

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto**  
**Departamento de Psicologia e Educação**  
**Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia**

**Distribuição da proteína Fos no encéfalo durante estados aversivos  
induzidos pela inibição GABAérgica na substância cinzenta periaquedutal  
dorsolateral e no colículo inferior de ratos**

*Karina Genaro Borelli*

**Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, como  
parte das exigências para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências, área de Psicobiologia.**

**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**

**Distribuição da proteína Fos no encéfalo durante estados aversivos  
induzidos pela inibição GABAérgica na substância cinzenta periaquedutal  
dorsolateral e no colículo inferior de ratos**

*Karina Genaro Borelli*

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, como  
parte das exigências para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências, área de Psicobiologia.

**Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão**

**Ribeirão Preto**

**– 2006 –**

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

### FICHA CATALOGRÁFICA

Borelli, Karina Genaro

Distribuição da proteína Fos no encéfalo durante estados aversivos induzidos pela inibição GABAérgica na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral e no colículo inferior de ratos

**100** p.; il.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Brandão, Marcus Lira.

1. Medo. 2. Proteína Fos. 3. Congelamento. 4. Fuga. 5. GABA.

*À minha Mãe, minha Mestre, que enriquece  
minha vida e meu saber, dedico, amorosamente,  
este trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao *Professor Marcus Lira Brandão*, pela contribuição valiosa à minha formação científica, pela confiança e amizade e pelo incentivo constante que me ensinou a não esmorecer.

Aos professores *Francisco Silveira Guimarães, Norberto Cysne Coimbra e Marisol Lamprea*, pelos conhecimentos que me foram transmitidos para desenvolver e aprimorar deste trabalho.

Aos professores *Jackson Cioni Bittencourt, Newton Sabino Canteras, Ricardo Luiz Nunes de Souza e Christie Ramos Andrade Leite Panissi* pela atenção dispensada na leitura desta tese.

À professora *Sylvia Bastos*, pela revisão dos originais e, principalmente, por transmitir seu conhecimento de maneira muito agradável.

À *Cristina Ferreira Netto*, pela amizade e fundamental colaboração para o desenvolvimento deste trabalho, além das diversas sugestões apropriadas.

Ao *Júnior*, meu marido, namorado, verdadeiro companheiro que comemora, com entusiasmo, minhas pequenas e grandes conquistas, por sempre me incentivar e contribuir muito para a realização dos meus objetivos profissionais e pessoais.

Às famílias *Di Sicco, Genaro e Borelli*, pelo apoio, incentivo e carinho.

À amiga-irmã *Regina Cláudia Barbosa da Silva*, pelo entusiasmo e encorajamento constantes e que, mesmo distante, se faz presente em todos os momentos da minha vida e da minha carreira.

Ao *Lucas Albrechet* que, aos poucos, tornou-se amigo de verdade e, entre cervejinhas e capuccinos, discutiu comigo tantas questões importantes.

À *Raquel Chacon Ruiz Martinez*, pela amizade e pela sua interminável disposição e alegria em cada dia de trabalho.

A todos os colegas da Psicobiologia, especialmente *Adriano, Amanda, Carlos Eduardo, Carol Gárgaro, Cidinha, Júlia, Luciana, Maria Cecília, Milene e Sueli*, pelo apoio direto e indireto que me ofereceram durante a realização deste trabalho.

À *Cláudia e Júlio*, da Clic Foto e Vídeo, pelos serviços prestados.

À *Renata B. Vicentini*, secretária da Psicobiologia, pelo auxílio competente e divertido.

À *CAPES*, pelo apoio financeiro.

A *Deus*.

## RESUMO

A microinjeção do antagonista de receptores GABA-A bicuculina ou do inibidor da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD), a semicarbazida, na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl) ou no colículo inferior (CI) produz comportamentos defensivos, que mimetizam os efeitos da estimulação elétrica nessas estruturas do teto mesencefálico. Enquanto a bicuculina causa uma intensa ativação comportamental caracterizada por respostas de fuga, o comportamento predominante induzido pela semicarbazida é o congelamento. Mecanismos GABAérgicos parecem exercer, portanto, uma inibição tônica no substrato neural responsável pela geração e elaboração de respostas defensivas no teto mesencefálico. Vários estudos que utilizam técnicas eletrofisiológicas, psicofarmacológicas e imunoistoquímicas foram desenvolvidos, nas últimas décadas, com o intuito de esclarecer o funcionamento dos substratos neurais envolvidos na elaboração do comportamento defensivo. Dentre as técnicas de imunoistoquímica, destaca-se o mapeamento da proteína Fos no estudo da organização neural do processamento e da expressão da reação de defesa. No presente trabalho, a imunorreatividade à proteína Fos foi utilizada com o objetivo de avaliar as estruturas ativadas, no encéfalo de ratos, pela indução dos comportamentos de congelamento e de fuga. Os resultados obtidos mostraram que a resposta de congelamento induzida pela injeção de semicarbazida na SCPdl aumentou a expressão de Fos no núcleo laterodorsal do tálamo (LD) e na coluna ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal (SCPvl). Por outro lado, a injeção de semicarbazida no CI aumentou a expressão de Fos apenas na coluna dorsomedial da substância cinzenta periaquedutal (SCPdm). A fuga induzida pela administração de bicuculina na SCPdl ou no CI promoveu uma intensa ativação comportamental e ampla distribuição de neurônios imunorreativos à proteína Fos. Portanto, os resultados mostraram uma segregação neural dos circuitos neurais subjacentes ao comportamento de congelamento e fuga induzidos pela redução do controle GABAérgico na SCPdl ou no CI. O processo de aquisição da informação aversiva, durante o congelamento, provavelmente envolve o núcleo LD e a coluna dorsomedial da SCP como estações-relés para centros encefálicos superiores, enquanto a fuga ativa, de maneira generalizada, as estruturas encefálicas envolvidas com o comportamento emocional.

## **ABSTRACT**

Microinjections of the GABA-A receptor antagonist bicuculline or the inhibitor of the glutamic acid decarboxylase (GAD) semicarbazide into the dorsolateral periaqueductal gray (dlPAG) or inferior colliculus (IC) produce defensive behaviors similar to those reported with electrical stimulation of these structures in the midbrain tectum. Bicuculline injections induce an intense behavioral activation characterized by escape response, while the predominant behavior caused by semicarbazide is freezing. GABAergic mechanisms exert a tonic control over the neural substrates responsible for the generation and elaboration of defensive responses in the midbrain tectum. Several studies using electrophysiological, psychopharmacological and immunohistochemical techniques have been developed in the last decade with the purpose of clarifying the function of neural substrates involved in defensive behaviors. The mapping of Fos protein is the most used immunohistochemical technique for disclosing the neural organization of the processing and expression of the defense reaction. In the present study, the Fos immunoreactivity was used order to map the encephalic structures of rats activated during the freezing or escape response. The results showed that freezing induced by semicarbazide microinjections into the dlPAG increased Fos expression in the laterodorsal nucleus of the thalamus (LD) and ventrolateral periaqueductal gray (vlPAG). On the other hand, semicarbazide microinjections into the IC increased Fos immunoreactivity only in the dorsomedial periaqueductal gray (dmPAG). Bicuculline microinjections into the dlPAG or IC elicited an intense behavioral activation and a widespread Fos labeling in the brain. Therefore, the present data support the notion that there is a neural segregation for freezing and escape behaviors induced by reduction of the GABAergic control in the dlPAG or IC. The process of information acquisition during freezing behavior probably involves the LD and dmPAG, which appear to be important relay stations to higher brain centers. All structures involved with the emotional behavior are recruited for the expression of the escape behavior.



## SUMÁRIO

ABREVIATURAS	10
INTRODUÇÃO	11
Reação de defesa	11
Substrato neural da defesa	14
Substância cinzenta periaquedutal	16
Colículo inferior	19
Neurotransmissão GABAérgica	22
Marcação da ativação neural – Proteína Fos	23
OBJETIVOS	28
EXPERIMENTO I - Distribuição da proteína Fos no encéfalo de ratos submetidos à estimulação química da SCPdl	30
Animais	31
Cirurgia	31
Microinjeções de drogas	32
Drogas	33
Arena circular	33
Procedimento experimental	33
Histologia	34
Protocolo de imunistoquímica para detecção da proteína Fos	34
Montagem das lâminas	36
Análise quantitativa da expressão da proteína Fos	36
Análise estatística	37
RESULTADOS	39
Localização dos sítios de estimulação química na SCPdl	40
Efeitos comportamentais	41

Expressão da proteína Fos _____	42
DISCUSSÃO _____	50
EXPERIMENTO II - Distribuição da proteína Fos no encéfalo de ratos submetidos à estimulação química do CI _____	56
MATERIAIS E MÉTODOS _____	57
RESULTADOS _____	58
Localização dos sítios de estimulação química no CI _____	59
Efeitos comportamentais _____	60
Expressão de proteína Fos _____	61
DISCUSSÃO _____	69
CONCLUSÕES _____	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	77
ANEXOS _____	97

## **ABREVIATURAS**

**AHC** - hipotálamo anterior  
**BIC** - bicuculina  
**BLA** - núcleo basolateral da amígdala  
**CeA** - núcleo central da amígdala  
**Cg** - córtex cingulado  
**CI** - núcleo central do colículo inferior  
**CnF** - núcleo cuneiforme  
**CS** - colículo superior  
**DMH** - hipotálamo dorsomedial  
**DRN** - núcleo dorsal da rafe  
**Ent** - córtex entorrinal  
**GABA** - ácido gama-amino butírico  
**GAD** - descarboxilase do ácido glutâmico  
**HM** - hipotálamo medial  
**LC** - *locus coeruleus*  
**LD** - núcleo laterodorsal do tálamo  
**LH** - área hipotalâmica lateral  
**MGD** - núcleo geniculado medial, parte dorsal  
**MGM** - núcleo geniculado medial, parte medial  
**MGV** - núcleo geniculado medial, parte ventral  
**MnR** - núcleo mediano da rafe  
**PaH** - núcleo paraventricular do hipotálamo  
**PEA** - potencial evocado auditivo  
**PMD** - núcleo pré-mamilar dorsal  
**PrL** - córtex pré-límbico  
**SCB** - semicarbazida  
**SCP** - substância cinzenta periaquedutal  
**SCPD** - substância cinzenta periaquedutal dorsal  
**SCPdl** - substância cinzenta periaquedutal dorsolateral  
**SCPdm** - substância cinzenta periaquedutal dorsomedial  
**SCPl** - substância cinzenta periaquedutal lateral  
**SCPvl** - substância cinzenta periaquedutal ventrolateral  
**SEA** - sistema encefálico aversivo  
**SNC** - sistema nervoso central  
**VMHdm** - hipotálamo ventromedial, parte dorsomedial

## **INTRODUÇÃO**

---

### ***Reação de defesa***

O estudo do comportamento de várias espécies animais tem servido de base para a compreensão das emoções humanas desde o trabalho pioneiro de Charles Darwin (1872). Estados motivacionais, tais como raiva e medo, são vivenciados, subjetivamente, como necessidades ou urgências que motivam o desempenho comportamental. Geralmente, os comportamentos gerados por esses estados ativados por fatores externos e internos são destinados a proteger o indivíduo ou animal e garantir a preservação da espécie a que ele pertence.

Processos emocionais como o medo e a ansiedade originam-se das reações de defesa dos animais frente a estímulos ameaçadores. A exposição de uma presa a seu predador, por exemplo, constitui um modelo etoexperimental para o estudo de tais comportamentos emocionais. O padrão comportamental de defesa anti-predatória – congelamento, fuga e ataque defensivo – é muito similar entre as espécies animais (Edmunds, 1974). Essas estratégias relacionam-se a diferentes níveis de ameaça com que o animal se defronta no ambiente (Tabela 1).

A separação categórica do medo e da ansiedade foi demonstrada por meio de uma análise detalhada das respostas defensivas, realizada por Blanchard e Blanchard (1988). Estes pesquisadores desenvolveram um aparelho para análise comportamental que consistia de um alojamento artificial para ratos, idealizado de acordo com o seu ambiente natural – o *Visible Burrow System*. Constituído por uma arena conectada a um sistema de túneis, o equipamento podia abrigar uma colônia de ratos selvagens. A arena permitia tanto a introdução de comida e água para os ratos quanto a apresentação do estímulo aversivo, o gato. Já os túneis, iluminados por luz infravermelha, possibilitavam que o comportamento dos animais fosse constantemente observado. Com tal modelo, os pesquisadores determinaram padrões de respostas defensivas a diferentes estímulos aversivos.

A apresentação do gato produzia uma seqüência característica de respostas defensivas imediatas de luta e fuga da arena para os túneis, onde ocorria inibição comportamental e congelamento que persistiam após a retirada do gato. Decorrido um tempo após a apresentação do gato, os animais voltavam a explorar a mesma arena, de modo muito cauteloso, num comportamento denominado avaliação de risco (*risk assessment*). O padrão observado após a remoção do gato também foi induzido com o odor do felino. Nesse caso, entretanto, a fase inicial de imobilidade era menor. Concluiu-se que, em roedores, o comportamento anti-predatório é organizado em função da viabilidade de fuga e da distância entre o predador e a presa. A fuga, quando possível, é a resposta predominante, por outro lado, se não houver uma distância segura para a presa, a ausência completa de seus movimentos – condição conhecida como congelamento – reduz a probabilidade de ser reconhecido pelo predador. A intensidade da reação aumenta quando a distância entre os animais diminui. Na situação de confronto real, ocorrem respostas de ameaça defensiva (vocalizações e exposição dos dentes) e ataque explosivo (saltos e mordida na área do focinho do predador) seguido, imediatamente, pela fuga (Blanchard & Blanchard, 1988). Tais respostas são acompanhadas por alterações autonômicas, neuroendócrinas e antinocicepção (Hilton, 1982; Bolles & Fanselow, 1980).

Dessa forma, duas dimensões comportamentais são associadas à distância defensiva, uma vez que evitar a ameaça denota medo e, por outro lado, a aproximação do estímulo ameaçador pressupõe ansiedade; ambas operam uma formação cognitiva interna referente à intensidade da ameaça percebida. Portanto, a natureza das respostas defensivas em animais expostos a situações ameaçadoras depende da distância e da intensidade do estímulo aversivo, as quais ativam substratos neurais específicos (McNaughton & Corr, 2004). Assim, o estudo das bases neurais das estratégias de defesa levaria a um conhecimento mais aprofundado da neurobiologia da ansiedade.

**Tabela 1.** Níveis de ameaça, comportamentos apresentados, integração neural e emoções associadas. Adaptação de Gray & McNaughton, 2000.

<b>Nível de ameaça</b>	<b>Estratégia comportamental</b>	<b>Substrato neural</b>	<b>Emoção</b>
Perigo potencial (aproximar)	Avaliação de risco/ inibição comportamental	Região posterior do giro do cíngulo/ sistema septo-hipocampal	Ansiedade
Perigo potencial (evitar)	Esquiva	Região anterior do giro do cíngulo/ complexo amigdalóide	Ansiedade
Perigo distal	Congelamento/ inibição do ataque	Hipotálamo medial	Medo
Perigo proximal	Congelamento/fuga/ luta	Substância cinzenta periaquedutal	Raiva/ pânico

### ***Substrato neural da defesa***

Os estados aversivos, os comportamentos defensivos e as alterações fisiológicas que os acompanham estão organizados no sistema nervoso central e apresentam características que parecem persistir ao longo da escala evolutiva (Panksepp, 1990). Nesse contexto, muitos estudos têm sido realizados com o intuito de identificar as estruturas e os mecanismos neurais envolvidos na aquisição de informações aversivas e na expressão de diferentes tipos de comportamentos defensivos.

A técnica de estimulação elétrica de áreas subcorticais permitiu a identificação de algumas estruturas encefálicas relacionadas à organização de respostas defensivas. Os estudos clássicos de Hess e Brüger (1943) e o de Fernandez de Molina e Hunsperger (1959) foram os primeiros a indicar que a estimulação elétrica da região perifornical do hipotálamo e da substância cinzenta periaquedutal (SCP) de gatos acordados provocava uma seqüência de comportamentos defensivos similares aos apresentados em resposta a situações de perigo ou a

estímulos aversivos ambientais. Vários estudos com lesão de tais estruturas são condizentes com esses achados (LeDoux *et al.*, 1988; Canteras *et al.*, 1997; Walker & Davis, 1997; Vianna *et al.*, 2001). Trabalhos posteriores evidenciaram que várias outras estruturas encefálicas pareciam estar envolvidas na regulação de diferentes aspectos da reação de defesa. Assim, dois importantes sistemas relacionados às bases neuroanatômicas da ansiedade foram propostos: o sistema encefálico aversivo (SEA; Graeff, 1981) e o sistema de inibição comportamental (SIC; Gray, 1982).

O sistema encefálico aversivo seria responsável pela elaboração e coordenação das respostas defensivas nos animais. Foi observado que a ativação de estruturas como o hipotálamo medial (HM), a amígdala (AM) e a SCP, evoca um padrão similar de respostas defensivas. Posteriormente, Brandão e colaboradores (1988, 1994) sugeriram que, além dessas estruturas, o colículo inferior (CI) e as camadas profundas do colículo superior (CS) também constituiriam o substrato neural da aversão. Anatomicamente, vários experimentos têm demonstrado que o SEA possui um padrão altamente complexo de interconexões com outras estruturas encefálicas que participam da organização neural do comportamento emocional.

O sistema encefálico aversivo estabelece contato anátomo-funcional com o sistema septo-hipocampal, tálamo intralaminar e córtex pré-frontal (Gray & McNaughton, 2000). Essas últimas estruturas constituem o sistema de inibição comportamental, baseado na supressão do comportamento que os animais apresentam em situações de perigo, com o objetivo de avaliar o grau de ameaça durante uma exploração cautelosa do ambiente (*risk assessment*).

Resumidamente, enquanto o sistema encefálico aversivo envolve estruturas relacionadas com estratégias defensivas observadas em situações de perigo iminente, o sistema de inibição comportamental é ativado em situações conflitantes, como aproximar-se e



evitar o perigo. Tais sistemas atuam de modo complementar, regulando estratégias comportamentais distintas de medo e/ou de ansiedade (Tabela 1).

Duas estruturas do SEA, a SCPD e o CI, constituem-se alvos desse estudo, desenvolvido para a identificação da circuitaria neural recrutada na geração e na elaboração de comportamento defensivo.

### ***Substância cinzenta periaquedutal***

A SCP refere-se à região do mesencéfalo que circunda o aqueduto cerebral. A região mais rostral da SCP está logo abaixo do nível de corte da comissura posterior e a região mais caudal imediatamente acima do véu medular superior. Sua posição anatômica, entre o rombencéfalo e o diencéfalo, proporciona uma localização privilegiada, por participar de vários sistemas sensoriais ascendentes e de trajetos sensoriais descendentes. Tal condição sugere que essa estrutura está interligada a um grande número de redes neurais que coordenam estratégias distintas para enfrentar diferentes tipos de ameaças, estímulos dolorosos e estressantes (Beitz, 1985; Behbehani, 1995; Mantyh, 1982).

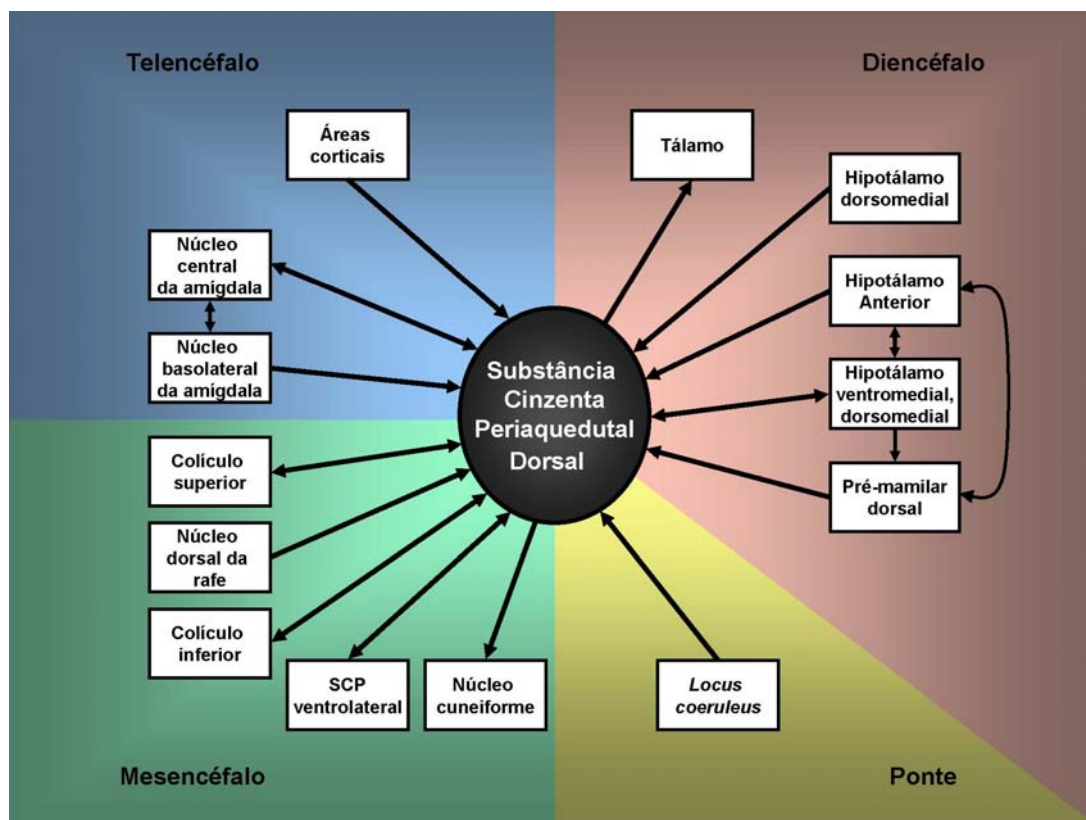
Utilizando critérios morfológicos, a SCP do rato foi dividida, inicialmente, em quatro sub-regiões: medial, dorsal, dorsolateral e ventrolateral (Beitz, 1985). Posteriormente, Carrive (1993) e Bandler e Shipley (1994) propuseram a divisão da SCP em quatro colunas longitudinais que se estendem ao longo do eixo rostrocaudal: colunas dorsomedial (SCPdm), dorsolateral (SCPdl), lateral (SCPl) e ventrolateral (SCPvl).

A utilização de técnicas de imunistoquímica revelou a existência de uma grande diversidade de neurotransmissores na SCP. Neurônios imunorreativos às enzimas da síntese do glutamato (Clements *et al.*, 1987), do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA; Barbaresi & Manfrini, 1988), do aspartato (Clements *et al.*, 1987), da acetilcolina (Ruiz-Torner *et al.*, 2001) e da neurotensina (Shipley *et al.*, 1987), foram encontrados nas sub-regiões da SCP.

Entretanto, a coluna dorsolateral apresenta também neurônios imunorreativos à enzima sintase do óxido nítrico (Onstott *et al.*, 1993; De Oliveira *et al.*, 2001). Acreditava-se que a coluna ventrolateral ao aqueduto era a única que possuía neurônios imunorreativos à serotonina (Clements *et al.*, 1985), mas dados neuromorfológicos recentes mostraram a presença desse neurotransmissor também nos aspectos dorsais da SCP (Coimbra & Brandão, 1997; Coimbra *et al.*, 2006).

As colunas da SCP são interconectadas e, além dos neurônios de saída há uma rede intrínseca de conexões envolvidas na ativação e inibição de cada coluna. Vários estudos demonstraram que a SCP também possui conexões recíprocas com as demais estruturas do SEA, como o colículo superior (Beitz *et al.*, 1986; Redgrave & Dean, 1991; Eichenberger *et al.*, 2002), o colículo inferior (Meninger *et al.*, 1986), o hipotálamo (Shiple *et al.*, 1991; Veening *et al.*, 1991) e o complexo amigdalóide (Rizvi *et al.*, 1991; Shiple *et al.*, 1991). A SCP recebe aferências e envia eferências a diferentes áreas motoras, sensoriais, autonômicas e límbicas (Beitz, 1990; Bandler *et al.*, 1991; Canteras & Swanson, 1992; Canteras, 2002; Sowards & Sowards, 2002). As principais conexões anatômicas da SCP estão ilustradas na figura 1.

A SCP é a estrutura mais caudal da SEA, a partir da qual um padrão completo de comportamentos defensivos pode ser observado. Estudos mostram que lesão da amígdala ou do hipotálamo não afeta a reação de defesa induzida pela estimulação da SCP, enquanto a lesão, nessa última, resulta no bloqueio dos efeitos provocados pela estimulação da AM e do HM. Dessa forma, a SCP tem sido considerada como a via final comum do repertório comportamental de defesa (Bandler, 1988; Graeff, 1993).



**Figura 1.** Principais conexões anatômicas da substância cinzenta periaquedutal dorsal na organização do medo.

Evidências importantes referentes ao envolvimento da SCP com o medo e a ansiedade também foram obtidas a partir de relatos de pacientes submetidos à estimulação dessa estrutura. A estimulação elétrica da SCP de humanos produz sentimentos de medo intenso, pânico, terror, sensação de morte iminente, aumento das frequências cardíaca e respiratória, sudorese e piloereção (Nashold *et al.*, 1969).

