

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

**Regulação serotoninérgica e gabaérgica nos núcleos amigdalóides do medo  
condicionado e incondicionado**

*Raquel Chacon Ruiz Martinez*

**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: 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**

**Regulação serotoninérgica e gabaérgica nos núcleos amigdalóides do medo  
condicionado e incondicionado**

*Raquel Chacon Ruiz Martinez*

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: 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

Martinez. Raquel Chacon Ruiz  
Regulação pelos núcleos amigdalóides do medo condicionado e incondicionado através da modulação serotoninérgica e gabaérgica  
135 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 Condicionado. 2. Medo Incondicionado. 3. Amígdala. 4. Muscimol. 5. Fluoxetina.

**Dedico esse trabalho aos meus pais  
Toninho e Tatá por sempre acreditarem em mim  
e aos meus irmãos Rafa e Renan por sempre estarem ao meu lado.**

## **Agradecimentos**

Ao Professor Marcus Lira Brandão, por sua excelente orientação!! Obrigada pela amizade, confiança, credibilidade e paciência. Muito obrigada por tudo que você me ensinou e pelos momentos de descontração. Não tenho como agradecê-lo por toda sua ajuda!!

Ao Professor Vitor Molina, pela amizade, apoio e pelas risadas!!

Ao Professor Dr. Ricardo Nunes, pela disponibilidade e valiosas contribuições durante o meu exame de qualificação!!

À Professora Dra. Liana Melo, pelas sugestões e disponibilidade em participar do meu exame de qualificação!!

À Professora Dra. Cláudia Padovan, pela amizade, apoio e dedicação ao longo do desenvolvimento do trabalho!!

Ao Professor Silvio Morato, por seus ensinamentos, carinho e amizade!!

Ao Professor Francisco Guimarães, pelo incentivo e apoio durante esses anos de pós-graduação. Muito obrigada pela amizade!!

Ao Professor Landeira, pela amizade e ajuda.

Aos meus pais, nunca canso de agradecê-los, por todas as oportunidades que vocês me deram durante toda a minha vida!! Agradeço muito o esforço e o sacrifício que vocês fizeram e ainda fazem para criar seus filhos com todo amor e carinho!!

Aos queridos irmãos Rafa e Renan, por tudo, não sei como enumerar o quanto vocês são importantes para mim!!

Ao meu amado marido Márcio, sempre carinhoso e atencioso, por sua paciência, amor, apoio e compreensão em todos os momentos!!

Aos meus queridos e amados avós: Maria e Lúcio, pelo amor e por sempre acreditarem em mim!!

Aos meus avós que infelizmente não estão mais presentes, Duzolina e Antônio, pelo amor e por me ensinarem que os sonhos podem se realizar!!

À minha família maravilhosa, por sempre acreditar em mim e pelo carinho de sempre!!

Aos meus tios Marcelo, Mara, Deolinda, Hugo, Nair, Silvio, Luciano e Ana por me apoiarem.

À querida Dani Chacão, por ser prima, amiga e irmã!!

Aos meus sogros: Yoshiko e Fernando, pelo carinho, apoio e por sempre cuidarem tão bem de mim!!

À minha querida amiga Christiane (“Chris”), por sempre estar ao meu lado me orientando, aconselhando, aguentando todas as crises e o principal, por ser essa pessoa sempre

amiga, carinhosa e dedicada. E é claro, aproveitando, agradeço ao Maurício, por permitir que eu alugue sua namorada!!

À Pequena Amanda, minha principal colaboradora, por ser essa pessoa tão especial, meiga, carinhosa, amiga e prestativa!! Obrigada pelo auxílio ao longo do meu doutorado e especialmente por sua ajuda nos experimentos!!

Ao querido Carlão, por tudo que você me ensinou, pelos risos, por sua paciência, seus conselhos, seu carinho e por ser essa pessoa tão especial na minha vida!!

À Grandona Karininha, por seu carinho, sua amizade, seu sorriso encantador, pelas risadas e pelo companheirismo!! Muito obrigada por toda sua ajuda ao longo do meu doutorado e principalmente com as figuras da tese!!

Ao Adriano, o senhor dos computadores, por sua amizade, disponibilidade, carinho e por suas habilidades incríveis!!

Ao Lucas, rei das pistas, por sua amizade, carisma, disponibilidade e apoio!!

À Cristina, Barbie, pelos ensinamentos, sorrisos e amizade!!

À Júlia, com seu sorriso radiante, sempre animando e encantando o laboratório!!

À Sueli, por sempre acreditar no meu potencial e me ajudar!!

Aos moradores da Coifa: Milton, Rafa, Fer e Caio, agradeço o apoio e as risadas!!

Às queridas vizinhas e amigas Dani e Milene, pela amizade, pelos jantares e por tudo!!  
Vocês são muito queridas!!

À Luzinha, mineirinha meiga e carinhosa pela amizade e apoio!!

À Juliana, pelos momentos de descontração e pela amizade desde a época da graduação!!

Ao Jorge, pelo seu bom humor e alegria!!

À Aninha, Sra. Feliz, pela sua delicadeza, meiguice e amizade.

Aos amigos do laboratório: Marcos, Lucão, Vanessa, Gabriel, Alicia, Carolina, Gabriel, Guto, Maria Cecília, Janaína, Renata, Vitor e Galvão pela amizade e por um convívio sempre tranquilo e alegre no laboratório!!

Ao Nikito, por me apoiar e me divertir quando eu estava ansiosa!!

À Rita Brandão, pelo espaço, amizade e valiosos conselhos!!

Aos meus sempre amigos do laboratório do Prof Silvio: Marisol, Fernando, Milena, Diogo, Patrícia, Khallil, Momô, Célio, Malu, Bia, Aninha, Javier, Omar e Umberto, pela amizade!!

Às queridas amigas Maria, Luciana e Cidinha pelos conselhos, risadas, apoio e amizade.

À todos os meus amigos, pela força e pique total!!

À Renata Vicentini, pela competência em seu trabalho e pelo carinho!!

Aos inesquecíveis amigos da graduação: Alexandra, Aldo e seus pimpolhos, Marina, Fabíola, Camila, Jonathas, Fabiana, Charles e todo o pessoal da 35<sup>a</sup>. Turma de Biologia!!

Às funcionárias da Pós-Graduação Inês, Denise, Sônia, obrigada pela competência e pelo auxílio durante todos esses anos em que sou aluna da pós-graduação.

Às amigas e funcionárias do Bloco 6: Cidinha e Sueli, agradeço o carinho e o apoio durante todos esses anos.

À todos os funcionários dessa Faculdade, pelo auxílio e amizade!!

Ao CNPq, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização de um sonho!!

Aos amigos da Psicobiologia, pelo apoio e carinho!!

Aos pequenos animaizinhos, tributo-lhes o meu respeito.

## Sumário

<b>RESUMO .....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS .....	15
MEDO E ANSIEDADE.....	17
SISTEMAS NEURAIS DE DEFESA.....	20
SISTEMA ENCEFÁLICO AVERSIVO E SISTEMA DE INIBIÇÃO COMPORTAMENTAL.....	21
MEDO CONDICIONADO.....	24
MEDO INCONDICIONADO .....	27
MODULAÇÃO DO MEDO POR MECANISMOS GABAÉRGICOS E SEROTONINÉRGICOS DA AMÍGDALA .....	28
<i>GABA</i> .....	28
<i>Serotonina</i> .....	31
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
OBJETIVO GERAL .....	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>EXPERIMENTO I: MODULAÇÃO SEROTONINÉRGICA DO MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL MODERADO E INTENSO.....</b>	<b>37</b>
MATERIAIS E MÉTODOS .....	38
<i>Sujeitos</i> .....	38
<i>Condicionamento Aversivo</i> .....	38
<i>Drogas</i> .....	39
<i>Delineamento Experimental</i> .....	39
<i>Análise Estatística</i> .....	40
RESULTADOS .....	42
<i>Mesmo Contexto X Contexto Diferente</i> .....	42
<i>Medo Moderado</i> .....	44
<i>Medo Intenso</i> .....	46
DISCUSSÃO .....	49
<i>Medo Moderado</i> .....	50
<i>Medo Intenso</i> .....	51

<b>EXPERIMENTO II: MODULAÇÃO GABAÉRGICA DA AMÍGDALA NO MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL E NO MEDO INCONDICIONADO .....</b>	<b>54</b>
INTRODUÇÃO .....	54
MATERIAIS E MÉTODOS .....	58
<i>Sujeitos</i> .....	58
<i>Cirurgia</i> .....	58
<i>Microinjeção</i> .....	59
<i>Equipamentos e Procedimento Experimental</i> .....	59
<i>Histologia</i> .....	61
<i>Drogas</i> .....	62
<i>Análise Estatística</i> .....	62
RESULTADOS .....	65
<i>Medo Incondicionado</i> .....	66
<i>Medo Condicionado</i> .....	72
DISCUSSÃO .....	75
<b>EXPERIMENTO III: MODULAÇÃO SEROTONINÉRGICA DA AMÍGDALA NO MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL E NO MEDO INCONDICIONADO .....</b>	<b>81</b>
INTRODUÇÃO .....	82
MATERIAIS E MÉTODOS .....	87
<i>Sujeitos</i> .....	87
<i>Cirurgia</i> .....	87
<i>Microinjeção</i> .....	87
<i>Equipamentos e Procedimento Experimental</i> .....	88
<i>Histologia</i> .....	88
<i>Drogas</i> .....	88
<i>Análise Estatística</i> .....	88
RESULTADOS .....	91
<i>Medo Incondicionado</i> .....	92
<i>Medo Condicionado</i> .....	98
DISCUSSÃO .....	101
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>110</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>135</b>

## RESUMO

Os núcleos lateral e basolateral da amígdala (LaA e BLA) servem como filtros para as informações aversivas condicionadas e incondicionadas que chegam ao cérebro, enquanto que o núcleo central da amígdala (CeA) está envolvido na expressão das reações de defesa. Sabe-se que a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) é ativada por estímulos aversivos e tem importantes conexões funcionais com a amígdala. Nesse experimento, estudou-se a influência da mediação gabaérgica e serotoninérgica dos núcleos amigdalóides sobre as respostas de congelamento e fuga induzidas pela estimulação elétrica da SCPd de ratos Wistar. Cada rato foi implantado com uma cânula em um dos núcleos amigdalóides: LaA, BLA ou CeA, por meio da qual se injetava salina, muscimol (0,5µg/0,5 µL) ou fluoxetina (3,5 nmol/0,2 µL) e um eletrodo na SCPd. O tempo de congelamento após a estimulação da SCPd também foi avaliado. Adicionalmente, os animais foram submetidos ao medo condicionado contextual utilizando-se choque nas patas como estímulo incondicionado. O congelamento condicionado contextual foi inibido após as injeções de muscimol e aumentado após administração de fluoxetina nos três núcleos amigdalóides. Os resultados obtidos mostram também que as injeções de muscimol ou fluoxetina nos três núcleos amigdalóides não alteram os limiares aversivos de congelamento e fuga. Estes resultados sugerem o envolvimento de mecanismos mediados por GABA e 5-HT nos circuitos neurais de medo condicionado, mas não no medo incondicionado induzido por estimulação da SCPd. Por outro lado, ambos tratamentos reduzem o tempo de congelamento pós-estimulação nos três núcleos estudados. Estudos anteriores mostraram que esse tipo de congelamento é resultante diretamente da estimulação da SCPd e não é contexto dependente, evidenciando sua natureza incondicionada. O congelamento pós-estimulação pode refletir o processo de transferência da informação aversiva da SCPd para estruturas superiores. Desse modo, mecanismos serotoninérgicos e gabaérgicos afetariam alguns, mas não todos os aspectos do medo incondicionado.

## **ABSTRACT**

The lateral and basolateral nuclei of amygdala (LaA and BLA, respectively) serve as a filter for unconditioned and conditioned aversive information that arrives to the brain, whereas the central nucleus of the amygdala (CeA) is considered to be the main output for the defense reaction. It has been shown that the dorsal periaqueductal gray (dPAG) is activated by threatening stimuli and has important functional links with the amygdala. In this work, we examined the influence of gabaergic and serotonergic mediation of these nuclei of amygdala on the freezing and escape responses induced by electrical stimulation of the dPAG of Wistar rats. Each rat bore a cannula implanted in the LaA, BLA or CeA for injections of the vehicle, muscimol (0.5  $\mu$ g/0.5  $\mu$ L) or fluoxetine (3.5 nmol/0.2  $\mu$ L) and an electrode in the dPAG for the determination of the freezing and escape thresholds. The duration of freezing behavior that outlasts electrical stimulation of the dPAG was also measured. These animals were also submitted to a contextual fear-conditioning using footshocks as unconditioned stimuli. Conditioned freezing to contextual cues previously associated with footshocks was reduced by injections of muscimol and increased by injections of fluoxetine into these amygdaloid nuclei. The contextual conditioned freezing is dependent on the serotonergic mechanisms and regulated by gabaergic mechanisms in the amygdala. The data obtained also show that injections of muscimol and fluoxetine into the three amygdaloid nuclei did not change the aversive thresholds for freezing and escape, but disrupted the dPAG post-stimulation freezing. Previous findings showing that this freezing results directly from dPAG stimulation and that it is not sensitive to a context shift suggest that it is of unconditioned nature. Thus, while the freezing and escape behaviors induced by direct stimulation of the dPAG are not under the influence of the amygdala, the freezing that outlasts the dPAG stimulation is. Therefore, gabaergic and serotonergic mechanisms of the amygdala can affect some, but not all, aspects of the unconditioned fear.



## INTRODUÇÃO

### COMPORTAMENTO DEFENSIVO

No decorrer da vida, os animais defrontam-se com muitas situações perigosas, as quais podem colocar em risco sua integridade e sobrevivência. Tais ameaças podem ser representadas por estímulos inatos, como predadores ou agressores da mesma espécie, ou ainda por estímulos condicionados que adquirem esta capacidade por meio de eventuais associações com estímulos causadores de dor, desconforto ou outras sensações de cunho desagradável.

Embora o comportamento de defesa e a natureza dos sinais de ameaça variem com a espécie do animal, algumas estratégias padronizadas são adotadas em função dos diferentes níveis de ameaça com os quais o animal defronta-se no seu meio ambiente. Blanchard e colaboradores (1986) e Blanchard & Blanchard (1988) sugeriram que cada uma das formas de defesa deve corresponder a um tipo de medo ou ansiedade, cada qual com um substrato neural específico. Assim, o estudo das bases neurais das diversas estratégias de defesa levaria a um conhecimento mais aprofundado da neurobiologia do medo e da ansiedade.

O primeiro nível de defesa ocorre quando o animal deixa a área segura para explorar uma área mais perigosa. Tal exploração pode ocorrer de maneira cautelosa, quando o animal encontra-se diante de um perigo incerto, apenas potencial. Esse tipo de comportamento pode levar à obtenção de informações que permitam confirmar, identificar e localizar o perigo além de sinalizar que a ameaça não é iminente, propiciando assim uma redução da defesa. Se este não é localizado ou confirmado e a investigação cautelosa prolonga-se temos a configuração da ansiedade antecipatória ou condicionada. Quando um predador é encontrado, o animal passa para o próximo nível de defesa. Para o rato esse nível é caracterizado pela resposta de

congelamento. Se o predador se aproxima (perigo proximal), o congelamento é interrompido e o animal passa para o terceiro nível de defesa, com ataques, saltos ou fuga (Blanchard *et al.*, 1986).

Recentemente, Gray & McNaughton (2000) sugeriram algumas modificações nos níveis de defesa sugeridos por Blanchard & Blanchard (1988). No modelo modificado, o congelamento, a luta e a fuga desordenada fariam parte dos níveis primários de defesa. Esses comportamentos seriam resultantes do perigo próximo, no qual há pouco tempo para análise da situação. O próximo nível seria caracterizado por uma fuga ordenada que seria resultante de um perigo identificado, porém distal. Nesse nível, há mais tempo para a análise da situação e uma maior variedade de respostas possíveis. Quando o perigo é potencial e há necessidade de ser evitado, o comportamento característico nessa situação seria a esquiva ativa. Nesse nível, pode ocorrer o condicionamento. Finalmente, quando o perigo é potencial, mas há uma tendência de aproximação, haveria a inibição comportamental juntamente com a avaliação de risco. Nessa situação um alto nível de conflito é gerado e há necessidade do processamento da informação pelas estruturas que medeiam as tendências de esquiva e aproximação, além daquelas que seriam responsáveis pelo nível mais complexo, atuando na resolução do conflito, com a definição da resposta mais apropriada após a comparação das tendências distintas.

Em ratos selvagens, o comportamento antipredatório está organizado em função da disponibilidade de fuga e da distância entre o predador e a presa. A fuga é a resposta predominante se o predador se aproxima e ainda existe uma distância segura para fugir. Quando a fuga não é possível devido a pouca distância entre os animais, o congelamento é o comportamento de defesa inicial, seguido da ameaça defensiva (vocalização com exposição dos dentes). Finalmente, se ocorre o encontro com o predador, o animal emite um ataque

defensivo. Esse ataque pode resultar em uma mordida na região do olho/focinho do predador, seguido imediatamente pela fuga (Blanchard & Blanchard, 1988).

Conhecendo-se o repertório de uma dada espécie, pode-se explorar o substrato neural subjacente a cada nível de defesa pelos métodos clássicos da neurofisiologia – ablação, estimulação elétrica, estimulação química – ou pelos métodos de análise de imagens funcionais do cérebro. Essas últimas podem compreender tanto métodos moleculares (por exemplo, imunorreatividade da proteína fos, radioimunoensaio) quanto técnicas como a tomografia e a ressonância magnética nuclear funcional (Graeff & Guimarães, 1999).

## MEDO E ANSIEDADE

O medo e a ansiedade são estados emocionais distintos, relacionados à reação de defesa dos animais. Segundo Blanchard & Blanchard (1988), um conceito importante para se diferenciar medo e ansiedade é o de direção defensiva, segundo o qual comportamentos distintos são observados quando um animal deixa uma área onde há um predador (perigo real) ou entra em uma área onde um predador esteve ou pode estar (perigo potencial). Esses pesquisadores definiram como respostas de medo aqueles comportamentos evocados na presença do predador e como respostas de ansiedade os comportamentos evocados na ausência do predador, por sinais a ele associados (por exemplo, seu odor). Com relação à distância defensiva observam-se diferentes tipos de comportamentos. Se o mesmo estiver próximo surgem respostas relacionadas ao medo e se estiver distante surgem comportamentos relacionados à ansiedade. Reações de congelamento, vocalizações, ataques defensivos com saltos e autolimpeza podem ser indicativas de medo (Blanchard & Blanchard 1988).

A palavra ansiedade tem origem no termo grego *anshein*, que significa "estrangular, sufocar, oprimir" evidenciando metaforicamente a experiência subjetiva aversiva

característica da ansiedade. Desde as primeiras reflexões sobre a ansiedade registradas na Grécia clássica, a experiência subjetiva era sempre associada a sintomas corporais. Na Antigüidade, bem como durante a Idade Média, a ansiedade raramente era tida como doença, embora Hipócrates já tivesse descrito casos óbvios de fobia. Biologicamente, a ansiedade pode ser definida como um estado emocional aversivo ligado à percepção de determinados contextos ambientais (lugares, pessoas, atividades, etc.) que são comparados à vivência anterior (memória) e que ativam sistemas cerebrais específicos, com função adaptativa (Gray, 1982; Gray & McNaughton, 2000).

A ansiedade pode ainda ser entendida como um estado emocional resultante de sentimentos de apreensão, incerteza e medo, freqüentemente experimentados na espécie humana e em outros mamíferos (Darwin, 1872). Esses sentimentos são, em humanos, relatados subjetivamente como desconfortáveis e são, em grande parte, acompanhados por diversas alterações fisiológicas, comportamentais e psicológicas, tais como taquicardia, sudorese, hiperventilação, aumento da tensão muscular, inquietude e alerta (Nutt, 1990). Quando manifestada em níveis adequados e normais, a ansiedade parece ser importante para um bom desempenho do indivíduo, ativando e mobilizando o organismo para sua adaptação ao ambiente; mas quando se torna excessiva, a ansiedade pode ser considerada patológica prejudicando o desempenho (Dractu & Lader, 1993; Graeff & Brandão, 1999). Segundo Dractu & Lader (1993), altos níveis de ansiedade podem conduzir o indivíduo à exaustão e, conseqüentemente, à formação de sintomas psicossomáticos, podendo desencadear uma patologia psicossomática. Distinguem-se dois tipos de ansiedade patológica: “estado” e “traço”. A ansiedade “estado” é freqüentemente associada com um evento estressante específico e termina quando o estímulo cessa. Já a ansiedade “traço” é uma característica persistente em um indivíduo, fazendo parte de sua personalidade (Graeff, 1997).

A Associação Americana de Psiquiatria classificou (DSM-IV) a ansiedade patológica em diversos grupos, como: distúrbio de pânico, agorafobia, distúrbio de pânico com agorafobia, fobia específica, fobia social, distúrbio obsessivo-compulsivo, distúrbio do estresse pós-traumático, distúrbio de ansiedade generalizada, distúrbio de ansiedade devido à condição médica geral, distúrbio de ansiedade induzida por substâncias e distúrbio de ansiedade não especificada. Essas diferentes formas de ansiedade respondem a diferentes tratamentos farmacológicos e abordagens terapêuticas.

Evidências sobre a neuroanatomia da ansiedade provenientes de estudos em humanos, com a utilização de recursos estáticos (ressonância magnética) e funcionais (tomografia por emissão de pósitrons PET/ ressonância nuclear magnética com fluxo) têm também mostrado novas e importantes contribuições a este campo de estudo (Sandford *et al.*, 2000).

A utilização de modelos animais de ansiedade possibilita estudar em laboratório aspectos de sintomatologia, etiologia, possíveis tratamentos e mecanismos pelos quais estes compostos produzem seus efeitos, além da neurobiologia da ansiedade (Treit, 1985; File, 1992). Os modelos animais de ansiedade são divididos em dois grupos principais: modelos baseados em medos inatos ou etologicamente fundamentados e modelos baseados em aprendizagem associativa.

Os modelos etologicamente fundamentados usam estímulos que desencadeiam respostas incondicionadas de medo em diferentes espécies animais como lugares novos e/ou intensamente iluminados, a presença de co-específicos e o confronto com predadores (Pelow *et al.*, 1985; Lister, 1990). Entre os modelos etologicamente fundamentados estão a transição claro-escuro, a interação social, o labirinto em cruz elevado, a interação presa-predador.

Muitos modelos animais de ansiedade envolvem processos de aprendizagem associativa e são baseados no condicionamento clássico e/ou operante do medo. Pelo condicionamento clássico, estímulos neutros como sons de baixa intensidade ou luz, quando

associados a estímulos aversivos incondicionados, como choques elétricos e sons intensos, tornam-se estímulos condicionados que podem desencadear respostas de medo/ansiedade (resposta condicionada). Nesse sentido, esses estímulos neutros passariam a desencadear as respostas de medo/ansiedade em decorrência de anteciparem para o animal a apresentação de um estímulo aversivo. Já pelo condicionamento operante, os animais aprendem determinadas estratégias ou tarefas, a fim de diminuir ou suprimir as conseqüências negativas associadas com a apresentação real de estímulos aversivos. Quando as respostas dos animais são seguidas de apresentação do estímulo aversivo, e ocorre uma diminuição da expressão deste comportamento no futuro, temos caracterizada uma situação de punição. Caso as respostas determinem a retirada do estímulo aversivo temos a fuga e quando são seguidas pela evitação da apresentação do estímulo aversivo temos a esquiva. Entre os modelos baseados em aprendizagem associativa estão a resposta emocional condicionada, o sobressalto potencializado pelo medo, o teste de conflito do beber punido e punição de pressão à barra (Geller & Seifter, 1960; Vogel *et al.*, 1971).

## SISTEMAS NEURAIS DE DEFESA

Os estados aversivos e as mudanças fisiológicas que os acompanham caracterizam as emoções básicas e parecem ser elaborados em circuitos encefálicos presentes em todos os mamíferos. Assim, tem-se observado que se, por um lado, as experiências subjetivas e cognitivas de muitas emoções parecem ser um fenômeno predominantemente humano, por outro, suas alterações fisiológicas e comportamentais sugerem uma herança neuronal comum com os outros animais. Com o aumento da complexidade do neocórtex no homem, as respostas às emoções foram sendo cada vez mais elaboradas. Apesar disso, os elementos básicos dos sistemas motivacionais primários, como o medo, a raiva e o pânico permaneceram

constantes. Sendo assim, esses sistemas apresentam-se organizados ao longo do neuroeixo, com características que parecem persistir ao longo da escala evolutiva (Pankseep, 1990). Com efeito, a utilização de modelos animais está baseada na premissa que considera que as raízes biológicas da ansiedade humana apresentam analogia com as reações de defesa que os animais exibem em resposta a estímulos ou situações de perigo (Graeff, 1988; Graeff & Zangrossi, 2002). De maneira geral dizemos que existem dois sistemas neurais que comandam a reação de defesa dos animais: o sistema encefálico aversivo (Graeff, 1981) e o sistema de inibição comportamental (Gray, 1982). A ativação desses dois sistemas é acompanhada por componentes subjetivos e neurovegetativos da reação de defesa e são de grande valor na luta pela sobrevivência.

#### SISTEMA ENCEFÁLICO AVERSIVO E SISTEMA DE INIBIÇÃO COMPORTAMENTAL

A técnica de estimulação elétrica de áreas subcorticais permitiu a identificação de algumas estruturas encefálicas relacionadas ao comando de respostas defensivas. Os estudos clássicos de Hess e Brüger (1943) e de Fernandez de Molina e Hunsperger (1959) foram os primeiros a indicar que a estimulação elétrica do hipotálamo medial e da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) de gatos acordados provocava uma seqüência de comportamentos defensivos que incluíam arqueamento do dorso, ataque orientado, piloereção, elevação da cauda, midríase e exposição de garras e dentes. Os autores propuseram que essas respostas eram partes de um repertório organizado, similar ao comportamento defensivo apresentado por diferentes espécies de animais, quando confrontadas com situações de perigo ou estímulos aversivos. Esse conjunto de respostas somatomotoras e viscerais foi denominado “reação de defesa afetiva”. Trabalhos posteriores

evidenciaram que várias outras estruturas encefálicas pareciam estar envolvidas na regulação de diferentes aspectos da reação de defesa.

O sistema encefálico aversivo estaria envolvido com a geração de comportamentos defensivos e a elaboração de estados motivacionais e emocionais aversivos. Esse sistema é representado por estruturas envolvidas nos processos que compreendem agressão/defesa, tais como hipotálamo medial, amígdala, SCPd, colículo inferior e camadas profundas do colículo superior (Graeff, 1990; Brandão *et al.*, 1999). O sistema encefálico aversivo processa principalmente estímulos incondicionados, produzindo um aumento expressivo da atividade dirigida para o ataque e a fuga.

A estimulação elétrica das estruturas do sistema encefálico aversivo produz um padrão característico de respostas, com atividade motora intensa com saltos, além de reações neurovegetativas, tais como, aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca, piloereção, micção, defecação, exoftalmia, similares àquelas evocadas quando um animal é confrontado com estímulos aversivos ou dolorosos em situação natural (Deakin & Graeff, 1991; Deakin *et al.*, 1994; Graeff, 1994).

Para Deakin & Graeff (1991), a amígdala estaria mais relacionada ao condicionamento aversivo. Sua disfunção geraria o distúrbio de ansiedade generalizada antecipatória. A SCPd, por sua vez, desencadearia respostas comportamentais à estimulação aversiva incondicionada (dor, asfixia e ameaça inata, como a presença de predadores), sendo que alterações funcionais nessa estrutura resultam em distúrbio do pânico. Enquanto o sistema encefálico aversivo compreende as estruturas relacionadas com as estratégias de defesa observadas em situações ameaçadoras ou perigo iminente, o sistema de inibição comportamental é ativado em situações conflitantes.

Gray & McNaughton (2000) propuseram que a ansiedade estaria relacionada com a ativação de um sistema de inibição comportamental, que levaria a um aumento nos níveis de

atenção e vigilância. Esse sistema seria representado principalmente pelo sistema septo-hipocampal, o qual é constituído pelo hipocampo, córtex entorrinal, subicular e cíngulo posterior e área septal, além de suas interconexões e vias monoaminérgicas ascendentes que inervam estas estruturas prosencefálicas.

