

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**Efeitos do tratamento crônico com a clomipramina na
mediação de respostas aversivas pelo óxido nítrico**

Fabício de Araújo Moreira

Ribeirão Preto

2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FABRÍCIO DE ARAÚJO MOREIRA

Efeitos do tratamento crônico com a clomipramina na
mediação de respostas aversivas pelo óxido nítrico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de doutor em
Ciências. Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Ribeirão Preto

2006

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Moreira, Fabrício de Araújo

Efeitos do tratamento crônico com a clomipramina na mediação de respostas aversivas pelo óxido nítrico./ Fabrício de Araújo Moreira; Orientador: Francisco Silveira Guimarães.-
Ribeirão Preto, 2006.

66p.: il.

Tese (Doutorado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Óxido nítrico. 2. Respostas aversivas. 3. Clomipramina

“Muss es sein? Es muss sein!”

Beethoven, op.135

À minha família, nas minhas muitas e queridas
Minas Gerais onde, devagar, as janelas olham...

À Lígia, por ser parte de minha felicidade
serena (“*ananda*”).

AGRADECIMENTOS

Ao Ilmo. Sr. Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães, ou seja, ao Chico, pela serenidade e inteligência com as quais conduz seus alunos na “Divina Comédia” da vida acadêmica. Por transmitir idéias sólidas e instigantes e por aceitar as minhas, ainda que estas, por diversas vezes, estivessem fora do âmbito do presente projeto. Meu reconhecimento por favorecer um ambiente de discussões científicas, culturais, filosóficas e artísticas.

Aos Profs. Drs. Antônio de Pádua Carobrez, Frederico Guilherme Graeff, Guilherme de Araújo Lucas e Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira, que aceitaram o convite para compor a banca examinadora, de modo a dedicarem tempo à avaliação deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Márcio de Matos Coelho (UFMG), Fernando de Queiroz Cunha (USP), Hélio Zangrossi Júnior (USP), Maria Crisitina de Oliveira Salgado (USP), dentre outros, com quem convivi, aprendi e discuti o que o poeta Thiago de Mello chamaria de “as ensinanças da dúvida”.

A Eleni Tamburus Gomes, José Carlos de Aguiar e demais técnicos, por me auxiliarem e ensinarem, com tanta propriedade, os métodos da pesquisa. Meus sinceros reconhecimentos, pois o uso apropriado da técnica é determinante para o sucesso na ciência, na arte ou em quaisquer outras manifestações do intelecto humano.

Aos profissionais da Secretaria, Sônia Maria Stefanelli, Fátima Helena Ferreira Petean e José Waldik Ramón, por sanarem minhas dúvidas e me auxiliarem nos aspectos administrativos.

Aos meus poucos e estimados amigos, colegas e conhecidos (necessariamente nessa ordem), próximos ou distantes, presentes ou ausentes, novos ou antigos.

Que não tenha sido em vão o sacrifício dos animais experimentais. Que cada sopro de vida que se apagou tenha contribuído para o enaltecimento da natureza humana, por meio do conhecimento científico.

Este trabalho foi realizado com o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo N° 02/05406-0. Ficam meus agradecimentos a essa Fundação e ao assessor que acompanhou meu trabalho.

RESUMO: O óxido nítrico (NO) é um neurotransmissor gasoso, sintetizado pela sintase do óxido nítrico (*Nitric Oxide Synthase*, NOS). A distribuição dessa enzima no sistema nervoso central pode ser avaliada por meio de uma técnica denominada NADPH-diaphorase. A sua expressão é significativa em estruturas encefálicas implicadas na elaboração de comportamentos aversivos e relacionadas a transtornos psiquiátricos como ansiedade generalizada e pânico. Uma dessas estruturas é a matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPDL), onde a injeção de doadores de NO induz reações aversivas em ratos. Além disso, em ratos expostos a um predador, há um aumento na expressão da proteína Fos em neurônios positivos para a NADPH-diaforase nessa e em outras estruturas, sugerindo que esses neurônios estão ativos frente a essas situações. Tais estudos sustentam a hipótese de que o NO possa ser um dos neurotransmissores responsáveis pela elaboração de reações de natureza aversiva. Porém, não está claro se os seus efeitos são atenuados pela ativação de receptores que modulam essas reações, a exemplo dos receptores de serotonina e benzodiazepínicos, ou pela administração de fármacos utilizados no tratamento dos transtornos de ansiedade e do pânico. Portanto, o primeiro objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que a reação de fuga induzida pelo NO na MCPDL poderia ser inibida por agonistas de receptores de serotonina ou benzodiazepínicos. Testou-se também a hipótese de que a clomipramina, uma droga inibidora da re-captção de serotonina e de noradrenalina e utilizada no tratamento do transtorno do pânico, intensificaria os efeitos aversivos dos agonistas de serotonina. O segundo objetivo foi testar a hipótese de que a ativação de neurônios positivos para NADPH-diaforase, induzida pela exposição a um predador, poderia ser inibida pelo tratamento com a clomipramina. A injeção na MCPDL do agonista de receptores 5HT_{2A/2C} de serotonina (DOI, 8 nmol) ou do benzodiazepínico midazolam (80 nmol), mas não do agonista 5HT_{1A} (8-OH-DPAT, 8 ou 16 nmol), inibiu a reação de fuga induzida pela injeção local do doador de NO SIN-1 (150 nmol). Esses efeitos não foram modificados pelo tratamento crônico (21 dias) com a clomipramina (10 mg/kg/dia). A exposição de ratos a um gato induziu respostas defensivas e um aumento na expressão de Fos em neurônios positivos para a NADPH-diaphorase, efeitos parcialmente atenuados pelo tratamento com a clomipramina (20 mg/kg/dia). Em conclusão, os presentes resultados mostram que a participação do NO em respostas aversivas pode ser modulada por receptores de serotonina e benzodiazepínicos, e por um fármaco de ação panicolítica.

ABSTRACT: Nitric oxide (NO) is a gaseous neurotransmitter synthesized by Nitric Oxide Synthase (NOS). The distribution of this enzyme in the central nervous system can be determined through a technique called NADPH-diaphorase reaction. Its expression is significant in encephalic structures related to aversive behaviours and psychiatric disorders, such as generalized anxiety and panic. One of such structures is the dorsolateral periaqueductal gray (DLPAG), where the injection of NO-donors induces escape reactions in rats. Moreover, the exposure of rats to a predator induces an increase in Fos expression in NADPH-diaphorase positive neurons, suggesting that these neurons are activated by this stimulus. These studies support the hypothesis that NO may be a neurotransmitter mediating aversive reactions. However, it is not clear if the NO effects could be prevented by the activation of receptors that modulate these reactions, such as the serotonin- and the benzodiazepine-receptors, or by the administration of drugs employed in the treatment of anxiety and panic disorders. Therefore, the first aim of this study was to test the hypothesis that the escape reaction induced by NO-injection into the DLPAG could be prevented by serotonin- or benzodiazepine-receptors agonists. It was also tested the hypothesis that clomipramine, a serotonin and noradrenaline re-uptake inhibitor employed in the treatment of panic disorder, would enhance the effects of these 5-HT agonists. The second aim of this study was to test the hypothesis that the activation of NADPH-diaphorase positive neurons induced by predator exposure would be prevented by clomipramine treatment. The injection of the serotonin 5HT_{2A/2C}-receptor agonist DOI (8 nmol) or the benzodiazepine midazolam (80 nmol), but not the 5HT_{1A}-receptor agonist 8-OH-DPAT (8 ou 16 nmol), inhibited the escape reaction induced by the local injection of the NO-donor SIN-1 (150). These effects were not modified by the chronic treatment (21 days) with clomipramine (10 mg/kg/day). Cat exposure induced defensive reaction in rats, as well as an increased Fos-protein expression in NADPH-diaphorase positive neurons. These effects were partially prevented by clomipramine injections (20 mg/kg/day). In conclusion, these results show that the aversive effects of NO may be modulated by serotonin- and benzodiazepine receptors and by an anxiolytic and panicolytic drug.

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	1
1.1- Óxido nítrico	1
1.2-Respostas aversivas e estruturas subjacentes	2
1.3-Modelos para o estudo de respostas aversivas	4
1.4-Principais neurotransmissores envolvidos na mediação de respostas aversivas	7
1.5-Óxido nítrico e respostas aversivas	9
2-OBJETIVOS	11
2.1-Objetivo geral	11
2.2-Objetivos específicos	11
3-EFEITOS DE AGONISTAS DE RECEPTORES DE 5-HT OU BENZODIAZEPÍNICOS E DO TRATAMENTO CRÔNICO COM A CLOMIPRAMINA NAS RESPOSTAS AVERSIVAS INDUZIDAS PELA INJEÇÃO DE UM DOADOR DE NO NA MCPDL DE RATOS	12
3.1-Material e métodos	12
3.1.1-Animais.....	12
3.1.2-Drogas.....	12
3.1.3-Aparelhos.....	13
3.1.4-Procedimentos.....	13
3.2-Análises estatísticas	15
3.3-Resultados	16
4-EFEITOS DO TRATAMENTO COM A CLOMIPRAMINA NAS RESPOSTAS AVERSIVAS E NA ATIVAÇÃO DE NEURÔNIOS NADPH-DIAFORASE POSITIVOS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO DE RATOS A UM PREDADOR	27
4.1-Material e métodos	27
4.1.1-Animais.....	27
4.1.2-Drogas.....	27
4.1.3-Aparelhos.....	27
4.1.4-Procedimentos.....	28
4.2-Análise estatística	31
4.3-Resultados	32

5-DISCUSSÃO	42
5.1- Efeitos de agonistas de receptores de 5-HT ou benzodiazepínicos e do tratamento crônico com a clomipramina nas respostas aversivas induzidas pela injeção de um doador de NO na MCPDL de ratos	42
5.1.1-Efeitos da injeção local de agonistas de receptores de 5-HT ou benzodiazepínicos nas respostas aversivas induzidas pela injeção de um doador de NO na MCPDL.....	42
5.1.2-Efeitos do tratamento crônico com a clomipramina na modulação dos efeitos do NO pelos receptores de 5-HT.....	46
5.2- Efeitos do tratamento com a clomipramina nas respostas aversivas e na ativação de neurônios NADPH-diaforase positivos induzidas pela exposição de ratos a um predador	46
5.2.1-Dados comportamentais.....	46
5.2.2-Dados de imuno-histoquímica para Fos.....	48
5.2.3-Ativação de neurônios positivos para NADPHd e participação do NO nas respostas aversivas induzidas pelo predador.....	50
6-CONCLUSÕES	52
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8-APÊNDICE: PUBLICAÇÕES	67

1-INTRODUÇÃO

1.1-Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um gás cuja importância fisiológica seria descoberta após a observação de que algum fator liberado por células endoteliais media o relaxamento da musculatura lisa vascular induzido pela acetilcolina em artérias *in vitro* (FURCHGOT & ZAWADSKY, 1980). O NO foi identificado como esse fator relaxante derivado do endotélio na década de 1980 (IGNARRO *et al.*, 1987; PALMER *et al.*, 1987), com a subsequente descoberta de que a sua formação ocorre a partir do aminoácido L-arginina, formando quantidades equimolares de citrulina (PALMER *et al.*, 1988). A enzima catalizadora desse processo é a sintase do NO (*nitric oxide synthase*, NOS), que possui diversas isoformas, a neuronal (nNOS), a endotelial e a induzida. Ela depende de cálcio ou magnésio (cátions divalentes), de calmodulina e do co-fator nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH) para a sua atividade. O NADPH doa elétrons a um sítio redutase da NOS e estes são transferidos para um outro domínio, o sítio oxigenase, responsável por catalizar uma reação entre arginina e oxigênio formando o NO e a citrulina (ALDERTON *et al.*, 1995). Esse mediador exerce seus efeitos por meio da enzima guanilato-ciclase (GC), que converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (BREDT & SNYDER, 1989).

O NO foi identificado no sistema nervoso central como um mediador do aumento de GMPc induzido pelo aminoácido neurotransmissor glutamato (GARTHWAITE *et al.*, 1988; KNOWLES *et al.*, 1989). A sua formação em neurônios ocorre por uma via idêntica àquela presente em células endoteliais, sendo a NOS ativada pelo influxo de cálcio resultante da ligação de glutamato aos receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA) (GARTHWAITE *et al.*, 1989). As regiões cerebrais onde o NO atua como transmissor podem

ser deduzidas a partir da distribuição da NOS, identificada por técnicas de imunohistoquímica ou enzimáticas. Uma dessas técnicas é a NADPH-diaforase (NADPHd) onde se tira proveito da atividade de redutase da NOS, de modo que elétrons podem ser transferidos do co-fator NADPH para um aceptor artificial, como o *nitroblue tetrazolium* (NBT), levando à formação de um precipitado azul, o formazam, que marca os citosol de neurônios positivos para a NOS (DAWSON *et al.*, 1991; HOPE *et al.*, 1991). Por meio das técnicas de imunohistoquímica e NADPHd, demonstrou-se que, em ratos, essa enzima é expressa em diversas estruturas ao longo do encefálo, como a matéria cinzenta periaquedutal (MCP), o núcleo dorsal da rafe (NDR) e os colículos superior e inferior no mesencéfalo; a NOS também é significativamente expressa em alguns núcleos do hipotálamo, como o pre-mamilar dorsal (PMD) e o paraventricular (PVH); também é expressa em núcleos da amígdala, no núcleo intersticial da estria terminal, e em diversas regiões do córtex cerebral, como o giro do cíngulo (GC). (BREDT *et al.*, 1990; VINCENT & KIMURA, 1992).

1.2-Respostas aversivas e estruturas subjacentes

Algumas das regiões acima mencionadas são propostas como bases neuroanatômicas para a elaboração de comportamentos frente a estímulos que podem ameaçar a integridade ou a sobrevivência de um indivíduo. Essas respostas defensivas ou aversivas podem ser tanto de natureza ativa, de modo a levar o indivíduo a escapar do estímulo, quanto de natureza inibitória, levando o indivíduo a se esquivar. Quanto à interpretação desses estímulos como ameaçadores, esta pode ser inata ou aprendida (PANKSEPP, 1998; ROLLS, 1999). Esses comportamentos podem ser a expressão de emoções de natureza aversiva tanto em humanos quanto nos demais animais (DARWIN, 1872). Podem ainda ser a base evolutiva para transtornos psiquiátricos de ansiedade, como a ansiedade generalizada e o pânico, dentro de

uma perspectiva na qual são convergentes os estudos sobre a neurobiologia do comportamento defensivo e dos transtornos de ansiedade (GRAY & McNAUGHTON, 2000).

O estudo das estruturas encefálicas envolvidas nessas reações se faz empregando métodos de lesão, estimulação elétrica ou injeção de drogas em regiões específicas do encéfalo de animais experimentais (PANKSEPP, 1998; SEWARDS & SEWARDS, 2002). Soma-se a esses métodos a imuno-histoquímica para a Fos, uma proteína transcrita a partir do gene de expressão imediata *c-fos*. O processo de identificação e quantificação da Fos constitui uma técnica para se avaliar a atividade neuronal, na qual a expressão aumentada dessa proteína é um indício de que uma determinada estrutura possa ser importante para o processamento de um estímulo (CHAUDHURI, 1997; MORGAN & CURRAN, 1989).

Pelo método de estimulação elétrica no encéfalo de gatos, HESS (1943 apud FERNANDEZ DE MOLINA & HUNSPERGER, 1959) delimitou áreas do hipotálamo que, quando estimuladas, faziam com que os animais apresentassem respostas semelhantes às aquelas observadas frente a estímulos ameaçadores. Estudos posteriores vieram estender esses resultados à estimulação da amígdala e de regiões do tronco cerebral, onde se localiza a MCP (FERNANDEZ DE MOLINA & HUNSPERGER, 1959; FERNANDEZ DE MOLINA & HUNSPERGER, 1962; SKULTEITY, 1963; DELGADO, 1967). Que a estimulação dessas estruturas representa um estímulo aversivo tornou-se ainda mais evidente após as observações de que os ratos emitem comportamentos para interrompê-la, sugerindo que a essa estimulação representa um reforço negativo (OLDS, 1958; OLDS & OLDS, 1962). Esse conjunto de estruturas relacionadas aos comportamentos defensivos foi agrupada em um sistema encefálico composto pela MCP, pelo hipotálamo medial e pela amígdala, constituindo o Sistema Cerebral Aversivo. Essas estruturas foram propostas como a base neuroanatômica do comportamento defensivo e dos transtornos de ansiedade generalizada e pânico (GRAEFF, 1981; 1994). Outra teoria conectando os comportamentos defensivos com os transtornos de

ansiedade propôs que eles seriam parte de um Sistema de Inibição Comportamental (SIC), cujas bases neuroanatômicas seriam o septo e o hipocampo. Esse sistema compararia as informações sensoriais recebidas do ambiente com as esperadas e, havendo uma discrepância, ocorreria inibição de comportamentos não defensivos e a manifestação do comportamento defensivo, alerta e atenção para a fonte de ameaça (GRAY, 1982).

1.3-Modelos para o estudo de respostas aversivas

A MCP é uma estrutura dividida em colunas no seu eixo cranial-caudal, com base em aspectos morfológicos e funcionais. Essas colunas são a ventrolateral, a lateral e as colunas dorsomedial e dorsolateral (MCPDL), que compõem a MCP dorsal (MCPD) (BANDLER *et al.*, 2000; BEHBEHANI, 1995; CARRIVE, 1993). A MCP é uma estrutura importante para o processamento e controle de respostas nociceptivas, para a modulação de pressão arterial, lordose e comportamento defensivo (BEHBEHANI, 1995; LOVICK, 2000). A estimulação elétrica ou química da MCPD em animais experimentais resulta em comportamentos de escape ou fuga e em alterações autonômicas (como elevação de pressão arterial e de frequência cardíaca, sudorese e piloereção) que são semelhantes àqueles observados em animais frente a estímulos de medo inato ou em humanos sob ataques de pânico (BANDLER & CARRIVE, 1988; BECKET & MARSDEN, 1995; KRIEGER & GRAEFF, 1985; SCHENBERG *et al.*, 2001). Além disso, a estimulação da MCP em humanos ocasiona relatos de emoções aversivas semelhantes àquelas observada no transtorno do pânico (NASHOLD *et al.*, 1969).