Em ratos, estudos sobre a neurobiologia do medo e da ansiedade têm mostrado que o aumento gradual na intensidade de estimulação elétrica aplicada na SCPD induz, de maneira hierárquica, uma série de respostas defensivas características, tais como alerta, congelamento e fuga (Coimbra & Brandão, 1993; Brandão *et al.*, 1999; Coimbra *et al.*, 2000; Borelli *et al.*, 2004). Em geral, essas respostas são acompanhadas por antinocicepção (Leão-Borges *et al.*, 1988; Coimbra *et al.*, 1992; Coimbra & Brandão, 1997; Fendt & Fanselow, 1999; Castilho & Brandão, 2001), alterações na pressão arterial média, nas frequências cardíaca e respiratória e

por outras alterações autonômicas, tais como piloereção, micção e defecação (Fendt & Fanselow, 1999; Vargas, 2000). A administração de antagonistas GABAérgicos – como a bicuculina e a picrotoxina – e do inibidor da síntese do GABA – a semicarbazida –, na SCPD, produz reação de defesa similar àquela observada com a estimulação elétrica dessa estrutura (Brandão *et al.*, 1982, 1986, 2005). Por outro lado, drogas que facilitam a neurotransmissão GABAérgica deprimem as respostas defensivas da estimulação do substrato neural que organiza o medo na SCPD (Graeff, 1981, Graeff *et al.*, 1991; Coimbra & Brandão, 1993; Brandão *et al.*, 1999).

### ***Colículo inferior***

O colículo inferior (CI) é a maior estrutura mesencefálica criticamente envolvida no processamento das informações aferentes e eferentes no sistema auditivo (Oliver & Huerta, 1992). Em ratos, o colículo inferior está dividido de acordo com as diferenças morfológicas de seus tipos celulares em três principais sub-regiões: núcleo central (CIC), núcleo dorsal (DCI) e o núcleo externo (ECI) (Morest & Oliver 1984; Oliver & Morest, 1984; Faye-Lund & Osen, 1985). Os neurônios de cada subnúcleo diferem na sua citoarquitetura e na resposta a estímulos acústicos e a outros estímulos sensoriais.

Os neurônios do CIC apresentam distribuição laminar que reflete sua organização tonotópica, isto é, estímulos acústicos de diferentes frequências ativam regiões específicas (Rose *et al.*, 1963; Aitkin *et al.*, 1986; Oliver & Morest, 1984; Merchan *et al.*, 2005). O CIC recebe a maior ascendência de projeções auditivas diretas, principalmente do núcleo coclear dorsal contralateral e ventral, e de projeções indiretas do complexo olivar superior, do núcleo periolivar e do núcleo do leminisco lateral (Oliver & Huerta, 1992). Em contraste, o DCI e o ECI recebem numerosas projeções intrínsecas do próprio CIC, pouca ou nenhuma

ascendência do complexo olivar superior e algumas projeções do núcleo coclear contralateral (Coleman & Clerici, 1987; Wynne *et al.*, 1995).

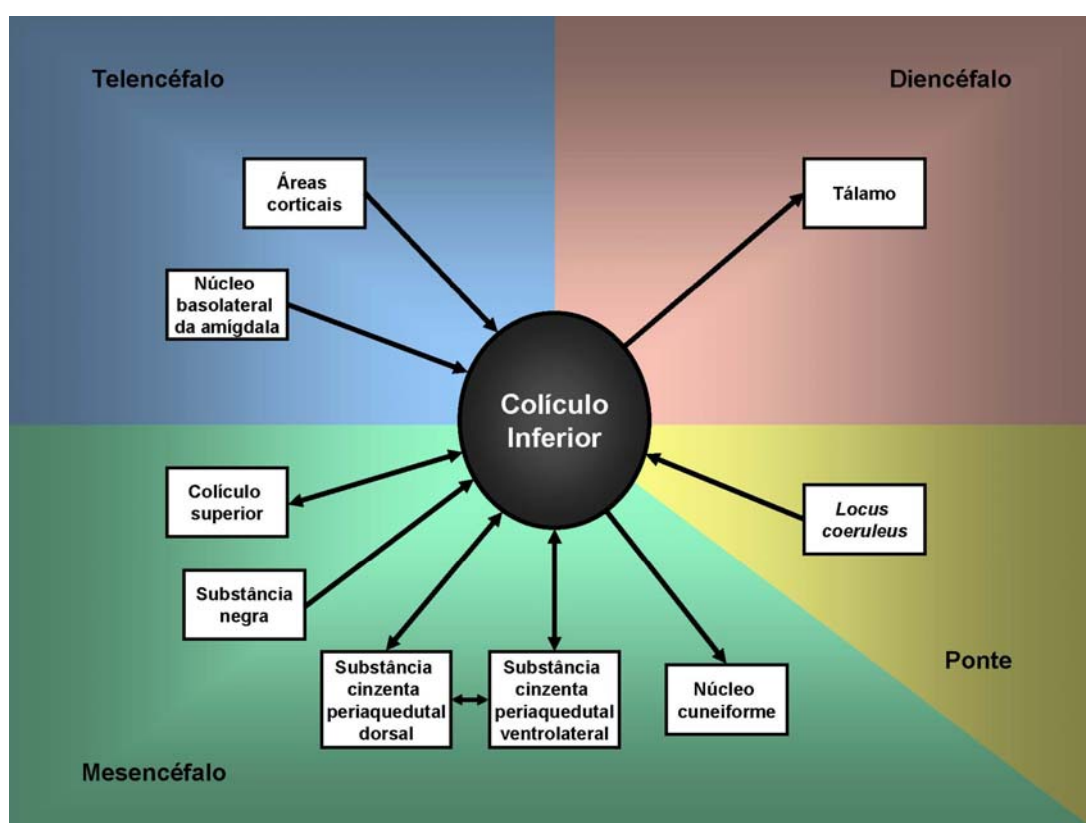
Fibras eferentes das três subdivisões do CI projetam-se, densamente, para o núcleo geniculado medial *ipsilateral*. Projeções ascendentes do CIC partem, primariamente, para a divisão ventral do núcleo geniculado medial, enquanto projeções descendentes vão para o complexo olivar superior, núcleo coclear e também para o núcleo externo do colículo inferior (Huffman & Henson Jr, 1990).

O DCI recebe projeções descendentes do córtex auditivo e envia fibras para a divisão dorsal do núcleo geniculado medial. Já o núcleo externo do colículo inferior (ECI) – que recebe projeções auditivas e somatossensoriais – envia projeções para a divisão medial do núcleo geniculado medial (área talâmica multissensorial) e para o colículo superior e cerebelo o que sugere sua participação na integração multissensorial (Huffman & Henson Jr. 1990). Além disso, há evidências que sugerem o envolvimento da parte dorsal do CI na produção de crises audiogênicas intensas (para revisão, ver Garcia-Cairasco, 2002).

O CI mantém conexões com a SCP, o hipotálamo, o colículo superior e a amígdala (Kudo & Niimi, 1980; Meininger *et al.*, 1986; Herrera *et al.*, 1988; Brandão *et al.*, 1999, 2001). Tem sido demonstrado que as projeções do CI para o complexo amigdalóide ocorrem via tálamo (LeDoux *et al.*, 1988, 1990; Rizvi *et al.*, 1991), entretanto, Marsh e colaboradores (2002) observaram, em morcegos, projeções diretas do núcleo basolateral da amígdala para o colículo inferior. As principais conexões anatômicas do CI estão ilustradas na figura 2.

O CI é, portanto, um importante núcleo mesencefálico que participa da complexa análise de frequências, da localização de sons e da regulação de muitos reflexos auditivos (Aitkin *et al.*, 1986). Evidências recentes obtidas em estudo com humanos apóiam a proposição do envolvimento do CI no medo. Nesse estudo, os indivíduos eram submetidos a estímulos acústicos aversivos, ao mesmo tempo em que era realizado o registro dos potenciais

evocados auditivos. Sabe-se que as ondas V dos potenciais evocados auditivos registrados no córtex cerebral indicam a ativação pelo som de circuitos neurais do CI. Os resultados mostraram que estados aversivos induzidos experimentalmente promovem aumentos significativos das ondas V dos potenciais evocados auditivos dos indivíduos avaliados (Baas *et al.*, 2006).



**Figura 2.** Principais conexões anatômicas do colículo inferior na organização do medo.

Vários padrões de respostas acústicas podem ser registrados no colículo inferior em razão da complexa interação entre mecanismos excitatórios e inibitórios nessa região (Vaughn *et al.*, 1996; Brandão *et al.*, 1993). Assim, o uso de técnica da estimulação química do CI associada a registros eletrofisiológicos tem fornecido evidências sobre as influências modulatórias de vários neurotransmissores, tais com, GABA (Brandão *et al.*, 1988; Melo *et al.*, 1992; Coimbra & Brandão, 1993), aminoácidos excitatórios (Cardoso *et al.*, 1994; Nobre

*et al.*, 2004), serotonina (Brandão *et al.*, 1993; Melo & Brandão, 1995; Castilho & Brandão 2001; Coimbra *et al.*, 2006), óxido nítrico (Moreira *et al.*, 2003) e opióides (Cardoso *et al.*, 1992; Bagri *et al.*, 1992; Osaki *et al.*, 2003) dos substratos neurais da aversão nessa estrutura.

Dentre esses, o GABA tem sido amplamente estudado, levando-se em conta sua função regulatória nas reações de defesa integrada no teto mesencefálico. A microinjeção do antagonista de receptor GABA-A bicuculina no CI induz intensa reação defensiva com expressão de corridas, saltos e alterações autonômicas – aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca (Brandão *et al.*, 1988). Assim como na SCPD, a estimulação elétrica do CI induz comportamentos característicos da reação de defesa. Melo e colaboradores (1992) demonstraram que a administração sistêmica do benzodiazepínico midazolam reduziu as conseqüências aversivas da estimulação elétrica do CI num paradigma de *switch-off*, em que o animal aprende a desligar a estimulação aversiva. Tais resultados sugerem que o GABA exerce um controle inibitório tônico sobre os processos aversivos integrados no CI.

### ***Neurotransmissão GABAérgica***

No sistema nervoso central dos vertebrados o ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório. O GABA é produzido pela remoção enzimática de um grupo carboxílico do ácido glutâmico pela enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD). O GABA é um neurotransmissor que atua rapidamente, promovendo a abertura de canais iônicos, nos níveis pré ou pós-sináptico, com a produção de efeitos inibitórios. Apresenta-se em todas as áreas do neuroeixo – na maioria delas associado a interneurônios inibitórios locais – e a neurotransmissão mediada por GABA regula muitos processos psicológicos e fisiológicos.

Há duas classes de receptores GABA: os receptores ionotrópicos GABA-A (inclui também o GABA-C) e os receptores metabotrópicos GABA-B (Bowery *et al.*, 1987). O

complexo receptor GABA-A é constituído por subunidades que formam uma estrutura pentamérica associada ao canal de Cl<sup>-</sup>, cuja ativação promove a hiperpolarização celular. Já os receptores GABA-B são heterodímeros acoplados à proteína G, o receptor GABA-B pré-sináptico modula a liberação do neurotransmissor por meio da redução do influxo de Ca<sup>2+</sup> e os receptores GABA-B pós-sinápticos são associados, principalmente, a ativação de canais de K<sup>+</sup> (Bowery *et al.*, 1987, 2002; Cryan & Kaupmann, 2005).

Ativação de receptores GABA-A e GABA-B podem ser distinguidas farmacologicamente. O receptor GABA-A é ativado, seletivamente, pelo agonista muscimol e bloqueado, da mesma forma, por bicuculina ou picrotoxina. Os receptores GABA-B são seletivamente estimulados por baclofen e bloqueados por 2-OH-sacofen (Bowery *et al.*, 1987). Há evidências de que a inibição pré-sináptica em terminais sensoriais envolve ativação de ambos os receptores.

No teto mesencefálico, a maior parte da ação inibitória parece ser mediada por GABA (Faingold *et al.*, 1989). Análises autorradiográfica e imunistoquímica, nessa região, detectaram níveis apreciáveis da enzima GAD (Ribak & Morin, 1995), de receptores GABA-A (Bristow & Martin, 1988; Glendenning & Baker, 1988; Shiraishi *et al.*, 2001) e de receptores GABA-B (Bowery *et al.*, 1987; Vaughn *et al.*, 1996).

### ***Marcação da ativação neural – Proteína Fos***

A neurobiologia molecular fornece a possibilidade de investigar a relação entre drogas, comportamentos e circuitos neurais ativados. Como visto anteriormente, existe um número considerável de trabalhos mostrando que a ansiedade está associada a um conjunto de estruturas encefálicas e pode ser modulada por alterações em sua atividade neural (Graeff, 1990; Gray & McNaughton, 2000). Entretanto, a maioria das evidências neuroanatômicas obtidas até o momento é originária de estudos comportamentais que utilizam técnicas de



lesão, estimulação ou manipulação farmacológica de estruturas específicas. Embora sejam de grande utilidade, esses métodos não avaliam o funcionamento integrado de estruturas do neuroeixo em situações de ameaça, apenas indicam o envolvimento de áreas isoladas na mediação da ansiedade e possibilitam, portanto, uma identificação parcial do substrato neural da ansiedade.

Além disso, parte da dificuldade em analisar as redes sensoriais envolvidas nas respostas de medo e ansiedade consiste no fato de que muitas vias sensoriais ascendentes são multissinápticas e esses caminhos neurais são relativamente difíceis de serem traçados por técnicas de investigação tradicional (Peschanski & Besson, 1984; McMahon & Wall, 1985; Bullitt, 1990). O desenvolvimento de técnicas de marcação que identificam a atividade neural, em preparações histológicas, poderia, entretanto, ajudar no delineamento de subnúcleos e de estruturas que elaboram, conjuntamente, o comportamento defensivo, assim como permitir a identificação de focos de atividade anormal em estados patológicos (Dragunow & Faull, 1989; Morgan & Curran, 1991; Bullitt, 1990). Por meio de um marcador neural, áreas que são excitadas por estímulos definidos podem ser identificadas por sua atividade celular ao longo do neuroeixo. A expressão do gene *c-fos* e seu produto protéico possibilitam este tipo de marcação. A proteína Fos possui uma seqüência de 380 aminoácidos na cadeia polipeptídica (Curran *et al.*, 1984).

Estudos pioneiros na indução de expressão do gene *c-fos*, do *c-jun* e do *c-myc*, dentre outros, foram iniciados na década de 90 (Herdegen & Leah, 1998; Herrera & Robertson, 1996). Tais genes pertencem à categoria dos proto-oncogenes e, em condições fisiológicas, estão envolvidos na regulação do crescimento e da divisão celular. Por outro lado, quando expressos de forma inadequada, esses genes dão origem aos oncogenes, definidos como elementos genéticos que podem causar alteração celular patológica (Bishop, 1985; Morgan &

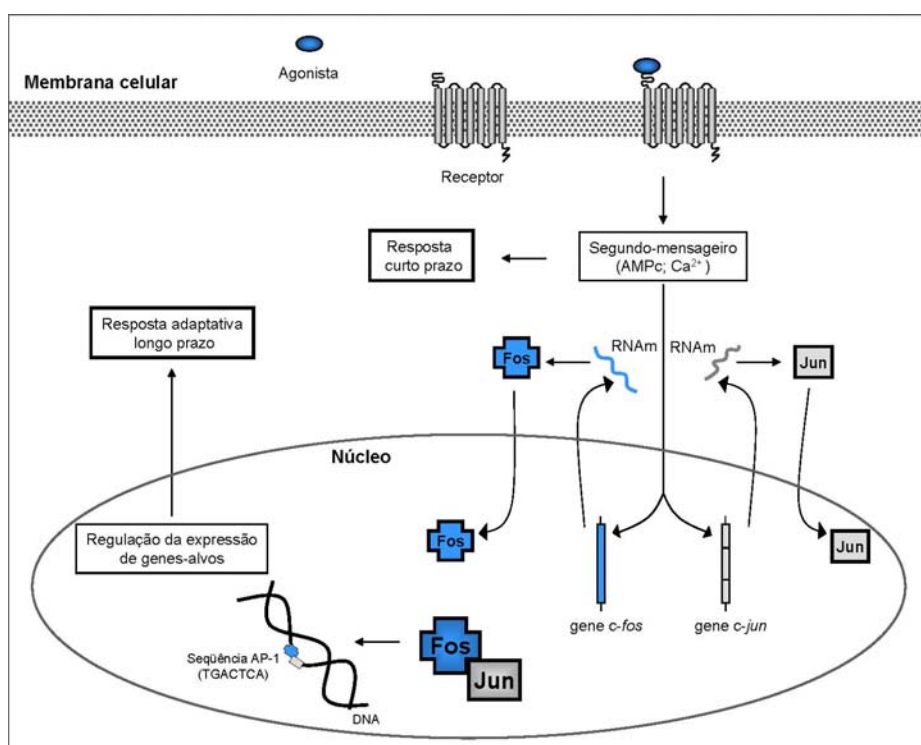
Curran, 1991). Assim, os genes celulares normais, dos quais os oncogenes foram derivados, são referidos como proto-oncogenes, que representam os progenitores dos oncogenes.

Os proto-oncogenes codificam proteínas nucleares que agem na transmissão de sinais intra e intercelulares. A interação de ligantes extracelulares com seus receptores na membrana plasmática promove uma série de informações ao citoplasma pela transdução de sinais nervosos. Tal informação promove uma rápida alteração na função celular por modificar a atividade das proteínas. A cascata de transdução de sinais não termina no citoplasma, mas se estende ao núcleo e a atividade neural é capaz de causar alterações na expressão gênica de células pós-sinápticas (Morgan & Curran, 1991; Armstrong & Montminy, 1993). Nessa cascata de eventos, existe uma distinção entre os fatores que requerem uma resposta nuclear (resposta de longo prazo) e aqueles que são independentes da síntese protéica (curto prazo), eventos rápidos, mediados por segundos-mensageiros, com alterações subseqüentes na expressão gênica. Contudo, os proto-oncogenes têm sua expressão alterada pela atividade celular e, por essa razão, são chamados genes de ação precoce ou imediata. Foi postulado que os referidos genes poderiam codificar fatores de transcrição e agir como terceiros-mensageiros nucleares, ligando eventos mediados por segundos-mensageiros para subseqüente alteração no fenótipo celular, por regularem a expressão de genes-alvos selecionados (Morgan & Curran, 1991, Curran & Morgan, 1995).

As famílias gênicas *fos* e *jun* incluem os genes *c-fos*, *fos B*, *fra-1* e *fra-2*, e os genes *c-jun*, *jun B* e *jun D*, respectivamente. O produto protéico desses genes é sintetizado no citoplasma. Entretanto, possivelmente em resposta ao aumento intracelular de segundos-mensageiros – proteína quinase C, cálcio, adenosina monofosfato cíclico –, as proteínas Fos e Jun voltam ao núcleo neuronal onde são dimerizadas por meio do denominado zíper de leucina (para revisão ver Landschulz *et al.*, 1988; Gentz *et al.*, 1989; Curran *et al.*, 1984).

No núcleo, as proteínas podem formar homodímeros (Jun-Jun) ou heterodímeros (Fos-Jun), complexos protéicos classificados como proteínas ativadoras 1 (AP-1; *Activator-Protein-1*). Tais complexos têm a capacidade de se ligarem, especificamente, a elementos do DNA (seqüência de nucleotídeos TGACTCA) que contêm o sítio de ligação AP-1 (sítios regulatórios de transcrição do DNA), e estão presentes em genes-alvos e podem atuar como fatores de transcrição (figura 3). É interessante notar que a presença de Fos no heterodímero Fos-Jun determina maior afinidade do complexo AP-1 pelo DNA, por aumentar a estabilidade da interação proteína-DNA (Rauscher *et al.*, 1988; Feldman *et al.*, 1997).

Em condições fisiológicas, tanto o RNAm *c-fos* quanto a proteína Fos são encontrados no sistema nervoso central em baixas concentrações (Herdegen & Leah, 1998; . Contudo, os genes de ação imediata são caracterizados pela transcrição de genes induzida de maneira rápida e transitória em resposta a estímulos fisiológicos ou nocivos, à ação de hormônios, à ligação de neurotransmissores ou neuromoduladores a seus respectivos receptores e à despolarização da membrana neural (Morgan & Curran, 1989, 1991; Kovasc, 1998).



**Figura 3.** Ativação do gene *c-fos* (adaptado de Feldman *et al.*, 1997).

Dentre as técnicas de biologia molecular, a hibridização *in situ* e a imunistoquímica para detecção do RNAm do *c-fos* e da proteína Fos são as mais utilizadas por fornecerem melhor localização neuroanatômica do substrato neural ativado por estímulos específicos (Curran & Morgan, 1995; Campeau *et al.*, 1997).

De particular interesse para este trabalho, a técnica de imunistoquímica é baseada na interação entre antígeno e anticorpo e utiliza anticorpos capazes de reconhecerem e de se ligarem especificamente a substâncias neuroativas. O intervalo necessário para síntese e acúmulo da proteína Fos no SNC é de aproximadamente duas horas após a excitação neural e desaparece depois de 4 a 16 horas. A marcação da imunorreatividade à proteína Fos é restrita ao núcleo celular (Bullitt, 1990).

Os fatores de transcrição e seus produtos protéicos desempenham funções específicas no desenvolvimento do sistema nervoso normal e no funcionamento dele, assim como nas respostas adaptativas do sistema nervoso a diferentes estímulos e a situações patológicas. Portanto, o mapeamento neuroanatômico dos circuitos neurais subjacentes às respostas comportamentais, autonômicas e neuroendócrinas induzidas pelo estresse pode permitir a identificação de estruturas encefálicas ativadas por estados aversivos induzidos por estímulos específicos.

## **OBJETIVOS**

---

---

## OBJETIVOS

O estudo dos substratos neurais envolvidos na geração dos estados aversivos tem sido útil para o esclarecimento das bases biológicas do medo e da ansiedade. Estratégias defensivas distintas tais como esquiva, congelamento e fuga são provavelmente organizadas por diferentes redes neurais (Blanchard & Blanchard, 1988; Ferreira-Netto *et al.*, 2005; Vianna & Brandão, 2003). O mapeamento dos circuitos neurais associados a essas reações defensivas tem sido realizado por meio de técnicas de imunistoquímica para detecção da proteína Fos, um marcador de atividade neural. Ultimamente, tem despertado grande interesse o delineamento dos circuitos neurais subjacentes aos comportamentos defensivos induzidos por estimulação elétrica e química da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) e do colículo inferior (CI).

O presente trabalho teve como proposta avaliar o substrato neural ativado pela estimulação química da SCPD ou do CI por meio de drogas que reduzem a neurotransmissão GABAérgica no teto mesencefálico. Para tanto, foi avaliada a distribuição da proteína Fos no encéfalo de ratos após a injeção de semicarbazida – inibidor da descarboxilase do ácido glutâmico – ou de bicuculina – antagonista de receptor GABA-A – na SCPDl ou no CI. A microinjeção de semicarbazida ou de bicuculina nessas estruturas promove, respectivamente, congelamento e fuga.

## **EXPERIMENTO I**

Distribuição da proteína Fos no encéfalo de ratos submetidos à estimulação química da SCPdl

---

---

Nesse estudo, foi avaliada a ativação de estruturas encefálicas, por meio da detecção da proteína Fos, no congelamento ou na fuga induzidos pela microinjeção de semicarbazida ou bicuculina na SCPdl.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Animais***

Foram utilizados, nesse experimento, ratos Wistar, machos, com peso entre 220 e 250 g, provenientes do biotério central da USP-RP. Os animais foram alojados aos pares, em caixas de acrílico, com livre acesso a água e comida durante o experimento, em um biotério com temperatura controlada ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro de 12 x 12 horas; o início do período de claro (67 lux) ocorria às 7 horas.

### ***Cirurgia***

Cada animal foi anestesiado, por via intraperitoneal, com tribromoetanol (Aldrich, EUA), na concentração de 250 mg/Kg. Após a anestesia, realizou-se a tricotomia do campo cirúrgico. O crânio do animal foi fixado a um aparelho estereotáxico (David-Kopf, USA), pelo rochedo temporal, e a barra dos incisivos, colocada 2,5 mm abaixo da linha interaural, de forma que o crânio ficasse em posição horizontal entre o bregma e o lambda. Utilizou-se álcool iodado para a limpeza do campo cirúrgico. Em seguida, o anestésico local cloridrato de lidocaína (Novocol 100, S.S.White, Brasil) foi administrado subcutaneamente. Com uma incisão longitudinal na pele, o periosteio foi removido por raspagem, com o auxílio de um bisturi. Em dois orifícios feitos no osso com auxílio de uma broca conectada a um motor de alta rotação, dois parafusos de aço inoxidável foram fixados para ancorar a prótese ao crânio do animal. Uma cânula 26 G (gauge) – de aço inoxidável, com 13 mm de comprimento, 0,6



mm de diâmetro externo, 0,4 mm de diâmetro interno - foi colocada na haste do estereotáxico e dirigida para a SCPdl do animal, com uma angulação de 16°. Considerando o lambda como referência, foram utilizadas as seguintes coordenadas: antero-posterior = 0 mm; lateral = 1.9 mm; e vertical = - 4.1 mm (Paxinos & Watson, 2005). Por meio de uma resina acrílica, a cânula foi fixada a parafusos pré-fixados no crânio. Para evitar obstrução, essa cânula permaneceu vedada, até o momento da injeção central, por um fio de aço inoxidável. Ao término da cirurgia uma associação antibiótica de largo espectro (Pentobarbital Veterinário, Fontoura-Wyeth, Brasil) foi administrada (0,2 mL) por via intramuscular, com o intuito de prevenir possíveis infecções. Os animais, após serem retirados do estereotáxico, foram colocados aos pares em suas gaiolas, no biotério, para recuperação por seis dias antes dos experimentos.