O sistema de inibição comportamental controlaria o comportamento quando há necessidade de movimento em direção à fonte de perigo, ou seja, quando existem dois planos conflitantes: obter a segurança e satisfazer a tendência de aproximação (Gray & McNaughton, 2000). A função desse sistema é promover a inibição do comportamento em curso, com o objetivo de avaliar o grau de ameaça enquanto ocorre uma exploração cautelosa do ambiente. Para isso, existe a necessidade de um aumento nos níveis de atenção e alerta. Essa reação de defesa seria caracterizada, principalmente, pelo comportamento de avaliação de risco. Entretanto, esse sistema é acionado apenas quando existe conflito entre as tendências de aproximação do perigo e de se esquivar, e não simplesmente em resposta à presença de estímulos aversivos. Para ativar o sistema de inibição comportamental é necessário ativar, ao mesmo tempo o sistema de aproximação comportamental, isto é, colocar o animal em uma situação de conflito aproximação/ esquivar. Dependendo do grau de ativação de um e outro pode ocorrer supressão do comportamento e/ou exploração do ambiente com um aumento na atenção e no comportamento de avaliação de risco, associados à análise de informações relacionadas que estão armazenados na memória. O papel do sistema de inibição comportamental no controle da memória seria o de resolver conflitos e, para isso, ele aumentaria a valência dos estímulos e associações afetivamente negativas. A partir daí, a esquivar passa a ser predominante no conflito aproximação/ esquivar. Enfim, como consequência da ativação do sistema de inibição comportamental, temos uma alteração do equilíbrio entre as tendências de aproximação e esquivar em direção à esquivar (Gray & McNaughton, 2000).

## MEDO CONDICIONADO

O primeiro relato na literatura sobre o comportamento de congelamento como índice de medo condicionado ocorreu em estudos com animais submetidos previamente a apenas um choque nas patas e inicialmente foi denominado de “crouching”, postura agachada e imóvel (Blanchard & Blanchard, 1969). A postura de agachar sugerida pelo casal Blanchard tem sido substituída pela resposta de congelamento como medida de medo. Bolles & Collier (1976) partiram deste trabalho para seus estudos sobre o comportamento de congelamento, como resposta de medo condicionado.

Alterações inesperadas no ambiente são suficientes para causar congelamento (Hofer, 1970; Bolles & Collier, 1976). Esse comportamento é uma maneira efetiva de evitar um provável perigo, quando a fuga e a esquivas não são viáveis. A aprendizagem também desempenha um papel importante quando um estímulo ativa o sistema de medo. O congelamento condicionado é uma forma de resposta do condicionamento pavloviano, no qual o sujeito é treinado a associar um estímulo neutro (apresentação de luz, som, contexto por exemplo) com um estímulo incondicionado, como o choque elétrico. Após esse pareamento, a apresentação da luz sozinha prediz a ocorrência do choque e atua como um estímulo condicionado, desencadeando o congelamento (Fendt & Fanselow, 1999). Assim, a luz, o som ou o contexto adquirem significado por terem sido pareados com um estímulo incondicionado intrinsecamente aversivo. A aprendizagem é avaliada, portanto, pela capacidade com que a presença apenas do estímulo condicionado produz resposta condicionada em antecipação à ocorrência do estímulo incondicionado (Gewirtz & Davis, 2000).

A resposta de medo condicionado expressa como comportamento de congelamento, pode ser definida como imobilidade total com postura tensa (Fanselow, 1984). Esse

comportamento não consiste na simples supressão da atividade do animal, mas sim, constitui um padrão comportamental complexo, acompanhado de alterações autonômicas, como aumento da atividade respiratória, hipertensão, aumento da frequência cardíaca, aumento da defecação e micção, e resposta antinociceptiva que reduz o impacto do choque subsequente pela ativação de mecanismos endógenos (Fanselow & Bolles, 1979; Fanselow & Baackes, 1982; Fanselow, 1984; Avanzi *et al.*, 1998; Antoniadis & McDonald, 1999; Carrive *et al.*, 2000; Carrive, 2002).

O tempo de resposta de congelamento é predominantemente determinado pelas características do choque e pela intensidade e/ou duração do mesmo (Fanselow, 1980). É determinado também pelo tipo de estímulo condicionado apresentado ao animal, ou seja, a duração é menor se o estímulo for discreto, como a luz ou o som (Sakaguchi *et al.*, 1983). Ao contrário, o tempo da resposta de congelamento aos estímulos contextuais pode ultrapassar 40 minutos, dependendo da duração das sessões de condicionamento (Fanselow, 1980; Sakaguchi *et al.*, 1983; LeDoux *et al.*, 1988; Antoniadis & McDonald, 1999; Carrive, 2002; Silva *et al.*, 2004).

Evidências mostram que lesões na amígdala e no hipocampo, realizadas após o treino, produzem enfraquecimento na expressão de congelamento (Blanchard & Blanchard, 1972; Davis, 1992a; 1992b; Maren & Fanselow, 1997), e que a lesão hipocampal, antes do treino, prejudica a aquisição do medo condicionado ao contexto (LeDoux, 1994). A destruição seletiva do núcleo lateral da amígdala bloqueia a resposta de congelamento a estímulos auditivos condicionados (Iwata *et al.*, 1986; LeDoux *et al.*, 1990a). Acredita-se que os sistemas sensoriais conduziriam as informações sobre os estímulos condicionados e incondicionados até os núcleos lateral e basolateral da amígdala (Davis, 1997; Maren, 1999; LeDoux, 2000). Estas evidências permitem sugerir que estes núcleos possuem função na aprendizagem e memória do medo condicionado (Wallace & Rosen, 2001). No paradigma de

sobressalto potencializado pelo medo, lesões no núcleo central da amígdala bloquearam a potencialização do sobressalto (Hitchcock & Davis, 1986; 1987). As projeções que partem do núcleo central da amígdala para os diversos núcleos hipotalâmicos e do tronco cerebral parecem mediar componentes distintos da resposta de medo. Suas projeções para o núcleo reticulopontino caudal, possivelmente, medeiam o sobressalto potencializado pelo medo, ao passo que as eferências para o hipotálamo lateral e bulbo medeiam as respostas autonômicas e as projeções para a substância cinzenta periaquedutal são importantes para o congelamento e a antinocicepção (LeDoux *et al.*, 1988).

Acredita-se, também, que o complexo basolateral da amígdala esteja envolvido na esquizofrenia, depressão e outras desordens que mobilizam componentes afetivos. Alguns desses comportamentos são regulados por impulsos do córtex pré-frontal ao núcleo basolateral da amígdala. A ativação dos receptores de dopamina atenua os impulsos do córtex pré-frontal ao núcleo basolateral da amígdala, confirmando, em parte, a sugestão acima (Rosenkranz & Grace, 2001). Entretanto, os mecanismos celular e farmacológico responsáveis por essas manipulações ainda não estão claros.

Há evidência da participação de uma via amígdala/substância cinzenta periaquedutal ventrolateral no medo condicionado. Lesões excitotóxicas, nesta última estrutura, feitas antes ou após o treino, inibem a resposta de congelamento condicionado (De Oca *et al.*, 1998). Da mesma forma, lesões na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral diminuem também a resposta de congelamento condicionado ao som pareado com choques nas patas (LeDoux *et al.*, 1988), como também as respostas de medo contextual (Kim *et al.*, 1993; De Oca *et al.*, 1998; Vianna *et al.*, 2001a).

Assim, os circuitos neurais que subservem essa forma de aprendizagem pavloviana vêm sendo examinados com detalhes. Bem menos conhecido, contudo, é como os sistemas modulatórios dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico, interagem com o circuito de

medo. Na literatura, algumas evidências, realçam o papel da dopamina (Blackburn *et al.*, 1992; Salamone, 1994; Aguilar *et al.*, 2000), serotonina (Ceulemans *et al.*, 1985; Van Praag *et al.*, 1990; Kent *et al.*, 1998; Dalery & Aubin, 2001; Nardi, 2001) e noradrenalina (Ressler & Nemeroff, 2001; Detke *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2004; Rabasseda, 2004) na neurobiologia de certas desordens psiquiátricas. Nos modelos de ansiedade, as drogas antidepressivas que bloqueiam a recaptção de serotonina como a fluoxetina apresentam efeito quando utilizadas de maneira crônica ou ainda de maneira subcrônica em comparação com a administração aguda (Porsolt *et al.*, 1977; Beck & Fibiger, 1995; Kent *et al.*, 1998; Nardi, 2001; Borelli *et al.*, 2004).

## MEDO INCONDICIONADO

Está bem estabelecido na literatura que os ratos congelam, esquivam e têm respostas defensivas a odores de predadores. Essas características são indicadoras de medo incondicionado (Cattarelli & Chanel, 1979; Blanchard & Blanchard, 1989; Berton *et al.*, 1998; Wallace & Rosen, 2001). Várias estruturas do sistema nervoso central, tais como, a SCPd, hipotálamo medial, camadas profundas do colículo superior, a amígdala e o colículo inferior são acionadas na gênese e elaboração dessas estratégias defensivas (Brandão *et al.*, 1999).

A microinjeção de drogas que diminuem a neurotransmissão gabaérgica, como também a estimulação elétrica da SCPd desencadeiam comportamento de congelamento alternado por corridas e saltos aparentemente não-direcionados (Brandão *et al.*, 1982; Schmitt *et al.*, 1984). Esta reação encontra similaridades ao que ocorre nos ataques de pânico apresentados em seres humanos (Panksepp, 1982; Brandão *et al.*, 2005).

Os circuitos que elaboram o comportamento de congelamento condicionado compreendem o núcleo central da amígdala, núcleo mediano da rafe, hipocampo e substância cinzenta periaquedutal ventral (Fanselow, 1980; LeDoux *et al.*, 1988; Avanzi *et al.*, 1998; Antoniadis & McDonald, 1999). Entretanto, pouco se sabe sobre a participação dessas estruturas na organização do medo incondicionado. Várias evidências sugerem que o complexo basolateral é um sítio de plasticidade e armazenamento de informações emocionais aversivas (Fanselow & LeDoux, 1999). Estudos deste laboratório mostram que a lesão do complexo basolateral da amígdala aumenta o caráter aversivo da estimulação elétrica do colículo inferior, enquanto que a lesão do núcleo central reduz essa aversividade, sugerindo que o complexo basolateral contém mecanismos neurais inibitórios, enquanto que o núcleo central da amígdala pode representar uma importante via motora de saída para o comportamento defensivo induzido pela ativação do colículo inferior (Maisonnette *et al.*, 1996; Macedo *et al.*, 2002).

## MODULAÇÃO DO MEDO POR MECANISMOS GABAÉRGICOS E SEROTONINÉRGICOS DA AMÍGDALA

### GABA

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central dos mamíferos. É produzido pela remoção enzimática de um grupo carboxílico do ácido glutâmico. Apresenta-se virtualmente em todas as áreas do neuroeixo, na maioria delas associado à interneurônios inibitórios locais, e mostra-se ativo em aproximadamente 30 a 40% das sinapses (Graeff, 1993a).

O controle exercido por mecanismos gabaérgicos sobre estruturas responsáveis pela geração e elaboração do comportamento de defesa tem sido um dos principais focos de

atenção de pesquisas sobre a modulação dos substratos neurais da aversão no teto mesencefálico. Diversos estudos vêm mostrando que injeções locais de benzodiazepínicos na SCPd deprimem o comportamento de fuga aprendido e não aprendido, induzido por estimulação elétrica dessa região (Brandão *et al.*, 1994; 1999). Dados obtidos de estudos comportamentais usando modelos animais de ansiedade têm fornecido evidências consistentes de uma interação da ação antiaversiva dos benzodiazepínicos com mecanismos gabaérgicos no teto mesencefálico. Particularmente, tem sido observado que antagonistas de receptores gabaérgicos injetados nessa região causam reações defensivas similares às que se observam com a estimulação elétrica, o que sugere que o complexo GABA-benzodiazepínico exibe um papel inibitório tônico sobre o substrato neural da ansiedade no teto mesencefálico (Schmitt *et al.*, 1985; Brandão *et al.*, 1988; 1994; 1999).

A estimulação química da SCPd com drogas que diminuem a neurotransmissão gabaérgica (Brandão *et al.*, 1982) e a estimulação elétrica dessa estrutura em animais são capazes de produzir comportamentos que se assemelham aos ataques de pânico clínicos e experimentais em humanos. Os animais apresentam um congelamento alternado com corridas desenfreadas e saltos; comportamento em geral acompanhado por exoftalmia e/ou defecação e micção. Essas alterações autonômicas estão associadas ao comportamento defensivo, e tem sido relatado que são similares às induzidas por estimulação de outras estruturas envolvidas com a reação de defesa (Brandão *et al.*, 1994; 1999; Schenberg *et al.*, 2000).

Herdade e colaboradores (2006) examinaram o papel da neurotransmissão gabaérgica na modulação dos comportamentos de medo e ansiedade e mostraram que a disfunção desses mecanismos regulatórios na amígdala resultam em reações defensivas similares às mencionadas acima. Adicionalmente, Venton e colaboradores (2006) mostraram que a redução dos níveis gabaérgicos da amígdala facilita o medo condicionado contextual e auditivo.

De maneira geral pode ser dito que a amígdala, uma das principais estruturas na regulação do comportamento emocional, ocupa uma posição central na regulação de respostas condicionadas e incondicionadas, atuando como um filtro para informações sensoriais que parecem ser cruciais para a aquisição do medo condicionado (Davis *et al.*, 1994a; Davis 1992b; LeDoux, 1994; Killcross *et al.*, 1997). Vários estudos apontam uma função regulatória do núcleo basolateral na aquisição do medo condicionado (Davis 1992b, LeDoux *et al.*, 1990a,b; Vazdarjanova *et al.*, 2001). Alterações no funcionamento da amígdala têm sido relacionadas ao transtorno de ansiedade generalizada (Davis *et al.*, 1994a; De Oca *et al.*, 1998; Graeff, 2002). Nesse contexto, os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos são relacionados à potencialização de mecanismos gabaérgicos no núcleo basolateral (Davis *et al.*, 1994a; LeDoux, 2000). Macedo e colaboradores (2006) mostraram que o aumento da neurotransmissão gabaérgica no núcleo basolateral da amígdala através de injeções de muscimol produz uma clara redução na aversão condicionada ao lugar. Enquanto que no medo incondicionado gerado pela ativação de substratos neurais da aversão no colículo inferior a microinjeção de semicarbazida no núcleo basolateral da amígdala levou a um aumento da aversividade, expresso pelo aumento do tempo de congelamento e do número de cruzamentos no teste do campo aberto.

O papel do GABA na ansiedade está fortemente apoiado na indiscutível eficácia dos benzodiazepínicos (BZDs) como ansiolíticos. Os receptores BZDs e o GABA, por estarem amplamente distribuídos no sistema nervoso central, podem exercer influência em vários sistemas neuroniais diferentes. Torna-se, então, extremamente importante delimitar quais sistemas neuroniais GABA-BZD participam da regulação da ansiedade. Como exemplo, o complexo amigdalóide parece estar mais relacionado com o medo condicionado e com o transtorno de ansiedade generalizada, que é susceptível aos medicamentos benzodiazepínicos (Davis, 1997). A SCPd, por sua vez, estaria predominantemente envolvida na elaboração do

medo incondicionado e no transtorno de pânico. Essa região possui um número bem menor de receptores BZDs quando comparada à amígdala. Portanto, é plausível que a SCPd possa ser o local de ação de certos compostos BZDs potentes, eficazes no transtorno de pânico quando administrados em doses elevadas e por período prolongado (Graeff, 1993a; Russo et al., 1993).

### *Serotonina*

Os neurônios contendo 5-hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina, no sistema nervoso central foram localizados utilizando técnicas de imunofluorescência e auto-radiográficas. Eles estão concentrados na rafe do tronco encefálico. Os núcleos pontinos e bulbares projetam-se caudalmente para a medula espinhal, onde a 5-HT está envolvida com a percepção dolorosa, com a regulação visceral e com o controle motor. Os núcleos mesencefálicos – particularmente o núcleo dorsal da rafe e o núcleo mediano da rafe – inervam o prosencéfalo, com destaque para a amígdala, bem como o teto mesencefálico, com destaque da SCPd (Graeff, 1997).

A função da 5-HT na ansiedade foi estabelecida observando-se que a diminuição da neurotransmissão serotoninérgica, pela administração sistêmica de inibidor da síntese de 5-HT (Robichaud & Sledge, 1969) ou de antagonistas serotoninérgicos (Graeff & Schoenfeld, 1970), liberava o comportamento suprimido por punição em teste de conflito. Essas observações levantaram a possibilidade de que a 5-HT pudesse participar da modulação do comportamento defensivo em modelos animais de ansiedade (Graeff, 1993b).

Dessa forma, vários estudos foram realizados para investigar o modo de ação da 5-HT nas estruturas envolvidas na mediação da ansiedade. Alguns trabalhos demonstraram que a serotonina medeia os efeitos da punição ao estimular regiões prosencefálicas, como a amígdala e a formação hipocampal (Stein *et al.*, 1973). Entretanto, outras evidências

sugeriram que esse mesmo neurotransmissor parece ter um papel antiaversivo na SCPd, pois a estimulação do núcleo dorsal da rafe (Kiser *et al.*, 1980) e a microinjeção local de agonistas serotoninérgicos (Nogueira & Graeff, 1995) reduzem a aversividade de sua estimulação. A 5-HT parece exercer esse efeito antiaversivo particularmente pela atuação em receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> (Schutz *et al.*, 1985; Nogueira & Graeff, 1995).

A amígdala recebe diversas modalidades de informação sensorial, olfativa, visual e auditiva. Essas informações permitem uma estratégia de defesa mais integrada e elaborada frente a estímulos sinalizadores de perigo ou de ameaça distal ou potencial, (Blanchard & Blanchard 1988). A defesa pode ser de natureza inata ou, por outro lado, a estratégia pode ter adquirido significado emocional através de um mecanismo de condicionamento clássico (LeDoux *et al.*, 1988). Assim, Deakin & Graeff (1991) propuseram que a via serotoninérgica prosencefálica, originária do núcleo dorsal da rafe, e que inerva a amígdala, promoveria comportamentos de esquiva em resposta a estímulos aversivos condicionados. O tipo de ansiedade elaborada por esta via seria o da ansiedade condicionada, ou seja, antecipatória ao perigo. Nesse caso, a ameaça estaria a uma certa distância do animal, levando-o a evitá-la. Por outro lado, segundo ainda esta teoria, a amígdala deve exercer algum controle sobre os substratos neurais do medo localizados na SCPd que são ativados por estímulos proximais que ameaçam a sobrevivência do animal. Como a ansiedade antecipatória que resulta do medo moderado e o pânico que resulta do perigo proximal são excludentes, a ativação da amígdala deve cursar com a inibição da SCPd. Em vista disso, têm sido realizados estudos com procedimentos de medo moderado e intenso na perspectiva de que eles possuam substratos neurais distintos da mesma forma que possam representar tipos diferentes de ansiedade. De fato, enquanto o medo contextual moderado é sensível à ação ansiolítica dos BZDs, o medo contextual intenso produzido pelo condicionamento com choques de intensidade alta é resistente à ação ansiolítica dos BZDs (Santos *et al.*, 2005). De forma interessante, estudo

recente deste laboratório mostrou que a fluoxetina administrada por via sistêmica e de forma subcrônica melhora os mecanismos de defesa de animais submetidos ao medo condicionado contextual intenso (Santos *et al.*, 2006). Não há entretanto, na literatura qualquer estudo que investigue os efeitos de drogas serotoninérgicas administradas localmente na amígdala ou na SCPd sobre o medo moderado ou intenso.

O núcleo dorsal da rafe mantém extensas conexões com os núcleos basolateral e central da amígdala (Azmitia & Segal, 1978; Vertes, 1991; Fallon & Ciofi, 1992). Estudos neuroquímicos mostram que a ativação do núcleo dorsal da rafe, através de injeção de ácido caínico, aumenta a liberação de serotonina na amígdala (Viana *et al.*, 1997). Outros estudos, também utilizando a técnica de microdiálise, mostram um aumento na liberação extracelular de serotonina na amígdala em ratos submetidos a estímulos estressantes (Amat *et al.*, 1998; Rueter & Jacobs, 1996; Funada & Hara, 2001). Os receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>1</sub> são encontrados em alta densidade principalmente no hipocampo, porém também são observadas altas densidades no septo, hipotálamo, algumas camadas do córtex e na amígdala, particularmente no núcleo central. Por outro lado, os três núcleos amigdalóides de interesse para esse estudo parecem ter uma alta densidade de receptores 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> (Pazos & Palácios, 1985; Ohuoda *et al.*, 1993; Rainnie, 1999).

Stutzmann & LeDoux (1999) examinaram o papel da 5-HT na modulação do processamento de informações sensoriais na amígdala. Esses autores mostraram que a serotonina na amígdala exerce um papel inibitório sobre as aferências glutamatérgicas oriundas do córtex e do tálamo auditivo. Ainda, esta inibição da atividade glutamatérgica no núcleo basolateral ocorre, predominantemente, devido à localização desses receptores serotoninérgicos, provavelmente dos subtipos 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub>, nos interneurônios gabaérgicos e nos neurônios de projeção do núcleo basolateral (Stutzmann & LeDoux, 1999; Rainnie,

1999). Segundo esses estudos, o principal efeito da serotonina no núcleo basolateral seria o de provocar uma ação estimulatória sobre os interneurônios gabaérgicos.

Em estudo recente, a administração do antagonista 5-HT<sub>2</sub> nefazodona no núcleo basolateral potencializou os efeitos gerados pela estimulação do colículo inferior com a administração de aminoácido excitatório NMDA nessa estrutura mesencefálica (Maisonnette *et al.*, 2000). A lesão neuroquímica dos terminais nervosos serotoninérgicos com a neurotoxina serotoninérgica 5,7-DHT dos núcleos basolateral e central produz resultados opostos na aversividade gerada pela estimulação elétrica do colículo inferior: a lesão serotoninérgica no núcleo basolateral facilita a aversividade gerada no colículo inferior, enquanto a lesão no núcleo central a diminui (Macedo *et al.*, 2002).

Adicionalmente, estudos mostram que ocorre um aumento na liberação extracelular de dopamina e serotonina na amígdala durante estados aversivos (Rueter & Jacobs, 1996; Amat *et al.*, 1998; Funada & Hara, 2001; Inglis & Moghaddam, 1999; Young & Ress, 1998). Como muitos estudos indicam o envolvimento da amígdala em estados aversivos dependendo da região estudada é possível que mecanismos mediados por GABA e/ou 5-HT nos núcleos lateral, basolateral e central da amígdala possam influenciar diretamente o comportamento defensivo induzido pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd. Baseado nesse raciocínio postula-se que eventuais alterações na neurotransmissão gabaérgica e serotoninérgica no núcleo lateral, basolateral e central da amígdala podem interferir com o papel funcional da amígdala na regulação do medo condicionado e incondicionado gerado por estimulação da SCPd.

**OBJETIVOS**

---

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Estudar o papel da neurotransmissão gabaérgica e serotoninérgica nos núcleos lateral, basolateral e central da amígdala no medo condicionado e no medo incondicionado.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o papel da neurotransmissão serotoninérgica no medo condicionado contextual moderado e intenso com injeções sistêmicas de fluoxetina. No primeiro experimento não foi estudada a mediação gabaérgica uma vez que estudo anterior do laboratório (Nobre *et al.*, 2004) já avaliou os efeitos da administração sistêmica de muscimol em modelos animais de ansiedade.
- Estudar a influência da neurotransmissão gabaérgica com a injeção de muscimol nos núcleos da amígdala sobre o medo incondicionado induzido pela estimulação elétrica da SCPd e sobre o medo condicionado contextual.
- Estudar os efeitos da neurotransmissão serotoninérgica utilizando-se fluoxetina nos núcleos da amígdala sobre o medo incondicionado induzido pela estimulação elétrica da SCPd e sobre o medo condicionado contextual.

**EXPERIMENTO I**  
**MODULAÇÃO SEROTONINÉRGICA DO MEDO CONDICIONADO**  
**CONTEXTUAL MODERADO E INTENSO**

---

## **EXPERIMENTO I: MODULAÇÃO SEROTONINÉRGICA DO MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL MODERADO E INTENSO**

Nesse experimento foi avaliado o papel da neurotransmissão serotoninérgica no medo condicionado contextual moderado e intenso.

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

#### *Sujeitos*

Foram utilizados 156 ratos *Wistar* machos, com peso médio de 230 g, agrupados em 5 animais em gaiolas de polipropileno (30 x 32 x 18 cm), forradas com maravalha, com livre acesso à água e alimento. Os animais foram mantidos em um biotério com temperatura controlada a  $23^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$  em um programa de iluminação artificial com ciclo claro/escuro 12 h x 12 h, com início do período claro às 7:00 horas.

#### *Condicionamento Aversivo*

Foram utilizadas duas caixas distintas: mesmo contexto (caixa A) e contexto diferente (caixa B). A caixa A mede 25 x 25 x 15 cm, com o teto e paredes de acrílico transparente, o piso constituído por 15 grades eletrificadas, separadas 1,2 cm uma da outra, conectadas a um gerador de choques (Albarsch). A porta, situada na face anterior da caixa, é confeccionada em acrílico transparente para facilitar a observação do animal pelo experimentador. A caixa B, diferente e maior, mede 60 x 40 x 30 cm com paredes de acrílico preto e a porta situa-se na face superior da mesma.

Na caixa A ou B, os animais foram colocados na caixa experimental por 8 minutos e a seguir receberam 10 choques nas patas de intensidade 0,3 (medo moderado) ou 0,6 mA (medo intenso), 1 s de duração, com intervalo randômico de 10 a 50 s entre as tentativas, controlado por um microprocessador (Insight Equipment, Brasil). Após cada sessão, os animais foram submetidos ao tratamento subcrônico com administração intraperitoneal (i.p.) de 3 injeções de salina ou fluoxetina (0, 19 h e 23 h após o condicionamento) e, 24 horas após, os animais (condicionados na caixa A ou B) foram testados na caixa A. A eficácia deste tratamento subcrônico já foi verificada por Porsolt e colaboradores (1977). Adicionalmente, foi verificado o efeito da administração aguda de fluoxetina (15 minutos antes do teste) no paradigma de medo condicionado contextual. O teste durou 8 minutos e sempre foi realizado na caixa A, onde foi medido o tempo de congelamento que é definido operacionalmente como ausência de todos os movimentos corporais, exceto aqueles relacionados à respiração.

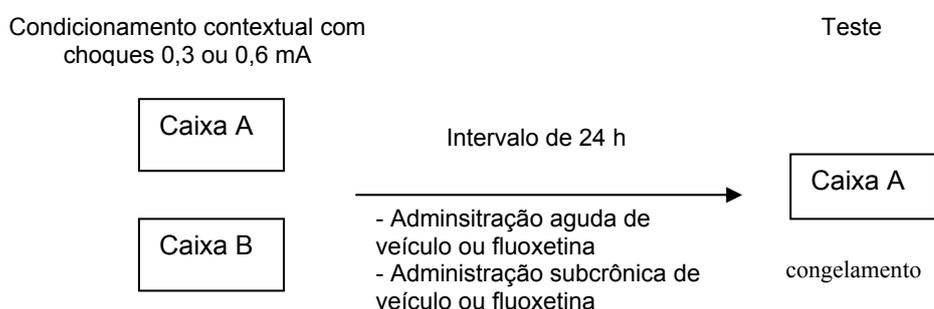
### *Drogas*

Os animais receberam injeções de fluoxetina, inibidor de recaptação de serotonina (Kent *et al.*, 1998), nas doses de 10 e 20 mg/Kg ou de solução fisiológica (NaCl, 0,9%), por via intraperitoneal. As soluções foram administradas no volume de 1 mg/Kg.

### *Delineamento Experimental*

Os animais foram submetidos ao condicionamento contextual aversivo que consistiu de 2 sessões: uma de condicionamento e outra de teste. Na sessão de condicionamento, os ratos receberam na caixa A, ou na caixa B, 10 choques nas patas com intensidade de 0,3 mA (medo moderado) ou 0,6 mA (medo intenso). Após a sessão condicionamento, os animais receberam por via intraperitoneal três injeções de salina ou fluoxetina (10 e 20 mg/kg).

Segundo esquema proposto por Porsolt e colaboradores (1977), os animais receberam injeções intraperitoniais 0, 19 e 23 horas após a sessão de condicionamento. Adicionalmente, um outro grupo experimental recebeu administração aguda 15 minutos antes da sessão teste de salina ou fluoxetina (10 e 20 mg/kg). A sessão teste ocorreu na caixa A, com duração de 8 minutos nos quais registrou-se o tempo de congelamento dos animais. Abaixo temos um esquema desse delineamento experimental.