O transtorno do pânico é tratado farmacologicamente com a administração crônica de inibidores da re-captção de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) e de noradrenalina, como a clomipramina, ou de inibidores seletivos da re-captção de 5-HT, como a fluoxetina (ARGYROPOULOS *et al.*, 2000; KASPER & RESINGER, 2001). Em ratos, esses fármacos

atenuam alguns componentes da reação de fuga resultante da estimulação elétrica da MCPD, como galopes e pulos (SCHEMBERG *et al.*, 2001; VARGAS *et al.*, 2001). Com base nos aspectos comportamentais e farmacológicos mencionados anteriormente, a estimulação da MCPD é proposta como um modelo de ataques de pânico (DEAKIN & GRAEFF, 1991; BECKET & MARSDEN, 1995; JENCK *et al.*, 1995; SCHEMBERG *et al.*, 2001).

Como alternativa aos modelos que empregam estimulação elétrica ou química, os comportamentos aversivos e seu substrato neuroanatômico podem ser estudados em situações onde os roedores são expostos a estímulos menos artificiais, baseados no seu próprio repertório de comportamentos. Em um desses modelos, o labirinto em cruz elevado (LCE), os ratos ou camundongos são expostos a um aparelho elevado, em forma de cruz, com dois braços abertos e dois fechados. Esse modelo baseia-se na preferência inata de ratos a espaços fechados, em contraposição aos abertos (MONTGOMERY, 1955). Ele apresenta preditabilidade farmacológica principalmente para as drogas ansiolíticas das classes dos barbituratos e dos benzodiazepínicos, que reduzem a aversão aos braços abertos do labirinto, fazendo com que os animais explorem mais esse ambiente (HANDLEY & MITHANI, 1984; PELLOW *et al.*, 1985; PELLOW & FILE, 1986).

Outro modelo foi desenvolvido a partir da adaptação de análises etológicas às condições experimentais de laboratório, pela avaliação dos comportamentos de camundongos ou ratos expostos a seus predadores (ratos e gatos, respectivamente) ou ao odor destes (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988; BLANCHARD & BLANCHARD, 1989; BLANCHARD *et al.*, 2003). Nesse paradigma, propõe-se um constructo teórico para cada comportamento emitido frente a esses estímulos. São observados comportamentos de congelamento quando o estímulo aversivo é potencial e difuso, como no caso do odor, o que estaria associado o transtorno de ansiedade. Por outro lado, podem ser observadas reações de fuga quando o perigo é proximal e localizável, como o no caso da presença proximal do

predador, o que estaria relacionado ao ataques observados no transtorno do pânico. (BLANCHARD & BLANCHARD, 1989; BLANCHARD *et al.*, 2003).

As análises acima mencionadas foram incorporadas à segunda versão da teoria do SIC, de modo a distinguir de forma mais clara as definições de ansiedade e pânico (GRAY & McNAUGHTON, 2000). Essa definição não refuta a importância da distância em relação ao estímulo, mencionada anteriormente, mas se baseia principalmente na direção da resposta, sendo ela de abordagem ou fuga. A ansiedade estaria relacionada a situações de aproximação da fonte de perigo, onde há conflito entre os sistemas de abordagem e o de fuga, e teria como base neuroanatômica a amígdala e sistema septo-hipocampal. O medo e o pânico estariam relacionados a situações aversivas onde não há conflito, mas sim a fuga, coordenada pela MCPD (GRAY & McNAUGHTON, 2000; McNAUGHTON & CORR, 2004; McNAUGHTON & GRAY, 2000).

Conforme mencionado em relação ao modelo de estimulação da MCPD, a convergência entre a farmacologia e o estudo do comportamento também ocorreu no modelo de exposição ao predador para a análise de substâncias ansiolíticas e panicolíticas (BLANCHARD *et al.*, 1997; GRIEBEL *et al.*, 1995). A preditabilidade farmacológica desse modelo pode ser deduzida a partir do provável significado da direção das respostas emitidas, conforme mencionado anteriormente. Ou seja, o tratamento crônico com fármacos de ação ansiolítica e panicolítica inibe tanto a esquiva quanto a fuga, enquanto a administração de fármacos de ação apenas ansiolítica, como os benzodiazepínicos, inibem preferencialmente a esquiva (BLANCHARD *et al.*, 1997; GRIEBEL *et al.*, 1995)

Além desses experimentos de exposição ao predador, foram desenvolvidos modelos de exposição de ratos ao odor de gato (DIELENBERG & McGREGOR, 2001; ZANGROSSI & FILE, 1992a). Esses modelos também foram caracterizados quanto à sua farmacologia,

principalmente com ansiolíticos benzodiazepínicos (DIELENBERG *et al.*, 1999; DIELENBERG & MCGREGOR, 2001; ZANGROSSI & FILE, 1992b).

As estruturas encefálicas importantes para a mediação do comportamento de ratos expostos a esses estímulos de medo inato vêm sendo estudadas pelos métodos de lesão e de imuno-histoquímica para a proteína Fos. Lesões do PMD ou da MCPD, por exemplo, reduzem de forma significativa o comportamento defensivo em ratos expostos ao predador, reforçando a hipótese de que essas estruturas são importantes na mediação dessas respostas (CANTERAS *et al.*, 1997; DIELENBERG *et al.*, 2004). Além disso, tanto o PMD quanto a MCPD apresentam um aumento significativo na expressão de Fos após a exposição de ratos ao predador (CANTERAS *et al.*, 1997, CANTERAS & GOTO, 1999). Essas estruturas e outras relacionadas aos transtornos de ansiedade, como o GC, diversos núcleos da amígdala e o PVH, também apresentam aumento de expressão de Fos em ratos expostos ao odor de gato (DIELENBERG *et al.*, 2001). Muitas das estruturas ativas nesses modelos são as mesmas que apresentam maior expressão de Fos após a exposição ao modelo de ansiedade do LCE (DUNCAN *et al.*, 1996a; SILVEIRA *et al.*, 1993). Além disso, essas estruturas são ativas após injeções sistêmicas de diferentes classes de drogas ansiogênicas (SINGEWALD *et al.*, 2003; SINGEWALD & SHARP, 2000), fornecendo um suporte ainda maior para a interpretação de que as estruturas responsáveis pelo comportamento defensivo frente a um predador são as mesmas responsáveis pelos transtornos de ansiedade.

1.4-Principais neurotransmissores envolvidos na mediação de respostas aversivas

Um dos métodos para a indução de reações aversivas ou defensivas pela MCPD é a injeção de aminoácidos excitatórios como a D,L-homocisteína (DLH) ou o próprio neurotransmissor glutamato (BECKET & MARSDEN, 1995; KRIEGER & GRAEFF, 1985). A injeção de agonistas seletivos para os receptores ionotrópicos de glutamato do subtipo

NMDA induzem efeitos similares (BITTENCOURT *et al.*, 2004). Além disso, a injeção de antagonistas desses receptores na MCPD induz efeitos do tipo ansiolítico no modelo do LCE (GUIMARÃES *et al.*, 1991). Em conjunto, esses dados sugerem que o glutamato e seus receptores sejam importantes na mediação de comportamentos aversivos.

Enquanto o glutamato induz reações de fuga na MCPD, outros neurotransmissores, a exemplo do ácido gama-aminobutírico (*gama-aminobutiric acid*, GABA) e da 5-HT, são importantes por inibi-las. Aparentemente, o GABA exibe uma função tônica na modulação das respostas aversivas elaboradas pela MCPD, uma vez que a injeção local de antagonistas do receptor ionotrópico do sub-tipo GABA-A (que promove o influxo de cloreto) induzem reações de fuga similares àquelas observada após a estimulação elétrica ou a injeção de aminoácidos excitatórios (BRANDÃO *et al.*, 1982). A injeção local de agonistas de receptores GABA-A ou de ansiolíticos benzodiazepínicos, que potencializam os efeitos mediados por esse receptor, inibem comportamentos de fuga induzidos pela estimulação elétrica da MCPD e induzem um efeito do tipo ansiolítico no modelo do LCE (AUDI & GRAEFF, 1984; RUSSO *et al.*, 1993).

Quanto à 5-HT, a injeção local dela própria ou de agonistas de receptores metabotrópicos dos subtipos 5-HT1A ou 5HT2 inibe as reações de fuga induzidas pela estimulação elétrica ou química da MCPD (BECKET *et al.*, 1992; NOGUEIRA & GRAEFF, 1995; SCHUTZ *et al.*, 1985). Além disso, o tratamento crônico com fármacos utilizados na terapia do transtorno do pânico potencializa os efeitos anti-aversivos da injeção local de agonistas 5HT1A ou 5-HT2, nos modelos de estimulação da MCPD em ratos (DE BERTOLI *et al.* 2006; JACOB *et al.*, 2002; MONGEAU & MARSDEN; 1997). A ação da 5-HT na MCPD pode ser importante para explicar o efeito terapêutico dos fármacos panicolíticos, que após o tratamento crônico agiriam por intensificar a via neuronal de 5-HT oriunda do NDR que se projeta para a MCPD (GRAEFF, 2002; 2004).

1.5-Óxido nítrico e respostas aversivas

O NO é um dos possíveis neurotransmissores envolvidos na mediação de respostas aversivas. A significativa presença da NOS em diversas estruturas responsáveis pela elaboração de comportamentos aversivos (VINCENT & KIMURA, 1992) sugere uma função para esse neurotransmissor em tais situações. A maior parte dos estudos investigando essa hipótese foi realizada na MCP.

Nessa estrutura, a NOS está presente de forma significativa na MCPDL, de modo a delimitá-la morfologicamente (ONSTOT *et al.*, 1993). Esse dado neuroanatômico sugere uma importância para o NO especificamente nessa coluna da MCP. Dando suporte a essa hipótese, a injeção de inibidores da NOS na MCPDL de ratos induz efeito do tipo ansiolítico no EPM (GUIMARÃES *et al.*, 1994). O mesmo se observa após a injeção de inibidores da GC ou de sequestradores de NO (GUIMARÃES *et al.*, 2005). Efeito do tipo ansiolítico também foi observado após a injeção sistêmica de inibidores da NOS (VOLKE *et al.*, 1995; VOLKE *et al.*, 1997), embora existam resultados contraditórios nesse aspecto (VALE *et al.*, 1998).

Corroborando a hipótese de que esse neurotransmissor seja importante na mediação de respostas aversivas pela MCPDL, a injeção de doadores de NO desencadeia comportamentos de fuga acompanhados de aumento na expressão de Fos em diversas estruturas relacionadas à elaboração de comportamentos defensivos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2000a). O mesmo efeito comportamental se observa após a injeção local de um análogo do GMPc, o 8-bromo-cGMP (DE OLIVEIRA *et al.*, 2001). Além disso, em ratos expostos a um gato, há um aumento na produção de NO na MCPDL, sugerindo que esse neurotransmissor possa ser importante na mediação de respostas aversivas induzidas pela exposição ao predador (CHIAVEGATTO *et al.*, 1998). Finalmente, o estresse de restrição em ratos aumenta a expressão de nNOS não só na MCPDL, mas também na amígdala medial e no PVH (DE OLIVEIRA *et al.*, 2000b) Já foi demonstrado também que, em ratos submetidos a restrição física, ocorre um aumento na

expressão de Fos em neurônios positivos para a NADPHd em diversas estruturas relacionadas ao estresse (KRUKOF & KALILI, 1997).

Apesar desses dados sugerirem uma participação do NO na mediação de respostas aversivas, ainda não está claro por quais mecanismos ele deve atuar, ou quais neurotransmissores podem modular as suas ações.

2-OBJETIVOS

2.1-Objetivo geral

Este estudo foi proposto para esclarecer alguns dos mecanismos que possam modular a ação do NO em repostas aversivas. A hipótese geral é que a injeção de drogas que inibem comportamentos aversivos atenuaria a mediação dessas repostas pelo NO.

2.2-Objetivos específicos

O primeiro objetivo desse projeto foi testar a hipótese de que a injeção local de agonistas de receptores de 5-HT ou benzodiazepínicos inibiria as repostas aversivas induzidas pela injeção de um doador de NO na MCPDL. Testou-se também a hipótese de que essa inibição seria potencializada pelo tratamento crônico com a clomipramina.

O segundo objetivo foi testar a hipótese de que o tratamento crônico com a clomipramina inibiria os comportamentos aversivos e a expressão de Fos em neurônios positivos para a NADPHd em ratos expostos a um predador. As estruturas analisadas foram especificamente aquelas que contém neurônios positivos para a NADPHd e que são propostas como base para a elaboração de comportamentos aversivos.

3-EFEITOS DE AGONISTAS DE RECEPTORES DE 5-HT OU BENZODIAZEPÍNICOS E DO TRATAMENTO CRÔNICO COM A CLOMIPRAMINA NAS RESPOSTAS AVERSIVAS INDUZIDAS PELA INJEÇÃO DE UM DOADOR DE NO NA MCPDL DE RATOS

3.1-Material e métodos

3.1.1-Animais

Para os experimentos dessa parte do trabalho, foram utilizados ratos Wistar machos, provenientes do Biotério Central do Campus da USP - Ribeirão Preto. Nos experimentos onde não houve injeção crônica de drogas, foram solicitados ao biotério ratos pesando entre 220-240 g, sendo estes imediatamente submetidos à cirurgia estereotáxica. Nos experimentos envolvendo tratamento crônico, foram solicitados ratos pesando entre 140-160 g e as cirurgias foram realizadas quando os animais atingiram os pesos adequados. Os animais foram mantidos aos pares, em gaiolas de acrílico (25 x 18 x 35 cm) no biotério do Laboratório de Psicofarmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sob condições ambientais controladas: Temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas entre 6 e 18 h). Água e alimento foram fornecidos *ad libitum*.

3.1.2-Drogas

O agonista de receptores 5HT1A 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina, ((±)8-OH-DPAT, SIGMA, 8 ou 16 nmol), o agonista de receptores 5HT2A/2C 1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)piperazina (R-(-)-DOI, SIGMA, 16 nmol), o benzodiazepínico maleato de midazolam (MDZ, ROCHE, 80 nmol) e o doador de NO 3-morfolinosidnonimina (SIN-1, RBI, 150 nmol) foram dissolvidos em solução salina (0,9% NaCl) para injeção intracerebral em um volume de 0,2 μL . O inibidor da re-captção de serotonina e noradrenalina

clomipramina (RBI, 10 mg/kg/dia) foi dissolvida em salina para injeção intraperitoneal em um volume de 10 mL/kg. As doses foram selecionadas com base em outros trabalhos onde essas drogas foram administradas pelas mesmas vias do presente trabalho (AUDI & GRAEFF, 1984; DE OLIVEIRA et al., 2000; MONGEAU & MARSDEN, 1997; NOGUEIRA & GRAEFF, 1995; VARGAS & SCHENBERG, 2001). Os anestésicos de ação geral 2,2,2-tribromoetanol (ALDRICH) e Uretana (ALDRICH) foram dissolvidos em salina e injetados por via intraperitoneal. O anestésico local Lidocaína (contendo Epinefrina 2%; HARVEY) foi injetado por via subcutânea e o antibiótico Pentabiótico veterinário Fort-Dodge (WIETH) foi injetado por via intramuscular.

3.1.3-Aparelhos

Para a avaliação comportamental foi utilizada uma arena circular, com 62 cm de diâmetro possuindo paredes de acrílico com 45 cm de altura e localizada em uma sala isolada, onde os comportamentos podiam ser observados por meio de câmera de vídeo e analisados em computador pelo programa Ethovision (versão 1.9; Noldus).

3.1.4-Procedimentos

Para a implantação das cânulas na MCPDL, os ratos (220-240 g), foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol 2,5% (10 mL/Kg, ip) fazendo-se, posteriormente, tricotomia na região dorsal da cabeça. Cada animal, depois de fixado em aparelho estereotáxico (David-Kopf, USA, 957), recebeu injeção de lidocaína (contendo epinefrina 2%) subcutânea na cabeça e injeção intramuscular de antibiótico no membro inferior (Pentabiótico veterinário, 0,2 mL). Depois de removidos os tecidos epiteliais e o perióstio para exposição do crânio, três orifícios foram perfurados nos ossos com uma broca dental, sendo dois para a inserção de parafusos de suporte e um para a inserção da cânula-guia. As cânulas utilizadas foram de 0,7

mm de diâmetro por 11 mm de comprimento (as agulhas para injeção foram de 12 mm), fixas ao crânio por um acrílico autopolimerizável. Posteriormente, um mandril de aço inoxidável, do mesmo comprimento, foi inserido da cânula para evitar a sua obstrução.

As coordenadas estereotáxicas para a inserção das cânulas na MCPDL foram obtidas do atlas de Paxinos & Watson (1997). A sutura utilizada como referência foi o lâmbida e as coordenadas foram as seguintes: Ântero-posterior zero, médio-lateral 1,9 mm (à direita), em ângulo de 16° em relação ao plano sagital, dorso-ventral 4 mm. Após a cirurgia, os animais foram mantidos próximos a uma lâmpada de 60 W, para evitar hipotermia, até completa recuperação. Posteriormente, permaneceram nas gaiolas por um período de 6 a 8 dias, aos pares, até a realização dos experimentos.

As drogas utilizadas foram dissolvidas imediatamente antes de cada experimento e preservadas em gelo e ao abrigo da luz. Fez-se cada injeção por meio de agulha (12 mm) inserida na cânula-guia (11 mm), com auxílio de uma bomba de perfusão. O volume e a duração das injeções foram de 0,2 µL e 20 segundos, respectivamente, sendo a agulha mantida por mais trinta segundos no interior da cânula, para evitar refluxo da solução injetada. O intervalo entre as injeções foi de 10 minutos, sendo o animal posto na arena logo após a última injeção. Nos experimentos envolvendo tratamentos crônicos, os ratos receberam injeções intraperitoneais durante 21 dias, sendo a última injeção 30 minutos antes do experimento. Ao término dos experimentos, os animais foram anestesiados com uretana (25%, 5 mL/Kg) via intraperitoneal e, posteriormente, perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo, por meio de uma bomba, com solução salina isotônica seguida de solução de formol 10%. Posteriormente, os cérebros foram isolados, acondicionados em formol a 10% por uma semana e cortados em criostato em secções de 50 µm e corados com azul de Nissl para a identificação do sítio de injeção (análise histológica).