### ***Microinjeções de drogas***

Os animais receberam uma injeção intra-SCPdl de salina ou droga, através de uma agulha odontológica 30 G – com 14 mm de comprimento, 0,3 mm de diâmetro externo – introduzida na cânula e ultrapassando-a em 1 mm. A agulha para injeção foi conectada a uma seringa Hamilton, de 5 µL, por meio de um tubo de polietileno (PE-10). Um volume de 0,2 µL foi injetado durante 30 s, por meio de uma bomba de microinfusão (Harvard, USA), e a agulha mantida no lugar por 30 s adicionais para evitar o refluxo da solução. O deslocamento de uma bolha de ar no tubo de polietileno foi utilizado para monitorar a microinjeção e imediatamente após o procedimento, os animais foram colocados na arena circular para o registro das respostas comportamentais.

### ***Drogas***

Metiliodeto de bicuculina (Sigma-USA) e semicarbazida (Vetec-Brasil) foram dissolvidas em solução salina (0,9%). A salina foi usada nos animais do grupo controle. Foram utilizadas as concentrações de 40 ng/ 0,2 µL de bicuculina e de 5 µg/0,2 µL de semicarbazida.

### ***Arena circular***

A medida das respostas comportamentais de congelamento e fuga foi realizada em uma arena constituída de uma base fórmica, sobre a qual estavam delimitados dois círculos concêntricos, de 30 cm e 60 cm de diâmetro, divididos em 12 quadrantes. Um cilindro de acrílico transparente, medindo 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura, foi colocado sobre a base fórmica.

### ***Procedimento experimental***

Para a realização dos testes comportamentais (após a recuperação cirúrgica - 6 dias), os animais foram colocados na arena para 10 minutos de habituação, sob iluminação fluorescente 40W (50 lux na base da arena). Após esse período, eles receberam a microinjeção de droga ou veículo e foram recolocados na arena para registro do comportamento por meio de um circuito interno de TV durante 30 minutos. Foi observada a intensidade da movimentação expressa sob a forma de *cruzamentos* (resposta de cruzar com as quatro patas o limite de um dos quadrantes), *saltos* (resposta de retirar as quatro patas do piso) e *congelamento* (pelo menos 6 segundos de imobilidade tensa). Após o registro comportamental, os animais voltaram para suas gaiolas de origem.

## ***Histologia***

Duas horas após a microinjeção, os animais foram anestesiados com uretana (25%, 5 mL/kg; Sigma) e sacrificados por meio de perfusão intracardíaca com solução salina tamponada (PBS 0,1M; pH = 7,3), seguida de solução de paraformaldeído 4% (PFA, Sigma) em tampão fosfato (PB 0,2M), por aproximadamente 10 minutos. Os encéfalos foram removidos da caixa craniana, guardados em frascos com PFA 4% por duas horas e, depois, transferidos para solução de sacarose 30% em PBS 0,1M a 4°C, durante cerca de 48 horas. Os encéfalos foram imersos em isopentana (Sigma) e congelados, em gelo seco, à temperatura de aproximadamente -40°C, durante 30 segundos. Após o congelamento, os encéfalos foram seccionados em um criostato (Cryocut 1800, Reichert-Jung).

Para cada região, foram coletados três cortes histológicos coronais, seriados, com espessura de 40 µm. Um corte foi coletado em cubetas com PBS 0,1M, para o ensaio de imunistoquímica; o segundo corte – útil para localização e comparação neuroanatômica – foi colocado em lâminas previamente gelatinizadas e posteriormente coradas com Nissl; o terceiro corte foi colocado em ependorf com solução anti-congelante e armazenado no freezer a -20°C, para uma eventual necessidade. Vale ressaltar que, antes da secção, o lado do encéfalo *ipsilateral* ao sítio de microinjeção era sinalizado com um pequeno orifício, por meio de uma agulha de 26 G. Os cortes tiveram como referência as seguintes coordenadas: bregma 3,72; 1,08; -1,80; -2,92; -3,96; -6,36; -6,48; -7,20; -7,32; -7,56; -7,80; 8,16; -8,52; -8,72, -9,60 mm segundo Atlas de Paxinos e Watson (2005).

## ***Protocolo de imunistoquímica para detecção da proteína Fos***

A solução salina tamponada com fosfato de molaridade 0,1 (PBS 0,1M) foi utilizada para todas as incubações e lavagens da imuno-histoquímica, realizadas em agitadora orbital à

temperatura de aproximadamente 25°C. As trocas do tampão foram feitas, por aspiração, com pipetas plásticas (Falcon).

Com a finalidade de diminuir a marcação não específica os cortes foram tratados em uma solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% em PBS 0,1M) – para diminuição da atividade da peroxidase endógena, durante 10 minutos – e submetidos, a seguir, a quatro lavagens com PBS 0,1M (5 minutos cada). Ao final desse processo, os cortes foram incubados *overnight* com anticorpo primário policlonal anti-fos, produzido em coelho (Santa Cruz, USA, SC-52), na concentração de 1:2000 em PBS+ (PBS 0,1M acrescido de soro albumina bovina, 1 mg/mL e do detergente triton X-100, 2 µL/mL).

Após a retirada do anticorpo primário, as seções foram lavadas três vezes (5 min cada) e incubadas com o anticorpo secundário (anticorpo policlonal anticoelho biotinizado, Kit ABC Elite, Vectastain), na concentração 1:400 em PBS+, durante 1 hora. Depois da incubação do anticorpo secundário, o tecido foi novamente lavado por três vezes (5 min cada) e incubado por 1 hora com o complexo de peroxidase avidina-biotina (reagentes **A** e **B**; Kit ABC Elite, Vectastain) em PBS 0,1M, na concentração de 1:250 cada, para formação dos complexos entre a avidina e a peroxidase-biotinizada; os cortes foram novamente lavados em PBS 0,1M, por três vezes (5 min cada). Posteriormente, foi revelada a reação, com tetracloreto de 3,3'-di-amino-benzidina (DAB, Sigma) acrescido de peróxido de hidrogênio 0,02% em PBS 0,1M. Os cortes foram incubados durante 5 a 15 minutos para revelação da atividade da peroxidase; em seguida, foram lavados duas vezes consecutivas, com PBS 0,1M. A di-amino-benzidina é um cromógeno que, na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, propicia a formação de um precipitado de cor marrom visualizável no interior dos núcleos neuroniais com proteína Fos.

### ***Montagem das lâminas***

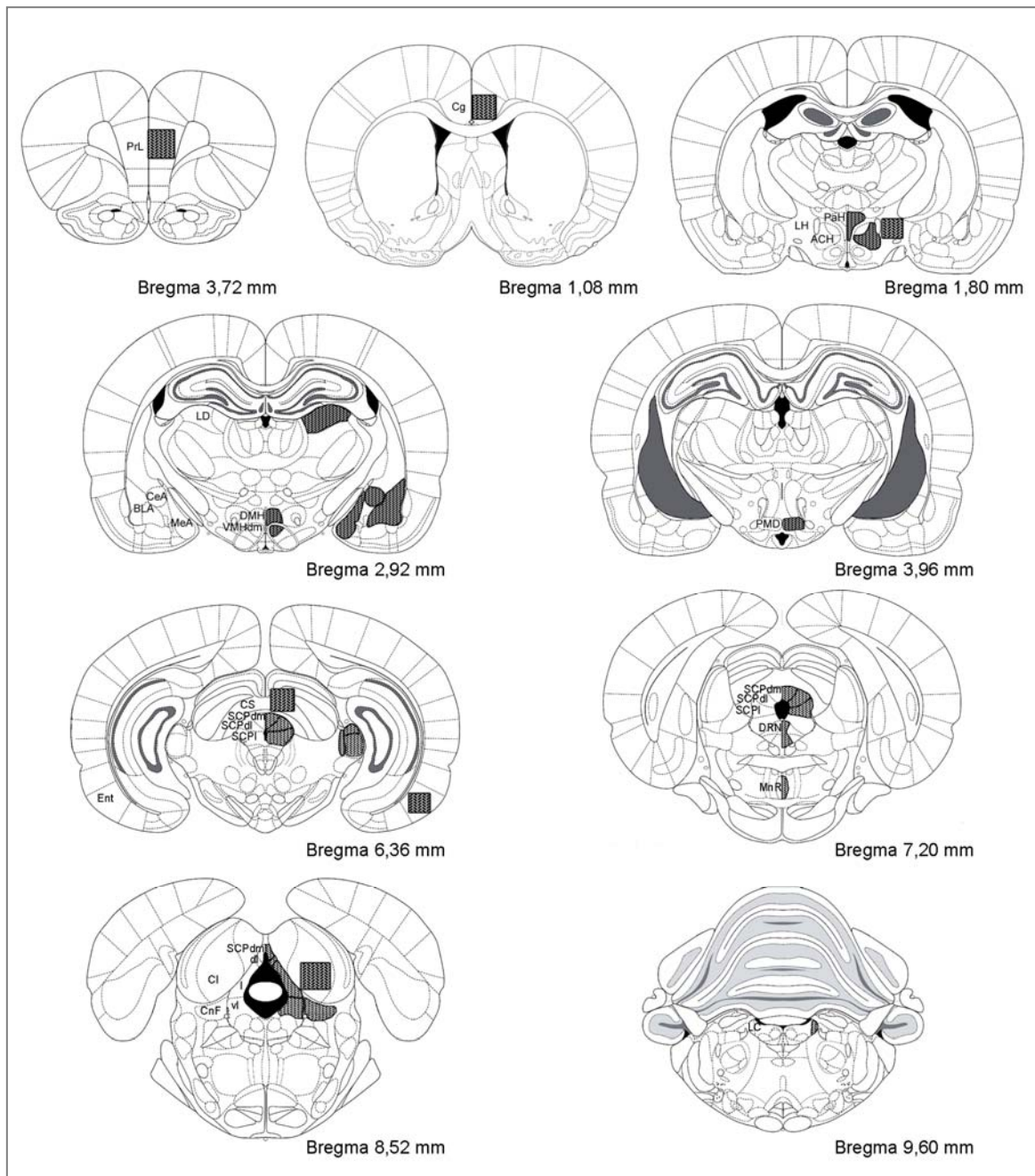
As seções foram distribuídas, uma a uma, sobre lâminas de vidro previamente gelatinizadas. Os cortes foram dispostos em seqüência antero-posterior. Após a secagem, as lâminas foram desidratadas por imersão em gradiente alcoólico, clareadas em xilol e cobertas com *Permount* e lamínulas.

### ***Análise quantitativa da expressão da proteína Fos***

A imunorreatividade à proteína Fos (Fos-IR) foi visualizada como um produto marrom depositado no interior dos núcleos neuronais. A contagem de células Fos-positivas foi realizada com o auxílio de um microscópio (*Olympus BX-50*) acoplado a uma videocâmara (*Hamatsu Photonics C2400*) que enviou, a um microcomputador, a imagem digitalizada da estrutura selecionada e, depois, foi processada por um programa de análise de imagem (*Image Pro-Plus 5.0, Media Cybernetics, USA*). A contagem de células Fos-positivas foi realizada em ambos os hemisférios cerebrais, *ipsi* e contralateral ao sítio da microinjeção, em uma área pré-delimitada pelo experimentador, com uma magnificação x 100. O número total de objetos que correspondiam aos sinais positivos da Fos-IR foi dividido pela área previamente delimitada, e obteve-se a densidade das células que apresentam imunorreatividade Fos positiva. Os núcleos foram contados individualmente e expressos como número de células Fos-IR por 0,1 mm<sup>2</sup>. A nomenclatura e os planos analisados basearam-se no Atlas de Paxinos e Watson (2005) e todas as estruturas foram bilateralmente quantificadas em cada rato (n = 6 – 8 por estrutura). As regiões encefálicas e suas respectivas áreas e coordenadas podem ser observadas na figura 4. Um grupo controle adicional recebeu injeção intra-SCPdl de salina e permaneceu no biotério, foi igualmente analisado quanto à imunorreatividade Fos (n = 5).

### ***Análise estatística***

Os dados comportamentais foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) de dois fatores, com o fator 1: tratamento (salina e drogas) e o fator 2 com medidas repetidas: tempo (três blocos de 10 min). No estudo imunoistoquímico, os efeitos da semicarbazida e da bicuculina foram analisados separadamente. Para cada estrutura, os dados foram analisados por meio da ANOVA de dois fatores. Considerou-se o fator 1: tratamento (salina e droga) e o fator 2: lado da microinjeção (*ipsi* ou *contralateral* em relação à implantação da cânula-guia). Em caso de significância estatística do tratamento e/ou da interação entre os fatores tratamento *versus* lado, foi realizado o teste *post hoc* de Newman-Keuls. Um valor de *p* inferior a 0,05 foi considerado significativo.



**Figure 4.** Representação esquemática das áreas quantificadas tendo como referência o Atlas de Paxinos e Watson (2005).

## **RESULTADOS**

---

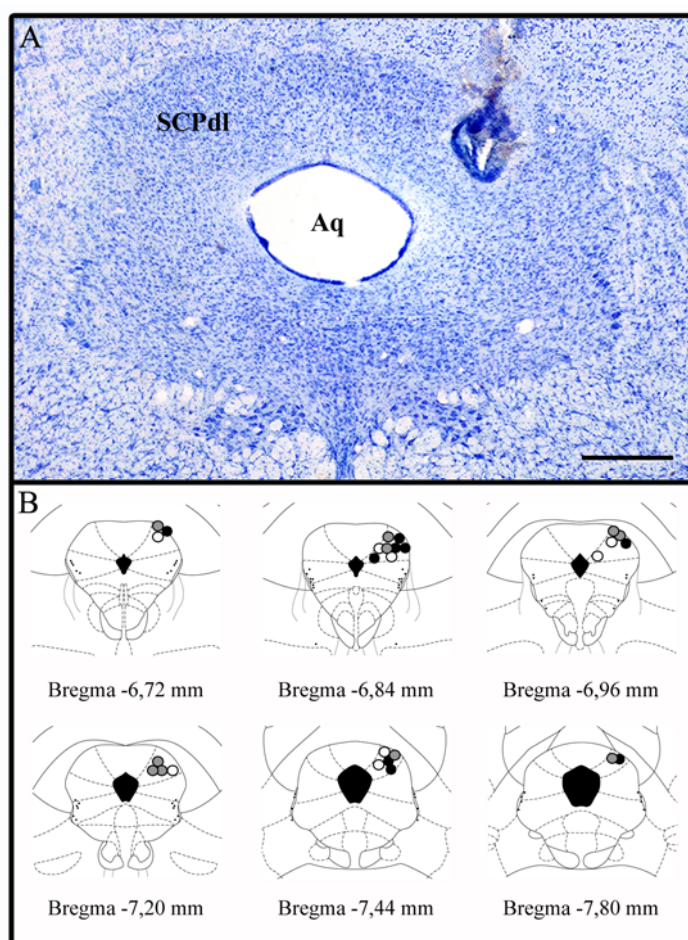
---



## RESULTADOS

### *Localização dos sítios de estimulação química na SCPdl*

A análise histológica indicou que os sítios de estimulação química dos animais utilizados nesse estudo estavam localizados na SCPdl. Uma fotomicrografia representativa do ponto de microinjeção e os sítios identificados e assinalados em diagramas modificados do Atlas de Paxinos e Watson (2005) podem ser vistos na figura 5.



**Figura 5.** Fotomicrografia que ilustra um exemplo típico do sítio de microinjeção na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl). Aq: aqueduto de Sylvius; barra: 400  $\mu$ m (A). Representação esquemática dos pontos de microinjeção na SCPdl, tendo como referência o Atlas Paxinos e Watson (2005). O símbolo (○) indica os animais que receberam microinjeção de salina, (◐) de semicarbazida e (●) de bicuculina (B).

### ***Efeitos comportamentais***

A injeção intra-SCPdl de semicarbazida (5 µg/0,2µL) promoveu congelamento caracterizado por imobilidade acompanhada por conjunto de sinais, tais como piloereção, defecação e/ou micção, exoftalmia, retração das orelhas e arqueamento do dorso. Essas reações defensivas duravam cerca de 20 – 30 minutos.

Os animais que receberam injeção intra-SCPdl de bicuculina (40 ng/0,2 µL) apresentaram uma resposta imediata de fuga explosiva, caracterizada por corridas, galopes, saltos e respostas autonômicas. Tal reação era mantida por aproximadamente 20 minutos e, então, decrescia paulatinamente.

As respostas comportamentais foram analisadas em três blocos de 10 minutos cada. A ANOVA de dois fatores mostrou uma diferença estatística do tratamento sobre cruzamentos e saltos [ $F_{(2,75)} = 71,24$  e  $139,49$ ;  $p < 0,01$ ], no tempo [ $F_{(2,75)} = 71,57$  e  $119,33$ ;  $p < 0,01$ ] e na interação tratamento e tempo [ $F_{(2,75)} = 70,42$  e  $96,73$ ;  $p < 0,01$ ]. A comparação *post hoc* de Newman-Keuls revelou que tais efeitos foram devidos apenas ao tratamento com bicuculina (Tabela 2). A ANOVA de dois fatores também mostrou um efeito estatisticamente significativo do tratamento na resposta de congelamento [ $F_{(2,75)} = 83,40$ ;  $p < 0,01$ ]; no entanto, não houve efeito estatístico significativo no tempo [ $F_{(2,75)} = 0,70$ ;  $p > 0,05$ ] e na interação tratamento e tempo [ $F_{(2,75)} = 1,38$ ;  $p > 0,05$ ]. O teste *post hoc* indicou apenas o tratamento com semicarbazida como responsável por tal efeito ( $p < 0,01$ ), apesar de haver uma tendência à significância pelo tratamento com bicuculina ( $p > 0,08$ ).

**Tabela 2.** Dados apresentados como média  $\pm$  EPM do número de cruzamentos, saltos e duração de congelamento em segundos após a microinjeção de salina, semicarbazida (SCB; 5  $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{L}$ ) ou bicuculina (BIC; 40  $\text{ng}/0.2 \mu\text{L}$ ) na SCPdl de ratos. A resposta comportamental foi analisada na arena durante 30 minutos, em três blocos de 10 minutos cada. \*  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo controle, de acordo com o teste *post hoc* de Newman-Keuls.

	Cruzamentos		
	SAL	SCB	BIC
10 min	52,00 $\pm$ 9,72	43,60 $\pm$ 10,81	863,56 $\pm$ 73,76*
20 min	20,22 $\pm$ 4,58	40,30 $\pm$ 13,72	131,11 $\pm$ 21,04*
30 min	12,56 $\pm$ 4,16	18,50 $\pm$ 7,84	21,22 $\pm$ 4,86
	Saltos		
	SAL	SCB	BIC
10 min	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	57,33 $\pm$ 7,02*
20 min	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,22 $\pm$ 0,15
30 min	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	Congelamento		
	SAL	SCB	BIC
10 min	10,67 $\pm$ 5,17	296,40 $\pm$ 53,40*	0,67 $\pm$ 0,67
20 min	0,67 $\pm$ 0,67	337,80 $\pm$ 48,11*	58,00 $\pm$ 9,22
30 min	0 $\pm$ 0	261,60 $\pm$ 48,30*	82,67 $\pm$ 21,99

### *Expressão da proteína Fos*

Nos animais que receberam microinjeção de salina na SCPdl e não foram expostos à arena circular (grupo: salina + biotério), observou-se discreta expressão da proteína Fos ou, até mesmo, ausência de expressão nas estruturas encefálicas analisadas (Tabela 1 do Anexo).

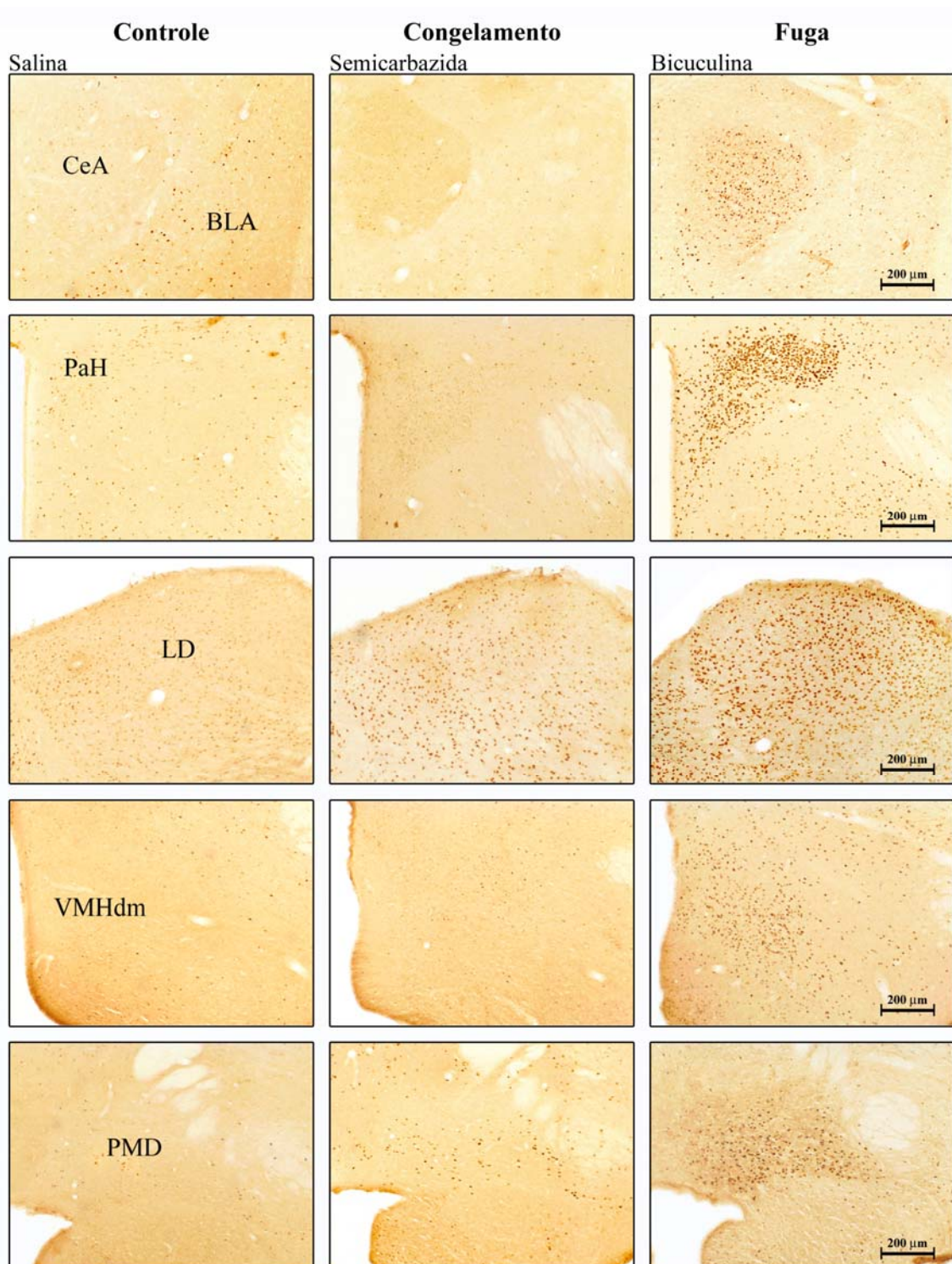
Nos animais que receberam a microinjeção de salina na SCPdl e foram submetidos ao teste da arena (grupo: salina + arena), núcleos neuroniais com imunorreatividade Fos (Fos-IR) foram encontrados em ambos os hemisférios cerebrais. Tais células apresentavam-se esparsamente distribuídas, sem formar aglomerado e a expressão da Fos-IR, nesse grupo, foi maior que a observada nos ratos do grupo salina + biotério. Para realização dos testes

estatísticos descritos a seguir, foi utilizado, como controle, apenas o grupo salina + arena, com o intuito de controlar o fator novidade e a atividade locomotora.