Esquema 1. Delinamento experimental para a avaliação dos efeitos do tratametro agudo ou subcrônico (ip) com fluoxetina ou salina sobre o medo contextual moderado (0,3 mA) e intenso (0,6 mA). Caixa A = mesmo contexto. Caixa B = Contexto Diferente.

### *Análise Estatística*

Os dados estão expressos como média + erro padrão da média (EPM). Nesse experimento para avaliar a resposta de congelamento em ratos submetidos ao condicionamento no mesmo contexto e no contexto diferente com choques de 0,3 e 0,6 mA foi utilizado o teste *t* de Student. Também foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via para avaliar os efeitos da administração aguda e subcrônica de fluoxetina no medo moderado e intenso. No caso de significância estatística, aplicou-se o teste de Newman-Keuls. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

**RESULTADOS**

---

## RESULTADOS

### *Mesmo Contexto X Contexto Diferente.*

A Figura 1A mostra o tempo de congelamento dos animais submetidos ao condicionamento contextual aversivo na caixa B com choque nas patas de intensidade 0,3 mA e testados na caixa A, 24 h após o condicionamento. O teste  $t$  de Student não acusou diferença entre os grupos [ $t_{(1,14)} = 1,82$  e  $p > 0,05$ ]. Igualmente, a Figura 1C mostra o tempo de congelamento dos animais submetidos ao condicionamento contextual aversivo na caixa B com choque nas patas de intensidade 0,6 mA e testados na caixa A, 24 h após o condicionamento. O teste  $t$  de Student também não mostrou diferença entre os grupos [ $t_{(1,14)} = 1,17$ ;  $p > 0,05$ ].

A Figura 1B mostra o tempo de congelamento dos animais submetidos ao condicionamento contextual aversivo na caixa A com choque nas patas de intensidade 0,3 mA e testados na caixa A, 24 h após o condicionamento. O teste  $t$  de Student acusou diferença entre os grupos [ $t_{(1,18)} = 26,93$  e  $p < 0,05$ ]. A Figura 1D mostra o tempo de congelamento dos animais submetidos ao condicionamento contextual aversivo na caixa A com choque nas patas de intensidade 0,6 mA e testados na caixa A, 24 h após o condicionamento. O teste  $t$  de Student acusou diferença entre os grupos [ $t_{(1,22)} = 6,80$  e  $p < 0,05$ ].

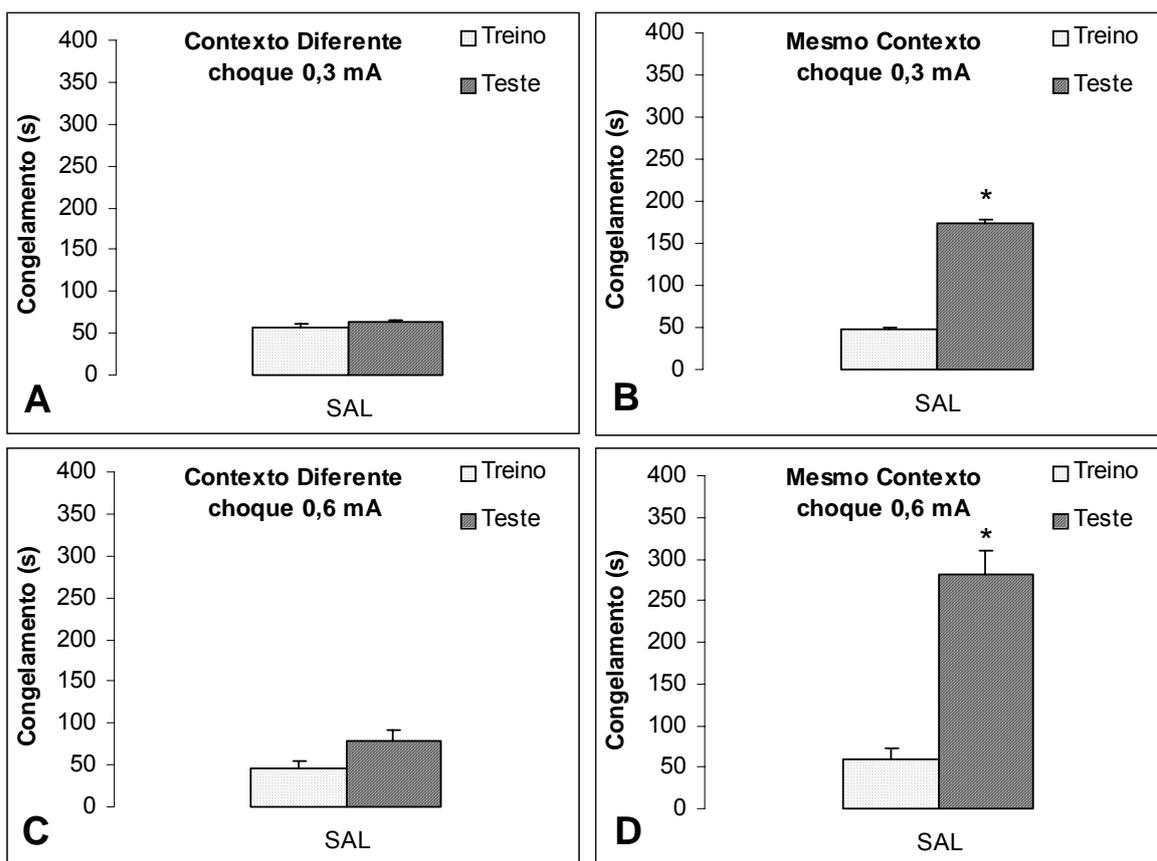


Figura 1. Tempo de congelamento (s) em animais testados no contexto diferente com choque nas patas de intensidade 0,3 mA (A) ou 0,6 mA (C) ou no mesmo contexto com choque nas patas de intensidade 0,3 mA (B) ou 0,6 mA (D). As colunas pontilhadas representam o tempo de congelamento registrado durante a sessão de condicionamento e as colunas hachuradas representam o tempo de congelamento na caixa A durante a sessão teste. SAL=salina (N = 10 para 0,3 mA e N = 8 para 0,6 mA). As colunas representam a média e as barras representam o E.P.M. \*, diferença significativa em comparação com o congelamento registrado durante a sessão treino. Os animais foram injetados com salina para permitir um controle para os grupos de animais injetados com fluoxetina.

*Medo Moderado*Administração aguda de fluoxetina

A Figura 2 mostra o tempo de congelamento dos animais que passaram pelo condicionamento contextual moderado (choques de intensidade 0,3 mA) e receberam tratamento agudo com salina ou fluoxetina (10 e 20 mg/kg, ip). A ANOVA de uma via não revelou diferença entre os grupos [ $F_{(2,27)} = 2,123, p > 0,05$ ].

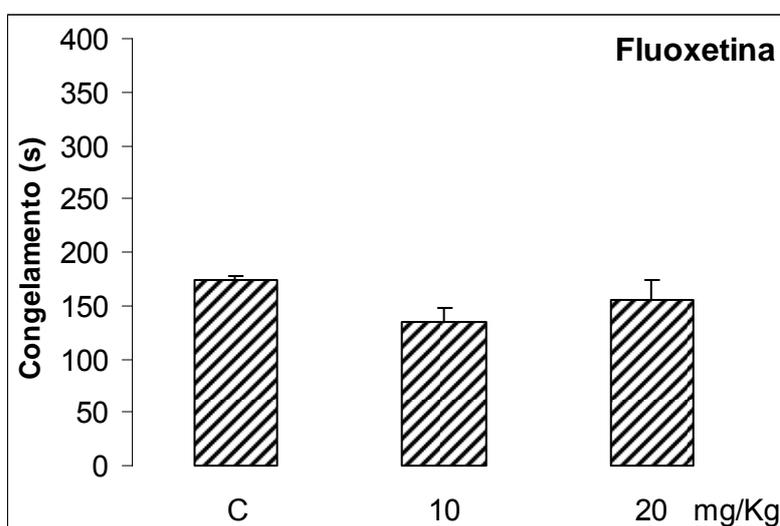


Figura 2. Efeitos da administração intraperitoneal aguda de salina ou fluoxetina, nas doses de 10 e 20 mg/Kg, sobre o tempo de congelamento (s) dos animais avaliados na sessão teste (caixa A). C = controle (salina). As colunas representam a média e as barras representam o E.P.M. (N=10 para todos os grupos).

### Administração subcrônica de fluoxetina

A Figura 3 mostra o tempo de congelamento dos animais que passaram pelo condicionamento contextual moderado (choques de intensidade 0,3 mA) e receberam tratamento subcrônico com salina ou fluoxetina (0, 19 e 23 h depois do condicionamento). A ANOVA de uma via não revelou diferença para os animais administrados com fluoxetina [ $F_{(2,27)} = 3,00$ ,  $p > 0,05$ ].

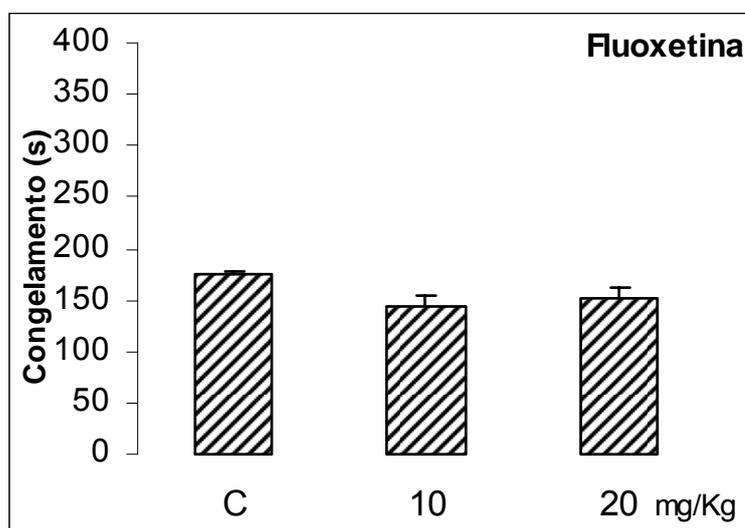


Figura 3. Efeitos da administração intraperitoneal subcrônica de salina ou fluoxetina nas doses de 10 e 20 mg/Kg, sobre o tempo de congelamento (s) dos animais avaliados na sessão teste (caixa A), 24 h após a sessão de condicionamento contextual pareado com choque nas patas, 0,3 mA. C=controle (salina). As colunas representam a média e as barras representam o E.P.M. (N=10 para todos os grupos).

*Medo Intenso*Administração aguda de fluoxetina

A Figura 4 mostra o tempo de congelamento dos animais que passaram pelo condicionamento contextual intenso (choques de intensidade 0,6 mA) e receberam tratamento agudo com salina ou fluoxetina (10 e 20 mg/kg, ip). A ANOVA de uma via não revelou diferença entre os grupos [ $F_{(2,21)} = 0,176$ ,  $p > 0,05$ ].

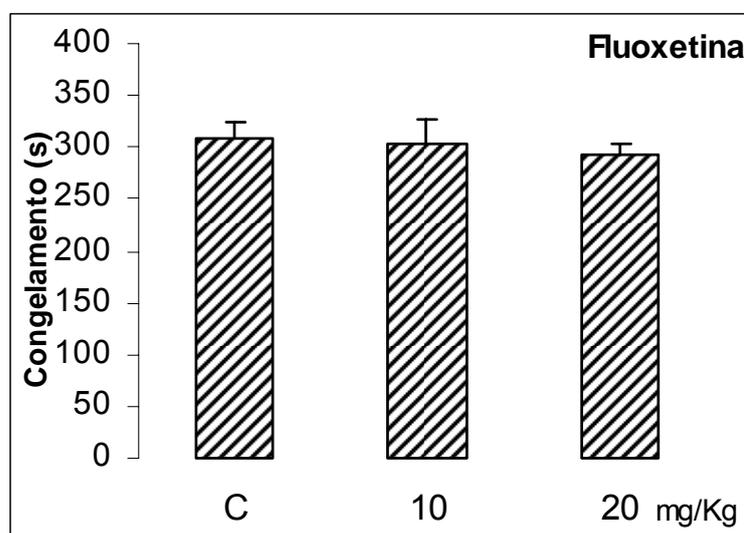


Figura 4. Efeitos da administração intraperitoneal aguda de salina ou fluoxetina, nas doses de 10 e 20 mg/Kg, sobre o tempo de congelamento (s) dos animais avaliados na sessão teste (caixa A). C = controle (salina). As colunas representam a média e as barras representam o E.P.M. (N=8 para todos os grupos).

### Administração subcrônica de fluoxetina

A Figura 5 mostra o tempo de congelamento em animais que passaram pelo condicionamento contextual intenso (choques de intensidade 0,6 mA) e receberam tratamento subcrônico com salina ou fluoxetina (0, 19 e 23 h depois do condicionamento). A ANOVA de uma via revelou diferença entre os grupos [ $F_{(2,33)} = 5,95$ ,  $p < 0,05$ ]. O teste *post-hoc* de Newman Keuls mostrou uma redução do tempo de congelamento quando os animais foram administrados subcronicamente com fluoxetina 10 e 20 mg/kg em comparação com o grupo controle (salina).

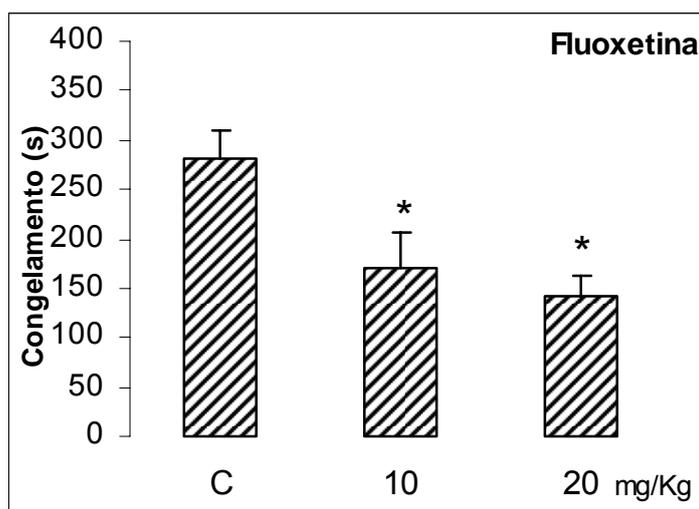


Figura 5. Efeito da administração intraperitoneal subcrônica de salina ou fluoxetina, nas doses de 10 e 20 mg/Kg, sobre o tempo de congelamento dos animais avaliados na sessão teste (caixa A), 24 h após a sessão de condicionamento contextual com choque nas patas de 0,6 mA. C=controle (salina). \*, diferença significativa dos tratamentos em relação ao controle (salina), segundo o teste de Newman Keuls. As colunas representam a média e as barras representam o E.P.M. (N=12 para todos os grupos).

**DISCUSSÃO**

---

## DISCUSSÃO

Na literatura vários relatos mostram que os ratos congelam, apresentam pressão arterial sangüínea elevada e sobressalto potencializado quando novamente expostos ao contexto onde receberam um estímulo aversivo, tal como o choque nas patas (Blanchard & Blanchard, 1972; McNish *et al.*, 1997). Essas reações indicam que os ratos aprenderam a relação entre o contexto e o estímulo incondicionado apresentado na forma de choques nas patas, estabelecendo uma aprendizagem associativa entre a representação do contexto e o choque (Bolles & Fanselow, 1981; Fanselow, 1990). Esta resposta de congelamento é amplamente documentada na literatura (Fanselow, 1986, 1990; Kilcross *et al.*, 1997). Ao lado disso, ratos esquivam-se do contexto onde receberam o choque, preferindo a livre movimentação no contexto sem associação com o choque (McAllister & McAllister, 1995; Holahan & White, 2002). Deste modo, no teste de mudança de contexto (Contexto Diferente, Figura 1A e 1C), não ocorreu congelamento significativo em concordância com outros relatos da literatura (Fanselow, 1980; Landeira-Fernandez, 1996).

Os resultados do presente trabalho mostram uma relação unimodal entre a resposta de congelamento dos animais submetidos ao condicionamento contextual aversivo com choques nas patas na intensidade de 0,3 e 0,6 mA corroborando Blanchard & Blanchard (1969) que sugerem que o tempo de congelamento é proporcional à intensidade do choque, sendo que quanto maior a intensidade, maior o tempo de congelamento do animal. Esta resposta de congelamento é caracterizada pela supressão da atividade que o animal está engajado e tem sido considerada um indicador de ansiedade condicionada frente a situações de perigo que depende da intensidade do choque (Small, 1899; Rescorla, 1988; Landeira-Fernandez, 1996; Winocur *et al.*, 1987; Phillips & LeDoux, 1992; LeDoux, 1995).

As diferentes modulações serotoninérgicas observadas nas diversas circuitarias neurais que envolvem o comportamento emocional ajudam a interpretar a vasta utilização dos

inibidores de recaptação da serotonina na depressão, ansiedade generalizada, pânico e outras condições.

Esse estudo procurou esclarecer como o tratamento agudo e subcrônico com o inibidor da recaptação de serotonina fluoxetina podem modular estados de medo diferentes (medo moderado e medo intenso). Tem sido proposto que o medo moderado e o medo intenso têm significados biológicos distintos. O medo condicionado moderado, sensível ao tratamento com benzodiazepínicos, parece configurar uma condição relacionada à ansiedade e envolver a participação de estruturas como a amígdala. Já o medo condicionado intenso é resistente à ação ansiolítica dos benzodiazepínicos e parece estar relacionado a estados de pânico/fobia e requer a participação de estruturas do tronco encefálico, como a SCPd (Santos *et al.*, 2005).

### *Medo Moderado*

Os tratamentos agudo (15 minutos antes do teste) e subcrônico com o inibidor da recaptação de serotonina fluoxetina (Kent *et al.*, 1998) não alteram a expressão do medo contextual com choques de intensidade 0,3 mA. Esses dados acrescentam-se aos resultados conflitantes dos inibidores de recaptação de serotonina nos modelos animais de ansiedade. Na literatura, os tratamentos agudo e crônico com fluoxetina nesses modelos têm mostrado efeitos ansiogênicos, ansiolíticos ou nenhum efeito (Boyer & Feighner, 1992; Griebel *et al.*, 1994, 1995a; Sanchez & Meier 1997; Goldstein & Goodnick, 1998; Matto & Allikmets 1999; Silva & Brandão, 2000; Inoue *et al.*, 2004). Essa discrepância de resultados pode ser explicada pelos diferentes mecanismos neurais que controlam os processos de aquisição e expressão do condicionamento contextual e os diversos modos como a serotonina pode modulá-los. A consequência funcional dessa diferença pode ser exemplificada pela administração de 8-OH-DPAT, um agonista de receptor 5-HT<sub>1A</sub>, no núcleo mediano da rafe (Avanzi & Brandão, 2001; Borelli *et al.*, 2005) ou no hipocampo (Stiedl *et al.*, 2000) que ao

contrário do presente estudo com a fluoxetina, inibe o condicionamento aversivo contextual. Ao lado disso, levando-se em consideração que o condicionamento contextual com choques de intensidade 0,3 mA (medo moderado) é um modelo animal de ansiedade, a ausência de efeitos ansiolíticos com o tratamento subcrônico de fluoxetina se relaciona a baixa eficácia desse fármaco no tratamento da ansiedade generalizada (Silva & Brandão, 2000).

### *Medo Intenso*

Contrariamente ao que foi observado no medo moderado, os tratamentos agudo e subcrônico com a fluoxetina produziram resultados distintos sobre o tempo de congelamento em animais no paradigma de condicionamento contextual utilizando-se choques de intensidade 0,6 mA como estímulo incondicionado. Enquanto o tratamento agudo não produziu efeitos, o tratamento subcrônico com fluoxetina (10 e 20 mg/Kg) causou uma significativa redução no medo condicionado intenso. Essa responsividade diferencial ao mesmo fármaco em situação de medo de intensidade diferente já foi relatada na literatura e sugere padrões de respostas diferentes em função da intensidade do choque que podem representar tipos distintos de ansiedade (Santos *et al.*, 2005).

Estudo recente mostra que animais submetidos a procedimento de estresse moderado não apresentam alteração na concentração de serotonina em diversas áreas cerebrais incluindo córtex pré-frontal medial, hipocampo dorsal, núcleo accumbens e amígdala (Carvalho *et al.*, 2005). No entanto, não existem dados mostrando o que ocorre com a concentração de serotonina nessas estruturas quando os animais são testados durante o medo intenso. O efeito ansiolítico exibido pelo tratamento subcrônico com fluoxetina corrobora os efeitos observados na clínica com a fluoxetina, particularmente no alívio dos sintomas de ataque de pânico (Wong *et al.*, 1995; Gorman *et al.*, 2000; Sonawalla *et al.*, 2002). É relatado que durante os ataques de pânico a resposta normalmente exibida é o comportamento de imobilidade

defensiva. Provavelmente, os efeitos benéficos deste tratamento tenham sido resultado do bloqueio da recaptção da serotonina causado pela administração subcrônica de fluoxetina e o conseqüente aumento na neurotransmissão serotoninérgica dos substratos neurais envolvidos na elaboração e organização do comportamento defensivo, particularmente no nível da SCPd (Borelli *et al.*, 2004).

O tratamento agudo, por sua vez, não se mostrou eficaz na diminuição do tempo de congelamento registrado pelos ratos submetidos ao paradigma de medo condicionado contextual com choques de intensidade 0,6 mA. Normalmente observa-se que em modelos de ansiedade, as drogas antidepressivas apresentam efeito quando utilizadas de forma crônica ou subcrônica em comparação com a administração aguda (Porsolt *et al.*, 1997; Beck & Fibiger, 1995; Kent *et al.*, 1998; Nardi, 2001; Borelli *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos em função da forma de administração da droga estão relacionados com a sua ação em diferentes tipos de receptores. Quando administrada agudamente a fluoxetina aumenta os níveis extracelulares de serotonina com conseqüente ativação de autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub> somatodendríticos nos núcleos da rafe. Isso leva a uma inibição do disparo dos neurônios serotoninérgicos e uma subseqüente diminuição na taxa de liberação da serotonina nos terminais neuroniais das regiões prosencefálicas (Silva & Brandão, 2000). Com a administração subcrônica ou crônica ocorre uma dessensibilização dos autoreceptores somatodendríticos aos efeitos da droga, com uma gradual recuperação da taxa de disparo dos neurônios serotoninérgicos e uma normalização da taxa de disparo neuronal, resultando em um aumento da neurotransmissão serotoninérgica (Blier, 2001). Esses efeitos da fluoxetina servem de base para explicar a eficácia da farmacoterapia com antidepressivos que são inibidores seletivos da recaptção de serotonina no distúrbio do pânico.

**EXPERIMENTO II**  
**MODULAÇÃO GABAÉRGICA DA AMÍGDALA NO MEDO**  
**CONDICIONADO CONTEXTUAL E NO MEDO INCONDICIONADO**

---

---

## **EXPERIMENTO II: MODULAÇÃO GABAÉRGICA DA AMÍGDALA NO MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL E NO MEDO INCONDICIONADO**

### INTRODUÇÃO

A amígdala é um complexo multinuclear localizado no lobo temporal. O interesse maior por essa estrutura ocorreu nos últimos 5-15 anos devido ao papel da amígdala em determinar significado emocional às pistas sensoriais (Adolphs *et al.*, 1994, 1995; Bonda *et al.*, 1996), ser responsável pela modulação de memórias a eventos emocionais (Cahill & McGaugh, 1998; Hamann *et al.*, 1997) e por uma variedade de respostas autonômicas, endócrinas e somatomotoras (Klingler & Gloor, 1960; Goddard, 1964).

Especificamente, a amígdala participa do condicionamento clássico aversivo, sendo que a inativação dos núcleos amigdalóides impede a aquisição e a expressão do condicionamento frente a estímulos discretos, som e luz, e a estímulos multimodais, contextuais (Davis *et al.*, 1994a; Fanselow, 1994; Maren & Fanselow, 1996; Muller *et al.*, 1997; Rogan & LeDoux, 1996).

Adicionalmente, a amígdala faz parte do sistema encefálico aversivo que está envolvido na geração de comportamentos defensivos e na elaboração de estados emocionais aversivos. Esse sistema abrange além da amígdala, o hipotálamo medial, a SCPd, o colículo inferior e camadas profundas do colículo superior (Graeff, 1990; Brandão *et al.*, 1999). Esse sistema processa estímulos incondicionados, sendo que a estimulação elétrica dessas estruturas produz um padrão característico de respostas, como atividade motora intensa, com saltos, além de reações neurovegetativas, tais como, aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca, piloereção, micção, defecação, exoftalmia, similares àquelas evocadas

quando um animal é confrontado com estímulos aversivos ou dolorosos em situação natural (Deakin & Graeff, 1991; Deakin *et al.*, 1994; Graeff, 1994).

Muitos trabalhos tentam esclarecer as conexões anatômicas entre o sistema de medo condicionado e o de medo incondicionado, trazendo importantes contribuições para a compreensão da interação entre os diferentes substratos neurais da aversão (Vianna *et al.*, 2003; Vianna & Brandão, 2003; Walker & Carrive, 2003). A principal estrutura apontada como interface entre os dois sistemas é a amígdala. Muitas evidências mostram que a amígdala é fundamental para a regulação das reações de medo inato e condicionado frente a estímulos aversivos (Campeau & Davis, 1995; Davis, 1992a; Davis *et al.*, 1994a; LeDoux, 1994; LeDoux *et al.*, 1988; 1990a; Rizvi *et al.*, 1991; Vazdarjanova *et al.*, 2001).

Existem evidências de conexões recíprocas entre a amígdala e a SCP, especificamente com as colunas dorsomedial, lateral, ventrolateral e dorsolateral (Rizvi *et al.*, 1991). Adicionalmente, os estudos de marcação neuronal da proteína Fos mostram ativação dos núcleos amigdalóides em decorrência da estimulação elétrica ou química da SCPd (Sandner *et al.*, 1993; De Oliveira *et al.*, 2000). A função dessas projeções pode ser a integração neural de respostas comportamentais e autonômicas envolvidas com o estado emocional.

De acordo com a divisão da amígdala em núcleos, observam-se papéis distintos na modulação das respostas defensivas (Killcross *et al.*, 1997; Sah *et al.*, 2003; Rosen, 2004). Os núcleos lateral e basolateral são filtros dos estímulos aversivos, enquanto que o núcleo central controla os componentes autonômicos e somáticos das reações de medo através da projeção para o hipotálamo e para áreas do tronco encefálico (Davis *et al.*, 1994a; Fendt & Fanselow, 1999; LeDoux, 1994; LeDoux *et al.*, 1988, 1990a; Maren & Fanselow, 1996). Com relação às respostas frente ao medo incondicionado, sugere-se que o circuito neural responsável pela produção do comportamento defensivo inicie-se na SCPd e se projete via feixe prosencefálico

medial para estruturas prosencefálicas, como a amígdala basolateral (Cameron *et al.*, 1995; Rizvi *et al.*, 1991).

Na literatura, muitos estudos mostram que a circuitaria amígdala-substância cinzenta periaquedutal ventral é fundamental para a expressão do medo condicionado contextual, entretanto, faltam estudos mostrando os efeitos da inativação de cada um dos núcleos da amígdala durante o medo eliciado pela ativação da SCPd. Adicionalmente, é relatado que as lesões eletrolíticas da amígdala ou da substância cinzenta periaquedutal ventral não alteram os limiares aversivos determinados pela estimulação elétrica da SCPd, mas reduzem o medo condicionado contextual (Oliveira *et al.*, 2004; Vianna *et al.*, 2001a; b). No entanto, é sabido que as lesões eletrolíticas têm a desvantagem de destruir não só os corpos celulares de neurônios, mas também axônios e fibras de passagem. Além disso, a lesão de todos os núcleos amigdalóides pode interferir na função individual de cada um dos núcleos. Para solucionar esse problema, a utilização de agentes químicos, os quais agem nos corpos celulares reduzindo a atividade neuronal, é preferível no estudo da organização dos circuitos neurais responsáveis pelo comportamento defensivo.

Nesse sentido, Hopkins & Holstege (1978) propõem que as projeções amigdalóides no mesencéfalo, na ponte e na medula podem ser o substrato anatômico para a modulação amigdalóide nos diversos componentes das reações de defesa. Além da compreensão da neuroanatomia, o estudo da neurotransmissão da amígdala possibilita o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de desordens clínicas de ansiedade, além de avanços no estudo da aprendizagem e da memória.

## MATERIAIS E MÉTODOS

---

Nesse experimento foi avaliado o efeito da modulação gabaérgica da amígdala no medo condicionado contextual e no medo incondicionado.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Sujeitos*

Foram utilizados 57 ratos *Wistar* machos, com peso entre 250 e 300 g. Os animais foram agrupados (5 animais por caixa) em gaiolas de polipropileno (30 x 32 x 18 cm) forradas com maravalha, e tiveram livre acesso à água e alimento. Os animais foram mantidos em um biotério com temperatura controlada a  $23^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$  e um programa de iluminação artificial com ciclo claro/escuro 12 h x 12 h, com início do período claro às 7:00 horas.

