

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO

Regulação pelo complexo basolateral da amígdala dos
estados aversivos gerados pela estimulação do colículo inferior:
modulação por mecanismos serotoninérgicos

Carlos Eduardo Antunes de Macedo

RIBEIRÃO PRETO
2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

Regulação pelo complexo basolateral da amígdala dos
estados aversivos gerados pela estimulação do colículo inferior:
modulação por mecanismos serotoninérgicos

Carlos Eduardo Antunes de Macedo

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Área: Psicobiologia
Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão

RIBEIRÃO PRETO
2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Macedo, Carlos Eduardo Antunes de
Regulação pelo complexo basolateral da amígdala dos estados
aversivos gerados pela estimulação do colículo inferior: modulação
por mecanismos serotoninérgicos. Ribeirão Preto, 2006.

107 p. : il. ; 30cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo –
Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Brandão, Marcus Lira

1. Colículo inferior. 2. Amígdala. 3. Córtex Frontal. 4. Medo
condicionado. 5 Medo incondicionado. 6. Serotonina. 7. Dopamina.
8. Microdiálise.

Dedico a minha família e a minha esposa Marcella.

Agradecimentos Especiais

Esta tese de doutorado dependeu de todos os esforços iniciais para implementar a técnica de microdiálise nesse laboratório; muitos contribuíram para isto. O professor Marcus deu todas as condições para eu desenvolver esta técnica durante o meu doutorado, acreditou em mim. O estágio, proposto pelo Prof. Marcus, no Laboratório de Farmacologia de Córdoba, sob a coordenação do Prof. Victor Molina, foi fundamental nesse estudo. Nesse Laboratório, devo todos os conhecimentos que adquiri sobre a técnica de microdiálise ao Prof. Gabriel Cuadra. Dessa colaboração originou-se o estudo publicado na revista Synapse. Minha enorme gratidão aos Professores Victor e Gabriel, sem vocês o próximo passo não seria possível. Com o apoio, incentivo e paciência do Prof. Marcus, ajudando nos momentos mais difíceis, conseguimos publicar o primeiro estudo com a técnica de microdiálise na revista European Journal of Neuroscience. Minha enorme gratidão ao Professor Marcus pela orientação no meu doutorado e por sempre impulsionar meu desenvolvimento científico. Minha tarefa ficou mais tranquila ao lado, dia e noite, da minha esposa Marcella, uma “especialista” em microdiálise.

Agradecimentos

Aos Professores Victor e Gabriel por me acolherem e apoiarem meus estudos em Córdoba.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia de Córdoba.

Aos amigos desse Laboratório de Neuropsicofarmacologia.

Ao Lucas pela participação nos experimentos da segunda fase desse estudo e a Raquel pela participação ao longo desse estudo.

Ao assessor da FAPESP pela recomendação e apoio durante esse estudo.

À FAPESP pela bolsa de pesquisa e pelo apoio financeiro concedidos a esse estudo.

Sumário

RESUMO	I
ABSTRACT	III
INTRODUÇÃO	2
COLÍCULO INFERIOR	6
AMÍGDALA	9
CÓRTEX PRÉ-FRONTAL	15
OBJETIVOS	19
EXPERIMENTO I: EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DO COLÍCULO INFERIOR SOBRE OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE DOPAMINA E SEROTONINA NO COMPLEXO BASOLATERAL E NO NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA	21
MATERIAIS E MÉTODOS	22
<i>Animais</i>	22
<i>Cirurgia</i>	22
<i>Microdiálise</i>	23
<i>Determinação por CLAE da DA e da 5-HT</i>	24
<i>Determinação dos limiares aversivos</i>	25
<i>Drogas e reagentes</i>	25
<i>Procedimento</i>	26
<i>Histologia</i>	27
<i>Análise dos dados</i>	27
RESULTADOS	29
DISCUSSÃO	35
EXPERIMENTO II: EFEITOS DA INATIVAÇÃO E DE ANTAGONISTAS D1 E 5-HT2 NO COMPLEXO BASOLATERAL DA AMÍGDALA NO MEDO CONDICIONADO E NO MEDO INCONDICIONADO GERADOS A PARTIR DO COLÍCULO INFERIOR.....	42
MATERIAIS E MÉTODOS	43
<i>Animais</i>	43
<i>Cirurgia</i>	43
<i>Drogas</i>	43
<i>Microinjeções</i>	44
<i>Aparelhos</i>	44
<i>Procedimento</i>	46
<i>Histologia</i>	47
<i>Análise dos dados</i>	48
RESULTADOS	49
DISCUSSÃO	60
EXPERIMENTO III: EFEITOS DA INATIVAÇÃO DO COMPLEXO BASOLATERAL DA AMÍGDALA SOBRE O AUMENTO NOS NÍVEIS EXTRACELULARES DE DA NO CÓRTEX FRONTAL PRODUZIDO PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DO CI.....	70
MATERIAIS E MÉTODOS	71
<i>Animais</i>	71
<i>Cirurgia</i>	71
<i>Microdiálise</i>	72
<i>Determinação por CLAE da DA e da 5-HT</i>	73
<i>Microinjeções</i>	73
<i>Determinação dos limiares aversivos</i>	74

<i>Drogas e reagentes</i>	74
<i>Procedimento</i>	74
<i>Histologia</i>	75
<i>Análise dos dados</i>	76
RESULTADOS	77
DISCUSSÃO	83
CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
APÊNDICES – ARTIGOS PUBLICADOS	107

Resumo

Resumo

O colículo inferior (CI) além de ser uma estação importante no tronco encefálico para a transmissão de informações auditivas para centros superiores também participa do chamado sistema encefálico aversivo. A amígdala é uma estrutura fundamental na aquisição e expressão do medo condicionado e incondicionado. Essa regulação do medo pela amígdala parece mediada por mecanismos dopaminérgicos e serotoninérgicos. Tem sido demonstrado que a amígdala influencia os estados aversivos gerados a partir do CI. Assim, a lesão eletrolítica ou serotoninérgica do complexo basolateral da amígdala (CBL) causa um aumento na aversividade gerada pela estimulação do CI, enquanto que essas lesões no núcleo central da amígdala (NCe) causam uma redução nessa aversividade. A estimulação aversiva do CI também provoca um aumento nos níveis extracelulares de dopamina no córtex frontal, que mantém conexões com a amígdala. Nesse estudo, examinamos i) os efeitos da estimulação do CI sobre os níveis extracelulares de dopamina (DA) e serotonina (5-HT) no CBL e no NCe; ii) os efeitos da inativação com muscimol e de antagonistas de receptores 5-HT₂ e D1 no CBL no medo condicionado e no medo incondicionado promovido pela estimulação aversiva do CI; e iii) os efeitos da inativação com muscimol e lidocaína do CBL sobre as conseqüências comportamentais e neuroquímicas da estimulação aversiva do CI. Os resultados mostram que a estimulação do CI causa um aumento nos níveis extracelulares de DA e 5-HT no CBL sem, contudo, afetá-los no NCe. A inativação ou o bloqueio dos receptores D1 ou 5-HT₂ no CBL causam uma redução no medo condicionado e um aumento do medo incondicionado promovidos pela estimulação do CI. A inativação do CBL reduziu o incremento nos níveis extracelulares de DA produzido pela estimulação do CI. Os resultados desse estudo mostram que a estimulação aversiva do CI aumenta a liberação extracelular de DA e 5-HT no CBL. Por sua vez, a DA e a 5-HT regulam as respostas do medo condicionado e incondicionado gerado pela estimulação do CI. Especificamente, a DA e a 5-HT no CBL parecem facilitar o medo condicionado e inibir o medo incondicionado gerados pela estimulação aversiva no CI. O CBL parece também regular a ativação de mecanismos dopaminérgicos corticofrontais produzido pela estimulação aversiva do CI.

Abstract

Abstract

The inferior colliculus (IC) is primarily involved in auditory information processing but also integrates acoustic information of aversive nature. The amygdala is an important structure in the acquisition and expression of conditioned and unconditioned fear. This amygdaloid regulation of fear seems to be mediated by dopaminergic and serotonergic mechanisms. It has been found that depending on the nucleus, amygdaloid lesions cause distinct changes in the aversiveness of electrical stimulation of the IC. In this respect, serotonergic and neurotoxic lesions of the basolateral amygdaloid complex (BLA) enhance whereas those of the central nucleus of the amygdala (CeA) reduce the aversiveness of the electrical stimulation of the IC. Moreover, electrical stimulation of the IC increases extracellular levels of dopamine in the prefrontal cortex, which sends projections to the amygdala. Based on this evidence, we examined i) the effects of the electrical stimulation of the IC on the extracellular levels of serotonin (5-HT) and dopamine (DA) in the BLA and CeA; ii) the effects of injections of muscimol, the antagonist of 5HT₂ receptors ketanserin and the antagonist of D₁ receptors SCH-23390, on the conditioned and unconditioned fear generated withelicited by stimulation of the IC; iii) the effects of BLA inactivation with muscimol and lidocaine on the activation of cortical dopaminergic neurons produced by aversive stimulation of the IC. The results showed that electrical stimulation of IC increased the extracellular levels of DA and 5-HT in BLA, but not in the CeA. Inactivation with muscimol or inhibition of D₁ or 5-HT₂ receptors in BLA decreased the conditioned fear and increased the aversiveness of the unconditioned fear elicited by IC stimulation. Inactivation of BLA counteracted the increase in DA extracellular levels in the frontal cortex elicited by aversive stimulation of the IC. These findings indicate that aversive stimulation of the IC increases DA and 5-HT extracellular levels in BLA. 5-HT mechanisms of the BLA appear to have opposite influences on the conditioned and unconditioned fear. Specifically, DA and 5-HT mechanisms in BLA seem to facilitate the conditioned fear and inhibit the unconditioned fear triggered by activation of the CI. Also, BLA seems to regulate the activation of dopaminergic cortical mechanisms elicited by aversive stimulation of the IC.

Introdução

Introdução

A partir da segunda da metade do século XIX, as emoções tornaram-se objeto de indagação científica e passam a ser estudadas a partir de sua expressão comportamental. A primeira tentativa importante nesse sentido foi a de Charles Darwin em seu livro *A expressão das emoções no homem e nos animais*, de 1872. A partir deste trabalho cresceu a importância das pesquisas com animais voltadas para a busca das raízes biológicas das emoções, particularmente do medo e da ansiedade no homem.

William James e Karl Lange propuseram, no final do século XIX, a chamada “teoria somática das emoções” que, apesar das críticas que suscitou, ocupa o campo científico há muitos decênios e tem servido como ponto útil de referência para várias teorias correntes. Ao longo de duas ou três décadas sucessivas, os estudos sobre as emoções seguiram influenciados por essa teoria, que sustenta que as emoções resultam da percepção de alterações fisiológicas no organismo frente a estímulos estressantes (James, 1890). No entanto, no início do século passado, tal teoria encontrou as primeiras objeções importantes nos estudos realizados por Walter Cannon e por seu colaborador Philip Bard. Esses fisiologistas apresentaram a “teoria neural das emoções”, sugerindo o hipotálamo como centro controlador das emoções no encéfalo. A hipótese sugeria que o hipotálamo permitiria avaliar a relevância emocional de eventos ambientais por meio de suas conexões com o córtex e expressar respostas emocionais por meio de suas conexões com o tronco cerebral (Cannon, 1929).

Em 1937, surge uma das teorias mais significativas para a compreensão das raízes biológicas das emoções. Cunhada pelo neuroanatomista norte-americano James Papez e baseada em observações clínicas e experimentais, essa teoria segue os passos daquela elaborada por Cannon e Bard, que ressaltou tanto a importância do hipotálamo na recepção de estímulos

emocionais e no controle das reações fisiológicas durante a emoção, como também a relevância do córtex na regulação da experiência emocional. Entretanto, Papez aprofundou o entendimento de Cannon e Bard sobre a comunicação entre o hipotálamo e o córtex, propondo que a emoção surge através de um fluxo de informações que obedece a um ciclo de conexões anatômicas entre o hipotálamo e outras estruturas do sistema límbico (*le grand lobe limbique*, expressão cunhada pelo anatomista francês Paul Pierre Broca, em 1878). Derivado de seu próprio nome, o “circuito de Papez” é composto pelo córtex sensorial, tálamo, giro do cíngulo, hipocampo e hipotálamo. Nesta neurocircuitaria, capaz de gerar experiências emocionais, as mensagens sensoriais chegam ao tálamo e são direcionadas para o córtex cerebral - dando origem à experiência emocional - e para o hipotálamo - originando as reações emocionais somáticas. Segundo Papez, a experiência emocional surgiria quando o giro do cíngulo fosse capaz de integrar sinais provenientes do córtex sensorial e do hipotálamo. Entretanto, essa teoria continua conferindo um papel central ao hipotálamo e as suas conexões ascendentes e descendentes. Neste mesmo ano de 1937, apoiando a sugestão de Papez, os pesquisadores Heinrich Klüver e Paul Bucy observaram que lesões nos lobos temporais de macacos causavam hipersexualidade, tranqüilidade e distúrbios alimentares.

Recorrendo aos trabalhos de Cannon e Papez, bem como ao trabalho de Klüver e Bucy, Paul MacLean, entre os anos de 1949 e 1952, constrói uma teoria mais abrangente para a emoção. O córtex e o hipotálamo continuam exercendo grande importância para a experiência e expressão emocionais, respectivamente, mas MacLean adicionou ao circuito de Papez outras regiões como a amígdala, o septo e o córtex pré-frontal (CPFr).

Embora o termo sistema límbico ainda seja utilizado para se referir aos circuitos emocionais no encéfalo, a teoria do sistema límbico possui pelo menos duas grandes críticas. Primeiro, não há um critério amplamente aceito para decidir qual área é límbica; segundo, a teoria do sistema límbico não explica como o sistema nervoso central (SNC) produz emoções.

Com o transcorrer dos anos, outras estruturas foram incorporadas ao sistema límbico, tido como grande coordenador do funcionamento das vísceras e das emoções. Além disso, não só outras estruturas passaram a integrar o sistema límbico, mas também as diversas emoções passam a ser investigadas separadamente dentro desse sistema.

Assim, as teorias das emoções passam a concentrar-se sobre o SNC e, mais ainda, incidem sobre um único sistema de estruturas encefálicas e em suas conexões. Além disso, passou-se a qualificar as emoções como importantes na sobrevivência do indivíduo e da espécie, recuperando, assim, sua importância evolutiva. Porém, se emoções diferentes estão associadas a distintas funções de sobrevivência (proteção contra o perigo, alimentação, reprodução, etc.), cada uma delas pode perfeitamente ser produzidas em diferentes sistemas encefálicos, cuja ativação pode depender de diferentes estímulos. Por conseguinte, não haveria um único sistema emocional no SNC, mas vários. Baseado nisto e em vários outros estudos, F.G. Graeff atribui a diferentes estruturas neurais distintas emoções, relacionadas ao repertório de defesa de cada espécie. Assim, a ansiedade, que envolve uma estratégia comportamental de “avaliação de risco” diante de uma ameaça potencial, seria mediada pela amígdala e pelo sistema septo-hipocampo. O medo, que envolve o comportamento de congelamento diante de uma ameaça distante, seria mediado pela amígdala e pela substância cinzenta periaquedutal ventral (SCPv). E, finalmente, o pânico/raiva, que envolve um repertório comportamental de luta/fuga diante de uma ameaça proximal, seria mediado pela amígdala, hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) (Graeff, 1990).

Dentre as estruturas neuronais críticas que regulam o comportamento de defesa e as emoções associadas (ansiedade, medo e pânico) mencionadas acima, o hipotálamo, a amígdala e a substância cinzenta periaquedutal (SCP) constituem o denominado sistema encefálico aversivo (SEA) (Graeff, 1990). Além dessas estruturas, haveria a participação de outras como o

CPFr. Em apoio a sua teoria, Graeff (1990) lembra que nos experimentos clássicos realizados por Hess e colaboradores (1943) e Fernandez de Molina e Hunsperger (1959) as estimulações elétricas na SCP, no hipotálamo medial, nos núcleos central, medial e dorsal da amígdala produzem tanto respostas de fuga como de agressão em gatos, similares a comportamentos espécie-específicos que ocorreriam em circunstâncias naturais. Essas estimulações elétricas são acompanhadas por alterações nos sistemas respiratório e cardiovascular (Kelly, 1980; Graeff, 1990). Ainda, considerando a especificidade de respostas defensivas em função da estrutura encefálica estimulada, a estimulação elétrica da amígdala produzia uma reação de defesa que se manifestam somente após alguns segundos (normalmente de 20 a 30 s) ao contrário do hipotálamo, que produzia uma reação de defesa imediata e completa concomitantemente a sua estimulação (Kelly, 1980).

Em 1969, Nashold e colaboradores relataram que estimulações elétricas na SCP de pacientes durante intervenções neurocirúrgicas para tratamento de dores incoercíveis produziam medo intenso, às vezes com sensação de morte iminente, acompanhadas de taquicardia, hiperventilação, piloereção e enrubescimento da face e do pescoço, lembrando muito um ataque de pânico.

Outras estruturas também participam de forma importante na organização do medo no SNC. O CPr, considerada outra estrutura dentro do sistema de defesa, mantém conexões com as estruturas que compõem o SEA e sua estimulação em primatas humanos e não-humanos produz alterações autonômicas e emocionais próprias do medo e da ansiedade (Graeff, 1990).

Esse Laboratório de Neuropsicofarmacologia de Ribeirão Preto vem propondo, baseado em modelos animais de medo e ansiedade, a inclusão do colículo inferior dentro da neurocircuitaria que compõe o sistema encefálico aversivo (Brandão et al., 1988; 1993; 1994;

1999).

A aversão gerada no colículo inferior parece envolver a participação da amígdala e do córtex pré-frontal (Maisonnette et al., 1996; Cuadra et al., 2000; Macedo et al., 2002; Borelli et al., 2006). Além disso, estudos neuroanatômicos mostram conexões diretas e indiretas entre essas estruturas (LeDoux et al., 1990a-b; McDonald, 1996). Ainda, estudos neuroquímicos e eletrofisiológicos mostram que a estimulação de uma dessas estruturas pode provocar alterações na liberação de neurotransmissores e no funcionamento neural da outra estrutura (Cuadra et al., 2000; Carr & Sesack, 2000). Dada a relevância para o presente estudo, destacaremos desse sistema de defesa os principais aspectos relacionados ao colículo inferior, à amígdala e ao córtex pré-frontal.

Colículo inferior

O colículo inferior (CI) é uma estação sináptica mesencefálica bilateral de vias auditivas (Webster, 1995). Muitas abordagens neuroanatômicas em mamíferos têm subdividido o CI em diversas regiões, obedecendo a várias nomenclaturas (Morest, 1964; Geniec & Morest, 1971; Huffman & Henson, 1990). Neste estudo serão adotadas as divisões neuroanatômicas do CI elaboradas por Faye-Lund & Osen (1985), que são adotadas também pelo atlas de Paxinos & Watson (1997). Segundo esses autores, o CI de ratos pode ser dividido em três grandes áreas: o núcleo central (NCCI), o núcleo externo (NECI) e o núcleo dorsal (NDCI) (Figura 1.1). Essas divisões neuroanatômicas foram baseadas em estudos de quimioarquitetura e citoarquitetura do CI e em suas conexões (Faye-Lund & Osen, 1985; Webster, 1995).

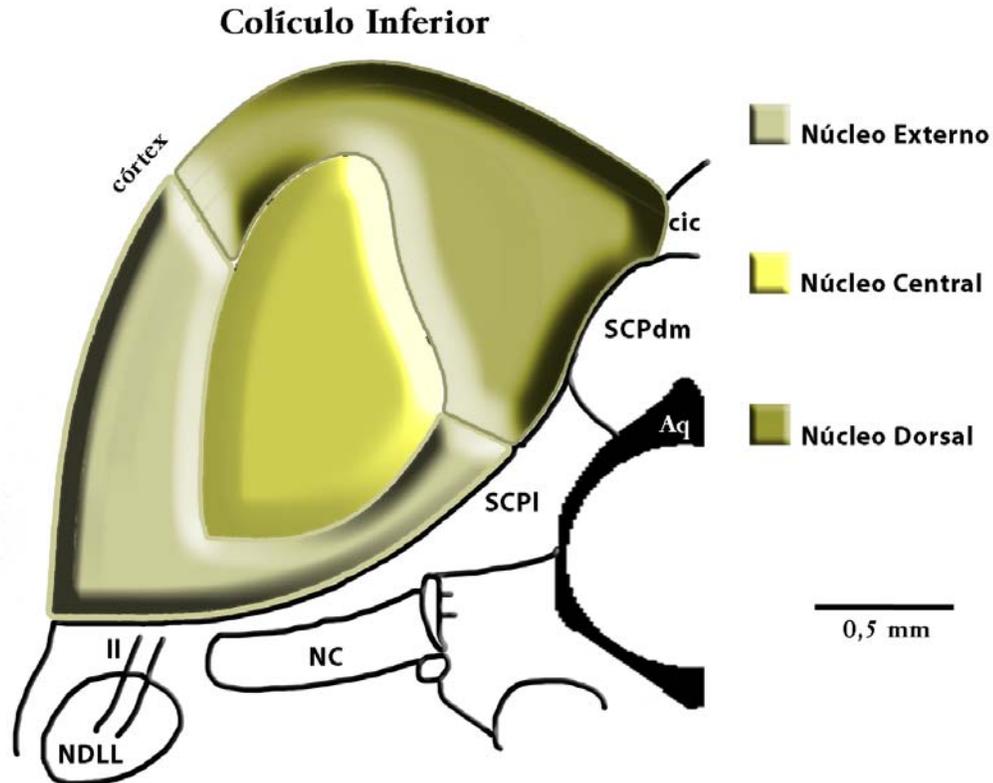


Figura 1.1. Seção coronal do colículo inferior de ratos mostrando suas divisões (adaptado de Huffman & Henson, 1990 e de Paxinos & Watson, 1997). Abreviações: Aq= aqueduto cerebral; cic= comissura do colículo inferior; II= trato do lemnisco lateral; NC= núcleo cuneiforme; NDLL= núcleo dorsal do lemnisco lateral; SCPdm= substância cinzenta periaquedutal dorsomedial; e SCPI= substância cinzenta periaquedutal lateral.

O NCCI está organizado em padrões de laminação, base de sua organização tonotópica, onde são encontrados neurônios que variam em forma e tamanho. A organização tonotópica desse núcleo apresenta-se com frequências de características baixas encontradas dorsalmente e frequências de características altas encontradas ventralmente (Hind et al., 1963; Aitkin et al., 1975). Este núcleo, além de receber as principais aferências de fibras do sistema ascendente auditivo, parece conter uma circuitaria local de neurônios GABAérgicos. O NECI, que inclui as divisões ventral e lateral do núcleo central definido por Morest & Oliver (1984), consiste de três camadas. O DCCI também possui três camadas e, assim como o NECI, não possui qualquer padrão de laminação. Estas subdivisões em camadas estão baseadas tanto no

tamanho e tipo celular dos neurônios do CI como na sua organização e forma de campo dendrítico (Faye-Lund & Osen, 1985).

O CI recebe axônios da maioria dos núcleos auditivos do tronco encefálico. Estudos utilizando traçadores retrógrados mostram que o CI de gatos recebe fibras de diferentes núcleos do tronco encefálico (Roth et al., 1978; Adams, 1979). As projeções ascendentes do tronco encefálico para o CI têm origem predominantemente no núcleo coclear contralateral e ipsilateral, no complexo olivar superior medial ipsilateral, no núcleo ventral do lemnisco lateral ipsilateral e no núcleo dorsal do lemnisco lateral ipsilateral e contralateral. Outras projeções, menos densas, têm origem no núcleo coclear ipsilateral, no núcleo periolivar e no colículo inferior contralateral (Webster, 1995).

O CI envia fibras principalmente para o núcleo geniculado medial do tálamo (NGm). Além disso, o CI mantém conexões indiretas com a SCP, o hipotálamo, a amígdala, a substância negra e o colículo superior (Webster, 1995; Beitz, 1982; LeDoux et al., 1985; 1990a-b). Portanto, o CI apresenta conexões importantes para as estruturas que compõem o SEA (Graeff, 1990).

As conexões eferentes do CI mantidas com a amígdala são estabelecidas indiretamente através do núcleo geniculado medial do tálamo (LeDoux et al., 1985; 1990^a-b; 1991). O NGm é, na verdade, um complexo de várias áreas e subnúcleos (Price, 1995). As projeções do NGm que alcançam os núcleos da amígdala têm origem principalmente na divisão medial e no núcleo suprageniculado. A amígdala também recebe densas aferências do núcleo intralaminar posterior e da região peripeduncular. Dentro da amígdala, essas aferências do NGm encontram-se em maior densidade principalmente nos núcleos lateral e central e na área de transição entre a amígdala e o *putamen* (LeDoux et al., 1985; 1990a-b; 1991).

Além da implicação do CI na produção de crises audiogênicas (Garcia-Cairasco e

Sabbatini, 1989; Garcia-Cairasco, 2002), um conjunto de evidências têm sugerido, baseado em modelos animais de estimulação elétrica e química, seu envolvimento no processamento de respostas aversivas (Brandão et al., 1993; 1994; 1999; Cardoso et al., 1994; Melo et al., 1992). De fato, a estimulação elétrica ou química dessa estrutura mesencefálica em ratos desencadeia reações de defesa. Assim, aumentos graduais na intensidade de estimulação elétrica do CI induzem, de modo progressivo, respostas defensivas características, tais como, estado de alerta, de congelamento e de fuga (Brandão et al., 1993; 1994; 1999). Injeções do antagonista de receptores GABAA, bicuculina, no CI causam respostas defensivas de fuga mostrando que o GABA exerce uma ação inibitória em neurônios do CI, implicados na elaboração das respostas defensivas (Brandão et al., 1988). Um ponto importante nos estudos dos substratos neurais do medo no CI é a natureza aversiva das respostas à estimulação elétrica ou química dessa estrutura decorre de experimentos nos quais os animais se empenham em diferentes comportamentos a fim de interromper ou desligar aquela estimulação (Bagri et al., 1991; Melo et al., 1992). Nesse contexto, foi analisada a expressão da proteína *c-fos* com o intuito de mapear áreas encefálicas ativadas pela estimulação elétrica aversiva do CI. Os resultados desse estudo mostram acentuada imunorreatividade *c-fos* no núcleo central e no complexo basolateral da amígdala e no CPFr (Lampreia et al., 2002).

Amígdala

A amígdala, localizada bilateralmente no lobo temporal anterior do encéfalo de primatas humanos e não-humanos é, na verdade, um complexo de muitos núcleos (Amaral et al., 1992; Price, 1995). Pitkänen et al. (1997), baseado em estudos de quimio e citoarquitetura e em fibras de projeção em ratos, identificou 13 regiões diferentes na amígdala (LeDoux, 2000;

Pitkänen et al., 1997).

Uma variedade de funções tem sido atribuída à amígdala, entre elas memória, atenção, interpretação de significado emocional de estímulos sensoriais e elaboração e produção de reações emocionais de medo (Aggleton, 1992; Adolphs et al., 1995; Gallagher & Chiba, 1996; LeDoux, 2000). Os núcleos de maior relevância para o medo condicionado e incondicionado são o lateral (NLa), o basal (NB), o basal acessório (NBA) e o central (NCE) (Davis et al., 1994a; Pitkänen et al., 1997; LeDoux, 2000). O complexo basolateral (CBL) é um termo que tem sido utilizado para se referir ao conjunto dos núcleos NLa e NB e, em alguns estudos, o NBA (Amaral et al., 1992).

As interconexões descritas destes núcleos da amígdala são observadas em muitas espécies, incluindo ratos, gatos e primatas (Pitkänen et al., 1997; Royer et al., 1999; Amaral et al., 1992). De maneira resumida, o NLa se projeta para o NB, NBA e NCE; o NB e NBA se interconectam e enviam projeções para o NCE. Entretanto, é importante reconhecer que cada núcleo é subdividido em várias regiões, cujas redes neurais obedecem a diferentes composições em suas conexões intrínsecas com as próprias regiões nucleares da amígdala e com outras regiões encefálicas. Assim, por exemplo, sinais que chegam ao NLa na região dorsal sofrem regulação local de interneurônios inibitórios (Stutzmann & LeDoux, 1999; Pitkänen et al., 1997). Esses interneurônios nessa região exercem um papel inibitório após a estimulação elétrica do tálamo auditivo que, a despeito de produzir disparos na divisão dorsal do NLa, são inicialmente mediados por receptores GABAA, durante os primeiros milissegundos e, posteriormente, por receptores GABAB, num período de inibição mais prolongada (Pitkänen et al., 1997). A divisão dorsal do NLa projeta-se para as outras duas divisões deste núcleo: regiões ventral e medial. Conferindo maior complexidade aos circuitos intra-amigdalares existe a presença de grupos intercalares de neurônios inibitórios GABAérgicos entre o CBL e os setores lateral e medial de

NCe. Esse grupo de neurônios inibitórios ocupa uma posição central no fluxo de informações entre o CBL e o NCe. Assim, as respostas dos neurônios localizados no setor medial do NCe podem aumentar ou diminuir dependendo dos núcleos do CBL ativados. Desta forma, por exemplo, a ativação dos núcleos lateral e basal promovem um aumento das respostas dos neurônios do setor medial do NCe (Paré & Smith, 1993; Collins & Paré, 1999a-b; Royer et al., 1999).

O NLa, que recebe densas projeções auditivas enviadas principalmente pelo tálamo e pelo córtex auditivos, mantém extensas conexões com o NCe. A região medial do NCe da amígdala parece ser o principal responsável pelas conexões com as áreas do tronco encefálico relacionadas com as reações de medo (Venning et al., 1984; Collins & Paré, 1999a-b). Entretanto, o NLa, apesar de manter conexões diretas com a região lateral e central do NCe, não se projeta diretamente para a região medial do NCe. A divisão medial do NCe recebe conexões das outras duas divisões deste núcleo: lateral e central. Conseqüentemente, são as conexões intra-amigdalares entre as demais regiões e núcleos do complexo basolateral da amígdala que possibilitam uma conexão do NLa com a região medial do NCe. No entanto, estudos mostram que a projeção direta do NLa para o NCe parece ser suficiente na mediação de respostas de medo condicionado, visto que a lesão dos núcleos NB e NBA não interfere nas reações de medo (LeDoux, 2000).