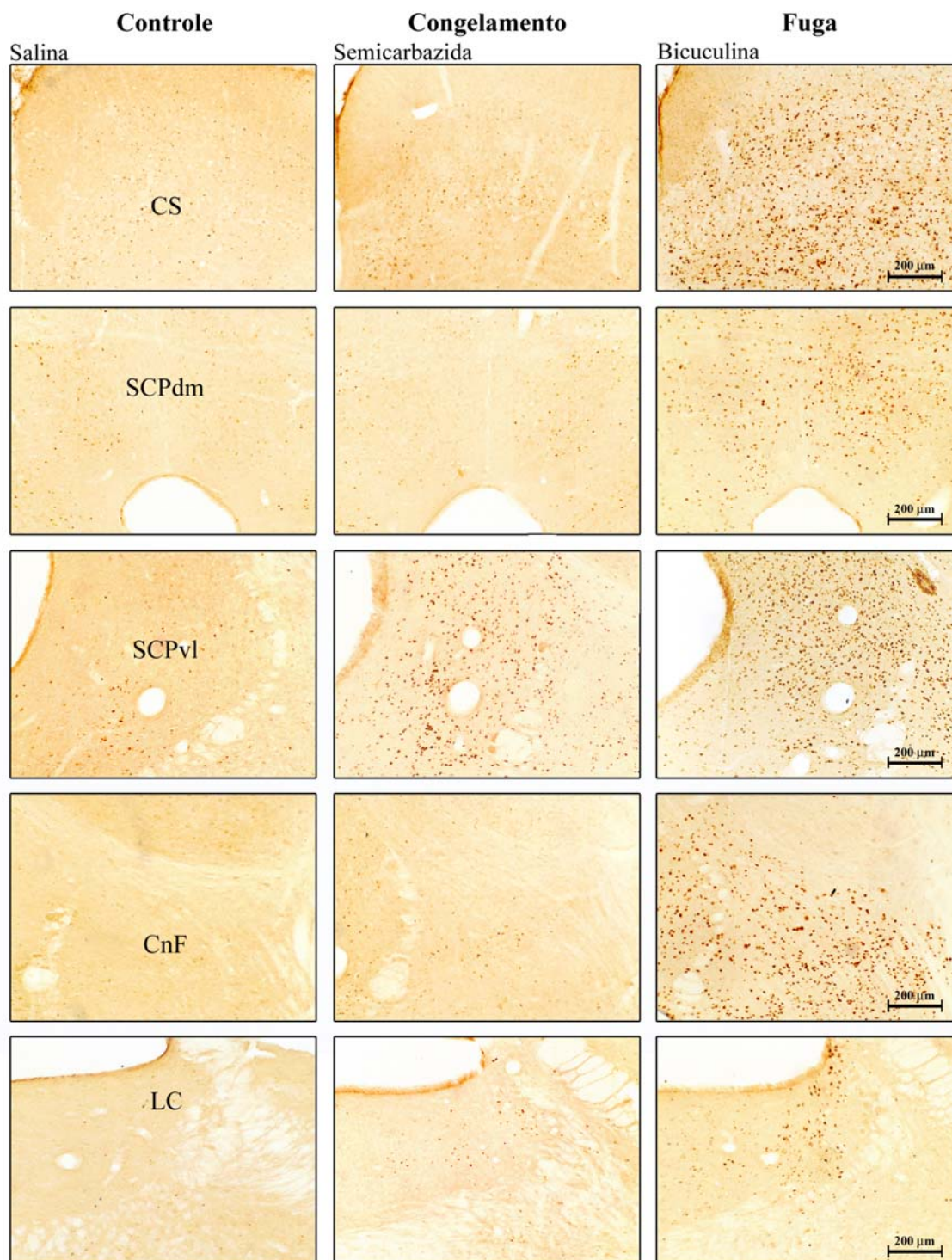
Os resultados obtidos com a análise quantitativa da imunorreatividade da proteína Fos nas estruturas encefálicas estudadas após a redução do controle GABAérgico, na SCPdl, estão sumarizados na Tabelas 2 do Anexo. Fotomicrografias de algumas regiões podem ser vistas na figura 6 (estruturas telencefálicas e diencefálicas) e na figura 7 (estruturas mesencefálicas). Os gráficos das médias de células Fos imunorreativas nos grupos experimentais podem ser vistos nas figuras 8-11.

*Congelamento:* a ANOVA de dois fatores mostrou que o grupo tratado com semicarbazida promoveu um aumento significativo na densidade de neurônios Fos-IR no núcleo laterodorsal do tálamo [ $F_{(1,20)} = 27,42; p < 0,01$ ] (figura 6) e na SCPvl [ $F_{(1,26)} = 12,34; p < 0,01$ ] (figura 7). Não houve efeito significativo do lado da microinjeção [ $F_{(1,20)} = 2,36$  e  $F_{(1,26)} = 0,92$  para LD e SCPvl, respectivamente;  $p > 0,05$ ] e na interação tratamento e lado [ $F_{(1,20)} = 0,46$  e  $F_{(1,26)} = 1,74$  para LD e SCPvl, respectivamente;  $p > 0,05$ ].

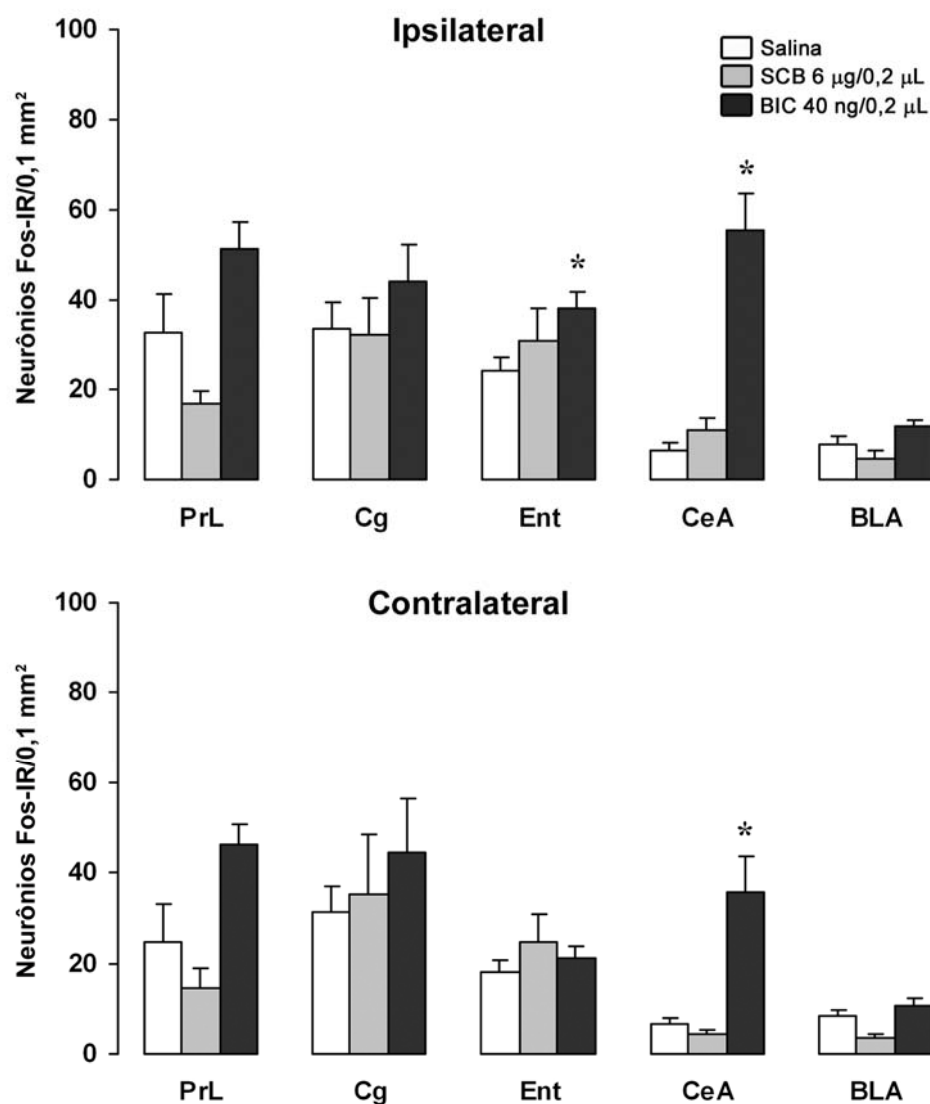
*Fuga:* a ANOVA de dois fatores mostrou que a microinjeção de bicuculina na SCPdl induziu um aumento significativo na densidade de núcleos neuronais Fos-IR na maioria das áreas encefálicas relacionadas. Os efeitos mais salientes do tratamento foram obtidos no CeA [ $F_{(1,30)} = 39,46; p < 0,01$ ] (figura 8); LD [ $F_{(1,26)} = 84,65; p < 0,01$ ]; VMHdm [ $F_{(1,28)} = 25,91; p < 0,01$ ]; PMD [ $F_{(1,19)} = 17,68; p < 0,01$ ] (figura 8); CnF [ $F_{(1,26)} = 58,34; p < 0,01$ ] (figura 8) e nas colunas da SCP [valores de F variaram de 6,96 a 31,21;  $p < 0,05$ ] (figura 7). Não foi observada diferença estatística no lado da microinjeção, nessas estruturas. Em outras regiões, houve interação entre o tratamento e o lado da microinjeção, sendo que a marcação foi significativamente maior do lado *ipsi* à injeção: CS [ $F_{(1,24)} = 14,31; p < 0,01$ ], SCP intermediária: SCPdm [ $F_{(1,21)} = 10,80; p < 0,01$ ], SCPdl [ $F_{(1,19)} = 57,76; p < 0,01$ ], SCPl [ $F_{(1,21)} = 28,44; p < 0,01$ ] e CnF [ $F_{(1,26)} = 10,48; p < 0,01$ ].



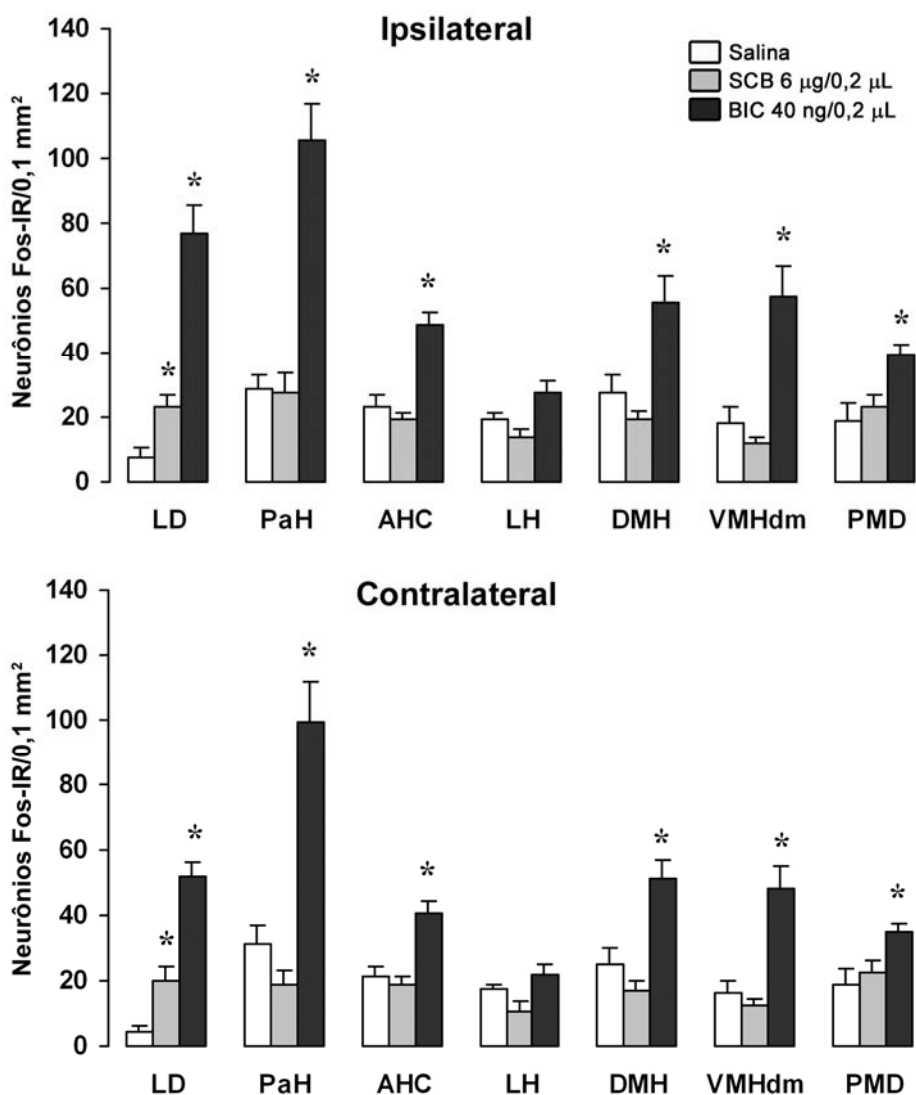
**Figura 6.** Fotomicrografias de sessões coronais (40  $\mu\text{m}$ ) de encéfalos de ratos ilustram a distribuição da imunorreatividade à proteína Fos após o congelamento (coluna intermediária) e fuga (coluna da direita) induzidos pela microinjeção de semicarbazida (5  $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ ) e bicuculina (40  $\text{ng}/0,2 \mu\text{L}$ ), respectivamente, na SCPdl em comparação com o grupo controle (coluna da esquerda). Estruturas telencefálicas – BLA: núcleo basolateral da amígdala; CeA: núcleo central da amígdala; estruturas diencefálicas – PAH: núcleo paraventricular do hipotálamo; LD: núcleo laterodorsal do tálamo; VMHdm: núcleo ventromedial do hipotálamo, parte dorsomedial e PMD: núcleo pré-mamilar dorsal.



**Figura 7.** Fotomicrografias de sessões coronais (40  $\mu\text{m}$ ) de encéfalos de ratos ilustram a distribuição da imunorreatividade à proteína Fos após o congelamento (coluna intermediária) e fuga (coluna da direita) induzidos pela microinjeção de semicarbazida (5  $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ ) e bicuculina (40 ng/0,2  $\mu\text{L}$ ), respectivamente, na SCPdl em comparação com o grupo controle (coluna da esquerda). Estruturas mesencefálicas – CS: colículo superior; SCPdm: substância cinzenta periaquedutal dorsomedial; SCPvl: substância cinzenta periaquedutal ventrolateral; CnF: núcleo cuneiforme; ponte – LC: *Locus Coeruleus*.

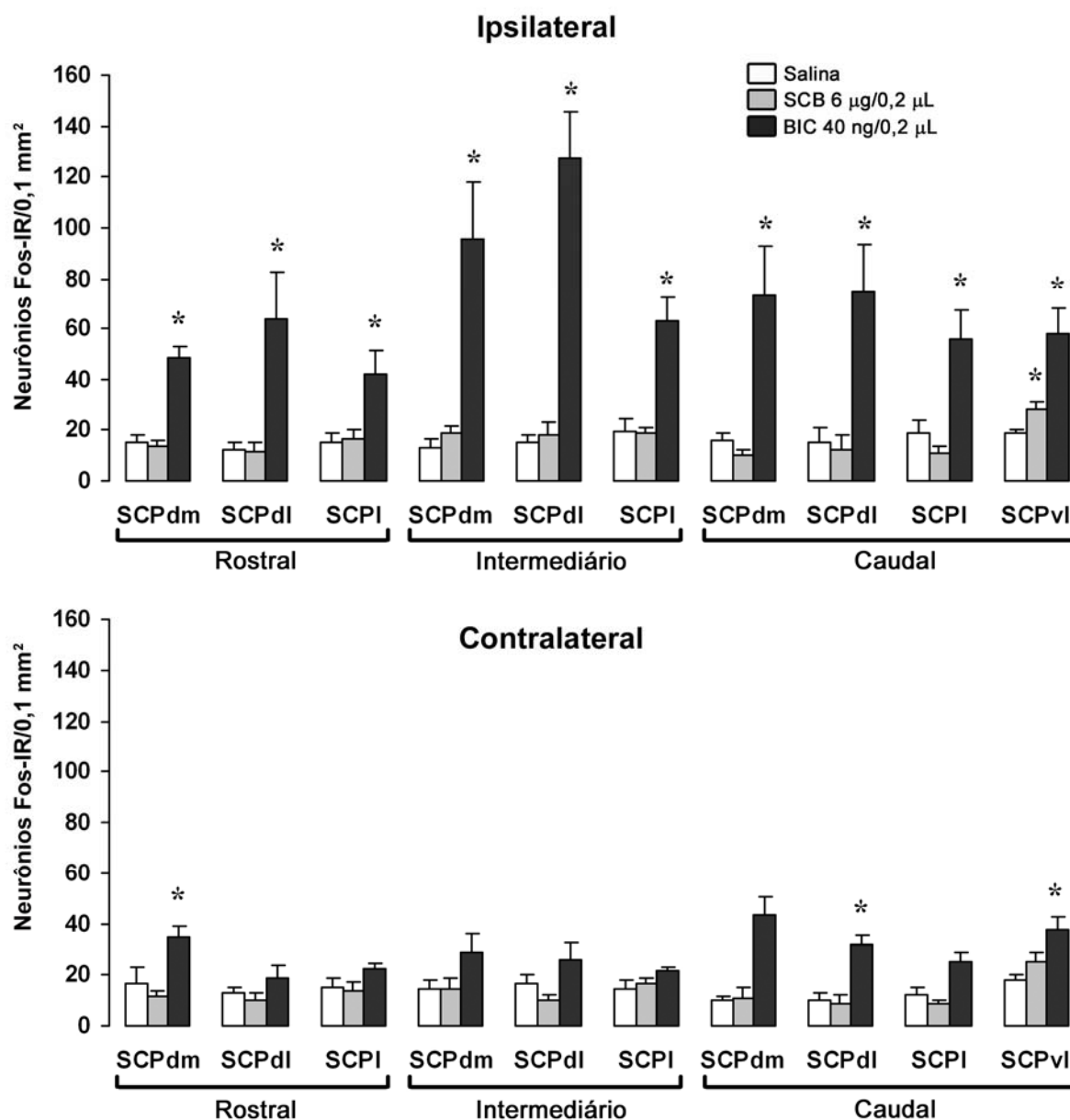


**Figura 8.** Número de neurônios Fos imunoreativos (Fos-IR) nas estruturas telencefálicas após a microinjeção de salina, semicarbazida (SCB; 5 µg/0,2 µL) ou bicuculina (BIC; 40 ng/0,2 µL) na SCPdl de ratos. As colunas representam as médias e as barras, o EPM. O número de células Fos-IR foi obtido de áreas pré-fixadas de 0,1 mm<sup>2</sup>. Cada estrutura encefálica foi quantificada bilateralmente, *ipsilateral* e *contralateral* à microinjeção (n = 6-8 por estrutura); \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle, de acordo com o teste de Newman-Keuls.

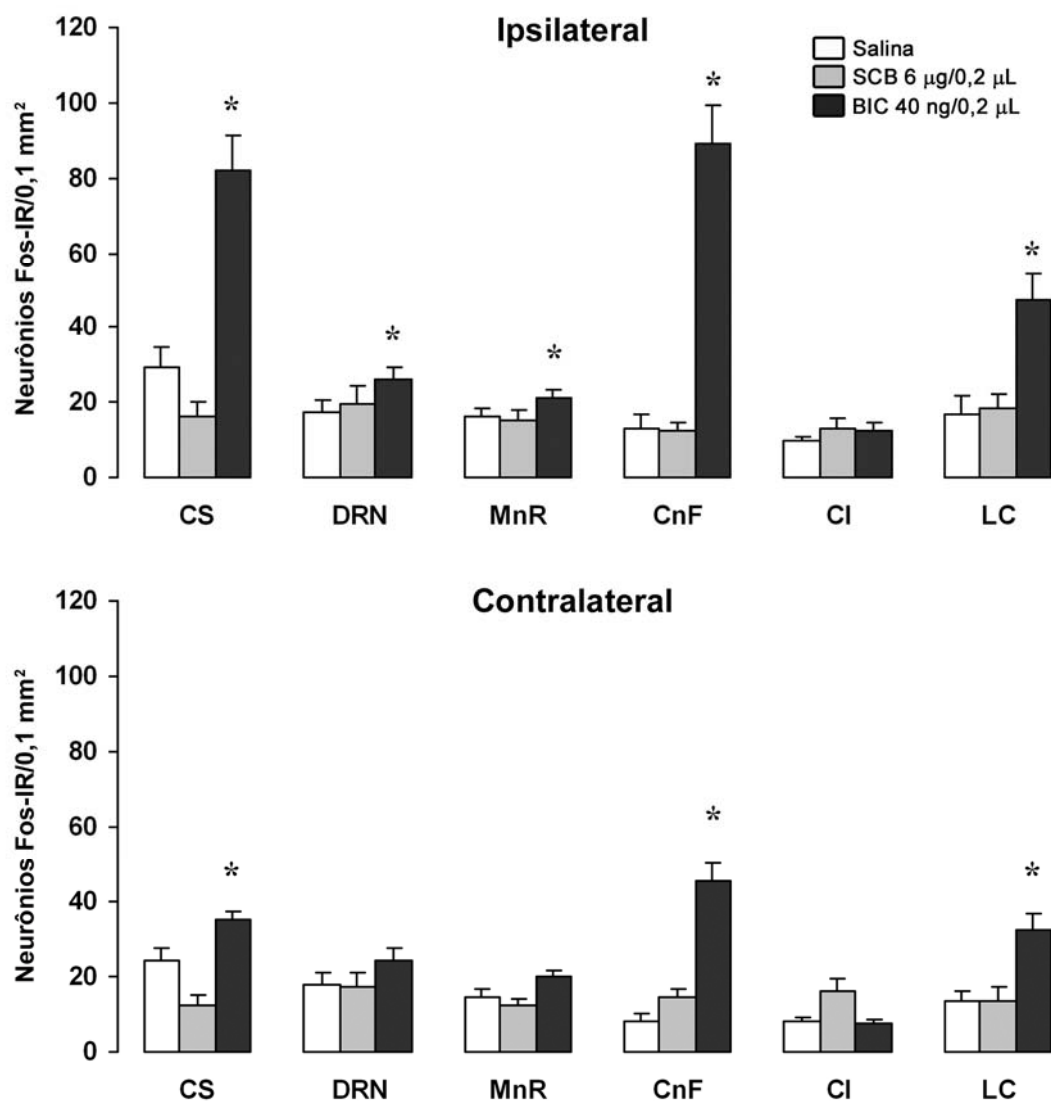


**Figura 9.** Número de neurônios Fos imunorreativos (Fos-IR) nas estruturas diencefálicas após a microinjeção de salina, semicarbazida (SCB; 5 µg/0,2 µL) ou bicuculina (BIC; 40 ng/0,2 µL) na SCPdl de ratos. As colunas representam as médias e as barras, o EPM. O número de células Fos-IR foi obtido de áreas pré-fixadas de 0,1 mm<sup>2</sup>. Cada estrutura encefálica foi quantificada bilateralmente, *ipsilateral* e *contralateral* à microinjeção (n = 6-8 por estrutura); \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle, de acordo com o teste de Newman-Keuls.





**Figura 10.** Número de neurônios Fos imunorreativos (Fos-IR) nos níveis: rostral, intermediário e caudal da SCP após a microinjeção de salina, semicarbazida (SCB; 5 µg/0,2 µL) ou bicuculina (BIC; 40 ng/0,2 µL) na SCPdl de ratos. As colunas representam as médias e as barras, o EPM. O número de células Fos-IR foi obtido de áreas pré-fixadas de 0,1 mm<sup>2</sup>. Cada estrutura encefálica foi quantificada bilateralmente, *ipsilateral* e *contralateral* à microinjeção (n = 6-8 por estrutura); \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle, de acordo com o teste de Newman-Keuls.



**Figura 11.** Número de neurônios Fos imunorreativos (Fos-IR) nas estruturas mesencefálicas e pontina após a microinjeção de salina, semicarbazida (SCB; 5 µg/0,2 µL) ou bicuculina (BIC; 40 ng/0,2 µL) na SCPdl de ratos. As colunas representam as médias e as barras, o EPM. O número de células Fos-IR foi obtido de áreas pré-fixadas de 0,1 mm<sup>2</sup>. Cada estrutura encefálica foi quantificada bilateralmente, *ipsilateral* e *contralateral* à microinjeção (n = 6-8 por estrutura); \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle, de acordo com o teste de Newman-Keuls.

**DISCUSSÃO**

---

---

## DISCUSSÃO

Em estudos prévios, a estimulação elétrica da SCPD nos limiares de congelamento e fuga resultou em aumentos diferenciais da expressão da proteína Fos em estruturas envolvidas na mediação do comportamento emocional (Vianna *et al.*, 2003). Esses experimentos revelaram diferenças significativas na distribuição de Fos em função do comportamento defensivo apresentado, mais especificamente, observou-se que as respostas de congelamento e fuga ativam circuitos neurais distintos. No entanto, a estimulação elétrica de determinada estrutura tem a desvantagem de ativar tanto corpos celulares quanto fibras de passagem (Bandler *et al.*, 1985). Para evitar esse problema de não-especificidade, é preferível o uso de agentes químicos que estimulam somente receptores pós-sinápticos nos estudos sobre a organização neural das reações de defesa. Para isso, foram utilizadas a semicarbazida e a bicuculina como ferramentas farmacológicas, com base no fato de que, dependendo da concentração utilizada, elas induzem os comportamentos de congelamento e fuga, respectivamente (Brandão *et al.*, 1982; 1986; Schmitt *et al.*, 1985; Nobre & Brandão, 2004). Assim, foi realizado o estudo da distribuição encefálica da proteína Fos induzida por estados aversivos decorrentes da estimulação química da SCPdl.

A injeção de semicarbazida induziu um comportamento de intenso congelamento, durante a sessão experimental; já a bicuculina causou uma reação motora explosiva, associada à ampla ativação dos substratos neurais das respostas aversivas. O congelamento e a fuga induzidos pela semicarbazida e pela bicuculina, respectivamente, foram seguidos pelo aumento significativo da imunorreatividade à proteína Fos na SCPvl. O tempo de ação das drogas pode ter permitido que o animal associasse o estado aversivo induzido pela droga com o ambiente experimental. Além disso, os núcleos dorsal e mediano da rafe também apresentaram aumento da expressão de Fos após a fuga induzida pela bicuculina. Essas estruturas, juntamente com o hipocampo e a amígdala, estão envolvidas no medo

condicionado contextual (Avanzi & Brandão, 2001; Carrive *et al.*, 1997, 2000; Silva *et al.*, 2002; Borelli *et al.*, 2005).