### *Cirurgia*

Após um período de habituação ao biotério de 72 horas, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg) por via intraperitoneal (i.p.). Em seguida, sofreram tricotomia e foram fixados a um aparelho estereotáxico (David-Kopf), com a barra do incisivo à 3,3 mm abaixo da linha interaural. Em seguida, foram feitas a assepsia com iodo e a administração do anestésico local cloridrato de lidocaína na pele da cabeça. O crânio do animal foi, então, exposto e o perióstio removido com o auxílio de um bisturi. Cada animal recebeu implante de um eletrodo direcionado à SCPd e uma cânula-guia direcionada a um dos três núcleos amigdalóides: lateral (LaA), basolateral (BLA) ou central (CeA). O eletrodo, introduzido com um ângulo de  $16^{\circ}$  e com lambda como referência, foi implantado de acordo com as seguintes coordenadas: AP: 0,0 mm; ML: 1,9 mm; DV: 5,1 mm. A cânula-guia foi implantada, considerando-se bregma como referência, utilizando-se as seguintes coordenadas:

lateral (AP: - 3,0 mm; ML: 5,1 mm; DV: 7,0 mm), basolateral (AP: - 2,5 mm; ML: 5,1 mm; DV: 7,7 mm) e central (AP: - 2,4 mm; ML: 4,0 mm; DV: 7,0 mm). A cânula-guia e o eletrodo foram fixados no crânio do animal por meio de uma resina acrílica (JET) e parafusos. A cânula-guia foi selada com um fio de aço inoxidável para protegê-la de obstrução. Esse fio só foi retirado no momento da sessão experimental. Para evitar infecção, após a cirurgia administraram-se 0,2 ml de uma associação antibiótica de largo espectro (pentabiótico veterinário, Fontoura-Wyeth-Brasil), por via intramuscular e aplicação por via subcutânea (0,2 ml) de um analgésico com atividade antiinflamatória (Banamine, Schering-Plough).

### *Microinjeção*

As microinjeções foram realizadas com a utilização de uma agulha de infusão conectada por meio de um tubo de polietileno (PE-10) a uma seringa de 5 µl (Hamilton, EUA) que, por sua vez, era controlada por uma bomba de microinfusão (Harvard Apparatus, South Natick, MA). A agulha de infusão foi introduzida 1mm abaixo da cânula guia e, as soluções foram injetadas com fluxo de 0,25 µl/min, sendo que após a injeção a agulha de infusão permaneceu no local por mais um minuto a fim de maximizar o processo de difusão. Esse procedimento foi monitorado por meio do deslocamento de uma bolha de ar no interior do tubo de polietileno.

### *Equipamentos e Procedimento Experimental*

#### Condicionamento Contextual Aversivo

*Treino:* Uma semana após a cirurgia, os animais foram submetidos ao condicionamento contextual aversivo. Os animais foram condicionados em um caixa de 25 x

25 x 15 cm, com o teto e paredes de acrílico transparente, o piso constituído por 15 grades eletrificadas, de diâmetro 2,0 mm e separadas 1,2 cm uma da outra, conectadas a um gerador de choques (Albarsch). A porta, situada na face anterior da caixa, é confeccionada em acrílico transparente para facilitar a observação do animal pelo experimentador. Os animais foram colocados na caixa e, após um período de 8 minutos de adaptação, receberam 10 choques nas patas de intensidade 0,6 mA, 1 s de duração, com intervalo randômico de 10 a 50 s entre as tentativas, controlado por um microprocessador (Insight Equipment, Brasil). Os animais foram removidos da caixa experimental 2 minutos após a aplicação do último choque.

*Teste:* O teste consistiu na exposição do animal por 8 minutos ao mesmo local onde foi realizado o condicionamento, no entanto, sem a aplicação dos choques nas patas. Metade dos animais de cada grupo recebeu salina, enquanto a outra metade recebeu muscimol. Nesse teste, foi avaliado o tempo de congelamento que é definido operacionalmente como a ausência de todos os movimentos corporais, exceto aqueles relacionados à respiração.

#### Determinação dos limiares aversivos

Vinte e quatro horas após o término do condicionamento contextual iniciou-se o teste do medo incondicionado. Essa seqüência foi escolhida com base em trabalhos prévios desse laboratório que mostraram a não ocorrência do comportamento de congelamento quando os animais são expostos a um contexto completamente diferente daquele em que foram inicialmente condicionados (Castilho & Brandão, 2001; Santos *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2004). O teste do medo incondicionado foi realizado em uma arena circular (60 cm de diâmetro e 50 cm de altura, dividida em doze quadrantes) com iluminação de 40-W (80 lux) no piso da arena. No início da sessão os animais permaneceram por um período de inicial de 5 minutos, após esse período se iniciava a aplicação de uma corrente elétrica na SCPd com

intensidade inicial de 20  $\mu\text{A}$  e que gradualmente era aumentada de 5 em 5  $\mu\text{A}$  em intervalos de 1 minuto (CA, 60 Hz, 10 s). A corrente elétrica foi monitorada por meio de queda de voltagem, através do resistor de  $1\text{K}\Omega$ , ligado em paralelo a um osciloscópio (Phillips, USA). Os limiares aversivos efetivos foram considerados como a menor intensidade de corrente elétrica, aplicada por duas vezes consecutivas, capaz de induzir comportamentos de congelamento ou fuga. Os animais com limiares acima de 180  $\mu\text{A}$  para a resposta de congelamento foram descartados dos experimentos. A fim de investigar o congelamento que persiste após a interrupção da estimulação da SCPd, os animais permaneceram por um período adicional de 8 minutos, nos quais não havia estimulação, e era analisado o tempo de congelamento. Tal medida é referida como congelamento pós-estimulação (Vianna *et al.*, 2001a; b). Após a determinação da corrente elétrica necessária para obtenção dos comportamentos de congelamento e fuga, os ratos receberam microinjeção de muscimol ou salina em um dos três núcleos amigdalóides (LaA, BLA ou CeA). As condições de tratamento foram balanceadas entre os testes de medo condicionado e incondicionado. Após 20 minutos da microinjeção na amígdala, o valor da corrente elétrica necessária para obtenção dos comportamentos de congelamento e fuga e o tempo de congelamento pós-estimulação da SCPd foram novamente determinados.

### *Histologia*

Ao final do experimento, os animais receberam uma dose letal de hidrato de cloral (i.p.) e, então, receberam microinjeção de Azul de Evans (2%) no mesmo volume das drogas utilizadas anteriormente (0,25  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Posteriormente, foram perfundidos intracardiacamente com solução salina (0,9%) seguida de formalina (10%). Em seguida, o encéfalo foi retirado e inicialmente estocado em solução de formalina (10%) por 2 horas sendo então mantido em uma solução de sacarose 30%. Após um prazo mínimo de 3 dias, os encéfalos foram fatiados

em micrótomo 60- $\mu$ m de congelação nas áreas correspondentes a amígdala e a SCPd. Os cortes foram corados em Nissl e analisados quanto à localização da cânula e do eletrodo com o auxílio de microscópio óptico e do atlas de Paxinos & Watson (2005).

### *Drogas*

Para avaliar a neurotransmissão gabaérgica nos núcleos amigdalóides foi utilizado muscimol (0,5 $\mu$ g/0,5 $\mu$ l). Os animais controle receberam o mesmo volume de salina.

### *Análise Estatística*

Os dados estão representados como média + E.P.M. Os dados referentes aos limiares aversivos determinados pelo procedimento de estimulação da SCPd antes e após a microinjeção de salina ou muscimol em cada um dos núcleos amigdalóides foram analisados utilizando-se a análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas. O fator 1 referiu-se ao tratamento (salina ou muscimol) e o fator 2 condição (antes ou depois da injeção do fármaco).

Para melhor visualização dos efeitos observados com as injeções nos núcleos amigdalóides sobre os comportamentos de congelamento e fuga induzidos pela estimulação da SCPd também calcularam-se as diferenças entre os limiares determinados antes e depois destas injeções. As variações ( $\Delta$ ) nos limiares também foram submetidos à ANOVA de duas vias com medidas repetidas sendo tratamento (salina ou muscimol) e comportamentos (congelamento e fuga) os dois fatores analisados.

O tempo de congelamento pós-estimulação também foi analisado com a ANOVA de duas vias com medidas repetidas sendo o tratamento (salina ou muscimol) e a condição (pré ou pós-injeção) os fatores analisados.

O tempo de congelamento registrado durante o teste do medo condicionado contextual também foi analisado com a ANOVA de duas vias com medidas repetidas utilizando-se como fator 1 o tratamento (salina ou muscimol) e como fator 2 a condição (antes ou depois da microinjeção). O nível de significância para todos os testes foi  $p < 0,05$ . Em caso de significância estatística foi utilizado o teste de *Newman-Keuls*.

**RESULTADOS**

---

## RESULTADOS

A Figura 6 representa os sítios das microinjeções localizados nos núcleos lateral (LaA), basolateral (BLA) e central (CeA) da amígdala e o sítio da estimulação situado na SCPd.

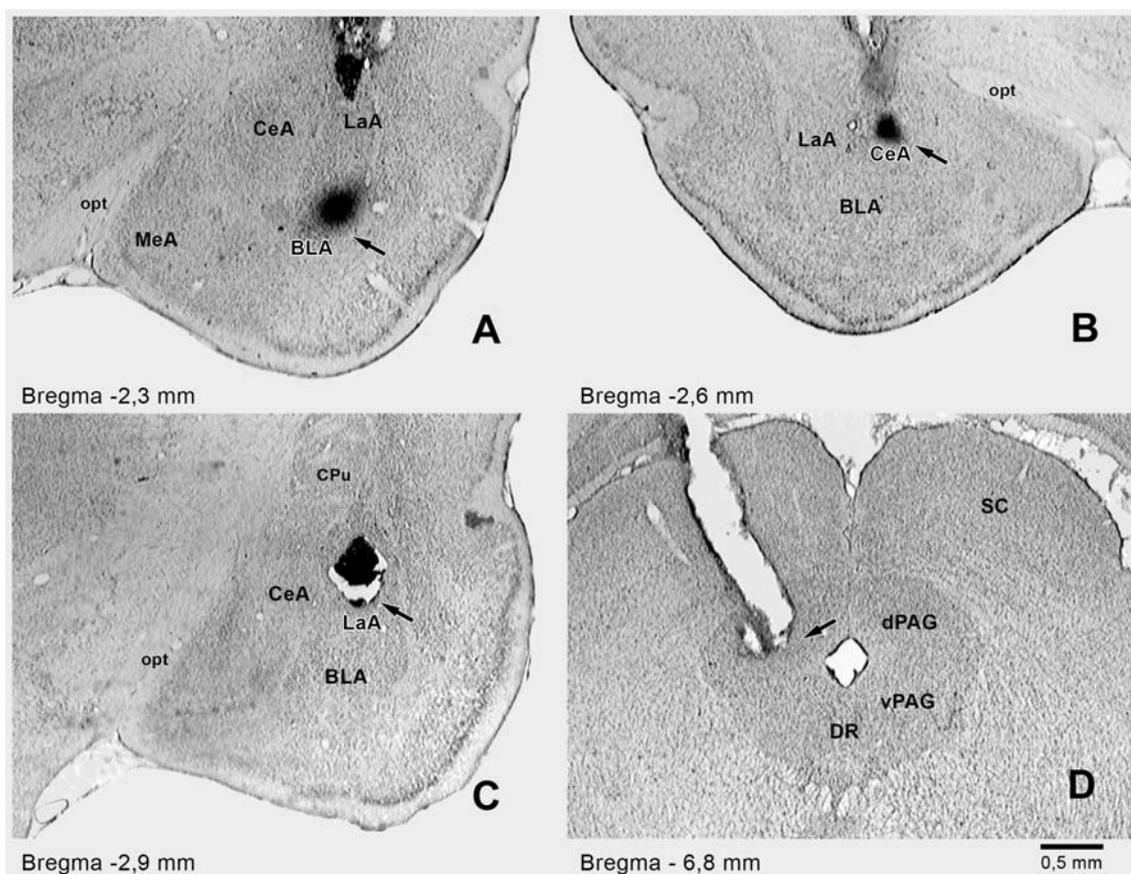


Figura 6. Fotomicrografias representativas dos sítios de injeção nos núcleos basolateral -BLA (A), central - CeA (B), e lateral - LaA (C) e do sítio de estimulação localizado na substância cinzenta periaquedual dorsal - dPAG (D). A barra representa 500  $\mu$ m em todas as fotografias. opt: trato óptico; Cpu: caudado putâmen; SC: colículo superior; vPAG: substância cinzenta periaquedual ventral; DR: núcleo dorsal da rafe. Os números abaixo das figuras indicam a distância em mm do bregma.

*Medo Incondicionado*

À medida que a intensidade da corrente elétrica aplicada na SCPd aumentava os animais subitamente paravam, permaneciam imóveis e frequentemente urinavam e defecavam. Com intensidades maiores, o comportamento de congelamento era seguido por fugas vigorosas e saltos. Os limiares aversivos de congelamento e fuga foram plotados juntos e submetidos à ANOVA de uma via. A análise mostrou diferenças significativas ( $F_{1,115} = 6,05$ ,  $p < 0,05$ ) entre as intensidades da corrente elétrica necessárias para a produção do congelamento ( $64,21 \pm 4,60$ ) e da fuga ( $80,33 \pm 4,66$ ) confirmando trabalhos anteriores (Oliveira *et al.*, 2004; Vianna *et al.*, 2001a; b; 2003).

A Figura 7 mostra os valores dos limiares ( $\mu A$ ) de congelamento (A) e fuga (B) determinados pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd em ratos antes e após receberem a microinjeção de salina ou muscimol nos núcleos LaA (N = 9 e 9, respectivamente), BLA (N = 8 e 9, respectivamente) e CeA (N = 10 e 12, respectivamente). Os dados obtidos com as injeções em cada núcleo foram submetidos à ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Com relação aos limiares necessários para a obtenção do congelamento, a análise mostrou que os diferentes tratamentos não alteraram o valor do limiar obtido pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd após a microinjeção nos núcleos amigdalóides ( $F_{1,35} = 0,24$  para o núcleo lateral,  $F_{1,33} = 0,185$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 0,01$  para núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos). Também não foi observado efeito das diferentes condições ( $F_{1,35} = 2,34$  para o núcleo lateral,  $F_{1,33} = 0,09$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 2,33$  para núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos). Do mesmo modo, a interação entre os fatores também não foi estatisticamente diferente ( $F_{1,35} = 2,34$  para o núcleo lateral,  $F_{1,33} = 0,09$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 0,11$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos).

A Figura 7B mostra os valores dos limiares ( $\mu\text{A}$ ) de fuga determinados pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd durante as fases de linha de base e teste para os grupos que receberam microinjeção de salina ou muscimol nos núcleos LaA, BLA e CeA. Os dados foram submetidos à ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Essa análise mostrou que os diferentes tratamentos não alteraram os limiares aversivos de fuga determinados pela estimulação elétrica da SCPd após a microinjeção nos núcleos amigdalóides ( $F_{1,35} = 0,17$  para o núcleo lateral,  $F_{1,33} = 0,28$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 0,23$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos). Também não houve diferença entre os limiares de congelamento para as diferentes condições ( $F_{1,35} = 1,58$  para o núcleo lateral,  $F_{1,33} = 2,80$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 1,39$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos). Do mesmo modo, a interação entre os fatores também não foi estatisticamente diferente ( $F_{1,35} = 0,51$  para o núcleo lateral,  $F_{1,33} = 0,54$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 2,17$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos).

A Figura 8 mostra a média da variação dos limiares de congelamento e fuga determinados pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd nos limiares de congelamento e fuga para os grupos injetados com salina ou muscimol nos núcleos amigdalóides. Os dados foram submetidos a ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Essa análise mostrou que os diferentes tratamentos (salina ou muscimol) não alteram os limiares aversivos determinados pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd após microinjeção nos núcleos amigdalóides ( $F_{1,35} = 1,67$  para o núcleo lateral,  $F_{1,33} = 0,08$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 0,60$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos). Também não houve diferença entre a variação dos limiares aversivos de congelamento e fuga determinados pela estimulação elétrica da SCPd ( $F_{1,35} = 2,00$  para o núcleo lateral,  $F_{1,33} = 0,57$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 0,56$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos). Do mesmo modo, a interação entre os fatores também não foi estatisticamente

diferente ( $F_{1,35} = 0,00$  para o núcleo lateral,  $F_{1,33} = 2,74$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 0,56$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos).

A análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas também foi utilizada no tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPd (Figura 9). A análise mostrou efeitos estatisticamente significativos dos tratamentos (salina ou muscimol) em todos os núcleos ( $F_{1,35} = 24,52$  para o núcleo lateral,  $F_{1,33} = 5,80$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 6,19$  para o núcleo central; sendo  $p < 0,05$  em todos os casos). O fator condição (antes e depois das microinjeções) também influenciou significativamente os núcleos ( $F_{1,35} = 27,93$  para o núcleo lateral,  $F_{1,33} = 57,90$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 29,34$  para o núcleo central; sendo  $p < 0,05$  em todos os casos). A interação entre os fatores também foi estatisticamente significativa ( $F_{1,35} = 17,53$  para o núcleo lateral,  $F_{1,33} = 24,14$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 19,00$  para o núcleo central; sendo  $p < 0,05$  em todos os casos). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou uma redução no tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPd após o tratamento com muscimol nos núcleos LaA, BLA e CeA.

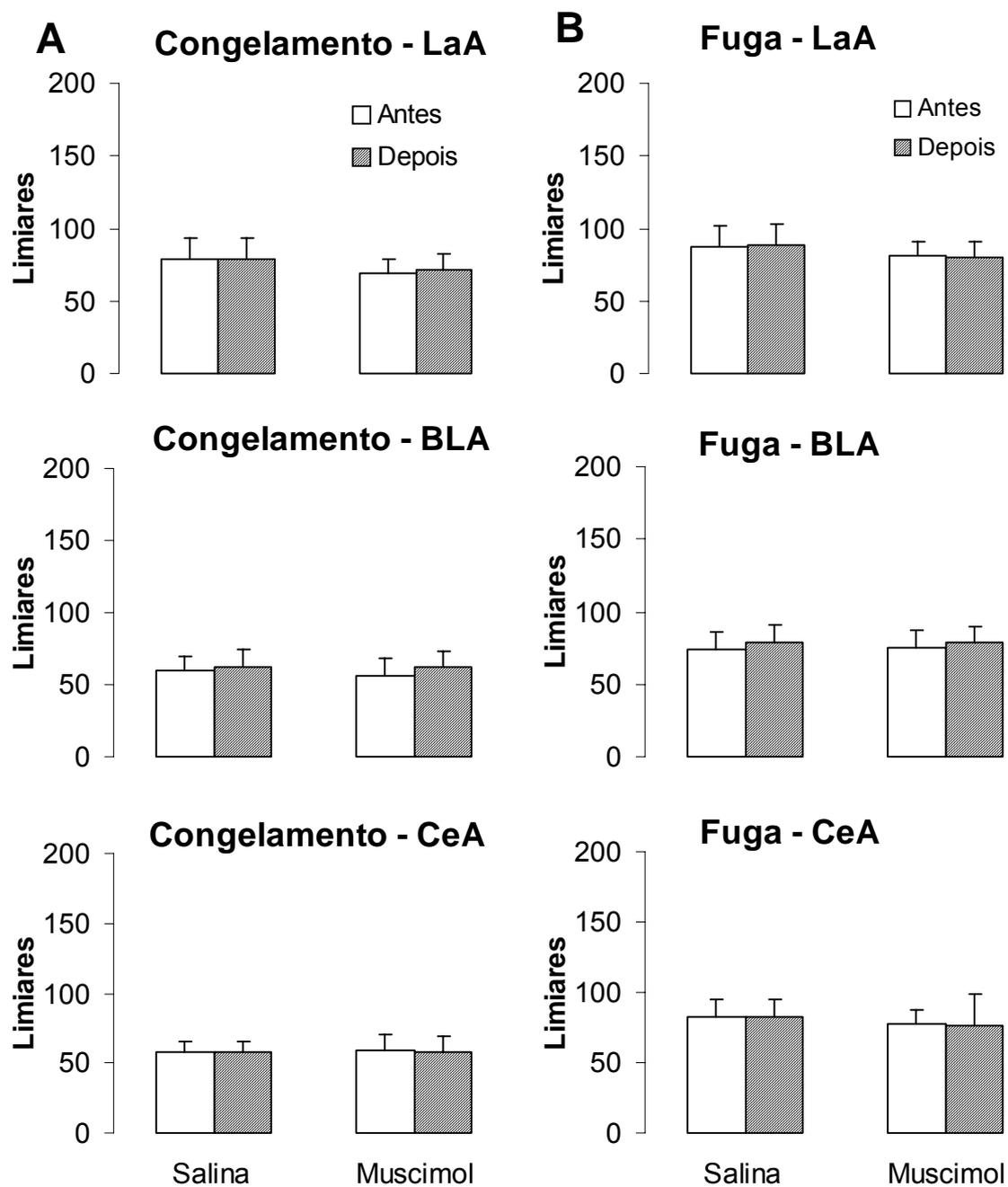


Figura 7. Limiars ( $\mu\text{A}$ ) de congelamento (A) e fuga (B) determinados pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd antes e após a injeção de salina ou muscimol nos núcleos lateral – LaA, basolateral – BLA e central – CeA.

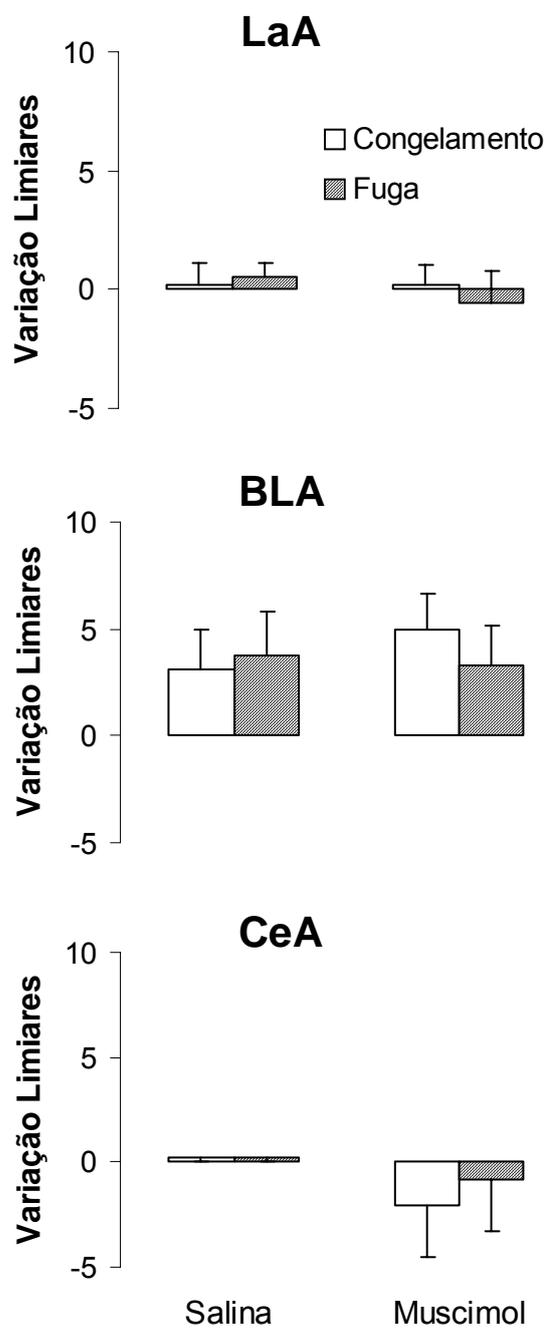


Figura 8. Variação ( $\Delta$ ) dos limiaries de congelamento e fuga determinados pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd antes e após os animais receberem microinjeção de salina ou muscimol em um dos três núcleos amigdalóides.

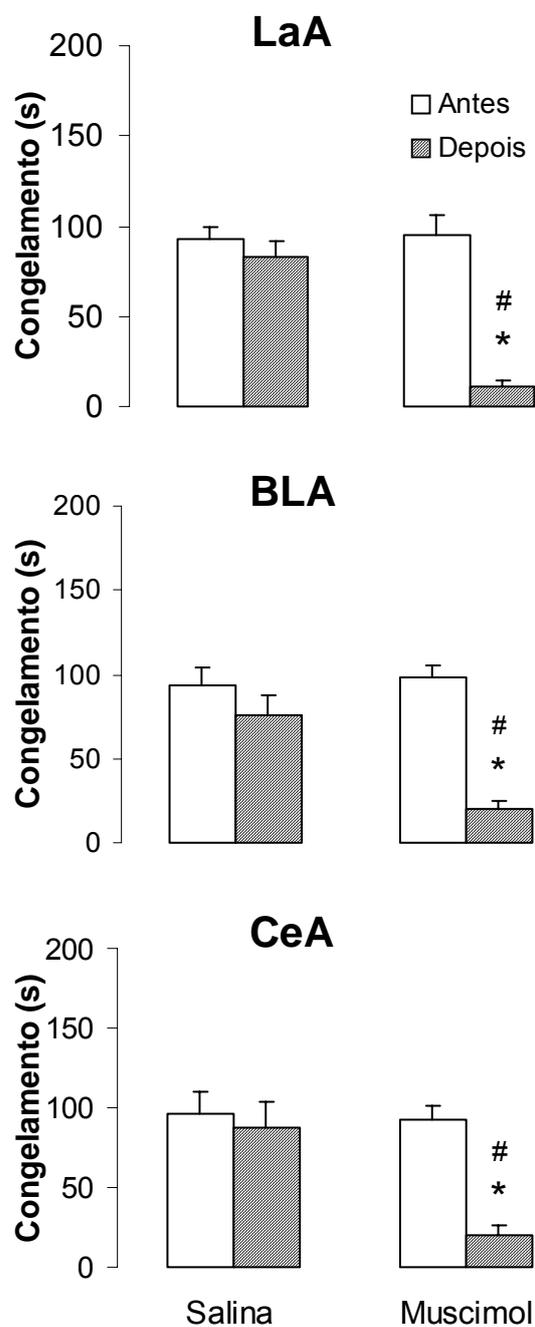


Figura 9. Média (+EPM) do tempo de congelamento pós-estimulação da SCPd registrado em animais microinjetados com salina ou muscimol em um dos três núcleos amigdalóides. \*,  $p < 0,05$  em relação aos respectivos controles, determinados antes das injeções. #,  $p < 0,05$  em relação ao correspondente grupo salina.

### *Medo Condicionado*

A Figura 10 mostra o tempo de congelamento registrado durante o teste do medo condicionado contextual em ratos antes e após a microinjeção de salina ou muscimol nos núcleos LaA (N = 9 e 9, respectivamente), BLA (N = 8 e 9, respectivamente) e CeA (N = 10 e 12, respectivamente). A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeitos significativos para o fator tratamento ( $F_{1,35} = 63,10$  para o núcleo lateral,  $F_{1,33} = 47,11$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 59,91$  para o núcleo central; sendo  $p < 0,05$  em todos os casos) e para o fator condição ( $F_{1,35} = 87,96$  para o núcleo lateral,  $F_{1,33} = 69,68$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 106,82$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos). A interação entre os fatores também foi estatisticamente significativa nos três núcleos amigdalóides ( $F_{1,35} = 63,34$  para o núcleo lateral,  $F_{1,33} = 42,82$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 71,61$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou uma redução no tempo de congelamento registrado durante o teste na caixa de condicionado após o tratamento com muscimol nos núcleos LaA, BLA e CeA em comparação com suas respectivas linhas de base e com os animais microinjetados com salina..

Resultados similares (não mostrados) foram obtidos em um estudo adicional com o uso da mesma dose de muscimol administrada em um volume de 0,2  $\mu\text{L}$  nos núcleos lateral (N=6), basolateral (N=6) e central (N=5) da amígdala.