Uma ampla gama de estruturas encefálicas mantém conexões com os diversos núcleos da amígdala. Assim, por exemplo, o hipocampo mantém conexões com a divisão parvocelular do NB, enquanto o córtex frontal envia fibras para o NBA (Pitkänen et al., 1997). O núcleo central também envia projeções para a área tegmentar ventral (ATV ou A10) (Amaral et al., 1992; Fallon & Loughlin, 1995) e para a SCP (Rizvi et al., 1991). O CBL recebe conexões aferentes modulatórias do CPFr (Rosenkranz & Grace, 1999; 2001).

Vários estudos atribuem à amígdala o status de receptora de sinais de perigo, onde são avaliados quanto ao seu grau de ameaça para o organismo. Desta forma, a amígdala parece atuar como uma espécie de interface sensório-afetiva da reação de defesa, isto é, funcionaria como um filtro de sinais sensoriais, proporcionando-lhes uma conotação afetiva. O CBL, especificamente o núcleo lateral, é o principal sítio de recepção destes sinais, enquanto o núcleo central é a principal estação de saída para as respostas autonômicas, endócrinas e somáticas de medo (LeDoux, 2000; LeDoux et al., 1988; Davis, 1992a; Davis et al., 1994a-b; Fendt & Fanselow, 1999; Killcross et al., 1997).

Como visto anteriormente, o CI mantém conexões indiretas com o CBL através do NGm. Estudos mostram que a lesão excitotóxica do CBL ou do NCe da amígdala, com NMDA, modificam, em sentidos opostos, a aversividade produzida pela estimulação elétrica do CI. Desta forma, a lesão do NCe inibe e a lesão do CBL facilita a aversividade gerada pela estimulação elétrica do CI (Maisonnette et al., 1996). Assim, a amígdala parece interferir diretamente nos estados aversivos gerados pela estimulação elétrica do CI.

O núcleo dorsal da rafe (NDR) mantém extensas conexões com o CBL e com o NCe da amígdala (Bobillier et al., 1975; Azmitia & Segal, 1978; Sadikot & Parent, 1990; Vertes, 1991; Amaral et al., 1992; Fallon & Ciofi, 1992). Estudos neuroquímicos mostram que a ativação do NDR, através da injeção de ácido cáinico, aumenta a liberação de serotonina (5-HT) na amígdala (Viana et al., 1997). Outros estudos, também utilizando a técnica de microdiálise, mostram um aumento na liberação extracelular de serotonina na amígdala em ratos submetidos a estímulos estressantes (Amat et al., 1998; Rueter & Jacobs, 1996; Funada & Hara, 2001). Os receptores serotoninérgicos na amígdala parecem ter distintos padrões de distribuição. Os receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₁ são encontrados em alta densidade principalmente no hipocampo, porém altas densidades são observadas também no septo, hipotálamo, algumas

camadas do córtex e na amígdala, particularmente no NCe. Por outro lado, ao contrário da alta densidade de receptores serotoninérgicos 5-HT1 no NCe, o CBL parece ter uma alta densidade de receptores serotoninérgicos 5-HT2 e 5-HT3 (Pazos & Palacios, 1985; Ohuoda et al., 1993; Rainnie, 1999).

Stutzmann & LeDoux (1999) examinaram o papel da 5-HT na modulação do processamento de informações sensoriais no CBL. Esses autores mostraram que a serotonina parece exercer um papel inibitório sobre as eferências glutamatérgicas oriundas do córtex e do tálamo auditivos. Ainda, esta inibição da atividade glutamatérgica no CBL ocorre, predominantemente, devido à localização desses receptores serotoninérgicos, provavelmente dos subtipos 5-HT2 e 5-HT3, diretamente nos interneurônios GABAérgicos e nos neurônios de projeção no CBL (Stutzmann & LeDoux, 1999; Rainnie, 1999). Segundo esses estudos, o principal efeito da serotonina no CBL seria provocar uma ação estimulatória sobre os interneurônios GABAérgicos.

Em estudo recente, a administração do antagonista 5-HT2 nefazodona no CBL potencializou os efeitos gerados pela estimulação do CI através da administração de aminoácido excitatório NMDA nessa estrutura mesencefálica (Maisonnette et al., 2000). A lesão neuroquímica dos terminais nervosos serotoninérgicos com a neurotoxina serotoninérgica 5,7-DHT do CBL e do NCe produzem resultados opostos na aversividade gerada pela estimulação elétrica do CI: a lesão serotoninérgica no CBL facilita a aversividade gerada pelo CI, enquanto essa lesão no NCe a diminui (Macedo et al., 2002). Estes resultados estão de acordo, portanto, com aqueles obtidos com a lesão excitotóxica destes núcleos da amígdala.

A dopamina é outro neurotransmissor encontrado na amígdala em concentrações apreciáveis (Coco et al., 1992; Young & Ress, 1998; Inglis & Moghaddam, 1999; Funada & Hara, 2001). As projeções dopaminérgicas para a amígdala têm origem principalmente na área

tegmentar ventral (ATV ou A10) (Oades & Halliday, 1987; Le Moal & Simon, 1991). Além disso, os receptores dopaminérgicos D1 e D2 apresentam uma distribuição seletiva nos núcleos da amígdala; enquanto os receptores D1 são detectados principalmente no CBL, os receptores D2 são encontrados em maior densidade no NCe (Levey et al., 1993; Missale et al., 1998). Na presença de estímulos afetivos sensoriais, os níveis extracelulares de DA no CBL estão aumentados (Coco et al., 1992; Inglis & Moghaddam, 1999). Os estudos de microdiálise em ratos revelam altas concentrações extracelulares de dopamina no CBL e no NCe (Young & Ress, 1998; Funada & Hara, 2001). A aplicação de choques nas patas aumenta os níveis de DA na amígdala, revelando um envolvimento desse neurotransmissor em eventos de natureza aversiva (Young & Ress, 1998). Apesar de pouco esclarecido o papel da dopamina na amígdala, estudos eletrofisiológicos mostram que a ativação de receptores dopaminérgicos com a apomorfina no CBL atenua a frequência de disparo das eferências provenientes do CPFr (Rosenkranz & Grace, 2001). Além da serotonina e dopamina, os aminoácidos excitatórios e inibitórios têm papel destacado nos processos mediados pela amígdala. Assim, a neurotransmissão GABAérgica no CBL parece ser essencial nos processos de aquisição e/ou expressão do medo condicionado, enquanto os receptores NMDA no CBL exercem um papel fundamental nos processos de aquisição do medo condicionado (Muller et al., 1997; Miserendino et al., 1990; Kim & Fanselow, 1992). No entanto, desconhecemos os mecanismos neuroquímicos amigdalares envolvidos na produção de comportamentos defensivos gerados a partir da estimulação elétrica do CI. Portanto, torna-se relevante investigar a participação serotoninérgica e dopaminérgica no CBL e no NCe na expressão destas reações defensivas. Ainda, não está claro se os estados aversivos gerados pela estimulação do CI são mediados por mecanismos amigdalares.

Córtex pré-frontal

A elaboração, definição e delimitação de critérios neuroanatômicos do CPFr é muito complexa, pois sua variabilidade de espécie para espécie é marcante (Kolb, 1984). Um critério sensível muito utilizado para sua definição é a distribuição das fibras eferentes que partem do núcleo dorsomedial do tálamo para o CPFr (Barbas, 1995; Kolb, 1984, 1990; McDonald, 1998; Fuster, 1989, 2001). Assim, foram identificadas cinco diferentes regiões corticofrontais no rato: 1- uma área do cíngulo anterior (Cg1, Cg2, Cg3); 2- uma área pré-límbica (PL) e infralímbica (IL); 3- uma área orbital; 4- uma área insular agranular, que pode ser subdividida nos componentes dorsal (AIAd) e ventral (AIAv); e 5- uma pequena faixa do córtex pré-central (CPc) (Kolb, 1984, 1990). Essas regiões podem ser ordenadas em três grandes grupos: o córtex pré-frontal medial (CPFm), que compreende o PL, IL, Cg e o CPc; o córtex pré-frontal orbital (CPFo); e o córtex pré-frontal lateral, que compreende o AIAd e AIAv (Kolb, 1984, 1990; McDonald, 1998).

Além das densas conexões mantidas com o núcleo dorsomedial do tálamo, o CPFr tem uma profusão de conexões corticais e subcorticais (Zillies & Wree, 1995; Fuster, 1989; Kolb, 1984, 1990). Assim, por exemplo, o CPFr recebe, diretamente ou através do tálamo, fibras do hipotálamo, SCP e amígdala. Particularmente, as eferências que partem da amígdala são direcionadas principalmente para o CPFm (Kolb, 1984, 1990; Price, 1999). O CPFr envia fibras para praticamente todas as estruturas das quais ele recebe eferências (Fuster, 1989). Assim, suas eferências projetam-se para outras áreas corticais e para várias estruturas encefálicas, tais como o hipocampo, os núcleos da base, o hipotálamo, a SCP e a amígdala (Fuster, 1989; Kolb, 1984, 1990).

As eferências do CPFr para a amígdala são direcionadas principalmente para o NB

(McDonald & Mascagni, 1996; McDonald, 1998). Essas eferências corticofrontais em direção ao NB são principalmente fibras glutamatérgicas (Brinley-Reed et al.,1995). Segundo Royer e colaboradores (1999), a estimulação do NB produz uma inibição da atividade neuronal da região medial do NCe. Com efeito, o próprio CPFr pode participar da modulação dos estados aversivos que dependam da atuação da amígdala. Assim, a estimulação do CPFr parece inibir a produção de comportamentos emocionais produzidos pela CBL (Zbrozyna & Westwood, 1991), enquanto a sua lesão parece desinibir alguns comportamentos afetivos (Morgan & LeDoux, 1995; Jaskiw & Weinberger, 1992). O CBL e o NCe, principalmente a divisão medial que exerce uma função crítica na mediação das respostas de medo, mantêm conexões com o tálamo e com o córtex auditivo. Assim, parece que o balanço das aferências sensoriais e do CPFr para o CBL podem determinar se uma resposta emocional mediada pela amígdala será produzida na presença de um estímulo sensorial significativo.

O CPFr está classicamente relacionado à memória, planejamento ou execução de ações, organizando temporalmente o comportamento e formando memória de seqüências comportamentais e planos ou esquemas de ação (Fuster, 1989, 2001). Estudos clássicos têm demonstrado que a estimulação do CPFr produz várias alterações no sistema respiratório e cardiovascular (Fuster, 1989; Zillies, 1990). Muitos estudos apontam um papel regulatório do CPFr nas reações de medo e stress regulados pelo eixo hipotálamo–hipófise–adrenal (Sullivan & Gratton, 2002; Lacroix et al., 2000) e pela SCP e amígdala (Price, 1990; McDonald, 1998; Davidson, 2002; Behbehani, 1995; Powell et al., 1997; Barbas, 1995).

Muitos estudos sugerem a participação do CPFr em distúrbios de ansiedade ou na esquizofrenia (David et al., 1996; Gorman et al., 2000). Eventos de natureza aversiva ou relacionados ao stress aumentam os níveis extracelulares de dopamina no córtex pré-frontal (Thierry et al., 1976; Cuadra et al. 1999, 2001; Abercrombie et al., 1989). De fato, diversos

estressores agudos (Biggio et al., 1990; Feenstra, et al., 1995) e uma ampla variedade de estímulos aversivos (Abercrombie et al., 1989; Feenstra & Botterblom, 1996; Yoshioka et al., 1996; Chachic & Powell, 1998) causam um aumento na concentração extracelular de dopamina no córtex pré-frontal. A principal origem das vias dopaminérgicas no CPFr é a região A10 (Dahlström & Fuxe, 1964), através da via mesocortical (Oades & Halliday, 1987; Le Moal & Simon, 1991).

Em estudo recente deste Laboratório de Neuropsicofarmacologia de Ribeirão Preto em colaboração com o Laboratório de Farmacologia da *Universidad Nacional de Córdoba* (Argentina) mostramos que a estimulação elétrica aversiva do CI, no limiar de fuga, aumenta a liberação extracelular de dopamina no córtex frontal (CFr), enquanto a estimulação da SCP dorsal não causa efeitos apreciáveis sobre os níveis dopaminérgicos extracelulares dessa estrutura telencefálica (Cuadra et al., 2000). No entanto, desconhecemos quais estruturas podem mediar esse aumento de DA no CFr a partir da estimulação elétrica do CI. Uma possibilidade é uma via glutamatérgica que parte do CI ao corpo geniculado medial que, por sua vez, envia fibras glutamatérgicas para o complexo basolateral da amígdala. O complexo basolateral mantém conexões glutamatérgicas recíprocas e diretas com o CFr que podem influenciar sua atividade dopaminérgica.

Alguns estudos recentes mostram que ocorre um aumento na liberação extracelular de DA e 5-HT na amígdala durante estados aversivos (Amat et al., 1998; Rueter & Jacobs, 1996; Funada & Hara, 2001; Inglis & Moghaddam, 1999; Young & Ress, 1998). Não há, entretanto, estudos que mostrem essas alterações neuroquímicas com a ativação aversiva de estruturas do teto mesencefálico, como o colículo inferior. Como muitos estudos indicam que o envolvimento da amígdala em estados aversivos depende da região estudada é possível que mecanismos mediados por DA e/ou 5-HT no complexo basolateral e no núcleo central da

amígdala possam influenciar diferentemente o comportamento defensivo induzido pela estimulação aversiva do colículo inferior. Baseado neste raciocínio postulamos que eventuais alterações nos níveis extracelulares desses neurotransmissores no complexo basolateral da amígdala e no núcleo central da amígdala estariam também envolvidas com o papel funcional da amígdala na regulação do medo condicionado e incondicionado gerados a partir da estimulação aversiva do colículo inferior. Por fim, dadas as estreitas conexões entre a amígdala e o córtex frontal, ficamos interessados em saber se alterações na liberação extracelular de aminas biogênicas no CFr induzidas pela estimulação do CI podem ser moduladas pela amígdala.

Objetivos

Objetivos

Este estudo examinou a participação da amígdala e de seus mecanismos dopaminérgicos e serotoninérgicos nos estados aversivos induzidos pela estimulação do colículo inferior. Esse estudo foi subdividido em três fases: i) Experimento I: efeitos da estimulação elétrica do colículo inferior sobre os níveis extracelulares de dopamina e serotonina no complexo basolateral e no núcleo central da amígdala; ii) Experimento II: efeitos da inativação e de antagonistas dopaminérgicos do tipo D1 e serotoninérgicos do tipo 5-HT2 no complexo basolateral da amígdala no medo condicionado e no medo incondicionado gerados a partir do colículo inferior; e iii) Experimento III: efeitos da inativação do complexo basolateral da amígdala sobre o aumento nos níveis extracelulares de dopamina no córtex frontal produzido pela estimulação elétrica do CI.

Os experimentos I e II foram desenvolvidos no Laboratório de Neuropsicofarmacologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil. O experimento III foi desenvolvido no *Laboratorio de Farmacología da Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba*, Córdoba, Argentina.

Esperimento I

Experimento I: efeitos da estimulação elétrica do colículo inferior sobre os níveis extracelulares de dopamina e serotonina no complexo basolateral e no núcleo central da amígdala

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar com peso inicial entre 280 g e 320 g provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo, câmpus de Ribeirão Preto. Os animais, mantidos posteriormente no biotério do Laboratório de Neuropsicofarmacologia com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e ciclo de iluminação claro-escuro (período de luz: 7:00 às 19:00 hs), foram alojados (cinco animais por caixa) em caixas de polipropileno (40 x 30 x 20 cm), forradas com serragem, recebendo comida e água *ad libitum*. Os animais, após o procedimento cirúrgico, foram mantidos nessas mesmas caixas.

Cirurgia

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol, por via i.p. (250 mg/kg), e foram fixados a um aparelho estereotáxico (David Kopf, EUA), pelo rochedo temporal e incisivos superiores (barra dos incisivos: -3,3 mm). Após tricotomia na região da cabeça, foi feita limpeza com álcool iodado e injeção subcutânea (0,2 ml) de lidocaína (2 %) com adrenalina (3 %) (Harvey, Brasil). A seguir, foi realizada uma incisão de aproximadamente 2,0 cm, removendo-se pele, tecido subcutâneo e periósteo. Com a superfície craniana exposta e ajustada na posição horizontal foram implantados dois parafusos nos ossos cranianos para a posterior ancoragem de uma prótese de ionômero de vidro (VOCO, Alemanha) sobre o local da incisão.

Em seguida, foram introduzidos, após perfuração óssea e de acordo com cada protocolo experimental, um eletrodo bipolar no CI e uma sonda de microdiálise concêntrica no CBL ou no NCe. As coordenadas utilizadas, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1997), tendo o bregma como referência, foram: colículo inferior, anterior-posterior (AP) = - 8,8 mm; médio-lateral (ML) = 1,6 mm; e dorso-ventral (DV) = 4,5 mm; complexo basolateral da amígdala, AP = - 2,8 mm; ML = $\pm 5,1$ mm; DV = 7,8 mm; núcleo central da amígdala, AP = -2.6 mm, ML = ± 4.2 mm, DV = 7.5 mm. O CBL é considerado neste estudo como composto pelos núcleos lateral, basolateral e basomedial. Esses implantes cirúrgicos foram realizados unilateralmente, tanto no encéfalo direito como no esquerdo.

Microdiálise

As sondas de microdiálise concêntricas, confeccionadas a partir de membranas de diálise (Cuprophane, Akzo, Alemanha; 250 mm d.o.), possuíam uma área de 2 mm (para implantes no CBL) e 1 mm (para implantes no NCe) que possibilitava a troca de moléculas entre o tecido nervoso da amígdala e o meio interno da membrana (ocupado por líquido cefalorraquidiano artificial - LCRA). Um tubo de polietileno (PE-20; Becton-Dickinson, EUA) foi conectado na extremidade de entrada da sonda e um tubo de sílica foi conectado na extremidade de saída da sonda, constituindo uma via de entrada do LCRA e outra de saída do dialisado. Durante o procedimento de microdiálise, os animais foram colocados em uma cuba para microdiálise (Bioanalytical Systems, EUA), que possibilitava sua livre movimentação. Neste momento, o tubo de polietileno e o tubo de sílica foram conectados a um sistema de braços e comutadores, que permitia a conexão do tubo de polietileno com uma seringa de microinfusão (entrada do LCRA) e o tubo de sílica com um coletor de fração (saída do dialisado) refrigerado com a temperatura ajustada a 4°C (BAS, EUA). Na sessão experimental, a perfusão com LCRA (NaCl 147 mM, KCl

4,0 mM, CaCl₂ 1,5 mM e MgCl₂ 0,8 mM) foi realizada através de uma bomba de infusão (BAS, EUA), num fluxo contínuo de 2,0 µL/min. As amostras do dialisado foram coletadas a cada 30 min, em tubos contendo 10 µL de uma solução com ácido perclórico (0,05 N) e diidroxibenzilamina (DHBA, padrão interno).

Determinação por CLAE da DA e da 5-HT

A dopamina e a serotonina e seus metabólitos ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido 5-hidroxiindolacético, respectivamente, contida no dialisado, foram analisadas num sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Esse sistema era constituído por um detector eletroquímico (LC-4C; Bioanalytical Systems, EUA), acoplado a uma coluna de fase-reversa (Nucleosil 125 x 2 mm, C18, tamanho de partículas de 5 µm, Macherey & Nagel, Alemanha) e a uma bomba para CLAE de baixa pulsação (PM-80, BAS, EUA). O potencial utilizado foi de 650 mV (eletrodo de referência Ag/AgCl). A fase móvel, constituída de 0,15 M ácido cloroacético, 0,12 M NaOH, 0,67 mM EDTA, 0,86 mM octilsulfato de sódio, 3,5% acetonitrila e 1,8% tetrahydrofurano (pH = 3,0), foi filtrada e bombeada através do sistema num fluxo de 250 µL/min. O volume por amostra de dialisado injetada foi de 50 µL. O sistema de CLAE era integrado a um sistema de aquisição de dados, PeakSimple II (SRI Instruments, EUA). Sob essas condições, o limite de detecção foi de aproximadamente 0,5 pg por amostra para DA e 5-HT e de aproximadamente 1,0 pg para os metabólitos DOPAC e 5-HIAA. A quantificação dos neurotransmissores DA e de 5-HT e seus metabólitos, respectivamente, DOPAC e 5-HIAA, foi feita pela comparação da área dos picos em relação ao padrão interno (DHBA).

Determinação dos limiares aversivos

Após a implantação de eletrodos bipolares (MS 303/3, Plastics One Inc., EUA), os limiares foram mensurados na cuba de microdiálise (Bioanalytical Systems, EUA), numa sala experimental com iluminação incandescente (35 lux na base da cuba). Através de um estimulador de onda senoidal (ESF12, DeIVechio, Brasil), foram aplicados estímulos elétricos intracranianos no CI com corrente inicial de 10 μ A (pico-a-pico) e gradualmente aumentados em passos de 5 μ A (CA, 60 Hz, 15 s) em períodos de 1 min. A corrente elétrica foi monitorada por meio de um osciloscópio (PM3218, Phillips, EUA), através de um resistor de 1K Ω . Os limiares aversivos foram determinados como a menor intensidade de corrente, aplicada por duas vezes consecutivas, capaz de produzir comportamentos aversivos indicativos de alerta, de congelamento e de fuga. O limiar de alerta foi definido operacionalmente como a menor intensidade capaz de produzir episódios de suspensão do movimento, com interrupções de qualquer comportamento corrente e assumindo uma postura de atenção. O limiar de congelamento foi definido como a menor intensidade capaz de produzir uma imobilidade, acompanhada por pelo menos duas das seguintes reações autonômicas: micção, defecação, piloereção e/ou exoftalmia. O limiar de fuga foi definido como uma ativação comportamental acompanhada por corridas, saltos e/ou galopes. Os animais com limiares acima de 150 μ A foram descartados dos experimentos.

Drogas e reagentes

Todos os reagentes utilizados para CLAE foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) ou da Sigma-Chemical (St. Louis, EUA).

Procedimento

O experimento foi iniciado seis dias depois do procedimento cirúrgico para os implantes de um eletrodo bipolar no CI e de uma sonda de microdiálise concêntrica no CBL ou no NCe e um dia após o procedimento de mensuração dos limiares aversivos. A membrana de diálise foi perfundida com a solução de LCRA num fluxo de 2,0 $\mu\text{L}/\text{min}$. Após um período de 2 horas de equilíbrio, as amostras de dialisado foram coletadas a intervalos regulares de 10 min dentro de tubos de vidro lacrados contendo 10 μL de uma solução com ácido perclórico (0,05 N) e DHBA. Esses tubos foram mantidos na temperatura de 4°C num coletor de frações refrigerado. Os níveis basais dos neurotransmissores e seus metabolitos, anteriores a qualquer procedimento, foram definidos como a média de três amostras consecutivas de dialisados, diferindo não mais do que 10%. Após a coleta dessas amostras basais, consideradas como 100%, foi aplicada a intensidade de corrente elétrica nos limiares de alerta, de congelamento ou de fuga, determinados um dia antes. A ocorrência da reação comportamental de alerta, de congelamento ou de fuga, foi considerada como tempo zero. A seguir, foram coletados dialisados a cada 30 min até 120 min.

Três grupos de animais, com um eletrodo bipolar implantado no CI e com uma sonda de microdiálise concêntrica implantada no CBL, foram testados para examinar os efeitos da estimulação elétrica no CI, nos limiares de alerta (n=6), de congelamento (n=7) e de fuga (n=7) sobre os níveis de DA e de 5-HT no CBL. Outros três grupos de animais, com um eletrodo bipolar implantado no CI e com uma sonda de microdiálise concêntrica implantada no NCe, foram testados para examinar os efeitos da estimulação elétrica no CI aplicada nos limiares de alerta (n=6), de congelamento (n=6) e de fuga (n=6) sobre os níveis de DA e de 5-HT no NCe.

Histologia

Após o término dos experimentos, os animais foram anestesiados com uma sobredose de hidrato de cloral, administrada via i.p., e perfundidos intracardiacamente com solução de salina tamponada (pH= 7,3), seguida por uma solução de formalina tamponada (4%). Após a perfusão, os animais foram decapitados e seus encéfalos removidos e colocados na mesma solução de formalina por duas horas e, em seguida, os encéfalos foram colocados em solução de sacarose (30%) em tampão fosfato (pH= 7,3) durante 12 horas. Os encéfalos foram, posteriormente, seccionados coronalmente em séries de 60 µm de espessura através de um criostato (Cryocut 1800, Leica, Alemanha). Subseqüentemente, os cortes foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas, corados com violeta de cresil (5%) (Sigma, EUA) para a localização dos sítios de microinjeção e de diálise, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2005). Foram considerados como integrantes da amostra, somente os dados obtidos de animais que apresentaram localização dos eletrodos e das sondas de microdiálise concêntricas nas estruturas-alvo, segundo comparações com diagramas do atlas de Paxinos & Watson (1997).

Análise dos dados

Os dados estão representados como média \pm E.P.M. do percentual dos valores basais, calculados a partir das primeiras três amostras consecutivas de dialisados, que foram obtidas antes do procedimento de estimulação elétrica do CI.

Os dados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de dois fatores com medidas repetidas. Essa análise estatística foi aplicada para examinar o efeito da estimulação elétrica no CI, nos limiares de alerta, de congelamento e de fuga (fator 1) sobre os níveis extracelulares de DA e 5-HT e seus metabolitos DOPAC e 5-HIAA no CBL e no NCe

(fator 2: tempo das amostras de dialisados). Nos casos em que ocorreram diferenças estatisticamente significativas foi aplicado o teste *post hoc* de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados

Os sítios de estimulação elétrica e de diálise estavam localizados, respectivamente, no CI e no CBL. A figura 4.1A mostra um sítio representativo de estimulação elétrica no CI. A

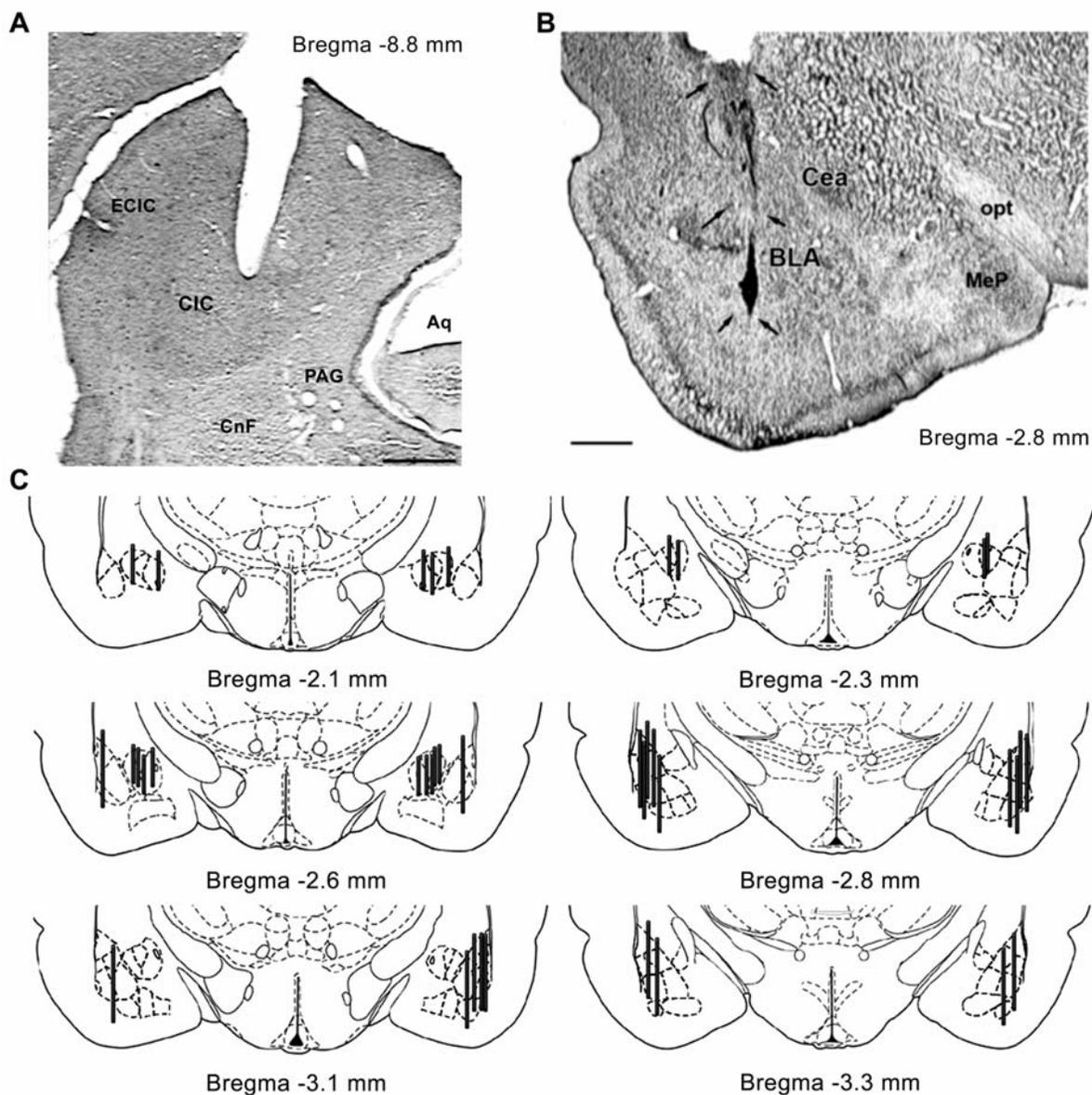


Figura 4.1. Fotomicrografias representativas dos sítios de estimulação elétrica no colículo inferior (A) e do implante de uma sonda de microdiálise concêntrica no complexo basolateral da amígdala (B). Representações de seções coronais mostrando a localização dos implantes das sondas de microdiálise no complexo basolateral da amígdala e no núcleo central da amígdala (C), adaptada do atlas de Paxinos e Watson (1997). Barras = 500 μ m. Aq, aqueduto; BLA, complexo basolateral da amígdala; Cea, núcleo central da amígdala; CIC, núcleo central do colículo inferior; CnF, núcleo cuneiforme; ECIC, núcleo externo do colículo inferior; MeP, núcleo medial da amígdala; opt, tracto óptico; e PAG, substância cinzenta periaquedutal.

figura 4.1B mostra a posição representativa de uma sonda de microdiálise concêntrica implantada no CBL. A figura 4.1C mostra a posição das sondas de microdiálise no CBL e no NCe.