A administração de bicuculina na SCPdl resultou em aumento significativo da proteína Fos no núcleo central da amígdala (CeA). A SCP e o CeA mantêm conexões diretas e recíprocas (Rizvi *et al.*, 1991; Pitkänen, 2000). Tais achados apóiam outros relatos que indicam a participação dessas estruturas na mediação da expressão de medo condicionado e de respostas defensivas incondicionadas (Rizvi *et al.*, 1991; Shipley *et al.*, 1991; Vianna & Brandão, 2003). Já o núcleo basolateral da amígdala não apresentou aumento da expressão da proteína Fos após a fuga. Esses resultados corroboram os achados de Sullivan e colaboradores (2003) que verificaram aumento da proteína Fos no CeA, mas não no núcleo lateral do complexo amigdalóide após a administração de doxapram, um estimulante respiratório que acentua comportamentos relacionados à ansiedade em animais submetidos ao teste da arena. Além disso, Martinez e colaboradores (2006) têm demonstrado que não ocorre alteração dos limiares de congelamento e fuga, induzidos pela estimulação elétrica da SCPD, após a inativação da amígdala.

Nos núcleos hipotalâmicos, a injeção de bicuculina intra-SCPdl promoveu aumento significativo na expressão da proteína Fos no AHC, VMHdm e PMD. Tais resultados estão de acordo com estudos comportamentais que mostraram que a estimulação elétrica ou química dessas áreas hipotalâmicas induz o comportamento de fuga (Brandão *et al.*, 1986). O PMD tem sido considerado uma “estrutura-chave” na mediação das respostas de medo inato e é uma das principais fontes de aferência para a SCPdl (Canteras *et al.*, 1997). Congelamento e fuga induzidos pela exposição ao predador promovem um aumento na expressão de Fos no PMD (Canteras & Swanson 1992; Comoli *et al.*, 2003). Tem sido sugerido que projeções do PMD para SCPdl poderiam envolver o hipotálamo anterior e o VMHdm, estruturas que compõem o circuito hipotalâmico de defesa (Canteras, 2002; 2003).

No mesencéfalo, a microinjeção de bicuculina intra-SCPdl resultou em expressiva imunorreatividade à proteína Fos nas colunas da SCP, no núcleo cuneiforme, no colículo superior e no *locus coeruleus*. Uma marcação mais pronunciada foi obtida no CnF – principal via de saída para respostas defensivas mediadas pela SCPD e pelo colículo superior (Dean *et al.*, 1989; Keay & Bandler, 2001) – e no LC – estrutura comumente referida como determinante nos circuitos encefálicos associados ao medo e ansiedade (Lino-de-Oliveira *et al.*, 1991; Ennis *et al.*, 1991; Sandner *et al.*, 1993). Curiosamente, a semicarbazida e a bicuculina não promoveu aumento significativo da expressão de Fos no colículo inferior, estrutura que mantém conexões diretas com a SCP (Herrera *et al.*, 1988). Isso não significa, entretanto, que tais estruturas não estejam conectadas funcionalmente na organização do comportamento defensivo uma vez que a estimulação elétrica ou a microinjeção de NMDA na SCPD promove aumento da imunorreatividade Fos no CI (Vianna *et al.*, 2003; Ferreira-Netto *et al.*, 2005). Além disso, esses resultados em conjunto podem indicar que a ativação dos circuitos neurais de defesa pode depender também dos mecanismos neuroquímicos alterados pelas drogas.

Particularmente em roedores, a resposta de defesa na presença de um estímulo aversivo envolve a ativação da SCPD, do hipotálamo medial e da amígdala e produz comportamentos de congelamento pronunciado, fuga, luta ou imobilidade tônica (Brandão *et al.*, 1986; Dielenberg & McGregor, 2001; Canteras, 2003; Comoli *et al.*, 2003; Leite-Panissi *et al.*, 2003). A fuga induzida pela estimulação elétrica (Vianna *et al.*, 2003) ou química da SCPD o óxido nítrico (De Oliveira *et al.*, 2000) e o aminoácido excitatório NMDA (Ferreira-Netto *et al.*, 2005) promove um padrão similar de distribuição da proteína Fos nas estruturas que compõem o sistema encefálico aversivo. Desse modo, tem sido sugerido que alterações em diferentes sistemas de neurotransmissores na SCPD podem participar da circuitaria neural comum relacionada à ansiedade (Bernard & Bandler, 1998; Coplan & Lydiard, 1998).

A hipótese de que as respostas de congelamento e fuga ativam diferentes conjuntos de estruturas encefálicas foi confirmada pelos presentes resultados. Diferentemente da fuga que causou um aumento da expressão de Fos na maioria das estruturas analisadas, o congelamento promoveu um aumento significativo de Fos no LD e na SCPvl. Dentre as estruturas avaliadas, o LD foi a única, fora do tronco encefálico, ativada durante o congelamento induzido pela semicarbazida. Esse achado é indicativo de que a SCPdl pode enviar informações aversivas para estruturas cerebrais superiores e não é, unicamente, um centro neural para a expressão de respostas defensivas. Parece natural que, durante o congelamento, os animais se orientem para o estímulo ameaçador. O LD assumiria o papel de filtragem das informações aversivas. Essa proposta corrobora estudos de Ferreira-Netto e colaboradores (2005), ao mostrar que o glutamato injetado em concentração que produz o congelamento na SCPD causou um padrão de distribuição de Fos muito distinto daquele obtido com o NMDA injetado na SCPD em concentração que induz fuga. Enquanto o glutamato ativou estruturas envolvidas no processamento de informações sensoriais como o LD, CS e CI, o NMDA promoveu fuga e uma ampla ativação do encéfalo, assim como a bicuculina, no presente estudo. Com base nesse conjunto de resultados, foi sugerido que, durante o congelamento induzido por essa droga na SCPD, ocorre a aquisição de informações aversivas que são enviadas para o LD, conhecido como núcleo transicional com projeções para áreas límbicas e neocorticais (van Groen & Wyss, 1992; Krout & Loewy, 2000; Shibata, 2000; van Groen *et al.*, 2002). Já durante a fuga, todas as estruturas envolvidas na expressão dos comportamentos defensivos devem ser ativadas – como foi demonstrado no presente trabalho – e os diferentes estados sensorial e motor podem agir como variáveis críticas para os padrões distintos de imunorreatividade Fos no encéfalo (Keay & Bandler, 2001; Mongeau *et al.*, 2003).

Finalmente, nas estruturas corticais analisadas – Cg e PrL –, a semicarbazida ou a bicuculina intra-SCPdl não foram capazes de induzir um aumento significativo no número de

neurônios Fos positivos, quando comparado ao grupo salina. Embora projeções corticais exerçam um controle sobre o substrato neural da aversão na SCPD, projeções ascendentes das colunas SCP para regiões corticais não têm sido claramente caracterizadas até o momento (Floyd *et al.*, 2000; Lacroix *et al.*, 2000; Vianna & Brandão 2003). De acordo com essa visão, tem sido relatado que o “disparo” de um ataque de pânico inesperado é relacionado a um aumento regional do fluxo sanguíneo cerebral no hipotálamo, mas não no córtex medial pré-frontal (Javanmard *et al.*, 1999), o que sugere que a ativação do eixo hipotálamo-SCP não está necessariamente associada ao funcionamento do córtex pré-frontal. A ativação desse eixo, sem a participação de estruturas corticais, poderia ser a origem da desordem do pânico (Sweards & Sweards, 2002). Curiosamente, o aumento do nível extracelular de dopamina no córtex pré-frontal – considerado um marcador biológico de condições estressantes – tem sido obtido após a estimulação aversiva do CI, mas não após a estimulação da SCPD (Cuadra *et al.*, 2000).

A estimulação da SCPdl com semicarbazida ou bicuculina promoveu uma distribuição de células Fos imunorreativas similar ao mapeamento descrito previamente com a estimulação elétrica da SCPD nos limiares de congelamento e fuga (Vianna *et al.*, 2003). Entretanto, as diferenças observadas entre tais estudos podem estar relacionadas aos procedimentos neles utilizados. Com a estimulação elétrica, a corrente pode ser desligada logo após a obtenção das respostas comportamentais, enquanto a reação defensiva induzida pela estimulação química permanece durante o período correspondente à ação da droga.



## **EXPERIMENTO II**

Distribuição da proteína Fos no encéfalo de ratos submetidos à estimulação química do CI

---

---

Nesse estudo, foi avaliada a ativação de estruturas encefálicas por meio da detecção da proteína Fos no congelamento ou na fuga induzidos pela microinjeção de semicarbazida ou bicuculina no CI.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Os materiais e métodos utilizados foram iguais aos do Experimento I, exceto a coordenada utilizada para colocação da cânula no CI dos animais; a cânula foi introduzida, verticalmente, com as seguintes coordenadas, considerando o bregma como referência: antero-posterior: 8,7 mm; médio-lateral: 1,6 mm e dorso-ventral: -3,5 mm. A concentração de semicarbazida utilizada neste experimento foi de 6 µg/0,2 µL.

## **RESULTADOS**

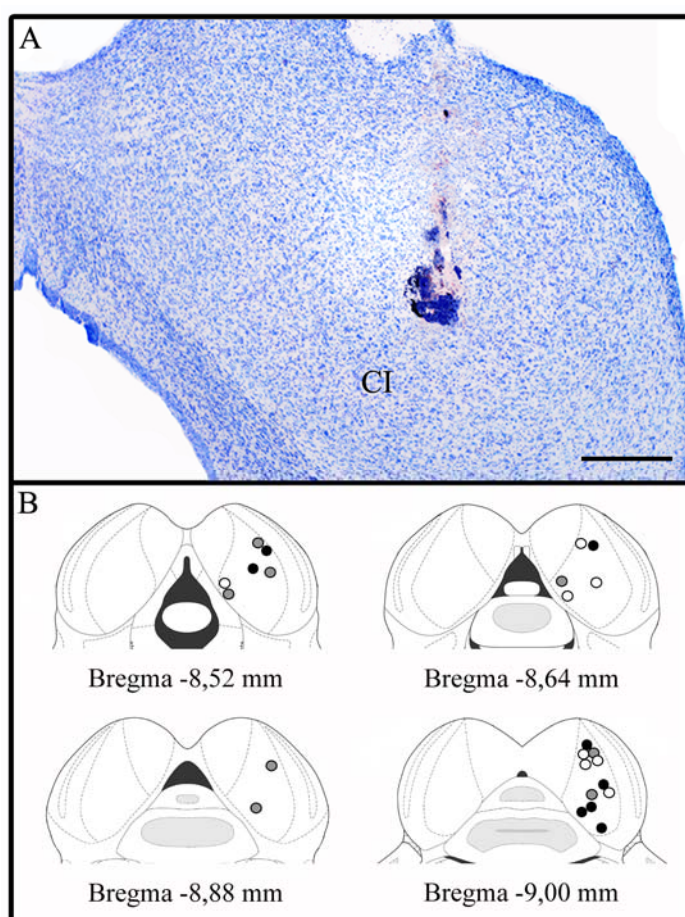
---

---

## RESULTADOS

### *Localização dos sítios de estimulação química no CI*

A análise histológica indicou que os sítios de estimulação química dos animais utilizados nesse estudo estavam localizados no núcleo central do colículo inferior. Uma fotomicrografia representativa ilustra o ponto de microinjeção e os sítios identificados e assinalados – em diagramas modificados do Atlas de Paxinos e Watson (2005) – podem ser vistos na figura 12.



**Figura 12.** Fotomicrografia que ilustra um exemplo típico do sítio de microinjeção no colículo inferior; barra: 400  $\mu\text{m}$  (A). Representação esquemática dos pontos de microinjeção no CI tendo como referência o Atlas Paxinos e Watson (2005). O símbolo (○) indica os animais que receberam microinjeção de salina, (◐) de semicarbazida e (●) de bicuculina (B).

### ***Efeitos comportamentais***

Os efeitos comportamentais obtidos com a administração de semicarbazida e de bicuculina no CI foram, em geral, parecidos com os descritos no experimento I, com algumas diferenças. A concentração efetiva de semicarbazida (6 µg/0,2 µl) intra-CI para produzir congelamento foi maior que a concentração utilizada na SCPdl e o comportamento de fuga induzido pela microinjeção de bicuculina no CI foi menos intenso e explosivo, quando comparado com a resposta observada após a injeção da mesma concentração na SCPdl.

As respostas comportamentais foram analisadas em três blocos de 10 minutos cada. A ANOVA de dois fatores mostrou uma diferença estatística do tratamento sobre cruzamento [ $F_{(2,42)}=17,76$ ;  $p<0,01$ ], congelamento [ $F_{(2,42)}=25,37$ ;  $p<0,01$ ] e salto [ $F_{(2,42)}=7,46$ ;  $p<0,01$ ]. Houve também efeito significativo do tempo sobre o cruzamento e congelamento [ $F_{(2,42)}=4,57$  e  $5,83$ ;  $p<0,05$ ], mas não sobre o salto [ $F_{(2,42)}=1,52$ ;  $p>0,05$ ]. Não houve interação entre tratamento e tempo para as respostas comportamentais [ $F_{(4,42)}$  variaram de 1,51 a 2,43;  $p>0,05$ ]. A comparação *post hoc* de Newman-Keuls revelou que os efeitos sobre cruzamento e salto foram devidos apenas ao tratamento de bicuculina, em relação ao grupo controle. Entretanto, o teste *post hoc* indicou que tanto a semicarbazida quanto a bicuculina aumentaram a duração do congelamento, na comparação com o grupo controle (Tabela 3).

**Tabela 3.** Dados apresentados como média  $\pm$  EPM do número de cruzamentos, saltos e duração de congelamento em segundos, após a microinjeção de salina, semicarbazida (SCB; 6  $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$ ) ou bicuculina (BIC; 40  $\text{ng}/0.2 \mu\text{l}$ ) no CI de ratos. A resposta comportamental foi analisada na arena durante 30 minutos, em três blocos de 10 minutos cada. \*  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo controle, de acordo com o teste *post hoc* de Newman-Keuls.

	Cruzamentos		
	SAL	SCB	BIC
10 min	40.13 $\pm$ 8.88	43.38 $\pm$ 9.10	352.90 $\pm$ 126.70*
20 min	14.25 $\pm$ 4.03	7.75 $\pm$ 6.65	202.60 $\pm$ 43.92*
30 min	8.75 $\pm$ 2.41	13.63 $\pm$ 5.92	68.88 $\pm$ 30.78
	Saltos		
	SAL	SCB	BIC
10 min	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	20.75 $\pm$ 12.32*
20 min	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	12.00 $\pm$ 3.90
30 min	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	2.12 $\pm$ 1.36
	Congelamento		
	SAL	SCB	BIC
10 min	5.25 $\pm$ 2.38	231.80 $\pm$ 44.86*	221.30 $\pm$ 52.53*
20 min	4.5 $\pm$ 3.72	353.30 $\pm$ 31.33*	349.50 $\pm$ 60.88*
30 min	0 $\pm$ 0	288 $\pm$ 35.73*	339.8 $\pm$ 55.05*

### *Expressão de proteína Fos*

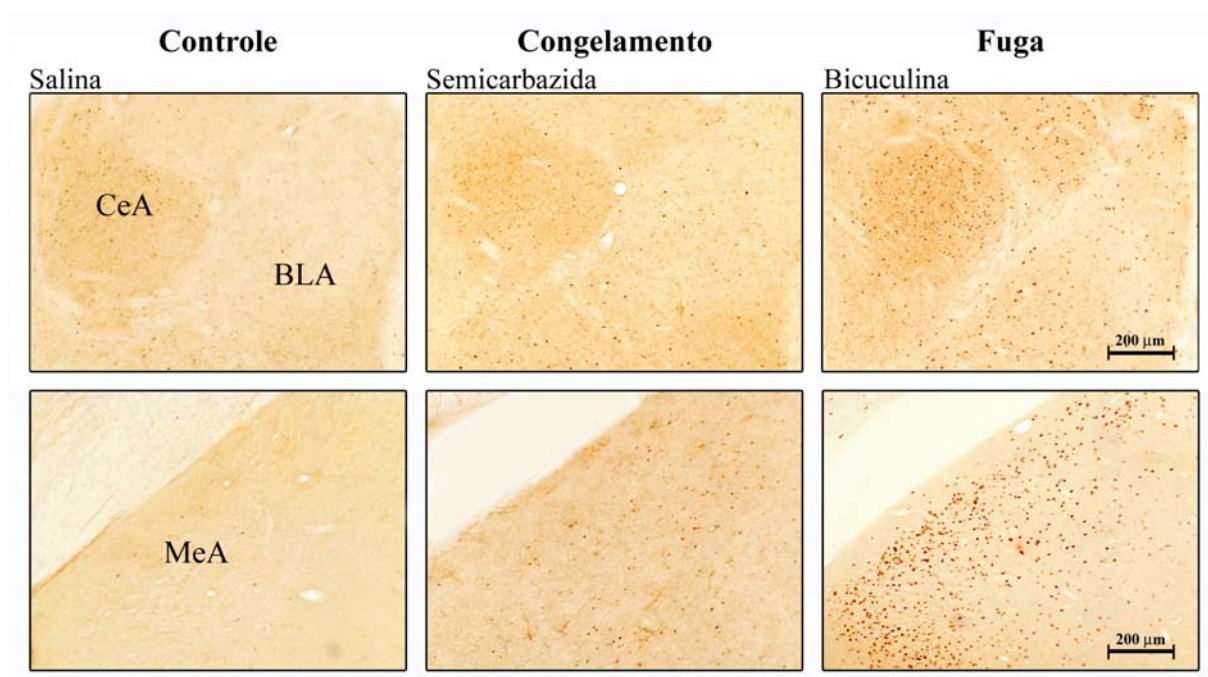
Após a microinjeção de salina no CI, núcleos neuroniais com imunorreatividade Fos foram encontrados em ambos os hemisférios cerebrais. As células apresentavam-se esparsamente distribuídas, sem formar aglomerado.

Os resultados obtidos com a análise quantitativa da imunorreatividade da proteína Fos nas estruturas encefálicas estudadas após a redução do controle GABAérgico no CI estão sumarizados na Tabela 3 do Anexo. Fotomicrografias de algumas das regiões podem ser vistas na figura 13 (estruturas telencefálicas), na figura 14 (estruturas diencefálicas) e na figura 15 (estruturas mesencefálicas). Os gráficos com as médias de células Fos imunorreativas nos grupos experimentais podem ser vistos nas figuras 16-18.

*Congelamento*: a ANOVA de dois fatores mostrou que o grupo tratado com semicarbazida promoveu um aumento significativo na densidade de neurônios Fos-IR apenas na coluna dorsomedial da SCP [ $F_{(1,28)} = 9,04$ ;  $p < 0,05$ ]. Não houve efeito significativo no lado da microinjeção [ $F_{(1,28)} = 1,22$ ;  $p > 0,05$ ] e na interação tratamento e lado [ $F_{(1,28)} = 0,82$ ;  $p > 0,05$ ] Figura 17.

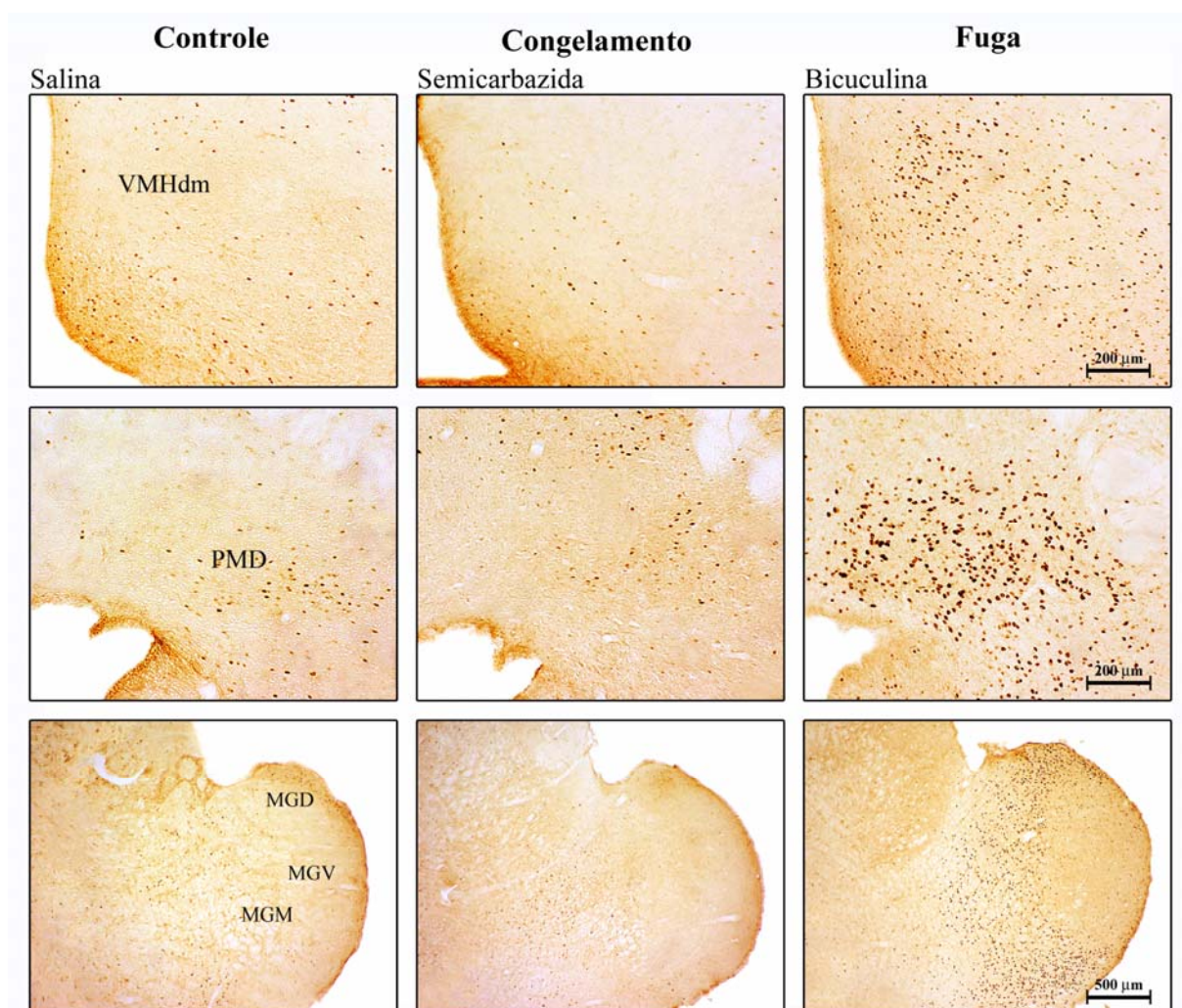
*Fuga*: a ANOVA de dois fatores mostrou que a administração de bicuculina no CI induziu aumento significativo na densidade de núcleos neuronais Fos-positivos, na maioria das áreas encefálicas relacionadas. Como pode ser observado nos gráficos, os efeitos mais salientes desse tratamento foram obtidos nos núcleos hipotalâmicos – PaV [ $F_{(1,24)} = 22,39$ ;  $p < 0,01$ ]; AHC [ $F_{(1,24)} = 42,45$ ;  $p < 0,01$ ]; LH [ $F_{(1,24)} = 33,89$ ;  $p < 0,01$ ]; VMHdm [ $F_{(1,28)} = 39,49$ ;  $p < 0,01$ ]; PMD [ $F_{(1,28)} = 22,15$ ;  $p < 0,01$ ]; nos amígdalóides – CeA [ $F_{(1,28)} = 14,27$ ;  $p < 0,01$ ]; BLA [ $F_{(1,28)} = 20,63$ ;  $p < 0,01$ ]; MeA [ $F_{(1,27)} = 31,00$ ;  $p < 0,01$ ]; nos talâmicos – LD [ $F_{(1,22)} = 9,86$ ;  $p < 0,01$ ]; MGD [ $F_{(1,20)} = 9,24$ ;  $p < 0,01$ ]; MGM [ $F_{(1,20)} = 37,96$ ;  $p < 0,01$ ], nas estruturas mesencefálicas – CI [ $F_{(1,28)} = 18,24$ ;  $p < 0,01$ ]; SC [ $F_{(1,28)} = 49,86$ ;  $p < 0,01$ ]; CnF [ $F_{(1,28)} = 50,61$ ;  $p < 0,01$ ] e em todas as colunas da SCP [ $F_{(1,28)}$  variaram de 7,39 a 134,55;  $p < 0,05$ ].

Em algumas regiões, houve interação entre tratamento e lado da microinjeção e a marcação foi significativamente maior do lado *ipsilateral*, o da microinjeção: CS [ $F_{(1,28)} = 9,84$ ;  $p < 0,01$ ]; CnF [ $F_{(1,28)} = 4,27$ ;  $p < 0,05$ ] MGM [ $F_{(1,20)} = 7,55$ ;  $p < 0,05$ ]. As colunas da SCP [ $F_{(1,28)}$  variaram de 7,05 a 40,75;  $p < 0,05$ ], exceto a lateral da SCP [ $F_{(1,28)} = 0,69$ ;  $p > 0,05$ ]. Esses resultados estão ilustrados nas figuras 14-16.