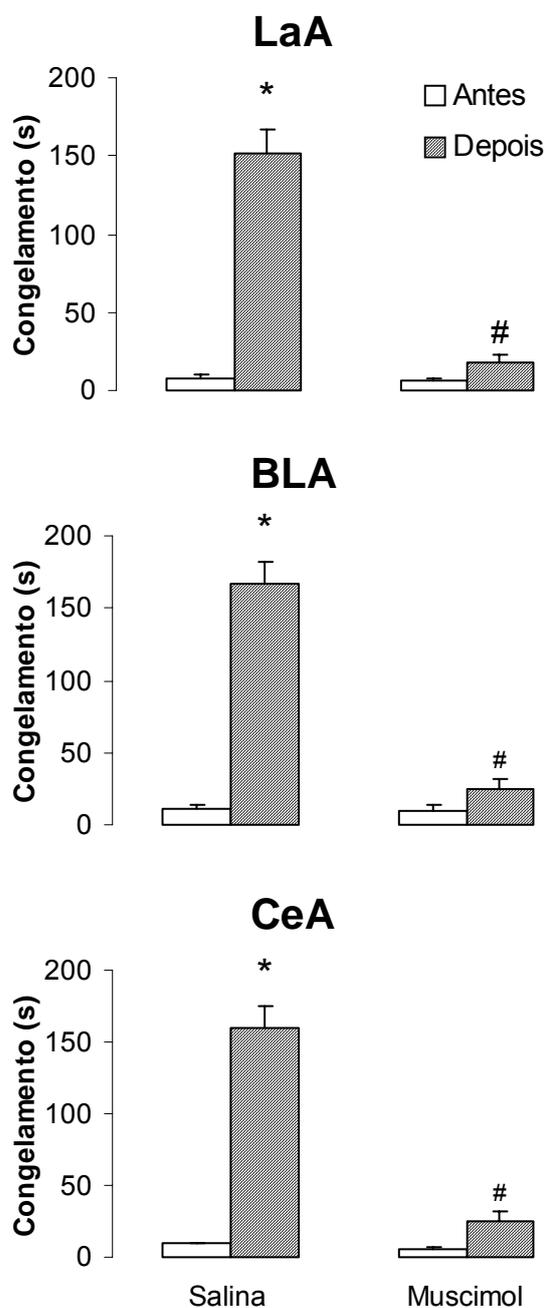


Figura 10. Média (+ EPM) do tempo de congelamento registrado em sessões de 8-minutos antes (coluna branca) e depois (coluna listrada) das injeções de salina ou muscimol nos núcleos lateral (LaA), basolateral (BLA) ou central (CeA) da amígdala dos animais expostos ao teste de condicionamento contextual. \*,  $p < 0,05$  em relação ao respectivo grupo controle, determinado antes das injeções. #,  $P < 0,05$  em relação ao valor correspondente do grupo salina.

**DISCUSSÃO**

---

## DISCUSSÃO

Vários estudos atribuem à amígdala o status de receptora de sinais de perigo, onde são avaliados quanto ao seu grau de ameaça para o organismo (LeDoux, 2000; Davis *et al.*, 1994a). Especificamente o núcleo LaA é o principal sítio de recepção destes sinais, enquanto o núcleo CeA é a principal estação de saída para as respostas autonômicas, endócrinas e somáticas do medo (Amaral & Price, 1984; LeDoux *et al.*, 1988; Davis, 1992a; Davis *et al.*, 1994a; Killcross *et al.*, 1997; Fendt & Fanselow, 1999; LeDoux, 2000; Nader *et al.*, 2000). Com relação às conexões, observam-se que existem quatro principais saídas do complexo basolateral (núcleos LaA e BLA), projeções recíprocas com o córtex e projeções unidirecionais ao caudado putâmen, núcleo accumbens e núcleo CeA. A projeção para o córtex pode envolver a percepção consciente de medo ou ansiedade, enquanto que a projeção para as áreas estriadas pode trazer informação motivacional das áreas motoras, as quais são necessárias para a esquiva a estímulos aversivos; já a projeção para o núcleo CeA representa a maior saída intra-amigdalóide e é importante para a elaboração de respostas autonômicas e somáticas (McDonald, 1991). Desta forma, a amígdala parece atuar como uma espécie de interface sensorio-afetiva da reação de defesa, isto é, funcionaria como um filtro de sinais sensoriais, proporcionando-lhes uma conotação afetiva. Nesse sentido, Gloor e colaboradores (1982) propuseram que a elaboração das sensações particularmente as modalidades visuais e auditivas são antes mesmo de serem elaboradas no neocórtex temporal transmitidas a estruturas límbicas a fim de atrelar o conteúdo afetivo e emocional; sendo que a função do complexo amigdalóide seria a de associar as experiências sensoriais com as afetivas de modo que para se ter a percepção deve haver o retorno da informação da amígdala para o neocórtex temporal o qual fornece ao córtex as indicações para o reconhecimento das sensações (Amaral & Price, 1984).

Os resultados mostram que o aumento da mediação gabaérgica nos núcleos LaA, BLA e CeA da amígdala utilizando-se a microinjeção de muscimol causa uma atenuação do congelamento condicionado contextual sem alterar significativamente os limiares aversivos determinados pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd. Esses resultados confirmam o envolvimento dos núcleos amigdalóides no medo condicionado contextual e corroboram os dados da literatura que mostram que a amígdala é importante na expressão de diversos componentes das respostas condicionadas incluindo congelamento, antinocicepção e alterações cardiovasculares (Blanchard & Blanchard, 1972; Iwata *et al.*, 1986; Helmstetter & Bellgowan, 1994; LeDoux *et al.*, 1988; Fendt & Fanselow, 1999).

O congelamento contexto-dependente provavelmente ativa a via amígdala-substância cinzenta periaquedutal ventral. Desse modo, todos os três núcleos amigdalóides (LaA, BLA e CeA) estão envolvidos na regulação do medo condicionado contextual. Um possível mecanismo subjacente ao estabelecimento do condicionamento contextual tem sido proposto com base na potenciação de longo prazo (Clugnet & LeDoux, 1990; Miserendino *et al.*, 1990). Resumidamente, a apresentação concomitante do estímulo condicionado e incondicionado permite a ativação de neurônios amigdalóides enquanto que sua apresentação sozinha não altera o potencial de repouso da membrana. O estímulo neutro pode liberar glutamato nos neurônios da amígdala que se liga a receptores NMDA e AMPA/cainato. A despolarização desses neurônios dependerá da associação prévia do estímulo aversivo com o estímulo neutro. Isto acarretará em uma liberação do bloqueio do canal por  $Mg^{+2}$  e subsequente entrada de íons  $Ca^{+2}$  na célula. Adicionalmente, acredita-se que o hipocampo seja importante para que o estímulo contextual adquira significado emocional e passe a controlar respostas aversivas (Sutherland & McDonald, 1990; Rudy & Sutherland 1989; Winocur & Olds, 1978). O hipocampo recebe aferências de áreas corticais que integram informações sobre as diferentes modalidades sensoriais (Amaral, 1986; Jones & Powell, 1970; Mesulam *et al.*, 1977) e esse

tipo de arquitetura pode controlar aspectos específicos do processamento contextual. Interessantemente, o subículo, a maior saída da formação hipocampal projeta-se para o núcleo LaA (Ottersen, 1981) sugerindo uma via plausível no processamento de informações contextuais, onde o hipocampo pode interagir com a amígdala e controlar as respostas emocionais.

Com relação ao muscimol, Krupa e colaboradores (1993) mostraram que se trata de um potente inibidor da atividade funcional podendo ser utilizado para estudar as regiões encefálicas envolvidas na aquisição e expressão das respostas condicionadas aversivas. Na literatura o uso de drogas que interferem no funcionamento neuronal (anestésico local, agonista de receptores e outros), como o muscimol, é bastante comum, pois possibilita o estudo de diversas regiões encefálicas permitindo verificar se essa região é crucial para a ocorrência de processos neurais (Albert & Madryga, 1980; Hikosaka & Wurtz, 1985a,b; Knudsen *et al.*, 1993, Muller *et al.*, 1997). Em relação à dispersão dessa droga, Myers (1974) sugere que o raio de difusão é proporcional ao volume infundido. Adicionalmente, Martin (1991) utilizando a técnica de autoradiografia para determinação da difusão de muscimol tritiado relatou que no córtex e no tronco encefálico a infusão de muscimol (1 $\mu$ g/1 $\mu$ L) difundiu em um diâmetro de 1,66 mm e permaneceu no sítio de injeção por 2 horas. No entanto, é difícil extrapolar esse dado para o volume de infusão administrado nesse experimento, 0,5 $\mu$ g/0,5 $\mu$ L, já que se trata de uma outra área encefálica com uma densidade diferente de neurônios. Por isso na falta de informações que delimitem precisamente a área de difusão da dose de muscimol utilizada não se pode descartar a possibilidade de núcleos adjacentes a esse núcleo terem sido atingidos. Um estudo adicional foi realizado utilizando-se um volume de 0,2  $\mu$ L e foram obtidos resultados similares (dados não mostrados).

A amígdala, o hipotálamo e a SCPd são os substratos neurais responsáveis pela produção do medo incondicionado (Graeff, 1990), sendo que uma possível ligação entre a

amígdala e a SCPd envolveria a passagem pelo hipotálamo lateral. A amígdala manda eferências para o hipotálamo e este para a SCPd (Beitz, 1982). Apesar da conexão entre a amígdala e a SCPd, a ausência de alteração dos limiares aversivos de congelamento e fuga obtidos pelo procedimento de estimulação da SCPd observados após a inativação da amígdala é provavelmente devida ao fato de que a produção das respostas incondicionadas ocorre diretamente na SCPd e envolve projeções descendentes. Em apoio a essa idéia, Vianna & Brandão (2003) mostraram por meio da estimulação elétrica da SCPd nos limiares de congelamento e fuga que essa estrutura envia projeções descendentes para estruturas encefálicas mais caudais, como o núcleo cuneiforme.

Os resultados do presente trabalho permitem propor diferentes padrões de comportamentos defensivos com vias neurais distintas para a mediação gabaérgica. O primeiro relacionado com uma postura defensiva passiva, envolve a ativação do complexo amigdalóide e da substância cinzenta periaquedutal ventral (Davis *et al.*, 1994a; De Oca *et al.*, 1998; Fanselow, 1994). O segundo sistema é o responsável pelos padrões característicos da ativação das reações de defesa sendo que a SCPd, o hipotálamo medial e a amígdala estão intimamente associados com a produção de respostas de medo frente a estímulos proximais (Brandão *et al.*, 1994; 1999; Graeff, 1990). No entanto, conexões intra-substância cinzenta periaquedutal não são determinantes na mediação dessas reações incondicionadas, uma vez que lesão dos neurônios da parte ventral da substância cinzenta não altera os limiares de congelamento e fuga determinados pela estimulação elétrica da SCPd (Vianna *et al.*, 2001a; b; 2003). Entretanto, os resultados desse experimento não descartam o envolvimento da amígdala na expressão do medo induzido pela estimulação da SCPd, quando ocorre uma ativação simultânea dos circuitos neurais do medo condicionado. Uma vez que, propõe-se que a amígdala inibe a SCPd durante estados de ansiedade, de modo que estados de ansiedade

gerados em regiões prosencefálicas inibem os ataques de pânico eliciados pela ativação dos substratos neurais da aversão na SCPd (Graeff, 1990; Magierek *et al.*, 2003).

Um resultado interessante foi a redução do congelamento pós-estimulação da SCPd registrado pelos ratos que receberam administração de muscimol nos núcleos LaA, BLA e CeA. Apesar de haver uma redução tanto no congelamento contextual quanto no congelamento pós-estimulação, evidências indicam que esses dois tipos de congelamento são funcionalmente distintos. O congelamento condicionado contextual mediado pela circuitaria amígdala-substância cinzenta periaquedutal ventral diminui com o término da estimulação, enquanto que o congelamento pós-estimulação da SCPd continua após a estimulação e não é contexto dependente. Esse tipo de congelamento resulta diretamente da estimulação da SCPd sugerindo a natureza inata desse tipo de congelamento (Vianna *et al.*, 2001a; b; 2003). Desse modo durante a neurotransmissão gabaérgica, a amígdala afeta alguns, mas não todos os aspectos do medo incondicionado, ou seja, não altera os limiares, porém altera o congelamento pós-estimulação da SCPd. Esse último tipo de congelamento pode estar relacionado com o fato de a SCPd integrar informações sensoriais que permitem o reconhecimento de estímulos aversivos. Desse modo, é interessante que a amígdala continue recebendo informações da SCPd para avaliar junto com as diversas informações sensoriais vindas do ambiente qual será a próxima resposta, por isso a manutenção do comportamento de congelamento seria uma resposta adaptativa no sentido em que permite ao animal receber o maior número de informações do ambiente e integrá-las para determinar qual será a próxima resposta, fuga caso haja um perigo proximal, manutenção da postura imóvel para avaliar se não existe um perigo potencial e, caso não haja mais perigo, retorno a condição de repouso. A supressão do comportamento, ou seja, a permanência na posição imóvel é frequentemente associada a estímulos aversivos e é reportada em estudos hormonais, neuroquímicos e imunológicos (Weiss *et al.*, 1981; Irwin *et al.*, 1986; Caggiula *et al.*, 1989). Para o

processamento dos estímulos sensoriais, tem sido proposto que o núcleo laterodorsal do tálamo também participe da elaboração do congelamento já que permite ao animal adquirir um maior número de informação aversiva sobre o ambiente (Ferreira-Neto *et al.*, 2005).

O congelamento registrado após a estimulação da SCPd é influenciado pela amígdala porque reflete o processo de ascensão da informação até os centros prosencefálicos. De modo que, projeções ascendentes da eferência SCPd-amígdala provavelmente são ativadas durante o congelamento pós-estimulação. Anatomicamente observam-se fibras originárias da SCPd innervando várias regiões prosencefálicas incluindo o complexo amigdalóide através do feixe prosencefálico medial (Cameron *et al.*, 1995; Rizvi *et al.*, 1991). Especificamente, Fanselow (1994) e De Oca *et al.* (1998) sugeriram que as conexões existentes entre a SCPd e o complexo amigdalóide modulam a ocorrência do congelamento.

Resumidamente, o trabalho indica que existem pelo menos três tipos de congelamento: i) o congelamento contextual, que é dependente da circuitaria de medo na amígdala e é modulado pela neurotransmissão gabaérgica; ii) o congelamento incondicionado, induzido diretamente pela estimulação da SCPd e que não depende da mediação gabaérgica nos núcleos amigdalóides aqui estudados; iii) o congelamento que persiste após a interrupção da estimulação da SCPd, que também é dependente da mediação gabaérgica da amígdala.

A partir dessas evidências, sugere-se que os substratos neurais da SCPd responsáveis pelo início do congelamento e da fuga são independentes da neurotransmissão gabaérgica na amígdala, no entanto, a duração do congelamento pós-estimulação depende de processos gabaérgicos da amígdala. De modo que, o congelamento incondicionado possa ser necessário na aquisição da informação aversiva a qual ativa a SCPd.

**EXPERIMENTO III**  
**MODULAÇÃO SEROTONINÉRGICA DA AMÍGDALA NO MEDO**  
**CONDICIONADO CONTEXTUAL E NO MEDO INCONDICIONADO**

---

## **EXPERIMENTO III: MODULAÇÃO SEROTONINÉRGICA DA AMÍGDALA NO MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL E NO MEDO INCONDICIONADO**

### **INTRODUÇÃO**

A utilização de drogas que atuam na neurotransmissão serotoninérgica no tratamento dos transtornos de ansiedade impulsionou a investigação do envolvimento desse neurotransmissor na elaboração de respostas comportamentais e autonômicas na reação de defesa a estímulos de perigo potencial e proximal (Graeff, 1981; 1990; 1993b; 1994; 1999; 2004; Handley & McBlane, 1993; Griebel *et al.*, 1995b; Gray & McNaughton, 2000; Graeff & Zangrossi, 2002). Os resultados com injeção de drogas que atuam em receptores serotoninérgicos no complexo amigdalóide de animais testados em modelos de conflito fundamentaram a proposição do papel ansiogênico da serotonina, ou seja, de que a serotonina teria o papel de aumentar a ansiedade (Graeff, 2004, para revisão). No entanto, existe divergência na literatura. Apesar de alguns estudos apontarem para o papel ansiogênico da serotonina (Geller, 1970; Graeff & Schoenfeld, 1970; Wise *et al.*, 1972; Tye *et al.*, 1977; Hodges *et al.*, 1987), outros indicam um papel ansiolítico para este neurotransmissor (Kiser *et al.*, 1980; Jenck *et al.*, 1990; Nogueira & Graeff, 1995).

As evidências de que a serotonina teria o papel de diminuir a ansiedade foram obtidas a partir de estudo com um outro modelo experimental: a estimulação elétrica da SCPd (Kiser & Lebovitz, 1975; Kiser *et al.*, 1978; Schenberg & Graeff, 1978). Nos primeiros estudos com este modelo, foi verificado que tanto o inibidor da síntese de serotonina pCPA (Kiser & Lebovitz, 1975), como o antagonista serotoninérgico não seletivo ciproheptadina (Schenberg & Graeff, 1978), facilitavam a resposta de fuga, indicando um efeito pró-aversivo. Por outro

lado, a potencialização da neurotransmissão serotoninérgica gerada pela administração sistêmica do inibidor da recaptação de serotonina/noradrenalina, clomipramina, prejudicava esta mesma resposta, indicando um efeito antiaversivo (Kiser *et al.*, 1978).

Outras evidências mostraram ainda que a injeção de 5-HT ou do agonista não seletivo de receptores serotoninérgicos 5-metoxi-N,M-dimetiltriptamina (5-MeODMT) diretamente na SCPd aumentava a corrente elétrica necessária para atingir o limiar de fuga nos animais, indicando a inibição desta resposta (Schutz *et al.*, 1985). Desta forma, enquanto a serotonina parece atuar aumentando a ansiedade em modelos que geram conflito, este mesmo neurotransmissor parece diminuir o medo em modelos de medo incondicionado.

Na clínica também foram observados resultados incongruentes. A administração do antagonista de receptores serotoninérgicos ritanserina, atenuava quadros de ansiedade generalizada (Celeumans *et al.*, 1985), não causava efeito (den Boer & Westenberger, 1990), ou então, piorava quadros de transtorno de pânico (Deakin *et al.*, 1992). Estas observações foram ainda confirmadas em testes experimentais conduzidos em humanos tanto em modelos relacionados à ansiedade generalizada (Hensman *et al.*, 1991) como em modelos relacionados ao transtorno de pânico (Guimarães *et al.*, 1997).

As evidências aparentemente contraditórias de que a serotonina aumenta a ansiedade atuando no complexo amigdalóide e diminui o medo atuando na SCPd levaram Deakin & Graeff (1991) a proporem uma teoria na qual diferentes vias serotoninérgicas que inervam estas estruturas seriam as responsáveis pela elaboração de comportamentos defensivos associados à ansiedade generalizada e ao pânico.

Nesse sentido, tanto o complexo amigdalóide como a SCPd são inervados por fibras serotoninérgicas provenientes do núcleo dorsal da rafe através dos feixes prosencefálico e periventricular, respectivamente (Azmitia & Segal, 1978). De acordo com Deakin & Graeff (1991), a via prosencefálica, que inerva o complexo amigdalóide, facilitaria os

comportamentos expressos em resposta a perigos potenciais ou distais como, por exemplo, a esquiva inibitória. Por outro lado, a via periventricular que inerva a SCPd inibiria reações de fuga e luta em resposta ao perigo proximal.

De acordo com a teoria de Deakin & Graeff (1991), diante de estímulos aversivos potenciais estas vias serotoninérgicas seriam ativadas, ocasionando o aumento da liberação de serotonina tanto no complexo amigdalóide quanto na SCPd. A ativação destas vias modularia a expressão de diferentes respostas comportamentais defensivas. No complexo amigdalóide, a serotonina facilitaria a esquiva comportamental, enquanto que na SCPd, o aumento da concentração de serotonina inibiria a resposta de fuga. Deste modo, a serotonina exerceria um papel dual, integrando diferentes tipos de reações comportamentais de defesa, pois a expressão de comportamentos desencadeados por ameaças reais ou proximais, como a luta e/ou a fuga pode ser inapropriado em situações nas quais o perigo é apenas discreto e potencial. Neste caso, estratégias mais flexíveis e elaboradas como os comportamentos de avaliação de risco e esquiva, coordenados pelo complexo amigdalóide, podem ser mais eficazes (Graeff, 1993b; Graeff *et al.*, 1996; Deakin & Graeff, 1991). Desta forma, o hiperfuncionamento da via serotoninérgica compreendida pelo núcleo dorsal da rafe/complexo amigdalóide e a disfunção do núcleo dorsal da rafe/SCPd levariam a transtornos de ansiedade generalizada e de pânico, respectivamente (Deakin & Graeff, 1991; Graeff, 1993b; 2002; 2004; Graeff *et al.*, 1996; 1997).

Corroborando a proposição de Deakin & Graeff (1991) foi verificado, por exemplo, que a administração sistêmica de d-fenfluramina, que ativa neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe e libera serotonina nos terminais sinápticos localizados no complexo amigdalóide e na SCPd facilita a resposta de esquiva e inibe a resposta de fuga, respectivamente (Graeff *et al.*, 1997). Nesse sentido, o presente trabalho visa contribuir para o conhecimento neste campo de pesquisa investigando os efeitos da ativação de receptores

serotoninérgicos pela administração local de fluoxetina nos núcleos amigdalóides sobre a modulação de respostas defensivas condicionadas e incondicionadas. Estas últimas geradas pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd.

## MATERIAIS E MÉTODOS

---

Nesse experimento foi avaliado o efeito da modulação serotoninérgica da amígdala no medo condicionado contextual e no medo incondicionado.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Sujeitos*

Foram utilizados 64 ratos *Wistar* machos, com peso entre 250 e 300 g. Os animais foram agrupados (5 animais por caixa) em gaiolas de polipropileno (30 x 32 x 18 cm) forradas com maravalha, e tiveram livre acesso à água e ao alimento. Os animais foram mantidos em um biotério com temperatura controlada a  $23^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$  e um programa de iluminação artificial com ciclo claro/escuro 12 h x 12 h, com início do período claro às 7:00 horas.

### *Cirurgia*

O mesmo procedimento do Experimento II.

### *Microinjeção*

As microinjeções foram realizadas com a utilização de uma agulha de infusão conectada por meio de um tubo de polietileno (PE-10) a uma seringa de 5  $\mu\text{l}$  (Hamilton, EUA) que, por sua vez, era controlada por uma bomba de microinfusão (Harvard Apparatus, South Natick, MA). A agulha de infusão foi introduzida 1 mm abaixo da cânula guia e, as soluções foram injetadas em um volume de 0,2  $\mu\text{l}/\text{min}$ , sendo que após a injeção a agulha de infusão permaneceu no local por mais um minuto a fim de maximizar o processo de difusão. Esse

procedimento foi monitorado por meio do deslocamento de uma bolha de ar no interior do tubo de polietileno.

#### *Equipamentos e Procedimento Experimental*

Mesmo procedimento do Experimento II.

#### *Histologia*

Mesmo procedimento do Experimento II, com exceção de que os animais receberam microinjeção de Azul de Evans (2%) nos núcleos amigdalóides no mesmo volume das drogas utilizadas nesse experimento (0,2 µl/min).

#### *Drogas*

Para verificar a mediação serotoninérgica nos núcleos amigdalóides foi utilizada a fluoxetina (3,5 nmol/0,2 µL). A escolha desta dose foi baseada em um estudo prévio (Pasini *et al.*, 1996). Os animais controle receberam o mesmo volume de salina.

#### *Análise Estatística*

Os dados estão representados como média + E.P.M. Os dados referentes aos limiares aversivos determinados pelo procedimento de estimulação da SCPd antes e após a microinjeção de salina ou fluoxetina em cada um dos núcleos amigdalóides foram analisados utilizando-se a análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas. O fator 1

referiu-se ao tratamento (salina ou fluoxetina) e o fator 2 condição (antes ou depois da injeção do fármaco).

Para melhor visualização dos efeitos observados com as injeções nos núcleos amigdalóides sobre os comportamentos de congelamento e fuga induzidos pela estimulação da SCPd também calcularam-se as diferenças entre os limiares determinados antes e depois destas injeções. As variações ( $\Delta$ ) nos limiares também foram submetidos à ANOVA de duas vias com medidas repetidas sendo tratamento (salina ou fluoxetina) e comportamentos (congelamento e fuga) os dois fatores analisados.

O tempo de congelamento pós-estimulação também foi analisado com a ANOVA de duas vias com medidas repetidas sendo o tratamento (salina ou fluoxetina) e a condição (pré ou pós-injeção) os fatores analisados

O tempo de congelamento registrado durante o teste do medo condicionado contextual também foi analisado com a ANOVA de duas vias com medidas repetidas utilizando-se como fator 1 o tratamento (salina ou fluoxetina) e como fator 2 a condição (antes ou depois da microinjeção).

O nível de significância para todos os testes foi  $p < 0,05$ . Em caso de significância estatística foi utilizado o teste de *Newman-Keuls*.

**RESULTADOS**

---

## RESULTADOS

A Figura 11 representa os sítios das microinjeções localizados nos núcleos LaA (B), BLA (C) e CeA (A) e a posição do eletrodo situado na SCPd (D).

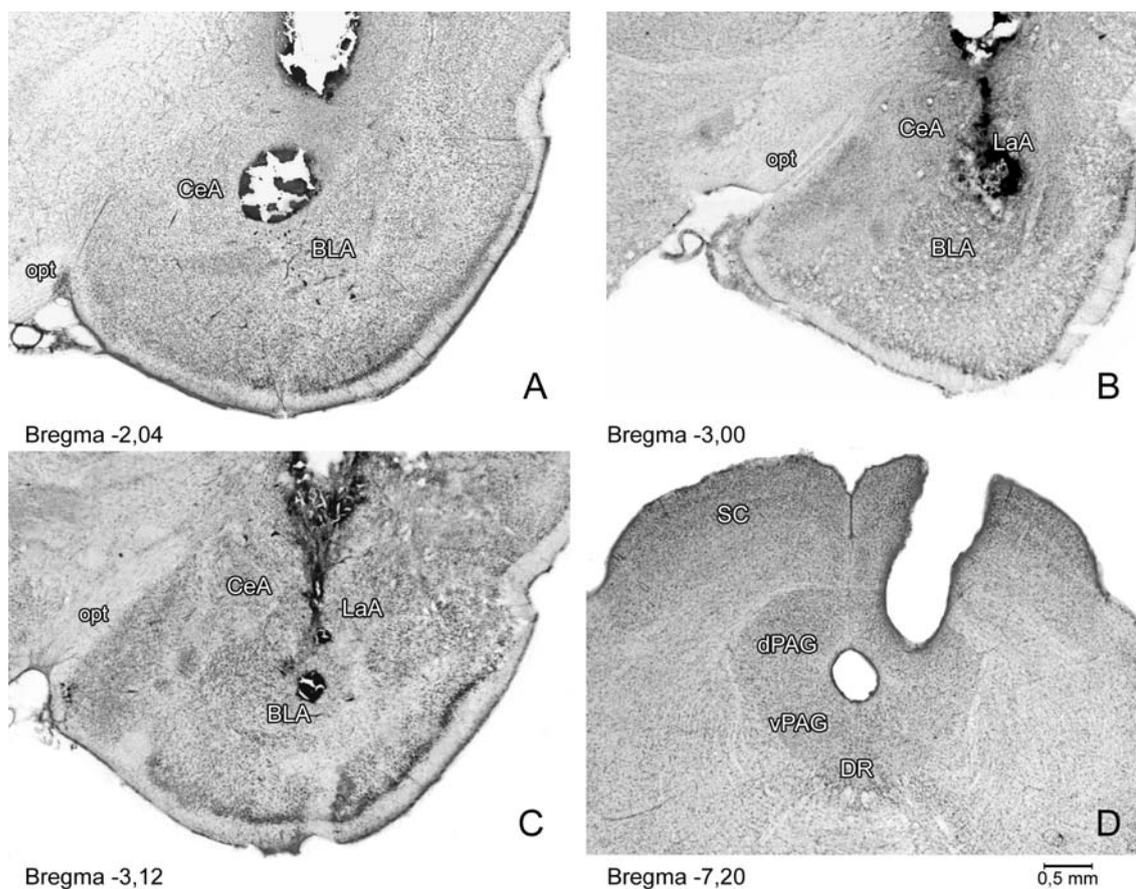


Figura 11. Fotomicrografias representativas dos sítios de injeção nos núcleos central – CeA (A); lateral – LaA (B), basolateral– BLA (C) e do sítio de estimulação localizado na substância cinzenta periaquedutal dorsal – dPAG (D). A barra representa 500  $\mu\text{m}$  em todas as fotomicrografias. opt: trato óptico; Cpu: caudado putâmen; SC: colículo superior; vPAG: substância cinzenta periaquedutal ventral; DR: núcleo dorsal da rafe. Os números abaixo das figuras indicam a distância em mm do bregma.