Os níveis extracelulares basais de DA foram de 23 ± 3 e 27 ± 2 fmol/amostra no CBL e no NCe, respectivamente e os níveis extracelulares basais de 5-HT foram de 22 ± 1 e 29 ± 2 fmol/amostra no CBL e no NCe, respectivamente. Os níveis extracelulares basais de DOPAC foram de 173 ± 17 e 291 ± 29 fmol/amostra no CBL e no NCe, respectivamente e os níveis extracelulares basais de 5-HIAA foram de 279 ± 19 e 188 ± 16 fmol/amostra no CBL e no NCe, respectivamente.

Os resultados obtidos no CBL e no NCe serão descritos separadamente abaixo.

Complexo basolateral da amígdala

A figura 4.2A mostra o curso temporal dos níveis extracelulares de DA no CBL de animais com estimulação elétrica no CI no limiars de alerta, congelamento e fuga. A ANOVA mostrou que houve um aumento estatisticamente significativo nos níveis extracelulares de DA no CBL sobre o tempo [$F(6,102) = 18,30$; $p < 0,05$], porém sem efeito significativo sobre os limiars [$F(2,17) = 1,50$; $p > 0,05$], após a estimulação elétrica do CI. Houve efeito estatisticamente significativo na interação tempo x limiars [$F(12,102) = 2,12$; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Tukey mostrou que houve um aumento significativo nos níveis extracelulares de DA nos tempos 20 e 40 min após a estimulação elétrica do CI nos limiars de congelamento e de fuga em comparação ao tempo 0 min, imediatamente antes da estimulação elétrica do CI ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis extracelulares de DA no CBL nos animais com estimulação elétrica do CI no limiar de alerta ($p > 0,05$). Os níveis extracelulares de DA no CBL aumentaram aproximadamente 50% em comparação com os valores basais após a

estimulação elétrica do CI nos limiares de congelamento e de fuga. Porém, não houve diferenças estatisticamente significativas nos níveis extracelulares de DA nos tempos 20 e 40 min quando comparamos a estimulação elétrica do CI nos limiares de congelamento e de fuga ($p > 0,05$).

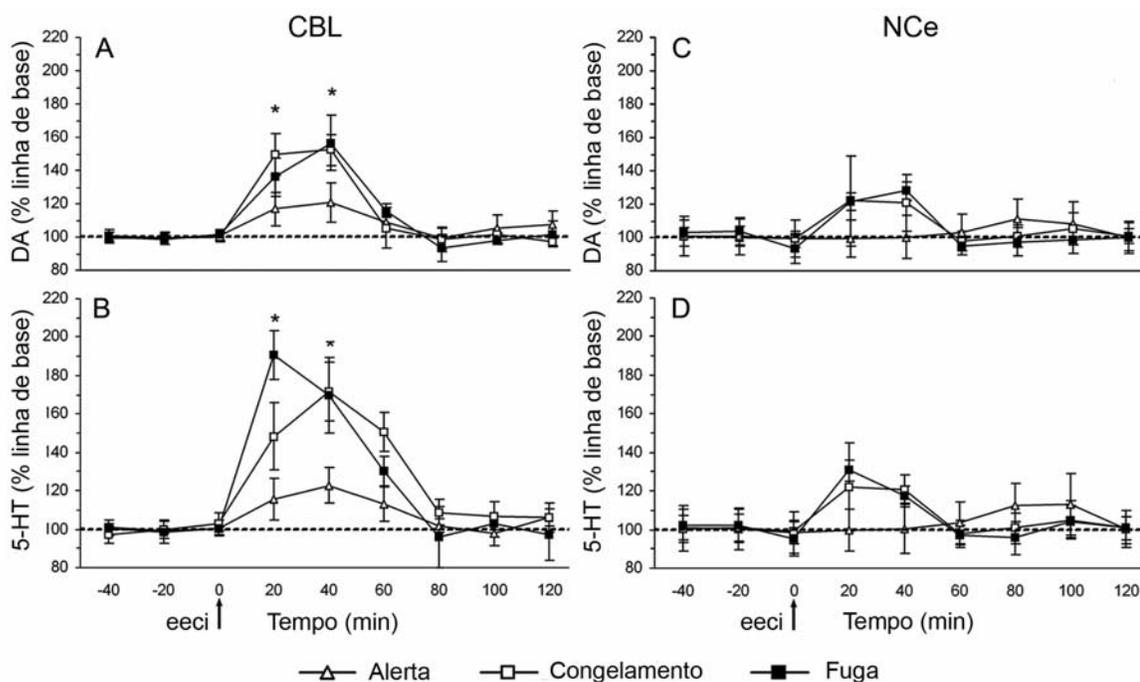


Figura 4.2. Níveis extracelulares de dopamina (DA) e de serotonina (5-HT) nos dialisados do complexo basolateral da amígdala (A e B, respectivamente) e do núcleo central da amígdala (C e D, respectivamente) antes (-40, -20 e 0 min) e depois (20 – 120 min) da estimulação elétrica do colículo inferior (eeci). A estimulação elétrica do colículo inferior foi aplicada nos limiares de alerta, congelamento e fuga, no tempo 0. Os dados estão apresentados como porcentagem em relação aos níveis basais (média das três primeiras amostras de dialisado consecutivas antes do eeci, considerada como 100%) e estão expressos como média \pm E.P.M. A análise estatística aplicada foi a ANOVA de dois fatores com medidas repetidas, seguido do teste *post hoc* de Tukey. Complexo basolateral da amígdala (CBL): $n=6$ para o grupo alerta e $n=7$ para os grupos congelamento e fuga; núcleo central da amígdala (NCe): $n=6$ para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação à linha de base.

A figura 4.2B mostra o curso temporal dos níveis extracelulares de 5-HT no CBL de animais com estimulação elétrica no CI nos limiares de alerta, congelamento e fuga. A ANOVA mostrou que houve um aumento estatisticamente significativo nos níveis extracelulares de DA no CBL sobre o tempo [$F(6,102) = 16,01$; $p < 0,05$], porém sem efeito significativo sobre os limiares [$F(2,17) = 2,17$; $p > 0,05$], após a estimulação elétrica do CI. Houve efeito estatisticamente significativo na interação tempo x limiares [$F(12,102) = 2,05$; $p < 0,05$]. O teste

post hoc de Tukey mostrou que houve um aumento significativo nos níveis extracelulares de 5-HT nos tempos 20 e 40 min após a estimulação elétrica do CI no limiar de fuga e no tempo 20 min após a estimulação elétrica do CI no limiar de congelamento em comparação ao tempo 0 min, imediatamente antes da estimulação elétrica do CI ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis extracelulares de DA no CBL nos animais com estimulação elétrica do CI no limiar de alerta ($p > 0,05$). Os níveis extracelulares de DA no CBL aumentaram aproximadamente 70% em comparação com os valores basais após a estimulação elétrica do CI nos limiares de congelamento e de fuga. Porém, não houve diferenças estatisticamente significativas nos níveis extracelulares de DA no tempo 20 min quando comparamos a estimulação elétrica do CI nos limiares de congelamento e de fuga ($p > 0,05$).

As figuras 4.3A e 4.3B mostram o curso temporal dos níveis extracelulares de DOPAC e 5-HIAA no CBL de animais com estimulação elétrica no CI no limiares de alerta, congelamento e fuga. A ANOVA mostrou que houve um aumento estatisticamente significativo nos níveis extracelulares de DOPAC e 5-HIAA no CBL sobre o tempo [$F(6,102) = 13,97$ e $3,01$ para DOPAC e 5-HIAA, respectivamente; $p < 0,05$ em ambos os casos], porém sem efeito significativo sobre os limiares [$F(2,17) = 0,05$ e $0,63$ para DOPAC e 5-HIAA, respectivamente; $p > 0,05$ em ambos os casos], após a estimulação elétrica do CI. Não houve efeito estatisticamente significativo na interação tempo x limiares [$F(12,102) = 1,26$ e $1,76$ para DOPAC e 5-HIAA, respectivamente, $p > 0,05$ em ambos os casos]. O teste *post hoc* de Tukey mostrou que houve um aumento significativo nos níveis extracelulares de DOPAC e 5-HIAA nos tempos 20 e 40 min após a estimulação elétrica do CI no limiar de fuga e no tempo 20 min após a estimulação elétrica do CI no limiar de congelamento em comparação ao tempo 0 min, imediatamente antes da estimulação elétrica do CI ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa nos

níveis extracelulares de DOPAC e 5-HIAA no CBL nos animais com estimulação elétrica do CI no limiar de alerta ($p > 0,05$).

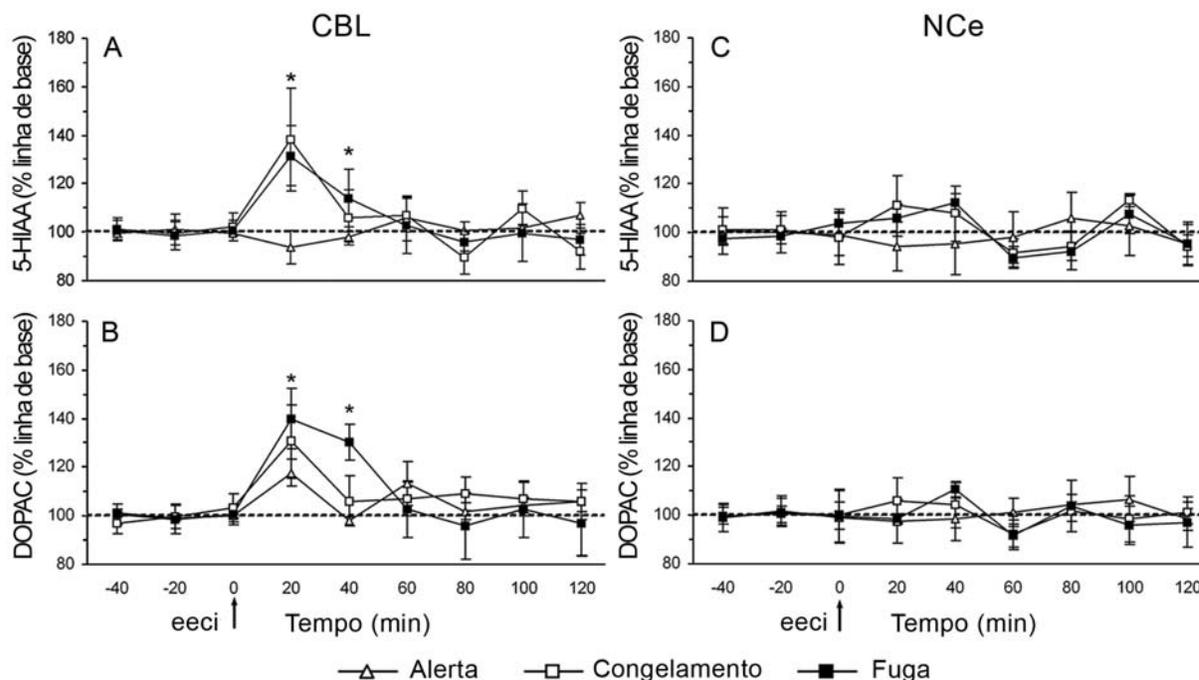


Figura 4.3. Níveis extracelulares do ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido 5-hidroxitriptâmico (5-HIAA) nos dialisados do complexo basolateral da amígdala (A e B, respectivamente) e do núcleo central da amígdala (C e D, respectivamente) antes (-40, -20 e 0 min) e depois (20 – 120 min) da estimulação elétrica do colículo inferior (eeci). A estimulação elétrica do colículo inferior (eeci) foi aplicada nos limiares de alerta, congelamento e fuga, no tempo 0. Os dados estão apresentados como porcentagem em relação aos níveis basais (média das três primeiras amostras de dialisado consecutivas antes do eeci, considerada como 100%) e estão expressos como média \pm E.P.M. A análise estatística aplicada foi a ANOVA de dois fatores com medidas repetidas, seguido do teste *post hoc* de Tukey. Complexo basolateral da amígdala (CBL) e núcleo central da amígdala (NCe): $n=6$ para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação à linha de base.

Núcleo central da amígdala

A figura 4.2C mostra o curso temporal dos níveis extracelulares de DA no NCe de animais com estimulação elétrica no CI no limiares de alerta, congelamento e fuga. A ANOVA não mostrou efeitos estatisticamente significativos nos níveis extracelulares de DA no NCe tanto sobre o tempo [$F(6,102) = 1,67$; $p > 0,05$] como sobre limiares [$F(2,15) = 0,74$; $p > 0,05$] após a estimulação elétrica do CI. Não houve efeito estatisticamente significativo na interação tempo x limiares [$F(12,90) = 0,83$; $p > 0,05$]. Não houve diferenças estatisticamente significativas nos três

limiares de estimulação elétrica no CI sobre os níveis extracelulares de DA no NCe quando comparamos com o tempo 0 min ($p > 0,05$).

A figura 4.2D mostra o curso temporal dos níveis extracelulares de 5-HT no NCe de animais com estimulação elétrica no CI no limiares de alerta, congelamento e fuga. A ANOVA não mostrou efeitos estatisticamente significativos nos níveis extracelulares de 5-HT no NCe tanto sobre o tempo [$F(6,90) = 1,86$; $p > 0,05$] como sobre limiares [$F(2,15) = 1,63$; $p > 0,05$] após a estimulação elétrica do CI. Não houve efeito estatisticamente significativo na interação tempo x limiares [$F(12,90) = 1,02$; $p > 0,05$]. Não houve diferenças estatisticamente significativas nos três limiares de estimulação elétrica no CI sobre os níveis extracelulares de 5-HT no NCe quando comparamos com o tempo 0 min ($p > 0,05$).

As figuras 4.3C e 4.3D mostram o curso temporal dos níveis extracelulares de DOPAC e 5-HIAA no NCe de animais com estimulação elétrica no CI no limiares de alerta, congelamento e fuga. A ANOVA não mostrou efeitos estatisticamente significativos nos níveis extracelulares de DOPAC e 5-HIAA no NCe tanto sobre o tempo [$F(6,90) = 0,45$ e $1,34$ para DOPAC e 5-HIAA, respectivamente; $p < 0,05$ em ambos os casos] como sobre limiares [$F(2,15) = 1,38$ e $1,35$ para DOPAC e 5-HIAA, respectivamente; $p < 0,05$ em ambos os casos] após a estimulação elétrica do CI. Não houve efeito estatisticamente significativo na interação tempo x limiares [$F(12,90) = 0,31$ e $0,59$ para DOPAC e 5-HIAA, respectivamente; $p < 0,05$ em ambos os casos]. Não houve diferenças estatisticamente significativas nos três limiares de estimulação elétrica no CI sobre os níveis extracelulares de DOPAC e 5-HIAA no NCe quando comparamos com o tempo 0 min ($p > 0,05$).

Discussão

Todos os sítios de estimulação elétrica estavam situados no colículo inferior, uma área tradicionalmente conhecida por processar informações acústicas de natureza aversiva (Merzenich & Reid, 1974; Hind et al., 1963; Cardoso et al., 1994; Brandão et al., 2001).

O presente trabalho mostrou um aumento nos níveis extracelulares de DA e de 5-HT no complexo basolateral da amígdala nos animais com estimulação elétrica no colículo inferior nos limiares de congelamento e de fuga.

O aumento nos níveis extracelulares de DA na amígdala em resposta a vários estressores, ou em resposta a estimulação de áreas envolvidas na circuitaria aversiva ou durante a aprendizagem tem sido relatado na literatura (Goldstein et al., 1996; Harmer & Phillips, 1999; Young & Rees, 1998; Inglis & Moghaddam, 1999; Funada & Hara, 2001; Suzuki et al., 2002). Esse aumento nos níveis extracelulares de DA no CBL permaneceu aproximadamente por quarenta minutos após a estimulação elétrica do CI nos limiares de congelamento e fuga. Porém, esse aumento nos níveis extracelulares de DA no CBL não foi estatisticamente diferente quando comparamos os limiares de congelamento e de fuga. Assim, independentemente do comportamento defensivo gerado no CI – congelamento ou fuga – o aumento nos níveis extracelulares de dopamina e serotonina no CBL seguiram praticamente o mesmo curso temporal.

A amígdala recebe projeções moderadas de fibras dopaminérgicas do sistema mesotelencefálico, com origem nas células das áreas A9 e, principalmente, A10 ou área tegmentar ventral (Ungerstedt, 1971; Asan, 1997a,b; Le Moal & Simon, 1991). A administração sistêmica de agonistas dopaminérgicos facilitam comportamentos que dependem da participação da amígdala (Borowski & Kokkinidis, 1996; Harmer & Phillips, 1999), enquanto os antagonistas

dopaminérgicos parecem diminuir esses comportamentos (Greba & Kokkinidis, 2000). Além disso, as manipulações dopaminérgicas diretamente na amígdala também alteram esses comportamentos (Greba & Kokkinidis, 2000; Greba et al., 2001; Lamont & Kokkinidis, 1998). Alguns estudos, por exemplo, indicam que a modulação dopaminérgica da aprendizagem associativa requer a ação direta da DA nos neurônios de projeção do CBL. Assim, durante o condicionamento os neurônios de projeção do CBL apresentam um aumento no limiar de despolarização. Essas alterações são bloqueadas pela administração do antagonista dopaminérgico haloperidol (Rosenkranz & Grace, 2002a-b; Maren, 2000; Paré & Collins, 2000; Quirk et al., 1995).

Embora a função precisa da dopamina na amígdala seja desconhecida, alguns estudos propõem um efeito modulatório sobre as aferências sensoriais e corticais que alcançam essa estrutura. Assim, a estimulação do CPFr provoca uma excitação inicial nos neurônios do CBL, especificamente sobre interneurônios inibitórios (Rosenkranz & Grace, 1999). Desta forma, a estimulação do CPFr poderia causar uma inibição sobre os neurônios de projeção do CBL através da ativação de interneurônios nesta região que, provavelmente, estão sob influências de receptores dopaminérgicos do tipo D1 (Rosenkranz & Grace, 2001; Grace & Rosenkranz, 2002). Porém, esse efeito não ocorre da mesma forma para todas as aferências que alcançam o CBL. Assim, quando o CPFr e o córtex de associação auditivo são estimulados outro efeito é observado, que passará a depender da ordem nas estimulações. Com efeito, a estimulação da região cortical sensorial não parece afetar significativamente a resposta à estimulação do CPFr. Entretanto, se o CPFr é estimulado primeiro, há uma potente inibição das respostas à estimulação do córtex de associação auditivo (Rosenkranz & Grace, 2001). A ativação dos receptores dopaminérgicos do tipo D1 parecem atenuar os efeitos do CPFr sobre o CBL. A DA parece agir também através de receptores dopaminérgicos do tipo D2 localizados no CBL onde causariam

uma potencialização dos aferentes corticais sensoriais. Com efeito, a estimulação dos receptores dopaminérgicos D2 aumentaria a eficácia das aferências sensoriais para o CBL, enquanto, em contraste, a estimulação dos receptores dopaminérgicos D1 não afetaria direta e substancialmente os neurônios no CBL. Porém, a estimulação desses receptores D1 causa uma potente atenuação das aferências do CPFr dirigidas ao CBL (Rosenkranz & Grace, 2002b).

Resumidamente, a estimulação dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 exerce uma ação coordenada no CBL: pode potencializar as aferências provenientes de regiões corticais sensoriais e atenuar as aferências do CPFr. Assim, quando os níveis de DA estão aumentados no CBL duas ações principais podem ocorrer. Primeiro, a capacidade do CPFr para estimular interneurônios inibitórios, que indiretamente inibiria os neurônios de projeção do CBL, estaria reduzida, provavelmente, pela ação sobre receptores dopaminérgicos do tipo D1. Esse efeito, *per se*, afetaria a eficácia das aferências corticais sensoriais que alcançam o CBL, incrementando a ação dessas aferências no CBL. Porém, além desse efeito, o aumento nos níveis de DA no CBL provocaria uma ação direta sobre os receptores dopaminérgicos do tipo D2, que aumentaria a excitabilidade dos neurônios de projeção do CBL. Como consequência, a DA maximizaria as respostas dos neurônios de projeção do CBL que estão sob influências de aferências sensoriais e removeria a capacidade do CPFr em atenuar essas aferências sensoriais que alcançam a amígdala. Assim, por exemplo, a administração de anfetamina poderia atenuar a influência inibitória do CPFr sob o CBL e aumentar as repostas dos neurônios de projeção do CBL. Com efeito, alterações nesses mecanismos dopaminérgicos poderiam exercer um impacto sobre as respostas afetivas geradas na amígdala em resposta a um estímulo sensorial, independente das características e da saliência do estímulo. A estimulação elétrica do CI provoca um aumento nos níveis de DA que, provavelmente, exerce alterações sobre a atividade do CBL e acentua o caráter aversivo dessa estimulação.

Muitos estudos têm associado alterações no funcionamento da amígdala com ansiedade (Rauch et al., 2003), depressão (Drevets, 2003), esquizofrenia (Chance et al., 2002) e drogas de abuso (Robbins & Everitt, 2002). Em algumas desses distúrbios parece haver um envolvimento do sistema dopaminérgico e serotoninérgico na causa ou no tratamento (Reynolds, 1983; Volkow et al., 2002).

A estimulação elétrica do colículo inferior não provocou qualquer alteração nos níveis extracelulares de DA no núcleo central da amígdala. Até o presente momento, poucos estudos foram direcionados para examinar o papel dopaminérgico no NCe.

A amígdala pode ser um sítio de ação para a modulação serotoninérgica da neurocircuitaria do medo. De fato, estudos neuroanatômicos indicam que a amígdala de roedores recebe uma densa projeção de fibras serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe (Vertes, 1991; Vertes et al., 1999; Azmitia & Segal, 1978; Sadikot & Parent, 1990; Ma et al., 1991) e que receptores do subtipo 5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃ estão presentes na amígdala (Stuart et al., 1986; Pompeiano et al., 1994; Varnas et al., 2001). A estimulação do núcleo dorsal da rafe produz um aumento na liberação de 5-HT na amígdala (Viana et al., 1997). Além disso, alterações nos níveis de serotonina afetam o balanço entre a neurotransmissão inibitória e excitatória no complexo basolateral da amígdala (Rainnie, 1999; Stutzmann & LeDoux, 1999).

A amígdala é uma estrutura fundamental nos processos de aquisição do medo condicionado bem como na expressão de respostas aprendidas e inatas (LeDoux, 1994, 2000; Killcross et al., 1997; Paré et al., 2004). Muitos estudos mostram que há um aumento nos níveis de 5-HT durante as reações de defesa diante de estímulos aversivos (Amat et al., 1998; Graeff, 2002; Kawahara et al., 1993). Alterações no funcionamento do sistema serotoninérgico na amígdala têm sido relacionadas à ansiedade (Graeff, 2002; Millan, 2003). A deficiência no funcionamento do sistema serotoninérgico no CBL tem sido relacionada a alterações no

processamento de informações sensoriais que, com efeito, poderia passar a processar um sinal sensorial inócuo como um evento emocional significativo (Stutzmann & LeDoux, 1999). Em estudo recente mostramos que a redução da neurotransmissão serotoninérgica no CBL através da neurotoxina 5,7-diidroxitriptamina causa um aumento na aversividade gerada pela estimulação elétrica do CI, enquanto nos animais falso-operados não houve mudanças nas reações aversivas geradas pela estimulação do CI (Macedo et al., 2002). O presente trabalho mostra também um aumento nos níveis extracelulares de 5-HT no CBL nos animais com estimulação elétrica no colículo inferior nos limiares de congelamento e de fuga. As alterações no sistema serotoninérgico do CBL através da lesão neurotóxica serotoninérgica ou pela injeção local de antagonistas serotoninérgicos podem, ambas, aumentar a aversividade da estimulação do CI (Maisonnette et al., 2000; Macedo et al., 2002). A ausência da regulação serotoninérgica no CBL pode resultar em um padrão alterado na expressão comportamental em resposta a estimulação aversiva do CI. Assim, parece que os mecanismos serotoninérgicos no CBL integram informação sensorial no processamento de respostas relacionadas ao medo diante de estímulos de perigo gerados pelo CI. O estudo recente também mostra um aumento nos níveis extracelulares de 5-HT no CBL em ratos expostos a estímulos incondicionados (Gonzalez et al., 2004). Os mecanismos mediados pelo sistema serotoninérgico no CBL poderiam ser uma resposta adaptativa do organismo às conseqüências aversivas da estimulação do CI.

A atividade neuronal no CBL parece ser regulada por uma complexa interação recíproca entre neurônios de projeção e uma rede de interneurônios. Além dessa interação, o relacionamento das aferências e eferências do CBL pode ser modulado pela serotonina. Uma das ações da serotonina pode ocorrer através da excitação de interneurônios inibitórios, provavelmente via ativação de receptores 5-HT₂ (Stutzmann & LeDoux, 1999). Ao mesmo tempo, essa excitação pode provocar uma inibição indireta nos neurônios de projeção, via um

aumento na liberação de GABA, cuja ação subsequente é, principalmente, ativação de receptores GABAA. A 5-HT pode também, em menor extensão, provocar uma ação inibitória direta nos neurônios de projeção do CBL, via ativação de receptores 5-HT1A. Quando há altas concentrações ou um aumento prolongado de 5-HT no CBL, pode ocorrer um efeito indireto adicional na excitabilidade neuronal: há uma redução na probabilidade da liberação de glutamato dos terminais glutamatérgicos pré-sinápticos, provavelmente mediado por receptores 5-HT1A ou 5-HT1B (Rainnie, 1999). Nesse quadro, o sistema serotoninérgico parece regular primordialmente a atividade de interneurônios e, desta forma, pode influenciar na sincronização dos neurônios de projeção no CBL em relação às aferências sensoriais que alcançam essa região da amígdala. Com efeito, a 5-HT no CBL pode modular as respostas comportamentais geradas pela estimulação do CI.

Diferentemente do CBL, no NCe não há uma alteração significativa nos níveis extracelulares de 5-HT durante a estimulação elétrica do CI. Esses resultados apontam para um papel diferencial do CBL e do NCe na regulação do medo incondicionado gerado pela estimulação elétrica do CI. De fato, resultados anteriores deste laboratório mostraram que enquanto a lesão neurotóxica serotoninérgica no CBL causou um aumento nas conseqüências aversivas da estimulação do CI, essa mesma manipulação no NCe resultou numa atenuação das conseqüências aversivas da estimulação do CI (Macedo et al., 2002). Através da técnica de microdiálise não conseguimos verificar a participação do sistema serotoninérgico no NCe. Uma explicação pode ser devido a alterações discretas e rápidas nos níveis extracelulares de 5-HT no NCe que não foram detectados nesse estudo. Outra possibilidade pode ser relacionada a zona de inserção da membrana de diálise, ou seja, outras regiões próximas ao NCe podem influenciar os níveis serotoninérgicos e dopaminérgicos basais.

Os níveis extracelulares de DOPAC e 5-HIAA seguiram o mesmo padrão de

aumento nos níveis extracelulares de DA e 5-HT no CBL indicando um aumento no metabolismo dessas aminas biogênicas no CBL.

Os resultados apresentados sustentam que a informação acústica de natureza aversiva gerada no CI ativa mecanismos dopaminérgicos e serotoninérgicos no CBL. A neurocircuitaria responsável compreende provavelmente o colículo inferior – núcleo geniculado medial – complexo basolateral da amígdala. Além disso, o NCe não apresenta qualquer modificação nos níveis extracelulares de DA ou de 5-HT durante a estimulação aversiva do CI. Não obstante, outros mecanismos podem estar agindo durante esse evento, tais como mecanismos glutamatérgicos e/ou GABAérgicos.

Assim, os dados obtidos neste trabalho mostram que a estimulação elétrica do CI, nos limiares de alerta e de congelamento, causam um aumento diferencial na liberação extracelular de DA e de 5-HT no CBL, mas sem alterações nesses níveis no NCe. Com efeito, a informação acústica aversiva ascendente do CI é acompanhada por um aumento concomitante nos níveis extracelulares de DA e 5-HT no CBL. Esses mecanismos dopaminérgicos e serotoninérgicos no CBL podem regular o medo incondicionado gerado no CI. A ausência desses mecanismos regulatórios no CBL pode resultar em um padrão alterado na expressão comportamental em resposta a estímulos de medo incondicionado gerado a partir do CI ou pode interferir nos processos de medo condicionado eliciados com o uso da estimulação do CI. Assim, torna-se relevante estudar qual o papel da dopamina e da serotonina no CBL durante o medo condicionado e incondicionado a partir da estimulação dos substratos neurais da aversão no CI.

Esperimento II

Experimento II: efeitos da inativação e de antagonistas D1 e 5-HT2 no complexo basolateral da amígdala no medo condicionado e no medo incondicionado gerados a partir do colículo inferior

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar com peso inicial entre 280 g e 320 g , mantidos sob as mesmas condições do Experimento I (pág. 22).

Cirurgia

Foi utilizado o mesmo procedimento cirúrgico descritos no Experimento I (pág. 24). Entretanto, foram implantadas, de acordo com as mesmas coordenadas descritas anteriormente, duas cânulas-guia direcionadas para o CI e para o CBL.

Drogas

Neste estudo foram utilizados o agonista de receptores GABAA muscimol, o antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT2, cetanserina, o antagonista de receptores dopaminérgicos D1, SCH-23390 e o inibidor da enzima descarboxilase do ácido glutâmico, semicarbazida. Todas essas drogas foram obtidas da Sigma (EUA), diluídas em solução salina (0,9%) e microinjetadas no volume de 0,2 µL. A concentração escolhida de muscimol nesse estudo (0,5 µg/0,2 µL) para a inativação neural do CBL deve-se a sua efetividade em outros estudos, demonstrando um bom grau de inatividade quando injetadas localmente em estruturas encefálicas (Wilensky et al., 1999). A concentração de semicarbazida utilizada neste estudo para

injeções no CI foi selecionada baseada em estudos deste laboratório mostrando que, quando microinjetada no teto mesencefálico de ratos, provoca uma resposta comportamental aversiva, com predomínio do congelamento (Aguiar & Brandão, 1994; Nobre et al., 2004). As concentrações de cetanserina (0,5 nmol e 1 nmol) e de SCH-23390 (1 µg/0,2 µl e 2 µg/0,2 µl) foram selecionadas de acordo com estudos anteriores (Lamont & Kokkinidis, 1998; Zangrossi-Junior & Graeff, 1994).