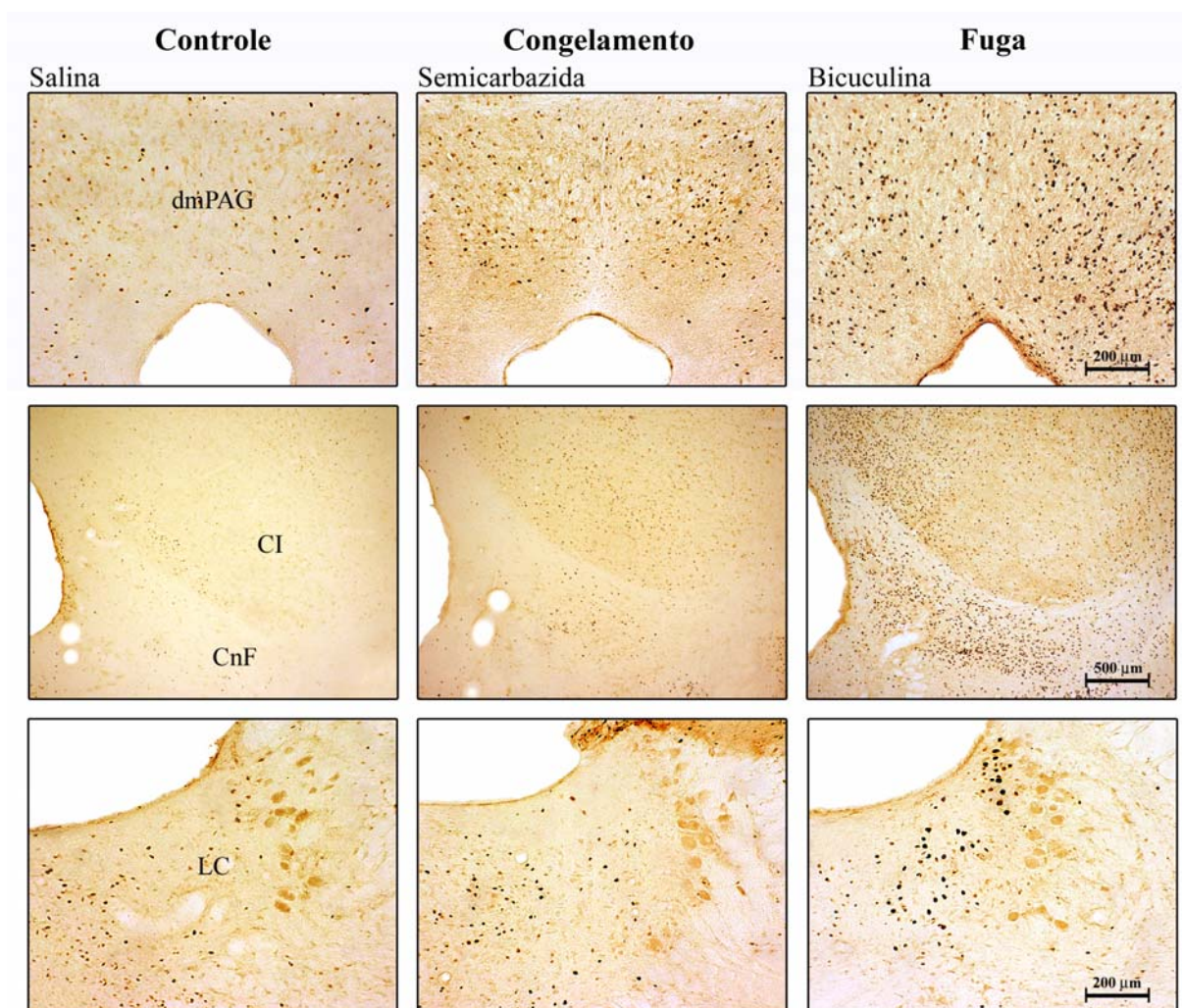


**Figura 13.** Fotomicrografias de sessões coronais (40  $\mu\text{m}$ ) de encéfalos de ratos que ilustram a distribuição da imunorreatividade à proteína Fos, após congelamento (coluna intermediária) e fuga (coluna da direita), induzidos pela microinjeção de semicarbazida (6  $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ ) e bicuculina (40  $\text{ng}/0,2 \mu\text{L}$ ), respectivamente, no CI em comparação com o grupo controle (coluna da esquerda). Estruturas telencefálicas - BLA: núcleo basolateral da amígdala; CeA: núcleo central da amígdala e MeA: núcleo medial da amígdala.

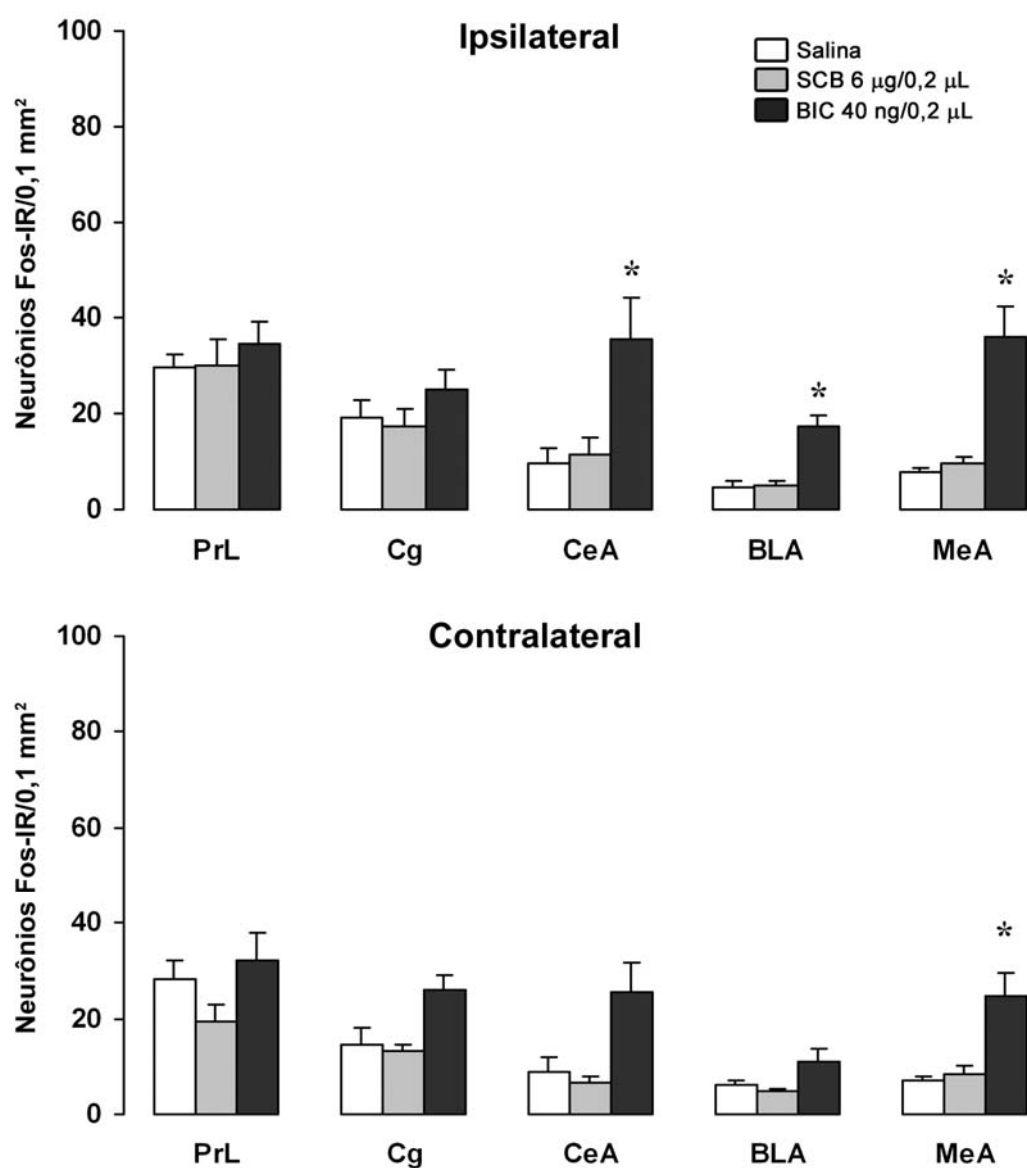




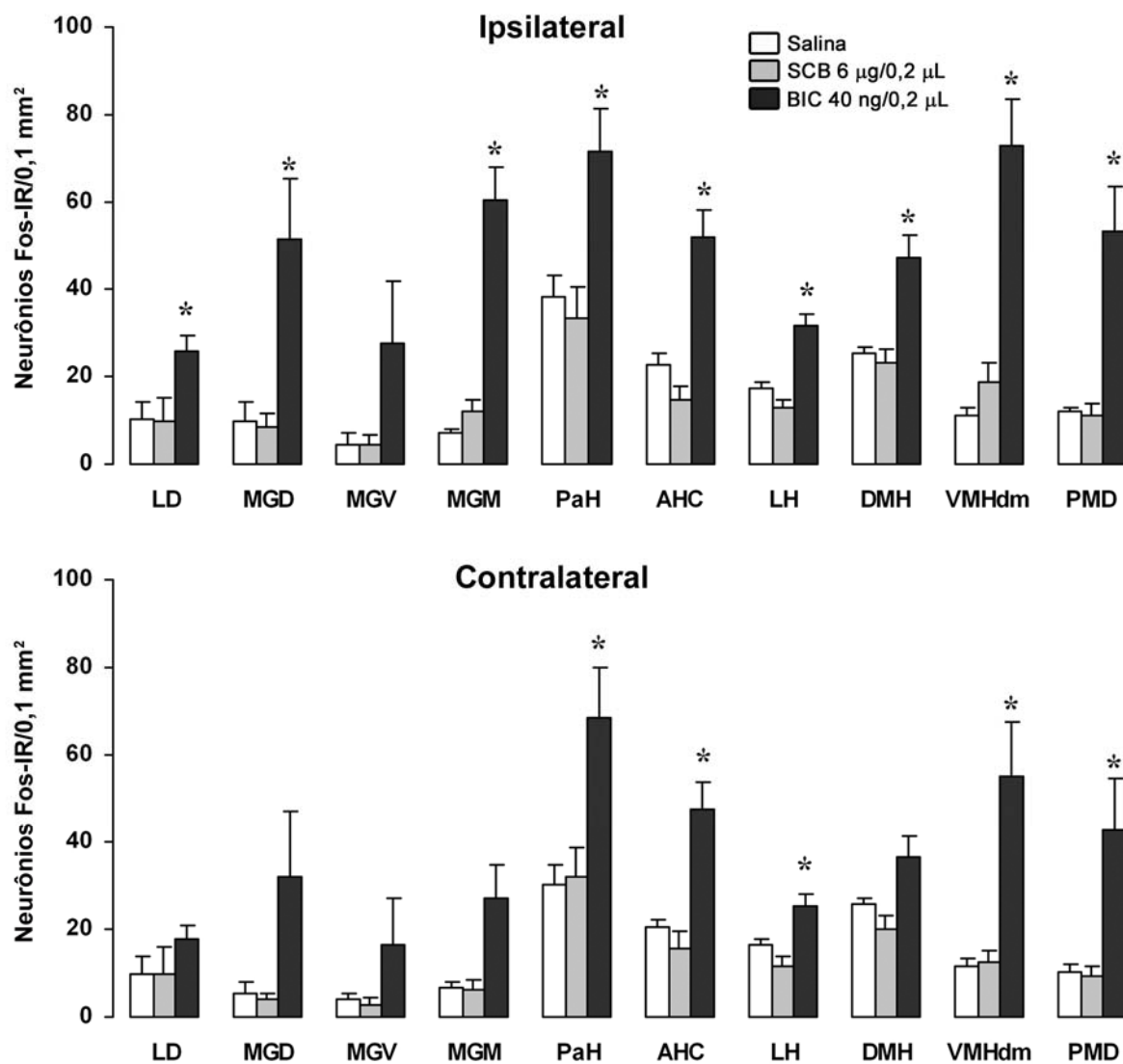
**Figura 14.** Fotomicrografias de sessões coronais (40  $\mu\text{m}$ ) de encéfalos de ratos que ilustram a distribuição da imunorreatividade à proteína Fos, após congelamento (coluna intermediária) e fuga (coluna da direita), induzidos pela microinjeção de semicarbazida (6  $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ ) e bicuculina (40  $\text{ng}/0,2 \mu\text{L}$ ), respectivamente, no CI em comparação com o grupo controle (coluna da esquerda). Estruturas diencefálicas - VMHdm: núcleo ventromedial do hipotálamo, parte dorsomedial; PMD: núcleo premamilar dorsal; MGD: núcleo geniculado medial parte dorsal, MGV: núcleo geniculado medial parte ventral e MGM: núcleo geniculado medial parte medial.



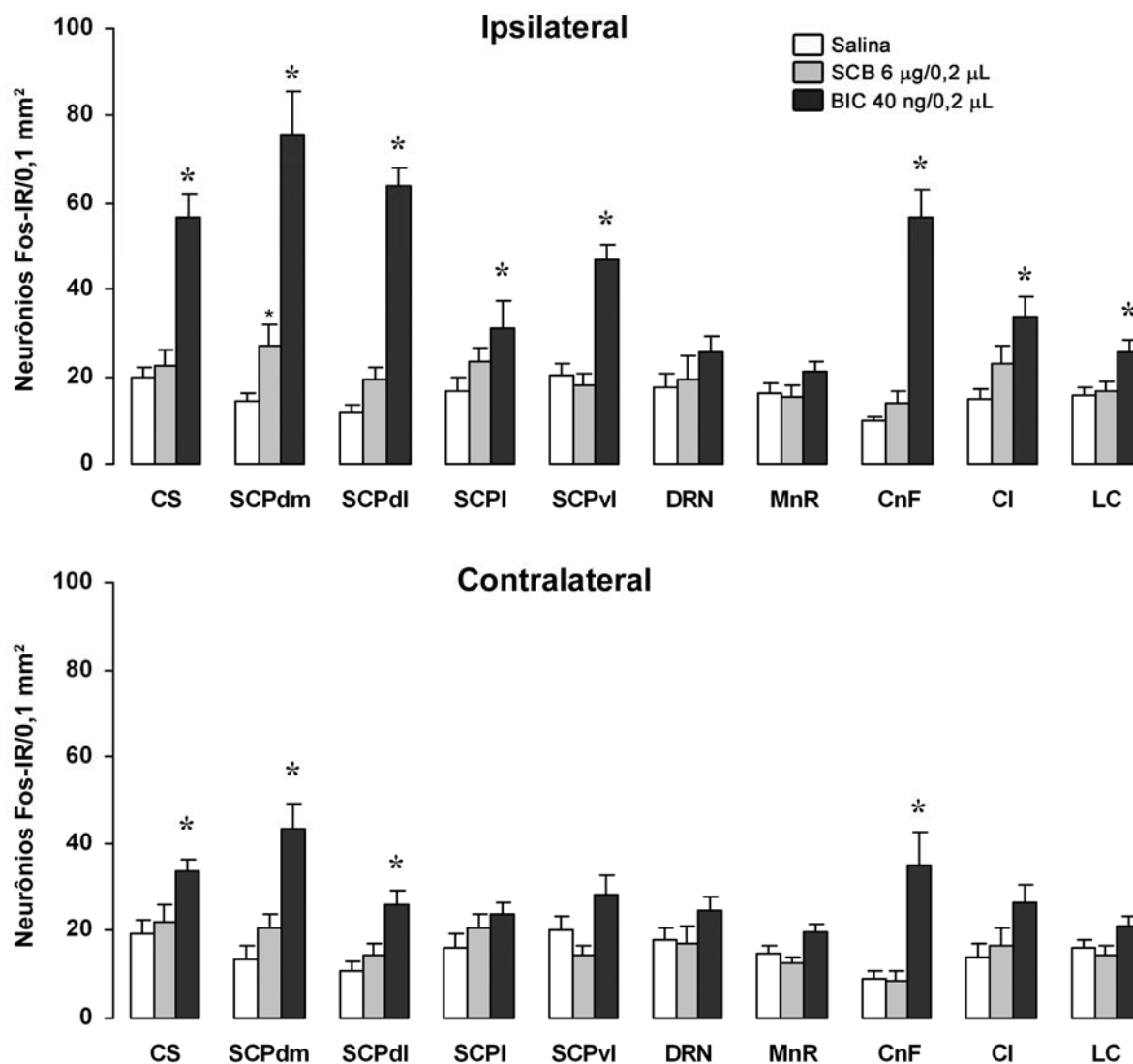
**Figura 15.** Fotomicrografias de sessões coronais (40  $\mu\text{m}$ ) de encéfalos de ratos que ilustram a distribuição da imunorreatividade à proteína Fos, após congelamento (coluna intermediária) e fuga (coluna da direita), induzidos pela microinjeção de semicarbazida (6  $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ ) e bicuculina (40  $\text{ng}/0,2 \mu\text{L}$ ), respectivamente, no CI em comparação com o grupo controle (coluna da esquerda). Estruturas mesencefálicas - SCPdm: substância cinzenta periaquedutal dorsomedial; CI: núcleo central do colículo inferior; CnF: núcleo cuneiforme; ponte - LC: locus coeruleus



**Figura 16.** Número de neurônios Fos imunorreativos (Fos-IR) em estruturas telencefálicas após a microinjeção de salina, semicarbazida (SCB; 6 µg/0,2 µL) ou bicuculina (BIC; 40 ng/0,2 µL) no CI de ratos. As colunas representam as médias e as barras, o EPM. O número de células Fos-IR foi obtido de áreas pré-fixadas de 0,1 mm<sup>2</sup>. Cada estrutura encefálica foi quantificada bilateralmente, *ipsilateral* e *contralateral* à microinjeção (n = 6-8 por estrutura); \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle, de acordo com o teste de Newman-Keuls.



**Figura 17.** Número de neurônios Fos imunorreativos (Fos-IR) em estruturas diencefálicas após a microinjeção de salina, semicarbazida (6 µg/0,2 µL) ou bicuculina (40 ng/0,2 µL) no CI de ratos. As colunas representam as médias e as barras, o EPM. O número de células Fos-IR foi obtido de áreas pré-fixadas de 0,1 mm<sup>2</sup>. Cada estrutura encefálica foi quantificada bilateralmente, *ipsilateral* e *contralateral* à microinjeção (n = 6-8 por estrutura); \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle, de acordo com o teste de Newman-Keuls.



**Figura 18.** Número de neurônios Fos imunorreativos (Fos-IR) em estruturas mesencefálicas e pontina após a microinjeção de salina, semicarbazida (6 µg/0,2 µL) ou bicuculina (40 ng/0,2 µL) no CI de ratos. As colunas representam as médias e as barras, o EPM. O número de células Fos-IR foi obtido de áreas pré-fixadas de 0,1 mm<sup>2</sup>. Cada estrutura encefálica foi quantificada bilateralmente, *ipsilateral* e *contralateral* à microinjeção (n = 6-8 por estrutura); \*  $p < 0.05$  quando comparado com o grupo controle, de acordo com o teste de Newman-Keuls.

**DISCUSSÃO**

---

---

## DISCUSSÃO

O próximo passo do presente trabalho foi verificar os circuitos neurais da aversão ativados pela estimulação química do CI. Considerando-se que o GABA exerce um controle inibitório tônico sobre o substrato neural da aversão, no teto mesencefálico, foram utilizadas drogas que reduzem a transmissão GABAérgica intra-CI a fim de ativar somente receptores pós-sinápticos.

A análise comportamental mostrou que a microinjeção de bicuculina no CI promoveu reações de fuga intercaladas com respostas de congelamento nos animais. Já a administração de semicarbazida no CI induziu somente o congelamento. A hipótese de que as respostas de congelamento e fuga induzidas pela estimulação do CI representam dois tipos de reações defensivas, com circuitos neurais distintos, é também confirmada neste estudo, uma vez que injeções de semicarbazida ou de bicuculina no CI promoveram um padrão distinto de distribuição da proteína Fos no encéfalo de ratos.

A fuga induzida pela bicuculina foi associada ao aumento de expressão de Fos na maioria das estruturas analisadas no presente trabalho. Por outro lado, o congelamento induzido pela semicarbazida promoveu uma marcação significativa apenas na coluna dorsomedial da SCP. O congelamento parece ser a resposta apropriada quando o animal está adquirindo informações do ambiente antes de optar por fugir da situação ameaçadora. Nesse sentido, parece natural que, durante esse comportamento, os animais se orientem para o estímulo ameaçador, uma vez que a fuga não seria a resposta adequada durante o processo de aquisição de informações. A SCPdm pode ser recrutada a participar dos circuitos neurais envolvidos no processamento das informações aversivas durante o congelamento induzido pela estimulação do CI. Uma evidência, embora indireta, que corrobora tal idéia está no trabalho de Comoli e colaboradores (2003) que demonstraram que ratos expostos ao seu predador natural – o gato – exibem intenso congelamento com alta densidade de células Fos

imunorreativas na coluna dorsomedial da SCP, enquanto a expressão de Fos nas outras colunas da SCP mostrou-se esparsamente distribuída.

É possível que o congelamento gerado na SCPD e no CI cumpram funções biológicas distintas. O processo de aquisição das informações durante o congelamento induzido pela estimulação da SCPD com NMDA foi relacionado com a ativação do núcleo laterodorsal do tálamo, do colículo superior e do inferior (Ferreira-Netto *et al.*, 2005); já a distribuição de Fos resultante da estimulação do CI com semicarbazida foi restrita a SCPdm. A ativação induzida pela estimulação química da SCPdl foi maior e alcançou o teto mesencefálico e circuitos talâmicos. O envolvimento diferenciado dessas estruturas na geração e elaboração do medo encontra suporte em estudos que apontam a SCPD como a principal estrutura envolvida nos ataques de pânico, consequência de uma ampla estimulação sensorial – visual, tátil e proprioceptiva –, enquanto o CI parece ter uma participação mais seletiva no medo com o processamento de sinais acústicos de natureza aversiva para a completa expressão desse transtorno (Borelli *et al.*, 2004; Brandão *et al.*, 2005; Ferreira-Netto e Guimarães, 2004).

Em contraste com o experimento I, com estimulação química da SCPdl, o núcleo dorsal e mediano da rafe, estruturas encefálicas também envolvidas na ansiedade, não se mostraram ativadas após a administração de semicarbazida ou de bicuculina no CI.

Neste experimento, o número de neurônios Fos imunorreativos nas estruturas corticais analisadas (Cg, PrL), não foi observada alteração associada às respostas de congelamento e fuga. Da mesma forma ocorrida em relação à SCPdl, esses resultados sugerem que estruturas corticais podem não ter controle direto sobre o substrato neural da aversão no CI (Brandão *et al.*, 2005). A bicuculina, por sua vez, promoveu aumento significativo na expressão de Fos nos núcleos amigdalóides BLA, CeA e MeA. Resultados similares foram obtidos com a estimulação elétrica do CI no limiar de fuga (Lamprea *et al.*, 2002) e após a microinjeção de NMDA nessa estrutura (Ferreira-Netto, comunicação pessoal). Tais núcleos estão



criticamente envolvidos na modulação de reações inatas e condicionadas a estímulos ameaçadores (Blanchard & Blanchard, 1972; Davis & Whalen, 2001; Maissonette *et al.*, 1996; Mongeau *et al.*, 2003). Tem sido proposto um papel diferencial de mecanismos amigdalóides no medo incondicionado gerado na SCPD e no CI. De fato, a inativação do núcleo basolateral da amígdala com muscimol aumenta, de forma significativa, as conseqüências aversivas da estimulação do CI, sem alterar as respostas induzidas pela estimulação da SCPD (Macedo *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2006).

Os resultados imunistoquímicos revelaram que a fuga induzida pela bicuculina promoveu aumento de células Fos imunorreativas no núcleo geniculado medial (parte medial e dorsal). Trabalhos prévios têm proposto que as respostas de medo induzidas por sinais aversivos de natureza auditiva envolvem projeções do CI para a parte medial do núcleo geniculado medial (MGM). Desse núcleo talâmico as informações aversivas são diretamente transmitidas para a amígdala e para o córtex auditivo (Brandão *et al.*, 1993, 1999, 2001; Marsh *et al.*, 2002; LeDoux *et al.*, 1988, 1990; Rizvi *et al.*, 1991).

Um quadro de ativação hipotalâmica similar ao descrito no experimento I com a SCPDl foi observado no presente estudo. A injeção de bicuculina, mas não de semicarbazida, no CI, também induziu aumento significativo na expressão da proteína Fos nos núcleos dorsomedial (DMH), ventromedial (VMHdm), lateral (LH), anterior (AHC) e pré-mamilar dorsal (PMD) do hipotálamo. Tal circuito integrado de estruturas hipotalâmicas é também fortemente ativado pelo odor de gato (Dielenberg & McGregor, 2001) e após a estimulação elétrica do CI no limiar de fuga (Lamprea *et al.*, 2002). Esses resultados corroboram estudos comportamentais mostrando que a estimulação elétrica ou química de áreas hipotalâmicas induz fuga, mas não congelamento (Bandler *et al.*, 1985; Brandão *et al.*, 1986, 1994; Comoli *et al.*, 2000).

O PMD apresentou, em particular, um expressivo número de neurônios Fos imunorreativos, bilateralmente, após a microinjeção de bicuculina no CI. Outros estudos mostraram que a exposição ao predador promove congelamento, fuga e saltos acompanhados pelo aumento da expressão de Fos no PMD (Blanchard *et al.*, 2005; Canteras 2002; Comoli *et al.*, 2003). Por outro lado, lesão eletrolítica ou neurotóxica do PMD produz uma redução da resposta defensiva de ratos na presença do predador ou do odor deste, o que sugere um papel funcional crítico para o PMD na modulação da reação defensiva (Blanchard *et al.*, 2005; Canteras *et al.*, 1997; Markham *et al.*, 2004).