*Medo Incondicionado*

A intensidade da corrente elétrica aplicada na SCPd necessária para a obtenção dos comportamentos de congelamento e fuga foram plotadas juntas e submetidas à ANOVA de uma via. A análise mostrou diferenças significativas ( $F_{1,511} = 61,13$ ,  $p < 0,05$ ) entre as intensidades de corrente elétrica necessárias para a produção do congelamento ( $77,23 \pm 1,93$ ) e da fuga ( $92,1 \pm 1,88$ ).

A Figura 12 mostra os valores dos limiares ( $\mu A$ ) de congelamento (A) e fuga (B) obtidos pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd em ratos antes e após receberem a microinjeção de salina ou fluoxetina nos núcleos LaA (N = 10 e 13, respectivamente), BLA (N = 9 e 10, respectivamente) ou CeA (N = 10 e 12, respectivamente). Os dados obtidos com as injeções em cada núcleo foram submetidos à ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Com relação aos limiares necessários para a obtenção do congelamento, a análise mostrou que os tratamentos não alteraram o valor do limiar obtido pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd após microinjeção nos núcleos amigdalóides ( $F_{1,45} = 1,14$  para o núcleo lateral,  $F_{1,37} = 0,01$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 0,03$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos). Também não foram observadas diferenças no fator condição ( $F_{1,45} = 2,24$  para o núcleo lateral,  $F_{1,37} = 3,13$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 1,93$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos). A interação entre os fatores também não foi estatisticamente diferente ( $F_{1,45} = 0,78$  para o núcleo lateral,  $F_{1,37} = 0,25$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 0,32$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos).

A Figura 12B mostra os valores dos limiares ( $\mu A$ ) de fuga determinados pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd na linha de base e no teste para os grupos que receberam microinjeção de salina ou fluoxetina nos núcleos LaA, BLA e CeA. Os dados foram submetidos à ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Essa análise mostrou que

os diferentes tratamentos não alteraram os limiares aversivos de fuga determinados pela estimulação elétrica da SCPd após microinjeção nos núcleos amigdalóides ( $F_{1,45} = 0,44$  para o núcleo lateral,  $F_{1,37} = 0,04$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 0,04$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos). O fator condição também não alterou os limiares de congelamento ( $F_{1,45} = 1,54$  para o núcleo lateral,  $F_{1,37} = 3,20$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 0,23$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos). A interação entre os fatores também não foi estatisticamente diferente ( $F_{1,45} = 0,91$  para o núcleo lateral,  $F_{1,37} = 1,29$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 3,75$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos).

A Figura 13 mostra a variação média ( $\Delta$ ) dos limiares de congelamento e fuga determinados pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd nos limiares de congelamento e fuga para os grupos que receberam microinjeção de salina ou fluoxetina nos núcleos LaA, BLA e CeA. Os dados foram submetidos à ANOVA de duas vias com medidas repetidas. A ANOVA não mostrou diferença entre os tratamentos para os três núcleos amigdalóides ( $F_{1,45} = 1,95$  para o núcleo lateral,  $F_{1,37} = 2,53$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 2,93$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos). Também não houve diferença entre a variação dos limiares aversivos de congelamento e fuga determinados pela estimulação elétrica da SCPd ( $F_{1,45} = 0,06$  para o núcleo lateral,  $F_{1,37} = 0,01$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 0,01$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos). A interação entre os fatores também não foi estatisticamente diferente ( $F_{1,45} = 0,06$  para o núcleo lateral,  $F_{1,37} = 0,01$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 0,01$  para o núcleo central; sendo  $p > 0,05$  em todos os casos).

A análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas também foi utilizada para o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPd (Figura 14). A análise mostrou efeitos estatisticamente significativos dos tratamentos (salina e fluoxetina) em todos os núcleos ( $F_{1,45} = 4,88$  para o núcleo lateral,  $F_{1,37} = 5,83$  para o núcleo basolateral e

$F_{1,43} = 7,24$  para o núcleo central; sendo  $p < 0,05$ ). O fator condição (antes e depois das microinjeções) também influenciou significativamente os núcleos ( $F_{1,45} = 4,88$  para o núcleo lateral,  $F_{1,37} = 6,64$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 15,09$  para o núcleo central; sendo  $p < 0,05$  em todos os casos). A interação entre os fatores também foi estatisticamente significativa ( $F_{1,45} = 1,88$  para o núcleo lateral,  $F_{1,37} = 7,80$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 14,71$  para o núcleo central; sendo  $p < 0,05$  em todos os casos). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou uma redução no tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPd após o tratamento com fluoxetina nos núcleos LaA, BLA e CeA.

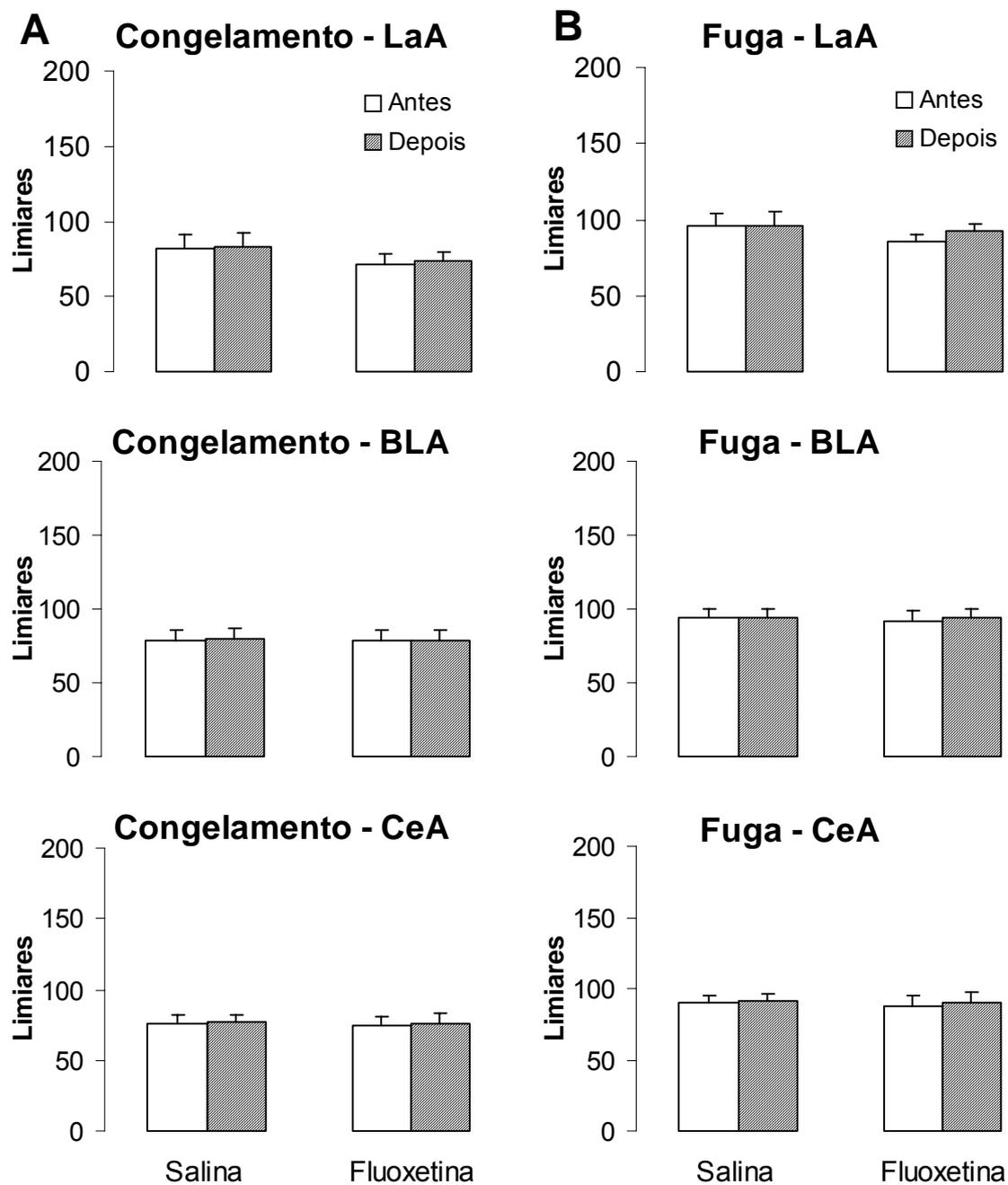


Figura 12. Limiars ( $\mu\text{A}$ ) de congelamento (A) e fuga (B) determinados pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd antes e após a injeção de salina ou fluoxetina nos núcleos lateral – LaA, basolateral – BLA e central – CeA.

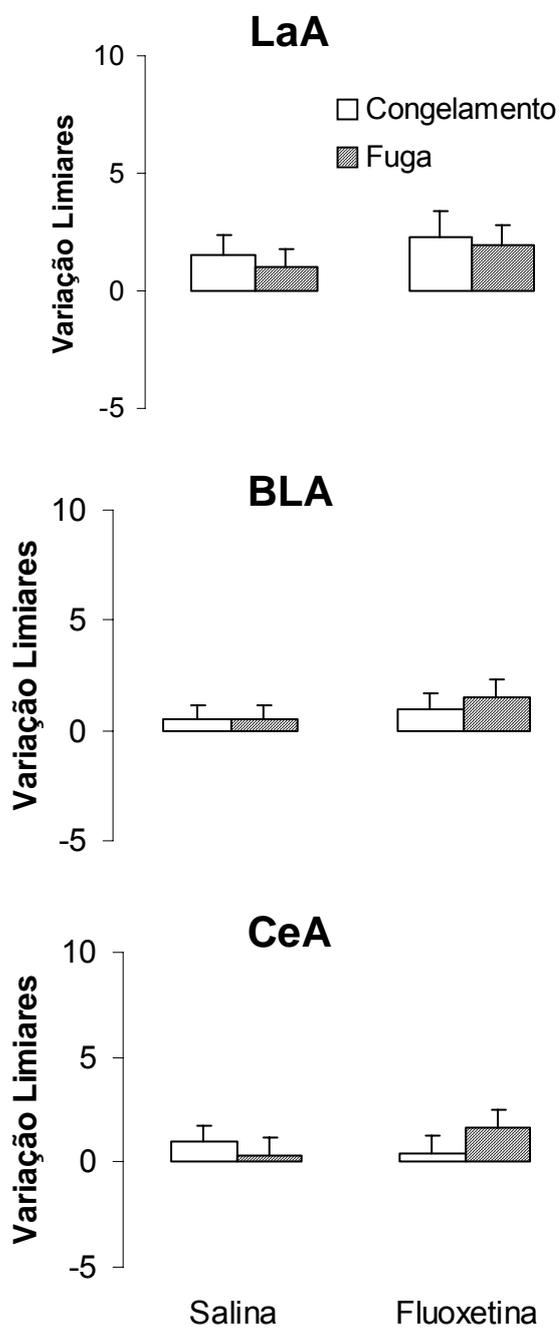


Figura 13. Variação ( $\Delta$ ) dos limiars de congelamento e fuga determinados pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd antes e após os animais receberem microinjeção de salina ou fluoxetina em um dos três núcleos amigdalóides.

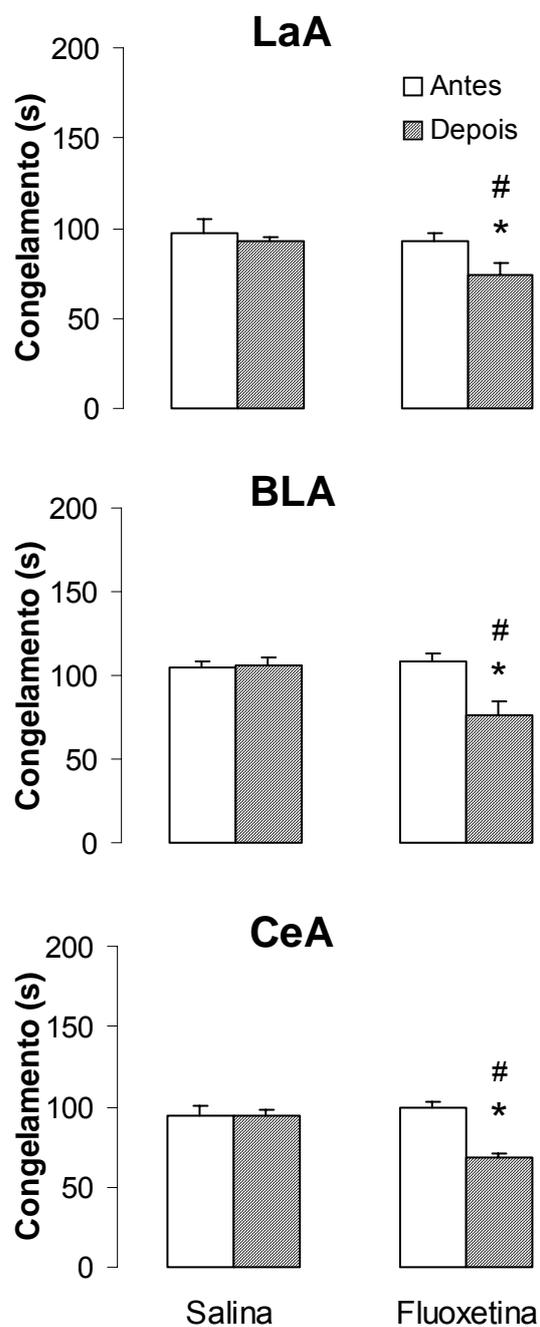


Figura 14. Média (+EPM) do tempo de congelamento pós-estimulação da SCPd registrado em animais microinjetados com salina ou fluoxetina em um dos três núcleos amigdalóides. \*,  $p < 0,05$  em relação aos respectivos controles, determinados antes das injeções. #,  $p < 0,05$  em relação ao correspondente grupo salina.

### *Medo Condicionado*

A Figura 15 mostra o tempo de congelamento registrado durante o teste do medo condicionado contextual antes e após as injeções de salina e fluoxetina nos núcleos LaA (N = 10 e 13, respectivamente), BLA (N = 9 e 10, respectivamente) ou CeA (N = 10 e 12, respectivamente). A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeitos significativos para o fator tratamento ( $F_{1,45} = 23,34$  para o núcleo lateral,  $F_{1,37} = 9,79$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 75,43$  para o núcleo central; sendo  $p < 0,05$  em todos os casos) e para o fator condição ( $F_{1,45} = 393,23$  para o núcleo lateral,  $F_{1,37} = 344,05$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 142,65$  para o núcleo central; sendo  $p < 0,05$  em todos os casos). A interação entre os fatores também foi estatisticamente significativa nos três núcleos amigdalóides ( $F_{1,45} = 23,57$  para o núcleo lateral,  $F_{1,37} = 10,78$  para o núcleo basolateral e  $F_{1,43} = 79,83$  para o núcleo central; sendo  $p < 0,05$  em todos os casos). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou um aumento no tempo de congelamento registrado na sessão teste após a administração de fluoxetina nos três núcleos amigdalóides (LaA, BLA e CeA) em comparação com suas respectivas linhas de base e com os animais microinjetados com salina.

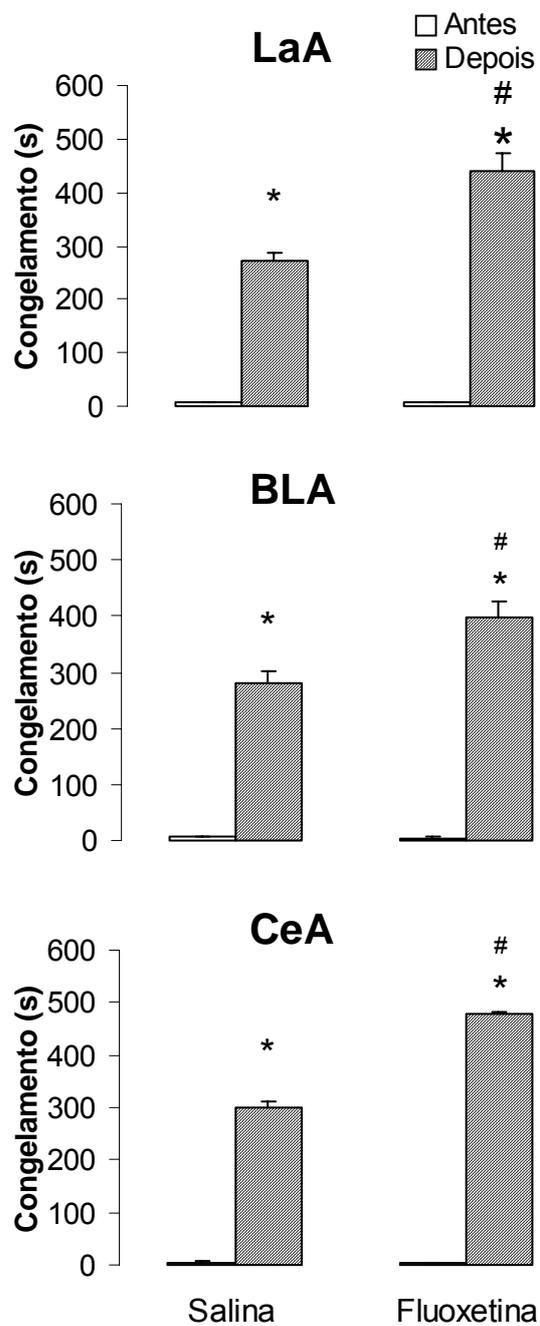


Figura 15. Média (+ EPM) do tempo de congelamento registrado em sessões de 8-minutos antes (coluna branca) e depois (coluna listrada) das injeções de salina ou fluoxetina nos núcleos lateral (LaA), basolateral (BLA) ou central (CeA) da amígdala dos animais expostos ao teste de condicionamento contextual. \*,  $p < 0,05$  em relação ao respectivo grupo controle, determinado antes das injeções. #,  $P < 0,05$  em relação ao valor correspondente do grupo salina.

**DISCUSSÃO**

---

## DISCUSSÃO

A amígdala é uma das principais estruturas na regulação do comportamento emocional e ocupa uma posição central na regulação de respostas condicionadas e incondicionadas, atuando como um filtro para informações sensoriais que parecem ser cruciais para a sobrevivência do indivíduo (Davis, 1992b; Davis *et al.*, 1994a; b; LeDoux, 1994; Kilcross *et al.*, 1997). Vários estudos apontam para uma função regulatória do núcleo basolateral na aquisição do medo condicionado (Davis, 1992b; LeDoux *et al.*, 1990a; b; Vazdarjanova *et al.*, 2001).

Estudos com marcação de proteína Fos mostram a ativação de núcleos amigdalóides específicos durante as respostas emitidas por animais expostos a diferentes situações aversivas como choques elétricos (Campeau *et al.*, 1991; Savonenko *et al.*, 1999), altura e ou espaços abertos (Duncan *et al.*, 1996; Silveira *et al.*, 2001), estímulos ultrasônicos (Beckett *et al.*, 1997), estimulação elétrica ou química da SCPd (Sandner *et al.*, 1993; De Oliveira *et al.*, 2000; Ferreira-Neto *et al.*, 2005). Adicionalmente, estudos utilizando a técnica de microdiálise mostram o mecanismo dual nos núcleos basolateral e central na regulação do comportamento defensivo induzido pela estimulação elétrica do colículo inferior (Macedo *et al.*, 2002).

A amígdala constitui-se em um dos principais sítios da modulação serotoninérgica na neurocircuitaria do medo. De fato, estudos neuroanatômicos indicam que a amígdala de roedores recebe uma densa projeção de fibras serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe (Vertes, 1991; Vertes *et al.*, 1999; Azmitia & Segal, 1978; Sadikot & Parent, 1990; Ma *et al.*, 1991) e que diferentes tipos de receptores serotoninérgicos estão presentes na amígdala (Pazos & Pallacios, 1985; Pazos *et al.*, 1985; Barnes *et al.*, 1989; Sugita *et al.*, 1992; Humphrey *et al.*, 1993; Morilak *et al.*, 1993; Martin & Humphrey, 1994; Pompeiano *et al.*,

1994; Varnas *et al.*, 2001). A estimulação do núcleo dorsal da rafe produz um aumento na liberação de 5-HT na amígdala (Viana *et al.*, 1997). Além disso, alterações nos níveis de serotonina afetam o balanço entre a neurotransmissão inibitória e excitatória no complexo basolateral da amígdala (Rainnie, 1999; Stutzmann & LeDoux, 1999).

Os dados obtidos nesse experimento mostram que o aumento da neurotransmissão serotoninérgica causada pela administração de fluoxetina nos núcleos LaA, BLA e CeA causou um aumento do congelamento condicionado contextual. Esse aumento da mediação serotoninérgica da amígdala provocado pela fluoxetina corrobora a proposta de que a consolidação do condicionamento contextual expresso pelo comportamento de congelamento ocorre devido a mecanismos serotoninérgicos que transferem a informação aversiva da via núcleo mediano da rafe para estruturas límbicas prosencefálicas (Avanzi & Brandão, 2001; Avanzi *et al.*, 2003; Borelli *et al.*, 2005). De fato, estudo utilizando a técnica de microdiálise demonstrou que a administração de inibidores da recaptação de serotonina aumenta a concentração de serotonina em várias regiões encefálicas (Fuller, 1994).

Segundo a teoria de Deakin & Graeff (1991), frente a estímulos aversivos as vias serotoninérgicas do trato periventricular e prosencefálico (que inervam respectivamente a SCPd e o complexo amigdalóide) seriam ativadas ocasionando o aumento da liberação de serotonina na SCPd e na amígdala. Por conseguinte, a ativação destas vias modularia a expressão de diferentes respostas comportamentais defensivas. Mais especificamente, na SCPd, o aumento da concentração de serotonina inibiria a expressão de comportamentos desencadeados por ameaças proximais, como a luta e/ou a fuga. Já na amígdala esse aumento favoreceria a expressão de comportamentos que ocorrem em resposta a estímulos ameaçadores potenciais ou distais e que envolvem o conflito entre aproximação/esquiva, proposto mais tarde por Gray & McNaughton (2000), como os comportamentos de avaliação de risco e esquiva. Deste modo, a serotonina exerceria um papel dual, uma vez que integraria

diferentes tipos de reações comportamentais de defesa. Ademais, os autores propõem ainda que enquanto a serotonina diminuiria o pânico agindo na SCPd, esse neurotransmissor aumentaria a ansiedade atuando no complexo amigdalóide (Deakin & Graeff, 1991; Graeff, 1993b; Graeff *et al.*, 1996; 1997; Graeff, 2002).

Desse modo, os resultados mostrados corroboram a teoria de Deakin & Graeff (1991) mostrando que o aumento da neurotransmissão serotoninérgica na amígdala leva a um aumento dos efeitos aversivos no paradigma de medo condicionado contextual. Apoiando esta hipótese, observa-se que a infusão de serotonina ou agonista de receptores serotoninérgicos (8-OH-DPAT) na amígdala produz um efeito ansiogênico em testes de conflito, enquanto a infusão do antagonista de receptores serotoninérgicos cetanserina produz um efeito ansiolítico (Hodges *et al.*, 1987). Resultados similares foram obtidos recentemente neste laboratório com a demonstração de que a injeção local de agonista serotoninérgico no núcleo basolateral da amígdala aumentou a aversão condicionada ao lugar onde anteriormente os ratos haviam recebido estimulação aversiva (Macedo *et al.*, submetido).

Entretanto, existem resultados conflitantes em relação ao papel da serotonina na amígdala. Alguns autores relatam efeitos ansiolíticos dos inibidores seletivos de recaptação de serotonina em alguns modelos animais de ansiedade (Hashimoto *et al.*, 1996; Muraki *et al.*, 1999). Também nesse sentido, injeções sistêmicas de citalopram, que aumenta a concentração extracelular de serotonina no córtex pré-lobulocaudal, levam a uma redução do tempo de congelamento em um paradigma de medo condicionado (Hashimoto *et al.*, 1999), sugerindo que o aumento da neurotransmissão serotoninérgica diminui os níveis de ansiedade (Eriksson & Humble, 1990).

Com relação ao medo incondicionado, os resultados mostram que o aumento da neurotransmissão serotoninérgica nos núcleos LaA, BLA e CeA ocasionado pela administração de fluoxetina não alterou os limiares aversivos de congelamento e fuga determinados pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd. Corroborando os resultados do presente experimento, Zangrossi e colaboradores (1999) verificaram que a injeção da droga serotoninérgica 8-OH-DPAT no núcleo basolateral não altera a resposta de fuga no labirinto em T elevado. No entanto, vários trabalhos apontam para o papel do núcleo medial da amígdala na mediação das respostas de fuga. Nesse sentido, Herdade e colaboradores (2006) mostraram que o núcleo medial da amígdala está envolvido na mediação das respostas de congelamento e fuga induzidos pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd.

Nesse sentido, vários trabalhos apontam para o envolvimento da amígdala medial na mediação das respostas de fuga. Como exemplo, Sandner e colaboradores (1993) e De Oliveira e colaboradores (2000) utilizando a técnica de marcação da proteína Fos apontam o envolvimento do núcleo medial na regulação do comportamento de fuga, gerado pela estimulação elétrica ou química da SCPd. Adicionalmente, foi observado que a inativação do núcleo medial, induzida pela injeção do anestésico local lidocaína ou de muscimol inibe tanto a fuga gerada no labirinto em T elevado (Strauss & Zangrossi, dados não publicados) como aquela gerada pelo procedimento de estimulação da SCPd (Herdade *et al.*, 2006).

Quando se considera o congelamento pós-estimulação da SCPd observa-se sua redução após a microinjeção de fluoxetina nos três núcleos amigdalóides (LaA, BLA e CeA) sugerindo que nesses núcleos, o congelamento pós-estimulação da SCPd é mediado por mecanismos serotoninérgicos da amígdala. Essa modulação provavelmente envolve o processo de transferência da informação aversiva das estruturas do tronco encefálico até centros prosencefálicos, via feixe prosencefálico medial (Azmitia e Segal, 1978). Esse congelamento pós-estimulação permite ao animal receber informações do ambiente no sentido

de prepará-los para uma nova possível ameaça, sugerindo que embora seja uma resposta incondicionada mecanismos de memória de curta duração podem ser acionados durante este tipo de congelamento. Nesse sentido, tem sido mostrado que a amígdala pode participar da integração de respostas condicionadas e incondicionadas de medo (Amaral & Price, 1984; Davis, 1992a; LeDoux 2000; Vazdarjanova *et al.*, 2001). Assim, temos que a serotonina na amígdala facilita o medo condicionado contextual, não afeta o congelamento e a fuga induzidos pela estimulação da SCPd e reduz o tempo de congelamento pós-estimulação aversiva da SCPd.

Analisados em conjunto, os resultados obtidos neste estudo podem ter relevância no contexto da teoria proposta por McNaughton & Corr (2004) que introduz o conceito do sistema bidimensional de defesa que está fundamentado nos conceitos de direção defensiva (Gray & McNaughton, 2000) e de distância defensiva (Blanchard & Blanchard, 1988; Blanchard *et al.*, 1993; 2001). Os autores propõem que as estruturas encefálicas envolvidas nos sistemas de defesa que controlam a ansiedade e o medo, caracterizados por comportamentos que visem a aproximação e a retirada do animal da situação de perigo, respectivamente, são inter e intraconectadas. Ainda, segundo esses autores a representação neural do medo condicionado e do medo incondicionado poderia ser feita com duas pirâmides invertidas, colocadas lado a lado no encéfalo. A pirâmide cuja base está no córtex e o vértice no tronco encefálico indicaria a prevalência dos substratos neurais do medo condicionado nas áreas rostrais do encéfalo, como córtex cerebral, hipocampo e amígdala. Assim, as estruturas que compõem estes sistemas são hierarquicamente organizadas e atuam de acordo com a distância em que se encontra a fonte de perigo. Enquanto comportamentos expressos em resposta a estímulos potenciais seriam controlados primordialmente por estruturas mais rostrais e corticais, comportamentos expressos em resposta a estímulos proximais seriam regulados por estruturas mais caudais e subcorticais. De modo que, todas as estruturas

envolvidas modulam tanto os comportamentos elaborados como, por exemplo, o congelamento, como as respostas rápidas e explosivas, como a fuga. Dentre as estruturas que participam destes dois sistemas está o complexo amigdalóide, elaborando a resposta defensiva mais apropriada para a situação (McNaughton & Corr, 2004). Assim, nossos resultados juntamente com os relatados na literatura (Herdade *et al.*, 2006; Strauss, 2006) apóiam a proposição do envolvimento do complexo amigdalóide na modulação de respostas de ansiedade e fuga.