Microinjeções

As injeções de muscimol (0,5 µg / 0,5 µL), de cetanserina (0,5 nmol e 1 nmol) e de SCH-23390 (1 µg/0,2 µl e 2 µg/0,2 µl) no CBL e de semicarbazida (6 µg/0,2 µL) no CI foram realizadas por meio de uma cânula de infusão (30 G; 14 mm). Essas drogas ou o seu veículo foram microinjetadas no complexo basolateral da amígdala num volume de 0,2 µl. O fluxo para a administração da droga foi de 0,2 µL/min (tempo total de administração de 1 min). Após esse procedimento, esperou-se um tempo adicional de 60 s para a completa dispersão da droga no tecido encefálico. As injeções foram realizadas através de uma seringa de 5 µl (Hamilton, EUA) conectada, através de um tubo de polietileno (PE-10; Becton-Dickinson, EUA), à cânula de infusão. O volume injetado foi controlado por uma bomba de microinfusão (Harvard Apparatus, EUA).

Aparelhos

Os testes comportamentais foram iniciados entre 5-7 dias após o procedimento cirúrgico. Os dois testes comportamentais deste estudo utilizaram uma arena circular construída com acrílico (60 cm de diâmetro e 50 cm de altura). Os experimentos foram conduzidos na mesma sala experimental, que contava com pistas visuais externas, através da posição da câmera

de vídeo, quadros e outros estímulos discriminativos arranjados de forma permanente no teto e nas paredes da sala. Um ruído (70 dB) foi gerado por um ar-condicionado e a iluminação na base da arena era de 50 lux. Nos dois testes comportamentais, o comportamento dos animais foi gravado através de uma câmera de vídeo e, posteriormente, analisado com a ajuda de um computador. No teste de aversão condicionada ao lugar a arena foi dividida em quatro quadrantes iguais através de linhas dispostas em sua base. Durante o condicionamento foram inseridas barreiras construídas em acrílico separando os quatro quadrantes. No teste do campo aberto a arena foi dividida em doze seções. A limpeza da arena foi realizada com uma solução de amônia (5%).

Teste de aversão condicionada ao lugar

Esse procedimento foi realizado durante três dias consecutivos e dividido em três sessões: pré-condicionamento ou linha de base (1º dia), condicionamento (2º dia) e pós-condicionamento ou teste (3º dia). Na sessão de linha de base, os animais foram colocados no centro da arena com livre acesso aos compartimentos (barreiras ausentes). Nessa sessão, foi avaliado o tempo de permanência em cada quadrante, durante 10 min. A permanência em um quadrante foi definida a partir da entrada no quadrante das duas patas dianteiras do rato. Foi escolhido como quadrante de tratamento para a sessão seguinte (condicionamento) aquele onde o animal não permaneceu nem o maior nem o menor tempo. Na sessão de condicionamento, os animais permaneceram confinados ao quadrante de tratamento (através das barreiras de acrílico inseridas na arena), durante 30 min. Nessa fase, foram administradas previamente as injeções de salina, muscimol, cetanserina ou SCH-23390 no CBL e de salina ou semicarbazida no CI. Na sessão de teste, assim como na sessão de linha de base, os animais foram colocados no centro da arena e tiveram livre acesso aos compartimentos (barreiras ausentes), sendo avaliado o tempo de

permanência em cada quadrante durante 10 min. Foi mensurada a atividade locomotora através do número de entradas nos quadrantes.

Teste do campo aberto

Após as injeções de salina, muscimol, cetanserina ou SCH-23390 no CBL e de salina ou semicarbazida no CI, os animais foram colocados no centro da arena. O número de cruzamentos foi definido como a entrada com as quatro patas numa das seções da arena e a duração do comportamento de congelamento foi definida operacionalmente como uma ausência de movimentos corporais durante pelo menos 6 segundos, exceto pelos movimentos respiratórios, e acompanhada por pelo menos duas das seguintes reações autonômicas: micção, defecação, piloereção e/ou exoftalmia. Esses comportamentos foram registrados durante 30 min e avaliados posteriormente.

Procedimento

Os experimentos foram iniciados 5-7 dias após o procedimento cirúrgico. Nos dois testes, aversão condicionada ao lugar e campo aberto, os animais foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos, de acordo com as injeções no CBL e no CI, respectivamente: i) injeções de salina ou muscimol (0,5 µg / 0,5 µL) no CBL e de salina ou semicarbazida no CI; ii) injeções de salina ou cetanserina (0,5 nmol e 1 nmol) no CBL e de salina ou semicarbazida no CI; e iii) injeções de salina ou SCH-23390 (1 µg/0,2 µl, 2 µg/0,2 µl) no CBL e de salina ou semicarbazida (6 µg/0,2 µL) no CI. As injeções no CBL e no CI foram administradas, respectivamente, 20 min e 5 min antes dos testes comportamentais. Os resultados foram analisados tomando por base a droga injetada no CBL (muscimol, cetanserina ou SCH-23390). A tabela 1 mostra em detalhes os grupos experimentais (i, ii e iii) de acordo com as combinações das injeções no CBL e no CI,

visando caracterizar os efeitos de cada uma dessas drogas sobre os comportamentos de medo condicionado e incondicionado gerados a partir do CI.

Tabela 1 – Grupo de animais com injeções no complexo basolateral da amígdala (CBL) e no colículo inferior (CI) administradas, respectivamente, 20 min e 5 min, antes do teste de aversão condicionada ao lugar (TACL) e do teste do campo aberto (TCA) acordo com as combinações das injeções no CBL e no CI, respectivamente, com suas abreviaturas e o número de animais de acordo com o teste de aversão condicionada ao lugar e do campo aberto. Estão indicados os números de animais em cada grupo conforme o teste realizado.

Grupos	Injeções no CBL + CI	Abreviaturas	TACL	TCA
			n	n
i	Salina + Salina	Sal+Sal	10	6
i	Salina + Semicarbazida	Sal+Sem	11	8
i	Muscimol (0,5 µg / 0,5 µL) + Salina	Mus+Sal	9	6
i	Muscimol (0,5 µg / 0,5 µL) + Semicarbazida	Mus+Sem	10	8
ii	Salina + Salina	Sal+Sal	10	9
ii	Salina + Semicarbazida	Sal+Sem	8	9
ii	Cetanserina (0,5 nmol) + Salina	K0,5+Sal	8	6
ii	Cetanserina (1 nmol) + Salina	K1+Sal	8	7
ii	Cetanserina (0,5 nmol) + Semicarbazida	K0,5+Sem	8	9
ii	Cetanserina (1 nmol) + Semicarbazida	K1+Sem	8	8
iii	Salina + Salina	Sal+Sal	9	9
iii	Salina + Semicarbazida	Sal+Sem	11	9
iii	SCH-23390 (1 µg / 0,2 µL) + Salina	SCH1+Sal	8	7
iii	SCH-23390 (2 µg / 0,2 µL) + Salina	SCH2+Sal	8	7
iii	SCH-23390 (1 µg / 0,2 µL) + Semicarbazida	SCH1+Sem	8	9
iii	SCH-23390 (2 µg / 0,2 µL) + Semicarbazida	SCH2+Sem	8	8

Histologia

Após o término dos experimentos, foi administrado 0,2 µL de Azul de *Evans* (2%) para marcar os sítios de injeções no BLA e no CI. Em seguida, os animais foram submetidos ao mesmo procedimento descrito na pág. 27. Foram considerados como integrantes da amostra,

somente os dados obtidos de animais que apresentaram localização das cânulas-guia no CBL e no CI, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2005).

Análise dos dados

Os dados estão representados como média + E.P.M. do tempo de permanência e número de entradas nos quadrantes no teste de aversão condicionada ao lugar e número de cruzamentos e tempo de congelamento no teste do campo aberto.

Os dados do tempo de permanência (linha de base e teste) obtidos no teste de aversão condicionada ao lugar foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de dois fatores com medidas repetidas. Essa análise estatística foi aplicada para examinar os efeitos das injeções (fator 1) sobre as sessões (linha de base e teste) do teste de aversão condicionada ao lugar (fator 2). O número de entradas nos quadrantes, registrado para cada grupo de tratamento, foi analisado através da ANOVA de um fator.

O tempo de congelamento e o número de cruzamentos registrados foram analisados através da ANOVA de um fator.

Nos casos em que ocorreram diferenças estatisticamente significativas foi aplicado o teste *post hoc* de Newman-Keuls. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados

Os sítios de injeção estavam localizados no CBL e no CI. As figuras 4.4A e 4.4B mostram, respectivamente, um sítio representativo de microinjeção no CBL e no CI.

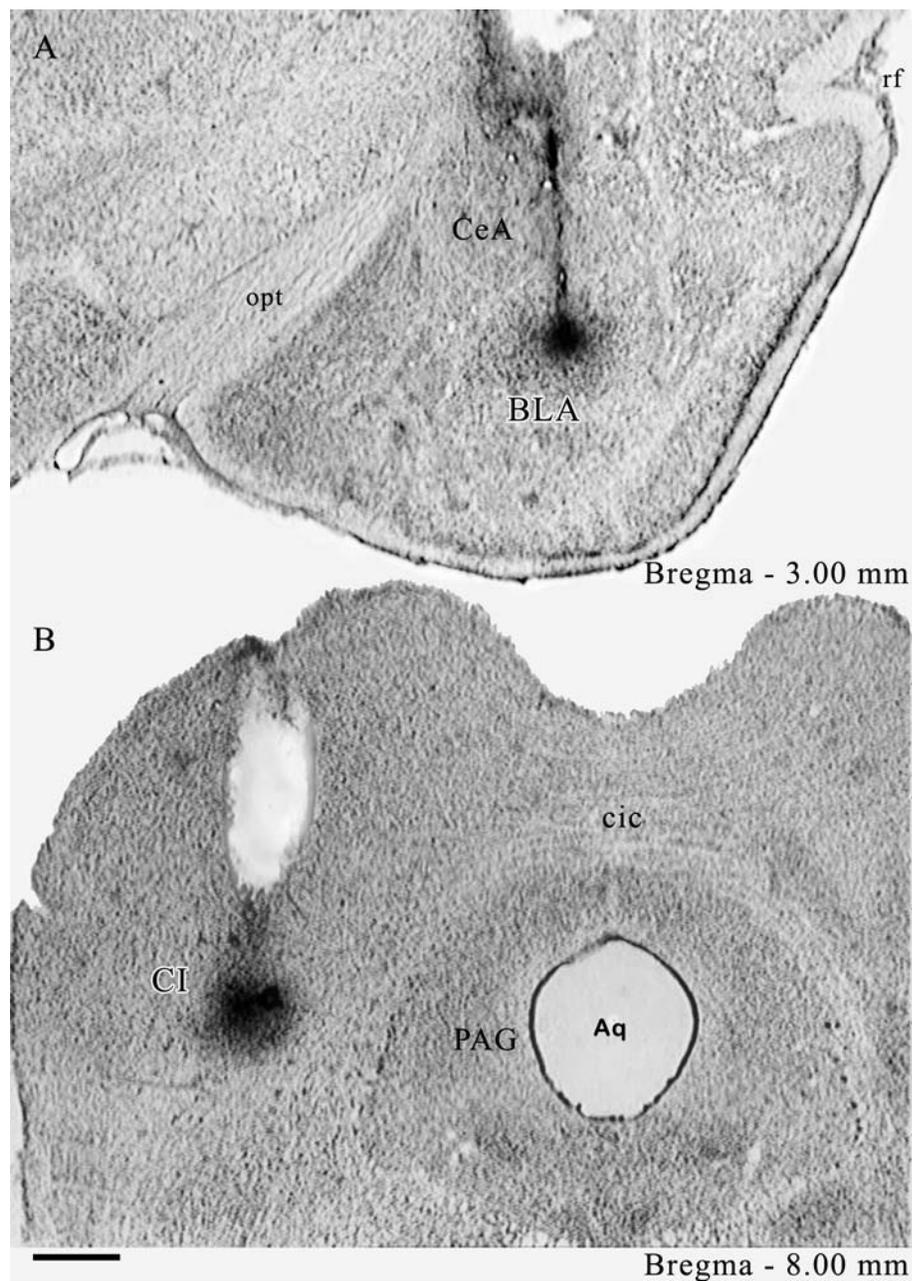


Figura 4.4. Fotomicrografias representativas dos sítios de microinjeções no complexo basolateral da amígdala (A) e no colículo inferior (B). Barras = 500 μ m. Aq, aqueduto; BLA, complexo basolateral da amígdala; CeA, núcleo central da amígdala; CI, colículo inferior; cic, comissura do colículo inferior; opt, tracto óptico, PAG, substância cinzenta periaqueductal; e rf, fisura rinal.

Os resultados obtidos no teste de aversão condicionada ao lugar e no teste da arena serão descritos abaixo de acordo com as microinjeções no CBL de muscimol (Mus), de cetanserina (K), de SCH-23390 (SCH) ou salina (Sal). Esses grupos recebem semicarbazida (Sem) ou salina (Sal) no CI, conforme Tabela 1.

Muscimol

Durante a sessão de linha de base (dia 1), não houve diferenças estatisticamente significativas quando comparamos o tempo de permanência em cada um dos quatro quadrantes ($131,38 \pm 16,18$; $146,23 \pm 12,35$; $155,40 \pm 14,54$; e $167,00 \pm 15,50$ segundos), revelando que não houve uma preferência ou uma aversão por qualquer quadrante [$F(3,156)=1,41$; $p > 0,05$].

A figura 4.5 mostra a média do tempo de permanência no quadrante de tratamento durante as sessões de linha de base e de teste nas diferentes combinações de microinjeções no CBL e no CI (Sal+Sal, Sal+Sem, Mus+Sal e Mus+Sem). A ANOVA mostrou diferenças estatisticamente significativas nos tratamentos [$F(3,36)=3,82$; $p < 0,05$], nas sessões [$F(1,36)=12,20$; $p < 0,05$] e na interação entre tratamentos x sessões [$F(3,36)=3,38$; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou uma redução no tempo de permanência no quadrante de tratamento no dia do teste para o grupo Sal+Sem em comparação com os demais grupos ($p < 0,05$). Os animais do grupo Sal+Sem mostraram uma aversão ao quadrante de tratamento, isto é, uma redução no tempo de permanência no quadrante de tratamento na sessão teste ($p < 0,05$). A análise *post hoc* mostrou também que não houve diferenças estatisticamente significativas nos grupos Sal+Sal, Mus+Sal e Mus+Sem ($p > 0,05$).

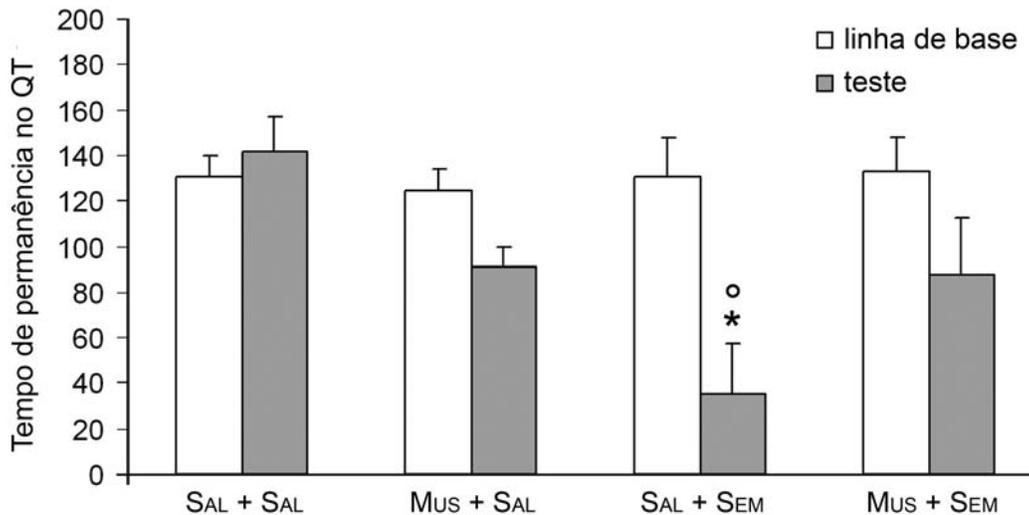


Figura 4.5. Média + E.P.M. no tempo de permanência no quadrante de tratamento (QT) no teste de aversão condicionada ao lugar durante sessão de linha de base e de teste. Durante a sessão de condicionamento foram microinjetados muscimol (Mus; 0,5 µg / 0,2 µl) ou salina (Sal; 0,2 µl) no complexo basolateral da amígdala e semicarbazida (Sem; 6 µg / 0,2 µl) ou salina (Sal; 0,2 µl) no colículo inferior. Todos os animais receberam duas microinjeções antes do confinamento no quadrante de tratamento (QT) na sessão de condicionamento (30 min): salina + salina (Sal+Sal, n=10); muscimol + salina (Mus+Sal, n=9); salina + semicarbazida (Sal+Sem; n=11); muscimol + semicarbazida (Mus+Sem; n=10). Na sessão de linha de base e de teste os animais tiveram livre acesso a todos os quadrantes da arena durante 10 min. A análise estatística aplicada foi a ANOVA de dois fatores com medidas repetidas, seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ em relação à linha de base dentro do mesmo grupo; e⁰ $p < 0,05$ em relação à sessão de teste dos demais grupos.

A ANOVA mostrou que não houve diferenças estatisticamente significativas no número de entradas nos quatro quadrantes para as diferentes combinações de microinjeções no CBL [$F(3,36)=0,16$; $p > 0,05$]. Entretanto, os animais mostraram uma redução na atividade motora durante a sessão de teste quando comparada à sessão de linha de base [$F(1,36)=10,92$; $p < 0,05$]. Não houve diferenças estatisticamente significativas na interação entre tratamento x sessões [$F(3,36)=0,17$; $p > 0,05$]. Embora todos os grupos tenham apresentado uma diminuição no comportamento exploratório durante a sessão de teste em relação à sessão de linha de base, somente os animais do grupo Sal+Sem mostraram uma redução no tempo de permanência no quadrante de tratamento durante a sessão de teste.

A figura 4.6 mostra os efeitos das mesmas quatro combinações de microinjeções no CBL e no CI nos comportamentos de congelamento e de cruzamentos medidos no teste do

campo aberto. A ANOVA mostrou diferenças estatisticamente significativas no tempo de congelamento entre as combinações de microinjeção no CBL e no CI [F(3,24)=26,00; $p < 0,05$].

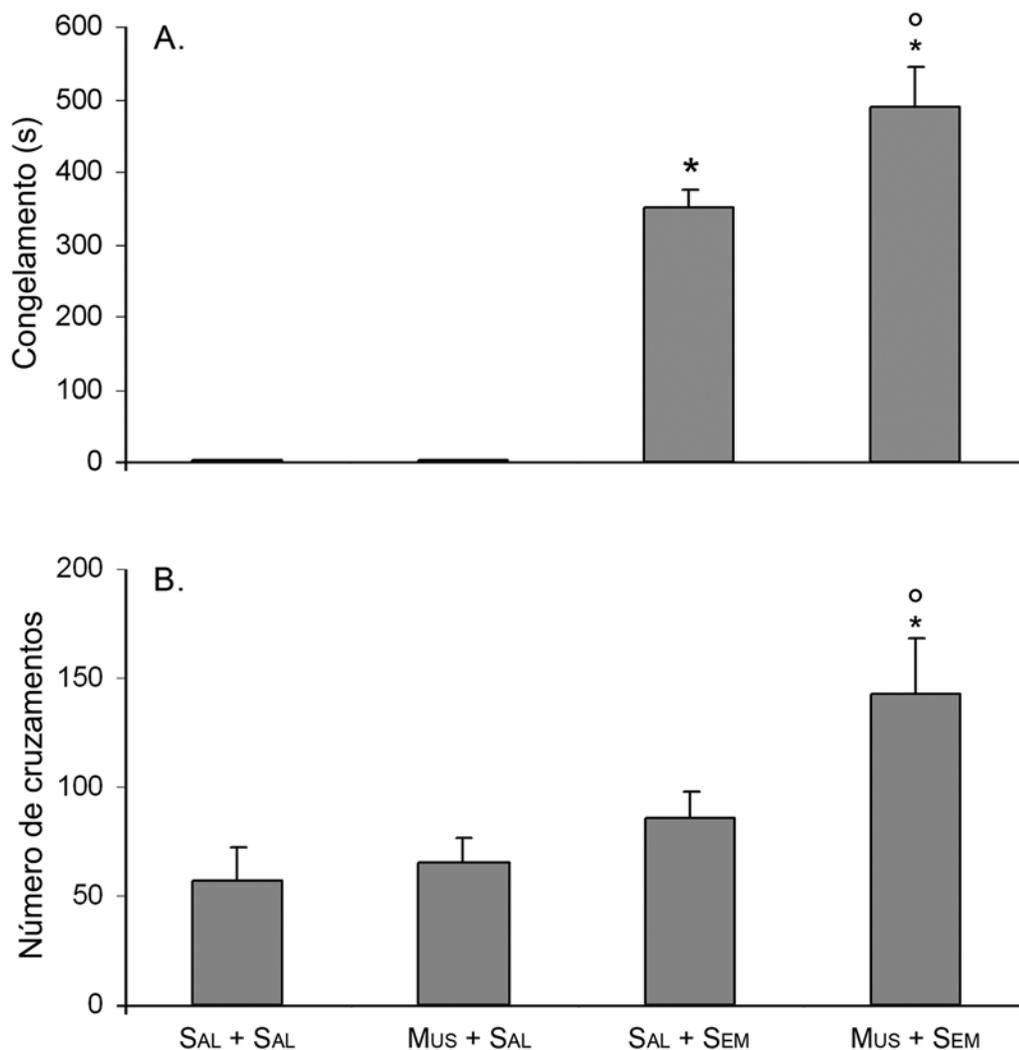


Figura 4.6. Média + E.P.M. no tempo de congelamento (A) e no número de cruzamentos (B) no teste do campo aberto. Os animais receberam microinjeções de muscimol (Mus; 0,5 μg / 0,2 μl) ou salina (Sal; 0,2 μl) no complexo basolateral da amígdala e de semicarbazida (Sem; 6 μg / 0,2 μl) ou salina (Sal; 0,2 μl) no colículo inferior. Todos os animais receberam duas microinjeções antes do teste do campo aberto (30 min): salina + salina (Sal+Sal, n=6); muscimol + salina (Mus+Sal, n=6); salina + semicarbazida (Sal+Sem, n=8); muscimol + semicarbazida (Mus+Sem, n=8). A análise estatística aplicada foi a ANOVA de um fator, seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal+Sal; e ^o $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal+Sem.

O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que houve um aumento no tempo de congelamento no grupo com microinjeções de Sal+Sem e um aumento desse comportamento nos

animais com microinjeções de Mus+Sem ($p < 0,05$). Esses resultados são apresentados na figura 4.6A. A figura 4.6B mostra os efeitos das combinações de microinjeções no CBL e no CI na atividade locomotora de animais no teste do campo aberto. A ANOVA mostrou diferenças estatisticamente significativas no número de cruzamentos entre as combinações de microinjeções no CBL e no CI [$F(3,24)=5,59$; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que houve um aumento no número de cruzamentos no grupo Mus+Sem ($p < 0,05$). A análise *post hoc* não mostrou diferenças estatisticamente significativas nos grupos Sal+Sal, Mus+Sal e Sal+Sem ($p > 0,05$). Dois animais do grupo Sal+Sem e quatro do grupo Mus+Sem apresentaram uma seqüência de comportamentos de fuga.

Cetanserina

Durante a sessão de linha de base (dia 1), não houve diferenças estatisticamente significativas quando comparamos o tempo de permanência em cada um dos quatro quadrantes ($119,30 \pm 14,32$; $123,10 \pm 11,23$; $149,55 \pm 24,44$; $131,12 \pm 15,79$ segundos), revelando que não houve uma preferência ou uma aversão por qualquer quadrante [$F(5,44)=1,08$; $p > 0,05$].

A figura 4.7 mostra a média do tempo de permanência no quadrante de tratamento durante as sessões de linha de base e de teste nas diferentes combinações de microinjeções no CBL e no CI (Sal+Sal, Sal+Sem, K0,5+Sal, K1+Sal, K0,5+Sem e K1+Sem). A ANOVA mostrou diferenças estatisticamente significativas nas microinjeções [$F(5,44)=7,67$; $p < 0,05$], nas sessões [$F(1,44)=9,58$; $p < 0,05$] e na interação entre tratamento x sessões [$F(5,44)=8,27$; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou uma redução no tempo de permanência no quadrante de tratamento no dia do teste para o grupo Sal+Sem e K0,5+SEM em comparação com os demais grupos ($p < 0,05$). Os animais do grupo Sal+Sem e K0,5+SEM mostraram uma aversão ao quadrante de tratamento, isto é, uma redução no tempo de permanência no quadrante de

tratamento na sessão teste ($p < 0,05$). A análise *post hoc* mostrou também que não houve diferenças estatisticamente significativas nos grupos Sal+Sal, K0,5+Sal, K1+Sal; K1+Sem ($p > 0,05$).

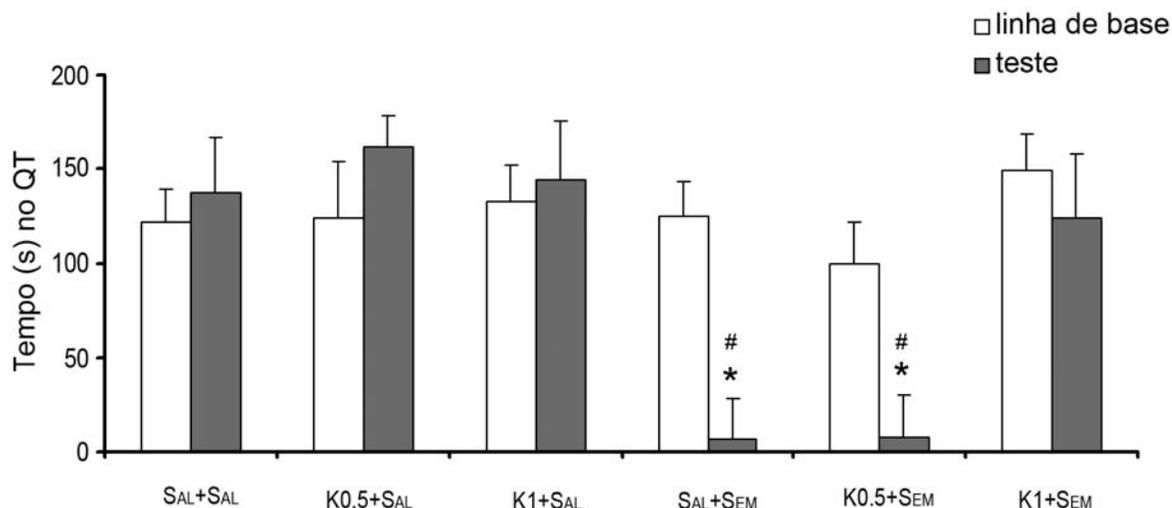


Figura 4.7. Média + E.P.M. no tempo de permanência no quadrante de tratamento no teste de aversão condicionada ao lugar durante sessão de linha de base e de teste. Durante a sessão de condicionamento foram microinjetados cetanserina (K0,5: 0,5 nmol; e K1: 1 nmol) ou salina (Sal; 0,2 μ l) no complexo basolateral da amígdala e semicarbazida (Sem: 6 μ g / 0,2 μ l) ou salina (Sal: 0,2 μ l) no colículo inferior. Todos os animais receberam duas microinjeções antes do confinamento no quadrante de tratamento (QT) na sessão de condicionamento (30 min): salina + salina (Sal+Sal, n=10); cetanserina 0,5 nmol + salina (K0,5+Sal, n=8); cetanserina 1 nmol + salina (K1+Sal, n=8); salina + semicarbazida (Sal+Sem; n=8) cetanserina 0,5 nmol + semicarbazida (K0,5+Sem, n=8); cetanserina 1 nmol + semicarbazida (K1+Sem, n=8). Na sessão de linha de base e de teste os animais tiveram livre acesso a todos os quadrantes da arena durante 10 min. A análise estatística aplicada foi a ANOVA de dois fatores com medidas repetidas, seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ em relação à sessão de linha de base dentro do mesmo grupo; e ⁰ $p < 0,05$ em relação à sessão de teste dos demais grupos.

A ANOVA mostrou que não houve diferenças estatisticamente significativas no número de entradas nos quatro quadrantes para as diferentes combinações de microinjeções no CBL [$F(5,44)=0,04$; $p > 0,05$]. Entretanto, os animais mostraram uma redução na atividade motora durante a sessão de teste quando comparada à sessão de linha de base [$F(1,44)=7,18$; $p < 0,05$]. Não houve diferenças estatisticamente significativas na interação entre microinjeções x sessões [$F(5,44)=0,05$; $p > 0,05$]. Embora todos os grupos tenham apresentado uma diminuição

no comportamento exploratório durante a sessão de teste em relação à sessão de linha de base, somente os animais do grupo Sal+Sem e K0,5+SEM mostraram uma redução no tempo de permanência no quadrante de tratamento durante a sessão de teste.