3.2-Análises estatísticas

Foram considerados para as análises estatísticas apenas os animais cujas injeções ocorreram nos sítios adequados, conforme as verificações histológicas. Uma fotomicrografia representativa de um rato cuja cânula foi inserida na MCPDL está mostrada na figura 1. Para a análise da distância percorrida, não havendo homogeneidade de variâncias entre os grupos, os dados foram analisados após transformação logarítmica com a adição de 1. Esses dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, tendo os diferentes tratamentos (drogas) como fatores entre-grupos e o tempo como fator intra-grupos. Comparações post-hoc foram realizadas pela ANOVA seguida do teste de Duncan. O tempo de galope e o número de saltos foram analisados por teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney. Diferenças foram consideradas significativas ao nível de $p < 0,05$. Os gráficos estão apresentados em escalas semelhantes, de modo a permitir a comparação visual entre grupos de diferentes experimentos.

3.3-Resultados

Os resultados do primeiro experimento, avaliando os efeitos da injeção local 8-OH-DPAT sobre os comportamentos aversivos induzidos pela injeção de SIN-1 na MCPDL, podem ser vistos na figura 2 e na tabela 1. A ANOVA de medidas repetidas demonstrou uma diferença significativa entre os tratamentos [$F(4, 30)=3,97$; $p=0,01$] e um efeito significativo do fator tempo [$F(6,1, 184,9)=2,49$; $p=0,02$], sem uma interação entre esses dois fatores [$F(24,6, 184,9)=1,32$; $p=0,30$]. A ANOVA seguida do teste de Duncan demonstrou que houve uma tendência para o aumento de locomoção total no grupo recebendo injeção local de SIN-1 ($p<0,1$), sendo esse efeito significativo no grupo tratado com 8-OH-DPAT (16 nmol) seguido de SIN-1 (figura 2, painel superior). Esses grupos tiveram uma locomoção significativamente aumentada em alguns minutos da análise (figura 2, painel inferior). A análise pelo teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferenças significativas para o tempo total de galopes ($p=0,0026$) e para o número de pulos ($p=0,0004$). A análise post-hoc de Mann-Whitney demonstrou que o SIN-1 induziu um aumento significativo nesses parâmetros, efeitos não inibidos por nenhuma das doses de 8-OH-DPAT (tabela 1).

Os resultados do segundo experimento, avaliando os efeitos do DOI sobre os comportamentos aversivos induzidos pelo SIN-1, podem ser vistos na figura 3 e na tabela 1. A ANOVA de medidas repetidas demonstrou uma diferença significativa entre os tratamentos [$F(3, 22)=9,74$; $p=0,02$], além de um efeito do tempo [$F(4, 89,4)=2,70$; $p=0,035$] e de uma interação entre esses fatores [$F(12,2, 89,4)=1,97$; $p=0,036$]. A ANOVA seguida de Duncan demonstrou um aumento significativo na distância total percorrida apenas no grupo tratado com Salina e SIN-1, quando comparado ao grupo controle (figura 3, painel superior). O aumento de locomoção induzido pelo SIN-1 foi atenuado pelo DOI nos minutos 2, 3, 5 e 6 (figura 3, painel inferior). A análise pelo teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferenças significativas para o tempo total de galopes ($p=0,0033$) e para o número de pulos ($p=0,0483$).

A análise post-hoc de Mann-Whitney demonstrou que o SIN-1 induziu um aumento significativo nesses parâmetros, sendo os pulos significativamente inibidos pelo pré-tratamento com o DOI (tabela 1).

Os resultados do terceiro experimento, avaliando os efeitos do pré-tratamento com o midazolam sobre os comportamentos aversivos induzidos pelo SIN-1, podem ser vistos na figura 4 e na tabela 1. A ANOVA de medidas repetidas demonstrou uma diferença significativa entre os tratamentos [$F(3, 24)=6,35$; $p=0,0025$], além de um efeito do fator tempo [$F(3,8, 91,9)=5,28$; $p=0,001$] e uma interação entre esses fatores [$F(11,4, 91,9)=2,04$; $p=0,031$]. A ANOVA seguida de Duncan demonstrou que o SIN-1 induziu um aumento significativo na distância total percorrida e que esse efeito foi inibido pelo midazolam (figura 4, painel superior). Esse efeito foi observado nos minutos 3, 4, 5, 6, 8 e 9 (figura 4, painel inferior). A análise pelo teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferenças significativas para o tempo total de galopes ($p<0,0001$) e para o número de pulos ($p=0,0001$). A análise post-hoc de Mann-Whitney demonstrou que o SIN-1 induziu um aumento significativo nesses parâmetros, ambos significativamente inibidos pelo pré-tratamento com o midazolam (tabela 1).

Os resultados do quarto experimento, avaliando os efeitos do tratamento crônico com a clomipramina, seguida de injeção local de 8-OH-DPAT, sobre os comportamentos aversivos induzidos pela injeção de SIN-1 na MCPDL, podem ser vistos na figura 5 e na tabela 2. A ANOVA de medidas repetidas demonstrou uma diferença significativa entre os tratamentos [$F(4,28)=8,68$; $p<0,0001$] e um efeito do tempo [$F(9,20)=6,79$; $p=0,001$], sem interação entre esses fatores [$F(36,74)=1,21$; $p=0,242$]. A ANOVA seguida de Duncan demonstrou que a injeção local de SIN-1 induziu um aumento na distância total percorrida nos grupos tratados cronicamente com salina, quando comparados ao grupo controle (que recebeu apenas injeções locais de salina). O mesmo foi observado no grupo tratado cronicamente com a

clomipramina seguida de injeção local de 8-OH-DPAT (figura 5, painel superior). Esses grupos apresentaram um aumento significativo de locomoção em diversos minutos a análise (figura 5, painel inferior) A análise pelo teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferenças significativas para o tempo total de galopes ($p=0,0014$) e para o número de pulos ($p=0,0039$). A análise post-hoc de Mann-Whitney demonstrou que o SIN-1 induziu um aumento significativo nesses parâmetros em todos os grupos, exceto no grupo tratado com clomipramina seguida de salina, quando comparados com o grupo que recebeu apenas injeções locais de salina (tabela 2).

Os resultados do quinto experimento, avaliando os efeitos do tratamento crônico com a clomipramina, seguida de injeção local de DOI, sobre os comportamentos aversivos induzidos pela injeção de SIN-1 na MCPDL, podem ser vistos na figura 6 e na tabela 2. A ANOVA de medidas repetidas demonstrou uma diferença significativa entre os tratamentos [$F(4,38)=8,18$; $p<0,0001$]. Não houve efeito do tempo [$F(9,30)=0,217$; $p=0,68$] ou interação entre os fatores [$F(36,114)=1,61$; $p=0,30$]. A ANOVA seguida de Duncan demonstrou que a injeção local de SIN-1 induziu um aumento na distância total percorrida no grupo tratado cronicamente com salina, efeito este inibido pela injeção local de DOI (figura 6). A análise pelo teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferenças significativas para o tempo total de galopes ($p=0,009$) e para o número de pulos ($p=0,0045$). A análise post-hoc de Mann-Whitney demonstrou que o SIN-1 induziu um aumento significativo nesses parâmetros, que foram atenuados pela injeção local de DOI (tabela 2).

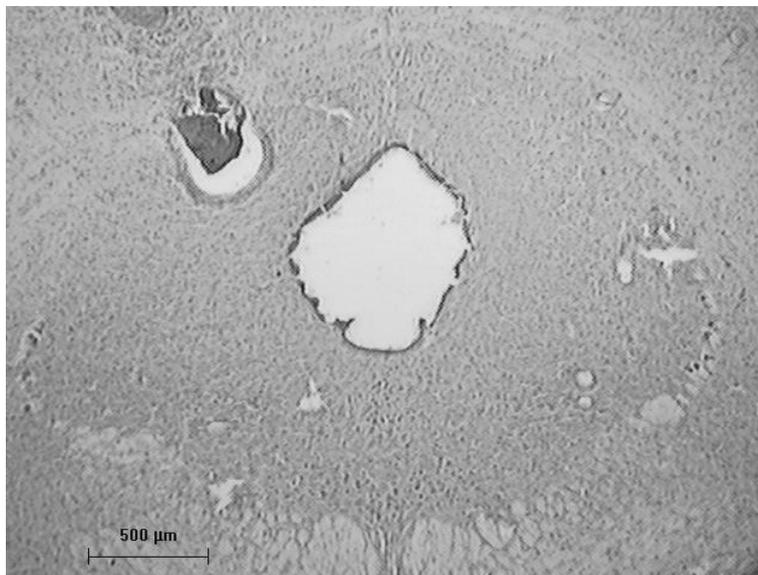


Figura 1: Fotomicrografia de um sítio de injeção na MCPDL de um rato.

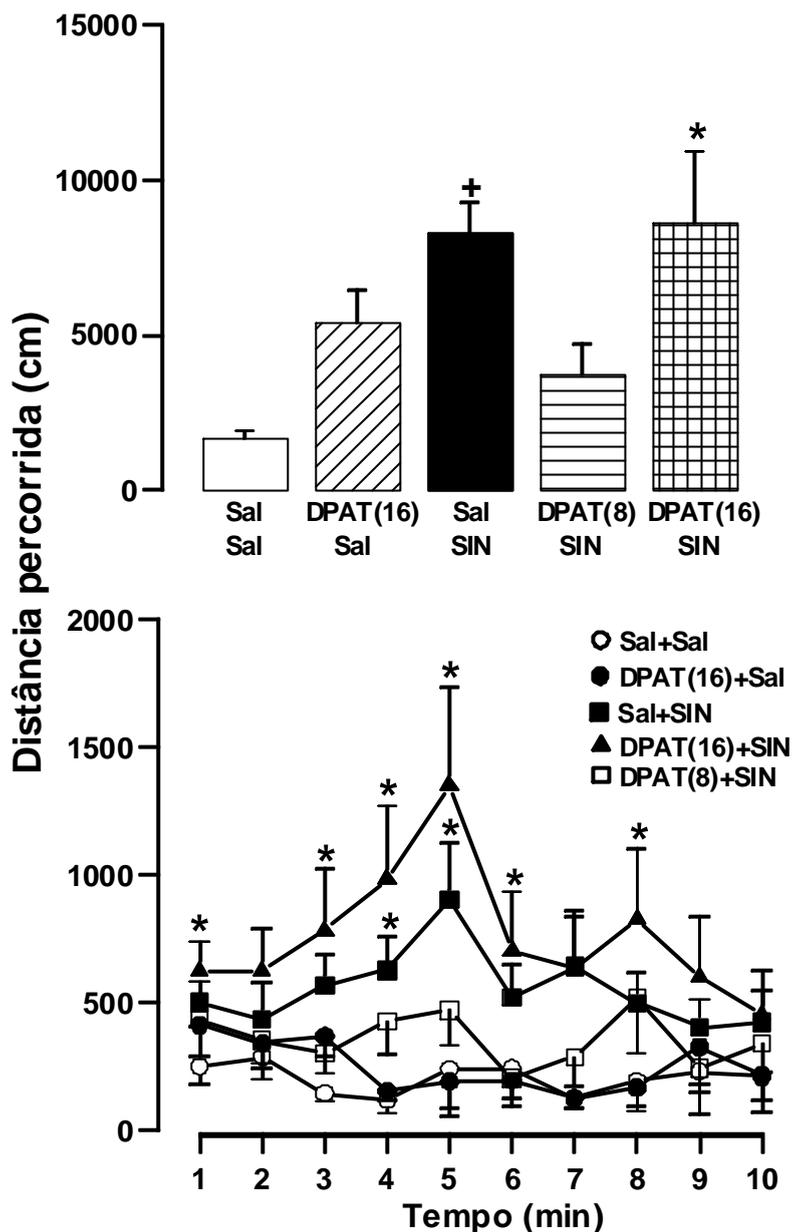


Figura 2: Efeitos de Salina (Sal) + Sal, 8-(OH)-DPAT (16 nmol) + Sal, Sal + SIN (150 nmol), 8-(OH)-DPAT (8 nmol) + SIN ou 8-(OH)-DPAT (16 nmol) + SIN injetados na MCPDL na distância percorrida por ratos na arena circular. Cada barra no painel superior representa a média±E.P.M para a distância total percorrida no período de 10 minutos. Cada ponto no painel inferior representa a média±E.P.M para a distância percorrida a cada minuto. * $p < 0,05$ e † $p < 0,1$ comparado ao grupo Sal + Sal (ANOVA seguida de Duncan; $n=6, 6, 9, 7, 7$).

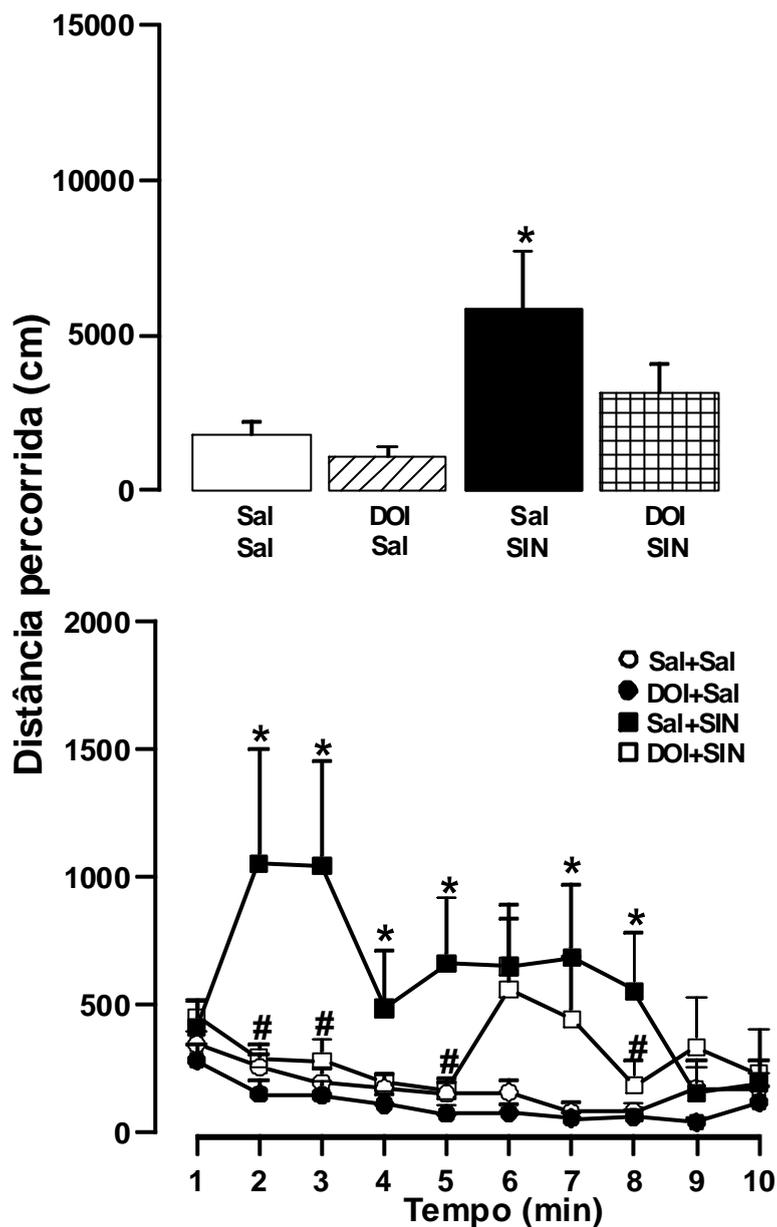


Figura 3: Efeitos de Salina (Sal) + Sal, DOI (16 nmol) + Sal, Sal + SIN (150 nmol) ou DOI + SIN injetados na MCPDL na distância percorrida por ratos na arena circular. Cada barra no painel superior representa a média±E.P.M para a distância total percorrida no período de 10 minutos. Cada ponto no painel inferior representa a média±E.P.M para a distância percorrida a cada minuto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sal + Sal; # $p < 0,05$ comparado ao grupo Sal + SIN (ANOVA seguida de Duncan; $n = 6, 7, 6, 7$).