De certa maneira, nossos resultados fortalecem a idéia de um maior envolvimento de estruturas prosencefálicas no medo condicionado e que quanto mais caudal uma estrutura, maior sua participação em processos relacionados ao medo incondicionado. Embora em menor extensão, o medo condicionado teria também uma representação neural em áreas do tronco encefálico como a SCPd e o medo incondicionado teria alguma representação em áreas prosencefálicas como a amígdala.

No Experimento II e III observam-se efeitos similares do muscimol e da fluoxetina sobre o medo incondicionado. Houve uma redução do congelamento pós-estimulação da SCPd sem alterar os limiares aversivos de congelamento e fuga. Os efeitos destes fármacos sobre o congelamento pós-estimulação da SCPd provavelmente se devem a uma interação entre mecanismos gabaérgicos e serotoninérgicos na amígdala. Tem sido mostrado que a serotonina estimula os interneurônios gabaérgicos da amígdala. Stutzmann & LeDoux (1999) e Rainnie (1999) examinando o papel da interação 5-HT/GABA na modulação do processamento de informações sensoriais na amígdala mostraram que a serotonina exerce um papel excitatório sobre os interneurônios gabaérgicos que incidem sobre as aferências do córtex e do tálamo (Figura 16). Com base nos resultados do presente trabalho sugere-se que os comportamentos de congelamento e de fuga determinados pelo procedimento de

estimulação elétrica da SCPd não estão sob o controle da amígdala, provavelmente, a resposta de defesa imediata é organizada diretamente por estruturas do tronco encefálico.

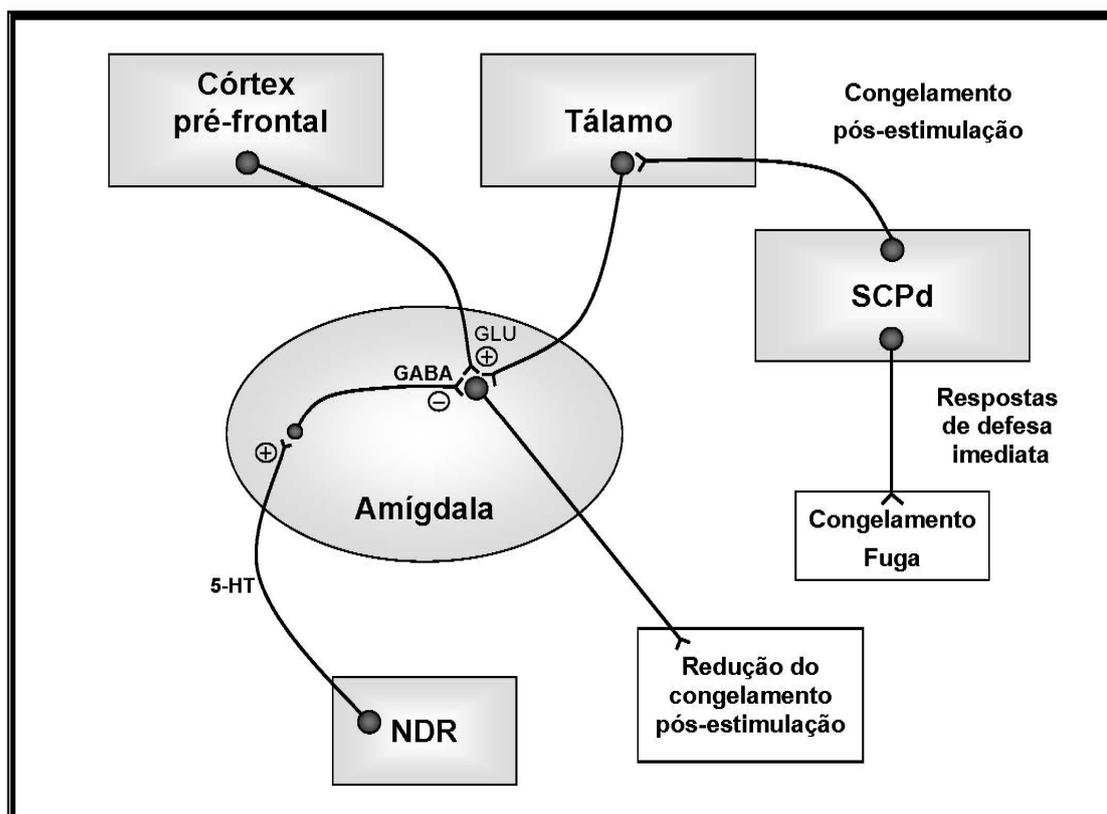


Figura 16. Representação esquemática da possível modulação 5-HT/GABA do medo incondicionado na amígdala. As respostas de defesa imediata – congelamento e fuga – são elaboradas por estruturas do tronco encefálico como a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd). O aumento da transmissão 5-HT/GABA na amígdala pode levar a uma redução do congelamento pós-estimulação da SCPd. NDR: núcleo dorsal da rafe, GLU: glutamato.

Por outro lado, quando se considera o medo condicionado contextual, o muscimol reduziu e a fluoxetina aumentou o congelamento. A lesão da amígdala reduz este comportamento de congelamento (Oliveira *et al.*, 2004) do mesmo modo que o muscimol reduz a atividade na amígdala por potencializar mecanismos inibitórios. É provável que a modulação serotoninérgica do medo condicionado na amígdala se utilize de mecanismos

diferentes dos discutidos acima para o medo incondicionado. Neste caso, provavelmente mecanismos serotoninérgicos seriam ativados por estímulos condicionados de medo ou situação de conflito e levariam a um aumento da aversão como sugerido por Deakin & Graeff (1991) (Figura 17).

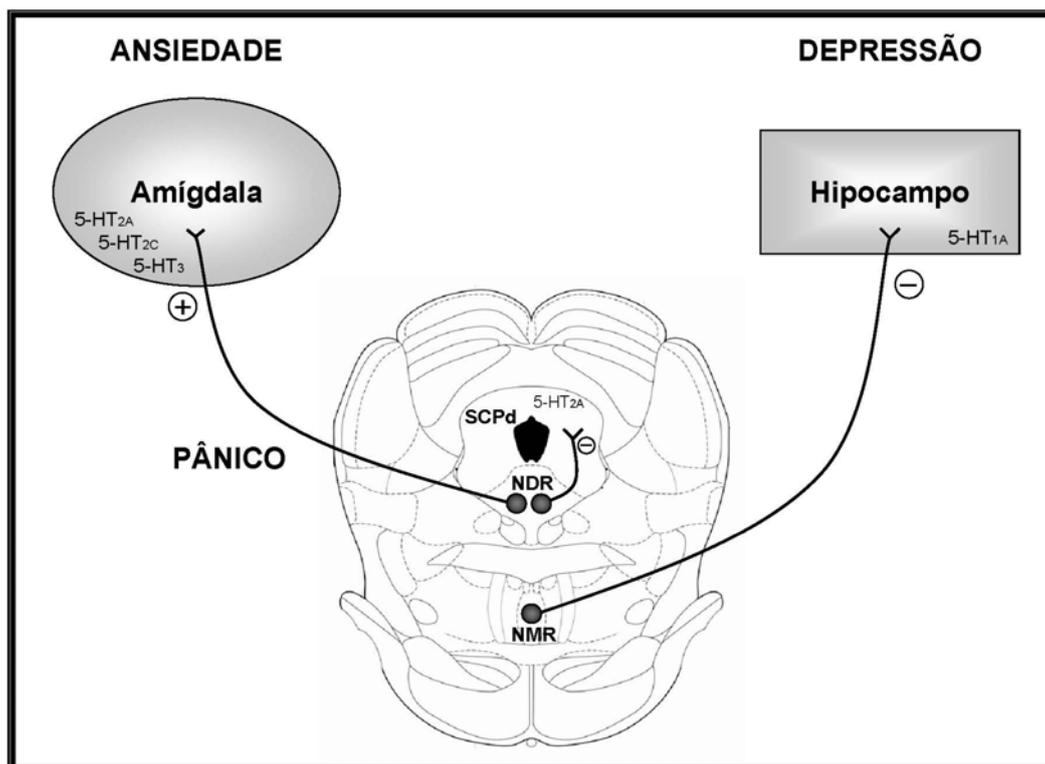


Figura 17. Representação esquemática do papel da serotonina na modulação do medo. Segundo o modelo proposto por Deakin & Graeff (1991), projeções do núcleo dorsal da rafe (NDR) para a amígdala parecem modular as respostas frente a eventos aversivos agudos e estariam relacionadas à ansiedade (receptores 5-HT<sub>2A/2C/3</sub>). Já as projeções do NDR para a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) inibem neurônios que comandam a fuga (receptores 5-HT<sub>2A</sub>) e este sistema neural estaria associado ao pânico. As projeções do núcleo mediano da rafe (NMR) para o hipocampo (receptores do tipo 5-HT<sub>1A</sub>) parecem modular respostas a eventos aversivos continuados, inibindo suas conseqüências comportamentais e facilitando a adaptação do animal.

Adicionalmente esses resultados corroboram a teoria de McNaughton & Corr (2004), que considera a amígdala e a SCPd participantes tanto do medo condicionado quanto do medo incondicionado. Segundo estes autores existe uma prevalência dos substratos neurais do medo condicionado nas áreas rostrais do encéfalo, enquanto que no medo incondicionado prevalecem as áreas mais caudais do encéfalo. Assim, a representação neural do medo condicionado e do medo incondicionado pode ser feita com duas pirâmides invertidas, colocadas lado a lado no encéfalo.

**CONCLUSÕES**

---

---

## CONCLUSÕES

- Existem pelo menos três tipos de congelamento:
  - 1) Congelamento associado ao medo contextual,
  - 2) Congelamento incondicionado induzido pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd,
  - 3) Congelamento pós-estimulação da SCPd que persiste após a interrupção de sua estimulação elétrica.
  
- Mecanismos gabaérgicos da amígdala regulam o congelamento contextual.
  
- Mecanismos serotoninérgicos da amígdala favorecem o medo condicionado contextual e não alteram o medo incondicionado induzido pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd.
  
- Mecanismos gabaérgicos e serotoninérgicos na amígdala regulam o congelamento pós-estimulação da SCPd sugerindo que embora seja uma resposta incondicionada mecanismos de memória de curta duração podem ser acionados durante este tipo de congelamento.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Adolphs, R.; Tranel, D.; Damásio, H.; Damásio, A. (1994). Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. *Nature*, 372(6507): 669-672.
- Adolphs, R.; Tranel, D.; Damásio, H.; Damásio, A.R. (1995). Fear and the human amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 15(9): 5879-5891.
- Aguilar, M.A.; Mari-Sanmillán; M.I.; Morant-Deusa, J.J.; Miñarro, J. (2000). Different inhibition of conditioned avoidance response by clozapine and DA D1 and D2 antagonists in male mice. *Behavioral Neuroscience*, 114(2): 389-400.
- Albert, D.J.; Madryga, F.J. (1980). An examination of the functionally effective spread of 4 microliters of slowly infused lidocaine. *Behavioral Neural Biology*, 29(3): 378-384.
- Amaral, D.G. (1986). Amygdalohippocampal and amygdalocortical projections in the primate brain. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 203: 3-17.
- Amaral, D.G.; Price, J. (1984). Amygdala-cortical projections in the monkey (*Macaca fascicularis*). *The Journal of Comparative Neurology*, 230(4): 465-496.
- Amat, J.A.; Matus-Amat, P.M.; Watkins, L.R.; Maier, S.F. (1998). Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-H in the basolateral amygdala of the rat. *Brain Research*, 812(1-2): 113-120.
- Antoniadis, E.A.; McDonald, R.J. (1999). Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. *Behavioural Brain Research*, 101(1): 1-13.
- Avanzi, V.; Brandão, M.L. (2001). Activation of somatodendritic 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors in the median raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. *Behavioural Brain Research*, 126(1-2): 175-184.
- Avanzi, V.; Castilho, V.M.; Andrade, T.G.C.S.; Brandão, M.L. (1998). Regulation of contextual by the median raphe nucleus. *Brain Research*, 790(1-2): 178-184.
- Avanzi, V.; Silva, R.C.; Macedo, C.E.; Brandão, M.L. (2003). 5-HT mechanisms of median raphe nucleus in the conditioned freezing caused by light/foot-shock association. *Physiology & Behavior*, 78(3): 471-477.
- Azmitia, E.C.; Segal, M. (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 179(3): 641-667.

- Barnes, J.M.; Barnes, N.M.; Costall, B.; Ironside, J.W.; Naylor, R.J. (1989). Identification and characterisation of 5-hydroxytryptamine 3 recognition sites in human brain tissue. *Journal of Neurochemistry*, 53(6): 1787-1793.
- Beck, C.H.M.; Fibiger, H.C. (1995). Chronic desipramine alters stress-induced behaviors and regional expression of the immediate early gene, c-fos. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 51(2-3): 331-338.
- Beckett, S.R.; Aspley, S.; Graham, M.; Marsden, C.A. (1997). Pharmacological manipulation of ultrasound induced defence behaviour in the rat. *Psychopharmacology (Berlin)*, 127(4): 384-390.
- Berton, F.; Vogel, E.; Belzung, C. (1998). Modulation of mice anxiety in response to cat odor as a consequence of predators diet. *Physiology & Behavior*, 65(2): 247-254.
- Beitz, A.J. (1982). The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience*, 7(1): 133-159.
- Blackburn, J.R.; Pfaus, J.G.; Phillips, A.G. (1992). Dopamine functions in appetitive and aversive defense behaviors. *Progress in Neurobiology*, 39(3): 247-279.
- Blanchard, R.J.; Blanchard, D.C. (1969). Crouching as an index of fear. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 67(3): 370-375.
- Blanchard, R.J.; Blanchard, D.C. (1972). Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 81(2): 281-290.
- Blanchard, R.J.; Blanchard, D.C. (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology*, 39: 43-68.
- Blanchard, R.J.; Blanchard, D.C. (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 103(1): 70-82.
- Blanchard, R.J.; Flannelly, K.J.; Blanchard, D.C. (1986). Defensive reactions of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *Journal of Comparative Physiological and Psychology*, 100(2): 101-107.
- Blanchard, R.J.; Yudko, E.B.; Rodgers, R.J.; Blanchard, D.C. (1993) Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioural Brain Research*, 58(1-2): 155-65.

- Blanchard, D.C.; Hynd, A.L.; Minke, K.A.; Minemoto, T.; Blanchard R.J. (2001) Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, 25(7-8): 761-70.
- Blier, P. (2001). Pharmacology of rapid-onset antidepressant treatment strategies. *Journal of Clinical Psychiatry*, 62(15): 12–17.
- Bolles, R.C.; Collier, A.C. (1976). The effect of predictive cues on freezing in rats. *Animal Learning Behavior*, 4(1A): 6-8.
- Bolles, R.C.; Fanselow, M.S. (1981). Perceptual defensive recuperative model of fear and pain. *Behavioural Brain Science*, 3: 291-301.
- Bonda, E.; Petrides, M.; Ostry, D.; Evans A. (1996). Specific involvement of human parietal systems and the amygdala in the perception of biological motion. *The Journal of Neuroscience*, 16(11): 3737-3744.
- Borelli, K.G.; Nobre, M.J.; Brandão, M.L.; Coimbra, N.C. (2004). 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(3): 557-566.
- Borelli, K.G.; Gargaro, A.C.; dos Santos, J.M.; Brandão, M.L. (2005). Effects of inactivation of serotonergic neurons of the median raphe nucleus on learning and performance of contextual fear conditioning. *Neuroscience Letter*, 387(2): 105-110.
- Boyer, W.F.; Feighner, J.P. (1992). An overview of paroxetine. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 53, suppl., 3–6.
- Brandão, M.L.; Aguiar, J.C.; Graeff, F.G. (1982). GABA mediation of the aversive action of the minor tranquilizers. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 16(3): 397-402.
- Brandão, M.L.; Tomaz, C.; Coimbra, N.C.; Bagri, A. (1988). Defense reaction induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus. *Physiology & Behaviour*, 44: 361-365.
- Brandão, M.L.; Cardoso, S.H.; Melo, L.L.; Motta, V.; Coimbra, N.C. (1994). Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 18(3): 339-346.

- Brandão, M.L.; Anseloni, V.Z.; Pandossio, J.E.; De Araujo, J.E.; Castilho, V.M. (1999). Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neuroscience Biobehavioural Reviews*, 23(6): 863-875.
- Brandão, M.L.; Borelli, K.G.; Nobre, M.J.; Santos, J.M.; Albrechet-Souza, L.; Oliveira, A.R.; Martinez, R.C. (2005). Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, 29(8):1299-1311.
- Caggiula, A.R.; Antelman, S.M.; Aul, E.; Knopf, S.; Edwards, D.J. (1989). Prior stress attenuates the analgesic response but sensitizes the corticosterone and cortical dopamine responses to stress 10 days later. *Psychopharmacology (Berlim)*, 99(2): 233-237.
- Cahill, L.; McGaugh, J.L. (1998). Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends in Neuroscience*, 21(7): 294-299.
- Cameron, A.A.; Khan, I.A.; Westlund, K.N.; Willis, W.D. (1995). The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. II. Descending projections. *The Journal of Comparative Neurology*, 351(4): 585-601.
- Campeau, S.; Davis, M. (1995). Involvement of the central nucleus and the basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 15(3 Pt 2): 2301-2311.
- Campeau, S.; Hayward, M.D.; Hope, B.T.; Rosen, J.B.; Nestler, E.J.; Davis, M. (1991). Induction of the c-fos proto-oncogene in rat amygdala during unconditioned and conditioned fear. *Brain Research*, 565(2): 349-352.
- Carrive, P. (2002). Cardiovascular and behavioural components of conditioned fear to context after ganglionic and  $\alpha$ -adrenergic blockade. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 98(1-2): 90-93.
- Carrive, P.; Lee, J.; Su, A. (2000). Lidocaine blockade of amygdala output in fear conditioned rats reduces Fos expression in the ventrolateral periaqueductal gray. *Neuroscience*, 95(4): 1071-1080.

- Carvalho, M.C.; Albrechet-Souza, L.; Masson, S.; Brandão, M.L. (2005). Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(12): 1857-1866.
- Castilho, V.M.; Brandão, M.L. (2001). 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(2): 154-162.
- Cattarelli, M.; Chanel, J. (1979). Influence of some biologically meaningful odorants on vigilance states of the rat. *Physiology & Behavior*, 23(5): 831-848.
- Ceulemans, D.L.; Hoppenbrouwers, M.L.; Gelders, Y.G.; Reyntjens, A.J. (1985) The influence of ritanserin, a serotonin antagonist, in anxiety disorders: a double-blind placebo-controlled study versus lorazepam. *Pharmacopsychiatry*, 18(5): 303-305.
- Clugnet, M.C.; LeDoux, J.E. (1990). Synaptic plasticity in fear conditioning circuits: induction of LTP in the lateral nucleus of the amygdala by stimulation of the medial geniculate body. *The Journal of Neuroscience*, 10(8): 2818-2824.
- Dalery, J.; Aubin, V. (2001). Comparative study of paroxetine and mianserin in depression in elderly patients: efficacy, tolerance, serotonin dependence, *Encephale*, 27(1): 71-81.
- Darwin, C. (1872). *The expression of emotion in men and animals*. Philosophical Library, New York (reprint 1985), pp. 134.
- Davis, M. (1992a). The role of the amygdala in conditioned fear. In J.P. Aggleton (Ed.) *The amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction*. New York: Wiley-Less, pp. 255-306.
- Davis, M. (1992b). The role of the amygdala in conditioned fear potentiated startle: implications for animal models of anxiety. *Trends in Pharmacological Science*, 13(1): 35-41.
- Davis, M. (1997). Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 9(3): 382-402.
- Davis, M.; Rainnie, D.; Cassell, M. (1994a). Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends in Neurosciences*, 17: 208-214.
- Davis M.; Hitchcock, J.M.; Bowers, M.B.; Berridge, C.W.; Melia, K.R.; Roth, R.H. (1994b). Stress-induced activation of prefrontal cortex dopamine turnover: blockade by lesions of the amygdala. *Brain Research*, 664(1-2): 207-210.

- Deakin, J.F.W.; Graeff, F.G. (1991). 5-HT and mechanisms of defense. *Psychopharmacology*, 5: 305-15.
- Deakin, J.F.; Simpson, M.D.; Slater, P.; Royston, M.C. (1992). Social signalling and schizophrenia: the significance of neurochemical and morphological abnormalities of the basolateral circuit. *Clinical Neuropharmacology*, 15(1): 495A-497A.
- Deakin, J.F.W.; Guimarães, F.S.; Graeff, F. G. (1994). Testing 5-HT theories of anxiety in normal volunteers. In: Palomo, T.; Archer, T. *Strategies for studying brain disorders. Depressive, anxiety and drug abuse disorders*. Madrid. Editorial Complutense, vol. 1, pp. 211-238.
- den Boer, J.A.; Westenberg, H.G. (1990). Behavioral, neuroendocrine, and biochemical effects of 5-hydroxytryptophan administration in panic disorder. *Psychiatry Research*, 31(3): 267-278.
- De Oca, B.M.; DeCola, J.P., Maren, S.; Fanselow, M.S. (1998). Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. *The Journal of Neuroscience*, 18(9): 3426-3432.
- De Oliveira, R.W.; Del Bel, E.A.; Guimarães, F.S. (2000). Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Brain Research Buletin*, 51(6): 457-464.
- Detke, M.J.; Wiltse, C.G.; Mallinckrodt, C.H.; McNamara, R.K.; Demitrack, M.A.; Bitter, I. (2004). Duloxetine in the acute and long-term treatment of major depressive disorder: a placebo- and paroxetine-controlled trial. *European Neuropsychopharmacology*, 14(6): 457-470.
- Dractu, L.; Lader, M. (1993). Ansiedade: conceito, classificação e biologia. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, 42: 19-32.
- Duncan, G.E.; Knapp, D.J.; Breese, G.R. (1996). Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Research*, 713(1-2): 79-91.
- Eriksson, E.; Humble, M. (1990). Serotonin in psychiatric pathophysiology: a review of data from experimental and clinical research. In: Pohl, R.; Gershon, S. (Eds.). *The Biological Basis of Psychiatric Treatment*. Prog. Basic Clin. Pharmacology, 3 Karger, Basel, pp.66-119.
- Fallon, J.H.; Ciofi, P. (1992). Distribution of monoamines within the amygdala. In: AGGLETON, J. P. (ed.) *The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction*. Wiley-Liss: New York, USA, pp.97-114.

- Fanselow, M.S. (1980). Conditional and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlovian Journal of Biological Science*, 15(4): 177-182.
- Fanselow, M.S. (1984). What is conditioned fear? *Trends in Neuroscience*, 7: 460-462.
- Fanselow, M.S. (1986). Associative vrs topographical accounts of the immediate shock freezing specific defensive reactions. *Learning and Motivation*, 17: 16-39.
- Fanselow, M.S. (1990). Factors governing one trial contextual conditioning. *Animal Learning Behavior*, 18: 64-270.
- Fanselow, M.S. (1994). Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychonomic Bulletin Reviews*, 1, 429-438.
- Fanselow, M.S.; Baackes, M.P. (1982). Conditioned fear-induced opiate analgesia on the formalin test: evidence for two aversive motivational systems. *Learning and Motivation*, 13(2): 200-221.
- Fanselow, M.S.; Bolles, R.C. (1979), Triggering of endorphin analgesia reaction by a cue previously associated with shock. Reversal by naloxone. *Bulletin of Psychology Society*, 14: 88-90.
- Fanselow, M.S.; LeDoux, J.E. (1999). Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala? *Neuron*, 23: 229-232.
- Fendt, M.; Fanselow, M.S. (1999). The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neuroscience Behavior Reviews*, 23(5): 743-760.
- Fernandez de Molina, A.; Hunsperger, R.W. (1959). Central representation of affective reaction in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis and adjacent structures, *Journal of Physiology*, 145(2): 251-265.
- Ferreira-Netto, F.; Borelli, K.G.; Brandão, M.L. (2005). Neural segregation of Fos-protein distribution in the brain following freezing and escape behaviors induced by injections of either glutamate or NMDA into the dorsal periaqueductal gray of rats. *Brain Research*, 1031(2): 151-163.
- File, S.E. (1992). Behavioural detection of anxiolytic action. In: Elliot, J.M.; Heal, D.J.; Mar4sden, C.A. (Orgs), *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. John Wiley. Sons Ltd. Chicester, pp. 25-44.
- Fuller, R.W. (1994). Uptake inhibitors increase extracellular serotonin concentration measured by brain microdialysis. *Life Science*, 55(3): 163-167.
- Funada, M.; Hara, C. (2001). Differential effects of psychological stress on activation of the 5-hydroxytryptamine- and dopamine-containing neurons in the brain of freely moving rats. *Brain Research*, 901(1-2): 247-251.

- Garcia, A.S.; Barrera, G.; Burke, T.F.; Ma, S.; Hensler, J.G.; Morilak, D.A. (2004). Autoreceptor-mediated inhibition of norepinephrine release in rat medial prefrontal cortex is maintained after chronic desipramine treatment. *Journal of Neurochemistry*, 91(3): 683-693.
- Geller, I. (1970). Effect of punishment on lever pressing maintained by food reward or brain stimulation. *Physiology & Behavior*, 5(2): 203-206.
- Geller, I.; Seifter, J. (1960). The effects of meprobamate, barbiturates, d-amphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat. *Psychopharmacology*, 1: 482-492.
- Gewirtz, C.J.; Davis, M. (2000). Using pavlovian Higher-Order conditioning paradigm to investigate the neural substrates of emotional learning and memory. *Learning & Memory*, 7: 257-266.
- Gloor, P.; Olivier, A.; Quesney, L.F.; Andermann, F.; Horowitz, S. (1982). The role of the limbic system in experiential phenomena of temporal lobe epilepsy. *Annual Neurology*, 12(2): 129-144.
- Goddard, G.V. (1964). Functions of the amygdala. *Psychological Bulletin*, 62: 89-109.
- Goldstein, B.J.; Goodnick, P.J. (1998). Selective serotonin reuptake inhibitors in the treatment of affective disorders—III. Tolerability, safety and pharmacoeconomics. *Journal of Psychopharmacology*, 12: S55–S87.
- Gorman, J.M.; Kent, J.M.; Sullivan, G.M.; Coplan, J.D. (2000). Neuroanatomical hypothesis of panic disorder, revised. *The American Journal of Psychiatry*, 157(4): 493-505.
- Graeff, F.G. (1981). Minor tranquilizers and brain defense systems. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 14(4-5): 239-265.
- Graeff, F.G. (1988). *Animal Models of aversion*. Animal Models Psychiatry Disorder. Karger, Basel, vol. 1, pp. 115-141.
- Graeff, F.G. (1990). Brain defense systems and anxiety. In M. Roth, G. D. Burrow; R. Noyes (Eds.), *Handbook of anxiety*. New York: Elsevier Science Publishers, vol 3, pp. 307-354.
- Graeff, F.G. (1993a). Ansiedade. In: GRAEFF, F.G. & BRANDÃO, M.L. *Neurobiologia das doenças mentais*. São Paulo: Lemos Editorial e Gráficos Ltda., 5º ed., pp. 109-144.
- Graeff, F.G. (1993b). Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. *Reviews in Neuroscience*, 4(2): 181-211.

- Graeff, F.G. (1994). Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27(4): 811-829.
- Graeff, F.G. (1997). Serotonergic systems. Em: *Neuropsychiatry of basal ganglia*, 20(4): 723-739.
- Graeff, F.G. (1999). Ansiedade. In: Graeff, F.G., Brandão, M.L. (Eds.). *Neurobiologia das Doenças Mentais*. 5a. Edição. São Paulo: Lemos, p. 135-178.
- Graeff, F.G. (2002). On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology (Berlin)*, 163(3-4): 467-476.
- Graeff, F.G. (2004). Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, 28(3): 239-259.
- Graeff, F.G., Brandão, M.L. (1999). *Neurobiologia das Doenças Mentais*. São Paulo. Lemos Editorial e Gráficos Ltda, 5ª edição.
- Graeff, F.G.; Guimarães, F.S. (1999). *Fundamentos da Psicofarmacologia*. Ed. Atheneu.
- Graeff, F.G.; Schoenfeld, R.I. (1970). Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*, 173(2): 277-283.
- Graeff, F.G.; Zangrossi, Jr. H. (2002). Animal models of anxiety. In: D'HAENEN, H. *et al.*, (Eds.), *Biological Psychiatry*. London: John Wiley ; Sons Ltda, pp. 1-14.
- Graeff, F.G.; Guimarães, F.S.; De Andrade, T.G.; Deakin, J.F. (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 54(1): 129-141.
- Graeff, F.G.; Viana, M.B.; Mora, P.O. (1997). Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21(6): 791-799.
- Gray, J.A. (1982). *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. Oxford University Press, New York, 1ª edição.
- Gray, J.A.; McNaughton, N. (2000). *The neuropsychology of anxiety*. Second Edition, New York, Oxford University Press.
- Griebel, G.; Moreau, J.L.; Jenck, F.; Misslin, R.; Martin, J.R. (1994). Acute and chronic treatment with 5-HT reuptake inhibitors differentially modulate emotional responses in anxiety models in rodents. *Psychopharmacology*, 113: 463-470.
- Griebel, G.; Blanchard, D.C.; Agnes, R.S.; Blanchard, R.J. (1995a). Differential modulation of antipredator defensive behavior in Swiss-Webster mice following acute or chronic administration of imipramine and fluoxetine. *Psychopharmacology*: 120: 57-66.