A figura 4.8 mostra os efeitos das mesmas quatro combinações de microinjeções no CBL e no CI nos comportamentos de congelamento e de cruzamentos medidos no teste do campo aberto. A ANOVA mostrou diferenças estatisticamente significativas no tempo de congelamento entre as combinações de microinjeção no CBL e no CI [$F(7,42)=8,04$; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que houve um aumento no tempo de congelamento no grupo com microinjeções de Sal+Sem e K0,5+SEM ($p < 0,05$) e um aumento desse comportamento nos animais com microinjeções de K1+SEM ($p < 0,05$). A análise *post hoc* mostrou também que não houve diferenças estatisticamente significativas nos grupos Sal+Sal, K0,5+Sal e K1+Sal ($p > 0,05$). Esses resultados são apresentados na figura 4.8A. A figura 4.8.B mostra os efeitos das combinações de microinjeções no CBL e no CI na atividade locomotora de animais no teste do campo aberto. A ANOVA mostrou diferenças estatisticamente significativas no número de cruzamentos entre as combinações de microinjeções no CBL e no CI [$F(5,42)=3,14$; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que houve um aumento no número de cruzamentos no grupo com microinjeções de Sal+Sem e K0,5+SEM ($p < 0,05$) e um aumento desse comportamento nos animais com microinjeções de K1+SEM ($p < 0,05$). A análise *post hoc* mostrou também que não houve diferenças estatisticamente significativas nos grupos Sal+Sal, K0,5+Sal e K1+Sal ($p > 0,05$). Quatro animais do grupo Sal+Sem e dez do grupo K0,5+Sem e K1+Sem apresentaram uma seqüência de comportamentos de fuga. Oito animais dos grupos K0,5+Sem e K1+Sem morreram durante ou após os testes experimentais e após apresentarem o comportamento de fuga.

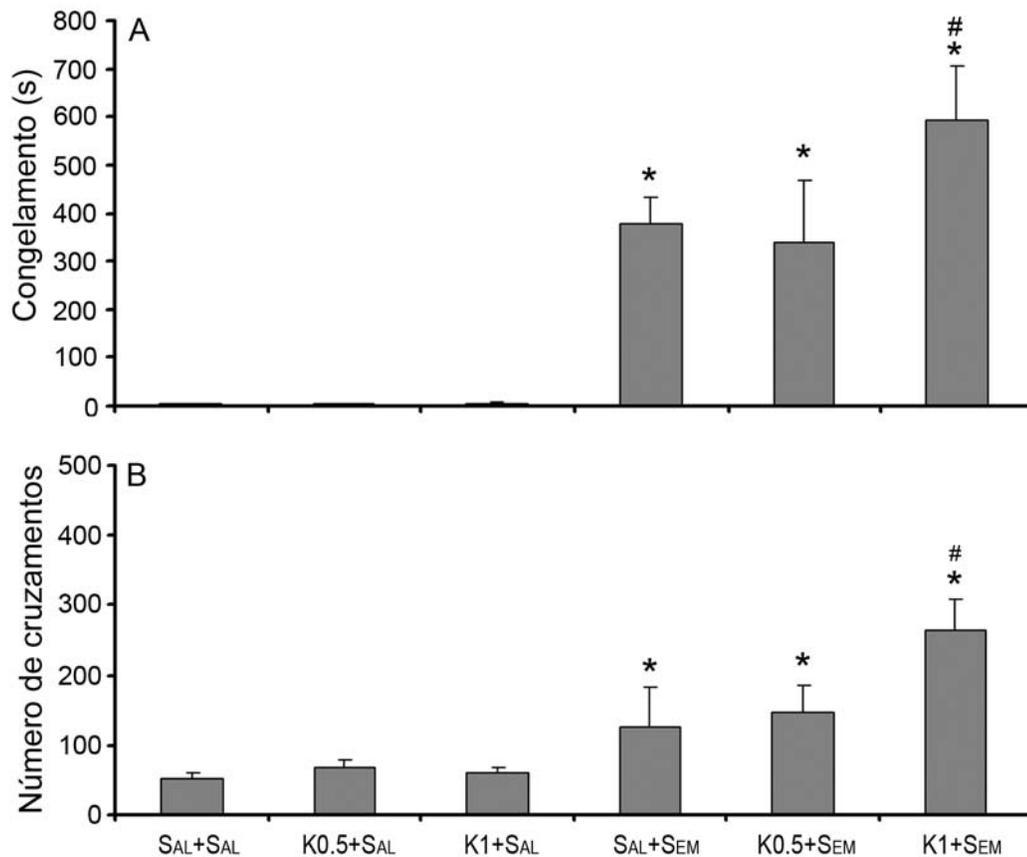


Figura 4.8 Média + E.P.M. no tempo de congelamento (A) e no número de cruzamentos (B) no teste do campo aberto. Os animais receberam microinjeções de cetanserina (K0,5: 0,5 nmol; e K1: 1 nmol) ou salina (Sal; 0,2 μ l) no complexo basolateral da amígdala e de semicarbazida (Sem; 6 μ g / 0,2 μ l) ou salina (Sal; 0,2 μ l) no colículo inferior. Todos os animais receberam duas microinjeções antes do teste do campo aberto (30 min): salina + salina (Sal+Sal, n=9); cetanserina 0,5 + salina (K0,5+Sal, n=6); cetanserina 1 + salina (K1+Sal, n=7); salina + semicarbazida (Sal+Sem; n=9) cetanserina 0,5 + semicarbazida (K0,5+Sem, n=9); cetanserina 1 + semicarbazida (K1+Sem, n=8). A análise estatística aplicada foi a ANOVA de um fator, seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal+Sal; e ⁰ $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal+Sem.

SCH-23390

Durante a sessão de linha de base (dia 1), não houve diferenças estatisticamente significativas quando comparamos o tempo de permanência em cada um dos quatro quadrantes ($106,83 \pm 27,33$; $112,55 \pm 12,11$; $99,55 \pm 13,27$; $97,22 \pm 13,33$ segundos), revelando que não houve uma preferência ou uma aversão por qualquer quadrante [$F(5, 46)=0,86$; $p > 0,05$].

A figura 4.9 mostra a média do tempo de permanência no quadrante de tratamento durante as sessões de linha de base e de teste nas diferentes combinações de microinjeções no CBL e no CI (Sal+Sal, Sal+Sem, SCH1+Sal, SCH2+Sal, SCH1+Sem e SCH2+Sem). A ANOVA mostrou diferenças estatisticamente significativas no tratamento [$F(5,46)=3,25$; $p < 0,05$], nas sessões [$F(5,46)=18,15$; $p < 0,05$] e na interação entre tratamento x sessões [$F(5,46)=16,75$; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou uma redução no tempo de permanência no quadrante de tratamento no dia do teste para o grupo Sal+Sem e SCH1+Sem em comparação com os demais grupos ($p < 0,05$). Os animais do grupo Sal+Sem e SCH1+Sem mostraram uma aversão ao quadrante de tratamento, isto é, uma redução no tempo de permanência no quadrante de tratamento na sessão teste ($p < 0,05$). A análise *post hoc* mostrou

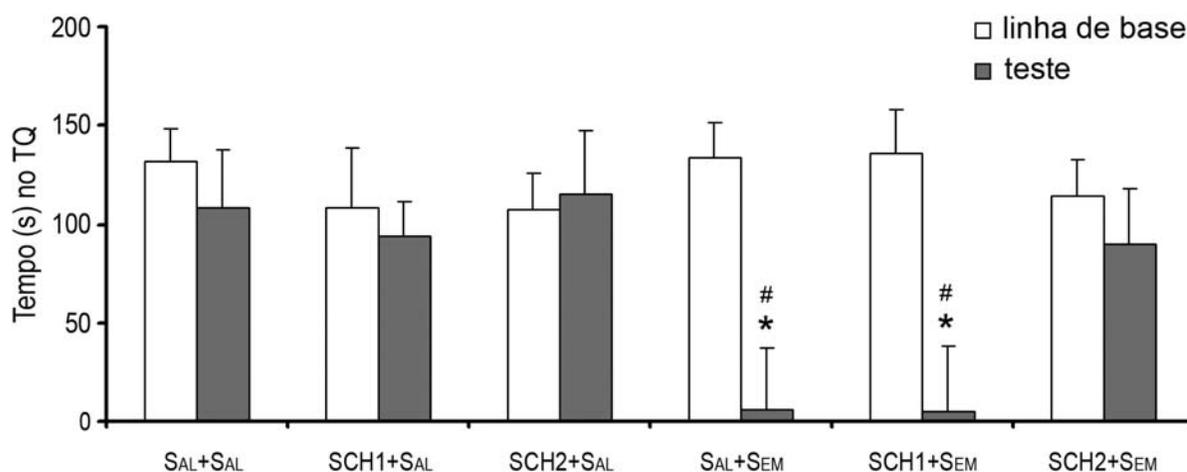


Figura 4.9. Média + E.P.M. no tempo de permanência no quadrante de tratamento no teste de aversão condicionada ao lugar durante sessão de linha de base e de teste. Durante a sessão de condicionamento foram microinjetados SCH-23390 (SCH1: 1 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$; e SCH2: 2 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$) ou salina (Sal; 0,2 μl) no complexo basolateral da amígdala e semicarbazida (Sem: 6 $\mu\text{g} / 0,2 \mu\text{l}$) ou salina (Sal: 0,2 μl) no colículo inferior. Todos os animais receberam duas microinjeções antes do confinamento no quadrante de tratamento (QT) na sessão de condicionamento (30 min): salina + salina (Sal+Sal, n=9); SCH-23390 1 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ + salina (SCH1+Sal, n=8); SCH-23390 2 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ + salina (K1+Sal, n=8); salina + semicarbazida (Sal+Sem; n=11) SCH-23390 1 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ + semicarbazida (SCH1+Sem, n=8); SCH-23390 2 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ + semicarbazida (K1+Sem, n=8). Na sessão de linha de base e de teste os animais tiveram livre acesso a todos os quadrantes da arena durante 10 min. A análise estatística aplicada foi a ANOVA de dois fatores com medidas repetidas, seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ em relação à sessão de linha de base dentro do mesmo grupo; e $^{\circ}$ $p < 0,05$ em relação à sessão de teste dos demais grupos.

também que não houve diferenças estatisticamente significativas nos grupos Sal+Sal, SCH1+Sal e SCH2+Sal ($p > 0,05$).

A ANOVA mostrou que não houve diferenças estatisticamente significativas no número de entradas nos quatro quadrantes para as diferentes combinações de microinjeções no CBL [$F(5,46)=0,09$; $p > 0,05$]. Entretanto, os animais mostraram uma redução na atividade motora durante a sessão de teste quando comparada à sessão de linha de base [$F(1,46)=7,37$; $p < 0,05$]. Não houve diferenças estatisticamente significativas na interação entre tratamento x sessões [$F(5,46)=0,06$; $p > 0,05$]. Embora todos os grupos tenham apresentado uma diminuição no comportamento exploratório durante a sessão de teste em relação à sessão de linha de base, somente os animais do grupo Sal+Sem e SCH1+Sem mostraram uma redução no tempo de permanência no quadrante de tratamento durante a sessão de teste.

A figura 4.10 mostra os efeitos das mesmas quatro combinações de microinjeções no CBL e no CI nos comportamentos de congelamento e de cruzamentos medidos no teste do campo aberto. A ANOVA mostrou diferenças estatisticamente significativas no tempo de congelamento entre as combinações de microinjeção no CBL e no CI [$F(5,43)=6,00$; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que houve um aumento no tempo de congelamento no grupo com microinjeções de Sal+Sem, SCH1+Sem e SCH2+Sem quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). A análise *post hoc* mostrou também que não houve diferenças estatisticamente significativas nos grupos Sal+Sal, SCH1+Sal e SCH2+Sal ($p > 0,05$). Esses resultados são apresentados na figura 4.10A. A figura 4.10B mostra os efeitos das combinações de microinjeções no CBL e no CI na atividade locomotora de animais no teste do campo aberto. A ANOVA mostrou diferenças estatisticamente significativas no número de cruzamentos entre as combinações de microinjeções no CBL e no CI [$F(5,43)=3,07$; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que houve um aumento no número de cruzamentos no grupo com

microinjeções de Sal+Sem ($p < 0,05$) e um aumento desse comportamento nos animais com microinjeções de SCH1+Sem e SCH2+Sem ($p < 0,05$). A análise *post hoc* mostrou também que não houve diferenças estatisticamente significativas nos grupos Sal+Sal, SCH1+Sal e SCH2+Sal ($p > 0,05$). Três animais do grupo Sal+Sem e nove do grupo SCH1+Sal e SCH2+Sal apresentaram uma seqüência de comportamentos de fuga.

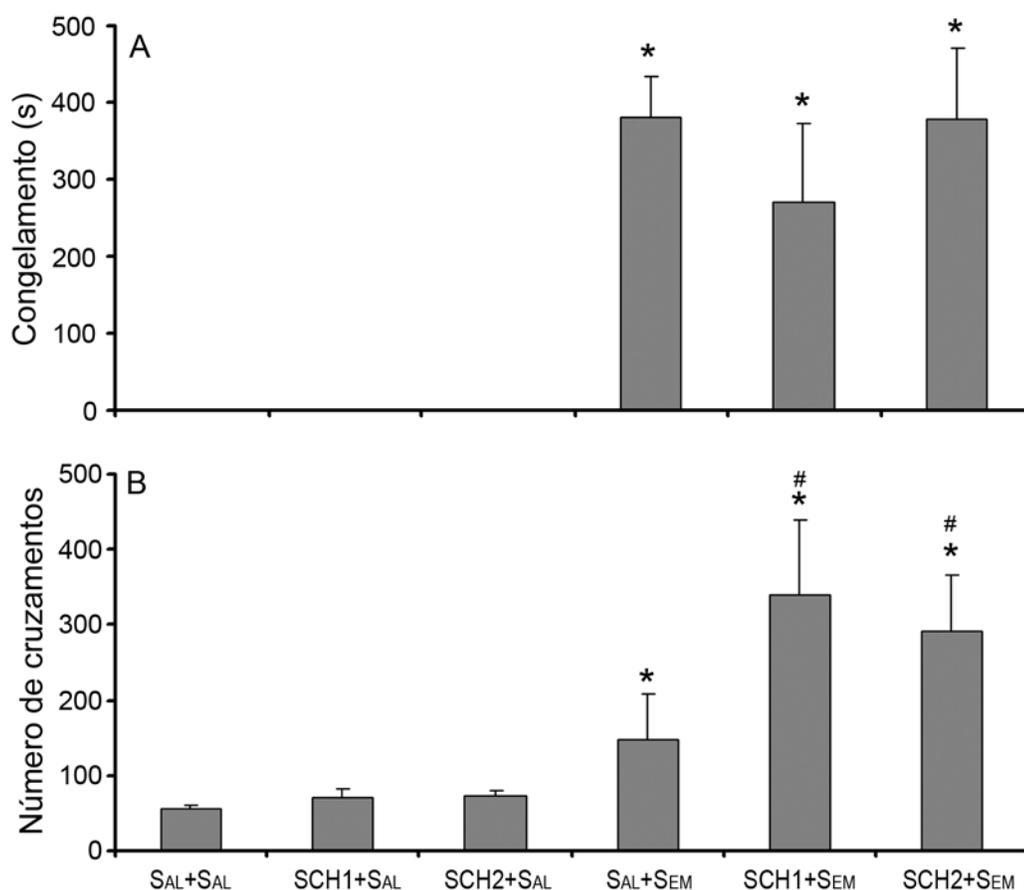


Figura 4.10. Média + E.P.M. no tempo de congelamento (A) e no número de cruzamentos (B) no teste do campo aberto. Os animais receberam microinjeções de SCH-23390 (SCH1: 1 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$; e SCH2: 2 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$) ou salina (Sal; 0,2 μl) no complexo basolateral da amígdala e de semicarbazida (Sem; 6 $\mu\text{g} / 0,2 \mu\text{l}$) ou salina (Sal; 0,2 μl) no colículo inferior. Todos os animais receberam duas microinjeções antes do teste do campo aberto (30 min): salina + salina (Sal+Sal, n=9); SCH-23390 1 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ + salina (SCH1+Sal, n=7); SCH-23390 2 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ + salina (SCH2+Sal, n=7); salina + semicarbazida (Sal+Sem, n=9); SCH-23390 1 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ + semicarbazida (SCH1+Sem, n=9); SCH-23390 2 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ + semicarbazida (SCH2+Sem, n=8). A análise estatística aplicada foi a ANOVA de um fator, seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal+Sal; e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal+Sem.

Discussão

Estudos comportamentais mostram que a estimulação química do CI produz comportamentos de congelamento e fuga (Cardoso et al., 1994; Castilho & Brandão, 2001; Nobre et al., 2004). Processos mediados por GABA podem ser importantes para o funcionamento do CI como revelam vários estudos mostrando altas concentrações de GABA e da enzima descarboxilase do ácido glutâmico – DAG – nessa estrutura (Okada, 1974; Thompson et al., 1985; Roberts & Ribak, 1987). Muitos estudos mostram que o GABA tem uma função regulatória nos estados aversivos gerados e elaborados no CI (Brandão et al., 1988; 1993; 1994; 1999). Neste contexto, a semicarbazida, um inibidor da enzima DAG, tem sido usada em estruturas relacionadas a comportamentos de defesa, pois produz uma redução lenta e gradual nos níveis de GABA, que resulta no aparecimento progressivo de comportamentos defensivos (Aguiar & Brandão, 1994; Brandão et al., 1986; Nobre et al., 2003). De fato, injeções de bloqueadores da DAG na SCPd e no hipotálamo medial de ratos produzem reações de defesa caracterizadas por comportamento de alerta, congelamento e fuga (Brandão et al., 1986). Em concentrações apropriadas, as injeções de semicarbazida no CI produzem, principalmente, um comportamento de congelamento, com aumento simultâneo da magnitude de potenciais auditivos evocados, indicando que, no CI, mecanismos GABAérgicos estão envolvidos na interface sensorio-motora (Aguiar & Brandão, 1994; Brandão et al., 2003; Nobre et al., 2003). Da mesma forma, o presente estudo mostra o envolvimento de um controle GABAérgico sobre os substratos neurais da aversão no CI. As injeções de semicarbazida no CI, que possuem um efeito similar ao produzido pela estimulação elétrica, podem servir como estímulo incondicionado no paradigma da aversão condicionada ao lugar. Confirmando esta predição, neste estudo as injeções de semicarbazida no CI produzem uma aversão condicionada no modelo do teste de aversão

condicionada ao lugar. Este estudo também confirma resultados anteriores mostrando que a inibição de mecanismos GABAérgicos no CI produz um estado aversivo através da ativação de substratos neurais do medo no CI que, com efeito, pode influenciar na aprendizagem associativa (Aguiar & Brandão, 1994; Brandão et al., 1997; Troncoso et al., 1998, 2003).

Neste contexto, a amígdala, uma das principais estruturas na regulação do comportamento emocional, ocupa uma posição central na regulação de respostas condicionadas e incondicionadas, atuando como um filtro para informações sensoriais que parecem ser cruciais para a aquisição do medo condicionado (Davis et al., 1994a; Davis, 1992b; LeDoux, 1994; Killcross et al., 1997). Vários estudos mostram uma função regulatória do CBL na aquisição do medo condicionado (Davis, et al., 1992b; LeDoux, et al., 1990a-b; Vazdarjanova, et al., 2001). Alterações no funcionamento da amígdala têm sido relacionadas ao transtorno de ansiedade generalizada (Davis et al., 1994a; De Oca et al., 1998; Graeff, 2002). Nesse contexto, os efeitos ansiolíticos das benzodiazepinas são relacionados à potencialização de mecanismos GABAérgicos no CBL (Davis et al., 1994a; LeDoux, 2000). Nesse estudo analisamos como a amígdala participa nas respostas condicionadas e incondicionadas organizadas no CI. Ele se baseou inicialmente nos resultados que evidenciam o papel do CBL na aquisição do medo condicionado (Davis et al., 1994a; Davis, 1992b; LeDoux, 1994; Killcross et al., 1997). Este estudo confirmou esse pressuposto, mostrando que a inativação do CBL, através de injeções de muscimol, produziu uma clara redução na aversão condicionada ao lugar, utilizando a semicarbazida injetada no CI como estímulo incondicionado.

O mesmo raciocínio não se aplica ao medo incondicionado produzido pela estimulação do CI. Para estudar o papel funcional do CBL no medo gerado pela ativação de substratos neurais da aversão no CI, foi realizada injeção de muscimol para inativar o CBL. Essa inativação do CBL aumentou a aversividade da estimulação do CI com semicarbazida. Assim, a

inativação do CBL aumentou tanto o congelamento como o número de cruzamentos no teste do campo aberto. Em estudo anterior, a lesão eletrolítica do CBL aumentou a aversividade gerada pela estimulação química do CI (Maisonnette et al., 1996). Porém, quando as estimulações são realizadas em outra estrutura do sistema encefálico defensivo, os resultados são diferentes. Desta forma, a lesão eletrolítica ou a inativação do CBL não alteram os limiares aversivos gerados pela estimulação elétrica da substância periaqueductal dorsal (Oliveira et al., 2004; Martinez et al., 2006). Com efeito, esses resultados sugerem que a inativação de mecanismos modulatórios no CBL pode facilitar ou amplificar a ocorrência de comportamentos defensivos produzidos pela estimulação do CI, porém não influenciam a aversividade gerada na substância cinzenta periaqueductal dorsal. Assim, esses estudos apontam para uma diferenciação no papel funcional do CBL na regulação do medo incondicionado gerado no CI e na SCPd.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos mostram que a inativação do CBL aumentou os efeitos aversivos incondicionados produzidos pela estimulação do CI e inibiu a aversão condicionada ao lugar com o uso da estimulação do CI como estímulo incondicionado. Esses resultados corroboram outros estudos mostrando que a inativação do CBL prejudica a aquisição do medo condicionado e favorece a expressão do medo incondicionado (Charney & Deutch, 1996; Davis et al., 1994a; Davis & Whalen, 2001). Apesar da inativação do CBL aumentar a aversividade da estimulação do CI, ou seja, do estímulo incondicionado, ocorre um enfraquecimento do processo associativo dado que houve uma redução na aquisição do medo condicionado. Isto sugere que o CBL é recrutado já nos processos iniciais da aquisição do medo condicionado. Isto reforça a idéia de que o CBL atua como filtro essencial nos processos de aprendizagem associativa.

A participação do CBL no medo condicionado já está bem consolidada (Amorapanth et al. 2000; Davis, 1992b; LeDoux et al., 1990a; Maren et al., 2001; Muller et al.,

1997; Sacchetti et al., 1999; Wilensky et al., 1999). Porém, pouco se sabe sobre como o CBL pode influenciar as respostas na expressão do medo incondicionado. Uma possibilidade neuroanatômica para os efeitos da inativação do CBL sobre o medo incondicionado é a participação de fibras glutamatérgicas que partem do núcleo talâmico posterior e alcançam a região medial do NCe, a principal região da amígdala com neurônios de projeção que alcançam estruturas encefálicas relacionadas ao medo (LeDoux et al., 1987; Linke et al., 2000; Turner & Herkenham, 1991). Até recentemente, acreditava-se que as informações auditivas que partiam do CI não alcançariam o núcleo talâmico posterior. Porém, Linke e colaboradores (2000) mostram que o núcleo talâmico posterior recebe aferências do CI. Assim, essa região do tálamo auditivo, que recebe projeções do CI, envia fibras glutamatérgicas para o CBL e, o mais importante, também envia projeções distintas para a região medial do NCe. O CBL pode influenciar os neurônios de projeção da região medial do NCe através de conexões intra-amigdalares. O principal efeito produzido pelos neurônios de projeção do núcleo lateral e do núcleo basal é uma ação inibitória sobre os neurônios da região medial do NCe (Pitkänen et al., 1997; Rosenkranz et al., 2005; Paré et al., 2004). Diante dessas informações podemos conjecturar que a estimulação do CI poderia alcançar os neurônios de projeção do núcleo talâmico posterior e influenciar diretamente os neurônios da região medial do NCe que, sem a ação inibitória do CBL sobre seus neurônios, poderiam funcionar inadequadamente, ou seja, as fibras glutamatérgicas que partem do núcleo talâmico posterior, estimuladas pelos neurônios de projeção do CI, alcançariam a região medial do NCe com maior eficiência e ativaria seus neurônios de projeção que mantém conexões com várias estruturas do sistema encefálico aversivo.

De interesse para a interpretação dos resultados aqui obtidos estão os relatos de que os neurônios da região medial do NCe parecem diminuir sua atividade em resposta a um estímulo condicionado e aumentar sua atividade em resposta a um estímulo incondicionado

(Rosenkranz et al., 2005; Pascoe & Kapp, 1985). Uma explicação possível para essa contradição seria que as estimulações do CBL ou do NCe poderiam produzir respostas emocionais distintas a um estímulo condicionado e a um estímulo incondicionado (Davis, 2000; Iwata & LeDoux, 1988; Marchand, 2002; Powell et al., 2002). Assim, é possível que o CBL possa afetar um subconjunto de neurônios na região medial do NCe, enquanto as projeções do núcleo talâmico posterior poderiam afetar outros subconjuntos e a estimulação do NCe, que produz fortes reações emocionais, afetaria todos os seus neurônios de projeção. Uma implicação interessante é que este sistema funcionaria pela desinibição no tronco encefálico e no hipotálamo na produção de respostas emocionais, pois a maioria dos neurônios de projeção da região medial do NCe contém GABA como seu principal mediador químico (Cassell et al., 1999; Saha et al., 2000, 2002) e, além disso, agonistas GABAérgicos administrados nessas áreas de projeção da região medial do NCe reduzem aquelas respostas emocionais, enquanto a administração de antagonistas GABAérgicos nessas áreas provocam fortes reações emocionais (Graeff, 2004; Bailey & DiMicco 2001; Chen et al., 2003; Keim & Shekhar 1996; Kenney et al., 2003; Martin & Haywood, 1993; Martin et al., 1997; Shekhar, 1993; Shekhar e DiMicco 1987; Shekhar et al 1987; Soltis & DiMicco 1991; Wible et al., 1988). Assim, as respostas opostas nesses mesmos neurônios indicam que a região medial do NCe pode possuir a capacidade de processar eventos condicionados e incondicionados de maneira única. Com efeito, pelo menos em parte, esse padrão distinto de respostas emocionais a estímulos condicionados e incondicionados indica que o CBL pode influenciar a região medial do NCe em resposta a estímulos condicionados e modular, pelo menos algumas, respostas a estímulos incondicionados através de vias alternativas. Outros neurônios de projeção não GABAérgicos da região medial do NCe podem participar das respostas a estímulos incondicionados.

Os resultados deste estudo mostram a possibilidade da participação de

mecanismos serotoninérgicos e dopaminérgicos no CBL nas respostas de medo geradas pela estimulação do CI. Esses neurotransmissores parecem agir nos interneurônios GABAérgicos e nas aferências sensoriais e corticofrontais do CBL. Assim, para examinar o papel de mecanismos dopaminérgicos e serotoninérgicos no CBL durante o medo condicionado eliciado pela estimulação do CI e do medo incondicionado produzido por essa mesma estimulação, foram administrados nessa região da amígdala antagonistas serotoninérgicos do tipo 5-HT2 e antagonistas dopaminérgicos do tipo D1. Ambos os antagonistas, serotoninérgico e dopaminérgico, administrados no CBL aumentaram os efeitos aversivos incondicionados produzidos pela estimulação do CI e inibiram a aversão condicionada ao lugar com o uso da estimulação do CI como estímulo incondicionado. Assim, o bloqueio dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT2 e dos receptores dopaminérgicos do tipo D1 no CBL prejudicaram a aquisição do medo condicionado e favorecem a expressão do medo incondicionado.

A administração da cetanserina, um antagonista de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT2, no CBL produziu uma clara redução na aversão condicionada ao lugar eliciada pelos efeitos aversivos provocados pela administração de semicarbazida no CI. No medo incondicionado a cetanserina administrada no CBL produziu um aumento na aversividade gerada pela ativação de substratos neurais aversivos no CI. Assim, a inibição de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT2 no CBL aumentou tanto o tempo de congelamento como o número de cruzamentos no teste do campo aberto.

Corroborando com os presentes resultados, em estudos anteriores mostramos que a lesão neurotóxica serotoninérgica no CBL aumentou a aversividade gerada pela estimulação elétrica do CI (Macedo et al., 2002). Do mesmo modo, a administração do antagonista de receptores serotoninérgicos nefazodona no CBL provocou um aumento na aversividade gerada

pela estimulação química do CI (Maisonnette et al., 2000).

Muitos estudos têm associado alterações no funcionamento do sistema serotoninérgico com ansiedade e depressão (Graeff et al., 1996; Graeff, 2002; Gargiulo et al., 1996; Liang, 1998; Graeff, 1994, 2002). Deakin & Graeff, baseados em uma série de estudos, lançaram a hipótese de que a serotonina na amígdala aumentaria os comportamentos relacionados ao medo ou ansiedade, enquanto sua presença na substância cinzenta periaqueductal inibiria esses comportamentos. Muitos estudos mostram os efeitos anti-aversivos da serotonina na substância cinzenta periaqueductal dorsal (Graeff et al., 1990, 1996; Graeff, 2002, 2004), mas são poucos os estudos que sustentam um papel da serotonina no medo incondicionado na amígdala. A infusão local de serotonina ou do agonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT na amígdala produz um efeito ansiogênico no teste de conflito, enquanto a infusão do antagonista de receptores serotoninérgicos cetanserina produz um efeito ansiolítico (Hodges et al., 1987). Por outro lado, a infusão na amígdala de 8-OH-DPAT ou buspirona reduziu a vocalização induzida pelo choque (Schreiber & De Vry, 1993). A infusão de 8-OH-DPAT ou midazolam na amígdala prejudicou o medo condicionado, indicando um efeito ansiolítico, mas não o medo incondicionado, medidos no labirinto em T elevado (Zangrossi et al., 1999). De maneira interessante, antagonistas de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ na amígdala promovem um efeito ansiogênico no medo incondicionado medido nesse mesmo modelo (Gargiulo et al., 1996). Os estudos atuais têm se restringido a núcleos específicos na amígdala, já que muitas respostas são moduladas diferentemente pelo CBL e pelo NCe. Assim, os resultados relatados acima não são facilmente interpretáveis em razão de terem sido pouco seletivos quanto aos sítios de infusão dentro da amígdala. O efeito aqui observado de antagonistas serotoninérgicos do tipo 5-HT₂ no CBL é consistente com a predição de Deakin & Graeff, ou seja, que a inibição desses receptores pode reduzir o medo condicionado, ou de outra forma, que a serotonina no CBL

facilita o medo condicionado. Se durante o medo condicionado os níveis de 5-HT estão aumentados no CBL, a administração do antagonista de receptores 5-HT₂ poderia reduzir a aquisição ou na expressão do medo condicionado (Inoue et al., 1993; Kawahara et al., 1993).