Neste estudo, destaca-se o papel da SCPdm na resposta de congelamento induzida por estimulação do CI com semicarbazida. A SCPdm parece ser importante para a expressão da resposta de congelamento e por contribuir, de alguma forma, no padrão das respostas somatomotoras, endócrinas e autonômicas expressas por animais frente a estímulos ameaçadores (Bernardis, 1975; Blanchard *et al.*, 2005). Assim, quando um animal se defronta com seu predador, o CI, a SCPdm, o hipotálamo medial e a amígdala agem em concerto na produção da reação de defesa. O fascículo dorsal de Schultz conecta a SCPdm à região periventricular hipotalâmica e pode atuar como uma ponte indutora de ação integrada do sistema encefálico aversivo (Gomita *et al.*, 1988). A partir dessa ativação inicial, dependendo da intensidade do estímulo aversivo, tal sistema organizaria outras respostas na escala hierárquica de defesa, como a fuga ou, quando ela não é possível, a imobilidade (Brandão *et al.*, 1999, Graeff *et al.*, 1986; Leite-Panisssi *et al.*, 2003).

Entre as estruturas mesencefálicas, além das colunas da SCP, a marcação mais pronunciada foi obtida no núcleo cuneiforme (CnF) – principal estação de saída para as respostas defensivas mediadas pela SCPD, CS e CI (Redgrave *et al.*, 1988; Depoortere *et al.*, 1990; Key & Bandler, 2001). Tem sido mostrado que os neurônios do CnF são ativados pela exposição de ratos ao odor de gato (Dielenberg & McGregor, 2001), por estimulação elétrica

da SCPD e do CI (Lamprea *et al.*, 2002; Vianna *et al.*, 2003) e por estimulação química da SCPD (Ferreira-Netto *et al.*, 2005).

Concluindo, o congelamento induzido pela semicarbazida foi associado ao aumento de células Fos imunorreativas apenas na coluna dorsomedial da SCP. Essa estrutura parece ser importante estação-relé no teto mesencefálico de informações aversivas relacionadas ao congelamento para centros encefálicos superiores. Por outro lado, a fuga induzida pela bicuculina foi acompanhada por uma intensa expressão de Fos nas estruturas encefálicas analisadas. A atividade encefálica durante o congelamento parece depender da extensão das conexões anatômicas da SCPdm, enquanto uma ampla ativação do sistema límbico predomina durante o comportamento de fuga induzido pela estimulação do CI.

**CONCLUSÕES**

---

---

## CONCLUSÕES

- O LD foi a única estrutura, fora do tronco encefálico, ativada durante o congelamento induzido pela semicarbazida na SCPdl. Esse achado é indicativo de que a SCPdl pode enviar informações aversivas para estruturas encefálicas superiores. O LD assumiria o papel de filtragem das informações aversivas.
- A fuga induzida pela bicuculina, na SCPdl, promoveu uma ampla ativação dos substratos neurais da aversão.
- O congelamento induzido pela microinjeção de semicarbazida no CI promoveu aumento da expressão da proteína Fos somente na SCPdm.
- Na aquisição de informações aversivas que ocorrem durante o comportamento de congelamento, o CI, provavelmente, utiliza a SCPdm como uma estação-relé para centros encefálicos superiores. Por outro lado, todas as estruturas envolvidas na expressão do comportamento defensivo foram ativadas pelo comportamento de fuga induzido pela bicuculina no CI.
- Circuitos neurais distintos foram recrutados pelos comportamentos de congelamento e fuga induzidos pela inibição de mecanismos GABAérgicos na SCPdl e no CI.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKIN, L.M.; IRVINE, D.R.; NELSON, J.E.; MERZENICH, M.M.; CLAREY, J.C. Frequency representation in the auditory midbrain and forebrain of a marsupial, the northern native cat (*Dasyurus hallucatus*). *Brain, Behavior and Evolution*, 29 (1986) 17-28.
- ARMSTRONG, R.C.; MONTMINY, M.R. Transsynaptic control of gene expression. *Annual Review of Neuroscience*, 16 (1993) 17-29.
- AVANZI, V.; BRANDÃO, M.L. Activation of somatodendritic 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors in the median raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. *Behavioural Brain Research*, 126 (2001) 175-184.
- BAAS, J.M.; MILSTEIN, J.; DONLEVY, M.; GRILLON, C. Brainstem correlates of defensive states in humans. *Biological Psychiatry*, 59 (2006) 588-593.
- BAGRI, A.; DI SCALA, G.; SANDNER, G. Wild running elicited by microinjections of bicuculline or morphine into the inferior colliculus of rats: lack of effect of periaqueductal gray lesions. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 41 (1992) 727-732.
- BANDLER, R. Brain mechanisms of aggression as revealed by electrical and chemical stimulation: suggestion of a central role for the midbrain periaqueductal grey region. In: EPSTEIN, A.N. & MORRISON, R. (eds), *Progress in psychobiology and physiological psychology*, Academic Press, New York (1988).
- BANDLER, R.; SHIPLEY, M.T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends in Neurosciences*, 17 (1994) 379-389.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P.; ZHANG, S.P. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatotopic and functional organization. *Progress in Brain Research*, 87 (1991) 269-305.
- BANDLER, R.; DEPAULIS, A.; VERGNES, M. Identification of midbrain neurones mediating defensive behaviour in the rat by microinjections of excitatory amino acids. *Behavioural Brain Research*, 15 (1985) 107-119.

- BARBARESI, P.; MANFRINI, E. Glutamate descarboxylase-immunoreactive neurons and terminals in the periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience*, 27 (1988) 183-191.
- BEHBEHANI, M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Progress in Neurobiology*, 46 (1995) 575-605.
- BEITZ, A.J. Central gray. In: PAXINOS G. the human nervous system. Academic Press, New York (1990).
- BEITZ, A.J.; CLEMENTS, J.R.; MULLER, M.; ECKLUND, L. Differential origin of brainstem serotonergic projections to the midbrain periaqueductal gray and superior colliculus of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 250 (1986) 498-509.
- BEITZ, A.J. The Midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. *The Journal of Comparative Neurology*, 237 (1985) 445-459.
- BERNARD, J.F.; BANDLER, R. Parallel circuits for emotional coping behaviour: new pieces in the puzzle. *The Journal of Comparative Neurology*, 401 (1998) 429-436.
- BERNARDIS, L.L. The dorsomedial hypothalamic nucleus in autonomic and neuroendocrine homeostasis. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, 2 (1975) 45-60.
- BISHOP, J.M. Viral oncogenes. *Cell*, 42 (1985) 23-38.
- BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 81 (1972) 281-290.
- BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology*, 39 (1988) 43-68.
- BLANCHARD, D.C.; CANTERAS, N.S.; MARKHAM, C.M.; PENTKOWSKI, N.S. BLANCHARD R.J. Lesions of structures showing Fos expression to cat presentation: Effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29 (2005) 1243-1253.



- BOLLES, R.C.; FANSELOW, M.S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behavioral Brain Science*, 3 (1980) 291-301.
- BORELLI, K.G.; GARGARO, A.C.; DOS SANTOS, J.M.; BRANDÃO, M.L. Effects of inactivation of serotonergic neurons of the median raphe nucleus on learning and performance of contextual fear conditioning. *Neuroscience Letters*, 387 (2005) 105-110.
- BORELLI, K.G.; NOBRE, M.J.; BRANDÃO, M.L.; COIMBRA, N.C. Effects of acute and chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 77 (2004) 557-566.
- BOWERY, N.G.; HUDSON, A.L.; PRICE, G.W. GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 20 (1987) 365-383.
- BOWERY, N.G.; BETTLER, B.; FROESTL, W.; GALLAGHER, J.P.; MARSHALL, F.; RAITERI, M.; BONNER, T.I.; ENNA, S.J. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacological Reviews*, 54 (2002) 247-264.
- BOWERY N.G.; BETTLER, B.; FROESTL, W.; GALLAGHER, J.P.; MARSHALL, F.; RAITERI, M.; BONNER, T.I.; ENNA S.J. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function, *Pharmacological Review*, 54 (2002) 247-264.
- BRANDÃO, M.L.; ANSELONI, V.Z.; PANDOSSIO, J.E.; DE ARAUJO, J.E.; CASTILHO, V.M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23 (1999) 863-875.
- BRANDÃO, M.L.; BORELLI, K.G.; NOBRE, M.J.; SANTOS, J.M.; ALBRECHET-SOUZA, L.; OLIVEIRA, A.R.; MARTINEZ, R.C. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29 (2005) 1299-1311.
- BRANDÃO, M.L.; CARDOSO, S.H.; MELO, L.L. Defense mechanisms in the inferior colliculus. *Behavioural Brain Research*, 58 (1993) 49-55.

- BRANDÃO, M.L.; CARDOSO, S.H.; MELO, L.L.; MOTTA, V.; COIMBRA, N.C. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 18 (1994) 339-346.
- BRANDÃO, M.L.; COIMBRA, N.C.; OSAKI, M.Y. Changes in the auditory-evoked potentials induced by fear-evoking stimulations. *Physiology & Behavior*, 72 (2001) 365-372.
- BRANDÃO, M.L.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 16 (1982) 397-402.
- BRANDÃO, M.L.; DISCALA, G.; BOUCHET, M.J.; SCHMITT, P. Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24 (1986) 497-501.
- BRANDÃO, M.L.; TOMAZ, C.; BORGES, P.C.; COIMBRA, N.C.; BAGRI, A. Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. *Physiology & Behavior*, 44 (1988) 361-365.
- BRISTOW, D.R.; MARTIN, I.L. Light microscopic autoradiographic localisation in rat brain of the binding sites for the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist [3H]SR 95531: comparison with the [3H]GABA<sub>A</sub> receptor distribution. *European Journal of Pharmacology*, 29 (1988) 283-288.
- BULLITT, E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 22 (1990) 517-530.
- CAMPEAU, S.; FALLS, W.A.; CULLINAN, W.E.; HELMREICH, D.L.; DAVIS, M.; WATSON, S.J. Elicitation and reduction of fear: behavioural and neuroendocrine indices and brain induction of the immediate-early gene c-fos. *Neuroscience*, 78 (1997) 1087-1104.

- CANTERAS, N.S.; SWANSON, L.W. The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (1992) 10089-10093.
- CANTERAS, N.S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 71 (2002) 481-491.
- CANTERAS, N.S. Critical analysis of the neural systems organizing innate fear responses. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 25 (2003) 21-24.
- CANTERAS, N.S.; CHIAVEGATTO, S.; VALLE, L.E.; SWANSON, L.W. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Research Bulletin*, 44 (1997) 297-305.
- CARDOSO, S.H.; COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. *Behavioural Brain Research*, 29 (1994) 17-24.
- CARDOSO, S.H.; MELO, L.L.; COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Opposite effects of low and high doses of morphine on neural substrates of aversion in the inferior colliculus. *Behavioural Pharmacology*, 3 (1992) 489-495.
- CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behavioural Brain Research*, 58 (1993) 27-47.
- CARRIVE, P.; LEE, J.; SU, A. Lidocaine blockade of amygdala output in fear-conditioned rats reduces Fos expression in the ventrolateral periaqueductal gray. *Neuroscience*, 95 (2000) 1071-1080.
- CARRIVE, P.; LEUNG, P.; HARRIS, J.; PAXINOS, G. Conditioned fear to context is associated with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. *Neuroscience*, 78 (1997) 165-177.
- CASTILHO, V.M.; BRANDÃO, M.L. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT<sub>2A</sub> receptors in rats. *Psychopharmacology*, 155 (2001) 154-162.

- CLEMENTS, J.R.; BEITZ, A.J.; FLETCHER, T.F.; MULLET, M.A. Immunocytochemical localization of serotonin in the rat periaqueductal gray: a quantitative light and electron microscopic study. *The Journal of Comparative Neurology*, 236 (1985) 60-70.
- CLEMENTS, J.R.; MADL, J.E.; JOHNSON, R.L.; LARSON, A.A.; BEITZ, A.J. Localization of glutamate, glutaminase, aspartate and aminotransferase in the rat midbrain periaqueductal gray. *Experimental Brain Research*, 67 (1987) 594-602.
- COIMBRA, C.; DE OLIVEIRA, R.; FREITAS R.L.; RIBEIRO, R.J.; BORELLI, K.G.; PACAGNELLA, R.C.; MOREIRA, J.E.; DA SILVA, L.A.; MELLO, L.L.; LUNARDI, L.O.; BRANDÃO M.L. Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. *Experimental Neurology*, 197 (2006) 93-112
- COIMBRA, N.C.; BRANDÃO M.L. Effects of 5-HT<sub>2</sub> receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. *Behavioural Brain Research*, 87 (1997) 97-103.
- COIMBRA, N.C.; BRANDÃO M.L. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. *Behavioural Brain Research*, 59 (1993) 131-139.
- COIMBRA, N.C.; OSAKI, M.Y.; EICHENBERGER, G.C.D.; CISCATO JR J.G.; JUCÁ, C.E.B.; BIOJONE, C.R. Effects of the blockade of opioid receptor on defensive behavior elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior colliculus in *Rattus norvegicus (Rodentia, Muridae)*. *Psychopharmacology*, 152 (2000) 422-430.
- COIMBRA, N.C.; TOMAZ, C.; BRANDÃO, M.L. Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum. *Behavioral Brain Research*, 50 (1992) 77-83.
- COLEMAN, J.R.; CLERICI, W.J. Sources of projections to subdivisions of the inferior colliculus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 8 (1987) 215-226.

- COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; CANTERAS, N.S. Afferent connections of the dorsal premammillary nucleus. *The Journal of Comparative Neurology*, 423 (2000) 83-98.
- COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; CANTERAS, N.S. Predatory hunting and exposure to live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. *Behavioural Brain Research*, 138 (2003) 17-28.
- COPLAN, J.D.; LYDIARD R.B. Brain circuits in panic disorder. *Biological Psychiatry*, 44 (1998) 1264-1276.
- CRYAN, J.F.; KAUPMANN, K. Don't worry 'B' happy!: a role for GABA(B) receptors in anxiety and depression. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26 (2005) 36-43.
- CUADRA, G.; ZURITA, A.; MACEDO, C.E.; MOLINA, V.A.; BRANDÃO, M.L. Electrical stimulation of the midbrain tectum enhances dopamine release in the frontal cortex. *Brain Research Bulletin*, 52 (2000) 413-418.
- CURRAN T.; MILLER, A.D.; ZOKAS, L.; VERMA, I.L. Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis. *Cell*, 36 (1984) 259-268.
- CURRAN, T.; MORGAN, J.I. Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *Journal of Neurobiology*, 26 (1995) 403-412.
- DARWIN, C. A expressão das emoções no homem e nos animais. 1872. Companhia das Letras, 4ª ed Editora Schwarcz Ltda.; São Paulo (2004). Título original: *The expression of emotion in man and animals*.
- DAVIS, M.; WHALEN, P.J. The amygdala: vigilance and emotion. *Molecular Psychiatry*, 6 (2001) 13-34.
- DE OLIVEIRA, R.W.; DEL BEL, E.A.; GUIMARÃES, F.S. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Brain Research Bulletin*, 51 (2000) 457-464.
- DE OLIVEIRA, R.W.; DEL BEL, E.A.; GUIMARÃES, F.S. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. *Neuroscience Biobehavior Reviews*, 25 (2001) 679-685.

- DEAN, P.; REDGRAVE, P.; WESTBY, G.W. Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. *Trends in Neurosciences*, 12 (1989) 137-147.
- DEPOORTERE, R.; SANDNER, G.; DISCALA, G. Aversion induced by electrical stimulation of the mesencephalic locomotor region in the intact and freely moving rat. *Physiology & Behavior*, 47 (1990) 561-567.
- DIELENBERG, R.A.; MCGREGOR, I.S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25 (2001) 597-609.
- DRAGUNOW, M.; FAULL, R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *Journal of Neuroscience Methods*, 29 (1989) 261-265.
- EDMUNDS, M. Defense in animals. Essex: Longmans (1974) *apud* BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology*, 39 (1988) 43-68.
- EICHENBERGER, G.C.; RIBEIRO, S.J.; OSAKI, M.Y.; MARUOKA, R.Y.; RESENDE, G.C.; CASTELLAN-BALDAN, L.; CORREA, S.A.; DA SILVA, L.A.; COIMBRA, N.C. Neuroanatomical and psychopharmacological evidence for interaction between opioid and GABAergic neural pathways in the modulation of fear and defense elicited by electrical and chemical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray matter. *Neuropharmacology*, 42 (2002) 48-59.
- ENNIS, M.; BEHBEHANI, M.; SHIPLEY, M.T.; VAN BOCKSTAELE, E.J.; ASTON-JONES, G. Projections from the periaqueductal gray to the rostromedial pericoerulear region and nucleus locus coeruleus: anatomic and physiologic studies. *The Journal of Comparative Neurology*, 306 (1991) 480-494.
- FAINGOLD, C.L.; GEHLBACH, G.; CASPARY, D.M. On the role of GABA as an inhibitory neurotransmitter in inferior colliculus neurons: iontophoretic studies. *Brain Research*, 500 (1989) 302-312.
- FAYE-LUND, H.; OSEN, K.K. Anatomy of the inferior colliculus in rat. *Anatomy and Embryology*, 171 (1985) 1-20.

- FELDMAN, R.S.; MEYER, J.S.; QUENZER, L.F. Synaptic structure and function. In: FELDMAN, R.S.; MEYER, J.S.; QUENZER, L.F. (eds), Principles of Neuropsychopharmacology. 1º ed.; Sinauer Associates, Inc. Massachusetts (1997).
- FENDT, M.; FANSELOW, M.S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 23 (1999) 743-760.
- FERNANDEZ de MOLINA, A.; HUNSPERGER, R.W. Central representation of affective reaction in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis and adjacent structures. *Journal of Physiology*, 145 (1959) 251-265.
- FERREIRA-NETTO, C.; GUIMARÃES, F.S. Anxiogenic effect of cholecystokinin in the dorsal periaqueductal gray. *Neuropsychopharmacology*, 29 (2004) 101-107.
- FERREIRA-NETTO, C.; BORELLI, K.G.; BRANDÃO, M.L. Neural segregation of Fos distribution in the brain following freezing and escape behaviors induced by injections of either glutamate or NMDA into the dorsal periaqueductal gray. *Brain Research*, 1031 (2005) 151-163.
- FLOYD, N.S.; PRICE, J.L.; FERRY, A.T.; KEAY, K.A.; BANDLER, R. Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 422 (2000) 556-578.
- 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 Research*, 168 (2002) 208-222.
- GENTZ, R.; RAUSCHER, F.J.3RD.; ABATE, C.; CURRAN, T. Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *Science*, 31 (1989) 1695-1699.
- GLENDENNING, K.K.; BAKER, B.N. Neuroanatomical distribution of receptors for three potential inhibitory neurotransmitters in the brainstem auditory nuclei of the cat. *The Journal of Comparative Neurology*, 8 (1988) 288-308.
- GOMITA, Y.; MORIYAMA, M.; ICHIMARU, Y.; ARAKI, Y. Neural systems activated by the aversive stimulation of dorsal central gray. *Japanese Journal of Pharmacology*, 48 (1988) 137-141.

- GRAEFF, F.G. Minor tranquilizers and brain defense systems. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 14 (1981) 239-265.
- GRAEFF, F.G.; Brain defense systems and anxiety. In: BURROWS, G.D.; ROTH, M.; NOYERS, JR. (eds.), *Handbook of anxiety*. vol. 3, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1990).
- GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L. (eds.), *Neurobiologia das doenças mentais*. 5º ed.; Lemos Editorial e Gráficos Ltda. São Paulo (1993).
- GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L.; AUDI, E.A.; SCHUTZ, M.T. Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. *Behavioural Brain Research*, 22 (1986) 173-180.
- GRAEFF, F.G. Neurotransmitters in the periaqueductal gray and animal models of panic anxiety. In: BRILEY, M.; FILE, S.E. (eds.), *New Concepts in Anxiety*. Mac Millan, London (1991).
- GRAEFF, F.G. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. *Reviews Neurosciences*, 4 (1993) 181-211.
- GRAY, J.A. *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. 1ª ed.; Oxford University Press, New York (1982).
- GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N. *Précis of the neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. 2ª ed.; Oxford University Press, New York (2000).
- HERDEGEN, T.; LEAH, J.D. Inducible and constructive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Knox, and CREB/ATF proteins. *Brain Research Reviews*, 28 (1998) 370-490.
- HERRERA M.; SANCHES DEL CAMPO, F.; RUIZ, A.; SMITH AGREDA, V. Neuronal relationships between the dorsal periaqueductal nucleus and the inferior colliculus (nucleus commissuralis) in the cat. A Golgi study. *Journal of Anatomy*, 158 (1988) 137-145.



- HERRERA, D.G.; ROBERTSON, H.A. Activation of c-fos in the brain. *Progress in Neurobiology*, 50 (1996) 83-107.
- HESS, W.; BRÜGER, M. Das subkortikales zentrum der affektiven abwereaktion. *Helvetica physiologica et pharmacologica acta*, 1 (1943) 33-52, *apud* FERNANDEZ de MOLINA, A.; HUNSPERGER, R.W. Central representation of affective reaction in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis and adjacent structures. *Journal of Physiology*, 145 (1959) 251-265.
- HILTON, S.M. The defence-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. *The Journal of Experimental Biology*, 100 (1982) 159-174.
- HUFFMAN, R.F.; HENSON JR, O.W. The descending auditory pathway and acousticomotor systems: connections with the inferior colliculus. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 15 (1990) 295-323.
- IRVINE, D.R.F. Physiology of the auditory brainstem. In: POPPER, A.N.; FAY, R.R. (eds.), *Springer handbook of auditory pathway neurophysiology*. Springer-Verlag, New York (1992). *apud* MERCHAN, M.; AGUILAR, L.A.; LOPEZ-POVEDA, E.A.; MALMIERCA, M.S. The inferior colliculus of the rat: quantitative immunocytochemical study of GABA and glycine. *Neuroscience*, 136 (2005) 907-925.
- JAVANMARD, M.; SHLIK, J.; KENNEDY, S.H.; VACCARINO, F.J.; HOULE, S.; BRADWEJN, J. Neuroanatomic correlates of CCK-4-induced panic attacks in healthy humans: a comparison of two time points. *Biological Psychiatry*, 45 (1999) 872-882.
- KEAY, K.A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25 (2001) 669-678.
- KOVASC, K.J. Functional neuroanatomy of the parvocellular vasopressinergic system: transcriptional responses to stress and glucocorticoid feedback. *Progress in Brain Research*, 119 (1998) 31-43.
- KROUT, K.E.; LOEWY, A.D. Periaqueductal gray matter projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 424 (2000) 111-141.

- KUDO, M.; NIIMI, K. Ascending projections of the inferior colliculus in the cat: an autoradiographic study. *The Journal of Comparative Neurology*, 15 (1980) 545-556.
- LACROIX, L.; SPINELLI, S.; HEIDBREDER, C.A.; FELDON, J. Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. *Behavioral Neuroscience*, 114 (2000) 1119- 1130.
- LAMPREA, M.R.; CARDENAS, F.P.; VIANNA, D.M.; CASTILHO, V.M.; CRUZ-MORALES, S.E.; BRANDÃO, M.L. The distribution of fos immunoreactivity in rat brain following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Research*, 950 (2002) 186-194.
- LANDSCHULZ, W.H.; JOHNSON, P.F.; MCKNIGHT, S.L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 24 (1988) 1759-1764.
- LEÃO-BORGES, P.C.; COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Independence of aversive and pain mechanisms in the dorsal periaqueductal grey matter of the rat. *Brazilian Journal Medical and Biological Research*, 21 (1988) 1027-1031.
- LEDOUX, J.E.; IWATA, J.; CICCHETTI, P.; REIS, D.J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *The Journal of Neuroscience*, 8 (1988) 2517-2529.
- LEDOUX, J.E.; CICCHETTI, P.; XAGORARIS, A.; ROMANSKI, L.M. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 10 (1990) 1062-1069.
- LEITE-PANISSI, C.R.; COIMBRA, N.C.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. The cholinergic stimulation of the central amygdala modifying the tonic immobility response and antinociception in guinea pigs depends on the ventrolateral periaqueductal gray. *Brain Research Bulletin*, 60 (2003) 167-178.
- LINO-DE-OLIVEIRA, C.; SALES, A.J.; DEL BEL, E.A.; SILVEIRA, C.L.; GUIMARÃES, F.S. Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. *Brain Research Bulletin*, 55 (1991) 747-754.

- MACEDO, C.E.; CUADRA, G.; MOLINA, V.; BRANDÃO, M.L. Aversive stimulation of the inferior colliculus changes dopamine and serotonin extracellular levels in the frontal cortex: modulation by the basolateral nucleus of amygdala. *Synapse*, 55 (2005) 58-66.
- MAISONNETTE, S.S.; KAWASAKI, M.C.; COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Research Bulletin*, 40 (1996) 93-98.
- MANTYH, P.W. The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat and monkey: a nissl, weiss and golgi analysis. *The Journal of Comparative Neurology*, 204 (1982) 146-158.
- MARKHAM, C.M.; BLANCHARD, D.C.; CANTERAS, N.S.; CUYNO, C.D.; BLANCHARD, R.J. Modulation of predatory odor processing following lesions to the dorsal premammillary nucleus. *Neuroscience Letters*, 372 (2004) 22-26.
- MARSH, R.A.; FUZESEY, Z.M.; GROSE, C.D.; WENSTRUP, J.J. Projection to the inferior colliculus from the basal nucleus of the amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 22 (2002) 10449-10460.
- MARTINEZ, R.C.R.; OLIVEIRA, A.R.; BRANDÃO, M.L. Conditioned and unconditioned freezing induced by electrical stimulation are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. *Neurobiology of Learning and Memory*, 85 (2006) 58-65.
- MCMAHON, S.B.; WALL, P.D. Electrophysiological mapping of brainstem projections of spinal cord lamina I cells in the rat. *Brain Research*, 29 (1985) 19-26.
- MCNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28 (2004) 285-305.
- MELO, L.L.; BRANDÃO M.L. Role of 5-HT1A and 5-HT2 receptors in the aversion induced by electrical stimulation of inferior colliculus. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 51 (1995) 317-321.