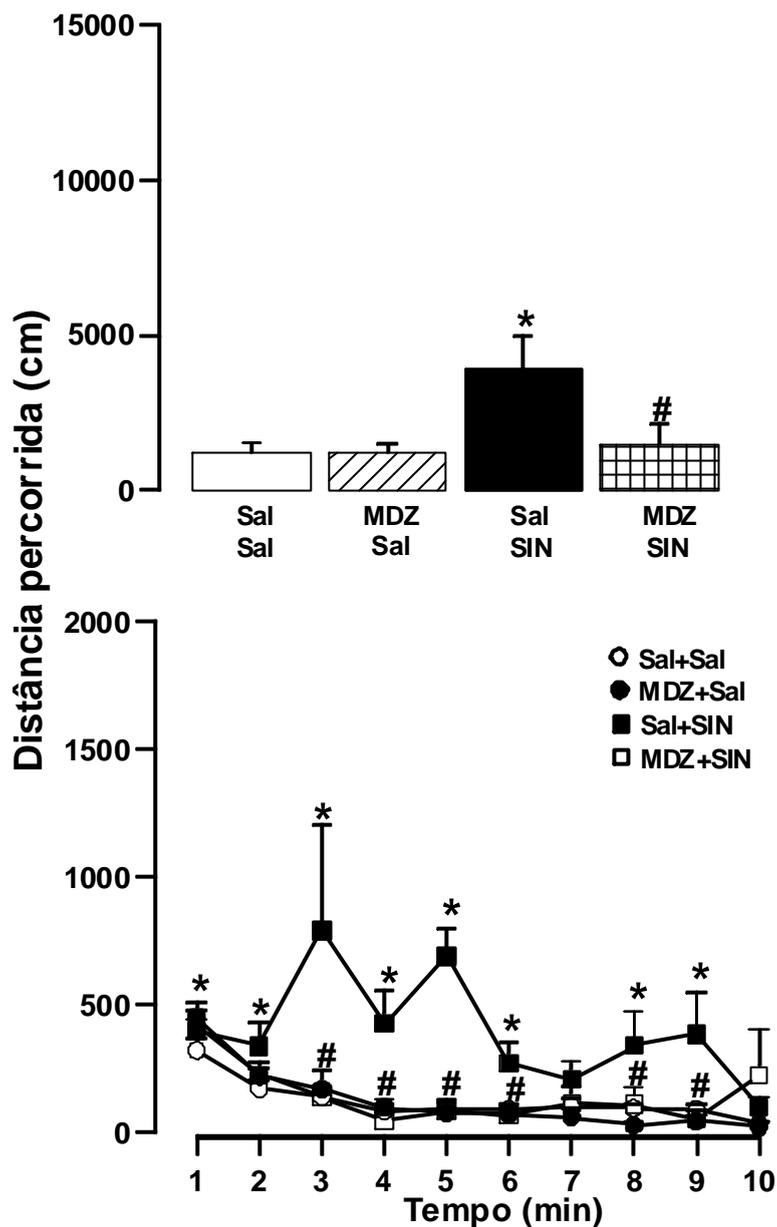


Figura 4: Efeitos de Salina (Sal) + Sal, midazolam (MDZ, 80 nmol) + Sal, Sal + SIN (150 nmol), MDZ + SIN injetados na MCPDL na distância percorrida por ratos na arena circular. Cada barra no painel superior representa a média±E.P.M para a distância total percorrida no período de 10 minutos. Cada ponto no painel inferior representa a média±E.P.M para a distância percorrida a cada minuto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sal + Sal; # $p < 0,05$ comparado ao grupo Sal + SIN (ANOVA seguida de Duncan; $n = 7, 6, 7, 8$).

Tabela: Média \pm E.P.M. para o tempo de galope e para o número de pulos observados por um período de 10 minutos após a injeção de Salina (Sal, 0,2 μ L), 8-OH-DPAT (8 ou 16 nmol), DOI (16 nmol), midazolam (MDZ, 80 nmol) ou SIN (150 nmol), na MCDPL de ratos.

	Tratamento	Galopes (s)	Pulos
Experimento 1	Sal + Sal (n=6)	0	0
	8-OH-DPAT (16) + Sal (n=6)	0	0
	Sal + SIN (n=9)	126,98 \pm 27,82*	5,56 \pm 1,70*
	8-OH-DPAT (8) + SIN-1 (n=7)	129,34 \pm 50,66*	5,14 \pm 2,36*
	8-OH-DPAT (16) + SIN(n=7)	61,33 \pm 20,97*	5,71 \pm 4,41*
	Experimento 2	Sal + Sal (n=6)	0
DOI + Sal (n=7)		0	0
Sal + SIN-1 (n=6)		132,05 \pm 61,55*	1,83 \pm 0,87*
DOI + SIN-1 (n=7)		58,56 \pm 26,83	0 [#]
Experimento 3	Sal + Sal (n=7)	0	0
	MDZ + Sal (n=6)	0	0
	Sal + SIN-1 (n=7)	83,34 \pm 16,81*	3,29 \pm 1,57*
	MDZ + SIN-1 (n=8)	0 [#]	0 [#]

*p<0.05 comparado ao grupo Sal + Sal.

[#]p<0.05 comparado ao grupo Sal + SIN (teste de Mann-Whitney).

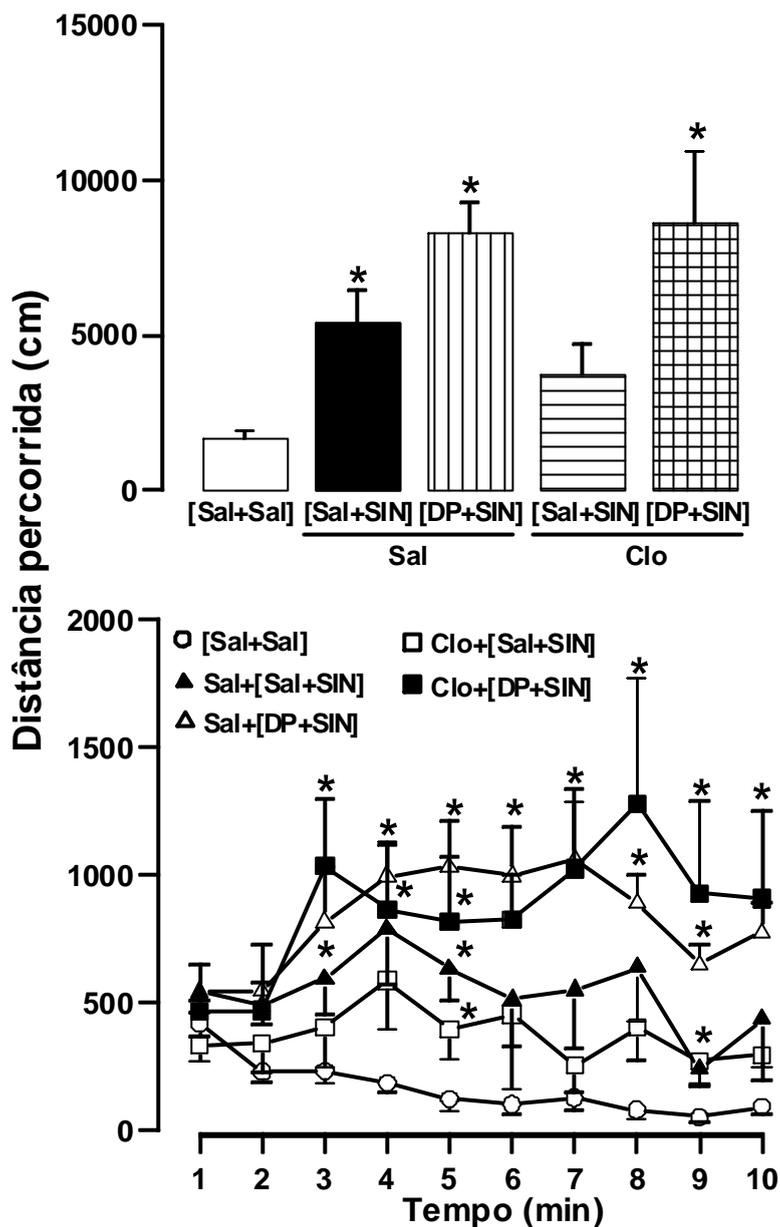


Figura 5: Efeitos de Salina (Sal) + Sal, 8-(OH)-DPAT (DP, 8 nmol) + Sal, Sal + SIN-1 (150 nmol) ou DP (8 nmol) + SIN-1, injetados na MCPDL, na distância percorrida por ratos tratados por 21 dias com Sal ou clomipramina (Clo, 10 mg/kg/dia). Cada barra no painel superior representa a média±E.P.M para a distância total percorrida no período de 10 minutos. Cada ponto no painel inferior representa a média±E.P.M para a distância percorrida a cada minuto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sal + Sal; # $p < 0,05$ comparado ao grupo Sal + SIN tratado cronicamente com salina (ANOVA seguida de Duncan; $n=6, 7, 6, 7, 7$).

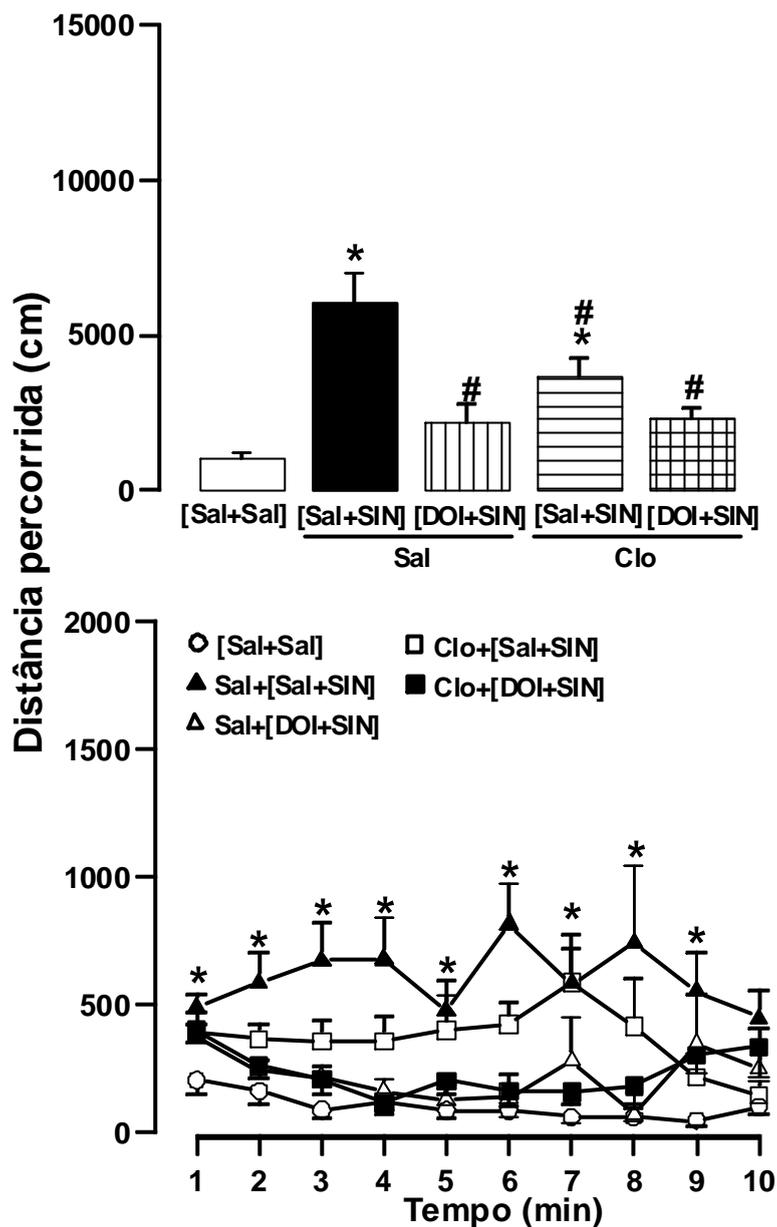


Figura 6: Efeitos de Salina (Sal) + Sal, DOI (16 nmol) + Sal, Sal + SIN-1 (150 nmol) ou DOI + SIN-1, injetados na MCPDL, na distância percorrida por ratos tratados por 21 dias com Sal ou Clomipramina (Clo, 10 mg/kg/dia). Cada barra no painel superior representa a média±E.P.M para a distância total percorrida no período de 10 minutos. Cada ponto no painel inferior representa a média±E.P.M para a distância percorrida a cada minuto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sal + Sal; # $p < 0,05$ comparado ao grupo Sal + SIN tratado cronicamente com salina (ANOVA seguida de Duncan; $n = 7, 10, 9, 8, 9$).

Tabela 2: Média \pm E.P.M. para o tempo de galope e para o número de pulos observados por um período de 10 minutos após a injeção de Salina (Sal, 0,2 μ L), 8-OH-DPAT (8), DOI (16 nmol) ou SIN (150 nmol), na MCDPL de ratos. Os animais foram tratados por 21 dias com Sal (1mL/kg) ou clomipramina (Clo, 10 mg/kg/dia).

	Tratamento	Galopes (s)	Pulos
Experimento 1	Sal + Sal (n=6)	0	0
	Sal + [Sal + SIN] (n=7)	125.31 \pm 23.34*	6.43 \pm 1.93*
	Sal + [DPAT + SIN] (n=6)	165.53 \pm 15.75*	10.33 \pm 1.99*
	Clo + [Sal + SIN] (n=7)	125.94 \pm 39.97*	2.00 \pm 0.65
	Clo + [DPAT + SIN] (n=7)	173.46 \pm 26.26*	4.71 \pm 2.21*
	Experimento 2	Sal + Sal (n=7)	0
Sal + [Sal + SIN] (n=10)		106.60 \pm 26.82*	7.90 \pm 2.34*
Sal + [DOI + SIN] (n=9)		14.32 \pm 8.65 [#]	1.67 \pm 0.83 [#]
Clo + [Sal + SIN] (n=8)		159.11 \pm 46.78*	2.50 \pm 1.18
Clo + [DOI + SIN] (n=9)		64.73 \pm 24.02*	1.00 \pm 0.67 [#]

*p<0.05 comparado ao grupo Sal + Sal.

[#]p<0.05 comparado ao grupo Sal + [Sal + SIN] (teste de Mann-Whitney).

4-EFEITOS DO TRATAMENTO COM A CLOMIPRAMINA NAS RESPOSTAS AVERSIVAS E NA ATIVAÇÃO DE NEURÔNIOS NADPH-DIAFORASE POSITIVOS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO DE RATOS A UM PREDADOR

4.1-Material e métodos

4.1.1-Animais

Ratos Wistar machos, pesando inicialmente 150-200 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP - Ribeirão Preto, foram mantidos em gaiolas de plástico no biotério do laboratório, sob condições ambientais controladas: Temperatura $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas entre 6 e 18 h). Água e alimento foram fornecidos *ad libitum*. Foi também utilizado um gato macho, fornecido pelo biotério central do campus da USP – RP. O animal foi requisitado a cada dia de experimento e permaneceu em uma sala isolada do laboratório no período em que não foi utilizado.

4.1.2-Drogas

A droga utilizada foi a clomipramina (RBI) dissolvida na concentração de 20 mg/mL em solução salina (NaCl 0,9%). O agente convulsivante pentilenotetrazol (PTZ, Sigma, 55 mg/kg), dissolvido em salina (55 mg/mL), foi utilizado em cada experimento como controle positivo para a indução da expressão da proteína Fos.

4.1.3-Aparelhos

O experimento foi realizado em uma caixa de acrílico retangular (comprimento x largura x altura: 100 x 22 x 35 cm) localizada em uma sala isolada, onde os experimentos foram observados por um monitor e filmados. A caixa consistia de dois compartimentos de tamanhos idênticos, separados por uma grade que impedia o contato entre o gato e o rato. Para

a análise dos dados, o compartimento do rato foi dividido, por uma linha imaginária, em metade proximal e metade distal ao compartimento do gato. Os experimentos filmados foram analisados em computador pelo programa Ethovision (versão 1.9; Noldus). Este programa detecta o animal experimental e possibilita a análise de diversos parâmetros, como a posição e a distância percorrida.

4.1.4-Procedimentos

Os ratos foram aleatoriamente separados em seis grupos experimentais. Os animais foram expostos a um gato de brinquedo (grupos “controles”) ou a um gato (grupos “expostos”). Dentro dos grupos “controles” ou “expostos”, foram divididos três subgrupos. O grupo salina crônica, que recebeu 21 injeções diárias de salina (1 mL/kg); o grupo clomipramina aguda, que recebeu 20 injeções diárias de salina e uma injeção de clomipramina (20 mg/kg) no dia do experimento; o grupo clomipramina crônica, que recebeu 21 injeções diárias de clomipramina (20 mg/kg). Foram realizados quatro experimentos, até que se completasse um número de 6 a 7 ratos por grupo. Cada sessão experimental continha pelo menos 1 rato de cada grupo.

Nos três dias anteriores ao experimento, os ratos foram manipulados e pré-expostos à caixa por 10 minutos, para habituação. Os experimentos foram realizados no 21^o dia, 30 minutos após as injeções. Cada rato foi exposto à caixa contendo um gato de brinquedo ou o gato, por um período de 10 minutos. Para evitar interferência devida ao odor do gato, os grupos expostos ao gato de brinquedo foram avaliados antes daqueles expostos ao gato em cada sessão experimental.

Duas horas após o término da exposição ou da injeção de PTZ, os animais foram anestesiados com uretana (25%, 1 mL/Kg) via intraperitoneal para a perfusão. Através do ventrículo cardíaco esquerdo, por meio de uma bomba, os ratos foram perfundidos com 250

mL de solução salina isotônica seguida de 150 mL de solução de paraformaldeído (PFA) 4% em tampão fosfato 0,1 mol/L preparado com salina (TFS, pH=7,4). Em seguida, foram decapitados para a remoção dos encéfalos. Estes foram pós-fixados em PFA 4% em TFS 0,1 mol/L, durante 2 horas, e crioprotetidos em solução de sacarose 30% em TFS 0,01 mol/L, durante 2 dias.

Após esse período, os encéfalos foram congelados em isopentana em gelo seco, para serem cortados em um criostato. Foram cortadas as fatias (40 μ m) contendo as estruturas a serem quantificadas, conforme identificadas nos planos do Atlas de Paxinos & Watson (1997). As estruturas, os planos do atlas e a distância em relação à sutura bregma foram as seguintes (figura 7): GC (plano 14; 1 mm); PVH, região parvocelular (plano 25; -1,80); PMD (plano 34; -4,16 mm); MCDPL (plano 48; -7,64 mm); o NDR (plano 50; -8,00 mm).

As fatias foram coletadas em TFS 0,1 mol/L para os ensaios de imuno-histoquímica. Para a marcação da proteína Fos, essas fatias foram transferidas para cubas de histoquímica, onde foram submetidas aos protocolos descritos a seguir, sempre sob agitação. O TFS 0,1 mol/L foi utilizado tanto como solvente (a não ser quando especificado de outra forma) como para lavar as cubas após a drenagem de cada solução utilizada (três lavagens de 5 minutos cada).

No primeiro passo, as fatias foram lavadas com H₂O₂ 1%, para a diminuição da atividade peroxidase endógena. Adicionou-se, em seguida, albumina sérica bovina 1% (ASB), para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação. Enfim, adicionou-se o anticorpo primário policlonal de coelho (Santa Cruz Biotechnology), que se liga aos resíduos 2-16 da proteína Fos. Esse anticorpo foi diluído a 1:1000 em TFS 0,1% contendo Triton 0,2% e ASB 0,1% (TFS+). As fatias imersas na solução do anticorpo permaneceram sob agitação por 14 h.