Em nosso estudo o antagonista de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂, cetanserina, produziu um aumento nas respostas de medo incondicionado, ou seja, a serotonina no CBL diminui as respostas de medo incondicionado. Porém, esse mecanismo deve ser mediado pela região medial do N_{Ce}, que mantém conexões, por exemplo, com a substância cinzenta periaqueductal dorsal, o que seria consistente com a teoria de Deakin & Graeff. Há portanto, os relatos de que agonistas serotoninérgicos do tipo 5-HT₂ no BLA aumentaram o medo incondicionado (Campbell & Merchant, 2003). Porém, em nosso estudo o efeito observado foi o contrário. Estes resultados conflitantes podem ser explicados por diferenças no modelo animal e nas concentrações dos agonistas utilizados. Além disso, os receptores 5-HT₂ estão localizados em neurônios de projeção e em interneurônios GABAérgicos no CBL (Stein et al., 2000). De fato, a estimulação desses receptores no CBL parece ter um efeito ansiolítico, pois aumenta a liberação de GABA e os agonistas GABAérgicos na amígdala têm efeito ansiolítico (Rainnie, 1999; Stutzmann & LeDoux, 1999; Hodges et al., 1987). A infusão de agonistas de receptores 5-HT₂ estimula tanto neurônios de projeção como interneurônios GABAérgicos (Stein et al., 2000; Rainnie, 1999; Stutzmann & LeDoux, 1999). Esse balanço entre efeitos excitatórios, via neurônios de projeção, e inibitórios, via interneurônios GABAérgicos, deve sofrer influência da concentração de serotonina no CBL durante as respostas defensivas mediadas pela amígdala. A estimulação do CI, ao promover uma redução dos filtros serotoninérgicos 5-HT₂, poderia modular os neurônios de projeção do CBL que, conseqüentemente, poderiam modular os neurônios da região medial do N_{Ce} facilitando, assim, as respostas de medo incondicionado. De outra forma, uma redução da atividade do sistema serotoninérgico no CBL pode resultar num

déficit da modulação GABAérgica sobre as aferências sensoriais glutamatérgicas que alcançam esse complexo nuclear da amígdala que, com efeito, pode provocar um processamento incorreto desses sinais sensoriais, por exemplo, processando sinais inócuos como eventos emocionais importantes para o organismo. Desta forma, essas alterações poderiam afetar tanto o medo condicionado como o medo incondicionado.

Os efeitos aversivos provocados pela estimulação do CI acentuados pela inibição dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂ podem ter sido determinantes na morte de oito animais deste estudo.

A administração da SCH-23390, um antagonista de receptores dopaminérgicos do tipo D₁, no CBL produziu uma clara redução na aversão condicionada ao lugar eliciada pelos efeitos aversivos provocados pela administração de semicarbazida no CI. No medo incondicionado a SCH-23390 administrada no CBL produziu um aumento na aversividade gerada pela ativação de substratos neurais de aversão no CI. Assim, a inibição de receptores dopaminérgicos do tipo D₁ no CBL aumentou substancialmente o número de cruzamentos no teste do campo aberto, porém não afetou o congelamento.

A redução do medo condicionado pela administração de SCH-23390 no CBL tem sido confirmada em outros estudos (Lamont & Kokkinidis, 1998). Esse mesmo antagonista de receptores D₁ no CBL reduziu a aquisição e a expressão do medo condicionado, enquanto a infusão do agonista D₁ SKF-82958 facilitou tanto sua aquisição como sua expressão (Guarraci et al., 1999a,b). A plasticidade e excitabilidade neural dos processos de condicionamento podem ser bloqueadas pela infusão de antagonistas dopaminérgicos no CBL (Rosenkranz & Grace, 2002a,b). Assim, uma consequência de inibições do sistema dopaminérgico do CBL é a interrupção dos processos associativos no condicionamento, que poderia resultar em mecanismos associativos inadequados. Todos esses resultados parecem indicar que a DA tem um papel

facilitador sobre o medo condicionado. Apoiando esta idéia, sabe-se que a ativação de receptores dopaminérgicos no CBL favorece o aparecimento de comportamentos emocionais (Borokowski & Kokkinidis 1996; Harmer & Phillips, 1999). A ativação de receptores dopaminérgicos resulta num aumento pós-sináptico de neurônios de projeção e de interneurônios GABAérgicos no CBL (Brinley-Reed & McDonald, 1999; Kröner et al., 2005). Especificamente, a ativação de receptores D1 aumenta a frequência de disparos em interneurônios GABAérgicos resultando, assim, numa inibição dos neurônios de projeção no CBL. Esse aumento da inibição GABAérgica pode filtrar as aferências glutamatérgicas que alcançam o CBL através de uma hiperpolarização transitória e reduzir a possibilidade de disparos dos seus neurônios de projeção (Häusser & Clark, 1997). Assim, a redução desses mecanismos dopaminérgicos no CBL resultaria num déficit da modulação GABAérgica sobre as aferências sensoriais e corticais glutamatérgicas que alcançam o CBL que, conseqüentemente, pode provocar um processamento incorreto desses sinais sensoriais e corticais, por exemplo, processando sinais inócuos como eventos emocionais importantes para o organismo ou interferindo sobre a inibição provocada pelas aferências corticofrontais, que estão relacionadas aos processos de extinção (Ledoux, 2000; Sotres-Bayon et al., 2004; Cookson & Clarimon, 2005). É provável, portanto, que mecanismos mediados por receptores 5-HT2 e dopaminérgicos do tipo D1 atuem de maneira cooperativa na modulação do medo na amígdala.

Experimento III

Experimento III: efeitos da inativação do complexo basolateral da amígdala sobre o aumento nos níveis extracelulares de DA no córtex frontal produzido pela estimulação elétrica do CI

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar com peso inicial entre 250 g e 300 g provenientes do biotério do *departamento de farmacologia da Facultad de Ciencias Químicas da Universidad Nacional de Córdoba*, Córdoba, Argentina. Os animais, mantidos nesse biotério com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e com ciclo de iluminação claro-escuro (período de luz: 7:00 às 19:00 hs), foram alojados (quatro animais por caixa) em caixas de polipropileno (50 x 30 x 20 cm), forradas com serragem, recebendo comida e água *ad libitum*. Os animais, após o procedimento cirúrgico, foram mantidos nessas mesmas caixas. Porém, após o procedimento para implantação de sondas de microdiálise transversal no córtex frontal, os animais foram mantidos isolados por 24 horas dentro de uma cuba para microdiálise.

Cirurgia

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol, por via i.p. (250 mg/kg), e foram fixados a um aparelho estereotáxico (Stoelting, EUA), pelo rochedo temporal e incisivos superiores (barra dos incisivos: -3,3 mm). Após tricotomia na região da cabeça, foi feita limpeza com álcool iodado. A seguir, foi realizada uma incisão de aproximadamente 2,0 cm, removendo-se pele, tecido subcutâneo e periósteo. Com a superfície craniana exposta e ajustada na posição horizontal foram implantados três parafusos nos ossos cranianos para a posterior ancoragem de

uma prótese de ionômero de vidro (VOCO, Alemanha) sobre o local da incisão. Em seguida, foram introduzidos, após perfuração óssea e de acordo com cada protocolo experimental, um eletrodo bipolar no CI, uma cânula-guia no CBL e uma sonda de microdiálise transversal no CFr. As coordenadas utilizadas, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1997), tendo o bregma como referência, foram: colículo inferior, anterior-posterior (AP) = - 8,8 mm; médio-lateral (ML) = 1,6 mm; e dorso-ventral (DV) = 4,5 mm; complexo basolateral da amígdala, AP = - 2,8 mm; ML = 5,1 mm; DV = 7,8 mm; e córtex frontal, AP = 3,2 mm; DV = 2,6 mm.

Microdiálise

Quatro dias após a implantação de eletrodos bipolares no CI e de cânulas-guia no CBL foi realizada a implantação de sondas de microdiálise transversal. Confeccionadas a partir de membranas de diálise (Hospal S.P.A., Itália; 200 mm d.i. e 340 mm d.e.), essas sondas de microdiálise transversais possuíam membranas com uma área de 6 mm que possibilita a troca de moléculas entre o tecido nervoso do córtex frontal – em ambos os hemisférios – e o meio interno da membrana (ocupado por líquido cefalorraquidiano artificial - LCRA). O restante da fibra de diálise foi recoberta com resina de epóxi. Tubos de polietileno (PE-10; Becton-Dickinson, EUA) foram conectados em cada extremidade da membrana de diálise, implantada no CFr, constituindo uma via de entrada e outra de saída. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram colocados em uma cuba para microdiálise (Bioanalytical Systems, EUA), que possibilitava sua livre movimentação. Neste momento, os tubos de polietileno eram conectados a um sistema de braços e comutadores, que permitia a conexão desses tubos com uma seringa de microinfusão (entrada do LCRA) e um coletor de fração (saída do dialisado) refrigerado com a temperatura ajustada a 4°C (CMA/100, CMA, EUA). Na sessão experimental, a perfusão com LCRA (NaCl 147,0 mM, KCl 4,0 mM, CaCl₂ 1,5 mM e MgCl₂ 0,8 mM) foi realizada através de uma bomba de infusão,

num fluxo contínuo de 1,2 $\mu\text{L}/\text{min}$. As amostras do dialisado foram coletadas a cada 30 min, em tubos contendo 1 μL de ácido acético (0,1 N).

Determinação por CLAE da DA e da 5-HT

A dopamina e a serotonina, contida no dialisado, foi analisada num sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Esse sistema era constituído por um detector eletroquímico (LC-4C; Bioanalytical Systems, EUA), acoplado a uma coluna de fase-reversa (Ultrasphere C18, 15 cm, tamanho de partículas de 5 mm; Beckman, EUA) e a uma bomba para CLAE de baixa pulsação (SpectraSeries P200; Spectra-Physics Analytical, EUA). O potencial utilizado foi de 650 mV (eletrodo de referência Ag/AgCl). A fase móvel, constituída de 75 mM NaH_2PO_4 , 0,75 mM sulfato de sódio dodecil, 100 μM EDTA, 1,48 mM trietilamina, 16% acetonitrila e 16% metanol (pH = 5.6), foi filtrada e bombeada através do sistema num fluxo de 1,0 ml/min. O volume por amostra de dialisado injetada foi de 20 μL . O sistema de CLAE era integrado a um sistema de aquisição de dados, PeakSimple II (SRI Instruments, EUA). Sob essas condições, o limite de detecção foi de 10 fmoles por amostra. A quantificação dos neurotransmissores DA e de 5-HT e seus metabolitos, respectivamente, DOPAC e 5-HIAA, foi feita pela comparação da altura dos picos em relação a uma curva padrão.

Microinjeções

As injeções de salina, de muscimol (0,5 μg / 0,5 μL) ou de lidocaína (10 μg / 0,5 μL) foram realizadas por meio de uma cânula de infusão (30 G; 13 mm). Essas drogas ou o seu veículo foram microinjetadas no complexo basolateral da amígdala num volume de 0,5 μL . O fluxo para a administração da droga foi de 0,25 $\mu\text{L}/\text{min}$ (tempo total de administração de 2 min). Após esse procedimento, esperou-se um tempo adicional de 1 min para a completa dispersão da

droga no tecido encefálico. As injeções foram realizadas através de uma seringa de 5 μ l (Hamilton, EUA), conectada a um tubo de polietileno (PE-10; Becton-Dickinson, EUA) à cânula de infusão e controladas por uma bomba de microinfusão (CMA/100, CMA, Suíça).

Determinação dos limiares aversivos

Após a implantação de eletrodos bipolares (MS 303/3, Plastics One Inc., EUA), os limiares foram mensurados na cuba de microdiálise (Bioanalytical Systems, EUA), numa sala experimental com iluminação fluorescente (60 lux na base da cuba). Através de um estimulador de onda senoidal (ESF12, DelVecchio, Brasil), foram aplicados estímulos elétricos de acordo com o protocolo descrito no experimento I (pág. 25).

Drogas e reagentes

O muscimol foi obtido da Sigma-Chemical (St. Louis, USA) e a lidocaína foi obtida da Denver Farma S.A. (Buenos Aires, Argentina). Todos os reagentes utilizados para CLAE foram obtidos da J. T. Baker Chemical (Phillipsburg, EUA) ou da Sigma-Chemical (St. Louis, EUA).

Procedimento

Os experimentos foram iniciados cinco dias após o procedimento cirúrgico para a implantação de um eletrodo bipolar no CI e uma cânula-guia no CBL e vinte e quatro horas após o procedimento de implantação da sonda de microdiálise transversal. A membrana de diálise foi perfundida com a solução de LCRA num fluxo de 1,2 μ L/min (CMA/100, CMA, Suíça). Após um período de 2 horas de equilíbrio, as amostras de dialisado foram coletadas a intervalos regulares de 30 min dentro de tubos de vidro (BAS, EUA) contendo 1 μ L de ácido perclórico (0,1 N) para prevenir oxidações. Esses tubos foram mantidos na temperatura de 4°C num coletor de

frações refrigerado (BAS, EUA). Os níveis basais dos neurotransmissores e seus metabolitos, anteriores a qualquer procedimento, foram definidos como a média de quatro amostras consecutivas de dialisados, diferindo não mais do que 10%. Após a coleta dessas amostras basais, consideradas como 100%, foi realizado o procedimento de estimulação elétrica do CI. Após a ocorrência da reação comportamental de fuga, considerada como tempo zero, foram coletados dialisados até 210 min. O procedimento de injeções de salina, de muscimol ou de lidocaína no CBL foi realizado quinze minutos antes da estimulação elétrica no CI.

Três grupos de animais, com um eletrodo bipolar no CI, uma cânula-guia no CBL e uma sonda de microdiálise transversal no CFr, foram testados para examinar os efeitos da microinjeção de salina (n=6), lidocaína (n=6) e muscimol (n=5) no CBL sobre os níveis de DA e de 5-HT no CFr, após a estimulação elétrica do CI – no limiar de fuga. Três grupos de animais controle, com os mesmos implantes cirúrgicos, foram adicionados nesse estudo, porém, para os animais desses grupos, não foi realizado o procedimento de estimulação elétrica do CI. Nesses grupos foi examinada a influência das injeções de salina (n=6), lidocaína (n=6) e muscimol (n=6) no CBL sobre os níveis de DA e de 5-HT no CFr, porém sem o efeito da estimulação elétrica do CI.

Histologia

Após o término dos experimentos, os animais foram submetidos ao mesmo protocolo descrito no experimento I (pág. 27). Foram considerados como integrantes da amostra, somente os dados obtidos de animais que apresentaram localização dos eletrodos, das cânulas-guia e das sondas de microdiálise transversal nas estruturas-alvo, segundo comparações com diagramas do atlas de Paxinos & Watson (1997).

Análise dos dados

Os dados estão representados como média \pm E.P.M. do percentual dos valores basais, calculados das primeiras quatro amostras de dialisados consecutivas, que foram obtidas antes do procedimento de microinjeção de salina, muscimol ou lidocaína no CBL e do procedimento de estimulação elétrica do CI.

Os dados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de dois fatores com medidas repetidas. Essa análise estatística foi aplicada para examinar o efeito das injeções de salina, muscimol ou lidocaína no CBL (fator 1) sobre os níveis extracelulares de DA e 5-HT no CFr (fator 2: tempo das amostras de dialisados) após a estimulação elétrica do CI no limiar de fuga. Nos casos em que ocorreram diferenças estatisticamente significativas foi aplicado o teste *post hoc* de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados

Os sítios de estimulação elétrica, de microinjeções e de diálise estavam localizados, respectivamente, no CI, no CBL e no CFr. A figura 4.11A mostra a posição das

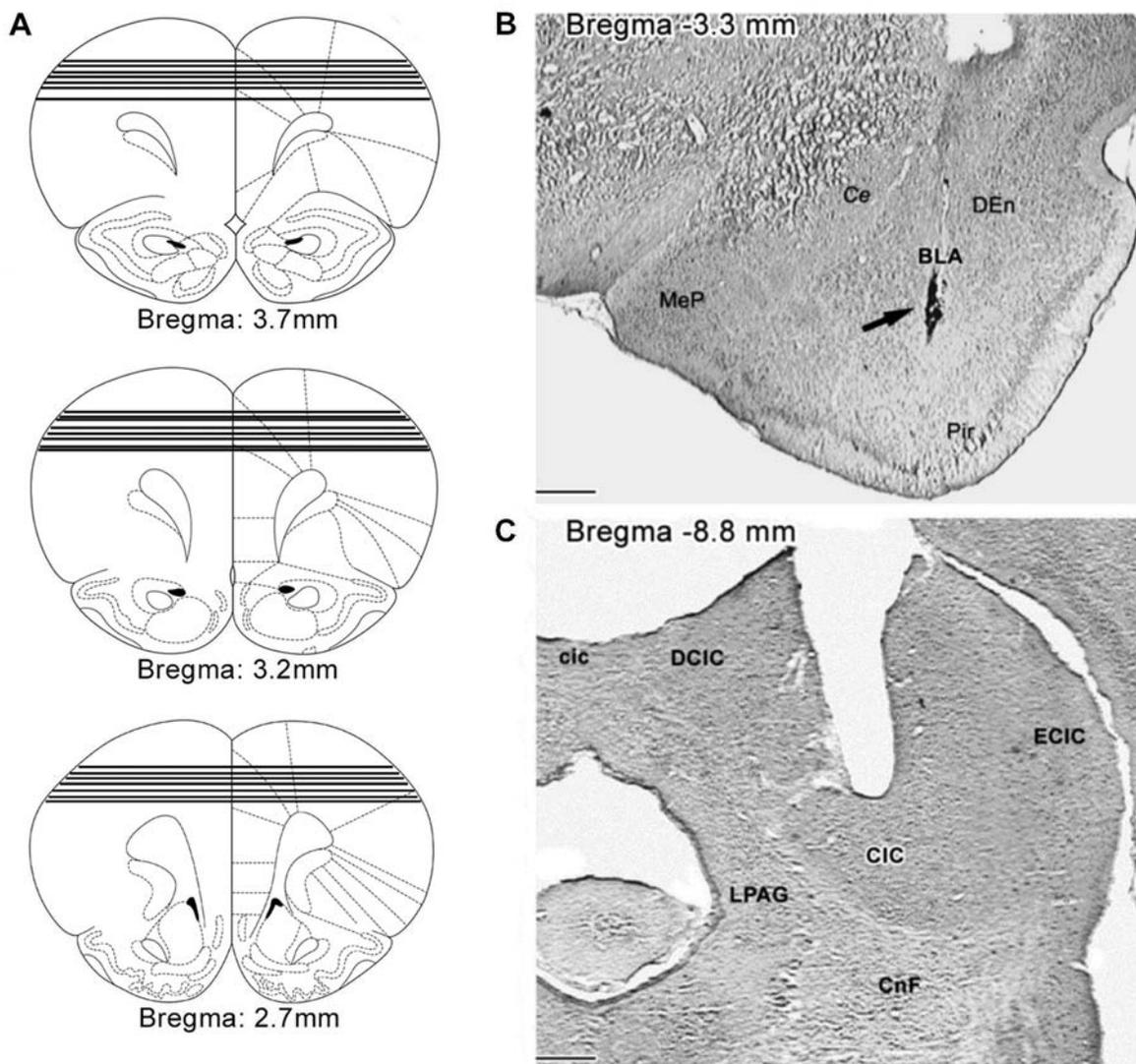


Figura 4.11. Representações de seções coronais mostrando a localização dos implantes das sondas de microdiálise no complexo basolateral da amígdala e no núcleo central da amígdala (A), adaptada do atlas de Paxinos e Watson (1997). Fotomicrografias representativas de sítios de microinjeções no complexo basolateral da amígdala (B) e de sítios de estimulação elétrica no colículo inferior (C). Barras = 500 μ m. BLA= complexo basolateral da amígdala. Ce=núcleo central da amígdala. CIC= núcleo central do colículo inferior. cic= comissura do colículo inferior. CnF= núcleo cuneiforme. DCIC= córtex dorsal do colículo inferior. Den= núcleo endopiriforme dorsal. ECIC= córtex externo do colículo inferior. LPAG= substância periaqueductal lateral. MeP= núcleo medial da amígdala. Pir= córtex piriforme.

sondas de microdiálise no CFr. As figuras 4.11B e 4.11C mostram, respectivamente, um sítio representativo de microinjeção no CBL e um sítio representativo de estimulação elétrica no CI.

A figura 4.12 mostra os efeitos das microinjeções de salina, muscimol e lidocaína no CBL sobre o limiar aversivo de fuga produzido pela estimulação elétrica do CI. A ANOVA mostrou diferenças estatisticamente significativas no limiar de fuga nos grupos com microinjeções no CBL [$F(2,14) = 39,10$; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Tukey mostrou uma diminuição estatisticamente significativa limiar de fuga nos grupos com microinjeção de muscimol e de lidocaína quando comparados com o grupo tratado com salina ($p > 0,05$).

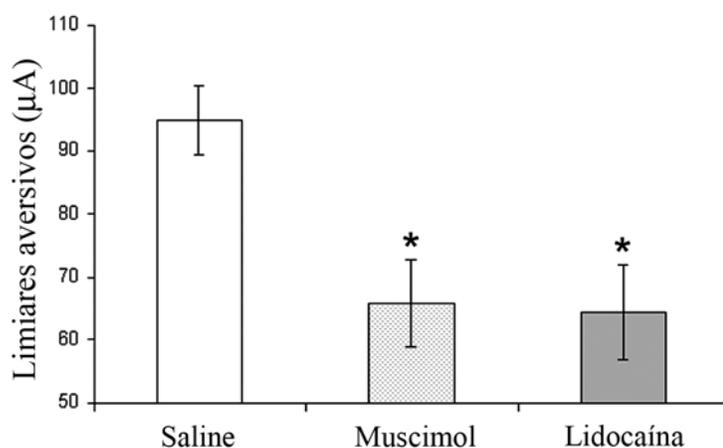


Figura 4.12. Limiares de fuga (média \pm E.P.M.) determinados pela estimulação elétrica do colículo inferior nos grupos com microinjeção de salina (0,5 μ l), lidocaína (10 μ g/0,5 μ l) e muscimol (0,5 μ g/0,5 μ l) no complexo basolateral da amígdala. A análise estatística aplicada foi a ANOVA de um fator, seguido do teste *post hoc* de Tukey. n=6 para os grupos salina e lidocaína e n=5 para o grupo muscimol todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação à linha de base.

Os níveis extracelulares basais de DA foram de $0,62 \pm 0,05$ nM e os níveis extracelulares basais de 5-HT foram de $0,35 \pm 0,04$ nM.

A figura 4.13 mostra os níveis extracelulares de DA e de 5-HT no CFr de animais com microinjeção de salina, muscimol e lidocaína no CBL, porém sem a estimulação elétrica

aversiva no CI. A ANOVA não mostrou diferenças estatisticamente significativas nos níveis extracelulares de DA e de 5-HT corticofrontais durante o tempo [F(7,105) = 0,51 e 0,18 para DA e 5-HT, respectivamente; $p > 0,05$ em ambos os casos] para os grupos com microinjeções no CBL [F(2,15) = 1,27 e 0,44 para DA e 5-HT, respectivamente; $p > 0,05$ em ambos os casos]. Não houve diferenças estatisticamente significativas na interação tempo x microinjeções [F(14,105) = 0,61 e 0,68 para DA e 5-HT, respectivamente; $p > 0,05$ em ambos os casos].

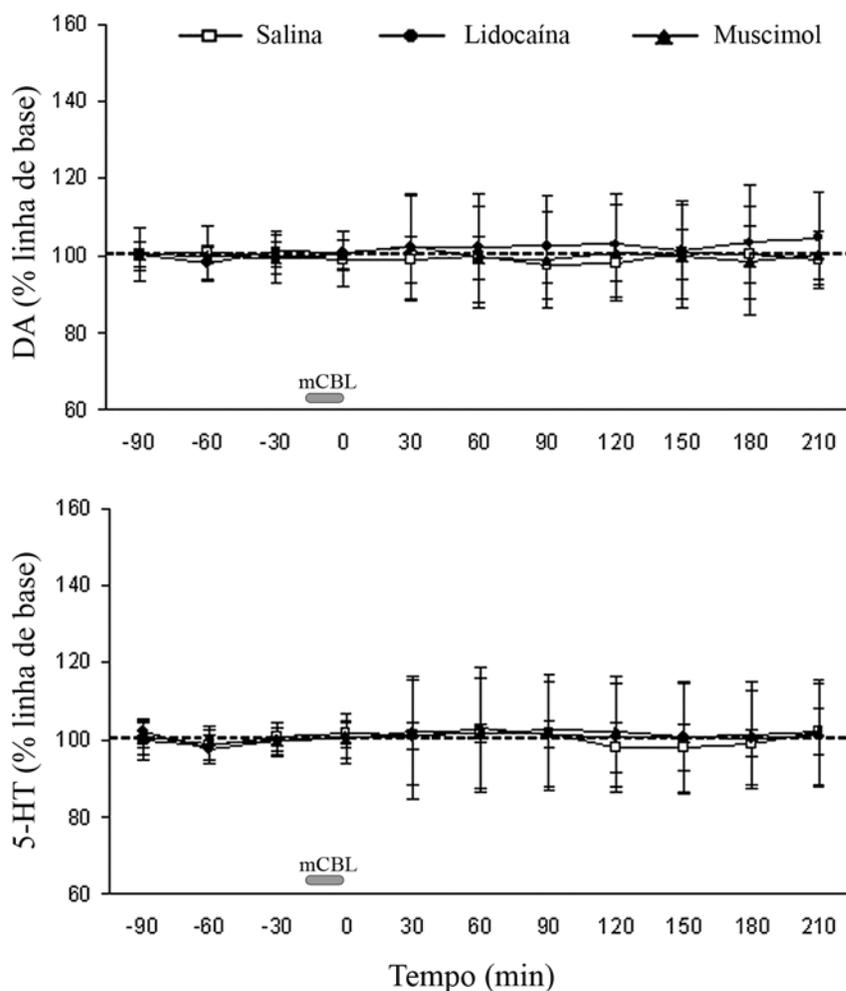


Figura 4.13. Níveis extracelulares de dopamina (DA) e de serotonina (5-HT) nos dialisados do córtex frontal antes (-90, -60, -30 e 0 min) e depois (30 – 210 min) de microinjeções de salina (0,5 μ l), lidocaína (10 μ g/0,5 μ l) e muscimol (0,5 μ g/0,5 μ l) no complexo basolateral da amígdala em animais sem estimulação elétrica do colículo inferior. Essas microinjeções foram aplicadas no tempo 0. Os dados estão apresentados como porcentagem em relação aos níveis basais (média das quatro primeiras amostras de dialisado consecutivas antes das microinjeções, considerada como 100%) e estão expressos como média \pm E.P.M. A análise estatística aplicada foi a ANOVA de dois fatores com medidas repetidas, seguido do teste *post hoc* de Tukey. $n=6$ para todos os grupos. * $p<0,05$ em relação à linha de base.

A figura 4.14 mostra o curso temporal dos níveis extracelulares de DA e de 5-HT no CFr de animais com estimulação elétrica no CI no limiar e microinjeções de salina, de lidocaína ou de muscimol no CBL. Os animais que receberam microinjeções de lidocaína e de muscimol foram agrupados em um grupo, pois não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos níveis extracelulares corticofrontais de DA [$F(1,9) = 0,07$; $p > 0,05$] ou de 5-HT [$F(1,6) = 0,80$; $p > 0,05$].

Os resultados obtidos nos níveis extracelulares de DA e de 5-HT em animais com estimulação elétrica no CI e microinjeções no CBL serão descritos separadamente abaixo.

Dopamina

A ANOVA mostrou que houve diferenças estatisticamente significativas nos níveis extracelulares de DA no CFr sobre o tempo [$F(7,105) = 4,64$; $p < 0,05$] e nos grupos com microinjeções no CBL [$F(1,15) = 4,98$; $p < 0,05$], após a estimulação elétrica do CI no limiar de fuga. Houve efeito estatisticamente significativo na interação tempo x microinjeções [$F(7,105) = 6,73$; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Tukey mostrou que houve um aumento significativo nos níveis extracelulares de DA somente nos animais com microinjeções de salina no CBL ($p < 0,05$). Esse efeito ocorreu logo após a estimulação elétrica do CI e seu efeito permaneceu até o tempo 210 min. Os níveis extracelulares de DA no CFr foi de aproximadamente 30% em comparação com os níveis extracelulares basais. Esses resultados são apresentados na figura 4.14A.