- MELO, L.L.; CARDOSO, S.H.; BRANDÃO M.L. Antiaversive action of benzodiazepines on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Physiology & Behavior*, 51 (1992) 557-562.
- MENINGER, V.; POL, D.; DERER, P. The inferior colliculus of the mouse. *Anissl and Golgi Study. Neuroscience*, 17 (1986) 1159-1179.
- MERCHAN, M.; AGUILAR, L.A.; LOPEZ-POVEDA, E.A.; MALMIERCA, M.S. The inferior colliculus of the rat: quantitative immunocytochemical study of GABA and glycine. *Neuroscience*, 136 (2005) 907-925.
- MONGEAU, R.; MILLER, G.A.; CHIANG, E.; ANDERSON, D.J. Neural correlates of competing fear behaviors evoked by an innately aversive stimulus. *The Journal of Neuroscience*, 23 (2003) 3855-3868.
- MOREIRA, F.A.; MOLCHANOV, M.L.; GUIMARÃES, F.S. Flight reactions to nitric oxide in the inferior colliculus of rats depend on NMDA receptor activation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 76 (2003) 35-41.
- MOREST, D.K.; OLIVER, D.L. The neuronal architecture of the inferior colliculus in the cat: defining the functional anatomy of the auditory midbrain. *The Journal of Comparative Neurology*, 10 (1984) 209-236.
- MORGAN J.I.; CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends in Neurosciences*, 12 (1989) 459-462.
- MORGAN J.I.; CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual Review of Neuroscience*, 14 (1991) 421-451.
- NASHOLD, B.S.; WILSON, W.P.; SLAUGHTER, D.G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *Journal of Neurosurgery*, 30 (1969) 14-24.
- NOBRE, M.J.; BRANDÃO, M.L. Analysis of freezing behavior and ultrasonic vocalization in response to foot-shocks, ultrasound signal and GABAergic inhibition in the inferior colliculus: effects of muscimol and midazolam. *European Neuropsychopharmacology*, 14 (2004) 45-52.

- NOBRE, M.J.; LOPES, M.G.; BRANDÃO, M.L. Defense reaction mediated by NMDA mechanisms in the inferior colliculus is modulated by GABAergic nigro-collicular pathways. *Brain Research*, 999 (2004) 124-131.
- OLIVER D.L.; HUERTA, M. Inferior and superior colliculi. In: WEBSTER, D.B.; POPPER A.N.; FAY, R.R. (eds.), *The mammalian auditory pathway neuroanatomy*. Springer-Verlag, Berlin (1992).
- OLIVER D.L.; MOREST, D.K. The central nucleus of the inferior colliculus in the cat. *The Journal of Comparative Neurology*, 10 (1984) 237-264.
- ONSTOTT, D.; MAYER, B.; BEITZ, A.J. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy. *Brain Research*, 610 (1993) 317-324.
- OSAKI, M.Y.; CASTELLAN-BALDAN, L.; CALVO, F.; CARVALHO, A.D.; FELIPPOTTI, T.T.; DE OLIVEIRA, R.; UBIALI, W.A.; PASCHOALIN-MAURIN, T.; ELIAS-FILHO, D.H.; MOTTA, V.; DA SILVA, L.A.; COIMBRA, N.C. Neuroanatomical and neuropharmacological study of opioid pathways in the mesencephalic tectum: effect of micro1- and kappa-opioid receptor blockade on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Research*, 992 (2003) 179-192.
- PANKSEPP, J. The psychoneurology of fear: evolutionary perspectives and the role of animals models in understanding human anxiety. In: BURROWS, G.D.; ROTH, M.; NOYES JR.; R. (eds.), *Handbook of Anxiety, The Neurobiology of Anxiety*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1990).
- PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinate – The new coronal set*. 5<sup>o</sup> ed. Elsevier: Academic Press, New York, 2005.
- PESCHANSKI, M.; BESSON, J.M. A spino-reticulo-thalamic pathway in the rat: an anatomical study with reference to pain transmission. *Neuroscience*, 12 (1984) 165-178.

- PITKÄNEN, A. Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: AGGLENTON, J.P. (ed.), The amygdala. A functional analysis. Oxford University Press Inc New York (2000).
- RAUSCHER, F.J.3RD.; VOULALAS, P.J.; FRANZA, B.R. JR, CURRAN, T. Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes & Development*, 2 (1988) 1687-1699.
- REDGRAVE, P.; DEAN, P.; Does the PAG learn about emergencies from the superior colliculus? In: DEPAULIS, A .; BANDLER, R. (eds.), The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Immunohistochemical Organization. Plenum Publishing Corporation. New York (1991).
- REDGRAVE, P.; DEAN, P.; MITCHELL, I.J.; ODEKUNLE, A.; CLARK, A. The projection from superior colliculus to cuneiform area in the rat. I. Anatomical Studies. *Experimental Brain Research*, 72 (1988) 611-625.
- RIBAK, C.E.; MORIN, C.L. The role of the inferior colliculus in a genetic model of audiogenic seizures. *Anatomy and Embryology*, 191 (1995) 279-295.
- RIZVI, T.A.; ENNIS, M.; BEHBEHANI, M.M.; SHIPLEY, M.T. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. *The Journal of Comparative Neurology*, 303 (1991) 121-131.
- ROSE, J.E.; GREENWOOD, D.O.; GOLDBERGER, J.M.; HIND, J.E. Some discharge characteristic of single neurons in the inferior colliculus of the cat: I. Tonopic organization relation of spike-counts to tone intensity and firing patterns of single elements. *The Journal of Comparative Neurology*, 26 (1963) 294-320. *apud* MERCHAN, M.; AGUILAR, L.A.; LOPEZ-POVEDA, E.A.; MALMIERCA, M.S. The inferior colliculus of the rat: quantitative immunocytochemical study of GABA and glycine. *Neuroscience*, 136 (2005) 907-925.
- RUIZ-TORNER, A.; OLUCHA-BORDONAU, F.; VALVERDE-NAVARRO, A.A.; MARTINEZ-SORIANO, F. The chemical architecture of the rat's periaqueductal gray based on acetylcholinesterase histochemistry: a quantitative study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 21 (2001) 295-312.

- SANDNER, G.; OBERLING, P.; SILVEIRA, M.C.; DISCALA, G.; ROCHA, B.; BAGRI, A.; DEPOORTERE, R. What brain structures are active during emotions? Effects of brain stimulation elicited aversion on c-fos immunoreactivity and behavior. *Behavioral Brain Research*, 58 (1993) 9-18.
- SCHMITT, P.; DISCALA, G.; BRANDÃO, M.L.; KARLI, P. Behavioral effects of microinjections of SR95103; a new GABA - A antagonist; into medial hypothalamus or the mesencephalic central gray. *European Journal of Pharmacology*, 117 (1985) 149-158.
- SEWARDS, T.V.; SEWARDS, M.A. Fear and power-dominance drive motivation: neural representations and pathways mediating sensory and mnemonic inputs, and outputs to premotor structures. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26 (2002) 553-579.
- SHIBATA, H. Organization of retrosplenial cortical projections to the laterodorsal thalamic nucleus in the rat. *Neuroscience Research*, 38 (2000) 303-311.
- SHIPLEY, M.T.; ENNIS, M.; RIZVI, T.A.; BEHBEHANI, M.M.; topographical specificity of forebrain inputs to the midbrain periaqueductal gray: evidence for discrete longitudinally organized input columns, In: DEPAULIS, A.; BLANDER, R. (eds.), *The midbrain periaqueductal gray matter: Functional, Anatomical and Immunohistochemical Organization*. Plenum Publishing Corporation, New York (1991).
- SHIPLEY, M.T.; MCLEAN, J.H.; BEHBEHANI, M.M. Heterogeneous distribution of neurotensin-like immunoreactive neurons and fibers in the midbrain periaqueductal gray of the rat. *The Journal of Neuroscience*, 7 (1987) 2025-2034.
- SHIRAISHI, S.; SHIRAISHI, Y.; OLIVER, D.L.; ALTSCHULER, R.A. Expression of GABA-A receptor subunits in the rat central nucleus of the inferior colliculus. *Molecular Brain Research*, 96 (2001) 122-132.
- SILVA, R.C.; CRUZ, A.P.; AVANZI, V.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M.L. Distinct contributions of median raphe nucleus to contextual fear conditioning and fear-potentiated startle. *Neural Plasticity*, 9 (2002) 233-247.

- SULLIVAN, G.M.; APERGIS, J.; GORMAN, J.M.; LEDOUX, J.E. Rodent doxapram model of panic: behavioral effects and c-Fos immunoreactivity in the amygdala. *Biological Psychiatry*, 53 (2003) 863-448.
- VAN GROEN, T.; WYSS, J.M. Projections from the laterodorsal nucleus of the thalamus to the limbic and visual cortices in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 324 (1992) 427-448.
- VAN GROEN, T.; KADISH, I.; WYSS, J.M. The role of the laterodorsal nucleus of the thalamus in spatial learning and memory in the rat. *Behavioural Brain Research*, 136 (2002) 329-337.
- VARGAS, L.C.; MARQUES, T.A.; SCHENBERG, L.C. Micturition and defensive behaviors are controlled by distinct neural networks within the dorsal periaqueductal gray and deep gray layer of the superior colliculus of the rat. *Neuroscience Letters*, 280 (2000) 45-48.
- VAUGHN, M.D.; POZZA, M.F.; LINGENHÖHL, K. Excitatory acoustic responses in the inferior colliculus of the rat are increased by GABA-B receptor blockade. *Neuropharmacology*, 35 (1996) 1761-1767.
- VEENING, J.; BUMA, P.; TER HORST, G.J.; ROELING, T.A.P.; LUITEN, P.G.M.; NIEUWENHUYIS, R. Hypothalamic projections to the PAG in the rat: topographical, immuno-electronmicroscopical and functional aspects, In: DEPAULIS, A.; BLANDER, R. (eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, anatomical and Immunohistochemical Organization*. Plenum Publishing Corporation. New York (1991).
- VIANNA, D.M.; BRANDÃO, M.L. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36 (2003) 557-566.
- VIANNA, D.M.; BORELLI, K.G.; FERREIRA-NETTO, C.; MACEDO, C.E.; BRANDÃO, M.L. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. *Brain Research Bulletin*, 62 (2003) 179-189.



- VIANNA, D.M.; GRAEFF, F.G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M.L. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. *Learning & Memory*, 8 (2001) 164-169.
- WALKER, D.L.; DAVIS, M. Involvement of the dorsal periaqueductal gray in the loss of fear-potentiated startle accompanying high footshock training. *Behavioral Neuroscience*, 111 (1997) 692-702.
- WYNNE, B.; HARVEY, A.R.; ROBERTSON, D.; SIRINATHSINGHI, D.J. Neurotransmitter and neuromodulator systems of the rat inferior colliculus and auditory brainstem studied by in situ hybridization. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 9 (1995) 289-300.

**ANEXOS**

---

## ANEXOS

Tabela 1. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM do número de neurônio Fos-IR em estruturas encefálica de animais que receberam de salina na SCPdl e não foram colocados a arena circular (n = 5). Cada estruturas encefálicas foi quantificada bilateralmente, *ipsilateral* à microinjeção e contralateral em áreas pré-fixadas de 0,1 mm<sup>2</sup>. A substância cinzenta periaquedutal foi analisada no níveis rostral (r), intermediário (i) e caudal (c).

Estruturas	Salina + Biotério	
	<i>Ipsi</i>	Contra
PrL	3.16 $\pm$ 1.45	2.30 $\pm$ 1.22
Cg	0.89 $\pm$ 0.41	0.63 $\pm$ 0.36
Ent	2.89 $\pm$ 0.68	1.38 $\pm$ 0.55
PaH	9.39 $\pm$ 2.49	13.40 $\pm$ 5.08
AHC	6.03 $\pm$ 2.83	3.18 $\pm$ 0.99
LH	1.17 $\pm$ 0.62	3.36 $\pm$ 1.46
DMH	4.34 $\pm$ 1.25	2.50 $\pm$ 0.35
VMHdm	4.19 $\pm$ 1.17	2.27 $\pm$ 1.06
PMD	3.73 $\pm$ 2.91	3.34 $\pm$ 2.81
LD	1.46 $\pm$ 0.31	1.42 $\pm$ 0.42
CeA	1.36 $\pm$ 0.69	0.96 $\pm$ 0.36
BLA	3.04 $\pm$ 1.69	2.78 $\pm$ 1.44
CS	1.31 $\pm$ 0.35	0.62 $\pm$ 0.23
DRN	1.16 $\pm$ 0.13	1.16 $\pm$ 0.13
MnR	0.31 $\pm$ 0.10	0.31 $\pm$ 0.10
SCPdm r	0.59 $\pm$ 0.22	0.59 $\pm$ 0.22
SCPdl r	2.04 $\pm$ 0.92	1.54 $\pm$ 0.41
SCPl r	3.47 $\pm$ 0.86	2.68 $\pm$ 0.65
SCPdm i	0.40 $\pm$ 0.70	0.40 $\pm$ 0.07
SCPdl i	3.59 $\pm$ 1.35	2.21 $\pm$ 0.63
SCPl i	3.12 $\pm$ 0.67	2.30 $\pm$ 0.62
SCPdm c	0.57 $\pm$ 0.19	0.57 $\pm$ 0.19
SCPdl c	2.98 $\pm$ 0.66	2.05 $\pm$ 0.42
SCPl c	2.47 $\pm$ 0.44	1.07 $\pm$ 0.23
SCPvl c	4.24 $\pm$ 1.53	4.22 $\pm$ 1.36
CnF	1.34 $\pm$ 0.68	1.29 $\pm$ 0.70
CI	0.94 $\pm$ 0.16	1.58 $\pm$ 0.60
LC	8.30 $\pm$ 2.31	6.99 $\pm$ 3.02

Tabela 2. Número de neurônios Fos-IR após administração de salina, semicarbazida (SCB; 5  $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ ) ou bicuculina (BIC; 40  $\text{ng}/0,2 \mu\text{L}$ ) na SCPdl de ratos expostos à arena. O número de células Fos-IR foi obtido em áreas pré-fixadas de  $0,1 \text{ mm}^2$ . Cada estrutura encefálica foi quantificada *ipsilateral* à microinjeção e *contralateral*. Os dados estão apresentados como médias e o EPM; \*  $p < 0.05$  em relação ao grupo controle, de acordo com o teste de Newman-Keuls.

Estruturas	Salina		SCB 5 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$		BIC 40 $\text{ng}/0,2 \mu\text{L}$	
	<i>Ipsi</i>	<i>Contra</i>	<i>Ipsi</i>	<i>Contra</i>	<i>Ipsi</i>	<i>Contra</i>
PrL	32,92 $\pm$ 8,33	24,48 $\pm$ 8,50	23,90 $\pm$ 5,73	23,18 $\pm$ 7,17	51,53 $\pm$ 5,88	46,44 $\pm$ 4,40
Cg	33,73 $\pm$ 5,67	31,37 $\pm$ 5,61	32,39 $\pm$ 8,15	34,88 $\pm$ 12,51	44,10 $\pm$ 8,33	44,50 $\pm$ 11,74
Ent	23,97 $\pm$ 3,37	17,03 $\pm$ 2,36	31,02 $\pm$ 6,95	24,64 $\pm$ 6,05	38,17 $\pm$ 3,49*	21,08 $\pm$ 2,89
PaH	28,69 $\pm$ 4,29	31,02 $\pm$ 5,85	27,41 $\pm$ 6,63	18,89 $\pm$ 4,43	105,37 $\pm$ 11,69*	99,68 $\pm$ 12,27*
AHC	23,16 $\pm$ 3,43	21,41 $\pm$ 2,70	19,54 $\pm$ 1,93	18,50 $\pm$ 2,83	49,01 $\pm$ 3,35*	40,85 $\pm$ 3,33*
LH	19,42 $\pm$ 1,75	17,27 $\pm$ 1,78	13,71 $\pm$ 2,29	10,83 $\pm$ 2,62	27,64 $\pm$ 3,57	22,08 $\pm$ 3,06
DMH	27,55 $\pm$ 5,87	24,82 $\pm$ 4,88	19,35 $\pm$ 2,35	16,98 $\pm$ 2,87	55,39 $\pm$ 8,27*	51,33 $\pm$ 5,77*
VMHdm	17,89 $\pm$ 5,17	16,41 $\pm$ 3,73	11,93 $\pm$ 2,09	12,20 $\pm$ 2,36	57,80 $\pm$ 8,97*	48,17 $\pm$ 6,89
PMD	18,84 $\pm$ 5,67	18,81 $\pm$ 5,07	23,16 $\pm$ 3,42	22,39 $\pm$ 4,06	39,40 $\pm$ 3,06*	35,04 $\pm$ 2,24*
LD	7,39 $\pm$ 3,01	4,42 $\pm$ 1,74	27,91 $\pm$ 3,87*	20,21 $\pm$ 4,58*	76,66 $\pm$ 8,75*	51,66 $\pm$ 4,75*
CeA	6,57 $\pm$ 1,50	6,52 $\pm$ 1,59	10,87 $\pm$ 2,97	4,25 $\pm$ 1,05	55,60 $\pm$ 8,24*	35,54 $\pm$ 8,03*
BLA	7,79 $\pm$ 1,53	8,51 $\pm$ 1,37	4,66 $\pm$ 1,52	3,52 $\pm$ 0,72	11,94 $\pm$ 1,19	10,65 $\pm$ 1,86
CS	29,45 $\pm$ 5,44	24,23 $\pm$ 3,42	16,38 $\pm$ 3,65	12,20 $\pm$ 3,13	81,96 $\pm$ 9,20*	34,93 $\pm$ 2,42
DRN	19,31 $\pm$ 4,76	20,64 $\pm$ 3,58	22,13 $\pm$ 2,56	18,22 $\pm$ 2,77	35,10 $\pm$ 3,47*	30,88 $\pm$ 4,16
MnR	11,75 $\pm$ 3,92	11,65 $\pm$ 2,95	13,03 $\pm$ 3,55	12,89 $\pm$ 3,05	22,52 $\pm$ 1,94*	18,46 $\pm$ 1,93
SCPdm r	15,11 $\pm$ 2,96	16,30 $\pm$ 6,42	13,45 $\pm$ 2,46	11,64 $\pm$ 2,28	48,73 $\pm$ 4,37*	34,86 $\pm$ 3,95*
SCPdl r	12,32 $\pm$ 2,2	13,01 $\pm$ 2,10	11,84 $\pm$ 3,29	10,34 $\pm$ 2,90	63,35 $\pm$ 15,49*	19,77 $\pm$ 3,46
SCPl r	15,33 $\pm$ 3,33	15,06 $\pm$ 3,61	16,61 $\pm$ 3,69	13,81 $\pm$ 3,71	42,07 $\pm$ 9,21*	22,16 $\pm$ 2,42
SCPdm i	13,30 $\pm$ 3,53	14,38 $\pm$ 3,30	19,01 $\pm$ 3,96	14,23 $\pm$ 4,81	95,32 $\pm$ 22,74*	28,49 $\pm$ 7,19
SCPdl i	15,39 $\pm$ 3,01	16,31 $\pm$ 3,79	18,30 $\pm$ 5,08	9,92 $\pm$ 2,27	127,51 $\pm$ 18,03*	25,59 $\pm$ 6,66
SCPl i	19,75 $\pm$ 4,67	14,05 $\pm$ 4,02	18,65 $\pm$ 1,99	16,22 $\pm$ 2,62	64,69 $\pm$ 7,32*	21,05 $\pm$ 1,67
SCPdm c	15,57 $\pm$ 3,39	9,81 $\pm$ 1,79	10,09 $\pm$ 2,19	10,75 $\pm$ 4,23	72,79 $\pm$ 19,71*	43,37 $\pm$ 6,85
SCPdl c	17,18 $\pm$ 6,37	11,86 $\pm$ 2,92	12,50 $\pm$ 5,52	8,88 $\pm$ 3,20	74,59 $\pm$ 19,08*	31,99 $\pm$ 3,25
SCPl c	18,71 $\pm$ 5,53	12,51 $\pm$ 2,30	11,18 $\pm$ 2,27	8,83 $\pm$ 1,40	55,79 $\pm$ 11,81*	25,34 $\pm$ 3,67
SCPvl c	17,12 $\pm$ 1,15	18,17 $\pm$ 1,73	31,27 $\pm$ 2,59*	24,58 $\pm$ 4,43	58,16 $\pm$ 9,72*	37,20 $\pm$ 5,46*
CnF	13,00 $\pm$ 3,58	8,23 $\pm$ 2,18	12,29 $\pm$ 2,45	14,32 $\pm$ 2,39	88,89 $\pm$ 10,65*	45,63 $\pm$ 4,72*
CI	9,57 $\pm$ 1,24	8,22 $\pm$ 1,11	12,93 $\pm$ 2,81	16,18 $\pm$ 3,28	12,60 $\pm$ 1,97	7,44 $\pm$ 1,11
LC	16,96 $\pm$ 4,88	13,39 $\pm$ 2,79	18,55 $\pm$ 3,89	13,78 $\pm$ 3,28	47,07 $\pm$ 7,10*	32,46 $\pm$ 4,21*

Tabela 3. Número de neurônios Fos-IR após administração de salina, semicarbazida (SCB; 6 µg/0,2 µL) ou bicuculina (BIC; 40 ng/0,2 µL) no CI de ratos expostos à arena. O número de células Fos-IR foi obtido em áreas pré-fixadas de 0,1 mmP<sup>2</sup>. Cada estrutura encefálica foi quantificada *ipsilateral* à microinjeção e *contralateral*. Os dados representam as médias e o EPM; \*  $p < 0.05$  em relação ao grupo controle, de acordo com o teste de Newman-Keuls.

Estruturas	Salina		SCB 6 µg/0,2 µL		BIC 40 ng/0,2 µL	
	<i>Ipsi</i>	<i>Contra</i>	<i>Ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>Ipsi</i>	<i>contra</i>
PrL	29.66±2.44	28.09±3.97	29.97±5.53	19.44±3.43	34.40±4.49	32.27±5.83
Cg	19.13±3.62	14.67±3.48	17.16±3.55	13.26±1.32	24.83±4.37	25.84±3.36
PaH	38.42±4.61	30.08±4.48	33.48±6.85	31.95±6.59	71.50±9.94*	68.38±11.66*
AHC	22.69±2.46	20.24±2.15	14.82±2.91	15.60±3.74	51.79±6.50*	47.49±6.36*
LH	17.41±1.42	16.53±1.42	12.73±1.74	11.57±2.07	31.51±2.68*	25.53±2.64*
DMH	25.24±1.39	25.77±1.53	22.99±3.40	20.10±3.03	47.00±5.32*	36.36±4.93
VMHdm	11.15±1.80	11.70±1.60	18.67±4.61	12.26±3.02	72.77±10.80*	55.14±12.53*
PMD	12.05±0.68	10.41±1.42	11.12±2.53	9.30±2.47	53.19±10.16*	42.84±11.77*
LD	10.32±3.75	9.85±3.97	9.97±5.32	9.83±5.98	25.89±3.62*	17.73±3.35
MGD	9.63±4.75	5.55±2.26	8.34±3.42	3.81±1.44	51.69±13.51*	32.10±15.05
MGV	4.29±2.78	4.03±1.24	4.43±2.38	2.73±12.61	27.70±14.14	16.52±10.58
MGM	7.16±0.88	6.61±1.39	12.18±2.32	6.28±2.02	60.33±7.56*	26.98±7.62
CeA	9.74±3.08	8.59±3.11	11.17±3.91	6.41±1.74	35.67±8.31*	25.37±6.28
BLA	4.66±1.22	6.02±1.18	4.99±1.01	4.63±0.60	17.18±2.49*	11.11±2.44
MeA	7.73±1.09	7.02±1.06	9.65±1.40	8.32±1.83	35.85±6.30*	24.47±5.21*
CS	20.00±2.28	19.45±2.81	22.48±3.71	21.88±4.09	56.58±5.44*	33.52±2.97*
SCPdm	10.44±2.35	12.92±3.99	18.60±4.79*	14.85±3.58	75.72±9.74*	43.38±5.86*
SCPdl	11.54±2.11	10.91±2.17	19.30±2.59	14.19±2.79	64.06±3.90*	26.14±3.12*
SCPI	16.85±3.15	15.95±3.14	23.36±3.19	20.64±3.22	31.20±6.06*	23.57±2.95
SCPvl	20.12±2.65	20.18±2.95	17.97±2.92	14.17±2.40	46.93±3.67*	28.04±4.66
DRN	17.54±3.06	18.07±2.75	19.44±5.11	17.15±4.05	25.83±3.60	24.46±3.16
MnR	16.38±1.93	14.79±1.88	15.18±2.73	12.46±1.35	21.19±2.12	19.73±1.98
CnF	9.75±0.88	9.12±1.85	13.83±2.66	8.45±2.11	56.62±6.61*	34.94±7.47*
CI	15.01±2.19	13.88±3.04	23.10±3.97	16.82±4.03	33.90±4.43*	26.24±4.46
LC	15.76±1.85	16.10±1.84	16.71±2.30	14.17±2.35	25.64±2.76*	20.90±2.19

# 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](#)