Após esse período, adicionou-se o anticorpo secundário biotilado policlonal de cabra, diluído a 1:1000 em TFS+, permanecendo as cubas sob agitação por 1 h.

Posteriormente, adicionou-se o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratoies) diluído a 1:1500, ao que se seguiu mais uma agitação de 1 h. Enfim, adicionou-se o revelador tetracloreto de 3,3-di-amino-benzidina (DAB), a 5 mg/100 mL em TFS, contendo H₂O₂ 0,02%, sob agitação por 10 min.

Após esse protocolo, a marcação para Fos pode ser vista como pontos marrons nos núcleos dos neurônios. Concluídas essas etapas, realizou-se o protocolo de marcação para NADPHd nessas mesmas fatias.

Para tal, adicionaram-se às cubas as soluções seguintes. Tampão fosfato 0,1 mol/L; Triton 0,3%; βNADPH 1 mg/mL; NBT 0,1 mg/mL. Imediatamente após a adição dessas soluções, as cubas permaneceram sob agitação em banho a 38°C e ao abrigo da luz, por um período de 1 h.

Após esse protocolo, são visualizados neurônios com citoplasmas azuis (positivos para NADPHd), neurônios com núcleos marrons (positivos para Fos) e os neurônios com ambas as características (células com dupla marcação).

As fatias foram estendidas em lâminas previamente gelatinizadas. Em seguida, as lâminas foram desidratadas através de uma série de álcoois (70%, 80%, 95% e 100%, 5 minutos cada), clareadas em xilol e cobertas com Permount e lamínulas.

As lâminas foram quantificadas de forma cega, com um aumento de 20 vezes, em um microscópio Olympus BX50. O programa utilizado para a quantificação foi o Image Pro-Plus. Uma fotomicrografia representativa de células positivas para Fos, NADPHd ou duplamente marcadas pode ser vista na figura 8.

4.2-Análise estatística

Os dados comportamentais analisados foram o tempo de permanência na parte proximal ao compartimento oposto e a distância total percorrida durante os 10 minutos de observação. Esses dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney. Para os dados de imuno-histoquímica, a densidade de células positivas para NADPHd ou Fos, bem como o percentual de células NADPHd que expressam Fos (percentagem de dupla marcação), foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de $p < 0,05$.

4.3-Resultados

Os tempos em que os ratos permaneceram próximos ao compartimento oposto, durante a exposição ao gato de brinquedo ou ao gato, podem ser vistos na figura 9, painel superior. A análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis revelou uma diferença significativa entre os grupos ($p=0,018$). A análise post-hoc de Mann-Whitney demonstrou que, quando comparado com o grupo “salina – controle”, o grupo “salina – exposto” permaneceu menos tempo próximo ao compartimento oposto, sugerindo que a exposição ao predador induziu uma resposta aversiva. Ao contrário do grupo “salina – exposto”, os grupos expostos tratados com clomipramina (20 mg/kg/dia) aguda ou crônica não diferiram do grupo “salina – controle”, o que sugere que a clomipramina atenuou a resposta aversiva induzida pela exposição ao predador. A distância total percorrida durante os 10 min da exposição pode ser vista na figura 2, painel inferior. A análise pelo teste de Kruskal-Wallis revelou que há diferença significativa entre os grupos ($p=0,048$). Segundo a análise post-hoc de Mann-Whitney, apenas o grupo tratado com clomipramina crônica e exposto ao gato difere do grupo “salina – controle”.

Os dados de imuno-histoquímica na MCPDL podem ser vistos na figura 10. Não há diferença entre os grupos quanto à densidade de células positivas para NADPHd [$F(5,34)=1,97$; $p=0,11$]. Para a densidade de células positivas para Fos, a ANOVA revelou uma tendência para diferença entre os grupos [$F(5,34)=2,31$; $p=0,0658$]. A análise com o teste de Duncan revelou que apenas o grupo “salina – exposto”, mas não aqueles tratados com clomipramina, difere do grupo “salina – controle”. A ANOVA revelou que não houve diferença significativa no percentual de células positivas para NADPHd que expressam Fos [$F(5,34)=1,49$; $p=0,22$]. Porém, a análise post-hoc com o teste de Duncan revelou um aumento significativo nos grupos “clomipramina aguda – controle” e “salina – exposto”.

Os dados de imuno-histoquímica no NDR podem ser vistos na figura 11. Não há diferença entre os grupos quanto à densidade de células positivas para NADPHd [$F(5,34)=0,42$; $p=0,83$.] ou Fos [$F(5,34)=1,53$; $0,21$]. Também não houve diferença significativa no percentual de células NADPHd-positivas que expressam Fos [$F(5,34)=1,23$; $p=0,32$].

Os dados de imuno-histoquímica no PMD podem ser vistos na figura 12. Não há diferença entre os grupos quanto à densidade de células positivas para NADPHd [$F(5,27)=0,77$; $p=0,58$] ou Fos [$F(5,27)=1,06$; $p=0,40$]. Também não houve diferença significativa no percentual de células NADPHd-positivas que expressam Fos [$F(5,27)=0,83$; $p=0,53$].

Os dados de imuno-histoquímica no PVH podem ser vistos na figura 13. A ANOVA revelou que não há diferença entre os grupos quanto ao número de células positivas para NADPHd ($F(5,34)=0,52$; $p=0,76$). Quanto ao número de células positivas para Fos, há uma diferença significativa entre os grupos ($F(5,34)=2,76$, $p=0,03$). A análise com o teste de Duncan revelou que os grupos expostos ao gato tratados com clomipramina diferem do grupo “salina – controle”. Houve diferenças significativas quanto ao percentual de células NADPHd-positivas que expressam Fos, $F(5,34)=2,56$ ($p=0,045$). A análise post-hoc com o teste de Duncan revelou que todos os grupos expostos ao gato diferem do grupo “salina – controle”

Os dados de imuno-histoquímica no GC podem ser vistos na figura 14. A ANOVA revelou que não há diferença entre os grupos quanto ao número de células positivas para NADPHd ($F(5,33)=1,68$, $p=0,17$). Quanto ao número de células positivas para Fos, há uma diferença significativa entre os grupos ($F(5,33)=5,59$, $p=0,0008$) e a análise com o teste de Duncan revelou que apenas o grupo “salina – exposto” difere do grupo “salina – controle”. Praticamente não há células duplamente marcadas nessa estrutura.

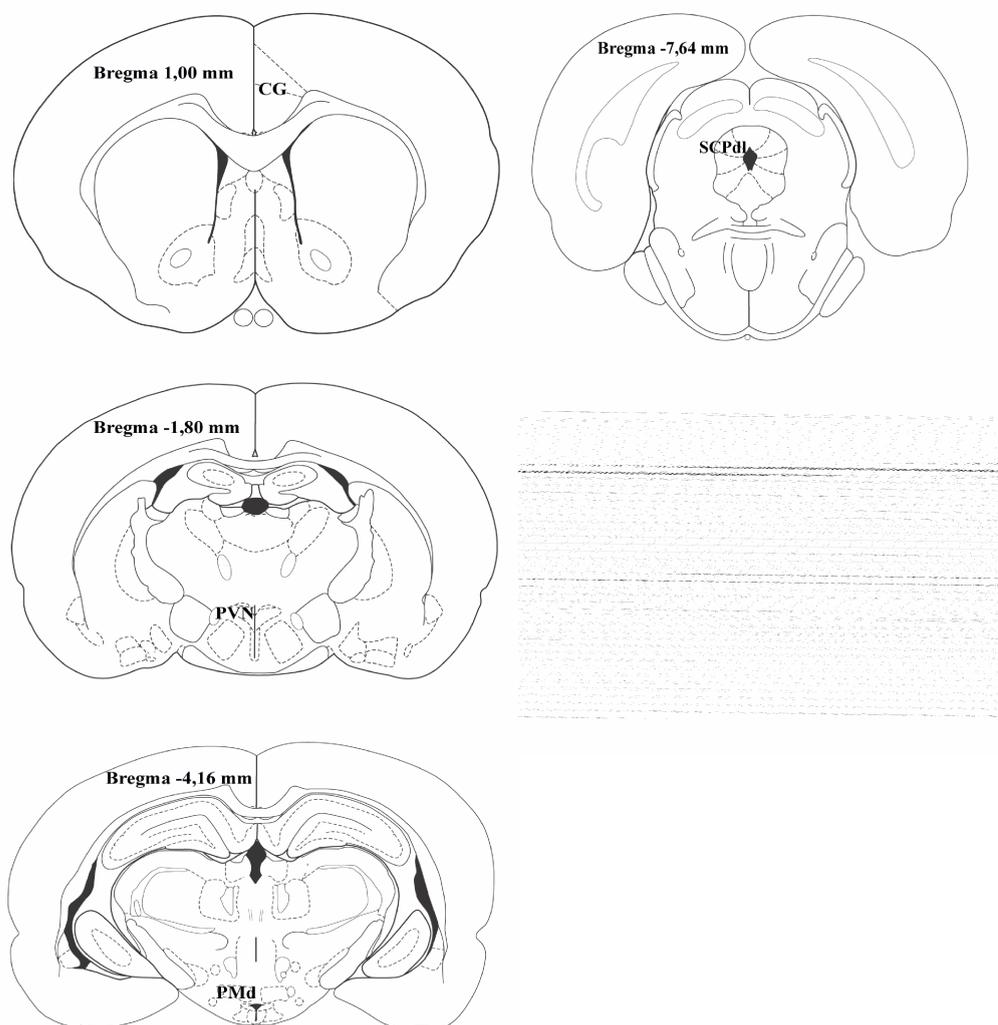


Figura 7: Ilustrações do atlas de Paxinos & Watson (1997) de secções coronais do encéfalo de rato contendo as estruturas quantificadas.

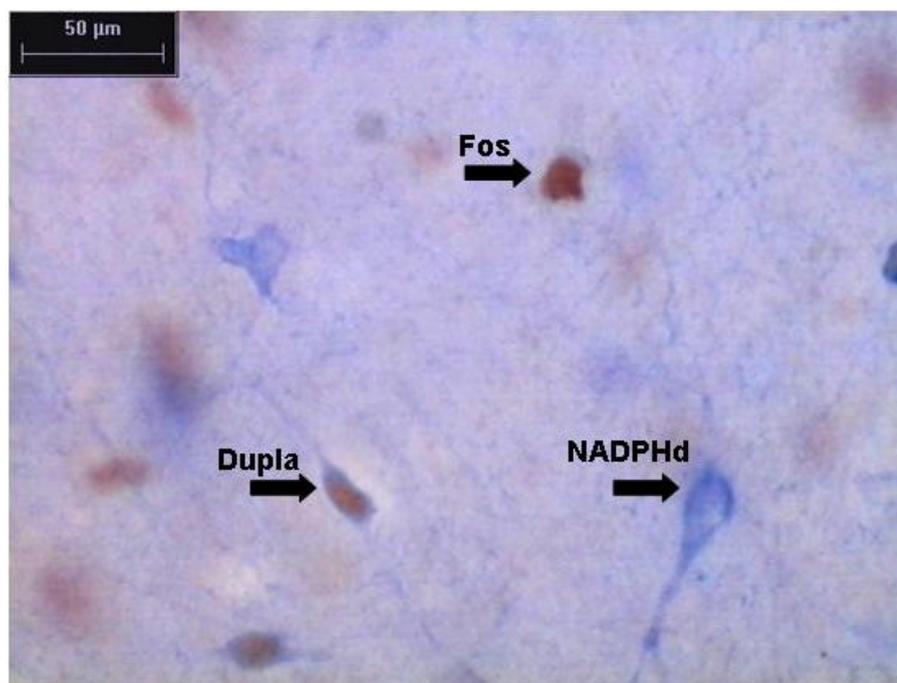


Figura 8: Fotomicrografia representativa de células marcadas para Fos, NADPH-d ou duplamente marcadas na MCPDL de ratos.

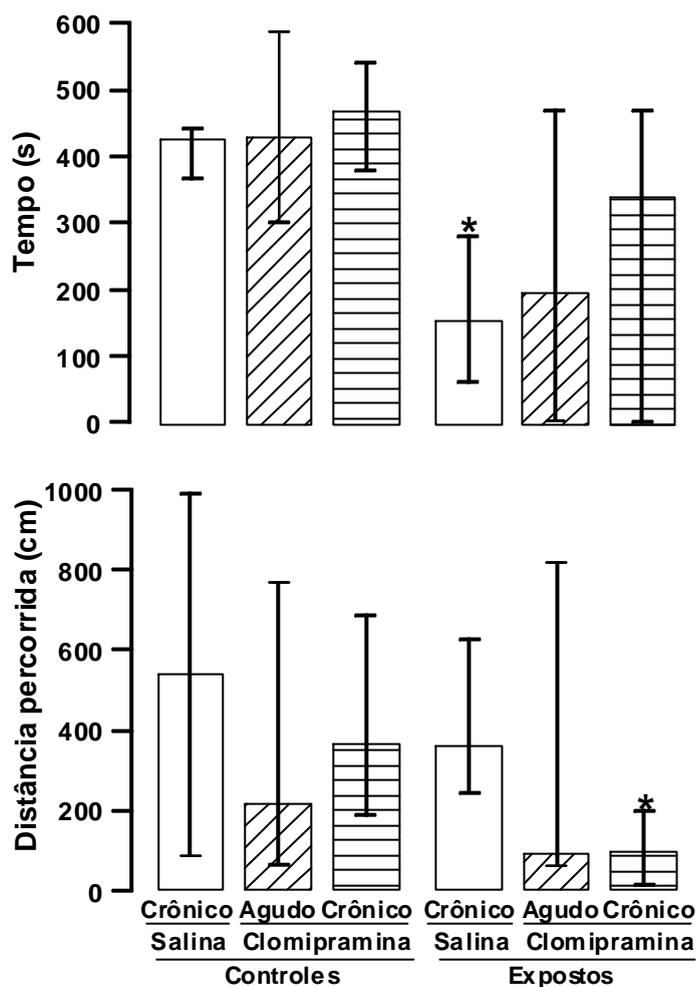


Figura 9: Efeitos do tratamento com salina ou clomipramina (20 mg/kg/dia) no comportamento de ratos expostos a um gato de brinquedo (controles) ou a um gato (expostos) durante 10 minutos. Cada barra representa a mediana \pm percentis para o tempo de permanência próximo ao compartimento oposto (painel superior) ou para a distância total percorrida (painel inferior). * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina-controle (teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; $n=7,6,7,7,6,7$).

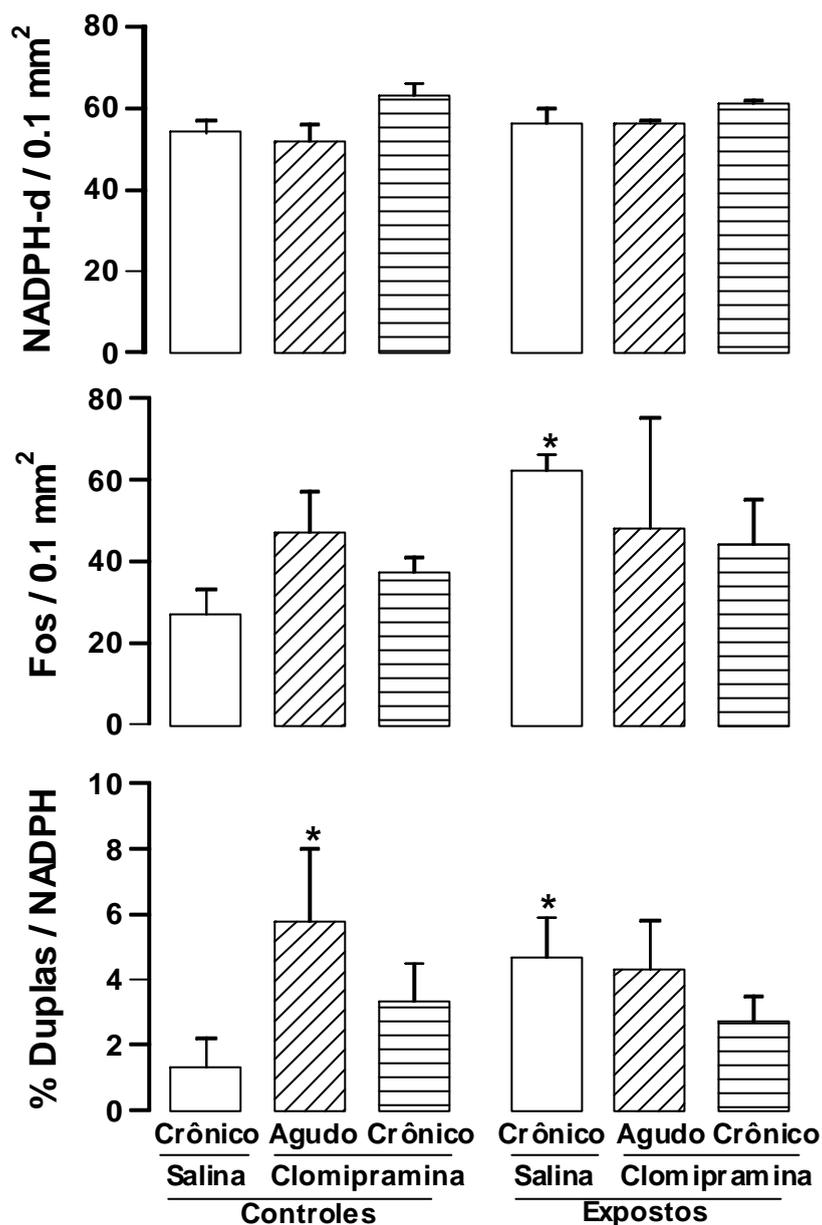


Figura 10: Efeitos do tratamento com salina ou clomipramina (20 mg/kg/dia) na densidade de células positivas para NADPHd (painel superior), Fos (painel central) ou no percentual de células NADPHd que expressam Fos (painel inferior) na MCPDL de ratos expostos a um predador durante 10 minutos. Cada barra representa a media \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina-controle (ANOVA seguida de Duncan; $n=7, 6, 7, 7, 6, 7$).