Serotonina

A ANOVA mostrou que houve diferenças estatisticamente significativas nos níveis extracelulares de 5-HT no CFr sobre o tempo [$F(7,84) = 12,34$, $p < 0,05$], porém sem efeito nos grupos com microinjeções no CBL [$F(1,12) = 0,19$; $p > 0,05$], após a estimulação

elétrica do CI no limiar de fuga. Não houve diferenças estatisticamente significativas na interação tempo x microinjeções [$F(7,84) = 1.77, p > 0,05$]. O teste *post hoc* de Tukey mostrou que houve uma redução significativa nos níveis extracelulares de 5-HT no Cfr em todos os grupos com microinjeções no CBL ($p < 0,05$). Esse efeito ocorreu no tempo 60 min após a estimulação

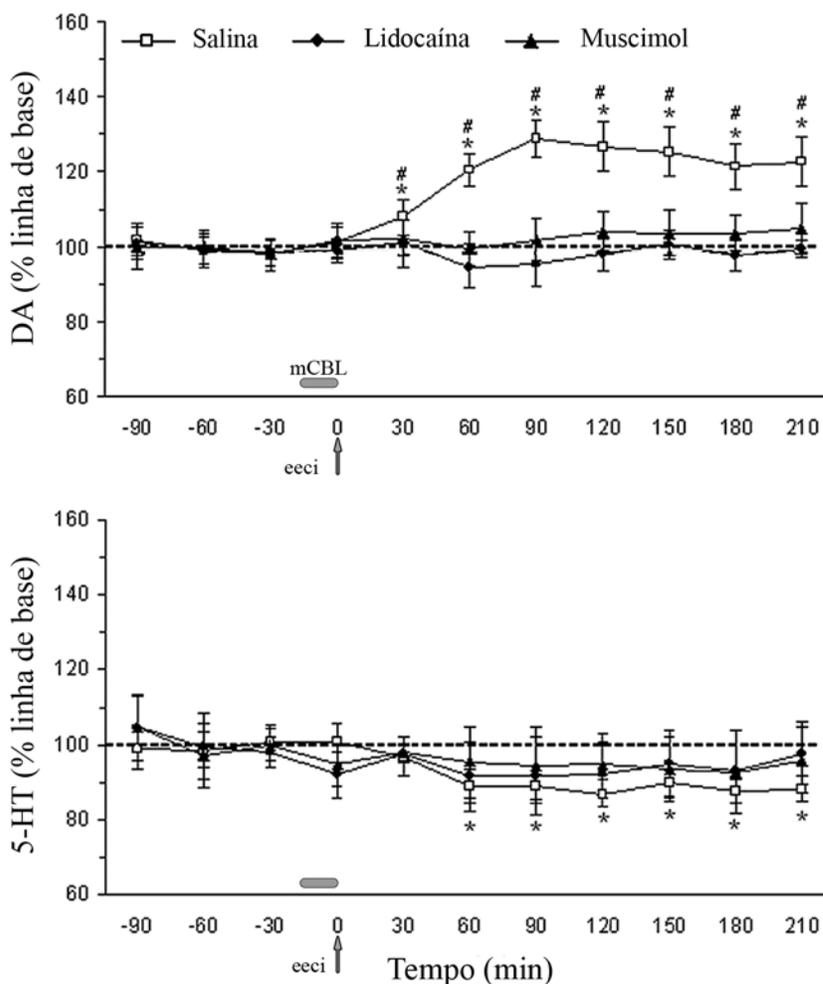


Figura 4.14. Níveis extracelulares de dopamina (DA) (A) e de serotonina (5-HT) (B) nos dialisados do córtex frontal antes (-90, -60, -30 e 0 min) e depois (30 – 210 min) de microinjeções de salina (0,5 μ l), lidocaína (10 μ g/0,5 μ l) e muscimol (0,5 μ g/0,5 μ l) no complexo basolateral da amígdala em animais com estimulação elétrica do colículo inferior (eeci). Essas microinjeções e as estimulações elétricas no limiar de fuga foram aplicadas no tempo 0. Os dados estão apresentados como porcentagem em relação aos níveis basais (média das quatro primeiras amostras de dialisado consecutivas antes da eeci e das microinjeções, considerada como 100%) e estão expressos como média \pm E.P.M. A análise estatística aplicada foi a ANOVA de dois fatores com medidas repetidas, seguido do teste *post hoc* de Tukey. $n=6$ para os grupos salina e lidocaína; e $n=5$ para o grupo muscimol. * $p < 0,05$ em relação à linha de base.

elétrica do CI e seu efeito permaneceu até o tempo 210 min. Esses resultados são apresentados na figura 4.14B.

Discussão

O presente estudo confirma resultados anteriores mostrando que a estimulação elétrica do colículo inferior, no limiar de fuga, causa uma liberação extracelular prolongada de DA no CF (Cuadra et al., 2000). Neste estudo, entretanto, quando o CBL é inativado, através da administração de lidocaína ou de muscimol, produz-se uma queda significativa nesse aumento dos níveis extracelulares de DA após a estimulação elétrica do CI no limiar de fuga.

O presente estudo busca compreender parte da circuitaria neural do medo que estabelece a conexão colículo inferior – córtex frontal. Alguns estudos suportam a hipótese de que a amígdala ocupa um papel relevante nessa circuitaria. Neuroanatomicamente, o CI mantém conexões com o CBL, através do núcleo geniculado medial (LeDoux et al. 1990b; Turner & Herkenham, 1991), enquanto o CBL estabelece conexões recíprocas e diretas com o CFr (McDonald, 1996). Estudos conduzidos neste e em outros laboratórios mostram que a lesão excitotóxica, a lesão neurotóxica serotoninérgica e a administração de antagonistas serotoninérgicos no CBL favorecem aversividade decorrente da ativação do CI (Maisonnette et al., 1996, 2000; Macedo et al., 2002). Nos estudos apresentados mostramos que a estimulação elétrica do CI no limiar de congelamento e de fuga provoca um aumento na liberação extracelular de DA e de 5-HT. Alguns resultados mostrando a ativação de mecanismos neurais corticofrontais durante estados aversivos gerados pela estimulação do CI têm sido descritos recentemente (Cuadra et al., 2000; Troncoso et al., 2003). Além disso, a ativação de substratos neurais da aversão no CI revela um aumento na expressão da proteína *c-fos* tanto na amígdala como no CFr (Lamprea et al., 2002).

O CBL parece modular a ativação de mecanismos dopaminérgicos corticofrontais em situações aversivas (Goldstein et al., 1996; Davidson et al., 2002; Quirk et al., 2003; Sotres-

Bayon et al., 2004; Likhtik et al., 2005). O CFr parece influenciar a resposta comportamental a estímulos aversivos e integrar as informações internas e externas e processá-las de acordo com sua relevância emocional, sendo que seu funcionamento depende das informações recebidas do CBL (Hurley et al., 1991; Terreberry & Neafsey, 1983, 1987). De fato, o CBL mantém conexões glutamatérgicas recíprocas com o CFr (Krettek & Price, 1977; McDonald, 1991; McDonald et al., 1996; Jackson & Moghaddam, 2001). Porém, o modo pelo qual a amígdala pode modular a atividade dopaminérgica no CFr ainda é objeto de conjecturas.

A principal fonte dopaminérgica corticofrontal é a área tegmentar ventral (ATV, A10), origem da via mesocortical (Le Moal & Simon, 1991). Tem sido postulado que o núcleo basolateral da amígdala atua como filtro sensorial para as informações aversivas que chegam CPFr. O controle seria exercido sobre o núcleo central da amígdala que se constitui na principal via de saída das respostas defensivas geradas e/ou elaboradas na amígdala. Estas fibras, por sua vez, alcançariam a A10, que se projeta para o CPFr (Wallace et al., 1992). Na literatura não há pesquisas que mostrem alguma conexão direta entre o CI e a área tegmentar ventral, principal origem da via mesocortical dopaminérgica. Por outro lado, estudos neuroanatômicos demonstram que o CPFr tem importantes conexões com áreas auditivas no córtex temporal (Pandya & Kuyper, 1969). Sabe-se que o CI é uma estrutura chave para a informação auditiva e que estabelece importantes conexões com áreas corticais, principalmente com o lobo temporal (Adams, 1979; Cooper & Young, 1976). Assim, a estimulação do colículo inferior, através de circuitos reguladores da amígdala, poderia aumentar os níveis de DA no CPFr, através da estimulação da área tegmentar ventral.

Atualmente, muitos estudos têm procurado compreender o papel da conexão recíproca e direta entre o CBL e o CPFr (Grace, 2000; Carr & Sesack, 2000). As projeções diretas do CBL para o CPFr envolvem fibras que, em sua maioria, são excitatórias,

especificamente glutamatérgicas (McDonald, 1987). A amígdala parece modificar a atividade dos neurônios do córtex pré-frontal durante o processamento de estímulos auditivos aversivos em ratos (Garcia et al., 1999). Ainda, a estimulação do CBL induz predominantemente respostas inibitórias no córtex pré-frontal (Pérez-Jaranay & Vives, 1991). Jackson & Moghaddam (2001), através de estudos neuroquímicos, mostraram que microestimulações do CBL produzem um aumento significativo nos níveis extracelulares de dopamina no CPFr. Além disso, essas microestimulações no CBL, que mantém conexões glutamatérgicas com o CPFr, também provocaram um aumento nos níveis de glutamato corticofrontal. Não obstante, o aumento nos níveis dopaminérgicos do CPFr não foi bloqueado pela inibição desse sistema glutamatérgico. Assim, que as fibras eferentes glutamatérgicas, que conectam diretamente a amígdala ao CPFr, não participem da regulação dopaminérgica do CPFr. Por conseguinte, é provável que a ativação do sistema dopaminérgico corticofrontal derive do aumento da atividade neuronal da ATV, cujos corpos celulares dopaminérgicos dão origem ao sistema dopaminérgico mesocortical (Carr & Sesack, 2000).

O núcleo *accumbens* tem sido considerado como uma interface para estímulos com valor emocional e os sítios efetores motores (Mogenson et al., 1980; Pennartz et al., 1994). Ainda, fibras glutamatérgicas tanto do CPFr como da amígdala para o núcleo *accumbens* são consideradas como vias fundamentais para a expressão de comportamentos motores acionado por estímulos emocionais relevantes (Cador et al., 1989; Robbins et al., 1989).

Assim, a estimulação elétrica do CI poderia ativar, via corpo geniculado medial, neurônios do CBL que se projetam para o CPFr que, por sua vez, ativariam neurônios glutamatérgicos corticofrontais que se projetam para a ATV: essa estimulação nos neurônios dopaminérgicos da ATV promoveria a liberação de DA no CPFr. Porém, em nosso estudo, essa cascata estimulatória parece ter sido interrompida pela inativação dos neurônios no CBL. O

aumento na transmissão dopaminérgica no CFr em função das informações aversivas elaboradas no mesencéfalo parece sofrer uma influência direta do CBL.

Uma outra possibilidade neuroanatômica na circuitaria entre o colículo inferior e o córtex pré-frontal pode ocorrer através da via: colículo inferior – núcleo geniculado medial – amígdala – tálamo dorsomedial – córtex pré-frontal (Brodal, 1992). Porém, parece haver um papel preponderante das conexões diretas entre o CBL e o CPFr no trajeto das informações aversivas (Barbas, 2000; Garcia et al., 1999; Jacobson & Trojanowski, 1975). Ainda, o NCe da amígdala mantém conexões com a ATV, podendo, assim, influenciar diretamente o sistema dopaminérgico mesocortical. Porém, os neurônios de projeção do NCe são em sua maioria GABAérgicos e alcançam os corpos celulares na ATV, cujo alvo são neurônios de projeção não dopaminérgicos (Fudge & Haber, 2000; Phillipson, 1979; Wallace et al., 1992).

Alguns autores têm proposto que mecanismos dopaminérgicos corticofrontais estão implicados em processos cognitivos e atencionais que seriam ativados durante experiências aversivas, sugerindo que a resposta dopaminérgica corticofrontal a estímulos aversivos é necessária, sob certas circunstâncias, para manter uma resposta comportamental apropriada diante de mudanças no ambiente (Davidson, 2002; Espejo, 1997; Likhtik et al., 2005). Assim, Garcia e colaboradores (1999) mostraram que a estimulação do CBL parece causar uma inibição nos mecanismos neurais corticofrontais que participam no controle da expressão de medo. Existem vários relatos que mostram um aumento na liberação extracelular de DA corticofrontal em resposta a estressores ambientais e farmacológicos ou a estimulação de áreas envolvidas na neurocircuitaria aversiva (Abercrombie et al., 1989; Cuadra et al., 2000; 2001; Davis et al., 1994b; Pezze et al., 2003).

A interação entre o córtex pré-frontal e amígdala parece estar envolvida nos processos de extinção do medo (LeDoux 2000; Morgan et al., 1993; Quirk et al., 2003;

Rosenkranz et al., 2003). Assim, a circuitaria no CBL, que é essencial para a aquisição do medo condicionado, mantém conexões intra-amigdalinas com a região medial do NCe, que controla a expressão do medo através de conexões com circuitos encefálicos específicos – tais como a substância cinzenta periaquedutal dorsal e o hipotálamo – que medeiam diferentes respostas – por exemplo, comportamento de congelamento e respostas endócrinas. A comunicação entre o CBL e a região medial do NCe é complexa e pode envolver as camadas intercalares de interneurônios inibitórios (Paré et al., 2004). O córtex pré-frontal medial parece regular a expressão do medo pela inibição da amígdala (Davidson, 2002; Drevets, 1999; Quirk & Gehlert, 2003; Sotres-Bayon et al., 2004). A extinção poderia envolver o córtex pré-frontal medial ou ventromedial que poderiam suprimir diretamente os disparos neurais na amígdala ou ativar interneurônios inibitórios no CBL ou a ativação dos interneurônios inibitórios da massa intercalar (Sotres-Bayon et al., 2004; Rosenkranz et al., 2003; Quirk et al., 2003).

Neste estudo a inativação do CBL com lidocaína ou muscimol não causou qualquer alteração nos mecanismos dopaminérgicos basais no CFr. Alguns estudos mostram que a inativação do CBL pode influenciar diretamente os níveis extracelulares de DA no córtex pré-frontal medial (Carr & Sesack, 2000). Mecanismos dopaminérgicos corticofrontais podem ser influenciados pela atividade motora. Assim, o aumento nos níveis extracelulares dopaminérgicos no CFr após a estimulação elétrica do CI, no limiar de fuga – que causa uma forte ativação motora –, poderia sofrer influências inerentes a própria atividade motora que o animal exhibe durante esse comportamento. No entanto, em estudo anterior mostramos que a estimulação elétrica, no limiar de fuga, da substância cinzenta periaqueductal dorsal, outra área mesencefálica relacionada ao comportamento defensivo, não produz um aumento nos níveis extracelulares de DA no CFr (Cuadra et al., 2000). Assim, é provável que o aumento nos níveis extracelulares de DA corticofrontais produzido pela estimulação elétrica do CI não sofra influências da atividade

motora do animal.

Em contraste com os mecanismos dopaminérgicos corticofrontais, os níveis extracelulares de serotonina no CFr são reduzidos pela estimulação elétrica do CI. Esses resultados eram esperados na medida em que mecanismos serotoninérgicos no medo e na ansiedade são largamente reconhecidos (Brandão et al., 1999; Graeff, 2002; Millan, 2003; Gray & McNaughton, 2000). Por outro lado, a inativação do CBL com lidocaína ou muscimol não causou qualquer modificação nos níveis extracelulares de 5-HT no CFr de ratos com estimulação elétrica no CI no limiar de fuga. Assim, ao contrário dos mecanismos dopaminérgicos corticofrontais, que parecem ser modulados pelo CBL, os mecanismos serotoninérgicos no CFr parecem não sofrer uma modulação do CBL.

Esse estudo mostra também que a inativação do CBL com lidocaína ou muscimol aumenta a aversividade produzida pela estimulação elétrica do CI. Esse resultado segue a mesma direção daqueles obtidos com a semicarbazida injetada no CI combinada com a inativação do CBL com muscimol.

A estimulação elétrica do CI produz um aumento nos níveis extracelulares de dopamina e uma redução nos níveis extracelulares de serotonina. A inativação do CBL produz um aumento da aversividade gerada pela estimulação elétrica do colículo inferior e uma redução nos níveis extracelulares de dopamina corticofrontal, porém não influenciou os níveis extracelulares de 5-HT.

Resultados consistentes na literatura têm evidenciado o papel crítico da amígdala na modulação de respostas condicionadas e incondicionadas a estímulos de perigo (Blanchard & Blanchard, 1972; LeDoux et al., 1988; Davis, 1992b; Davis et al., 1994a). O córtex pré-frontal medial parece regular a expressão do medo através de mecanismos inibitórios da amígdala (Drevets, 1999; Quirk & Gehlert, 2003; Sotres-Bayon et al., 2004), suprimindo diretamente os

disparos neurais na amígdala ou ativando interneurônios inibitórios no CBL (Sotres-Bayon et al 2004; Rosenkranz et al., 2003; Quirk et al., 2003). O medo condicionado está associado a um aumento na liberação de DA no córtex pré-frontal, sugerindo que a DA é um importante componente no medo condicionado (Yoshioka et al., 1996; Pezze et al., 2003; Pezze & Feldon, 2004). Estímulos de estresse e aversivos também provocam um aumento na liberação de DA no córtex pré-frontal (Goldstein et al., 1994; Yoshioka et al., 1996).

Conclusões

Conclusões

- A estimulação elétrica no colículo inferior, nos limiares de congelamento e fuga, aumentou os níveis extracelulares de dopamina e de serotonina no complexo basolateral da amígdala. A estimulação elétrica do colículo inferior não provocou qualquer alteração nos níveis extracelulares de DA e 5-HT no núcleo central da amígdala.
- A inativação com muscimol ou a inibição dos receptores dopaminérgicos D1 e serotoninérgicos 5-HT2 no complexo basolateral da amígdala prejudicam a aquisição da aversão condicionada ao lugar produzida por associações com o estado aversivo gerado pela infusão de semicarbazida no colículo inferior. Essas mesmas manipulações no complexo basolateral da amígdala favorecem o medo incondicionado produzido pela estimulação do colículo inferior.
- A inativação do complexo basolateral da amígdala com lidocaína ou muscimol preveniu a liberação extracelular de dopamina no córtex frontal gerado pela estimulação elétrica do colículo inferior no limiar de fuga. Por outro lado, a estimulação elétrica do CI, no limiar de fuga, promoveu uma redução nos níveis extracelulares de serotonina no córtex frontal. Essa redução nos mecanismos serotoninérgicos do córtex frontal parecem não depender do funcionamento do complexo basolateral da amígdala.

Referências bibliográficas

Referências bibliográficas

- ABERCROMBIE ED, KEEFE KA, DIFRISCHIA DS, ZIGMOND MJ. Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens and medial frontal cortex. *J. Neurochem.*, 52:1655-1658, 1989.
- ADAMS JC. Ascending projections in the inferior colliculus. *J. Comp. Neurol.*, 183:519-538, 1979.
- ADOLPHS R, TRANEL D, DAMASIO H, DAMASIO, AR. Fear and the human amygdala. *J. Neurosci.*, 15:5879-5891, 1995.
- AGGLETON JP. *The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction*. Wiley-Liss Inc.: New York, USA, 1992.
- AGUIAR MS & BRANDÃO ML. Conditioned place aversion produced by microinjections of substance P into the periaqueductal gray of rats. *Behav. Pharmacol.*, 5:369-373, 1994.
- AITKIN LM, WEBSTER WR, VEALE JL, CORSBY DC. Inferior colliculus. I. Comparison of response properties of neurons in the central, pericentral and external nuclei of adult cat. *J. Neurophysiol.*, 38:1197-1207, 1975.
- AMARAL DG, et al. Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. In: AGGLETON, J. P. (ed.) *The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction*. p. 1-66. Wiley-Liss Inc.: New York, USA, 1992.
- AMAT J, MATUS-AMAT P, WATKINS LR, MAIER SF. Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-H in the basolateral amygdala of the rat. *Brain Res.*, 812:113-120, 1998.
- AMORAPANTH P, LEDOUX JE, NADER K. Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by fear-arousing stimulus. *Nat. Neurosci.*, 3(1): 74-79, 2000.
- ASAN E. Interrelationships between tyrosine hydroxylase-immunoreactive dopaminergic afferents and somatostatinergic neurons in the rat central amygdaloid nucleus. *Histochem Cell Biol.*, 107:65-79, 1997a.
- ASAN E. Ultrastructural features of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive afferents and their targets in the rat amygdala. *Cell Tissue Res.* 288:449-69, 1997b.
- AZMITIA EC & SEGAL M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and medial raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 179:641-668, 1978.
- BAGRI A, SANDNER G, DISCALA G. Wild running and switch-off behavior elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus: effect of anticonvulsant drugs. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 39:683-688, 1991.
- BAILEY TW & DIMICCO JA. Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus elevates plasma ACTH in conscious rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 280:R8 – R15, 2001.
- BARBAS H. Anatomic basis of cognitive-emotional interactions in the primate prefrontal cortex. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 19:499-510, 1995.
- BARBAS H. Connections underlying the synthesis of cognition, memory and emotion in primate prefrontal cortex. *Brain Res. Bull.*, 52:319-330, 2000.

- BEHBEHANI MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog. Neurobiol.*, 46:575–605, 1995.
- BEITZ AJ. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience*, 7:133-159, 1982.
- BIGGIO G et al. GABAergic and dopaminergic transmission in the rat cerebral cortex: effect of stress, anxiolytic and anxiogenic drugs. *Pharmacol. Ther.*, 48:121–142, 1990.
- BLANCHARD DC & BLANCHARD RJ. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 81:281-290; 1972.
- BOBILLIER P, PETTIJEAN F, SALVERT D, LIGIER M, SEGUIN S. Differential projections of the nucleus raphe dorsalis and nucleus raphe centralis as revealed by autoradiography. *Brain Res.*, 85:502-210, 1975.
- BORELLI KG, FERREIRA-NETTO C, BRANDAO ML. Distribution of Fos immunoreactivity in the rat brain after freezing or escape elicited by inhibition of glutamic acid decarboxylase or antagonism of GABA-A receptors in the inferior colliculus. *Behav. Brain Res.*, 2006 (no prelo).
- BOROWSKI TB & KOKKINIDIS L. Contribution of ventral tegmental area dopamine neurons to expression of conditional fear: effects of electrical stimulation, excitotoxin lesions, and quinpirole infusion on potentiated startle in rats. *Behav. Neurosci.*, 110(6):1349-64, 1996.
- BRANDÃO ML, ANSELONI VZ, PANDOSSIO JE, DE ARAUJO JE, CASTILHO VM. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 23:863-875, 1999.
- BRANDÃO ML, CARDOSO SH, MELO LL, MOTTA V, COIMBRA NC. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 18:339-346, 1994.
- BRANDÃO ML, COIMBRA NC, OSAKI MY. Changes in the auditory-evoked potentials induced by fear-evoking stimulations. *Physiol Behav.*, 72:365-372, 2001.
- BRANDÃO ML, DISCALA G, BOUCHET MJ, SCHMITT P. Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 24:497-502, 1986.
- BRANDÃO ML, MELO LL, CARDOSO SH. Mechanisms of defense in the inferior colliculus. *Behav. Brain Res.*, 58:49-55, 1993.
- BRANDÃO ML, TOMAZ C, BORGES PC, COIMBRA NC, BAGRI A. Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. *Physiol. Behav.*, 44:361-365, 1988.
- BRANDÃO ML, TRONCOSO AC, DE SOUZA SILVA MA, HUSTON JP. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress : empirical and conceptual considerations. *Eur. J. Pharmacol.*, 463(1-3): 225-33, 2003.
- BRANDÃO ML, TRONCOSO AC, MELO LL, SANDNER G. Active avoidance learning using brain stimulation applied to the inferior colliculus as negative reinforcement in rats: evidence for latent inhibition. *Neuropsychobiology*, 35:30-35, 1997.
- BRINLEY-REED M & MCDONALD, A.J. Evidence that dopaminergic axons provide a dense innervation of specific neuronal subpopulations in the rat basolateral amygdala. *Brain Res.*, 850(1-2):127-35, 1999.
- BRINLEY-REED M, MASCAGNI F, MCDONALD AJ. Synaptology of prefrontal cortical projections to the basolateral amygdala: an electron microscopic study in the rat. *Neurosci. Lett.*, 202:45-48, 1995.

- BROCA P. Anatomie comparée des enconvolutions cérébrales: Le grand lobe limbique et la scissure limbique dans la série des mammifères. *Rev. Anthropol.*, 1:385–498, 1878.
- BRODAL P. *The central nervous system: structure and function*. Oxford University Press: New York, Estados Unidos, 1992.
- CADOR M, ROBBINS TW, EVERITT BJ. Involvement of the amygdala in stimulus-reward associations: interaction with the ventral striatum. *Neurosci.* 30:77-86, 1989.
- CAMPBELL BM & MERCHANT KM. Serotonin 2C receptors within the basolateral amygdala induce acute fear-like responses in an open-field environment. *Brain Res.*, 993:1-9, 2003.
- CANNON WB. *Cannon Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage*, Appleton, New York, 1929.
- CARDOSO SH, COIMBRA NC, BRANDAO ML. Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. *Behav. Brain Res.*, 63:17-24, 1994.
- CARR D & SESACK S Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J. Neurosci.*, 20:3864-3873, 2000.
- CASSELL MD, FREEDMAN LJ, SHI C. The intrinsic organization of the central extended amygdala. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 29877:217–241, 1999.
- CASTILHO VM & BRANDAO ML. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT_{2A} receptors in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 155(2):154-62, 2001.
- CHACHIC M & POWELL D. A. Both medial prefrontal and amygdala central nucleus lesions abolish heart rate classical conditioning, but only prefrontal lesions impair reversal of eyeblink different conditioning. *Neurosci. Lett.*, 257:151-154, 1998.
- CHANCE SA, ESIRI MM, CROW TJ. Amygdala volume in schizophrenia: post-mortem study and review of magnetic resonance imaging findings. *Br. J. Psychiatry*, 180:331-8, 2002.
- CHARNEY DS & DEUTCH A. A functional neuroanatomy of anxiety and fear: implications for the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 10:419-46, 1996
- CHEN QH, HAYWOOD JR, TONEY GM. Sympathoexcitation by PVN-injected bicuculline requires activation of excitatory amino acid receptors. *Hypertension*, 42:725–731, 2003.
- COCO ML, KUHN CM, ELY TD, KILTS CE. Selective activation of mesoamygdaloid dopamine neurons by conditioned stress: attenuation by diazepam. *Brain Res.*, 11(1-2): 39-47, 1992.
- COLLINS DR & PARÉ D. Reciprocal changes in the firing probability of lateral and central medial amygdala neurons. *J. Neurosci.*, 19:836–844, 1999b.
- COLLINS DR & PARÉ D. Spontaneous and evoked activity of intercalated amygdala neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 11:3441–3448, 1999a.
- COOKSON MR & CLARIMON J. Dystonia and the nuclear envelope. *Neuron*, 48:875-877, 2005.
- COOPER MH & YOUNG PA. Cortical projections to the inferior colliculus of the cat. *Exp. Neurol.*, 51:488–502, 1976.
- CUADRA G, ZURITA A, GIOINO G, MOLINA V. Influence of different antidepressant drugs on the effect of chronic variable stress on restraint-induced dopamine release in frontal cortex. *Neuropsychopharm.*, 25:1-11, 2001.

- CUADRA G, ZURITA A, MACEDO CE, MOLINA VA, BRANDAO ML. Electrical stimulation of the midbrain tectum enhances dopamine release in the frontal cortex. *Brain Res. Bull.*, 52:413-418, 2000.
- DAHLSTRÖN A & FUXE K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 62 Suppl., 232:1-55, 1964.
- DARWIN C. *A expressão das emoções nos homens e nos animais*. Companhia das Letras: São Paulo, Brasil, 2000.
- DAVID AS. et al. Auditory hallucinations inhibit exogenous activation of auditory association cortex. *Neuroreport*, 7:932-936, 1996.
- DAVIDSON RJ. Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. *Biol. Psychiatry*, 51:68-80, 2002.
- DAVIS M, RAINNIE D, CASSELL M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends in Neurosciences*, 17:208-214, 1994a.
- DAVIS M. & WHALEN PJ. The amygdala: vigilance and emotion. *Molecular Psychiatry*, 6:13-34, 2001.
- DAVIS M. 2000. The role of the amygdala in conditioned and unconditioned fear and anxiety. In: Aggleton JP, editor. *The Amygdala: A Functional analysis*. 2^a ed. Oxford University Press, EUA.
- DAVIS M. et al. Stress-induced activation of prefrontal cortex dopamine turnover: blockade by lesions of the amygdala. *Brain Res.*, 664:207-210, 1994b.
- DAVIS M. The role of the amygdala in conditioned fear. In: AGGLETON, J. P. (ed.) *The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction*. pp. 255-306. Wiley-Liss: New York, Estados Unidos, 1992a.
- DAVIS M. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Ann. Rev. Neurosci.*, 15:353-75, 1992b.
- DE OCA BM. et al. Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. *J. Neurosci.*, 18:3426-3432, 1998.
- DREVETS WC. Neuroimaging abnormalities in the amygdala in mood disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 985:420-44, 2003.
- DREVETS WC. Prefrontal cortical-amygdalar metabolism in major depression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 877:614-37, 1999.
- ESPEJO EF. Selective dopamine depletion within the medial prefrontal cortex induces anxiogenic-like effects in rats placed on the elevated plus maze. *Brain Res.*, 762:281-284, 1997.
- FALLON JH & CIOFI P. Distribution of monoamines within the amygdala. In: AGGLETON, J. P. (ed.) *The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction*. pp.97-114. Wiley-Liss: New York, USA, 1992.
- FALLON JH & LOUGHLIN SE. Substantia Nigra. In: PAXINOS, G. *The Rat Nervous System*. pp. 215-238. Academic Press: Califórnia, Estados Unidos, 1995.
- FANSELOW MS & KIM JJ. Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. *Behav. Neurosci.*, 108:210-212, 1994.
- FAYE-LUND H & OSEN KK. The anatomy of the inferior colliculus in rat. *Anat. Embryol.*, 137:1-20, 1985.
- FEENSTRA MGP & BOTTERBLUM MH. Rapid sampling of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during food consumption, handling and exposure to novelty. *Brain Res.*, 742:17-24, 1996.

- FEENSTRA MGP, BOTTERBLOM MH, VAN UUM JF. Novelty-induced increase in dopamine release in the rat prefrontal cortex in vivo: inhibition by diazepam. *Neurosci. Lett.*, 189:81–84, 1995.
- FENDT M & FANSELOW MS. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci. Behav. Rev.*, 23:743-760, 1999.
- FERNANDEZ DE MOLINA A & HUNSPERGER RW. Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis, and adjacent structures. *J. Physiol.*, 145:251-65, 1959.
- FUDGE JL & HABER SN. The central nucleus of the amygdala projection to dopamine subpopulations in primates. *Neuroscience*, 97:479-494, 2000.
- FUNADA M & HARA C. Differential effects of psychological stress on activation of the 5-hydroxytryptamine- and dopamine-containing neurons in the brain of freely moving rats. *Brain Res.*, 901:247-51, 2001.
- FUSTER JM. The prefrontal cortex – an update: time is of the essence. *Neuron*, 30:319-333, 2001.
- FUSTER JM. *The prefrontal cortex: anatomy, physiology and neuropsychology of the frontal lobe*. Raven Press: New York, Estados Unidos, 1989.
- GALLAGHER M & CHIBA AA. The amygdala and emotion. *Cognitive Neurosci.*, 6:221-227, 1996.
- GARCIA R, VOUMBA RM, BAUDRY M, THOMPSON RF. The amygdala modulates prefrontal cortex activity relative to conditioned fear. *Nature*, 402:294-296, 1999.
- GARCIA-CAIRASCO N & SABBATINI RME. Neuroethological evaluation of audiogenic seizures in hemidetelencephalated rats. *Behav. Brain Res.*, 48:49-56, 1989.
- GARCIA-CAIRASCO N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hearing Res.*, 168:208-222, 2002.
- GARGIULO PA, VIANA MB, GRAEFF FG, SILVA MA, TOMAZ C. Effects of anxiety and memory of systemic and intra-amygdala injection of 5-HT₃ receptor antagonist BRL 46470A. *Neuropsychobiology.*, 33:189-195, 1996.
- GENIEC P & MOREST DK. The neuronal architecture of the human posterior colliculus. *Acta-otolaryngol. Suppl.*, 295:1-33, 1971.
- GOLDSTEIN LE, RASMUSSEN AM, BUNNEY BS, ROTH RH. The NMDA glycine site antagonist (+)-HA-966 selectively regulates conditioned stress-induced metabolic activation of the mesoprefrontal cortical dopamine but not serotonin systems: a behavioral, neuroendocrine, and neurochemical study in the rat. *J. Neurosci.*, 14:4937-50, 1994.
- GOLDSTEIN LE, RASMUSSEN AM, BUNNEY BS, ROTH RH. Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. *J. Neurosci.*, 16:4787-4798, 1996.
- GONZALEZ LE, JOB MO, DOYON WM. Tonic and phasic alteration in amygdala 5-HT, glutamate and GABA transmission after prefrontal cortex damage in rats. *Brain Res.*, 1005:154-63, 2004.
- GORMAN MJ. et al. Neuroanatomical hypothesis of panic disorder, revised. *Am. J. Psychiatry*, 157:493-505, 2000.
- GRACE AA. & ROSENKRANZ, J.A. Regulation of conditioned responses of basolateral amygdala neurons. *Physiol. Behav.*, 77:489-93, 2002.