- Griebel, G.; Blanchard, D.C.; Jung, A.; Blanchard, R.J. (1995b). A model of 'antipredator' defense in Swiss-Webster mice: effects of benzodiazepine receptor ligands with different intrinsic activities. *Behavioral Pharmacology*, 6(7): 732-745.
- Guimarães, F.S.; Mbaya, P.S.; Deakin, J.F. (1997). Ritanserin facilitates anxiety in a simulated public-speaking paradigm. *Journal of Psychopharmacology*, 11(3): 225-231.
- Hamann, S.B.; Cahill, L.; McGaugh, J.L.; Squire, L.R. (1997). Intact enhancement of declarative memory for emotional material in amnesia. *Learning & Memory*, 4(3): 301-309.
- Handley, S.L.; McBlane, J.W. (1993). Serotonin mechanisms in animal models of anxiety. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26(1): 1-13.
- Hashimoto, S.; Inoue, T.; Koyama, T. (1996). Serotonin reuptake inhibitors reduce conditioned fear stress-induced freezing behavior in rats. *Psychopharmacology (Berlin)*, 123(2): 182-186.
- Hashimoto, S.; Inoue, T.; Koyama, T. (1999). Effects of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats. *European Journal of Pharmacology*, 378(1): 23-30.
- Helmstetter, F.J.; Bellgowan, P.S. (1994). Effects of muscimol applied to the basolateral amygdala on acquisition and expression of contextual fear conditioning in rats. *Behavioral Neuroscience*, 108(5): 1005-1009.
- Hensman, R.; Guimarães, F.S.; Wang, M.; Deakin, J.F. (1991). Effects of ritanserin on aversive classical conditioning in humans. *Psychopharmacology (Berlin)*, 104(2): 220-224.
- Herdade, K.C.; de Andrade Strauss, C.V.; Junior, H.Z.; de Barros Viana, M. (2006). Effects of medial amygdala inactivation on a panic-related behavior. *Behavioral Brain Research*, Jun 24; [aguardando publicação].
- Hess, W.; Brugger, M. (1943). Das subkortikales zentrum der affektiven abwereaktion, *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 1: 33-52, apud Fernandez de Molina, A.; Hunsperger, R.W. (1959). Central representation of affective reaction in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis and adjacent structures, *Journal of Physiology*, 145: 251-265.
- Hikosaka, O.; Wurtz, R.H. (1985a). Modification of saccadic eye movements by GABA-related substances. II. Effects of muscimol in monkey substantia nigra pars reticulata. *Journal of Neurophysiology*, 53(1): 292-308.

- Hikosaka, O.; Wurtz, R.H. (1985b). Modification of saccadic eye movements by GABA-related substances. I. Effect of muscimol and bicuculline in monkey superior colliculus. *Journal of Neurophysiology*, 53(1): 266-291.
- Hitchcock, J.M.; Davis, M. (1986). Lesions of the amygdala, but not of the cerebellum or red nucleus, block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. *Behavioural Neuroscience*, 100(1): 11-22.
- Hitchcock, J.M.; Davis, M. (1987). Fear potentiated startle using an auditory conditioned stimulus: effects of lesions of the amygdala. *Physiology & Behavior*, 39(3): 403-408.
- Hodges, H.; Green, S.; Glenn, B. (1987). Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. *Psychopharmacology (Berlin)*, 92(4): 491-504.
- Hofer, M.A. (1970). Cardiac and respiratory function during sudden prolonged immobility in wild rodents. *Psychosomatic Medicine*, 32(6): 633-647.
- Holahan, M.R.; White, N.M. (2002). Conditioned memory modulation, freezing, and avoidance as measures of amygdala mediated conditioned fear. *Neurobiology of Learning and Memory*, 77(2): 250-275.
- Hopkins, D.A.; Holstege, G. (1978). Amygdaloid projections to the mesencephalon, pons and medulla oblongata in the cat. *Experimental Brain Research*, 32(4): 529-547.
- Humphrey, P.P.A.; Hartig, P.; Hoyer, D. (1993). A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *Trends in Pharmacology Science*, 14(6): 233-236.
- Inglis, F.M.; Moghaddam, B. (1999). Dopaminergic innervation of the amygdala is highly responsive to stress. *Journal of Neurochemistry*, 72(3):1088-1094.
- Inoue, T.; Li, X.B.; Abekawa, T.; Kitaichi, Y.; Izumi, T.; Nakagawa, S. (2004). Selective serotonin reuptake inhibitor reduces conditioned fear through its effect in the amygdala. *European Journal of Pharmacology*, 497: 311-316.
- Irwin, J.; Ahluwalia, P.; Zacharko, R.M.; Anisman, H. (1986). Central norepinephrine and plasma corticosterone following acute and chronic stressors: influence of social isolation and handling. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24(4): 1151-1154.
- Iwata, J.; LeDoux, J.E.; Meeley, M.P.; Arneric, S.; Reis, D.J. (1986). Intrinsic neurons in the amygdaloid field projected to by the medial geniculate body mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. *Brain Research*, 383(1-2): 195-214.
- Jenck, F.; Broekkamp, C.L.; Van Delft, A.M. (1990). 5-HT<sub>1C</sub> receptors in the serotonergic control of periaqueductal gray induced aversion in rats. *Psychopharmacology (Berlin)*, 100(3): 372-376.

- Jones, E.G.; Powell, T.P. (1970). An anatomical study of converging sensory pathways within the cerebral cortex of the monkey. *Brain*, 93(4): 793-820.
- Kent, J.M.; Coplan, J.D.; Gorman, J.M. (1998). Clinical utility of the selective serotonin reuptake inhibitors in the spectrum of anxiety. *Biological Psychiatry*, 44(9): 812-824.
- Killcross, S.; Robbins, T.W.; Everitt, B.J. (1997). Different types of fear-conditioned behaviour mediate by separate nuclei within amygdala. *Nature*, 338(6640): 377-380.
- Kim, J.J.; Rison, R.A.; Fanselow, M.S. (1993). Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short and long term contextual fear. *Behavior Neuroscience*, 107(6): 1093-1098.
- Kiser, R.S.; Lebovitz, R.M. (1975). Monoaminergic mechanisms in aversive brain stimulation. *Physiology & Behavior*, 15(1): 47-53.
- Kiser, R.S.; Lebovitz, R.M.; German, D.C. (1978). Anatomic and pharmacologic differences between two types of aversive midbrain stimulation. *Brain Research*, 155(2): 331-342.
- Kiser, R.S.; Brown, C.A.; Sanghera, M.K.; German, D.C. (1980). Dorsal raphe nucleus stimulation reduces centrally-elicited fearlike behavior. *Brain Research*, 191(1): 265-272.
- Klingler, J.; Gloor, P. (1960). The connections of the amygdala and of the anterior temporal cortex in the human brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 115: 333-369.
- Knudsen, E.I.; Knudsen, P.F.; Masino, T. (1993). Parallel pathways mediating both sound localization and gaze control in the forebrain and midbrain of the barn owl. *The Journal of Neuroscience*, 13(7): 2837-2852.
- Krupa, D.J.; Thompson, J.K.; Thompson, R.F. (1993). Localization of a memory trace in the mammalian brain. *Science*, 260(5110): 989-991.
- Ladeira-Fernandez, J. (1996). Context and Pavlovian conditioning. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29(2): 149-173.
- LeDoux, J.E. (1994). Emotion, memory and the brain. *Scientific American*, 270(6): 50-59.
- LeDoux, J.E. (1995). Emotion: clues from the brain. *Annual Review Psychology*, 46: 209-235.
- LeDoux, J.E. (2000). Emotions circuits in the brain. *Annual review of neuroscience*, 23: 155-184.
- LeDoux, J.E.; Iwata, J.; Cicchetti, P.; Reis, D.J. (1988). Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *The Journal of Neuroscience*, 8(7): 2517-2519.

- LeDoux, J.E.; Cicchhetti, P.; Xagoraris, A.; Romanski, L.M. (1990a). The lateral amygdaloid nucleus sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 10(4): 1043-1054.
- LeDoux, J.E.; Farb, C.; Ruggiero, D.A. (1990b). Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 10(4): 1043-1054.
- Lister, R.G. (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 46(3): 321-340.
- Ma, Q.P.; Yin, G.F.; Ai, M.K.; Han, J.S. (1991). Serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the amygdala in the rat. *Neuroscience Letter*, 134(1): 21-24.
- Macedo, C.E.; Castilho, V.M.; Brandão, M.L.; (2002). Dual 5-HT mechanisms in basolateral and central nuclei of amygdala in the regulation of the defensive behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Research Bulletin*, 59(3): 189-195.
- Macedo, C.E.; Martinez, R.C.; Brandão, M.L. (2006). Conditioned and unconditioned fear organized in the inferior colliculus are differentially sensitive to injections of muscimol into the basolateral nucleus of the amygdala. *Behavioral Neuroscience*, 120(3): 625-631.
- Macedo, C.E.; Martinez, R.C.; Albrecht-Souza, L.; Brandão, M.L. (submetido). 5-HT<sub>2</sub>- and D<sub>1</sub>- mechanisms of the basolateral nucleus of the amygdala enhance conditioned and impair unconditioned fear. *Neurobiology of Learning and Memory*.
- Magierek, V.; Ramos, P.L.; Silveira-Filho, N.G.; Nogueira, R.L.; Landeira-Fernandez, J. (2003). Context fear conditioning inhibits panic-like behavior elicited by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray. *NeuroReport*, 14(12): 1641-1644.
- Maisonnette, S.S.; Kawasaki, M.C.; Coimbra, N.C.; Brandão, M.L. (1996). Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Research Bulletin*, 40(2): 93-98.
- Maisonnette, S.; Villela, C.; Carotti, A.P.; Landeira-Fernandez, J. (2000). Microinfusion of nefazodone into the nucleus of the amygdala enhances defensive behavior induced by NMDA stimulation of the inferior colliculus. *Physiology & Behavior*, 70(3-4): 243-247.

- Maren, S. (1999). Neurotoxic or eletrolytic lesions of the ventral subiculum produce deficits in the acquisition and expression of pavlovian fear conditioning in rats. *Behavioral Neuroscience*, 113(2): 283-290.
- Maren, S.; Fanselow, M.S. (1996). The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? *Neuron*, 16(2): 237-240.
- Maren, S.; Fanselow, M.S. (1997). Eletrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal hippocampus, or entorhinal cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. *Neurobiology Learning Memory*, 67(2): 142-149.
- Martin, J.H. (1991). Autoradiographic estimation of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. *Neuroscience Letters*, 127(2): 160-164.
- Martin, G.R.; Humphrey, P.P.A. (1994). Receptors for 5-hydroxytryptamine: current perspectives on classification and nomenclature. *Neuropharmacology*, 33(3/4): 261-273.
- Matto, V.; Allikmets, L. (1999). Acute and chronic citalopram treatment differently modulates rat exploratory behavior in the exploration box test: No evidence for increased anxiety or changes in the [3H]raclopride binding. *Pharmacology*, 58: 59–69.
- McAllister, W.R.; McAllister, D.E. (1995). Two factor theory: Implications for understanding anxiety-based clinical phenomena. In W.T. O'Donohue ; L. Krasner (Eds.), *Theories of behavior therapy: Exploring behavior change*. Washington, DC: American Psychology Association, p.145-171.
- McDonald, A.J. (1991). Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. *Neuroscience*, 44(1): 15-33.
- McNaughton, N.; Corr, P.J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28(3): 285-305.
- McNish, K.A.; Gewirtz, J.C.; Davis, M. (1997). Evidence of contextual fear after lesions of hippocampus: A disruption of freezing but not fear-potentiated startle. *The Journal of Neuroscience*, 17(23): 9353-9360.

- Mesulam, M.M.; Van Hoesen, G.W.; Pandya, D.N.; Geschwind, N. (1977). Limbic and sensory connections of the inferior parietal lobule (area PG) in the rhesus monkey: a study with a new method for horseradish peroxidase histochemistry. *Brain Research*, 136(3): 393-414.
- Miserendino, M.J.; Sananes, C.B.; Melia, K.R.; Davis, M. (1990). Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature*, 345(6277): 716-718.
- Morilak, D.A.; Garlow, S.J.; Ciaranello, R.D. (1993). Immunocytochemical localization and description of neurons expressing serotonin<sub>2</sub> receptors in the rat brain. *Neuroscience*, 54(3): 701-717.
- Muller, J.; Corodimas, K.P.; Fridel, Z.; LeDoux, J.E. (1997). Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli. *Behavioral Neuroscience*, 111(4): 683-691.
- Muraki, I.; Inoue, T.; Hashimoto, S.; Izumi, T.; Ito, K.; Ohmori, T.; Koyama T. (1999). Effect of subchronic lithium carbonate treatment on anxiolytic-like effect of citalopram and MKC-242 in conditioned fear stress in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 383(3): 223-229.
- Myers, R.D. (1974). Handbook of drug and chemical stimulation of the brain: Behavioral, pharmacological and physiological aspects (pp.59-63). New York. Van Nostrand Reinhold. Apud: Muller, J., Corodimas, K.P., Fridel, Z.; LeDoux, J.E. (1997). Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli. *Behavioral Neuroscience*, 111(4): 683-691.
- Nader, K.; Majidishad, P.; Amorapanth, P.; LeDoux, J.E. (2000). Damage to the lateral and central, but not other, amygdaloid nuclei prevents the acquisition of auditory fear conditioning. *Learning & Memory*, 8: 156-163.
- Nardi, A.E. (2001). Antidepressants in social anxiety disorder. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 59(3A): 637-642.
- Nobre, M.J.; Lopes, M.G.; Brandão, M.L. (2004). Defense reaction mediated by NMDA mechanisms in the inferior colliculus is modulated by GABAergic nigro-collicular pathways. *Brain Research*, 999(1): 124-31.

- Nogueira, R.L.; Graeff, F.G. (1995). Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 52(1): 1-6.
- Nutt, D.J. (1990). The pharmacology of human anxiety. *Pharmacology & Therapeutics*, 47(2): 233-266.
- Oliveira, L.C.; Nobre, M.J.; Brandão, M.L.; Landeira-Fernandez, J. (2004). Role of amygdala in conditioned and unconditioned fear generated in the periaqueductal gray. *NeuroReport*, 15(14): 2281-2285.
- Ohuoha, D.C.; Hyde, T.M.; Kleinman, J.E. (1993). The role of serotonin in schizophrenia: an overview of the nomenclature, distribution and alterations of serotonin receptors in the central nervous system. *Psychopharmacology (Berlin)*, 112(1 Suppl): S5-15.
- Ottersen, O.P. (1981). Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat with some observations in the cat. III. Afferents from the lower brain stem. *The Journal of Comparative Neurology*, 202(3): 335-356.
- Panksepp, J. (1982). Toward a general psychobiology theory of emotions. *Behavioral Brain Science*, 5: 407-467.
- Panksepp, J. (1990). The psychoneurology of fear: evolutionary perspectives and the role of animals models in understanding human anxiety. In: *Handbook of Anxiety, The Neurobiology of Anxiety*. G. D. Burrows, M. Roth ; R. Jr Noyes (Eds.) Amsterdam: Elsevier Science Publishers, vol. 3, 3-58.
- Pasini, A.; Tortorella, A.; Gale, K. (1996). The anticonvulsant action of fluoxetine in substantia nigra is dependent upon endogenous serotonin. *Brain Research*, 724(1): 84-88.
- Paxinos, G.; Watson, C. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates - The new coronal set*. Elsevier. New York: Academic Press, 5ª edição.
- Pazos, A.; Palacios, J.M. (1985). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Research*, 346(2): 205-230.
- Pazos, A.; Cortes, R.; Palacios, J.M. (1985). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Research*, 346(2): 231-249.
- Pellow, S.; Chopin, P.; File, S.E.; Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3): 149-167.

- Phillips, R.G.; LeDoux, J.E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cues and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, *106*(2): 274-285.
- Pompeiano, M.; Palácios, J.M.; Mengod, G. (1994). Distribution of the serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor family mRNAs: comparison between 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Molecular Brain Research*, *23*(1-2): 163-178.
- Porsolt, R. D.; Le Pichon, M.; Jalfre, M. (1977). Depression: a new model sensitive to antidepressant treatment. *Nature*, *266*(5604): 730-732.
- Rabasseda, X. (2004). Duloxetine: A new serotonin/noradrenaline reuptake inhibitor for the treatment of depression. *Drugs Today*: *40*(9): 773-790.
- Rainnie, D.G. (1999). Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. *Journal of Neurophysiology*, *82*(1): 69-85.
- Rescorla, R.A. (1988). Behavioral studies of pavlovian conditioning. *Annual Review of Neuroscience*, *11*: 329-352.
- Ressler, K.J.; Nemeroff, C.B. (2001). Role of norepinephrine in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders. *CNS Spectrums*, *6*(8): 663-670.
- Rizvi, T.A.; Ennis, M.; Behbehani, M.M.; Shipley, M.T. (1991). Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. *The Journal of Comparative Neurology*, *303*(1): 121-131.
- Robichaud, R.C.; Sledge, K.L. (1969). The effects of p-chlorophenylalanine on experimentally induced conflict in the rat. *Life Science*, *8*(17): 181-188.
- Rogan, M.T.; LeDoux, J.E. (1996). Emotion: systems, cells, synaptic plasticity. *Cell*, *85*(4): 469-475.
- Rosen, J.B. (2004). The neurobiology of conditioned and unconditioned fear: a neurobehavioral system analysis of the amygdala. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*, *3*(1): 23-41.
- Rosenkranz, J.A.; Grace, A.A. (2001). Dopamine attenuates prefrontal cortical expression of sensory inputs to the basolateral amygdala of rats. *The Journal of Neuroscience*, *21*(11): 4090-4103.
- Rudy, J.W.; Sutherland, R.J. (1989). The hippocampal formation is necessary for rats to learn and remember configural discriminations. *Behavioral Brain Research*, *34*(1-2): 97-109.
- Rueter, L.E.; Jacobs, B.L.A. (1996). A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioural/environmental manipulations. *Brain Research*, *739*(1-2): 57-69.

- Russo, A.S.; Guimarães, F.S.; De Aguiar, J.C.; Graeff, F.G. (1993). Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal gray of rats in anxiety. *Psychopharmacology (Berlin)*, 110(1-2): 198-202.
- Sadikot, A.F.; Parent, A. (1990). The monoaminergic innervation of the amygdala in the squirrel monkey: an immunohistochemical study. *Neuroscience*, 36(2): 431-447.
- Sah, P.; Faber, E.S.; Lopez, De Armentia, M.; Power, J. (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiology Review*, 83(3): 803-834.
- Sakaguchi, A.; LeDoux, J.E.; Reis, D.J. (1983). Sympathetic nerves and adrenal medulla contributions to cardiovascular conditioned emotional responses in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 5(7): 728-738.
- Salamone, J.D. (1994). The involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation. *Behavioural Brain Research*, 61(2): 117-133.
- Sanchez, C.; Meier, E. (1997). Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. Are they all alike? *Psychopharmacology*, 129: 197-205.
- Sandford, J.J.; Argyropoulos, S.V.; Nutt, D.J. (2000). The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: basic neurobiology. *Pharmacology & Therapeutics*, 88(3): 197-212.
- Sandner, G.; Oberling, P.; Silveira, M.C.; Di Scala, G.; Rocha, B.; Bagri, A.; Depoortere, R. (1993). What brain structures are active during emotions? Effects of brain stimulation elicited aversion on c-fos immunoreactivity and behavior. *Behavioural Brain Research*, 58(1-2): 9-18.
- Santos, J.M.; Gárgaro, A.C.; Oliveira, A.R.; Masson, S.; Brandão, M.L. (2005). Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing behavior and fear-potentiated startle. *The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 15(2): 239-246.
- Santos, J.M.; Martinez, R.C.R.; Brandão, M.L. (2006). Effects of acute and subchronic treatments with fluoxetine and desipramine on the memory of fear in moderate and high intensity contextual conditioning. *European Journal of Pharmacology*, 542(1-3): 121-128.
- Savonenko, A.; Filipkowski, R.K.; Werka, T.; Zielinski, K.; Kaczmarek, L. (1999). Defensive conditioning-related functional heterogeneity among nuclei of the rat amygdala revealed by c-Fos mapping. *Neuroscience*, 94(3): 723-733.
- Schenberg, L.C.; Graeff, F.G. (1978). Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 9(3): 287-295.

- Schenberg, L.C.; Marçal, L.P.A.; Seeberger, F.; Barros, M.R.; Sudré, E.C.M. (2000). L-type calcium channels selectively control the defensive behaviors induced by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray and overlying collicular layers. *Neuroscience Biobehavioral Review*, 111(1-2): 175-185.
- Schmitt, P.; Di Scala, G.; Brandão, M.L.; Karli, P. (1984). Periventricular structures, elaboration of aversive effects and processing of sensory information. In: Blander, R., (Ed). *Modulation of Sensorimotor Activity during Alterations in Behavioral States*. Alan R. Liss, New York, 1984, pp. 393-414.
- Schmitt, P.; Di Scala, G.; Brandão, M.L.; Karli, P. (1985). Behavioral effects of microinjections of SR 95103, a new GABA-A antagonist, into the medial hypothalamus on the mesencephalic central gray. *European Journal of Pharmacology*, 117(2): 149-158.
- Schutz, M.T.; de Aguiar, J.C.; Graeff, F.G. (1985). Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. *Psychopharmacology (Berlin)*, 85(3): 340-345.
- Silva, R.C.B.; Brandão, M.L. (2000). Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 65: 209-216.
- Silva, R.C.; Gargaro, A.C.; Brandão, M.L. (2004). Differential regulation of the expression of contextual freezing and fear-potentiated startle by 5-HT mechanisms of the median raphe nucleus. *Behavioral Brain Research*, 151(1-2): 93-101.
- Silveira, M.C.; Zangrossi, H.; de Barros Viana, M.; Silveira, R.; Graeff, F.G. (2001). Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. *Behavioral Brain Research*, 126(1-2): 13-21.
- Small, W. (1899). Notes on the psychic development of young white rats. *American Journal of Psychology*, 11: 80-100.
- Sonawalla, S.B.; Farabaugh, A.; Johnson, M.W.; Morray, M.; Delgado, M.L.; Pingol, M. (2002). Fluoxetine treatment of depressed patients with comorbid anxiety disorders. *Journal of Psychopharmacology*, 16(3): 215-219.
- Stein, L.; Wise, C.D.; Berger, B.D. (1973). Antianxiety action of Benzodiazepines: decrease in activity of serotonin neurons in the punishment system. In: Garattini, S., Mussin, E., Randal, L.O. (Eds.). *Benzodiazepines*. Raven Press, New York, pp. 299-326.

- Stiedl, O.; Misane, I.; Spiess, J.; Ogren, S.O. (2000). Involvement of the 5-HT<sub>1A</sub> receptors in classical fear conditioning in C57BL/6J mice. *Journal of Neuroscience*, 20: 8515–8527.
- Strauss, C.V.A. (2006). *Efeitos da ativação de receptores serotoninérgicos dos tipos 5-HT<sub>1a</sub> e 5-HT<sub>2a/2c</sub> do complexo amigdalóide sobre a modulação de respostas defensivas associadas à ansiedade e ao pânico*. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP Ribeirão Preto.
- Stutzmann, G.E.; LeDoux, J.E. (1999). GABAergic antagonists block the inhibitory effects of serotonin in the lateral amygdala: a mechanism for modulation of sensory inputs related to fear conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 19(11): RC8.
- Sugita, S.; Shen, K.Z.; North, R.A. (1992). 5-hydroxytryptamine is a fast excitatory transmitter at 5-HT<sub>3</sub> receptors in rat amygdala. *Neuron*, 8(1): 199-203.
- Sutherland, R.J.; McDonald, R.J. (1990). Hippocampus, amygdala, and memory deficits in rats. *Behavioral Brain Research*, 37(1): 57-79.
- Tye, N.C.; Sahgal, A.; Iversen, S.D. (1977). Benzodiazepines and discrimination behaviour: dissociation of response and sensory factors. *Psychopharmacology (Berlin)*, 52(2): 191-194.
- Treit, D. (1985). Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 9(2): 203-222.
- Van Praag, H.M.; Asnis, G.M.; Kahn, R.S.; Brown, S.L.; Korn, M.; Friedman, J.M.; Wetzler, S. (1990). Nosological tunnel vision in biological psychiatry. A plea for a functional psychopathology. *Annals of New York Academic Science*, 600: 501-510.
- Varnas, K.; Hall, H.; Bonaventure, P.; Sedvall, G. (2001). Autoradiographic mapping of 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors in the post mortem human brain using [(3)H]GR 125743. *Brain Research*, 915(1):47-57.
- Vazdarjanova, A.; Cahill, L.; McGaugh, J.L. (2001). Disrupting basolateral amygdala function impairs unconditioned freezing and avoidance in rats. *European Journal of Neuroscience*, 14(4): 709-718.
- Venton, B.J.; Robinson, T.E.; Kennedy, R.T.; Maren, S. (2006). Dynamic amino acid increases in the basolateral amygdala during acquisition and expression of conditioned fear. *European Journal of Neuroscience*, 23(12): 3391-3398.
- Vertes, R.P. (1991). A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 313(4): 643-668.

- Vertes, R.P.; Fortin, W.J.; Crane, A.M. (1999). Projections of the median raphe nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 407(4): 555-582.
- Vianna, D.M.L.; Brandão, M.L. (2003). Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(5): 557-566.
- Viana, M.B.; Graeff, F.G.; Loschmann, P.A. (1997). Kainate microinjection into the dorsal raphe nucleus induces 5-HT release in the amygdala and periaqueductal gray. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 58(1): 167-172.
- Vianna, D.M.L.; Graeff, F. G.; Landeira-Fernandez, J.; Brandão, M.L. (2001a). 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(3): 164-169.
- Vianna, D.M.L.; Graeff, F.G.; Brandão, M.L.; Landeira-Fernandez, J. (2001b). Defensive behavior evoked by electrical stimulation of the periaqueductal gray: comparison between dorsolateral and ventrolateral region. *NeuroReport*, 12(18): 4109-4113.
- Vianna, D.M.L.; Borelli, K.G.; Ferreira-Netto, C.; Macedo, C.E.; Brandão, M.L. (2003). Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. *Brain Research Bulletin*, 62(3): 179-189.
- Vogel, J.R.; Beer, B.; Clody, D.E. (1971). A simple and reliable conflict of procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacology*, 21(1): 1-7.
- Young, A.M.J.; Ress, K.R. (1998). Dopamine release in the amygdaloid complex of the rat, studied by brain microdialysis. *Neuroscience Letter*, 249(1): 49-52.
- Walker, P.; Carrive, P. (2003). Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and post stress recovery. *Neuroscience*, 116(3): 897-912.
- Wallace, K.J.; Rosen, J.B. (2001). Neurotoxic lesions of the lateral nucleus of the amygdala decrease conditioned fear of a predator odor: Comparison with electrolytic lesions. *The Journal of Neuroscience*, 21(10): 3619-3627.
- Weiss, G.; Steinetz, B.G.; Dierschke, D.J.; Fritz, G. (1981). Relaxin secretion in the rhesus monkey. *Biology of Reproduction*, 24(3): 565-567.
- Winocur, G.; Olds, J. (1978). Effects of context manipulation on memory and reversal learning in rats with hippocampal lesions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 92(2): 312-321.

- Winocur, G.; Rawlins, J.N.P.; Gray, J.A. (1987). The hippocampus and conditioning to contextual cues. *Behavioral Neuroscience*, *101*(5): 617-625.
- Wise, C.D.; Berger, B.D.; Stein, L. (1972). Benzodiazepines: anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. *Science*, *177*(44):180-183.
- Wong, D.T.; Bymaster, F.P.; Engleman, EA. (1995). Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Science*, *57*: 411-441.
- Zangrossi, H.Jr.; Viana, M.B.; Graeff, F.G. (1999). Anxiolytic effect of intra-amygdala injection of midazolam and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in the elevated T-maze. *European Journal of Pharmacology*, *369*(3): 267-270.



# 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](#)