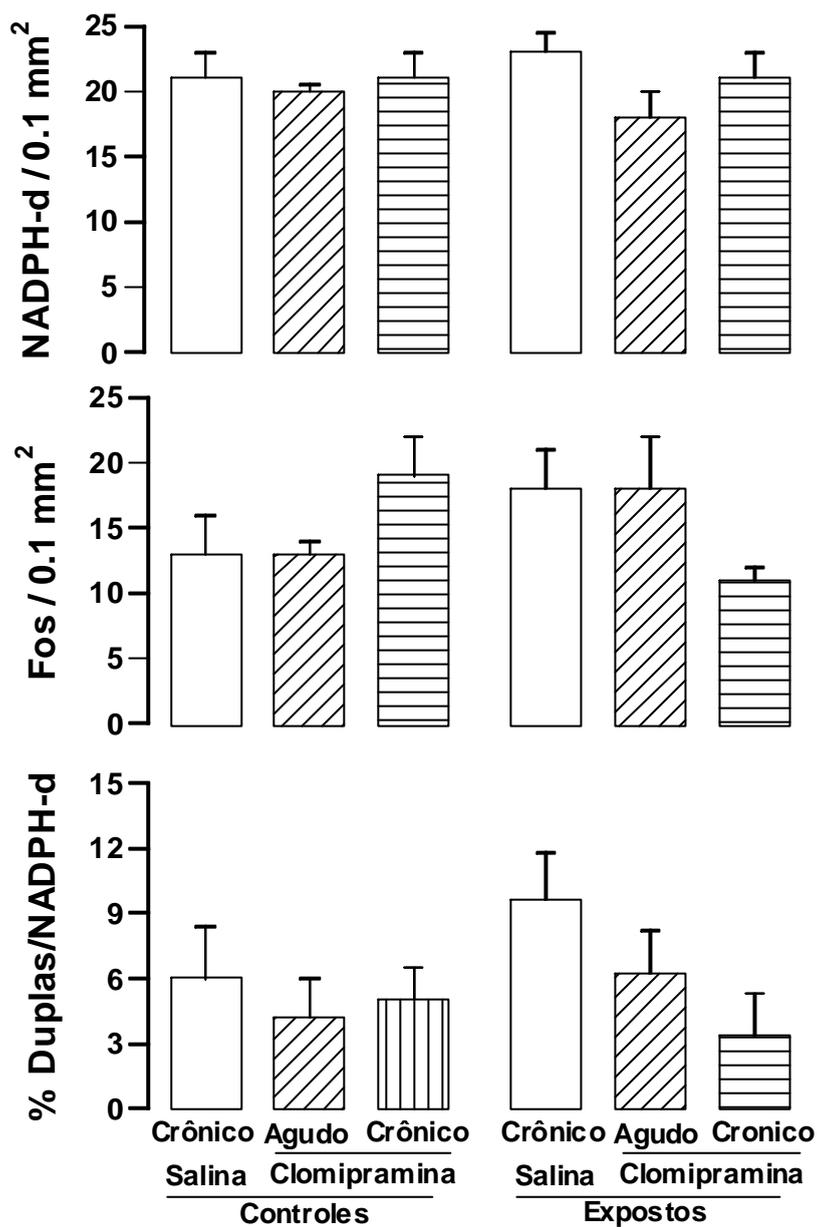


Figura 11: Efeitos do tratamento com salina ou clomipramina (20 mg/kg/dia) na densidade de células positivas para NADPHd (painel superior), Fos (painel central) ou no percentual de células NADPHd que expressam Fos (painel inferior) no NDR de ratos expostos a um predador durante 10 minutos. Cada barra representa a média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina-controle (ANOVA seguida de Duncan; $n = 7, 6, 7, 7, 6, 7$).

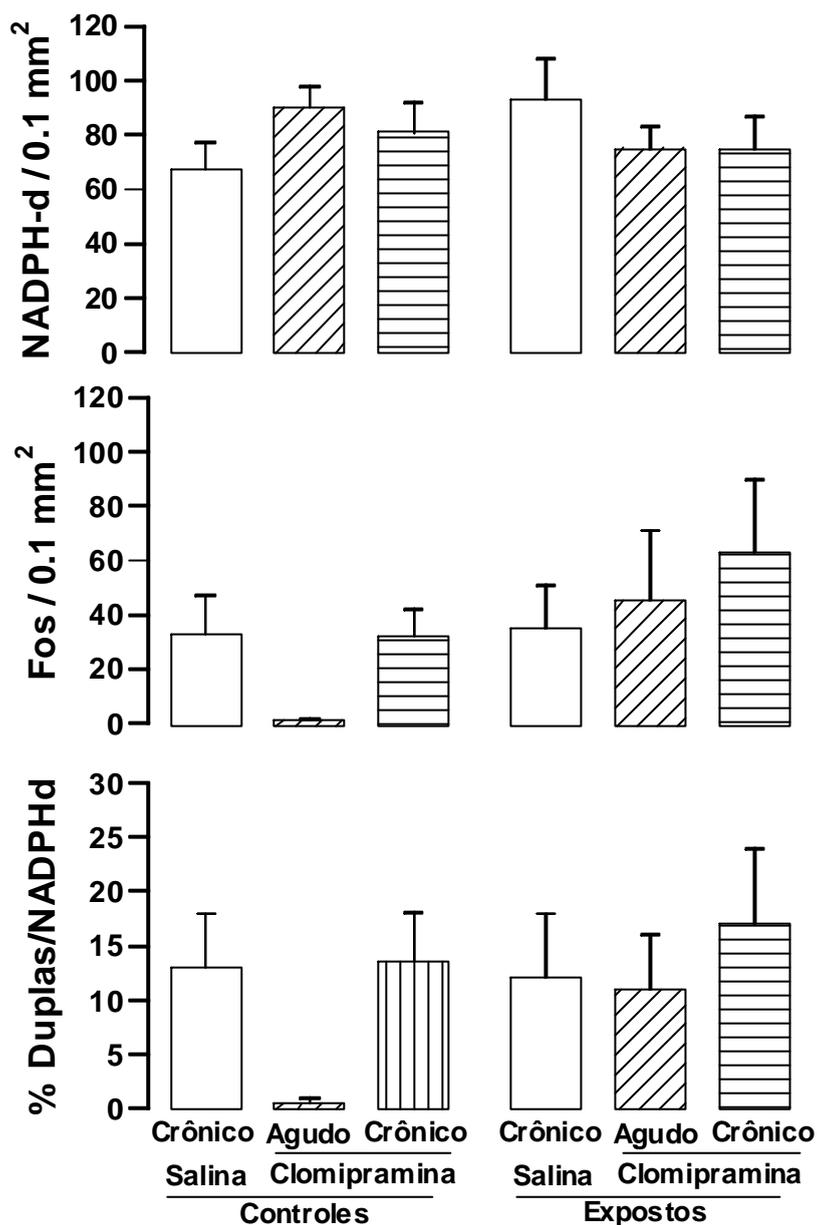


Figura 12: Efeitos do tratamento com salina ou clomipramina (20 mg/kg/dia) na densidade de células positivas para NADPHd (painel superior), Fos (painel central) ou no percentual de células NADPHd que expressam Fos (painel inferior) no PMD de ratos expostos a um predador durante 10 minutos. Cada barra representa a média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina-controle (ANOVA seguida de Duncan; $n = 7, 4, 6, 5, 5, 6$).

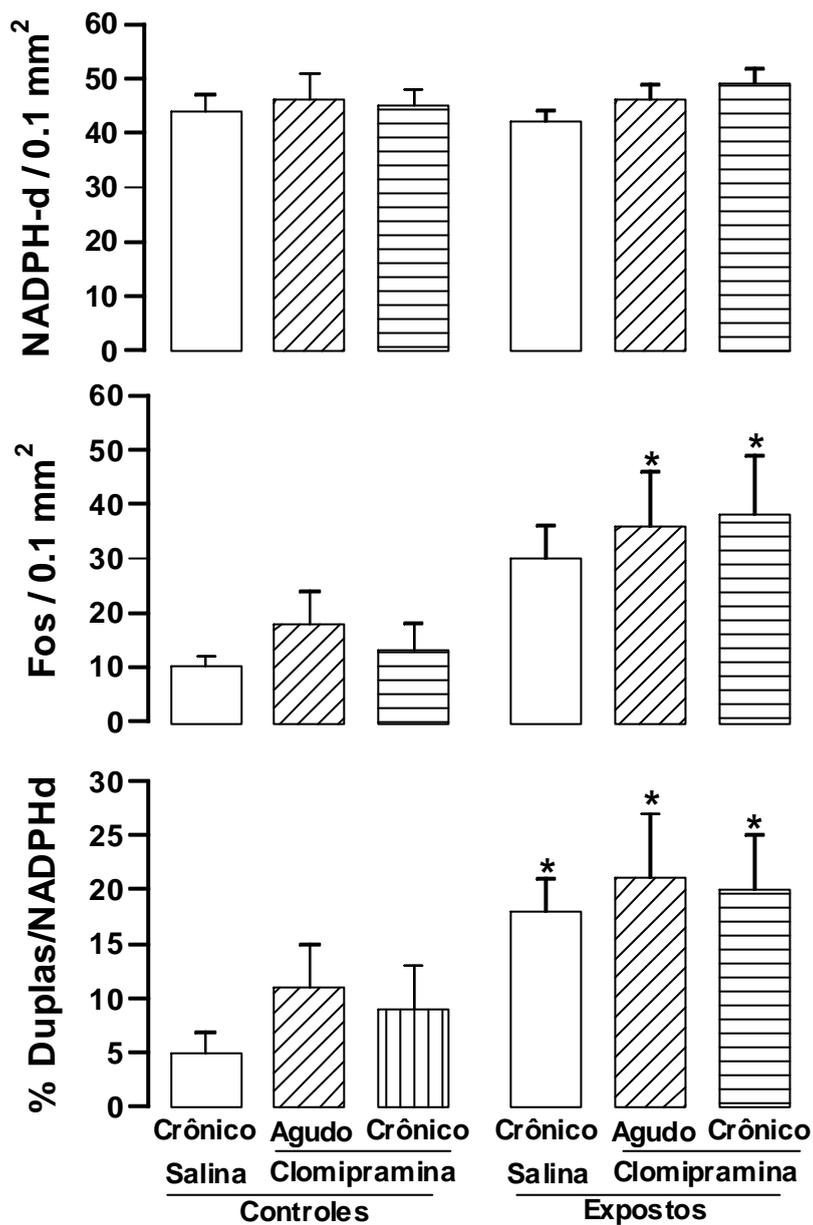


Figura 13: Efeitos do tratamento com salina ou clomipramina (20 mg/kg/dia) na densidade de células positivas para NADPHd (painel superior), Fos (painel central) ou no percentual de células NADPHd que expressam Fos (painel inferior) no PVH de ratos expostos a um predador durante 10 minutos. Cada barra representa a média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina-controle (ANOVA seguida de Duncan; $n = 7, 6, 7, 7, 6, 7$).

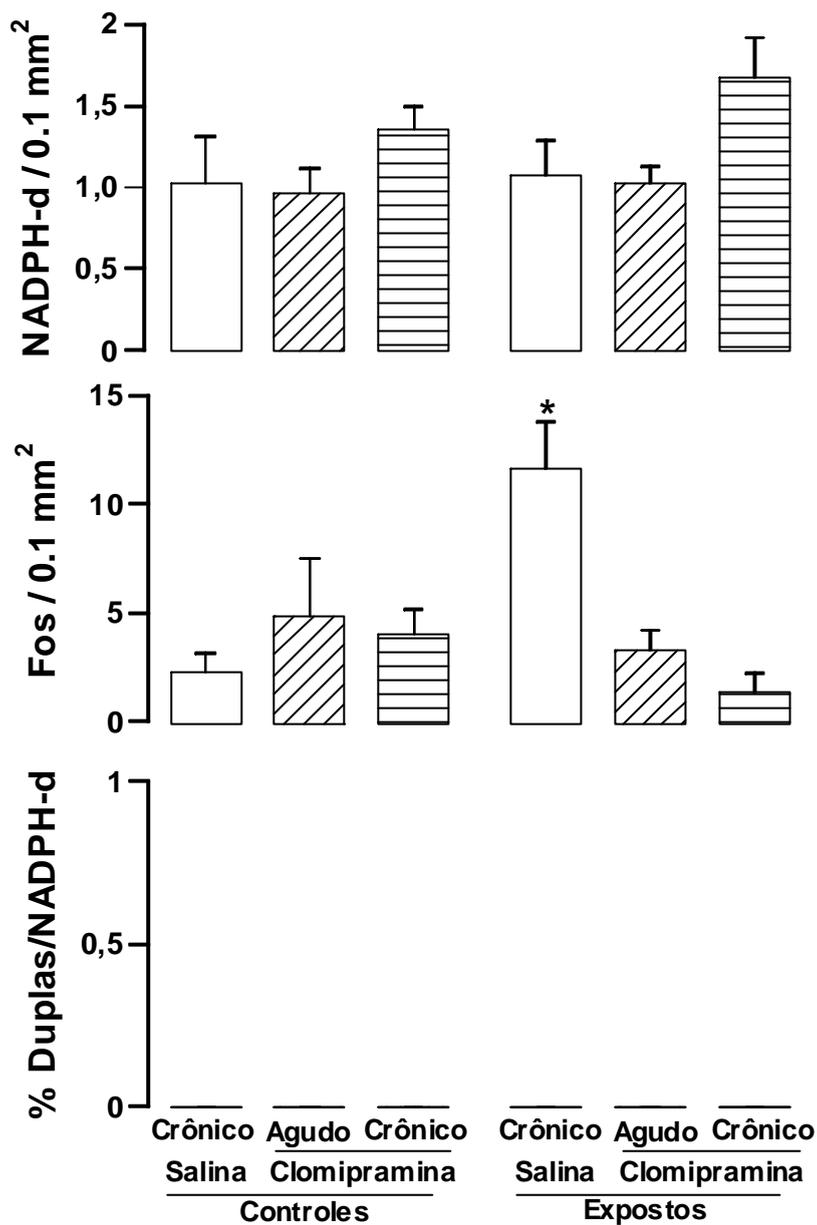


Figura 14: Efeitos do tratamento com salina ou clomipramina (20 mg/kg/dia) na densidade de células positivas para NADPHd (painel superior), Fos (painel central) ou no percentual de células NADPHd que expressam Fos (painel inferior) no GC de ratos expostos a um predador durante 10 minutos. Cada barra representa a média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina-controle (ANOVA seguida de Duncan; $n = 7, 6, 7, 7, 6, 6$).

5-DISCUSSÃO

5.1- Efeitos de agonistas de receptores de 5-HT ou benzodiazepínicos e do tratamento crônico com a clomipramina nas respostas aversivas induzidas pela injeção de um doador de NO na MCPDL de ratos

5.1.1-Efeitos da injeção local de agonistas de receptores de 5-HT ou benzodiazepínicos nas respostas aversivas induzidas pela injeção de um doador de NO na MCPDL

Confirmando resultados prévios (DE OLIVEIRA *et al.* 2000a), os presentes experimentos mostraram que a injeção de um doador de NO na MCPDL de ratos induz uma reação de fuga caracterizada por aumento de atividade locomotora, galopes e pulos.

Esses resultados estão de acordo com a proposta de que essa coluna da MCP deve mediar comportamentos ativos de escape (BANDLER *et al.*, 2000). Diferentes colunas da MCP parecem estar envolvidas em reações a tipos distintos de estressores. Segundo essa hipótese, enquanto as respostas a estresses físicos são elaboradas a partir das colunas ventrolaterais (estresse visceral) ou lateral (estresse somático), a MCPDL seria um componente de uma circuitaria responsável por elaborar respostas a estresses onde os estímulos não são físicos, mas “psicológicos” (BANDLER *et al.*, 2000). A existência de projeções diretamente do córtex pré-frontal orbitomedial para a MCPDL fornece um suporte neuroanatômico para essa possibilidade (FLOYD *et al.*; 2000). Na mesma direção apontam os dados de que há um aumento na expressão de Fos e na produção de NO na MCPDL de ratos expostos a um predador, um estímulo aversivo de natureza inata que não envolve nocicepção ou contato físico (CANTERAS & GOTO, 1999; CHIAVEGATTO *et al.*; 1998).

As reações motoras (fuga) observadas após a estimulação das colunas dorsais da MCP de ratos são frequentemente interpretadas como reações aversivas ou defensivas. O caráter aversivo dessa estimulação pode ser constatado pelo fato de que os animais aprendem a emitir

comportamentos para interrompê-la, sugerindo que esta funciona como um reforço negativo (JENCK *et al.*, 1995). O caráter de reação defensiva pode ser constatado pela semelhança entre os comportamentos emitidos por esses animais após a estimulação da MCPD com aqueles observados após a exposição a um predador (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988). Quanto à sua validade como um modelo de ataque de pânico, esta pode ser defendida com base na convergência entre as possíveis bases neurais desse transtorno psiquiátrico com aquelas relacionadas aos comportamentos defensivos (BLANCHARD & BLANCHARD, 1989; BLANCHARD *et al.*, 2003; DEAKIN & GRAEFF, 1991; GRAY & MCNAUGHTON, 2000; MCNAUGHTON & CORR, 2004; MCNAUGHTON & GRAY, 2000). Pode, também, ser sustentada com base em sua preditabilidade farmacológica, uma vez que é inibida por drogas utilizadas no tratamento do transtorno do pânico (JENCK *et al.*, 1995; SCHENBERG *et al.*, 2001).