- GRACE AA. Gating of information flow within the limbic system and the pathophysiology of schizophrenia. *Brain Res. Rev.*, 31:330-341, 2000.
- GRAEFF FG, GUIMARAES FS, DE ANDRADE TG, DEAKIN JF. Opposed regulation by dorsal raphe nucleus 5-HT pathways of two types of fear in the elevated T-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 53:171-177, 1996.
- GRAEFF FG. Brain defense systems and anxiety. In: BURROWS, G. D. ; ROTH, M. ; NOYES Jr, R. (ed.) *Handbook of Anxiety: The Neurobiology of Anxiety*. v. 13, pp. 307-354. Elsevier Science Publishers: Amsterdam, Holanda, 1990.
- GRAEFF FG. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviours and related emotions in mammals. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27:811-829, 1994.
- GRAEFF FG. On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology*, 163:467-476, 2002.
- GRAEFF FG. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 28:239-59, 2004.
- GRAY JA, MCNAUGHTON N. 2000. Fundamentals of the septo-hippocampal system. In: Gray JA, McNaughton N. *Neuropsychology of anxiety*. Oxford: Oxford University Press. p. 204-232.
- GREBA Q & KOKKINIDIS L. Peripheral and intraamygdalar administration of the dopamine D1 receptor antagonist SCH 23390 blocks fear-potentiated startle but not shock reactivity or the shock sensitization of acoustic startle. *Behav. Neurosci.*, 114:262-272, 2000.
- GREBA Q, GIFKINS A, KOKKINIDIS L. Inhibition of amygdaloid dopamine D2 receptors impairs emotional learning measured with fear-potentiated startle. *Brain Res.* 899:218-226, 2001.
- GUARRACI FA, FROHARDT RJ, KAPP BS. Amygdaloid D1 dopamine receptor involvement in Pavlovian fear conditioning. *Brain Res.*, 827:28-40, 1999a.
- GUARRACI FA, FROHARDT RJ, YOUNG SL, KAPP BS. A functional role for dopamine transmission in the amygdala during conditioned fear. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 877:732-736, 1999b.
- HARMER CJ & PHILLIPS GD. Enhanced dopamine efflux in the amygdala by a predictive, but not a non-predictive, stimulus: Facilitation by prior repeated D-amphetamine. *Neuroscience*, 90:119-130, 1999.
- HAUSSER M & CLARK BA. Tonic synaptic inhibition modulates neuronal output pattern and spatiotemporal synaptic integration. *Neuron*, 19:665-678, 1997.
- HESS WR & BRÜGGER M. Das subkortikale zentrum der affektiven abwehrreaktion. *Helv. Physiol. Pharmacol., Acta* 1: 33, 1943.
- HIND JE, GOLDBERG JM, GREENWOOD DD, ROSE JE. Some discharge characteristics of single neurons in the inferior colliculus of the cat. II. Timing of the discharges and observations on binaural stimulation. *J. Neurophysiol.*, 26:321-341, 1963.
- HODGES H, GREEN S, GLENN B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. *Psychopharmacology (Berl)*, 92:491-504, 1987
- HUFFMAN RF & HENSON OW. The descending auditory pathway and acousticomotor systems: connections with the inferior colliculus. *Brain Res. Rev.* 15:295-323, 1990.
- HURLEY KM, HERBERT H, MOGA MM, SAPER CB. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 308:249-76, 1991.
- INGLIS FM & MOGHADDAM B. Dopaminergic innervation of the amygdala is highly responsive to stress. *J. Neurochem.* 72:1088-94, 1999.

- INOUE T, KOYAMA T, YAMASHITA I. Effect of conditioned fear stress on serotonin metabolism in the rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 44:371-374, 1993.
- IWATA J & LEDOUX JE. Dissociation of associative and nonassociative concomitants of classical fear conditioning in the freely behaving rat. *Behav. Neurosci.*, 102:66-76, 1988.
- JACKSON ME & MOGHADDAM B. Amygdala regulation of nucleus accumbens dopamine output is governed by the prefrontal cortex. *J. Neurosci.*, 21:676-681, 2001.
- JACOBSON S & TROJANOWSKI J. Q. Amygdaloid projections to prefrontal granular cortex in rhesus monkey demonstrated with horseradish peroxidase. *Brain Res.*, 100:132-139, 1975.
- JAMES W. *Principios de psicología*. Fondo cultura económica: Ciudad Mexico, México, 1989.
- JASKIW GE & WEINBERGER DR. Ibotenic acid lesions of the medial prefrontal cortex augment swim-stress-induced locomotion. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 71:607-609, 1992.
- KAWAHARA H, YOSHIDA M, YOKOO H, NISHI M, TANAKA M. Psychological stress increases serotonin release in the amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. *Neurosci. Lett.*, 162:81-84, 1993.
- KEIM SR & SHEKHAR A. The effects of GABAA receptor blockade in the dorsomedial hypothalamic nucleus on corticotrophin (ACTH) and corticosterone secretion in male rats. *Brain Res.*, 739:46-51, 1996.
- KELLY D. *Anxiety and emotions*. Springfield: Illinois, Estados Unidos, 1980.
- KENNEY MJ. et al. The paraventricular nucleus: An important component of the central neurocircuitry regulating sympathetic nerve outflow. *Acta Physiol. Scand.*, 177:7-15, 2003.
- KILLCROSS S, ROBBINS TW, EVERITT BJ. Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature*, 388:377-380, 1997.
- KIM JJ & FANSELOW MS. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*, 256:675-677, 1992.
- KLUVER H & BUCY PC. "Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. *Am. J. Physiol.*, 119:352-353, 1937.
- KOLB B. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. *Brain Res. Rev.*, 8:65-98, 1984.
- KOLB B. Prefrontal cortex. In: Kolb, B. & Tees, R. C. *The cerebral cortex of the rat*. Bradford, MIT: Massachusetts, Estados Unidos, 1990.
- KRETTEK JE & PRICE JL. Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. *J. Comp. Neurol.*, 172:687-722, 1977.
- KRONER S. et al. Dopamine modulates excitability of basolateral amygdala neurons in vitro. *J. Neurophysiol.*, 93:1598-1610, 2005.
- LACROIX L, SPINELLI S, HEIDBREDE CA, FELDON J. Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. *Behav. Neurosci.*, 114:1119-1130, 2000.
- LAMONT EW & KOKKINIDIS L. Infusion of the dopamine D1 receptor antagonist SCH 23390 into the amygdala blocks fear expression in a potentiated startle paradigm. *Brain Res.*, 795:128-136, 1998.
- LAMPREA MR et al. The distribution of fos immunoreactivity in rat brain following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Res.*, 950:186-94, 2002.
- LE MOAL M & SIMON H. Mesocorticolimbic dopaminergic network and regulatory roles. *Physiol. Rev.*, 71:155-231, 1991.

- LEDOUX JE, CICCHETTI P, XAGORARIS A, ROMANSKI LM. The lateral amygdaloid nucleus: Sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J. Neurosci.*, 10:1062-1069; 1990a.
- LEDOUX JE, FARB C, RUGGIERO DA. Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *J. Neurosci.*, 10:1043-1054, 1990b.
- LEDOUX JE, FARB CR, MILNER TA. Ultrastructure and synaptic associations of auditory thalamo-amygdala projections in the rat. *Exp. Brain Res.*, 85:577-586, 1991.
- LEDOUX JE, IWATA J, CICCHETTI P, REIS DJ. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J. Neurosci.*, 8:2517-2519, 1988.
- LEDOUX JE, RUGGIERO DA, REIS DJ. Projections to the subcortical forebrain from anatomically defined regions of the medial geniculate body in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 242:182-213, 1985.
- LEDOUX JE. Emotions circuits in the brain. *Annu. Ver. Neurosci.*, 23:155-184, 2000.
- LEDOUX JE. The amygdala: contributions to fear and stress. *Sem. in Neurosci.*, 6:231-237, 1994.
- LEVEY AI et al. Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8861-8865, 1993.
- LIANG KC. Pretraining infusion of DSP-4 into the amygdala impaired retention in the inhibitory avoidance task: involvement of norepinephrine but not serotonin in memory facilitation. *Chin. J. Physiol.*, 41:223-233, 1998.
- LIKHTIK E, PELLETIER JG, PAZ R, PARÉ D. Prefrontal control of the amygdala. *J. Neurosci.* 25(2): 7429-7437, 2005.
- LINKE R, BRAUNE G, SCHWEGLER H. Differential projection of the posterior paralaminar thalamic nuclei to the amygdaloid complex in the rat. *Exp. Brain Res.*, 134:520-532, 2000.
- MA QP, YIN GF, AI MK, HAN JS. Serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the amygdala in the rat. *Neurosci. Lett.*, 134:21-24, 1991.
- MACEDO CE, CASTILHO VM, DE SOUZA E SILVA MA, BRANDAO ML. Dual 5-HT mechanisms in basolateral and central nuclei of amygdala in the regulation of the defensive behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Res. Bull.*, 59:189-195, 2002.
- MACLEAN PD. Psychosomatic disease and the "visceral brain": Recent developments bearing on the Papez theory of emotion. *Psychosom. Med.*, 11:338-353, 1949.
- MACLEAN PD. Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (visceral brain). *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 4:407-418, 1952.
- MAISONNETTE S, VILLELA C, CAROTTI AP, LANDEIRA-FERNANDEZ J. Microinfusion of nefazodone into the nucleus of the amygdala enhances defensive behavior induced by NMDA stimulation of the inferior colliculus. *Physiol. Behav.*, 70:243-247, 2000.
- MAISONNETTE SS, KAWASAKI MC, COIMBRA NC, BRANDAO ML. Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Res. Bull.*, 40:93-98, 1996.
- MARCHAND AR. Integration of cardiac responses to serial stimuli after Pavlovian conditioning in rats. *Anim. Learn. Behav.*, 30:132-142, 2002.

- MAREN S, YAP SA, GOOSENS KA. The amygdala is essential for the development of neuronal plasticity in the medial geniculate nucleus during auditory fear conditioning in rats. *J. Neurosci.*, 21:RC135, 2001.
- MAREN S. Auditory fear conditioning increases CS-elicited spike firing in lateral amygdala neurons even after extensive overtraining. *Eur. J. Neurosci.*, 12(11): 4047-4054, 2000.
- MARTIN DS & HAYWOOD JR. Hemodynamic responses to paraventricular nucleus disinhibition with bicuculline in conscious rats. *Am. J. Physiol.*, 265:H1727–H1733, 1993.
- MARTIN DS, RODRIGO MC, EGLAND MC, BARNES LU. Disinhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus increases mean circulatory filling pressure in conscious rats. *Brain Res.*, 756:106–113, 1997.
- MARTINEZ RC, DE OLIVEIRA AR, BRANDAO ML. Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 85:58-65, 2006.
- MCDONALD AJ & MASCAGNI F. Cortico-cortical and cortico-amygdaloid projections of the rat occipital cortex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study. *Neuroscience*, 71:37-54, 1996.
- MCDONALD AJ, MASCAGNI F, GUO L. Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience*, 71:55-75, 1996.
- MCDONALD AJ. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog. Neurobio.*, 55:257-332, 1998.
- MCDONALD AJ. Glutamate and aspartate immunoreactive neurons of the rat basolateral amygdala: Colocalization of excitatory amino acids and projections to the limbic circuit. *J. Comp. Neurol.*, 365:367–379, 1996.
- MCDONALD AJ. Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. *Neuroscience*, 44:1-14, 1991.
- MCDONALD AJ. Organization of amygdaloid projections to the mediodorsal thalamus and prefrontal cortex : a fluorescence retrograde transport study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 262: 46-58, 1987.
- MELO LL, CARDOSO SH, BRANDAO ML. Antiaversive action of benzodiazepines on escape behaviour induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Physiol. Behav.*, 51: 557-562, 1992.
- MERZENICH MM & REID MD. Representation of the cochlea within the inferior colliculus of the cat. *Brain Res.*, 77:397-415, 1974.
- MILLAN MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog. Neurobiol.*, 70, 83-244, 2003.
- MISERENDINO MJ, SANANES CB, MELIA KR, DAVIS M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdale. *Nature*, 345:716-718, 1990.
- MISSALE C, NASH SR, ROBINSON SW, JABER M, CARON MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.*, 78:189-225, 1998.
- MOGENSEN GJ, JONES DL, YIM CY. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog. Neurobiol.* 14:69-97, 1980.

- MOREST DK & OLIVER DL. The neuronal architecture of the inferior colliculus in the cat defining the functional anatomy of the auditory midbrain. *J. Comp. Neurol.*, 22:209-236, 1984.
- MOREST DK. The laminar structure of the inferior colliculus of the cat. *J. Anat.*, 98:611-630, 1964.
- MORGAN MA, ROMANSKI LM, LEDOUX JE. Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. *Neurosci. Lett*, 163:109-113, 1993.
- MORGAN MA. & LEDOUX JE. Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Behav. Neurosci.*, 109:681-688, 1995.
- MULLER J, CORODIMAS KP, FRIDEL Z, LEDOUX JE. Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli. *Behav. Neurosci.*, 111:683-91, 1997.
- NASHOLD BS JR, WILSON WP, SLAUGHTER DG. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J. Neurosurg.*, 30:14-24, 1969.
- NOBRE MJ, LOPES MG, BRANDAO ML. Defense reaction mediated by NMDA mechanisms in the inferior colliculus is modulated by GABAergic nigro-collicular pathways. *Brain Res.*, 999(1):124-131, 2004.
- NOBRE MJ, SANDNER G, BRANDAO ML. Enhancement of acoustic evoked potentials and impairment of startle reflex induced by reduction of GABAergic control of the neural substrates of aversion in the inferior colliculus. *Hear. Res.*, 184:82-90, 2003.
- OADES RD & HALLIDAY GM. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res. Rev.*, 12:117-165, 1987.
- OHUOHA DC, HYDE TM, KLEINMAN JE. The role of serotonin in schizophrenia: an overview of the nomenclature, distribution and alterations of serotonin receptors in the central nervous system. *Psychopharmacology*, 112:S5-S15, 1993.
- OKADA Y. Distribution of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the layers of the superior colliculus of the rabbit. *Brain Res.*, 75:362-366, 1974.
- OLIVEIRA LC, NOBRE MJ, BRANDAO ML, LANDEIRA-FERNANDEZ J. Role of amygdala in conditioned and unconditioned fear generated in the periaqueductal gray. *Neuroreport*, 15:2281-2285, 2004.
- PANDYA DN & KUYPERS HGJM. Cortico-cortical connections in the rhesus monkey. *Brain Res.*, 13:13-36, 1969.
- PAPEZ JW. A proposed mechanism of emotion. *Arch. Neurol. Psychiatry*, 38:725-743, 1937.
- PARÉ D & COLLINS DR. Neuronal correlates of fear in the lateral amygdala: Multiple extracellular recordings in conscious cats. *J. Neurosci.*, 20:2701-2710, 2000.
- PARÉ D & SMITH Y. The intercalated cell masses project to the central and medial nuclei of the amygdala in cats. *Neurosci.*, 57:1077-1090, 1993.
- PARÉ D, QUIRK GJ, LEDOUX JE. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J. Neurophysiol.*, 92:1-9, 2004.
- PASCOE JP & KAPP BS. Electrophysiological characteristics of amygdaloid central nucleus neurons during Pavlovian fear conditioning in the rabbit. *Behav. Brain Res.* 16:117-133, 1985.
- PAXINOS G & WATSON P. The rat brain in stereotaxic coordinates, 3a ed. Academic Press: San Diego, Estados Unidos, 1997.

- PAXINOS G & WATSON P. The rat brain in stereotaxic coordinates, 5 a ed. Academic Press: San Diego, Estados Unidos, 2005.
- PAZOS A & PALACIOS JM. Quantitative autographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptores. *Brain Res.*, 346:205-230, 1985.
- PENNARTZ CM, GROENEWEGEN HJ, LOPES DA SILVA FH. The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. *Prog. Neurobiol.*, 42:719-761, 1994.
- PEREZ-JARANAY JM & VIVES F. Electrophysiological study of the response of medial prefrontal cortex neurons to stimulation of the basolateral nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Res.*, 564:97-101, 1991.
- PEZZE MA & FELDON J. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Prog. Neurobiol.*, 74:301-230, 2004.
- PEZZE MA, BAST T, FELDON J. Significance of dopamine transmission in the rat medial prefrontal cortex for conditioned fear. *Cereb. Cortex*, 13:371-80, 2003.
- PHILLIPSON OT. The cytoarchitecture of the interfascicular nucleus and ventral tegmental area of Tsai in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 187:85-98, 1979.
- PITKANEN A, SAVANDER V, LEDOUX JE. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: An emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci.*, 20:517-523, 1997.
- POMPEIANO M, PALACIOS JM, MENGOD G. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 23:163-178, 1994.
- POWELL DA et al. Amygdala-prefrontal interactions and conditioned bradycardia in the rabbit. *Behav. Neurosci.*, 111:1056-1074, 1997.
- POWELL DA, MCLAUGHLIN J, CHURCHWELL J, ELGARICO T, PARKER A. Heart rate changes accompanying jaw movement Pavlovian conditioning in rabbits: Concomitant blood pressure adjustments and effects of peripheral autonomic blockade. *Integr. Physiol. Behav. Sci.*, 37:215-227, 2002.
- PRICE JL. Prefrontal cortical networks related to visceral function and mood. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 877:383-396, 1999.
- PRICE JL. Thalamus. In: PAXINOS, G. *The Rat Nervous System*. pp. 629-648. Academic Press: New York, Estados Unidos, 1995.
- QUIRK GJ & GEHLERT DR. Inhibition of the amygdala: key to pathological states? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 985:263-272, 2003.
- QUIRK GJ, LIKHTIK E, PELLETIER JG, PARE D. Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. *J. Neurosci.*, 23:8800-8807, 2003.
- QUIRK GJ, REPA C, LEDOUX JE. Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron*, 15:1029-1039, 1995.
- RAINNIE DG. Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. *Am. Physiol.*, 82:69-85, 1999.
- RAUCH SL, SHIN LM, WRIGHT CI. Neuroimaging studies of amygdala function in anxiety disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 985:389-410, 2003.
- REYNOLDS GP. Increased concentrations and lateral asymmetry of amygdala dopamine in schizophrenia. *Nature*, 305:527-529, 1983.

- RIZVI TA, ENNIS M, BEHBEHANI MM, SHIPLEY MT. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: Topography and reciprocity. *J. Comp. Neurol.*, 303:121–131, 1991.
- ROBBINS TW & EVERITT BJ. Limbic-striatal memory systems and drug addiction. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 78:625-636, 2002.
- ROBBINS TW, CADOR M, TAYLOR JR, EVERITT BJ. Limbic-striatal interactions in reward-related processes. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 13:155-162, 1989.
- ROBERTS RC & RIBAK CE. GABAergic neurons and axon terminals in the brainstem auditory nuclei of the gerbil. *J. Comp. Neurol.*, 258:267-280, 1987.
- ROSENKRANZ JA & GRACE AA. Cellular mechanisms of infralimbic and prelimbic prefrontal cortical inhibition and dopaminergic modulation of basolateral amygdala neurons in vivo. *J. Neurosci.*, 22:324-337, 2002a.
- ROSENKRANZ JA & GRACE AA. Dopamine attenuates prefrontal cortical suppression of sensory inputs to the basolateral amygdala of rats. *J. Neurosci.*, 21:4090–4103, 2001.
- ROSENKRANZ JA & GRACE AA. Dopamine-mediated modulation of odor-evoked amygdala potentials during pavlovian conditioning. *Nature*, 417:282-287, 2002b.
- ROSENKRANZ JA & GRACE AA. Modulation of basolateral amygdala neuronal firing and afferent drive by dopamine receptor activation in vivo. *J. Neurosci.*, 19:11027-11039, 1999.
- ROSENKRANZ JA, BUFFALARI DM, GRACE AA. Opposing influence of basolateral amygdala and footshock stimulation on neurons of the central amygdala. *Biol. Psychiatry*, 19; 2005 (no prelo).
- ROSENKRANZ JA, MOORE H, GRACE AA. The prefrontal cortex regulates lateral amygdala neuronal plasticity and responses to previously conditioned stimuli. *J. Neurosci.*, 23:11054-11064, 2003.
- ROTH GL, AITKIN LM, ANDERSEN RA, MERZENICH MM. Some features of the spatial organization of the central nucleus of the inferior colliculus of the cat. *J. Comp. Neurol.*, 138:661-680, 1978.
- ROYER S, MARTINA M, PARÉ D. An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *J. Neurosci.*, 19:10575–10583, 1999.
- RUETER LE & JACOBS BL. A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioural/environmental manipulations. *Brain Res.*, 739:57-69, 1996.
- SACCHETTI B, LORENZINI CA, BALDI E, TASSONI G, BUCHERELLI C. Auditory thalamus, dorsal hippocampus, basolateral amygdala, and perirhinal cortex role in the consolidation of conditioned freezing to context and to acoustic conditioned stimulus in the rat. *J. Neurosci.*, 19:9570-9578, 1999.
- SADIKOT AF & PARENT A. The monoaminergic innervation of the amygdala in the squirrel monkey: an immunohistochemical study. *Neurosci.*, 36:431-447, 1990.
- SAHA S, BATTEN TF, HENDERSON Z. A GABAergic projection from the central nucleus of the amygdala to the nucleus of the solitary tract: A combined anterograde tracing and electron microscopic immunohistochemical study. *Neuroscience*, 99:613– 626, 2000.
- SAHA S, HENDERSON Z, BATTEN TF. Somatostatin immunoreactivity in axon terminals in rat nucleus tractus solitarius arising from central nucleus of amygdala: Coexistence with GABA and postsynaptic expression of sst2A receptor. *J. Chem. Neuroanat.*, 24:1–13, 2002.

- SCHREIBER R & DE VRY J. 5-HT_{1A} receptor ligands in animal models of anxiety, impulsivity and depression: multiple mechanisms of action? *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 17:87-104, 1993.
- SHEKHAR A & DIMICCO JA. Defense reaction elicited by injection of GABA antagonists and synthesis inhibitors into the posterior hypothalamus in rats. *Neuropharmacol.*, 26:407–417, 1987.
- SHEKHAR A, HINGTGEN JN, DIMICCO JA. Selective enhancement of shock avoidance responding elicited by GABA blockade in the posterior hypothalamus of rats. *Brain Res.*, 420:118–128, 1987.
- SHEKHAR A. GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test. I. Behavioral measures. *Brain Res.*, 627:9–16, 1993.
- SOLTIS RP & DIMICCO JA. GABA_A and excitatory amino acid receptors in dorsomedial hypothalamus and heart rate in rats. *Am. J. Physiol.*, 260(1 pt2):R13–R20, 1991.
- SOTRES-BAYON F, BUSH DE, LEDOUX JE. Emotional perseveration: an update on prefrontal-amygdala interactions in fear extinction. *Learn. Mem.*, 11:525-35, 2004.
- STEIN C, DAVIDOWA H, ALBRECHT D. 5-HT(1A) receptor-mediated inhibition and 5-HT(2) as well as 5-HT(3) receptor-mediated excitation in different subdivisions of the rat Stuart AM, Mitchell IJ, Slater P, Unwin HL, Crossman AR. A semi-quantitative atlas of 5-hydroxytryptamine-1 receptors in the primate brain. *Neuroscience*, 18:619-639, 1986.
- STUTZMANN GE & LEDOUX JE. GABAergic antagonists block the inhibitory effects of serotonin in lateral amygdala: a mechanism for modulation of sensory inputs related to fear conditioning. *J. Neurosci.*, 19:1-4, 1999.
- SULLIVAN RM & GRATTON A. Prefrontal cortical regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function in the rat and implications for psychopathology: side matters. *Psychoneuroendocrinology*, 27:99-114, 2002.
- SUZUKI T, ISHIGOOKA J, WATANABE S, MIYAOKA H. Enhancement of delayed release of dopamine in the amygdala induced by conditioned fear stress in methamphetamine-sensitized rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 435:59-65, 2002.
- TERREBERRY RR & NEAFSEY EJ. Rat medial frontal cortex: a visceral motor region with a direct projection to the solitary nucleus. *Brain Res.*, 278:245-249, 1983.
- TERREBERRY RR & NEAFSEY EJ. The rat medial frontal cortex projects directly to autonomic regions of the brainstem. *Brain Res. Bull.*, 19:639-649, 1987.
- THIERRY AM, TASSIN JP, BLANC G, GLOWINSKI J. Selective activation of the mesocortical DA system by stress. *Nature*, 263:242-244, 1976.
- THOMPSON GC, CORTEZ AM, LAM DM. Localization of GABA immunoreactivity in the auditory brainstem of guinea pigs. *Brain Res.*, 339:119-122, 1985.
- TRONCOSO AC, CIRILO-JUNIOR G, SANDNER G, BRANDAO ML. Signaled two-way avoidance learning using electrical stimulation of the inferior colliculus as negative reinforcement: effects of visual and auditory cues as warning stimuli. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31:391-398, 1998.
- TRONCOSO AC, OSAKI MY, MASSON S, BORELLI KG, BRANDAO ML. Apomorphine enhances conditioned responses induced by aversive stimulation of the inferior colliculus. *Neuropsychopharmacology*, 28:284-291, 2003.
- TURNER BH & HERKENHAM M. Thalamoamygdaloid projections in the rat: a test of the amygdala's role in sensory processing. *J. Comp. Neurol.*, 313:295-325, 1991.

- UNGERSTEDT U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 367:1-48, 1971.
- VARNAS K, HALL H, BONAVENTURE P, SEDVALL G. Autoradiographic mapping of 5-HT(1B) and 5-HT(1D) receptors in the post mortem human brain using [(3)H]GR 125743. *Brain Res.*, 915:47-57, 2001.
- VAZDARJANOVA A, CAHILL L, MCGAUGH JL. Disrupting basolateral amygdala function impairs Veening JG, Swanson LW, Sawchenko PE. The organization of projections from the central nucleus of the amygdala to brainstem sites involved in central autonomic study. *Brain Res.*, 303:337-357, 1984.
- VERTES RP, FORTIN WJ, CRANE AM. Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 407:555-582, 1999.
- VERTES RP. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 313:643-668, 1991.
- VIANA MB, GRAEFF FG, LOSCHMANN PA. Kainate microinjection into the dorsal raphe nucleus induces 5-HT release in the amygdala and periaqueductal gray. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 58:167-172, 1997.
- VOLKOW ND et al. Relationship between blockade of dopamine transporters by oral methylphenidate and the increases in extracellular dopamine: therapeutic implications. *Synapse*, 43:181-187, 2002.
- WALLACE DM, MAGNUSON DJ, GRAY TS. Organization of amygdaloid projections to brainstem dopaminergic, noradrenergic, and adrenergic cell groups in the rat. *Brain Res. Bull.*, 28:447-454, 1992.
- WEBSTER, W.R. Auditory System. In: PAXINOS, G. *Rat Nervous System*. pp. 797-832. Academic Press: New York, Estados Unidos. 1995.
- WIBLE JH JR, LUFT FC, DIMICCO JA. Hypothalamic GABA suppresses sympathetic outflow to the cardiovascular system. *Am. J. Physiol.*, 254:R680 –R687, 1988.
- WILENSKY AE, SCHAFE GE, LEDOUX JE. Functional inactivation of the amygdala before but not after auditory fear conditioning prevents memory formation. *J. Neurosci.*, 19:RC48, 1999.
- YOSHIOKA M, MATSUMOTO M, TOGASHI H, SAITO H. Effect of conditioned fear stress on dopamine release in the prefrontal cortex. *Neurosci. Lett.*, 209:201-203, 1996.
- YOUNG AMJ & RESS KR. Dopamine release in the amygdaloid complex of the rat, studied by brain microdialysis. *Neurosci. Lett.*, 249:49-52, 1998.
- ZANGROSSI H JR, VIANA MB, GRAEFF FG. Anxiolytic effect of intra-amygdala injection of midazolam and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in the elevated T-maze. *Eur. J. Pharmacol.*, 369:267-270, 1999.
- ZANGROSSI HJR & GRAEFF FG. Behavioral effects of intra-amygdala injections of GABA and 5-HT acting drugs in the elevated plus-maze. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27:2453-2456, 1994.
- ZBROZYNA AW & WESTWOOD DM. Stimulation in prefrontal cortex inhibits conditioned increase in blood pressure and avoidance bar pressing in rats. *Physiol. Behav.*, 49:705-708, 1991.
- ZILLIES K & Wree A. Cortex: a real and laminar structure. In: PAXINOS, G. *The Rat Nervous System*. pp. 649-688. Academic Press: New York, Estados Unidos. 1995.
- ZILLIES K. Cortex. In: PAXINOS, G. *The Human Nervous System*. pp. 757-802. Academic Press: New York, Estados Unidos. 1990.

Apêndice

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](#)