A respeito da utilização do SIN-1 para a indução de reação de fuga na MCPDL, cabe ressaltar que ela difere daquela observada após a injeção de aminoácidos excitatórios. A injeção de glutamato ou de NMDA, por exemplo, induzem reações de fuga que se iniciam imediatamente e são de curta duração (AGUIAR *et al.*, no prelo; KRIEGER & GRAEFF, 1985), enquanto aquela induzida pelo doador de NO inicia-se cerca de 3 minutos após a injeção e é de duração prolongada. Porém, a reação observada com um outro doador de NO, a dietilamina-óxido nítrico (DEA/NO), assemelha-se mais àquela obtida com os aminoácidos excitatórios (DE OLIVEIRA *et al.*, 2000a). Provavelmente, essas particularidades se devem às diferentes cinéticas com que o SIN-1 e a DEA/NO liberam o NO, já que a liberação promovida pelo SIN-1 é lenta e envolve a formação de um composto intermediário, o SIN-1C (FEELISCH *et al.*, 1989). Essa ação prolongada do SIN-1 oferece uma vantagem, a de permitir a quantificação de comportamentos como galopes e pulos, parâmetros propostos

como as melhores medidas etológicas para se modelar ataques de pânico em ratos (VARGAS & SCHENBERG, 2001).

Os resultados desse projeto vêm a esclarecer um pouco os mecanismos modulando as reações de fuga induzidas pelo NO. Paralelo ao presente trabalho, demonstrou-se que o pré-tratamento com antagonistas de receptores ionotrópicos de glutamato na MCPDL ou no colículo inferior abole completamente a reação de fuga induzida pelo SIN-1 (MOREIRA *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2004). Esses resultados estão de acordo com dados eletrofisiológicos *in vitro*, onde se mostrou que a indução de potenciais pós-sinápticos excitatórios por um doador de NO é atenuada por um antagonista de receptores de glutamato na MCPDL (HALL & BEHBEHANI, 1998). Proporcionando mais suporte à hipótese de que os efeitos do NO possam ser mediados pelo glutamato, já se demonstrou que o NO aumenta a liberação desse aminoácido excitatório em outras estruturas encefálicas, como no estriado e no hipotálamo (GUEVARA-GUZMAN *et al.*, 1994; PRAST *et al.*, 1996). A partir dessas considerações, pode-se especular que o NO atue na MCPDL por aumentar a liberação de glutamato, este sendo a via final para a indução dos comportamentos defensivos. Sustentando essa possibilidade, observou-se, em outro trabalho, que os efeitos da injeção de NMDA não são atenuados por drogas que inibem a via de sinalização mediada pelo NO (AGUIAR *et al.*, no prelo; GUIMARÃES *et al.*, 2005). Portanto, embora os efeitos do NO pareçam depender do glutamato, a recíproca não parece ser verdadeira.

Além do glutamato, mencionado anteriormente, o NO pode interagir com a 5-HT na MCPDL. Foi demonstrada interação entre esses dois neurotransmissores na modulação de pressão arterial e nocicepção por essa estrutura (HAMALAINEN & LOVICK; 1997). Quanto à modulação de comportamentos defensivos, esses neurotransmissores apresentam funções opostas na MCPDL. Enquanto o NO induz reações de fuga, a injeção de 5-HT ou dos agonistas de receptores 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) ou 5-HT_{2A/2C} (DOI) inibem as reações

induzidas por estimulação da MCPD (BECKET *et al.*, 1992; NOGUEIRA & GRAEFF, 1995; SCHUTZ *et al.*, 1985). No presente trabalho, a reação de fuga induzida pelo doador de NO foi inibida pelo DOI, mas não pelo 8-OH-DPAT, sendo estes injetados nas mesmas doses utilizadas por Nogueira e Graeff (1995). Esses resultados sugerem que os efeitos aversivos do NO na MCP diferem daqueles induzido por estimulação elétrica ou por aminoácidos excitatórios, uma vez que podem ser modulados por receptores 5-HT_{2A/2C}, mas não por receptores 5-HT_{1A} (MOREIRA & GUIMARÃES, 2004).

Além de interagir com a 5-HT, o NO pode também interagir com o GABA na MCPDL. A nNOS pode estar co-localizada com receptores GABA-A nessa estrutura (LOVICK & PAUL, 1999). Além disso, o pré-tratamento com GABA inibe o efeito excitatório de um doador de NO em neurônios da MCPDL *in vitro* (HALL & BEHBEHANI, 1998). No presente trabalho foram obtidos resultados que estão em acordo com esse dado eletrofisiológico, uma vez que a potencialização dos receptores GABA-A com o benzodiazepínico midazolam inibiu significativamente o efeito aversivo do NO (MOREIRA & GUIMARÃES, 2004). Esse dado é semelhante ao obtido por estimulação elétrica, onde o midazolam e um outro benzodiazepínico, o clordiazepóxido, apresentaram efeitos antiaversivos quando injetados na MCPD (AUDI & GRAEFF, 1984).

Portanto, pode-se concluir que, na MCPDL, os efeitos aversivos do NO podem ser mediados por receptores ionotrópicos de glutamato e modulados por receptores 5HT₂ e benzodiazepínicos, mas não por receptores 5HT_{1A} (MOREIRA *et al.*, 2004; MOREIRA & GUIMARÃES, 2004).

5.1.2-Efeitos do tratamento crônico com a clomipramina na modulação dos efeitos do NO pelos receptores de 5-HT

O tratamento crônico com drogas anti-pânico aumenta o efeito inibitório do 8-OH-DPAT e do DOI sobre as reações de fuga induzidas pela estimulação da MCPD (DE BORTOLI *et al.*, 2006; JACOB *et al.*, 2002; MONGEAU & MARSDEN, 1997). Isso não foi observado no presente trabalho, onde os ratos foram tratados com a clomipramina e a reação de fuga foi desencadeada pela injeção de um doador de NO. Isso sugere mecanismos neurais distintos para o NO, em comparação ao estímulo elétrico ou por aminoácidos excitatórios (MOREIRA & GUIMARÃES, 2005).

Embora o tratamento crônico com a clomipramina tenha falhado em intensificar os efeitos dos agonistas de 5-HT, houve uma tendência para que ela, por si própria, atenuasse os efeitos do NO. Embora efeitos dessa natureza não sejam comumente observados nos modelos de estimulação da MCPD (DE BORTOLI *et al.*, 2006; JACOB *et al.*, 2002; MONGEAU & MARSDEN, 1997), outros trabalhos mostraram que é possível detectá-los quando os comportamentos da reação de fuga são analisados separadamente (BORELLI *et al.*, 2004; VARGAS & SCHENBERG, 2001), conforme se fez no presente trabalho.

5.2- Efeitos do tratamento com a clomipramina nas respostas aversivas e na ativação de neurônios NADPHd-positivos induzidas pela exposição de ratos a um predador

5.2.1-Dados comportamentais

O presente resultado mostrou que a exposição de ratos a um gato induz respostas aversivas, conforme deduzido pela redução no tempo em que os ratos permanecem próximos ao compartimento oposto, quando nele está presente o predador. Isso está de acordo com outros trabalhos utilizando a exposição a um predador ou o odor deste (BLANCHARD &

BLANCHARD, 1989; BLANCHARD *et al.*, 2003; DIELENBERG & MCGREGOR, 2001; ZANGROSSI & FILE, 1992a). As exposições ao odor ou ao próprio gato devem induzir respostas defensivas semelhantes, uma vez que o olfato é a principal via sensorial em roedores, sendo o odor a provável fonte de aversão mesmo no modelo de exposição ao próprio gato (BLANCHARD *et al.*, 2003; PANKSEPP, 1998).

Os roedores reconhecem objetos por meio de duas vias olfatórias distintas. Uma delas é parte do sistema olfatório principal, responsável pelo reconhecimento de estímulos aprendidos, e a outra é parte do sistema vomeronasal, responsável pelo reconhecimento de estímulos inatos (SEWARDS & SEWARDS, 2002). É possível que a circuitaria responsável pela elaboração de respostas a estímulos aversivos inatos seja composta por essa última via. Dentro dessa proposta, os comportamentos de fuga podem ser elaborados por um conjunto de estruturas que se inicia com a via vomeronasal, a qual se direciona para o núcleo medial da amígdala. A partir desta, há projeções para o núcleo ventromedial do hipotálamo e para o PMD. Essas estruturas se conectam com a MCPDL, que por sua vez se projeta para as áreas motoras que elaboram a fuga (CANTERAS *et al.*, 2001; SEWARDS & SEWARDS, 2002). Lesões em cada uma dessas estruturas ocasionam reduções de comportamentos defensivos, o que dá suporte à importância dessa circuitaria (BLANCHARD *et al.*, 2005).

No presente trabalho, o tratamento com a clomipramina atenuou a aversão induzida pela presença do predador. O efeito anti-aversivo do tratamento crônico com essa droga está de acordo com a hipótese inicial. Esse efeito da clomipramina crônica também está de acordo com o que já se observou com a imipramina, um composto que também pertence à classe dos antidepressivos tricíclicos e que inibe comportamentos aversivos induzidos pela exposição de ratos ao gato (BLANCHARD *et al.*, 1993). Embora o efeito de drogas que modulam a 5-HT seja bastante variável em alguns modelos de transtornos de ansiedade, como no labirinto em

cruz elevado, efeitos consistentes são observados em modelos de medo inato como o que foi utilizado neste presente trabalho (BLANCHARD *et al.*, 1993; BORSINI *et al.*, 2002).

Não está claro o mecanismo pelo qual os inibidores da recaptação de 5-HT induzem efeito anti-aversivo após o tratamento crônico. É possível que atuem por induzirem dessensibilização dos receptores 5HT1A que modulam os neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe. Isso resultaria em aumento na frequência de disparos desses neurônios e na maior liberação de 5-HT em estruturas para onde eles se projetam, como o hipocampo e a MCPDL, o que inibiria os comportamentos aversivos (GRAEFF, 2002; 2004; NUTT *et al.*, 1999).

A injeção aguda de clomipramina induziu um discreto efeito anti-aversivo, de menor magnitude, quando comparado ao tratamento crônico. Embora o efeito de inibidores da recaptação de 5-HT seja mais consistente após o tratamento crônico (BORSINI *et al.*, 2002), o efeito antiaversivo da injeção aguda dessas drogas tem sido detectado no modelo de estimulação elétrica da MCPDL (BORELLI *et al.*, 2004; SCHENBERG *et al.*, 2002).

5.2.2-Dados de imuno-histoquímica para Fos

Observou-se um aumento significativo na expressão de Fos na MCPDL de ratos após a exposição ao gato. Esse dado sugere que essa estrutura seja importante na mediação das repostas aversivas induzidas pela exposição a um predador. Isso está de acordo com outros trabalhos que demonstraram aumento de Fos na MCPDL de ratos após a exposição a um gato (CANTERAS E GOTO, 1999) ou ao odor deste (DIELENBERG *et al.*, 2001). Além disso, a lesão da MCP reduz comportamentos desencadeados pelo odor de gato, o que fornece um suporte ainda maior para participação dessa estrutura na elaboração de tais comportamentos (DIELENBERG *et al.*, 2004). Isso está de acordo com a função que se postula para a MCPDL, que seria a de elaborar comportamentos de fuga frente a estímulos ameaçadores

inatos, sendo que o seu mau funcionamento poderia desencadear os ataques observados no transtorno do pânico (BANDLER *et al.*, 2001; DEAKIN & GRAEFF, 1991; LOVICK, 2000).

Outra estrutura onde houve aumento significativo na expressão de Fos foi o PVH. De fato, essa é uma estrutura de grande importância fisiológica no que diz respeito ao estresse, a repostas aversivas e a transtornos psiquiátricos (PACAK & PALKOVITS, 2001). A clomipramina não atenuou a expressão de Fos nessa estrutura, sugerindo que não é provável que esse seja um sítio de ação dessa droga no modelo utilizado no presente trabalho.

Não houve aumento na expressão de Fos no PMD, o que foi um resultado inesperado, considerando as evidências sugerindo um importante papel para essa estrutura no comportamento defensivo (CANTERAS *et al.*, 1997; 2001). É possível que essa falha em detectar uma diferença significativa seja devida a uma expressão elevada de Fos no grupo controle.

Foi observada uma significativa expressão de Fos no GC. Esse dado está de acordo com a literatura implicando o GC como uma estrutura subjacente a transtornos psiquiátricos decorrentes de estresses muito intensos (HAMMER *et al.*, 1999). Porém, embora existam neurônios positivos para a NADPHd, não foram detectadas células duplamente marcadas. A interpretação desses dados é que, embora o NO atue como neurotransmissor no GC, é possível que sua ação nessa estrutura não seja importante para os comportamentos observados no presente estudo.

Quando ao efeito da clomipramina, houve uma inibição na expressão de Fos na MCPDL e no GC, sugerindo que essas estruturas sejam importantes para o efeito antiaversivo dessa droga frente a um estímulo de medo inato. Os efeitos de inibidores (seletivos ou não) da captação de 5-HT, como fluoxetina, imipramina ou desipramina, sobre a expressão de Fos já foram estudados em outros tipos de estresse, como imobilização, nado forçado e medo condicionado ao contexto (BECK & FIBIGER, 1995b; DUNCAN *et al.*, 1996b; LINO-DE-

OLIVEIRA *et al.*, 2001). Porém, os presentes resultados são os primeiros com drogas moduladoras da 5-HT sobre expressão de Fos no modelo de exposição ao predador. Há apenas dados com o ansiolítico benzodiazepínico midazolam, , onde se observou inibição da expressão de Fos no PMD, no hipotálamo dorsomedial e no núcleo intersticial da estria terminal, mas não na MCPDL ou no PVH, no modelo de exposição ao odor de gato (McGREGOR *et al.*, 2004). Efeito semelhante foi observado com outro benzodiazepínico, o diazepam, no modelo de medo condicionado (BECK & FIBIGER, 1995a).

A injeção aguda de clomipramina aumentou a expressão de Fos na MCPDL. Esse resultado contrasta com aqueles obtidos com inibidores seletivos da re-captção de noradrenalina ou de 5-HT. Os inibidores seletivos para o captador de 5-HT induzem expressão de Fos principalmente em estruturas prosencefálicas após a injeção aguda (LINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2001; SALCHNER & SINGEWALD, 2002). Embora o padrão dos inibidores seletivos da re-captção de noradrenalina tenha sido pouco estudado, esses fármacos parecem diferir daqueles seletivos para a 5-HT quanto à ativação de Fos em algumas estruturas (MIYATA *et al.*, 2005; SUMNER *et al.*, 2004).

5.2.3-Ativação de neurônios positivos para NADPHd e participação do NO nas respostas aversivas induzidas pelo predador

Observou-se, nesse trabalho, que ratos expostos a um gato apresentam aumento na expressão de Fos em células positivas para NADPHd na MCPDL e no PVH, podendo-se sugerir que neurônios produtores de NO são ativados nesse modelo de medo inato. Ainda que o percentual de neurônios ativos pareça modesto, cabe ressaltar que o NO é um gás capaz de se difundir de forma significativa, de modo a agir em uma grande população de neurônios. A ativação na MCPDL está de acordo com o trabalho de Chiavegatto *et al.* (1998), onde se demonstrou que ratos expostos a esse modelo apresentam um aumento significativo na

produção de NO nessa estrutura. A ativação no PVH dá suporte aos dados da literatura mostrando que o NO possa ser importante na modulação de resposta ao estresse por essa região (RIVIER, 2001).

A clomipramina inibiu a expressão de Fos em neurônios positivos para NADPHd na MCPDL, mostrando que uma droga que potencializa as ações da 5-HT inibe a ativação dos neurônios produtores de NO. Esse dado está de acordo com os demais resultados desse projeto, onde a injeção local de um agonista 5HT_{2A/2C} ou o tratamento crônico com a própria clomipramina inibiram os efeitos aversivos induzidos pela injeção de um doador de NO nessa estrutura (MOREIRA & GUIMARÃES, 2004; MOREIRA & GUIMARÃES, 2005).

6-CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

- A reação de fuga induzida por um doador de NO na MCPDL pode ser modulada por receptores 5-HT_{2A/2C} e benzodiazepínicos, podendo-se sugerir que NO, 5-HT e GABA devem interagir na modulação de respostas aversivas por essa estrutura. O resultado de que o efeito do NO não é modulado pelo receptor 5-HT_{1A} contrasta com os resultados obtidos com estimulação elétrica ou injeção de aminoácidos, sugerindo mecanismos distintos para a indução de respostas aversivas pelo NO.
- O tratamento crônico com a clomipramina não intensificou os efeitos anti-aversivos dos agonistas de 5-HT frente ao doador de NO. Mais uma vez, esse dado contrasta com os resultados obtidos com estimulação elétrica ou injeção de aminoácidos excitatórios na MCPDL.
- O modelo de exposição ao predador induziu comportamentos aversivos e aumentou a expressão de Fos em neurônios produtores de NO na MCPDL e no PVH. Isso sugere que, nessas estruturas, o NO seja importante para a resposta ao predador. O tratamento com a clomipramina inibiu os efeitos aversivos e a expressão de Fos em neurônios positivos para NADPHd na MCPDL, sugerindo que essa droga pode modular as ações aversivas do NO nessa estrutura.
- De forma geral, os resultados são compatíveis com a hipótese inicial do trabalho, e contribuem por mostrar que a serotonina pode modular a ação do NO em comportamentos de natureza aversiva.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR DC, MOREIRA FA, GUIMARÃES FS. Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-D-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* No prelo.

ALDERTON WK, COOPER CE, KNOWLES RG. Nitric oxide synthases: structures, functions and inhibition. *Biochemical Journal* 357:593-615; 2001.

ARGYROPOULOS SV, SANDFORD JJ, NUTT DJ. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 2: pharmacological treatments of anxiety. *Pharmacology and Therapeutics* 88:213-227; 2000.

AUDI E & GRAEFF FG. Benzodiazepine receptors in the periaqueductal gray mediate antiaversive drug action. *European Journal of Pharmacology* 103:279-285; 1984.

BANDLER R & CARRIVE P. Integrated defense reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain Research* 439:95-106; 1988.

BANDLER R, KEAY KA, FLOYD N, PRICE J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Research Bulletin* 53:95-104; 2000.

BECK CHM & FIBIGER HC. Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene *c-fos*: with and without diazepam pretreatment. *Journal of Neuroscience* 15:709-720; 1995a.

BECK CHM & FIBIGER HC. Chronic desipramine alters stress-induced behaviors and regional expression of the immediate early gene, *c-fos*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 51:331-338; 1995b.

BECKET S, LAWRENCE AJ, MARSDEN CA, MARSHAL PW. Attenuation of chemically induced defence response by 5-HT₁ receptor agonists administered into the periaqueductal gray. *Psychopharmacology* 108:110-114; 1992.

BECKET S & MARSDEN CA. Computer analysis and quantification of periaqueductal grey-induced defence behaviour. *Journal of Neuroscience Methods* 58: 157-161; 1995.

BEHBEHANI HH. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Progress in Neurobiology* 43:575-605; 1995.

BITTENCOURT AS, CAROBREZ AP, ZAMPROGNO LP, TUFIK S, SCHENBERG LC. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience* 125:71-89; 2004.

BLANCHARD DC & BLANCHARD RJ. Ethoexperimental approach to the biology of emotion. *Annual Reviews of Psychology* 39:43-68; 1988.

BLANCHARD DC & BLANCHARD RJ. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *Journal of Comparative Psychology* 103:70-82; 1989.

BLANCHARD DC, CANTERAS NS, MARKHAN CM, PENTKOWSKI NS, BLANCHARD RJ. Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29:1243-1253; 2005.

BLANCHARD DC, GRIEBEL G, BLANCHARD RJ. Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 27:1177– 1185; 2003.

BLANCHARD RJ, GRIEBEL G, HENRIE JA, BLANCHARD DC. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 21:783-789; 1997.

BLANCHARD RJ, SHEPHERD JK, RODGERS RJ, MAGEE L, BLANCHARD DC. Attenuation of antipredator defensive behavior in rats following chronic treatment with imipramine. *Psychopharmacology* 110:245-253; 1993.

BORELLI KG, NOBRE MJ, BRANDÃO ML, COIMBRA NC. Effects of acute and chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 77:557-566; 2004.

BORSINI F, PODHORNA J, MARAZZITI D. Do animal models of anxiety predict the anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology* 163:121-141; 2002.

BRANDÃO ML, DE AGUIAR JC, GRAEFF FG. GABA mediation of the anti-aversive effects of minor tranquilizers. *Pharmacology Biochemistry Behavior* 16:397-402; 1982.

BREDT DF, HWANG PM, SNYDER SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neuronal role for nitric oxide. *Nature* 347:768-770; 1990.

BREDT DF & SNYDER SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 86:9030-9036; 1989.

CANTERAS NS, CHIAVEGATTO S, RIBEIRO DO VALE LE, SWANSON L. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Research Bulletin* 44:297-305; 1997.

CANTERAS NS & GOTO M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport* 10:413-418; 1999.

CANTERAS NS, RIBEIRO-BARBOSA ER, COMOLI E. Tracing from the dorsal premammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25:661-668; 2001.

CARRIVE P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional significance and neuronal organization. *Behavioral Brain Research* 58:27-47; 1993.

CHADURI A. Neural activity mapping with inducible transcription factors. *Neuroreport* 8:5-9; 1997.

CHIAVEGATTO S, SCAVONE C, CANTERAS NS. Nitric oxide synthase activity in the dorsal periaqueductal gray of rats expressing innate fear responses. *Neuroreport*. 9:571-576; 1998.

DARWIN C. *The expression of emotion in man and animals*. 1872. New York: Philosophical Library, 1985.

DAWSON TM, BREDT DS, FOTUHI M, HWANG PM, SNYDER SH. Nitric oxide and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88:7797-7801; 1991.

DEAKIN JF & GRAEFF FG. 5-HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology* 5:305-315; 1991.

DE BORTOLI VC, NOGUEIRA RL, ZANGROSSI HJr. Effects of fluoxetine and buspirone on the panicolytic-like response induced by the activation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology* 183:422-428; 2006.

DELGADO JMR. Brain research and behavioral activity. *Endeavour*. 26:149-154; 1967.

DE OLIVEIRA RW, DEL BEL EA, GUIMARÃES FS. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Brain Research Bulletin* 51:457-464; 2000a.

DE OLIVEIRA RM, DEL BEL EA, MAMEMDE ROSA ML, PADOVAN CM, DEAKIN JF, GUIMARÃES FS. Expression of neuronal nitric oxide synthase in stress-related brain areas after restraint in rats. *Neuroscience Letters* 289:123-126; 2000b.

DE OLIVEIRA RW, DEL BEL EA, GUIMARÃES FS. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25:679-685; 2001.

DIELENBERG RA, ARNOLD JC, MCGREGOR MS. Low-dose midazolam attenuates predatory odor avoidance in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 62:197-201; 1999.

DIELENBERG RA, HUNT GE, MCGREGOR IS. "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience* 104:1085-1097; 2001.

DIELENBERG RA, LEMAN S, CARRIVE P. Effect of dorsal periaqueductal gray lesions on cardiovascular and behavioral responses to cat odor exposure in rats. *Behavioral Brain Research* 153:487-96; 2004.

DIELENBERG RA & MCGREGOR IS. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25:597-609; 2001.

DUNCAN GE, KNAPP DJ, BREESE GR. Neuroanatomical characterization of FOS induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Research* 713:79-91; 1996a.

DUNCAN GE, KNAPP DJ, JOHNSON KB, BREESE GR. Functional classification of antidepressants based on antagonism of swim stress-induced Fos-like immunoreactivity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 277:1076-1089; 1996b.

FEELISH M, OSTROWSKY J, NOACK E. On the mechanisms of NO release from sydnonimines. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 14(Suppl 11):S13-22;1989.

FERNANDEZ DE MOLINA A & HUNSPERGER RW. Central representation of affective reactions in forebrain and brainstem: Electrical stimulation of amygdala, stria terminalis , and adjacent structures. *Journal of Physiology* 145: 251-265; 1959.

FERNANDEZ DE MOLINA A & HUNSPERGER RW. Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat. *Journal of Physiology* 160:200-213; 1962.

FLOYD NS, PRICE JL, FERRY AT, KEAY KA, BANDLER R. Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 422:556-578; 2000.

FURCHGOTT RF & ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376; 1980.

GARTHWAITE J, CHARLES SL, CHESS-WILLIAMS R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptor suggests a role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336:385-388; 1988.

GARTHWAITE J, GARTHWAITE G, PALMER RMJ, MONCADA S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *European Journal of Pharmacology*. 172:413-416; 1989.

GRAEFF FG. Minor tranquilizers and brain defense systems. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 14:239-265; 1981.

GRAEFF FG. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behavior and related emotions in mammals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 27:811-829; 1994.

GRAEFF FG. On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology*. 163:467-476; 2002.

GRAEFF FG. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28:239-259; 2004.

GRAY J.A. Précis of The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo hippocampal system. *Behavioural and Brain Sciences* 5: 469-534; 1982.

GRAY J.A & McNAUGHTON N. *The neuropsychology of anxiety*. 2^a Ed. Oxford: Oxford University Press; 2000.

GRIEBEL G, BLANCHARD DC, AGNES RS, BLANCHARD RJ. Differentiation of antipredator defensive behavior in Swiss-Webster mice following acute or chronic administration of imipramine and fluoxetine. *Psychopharmacology* 120:57-66; 1995.

GUEVARA-GUSMAN R, EMSON PC, KENDRICK KM. Modulation of in vivo striatal release by nitric oxide and cyclic GMP. *Journal of Neurochemistry* 62:807-810; 1994.

GUIMARÃES FS, BEIJAMINI V, MOREIRA FA, AGUIAR DC, DE LUCCA AC. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosciences and Biobehavioral Reviews* 29:1313-22; 2005.

GUIMARÃES FS, CAROBREZ AP, DE AGUIAR JC, GRAEFF FG. Anxiolytic effect in the elevated plus maze of NMDA receptor antagonist microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology* 103:91-94; 1991.

GUIMARÃES FS, DE AGUIAR JC, DEL BEL EA, BALLEJO G. Anxiolytic effect of nitric oxide inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *NeuroReport* 5:1929-1932; 1994.

HALL CW, BEHBEHANI MM. The medial preoptic nucleus of the hypothalamus modulates activity of nitric oxide sensitive neurons in the midbrain periaqueductal gray. *Brain Research* 765:208-217; 1997.

HAMALAINEN MM & LOVICK TA. Involvement of nitric oxide and serotonin in modulation of antinociception and pressor responses evoked by stimulation in the dorsolateral periaqueductal gray matter in the rat. *Neuroscience* 80:821-827; 1997.

HAMNER MB, LORBERBAUM JP, GEORGE MS. Potential role of the anterior cingulate cortex in PTSD: review and hypothesis. *Depression and Anxiety* 9:1-14; 1999.

HANDLEY S & MITHANI S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of fear-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 327:1-5; 1984

HOPE BT, MICHAEL GJ, KNIGGE KM, VINCENT SR. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 88: 2811-2814; 1991.

IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE, CHAUDHURI G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84:9265-9269; 1987.

JACOB CA, CABRAL AHCL, ALMEIDA LP, MAGIEREK, V, RAMOS PL, ZANOVELI J, LANDEIRA-FERNANDEZ J, ZANGROSSI H, NOGUEIRA R. Chronic imipramine enhances 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptor-mediated inhibition of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray. *Pharmacology Biochemistry Behavior* 761-766; 2002.

JENCK F, MOREAU JL, MARTIN JR. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: Elements of face and predictive validity. *Psychiatry Research* 57:181-191; 1995.

KASPAR S & RESINGER E. Panic disorder: The place of benzodiazepines and selective serotonin reuptake inhibitors. *European Neuropsychopharmacology* 11:307-321; 2001.

KNOWLES R.G, PALACIOS M, PALMER RM, MONCADA S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 86:5159-5162; 1989.

KRIEGER JE & GRAEFF FG. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central grey of the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 18: 61-67; 1985.

KRUKOFF TL, KHALILI P. Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology* 377:509-519; 1997.

LINO-DE-OLIVEIRA C, SALES AJ, DEL BEL EA, SILVEIRA MCL, GUIMARÃES FS. Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. *Brain Research Bulletin* 55:747-754; 2001.

LOVICK TA. Panic disorder – A malfunction of multiple transmitter control systems within the midbrain periaqueductal gray matter? *Neuroscientist*. 6:48-59; 2000.

LOVICK TA & PAUL NL. Co-localization of GABA with nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent diaphorase in neurones in the dorsolateral periaqueductal grey of the rat. *Neuroscience Letters* 272:167-170; 1999.

McGREGOR IS, HARGREAVES GA, APFELBACH R, HUNT GE. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. *Journal of Neuroscience* 24:4134-4144; 2004.

McNAUGHTON N & CORR PJ. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28:285-305; 2004.

McNAUGHTON N & GRAY JA. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *Journal of Affective Disorders* 61:161-176; 2000.

MIYATA S, HAMAMURA T, LEE Y, MIKI M, HABARA T, OKA T, ENDO S, TAOKA H, KURODA S. Contrasting Fos expression induced by acute reboxetine and fluoxetine in the rat forebrain: neuroanatomical substrates for the antidepressant effect. *Psychopharmacology* 177:289-295; 2005.

MONGEAU R & MARSDEN CA. Effect of imipramine treatments on the 5-HT_{1A}-receptor-mediated inhibition of panic-like behaviour in rats. *Psychopharmacology*. 131:321-328; 1997.

MONTGOMERY KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative Physiology and Psychology* 48:254-260; 1955.

MOREIRA FA & GUIMARÃES FS. Benzodiazepine receptor and serotonin 2A receptor modulate the aversive-like effects of nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology* 176:362-368; 2004.

MOREIRA FA & GUIMARÃES FS. Role of serotonin receptors in panic-like behavior induced by nitric oxide in the rat dorsolateral periaqueductal gray: effects of chronic clomipramine treatment. *Life Sciences* 77:1972-1982; 2005.

MOREIRA FA, MOLCHANOV ML, GUIMARÃES FS. Flight reactions to nitric oxide in the inferior colliculus of rats depend on NMDA-receptor activation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 76:35-41; 2003.

MOREIRA FA, MOLCHANOV ML, GUIMARÃES FS. Iontropic glutamate receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology* 171:199-203; 2004.

MORGAN JI & CURRAN T. Stimulus transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends in Neuroscience* 12:459-462; 1989

NASHOLD BSJr., WILSON WP, SLAUGHTER DG. Sensations evoked by stimulation of midbrain in man. *Journal of Neurosurgery* 30: 14-24; 1969.

NOGUEIRA RL & GRAEFF, FG. Role of 5HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 52:1-6; 1995.

NUTT DJ, FORSHALL S, BELL C, RICH A, SANDFORD J, NASH J, ARGYROPOULOS S. Mechanisms of action of selective serotonin reuptake inhibitors in the treatment of psychiatric disorders. *European Neuropsychopharmacology* 9 (Suppl. 3):S81-S86; 1999.

OLDS J. Self-stimulation of the brain. *Science* 127: 315-324; 1958.

OLDS ME & OLDS J. Approach-escape interactions in the rat brain. *American Journal of Physiology* 203: 803-810; 1962.

ONSTOTT D, MAYER B, BEITZ AJ. Nitric oxide immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy. *Brain Research* 610:317-324; 1993.

PACAK K & PALKOVITS M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrinological Reviews* 22:502-548; 2001.

PALMER RMJ, ASHTON DS, MONCADA S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:664-666; 1988.

PALMER RMJ, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526; 1987.

PANKSEPP JA *Affective neuroscience*. Oxford: Oxford University Press; 1998.

PAXINOS G & WATSON C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. San Diego: American Press; 1997.

PELLOW S, CHOPIN P, FILE SE, BRILEY M. Validation of open:closed arms entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 14:149-167; 1985.

PELLOW S & FILE SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 24:525-529; 1986.

PRAST H, LAMBERTI, C, FISHER H, TRAN MH, PHILIPPU A. Nitric oxide influences the release of histamine and glutamate in the rat hypothalamus. *Naunyn-Schmiedberg Archives of Pharmacology* 354:731-735; 1996.

RIVIER C. Role of gaseous neurotransmitters in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 933:254-264; 2001.

ROLLS E *The brain and emotion*. Oxford: Oxford University Press; 1999.

RUSSO AS, GUIMARÃES FS, DE AGUIAR JC, GRAEFF FG. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal gray of rats in anxiety. *Psychopharmacology* 110:198-202; 1993.

SALCHNER P & SINGEWALD N. Neuroanatomical substrates involved in the anxiogenic-like effect of acute fluoxetine treatment. *Neuropharmacology* 43:1238-1248; 2002.

SCHENBERG LC, BITTENCOURT AS, SUDRÉ ECM, VARGAS LC. Modelling panic attacks. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25: 647-659; 2001.

SCHENBERG LC, CAPUCHO LB, VATANABE RO, VARGAS LC. Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 159:138-144; 2002.

SCHUTZ MTB, DE AGUIAR JC, GRAEFF FG. Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal gray matter. *Psychopharmacology* 85:340-345; 1985.

SEWARDS TV & SEWARDS MA. Fear and power-dominance drive motivation: neural representations and pathways mediating sensory and mnemonic inputs, and outputs to premotor structures. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 26:553-579; 2002.

SKULTEITY FM. Stimulation of periaqueductal grey and hypothalamus. *Archives of Neurology* 8:38-50; 1963.

SILVEIRA MC, SANDNER G, GRAEFF FG. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behavioral Brain Research* 56:115-118; 1993.

SINGEWALD N, SALCHNER P, SHARP T. Induction of c-Fos expression in specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs. *Biological Psychiatry* 53:275-283; 2003.

SINGEWALD N & SHARP T. Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry. *Neuroscience* 98:759-770; 2000.

SUMMER BEH, CRUISE LA, SLATTERY DA, HILL DR, SHAHID M, HENRY B. Testing the validity of *c-fos* expression profiling to aid the therapeutic classification of psychoactive drugs. *Psychopharmacology* 171:306-321; 2004.

VALE AL, GREEN S, MONTGOMERY AMJ, SHAFI S. The nitric oxide inhibitor L-NAME produces anxiogenic-like effects in the rat elevated plus-maze test, but not in the social interaction test. *Journal of Psychopharmacology* 12:268-272; 1998.

VARGAS LC & SCHEMBERG LC. Long-term effects of clomipamine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 155:260-268; 2001.

VINCENT SR & KIMURA H. Histochemical map of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46:755-784; 1992.

VOLKE V, KOKS S, VASAR E, BOURIN M, BRADWEJN J, MANNISTO PT. Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behaviour in an elevated plus maze. *Neuroreport* 6:1285-1288; 1995.

VOLKE V, SOOSAAR A, KOKS S, BOURIN M, MANNISTO PT, VASAR E. 7-nitroindazol, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. *Psychopharmacology* 131:399-405; 1997.

ZANGROSSI HJr & FILE S. Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. *Brain Research Bulletin* 29:381-388; 1992a.

ZANGROSSI HJr & FILE S. Chlordiazepoxide reduces the generalized anxiety, but not the direct responses, of rats exposed to cat odor. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 43:1195-1200; 1992b.

8-APÊNDICE: PUBLICAÇÕES

1-MOREIRA FA, MOLCHANOV ML, GUIMARÃES FS. Ionotropic glutamate receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology* 171:199-203; 2004.

2-MOREIRA FA & GUIMARÃES FS. Benzodiazepine receptor and serotonin 2A receptor modulate the aversive-like effects of nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology* 176:362-368; 2004.

3-MOREIRA FA & GUIMARÃES FS. Role of serotonin receptors in panic-like behavior induced by nitric oxide in the rat dorsolateral periaqueductal gray: effects of chronic clomipramine treatment. *Life Sciences* 77:1972-1982; 2005.

4-GUIMARÃES FS, BEIJAMINI V, MOREIRA FA, AGUIAR DC, DE LUCCA AC. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosciences and Biobehavioral Reviews* 29:1313-22; 2005.

5-JARDIM MC, AGUIAR DC, MOREIRA FA, GUIMARAES FS. Role of glutamate ionotropic and benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus on anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 82:182-189; 2005.

6-MOREIRA FA & GUIMARÃES FS. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drgs in mice *European Journal of Pharmacology* 512:199-205; 2005.

7-AGUIAR DC, MOREIRA FA, GUIMARAES FS. Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-D-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* No prelo.

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](#)