

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

Alberto Ferreira Donatti

“Interação do sistema serotoninérgico e gabaérgico do núcleo
basolateral da amígdala na modulação da resposta defensiva
de imobilidade tônica em cobaias”

Orientadora: Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Dissertação de mestrado apresentada
junto ao Departamento de Psicologia,
da Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área:
Psicobiologia.

Ribeirão Preto

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Alberto Ferreira Donatti

“Interação do sistema serotoninérgico e gabaérgico do núcleo basolateral da amígdala na modulação da resposta defensiva de imobilidade tônica em cobaias”

Dissertação de mestrado apresentada junto ao Departamento de Psicologia, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área: Psicobiologia.

Ribeirão Preto

2008

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Donatti, Alberto Ferreira.

Interação do sistema serotoninérgico e gabaérgico do núcleo basolateral da amígdala na modulação da resposta defensiva de imobilidade tônica em cobaias / Alberto Ferreira Donatti; orientadora Christie Ramos Andrade Leite Panissi. –Ribeirão Preto, 2008.

64 f.: fig.

Tese (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia. Área de Concentração: Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Comportamento defensivo. 2. Imobilidade Tônica. 3. Núcleo Basolateral da Amígdala. 4. Sistema GABAérgico e Serotoninérgico.

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente essa conquista a Deus, que é autor dessa vitória, que me abençoou com o dom da sabedoria e me deu força em todos os momentos da minha vida.

A minha amada esposa Sabrina Maria Saueia Ferreira, com muito amor e imensa gratidão, por sua presença e companheirismo.

A minha querida mãe, Maria Luiza de Olival Breda Ferreira, que me inspirou com sua grande determinação e perseverança em buscar sempre o melhor e por estar ao meu lado em todas as situações da minha vida, demonstrando amor e confiança.

A atenciosa Prof. Christie Ramos Andrade Leite Panissi, que soube conduzir meus passos com sua imensa sabedoria e paciência.

As famílias Saueia e Ferreira, que mesmo apesar da distância, estiveram sempre presente através de carinhos e orações.

AGRADECIMENTO

Aos colegas de laboratório Ana Paula, Amanda, Eveline, Débora, Priscila e Bruno, pelo companheirismo e carinho nesta jornada.

A Aline Aparecida Ferrarese, grande profissional que soube me ensinar as técnicas de laboratório necessárias para o desenvolvimento desse projeto.

A Prof. Dr^a Maria José Alves da Rocha, pelo grande carinho em me acolher em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. José Lino Bueno, por dedicar seu tempo, paciência e seu imenso conhecimento para o crescimento desse projeto.

Aos amigos que conquistei ao longo dessa jornada da minha vida: Tiago, Gabi, Marcelo, Roberta, Valéria, Carol, Talita, Fábio, Sr^a Célia, Gabriela (Majô) e Maicon.

A Renata B. Vicentini, secretária do programa de Pós-Graduação em Psicobiologia da FFCLRP-USP, com sua grande colaboração.

Ao Prof. Dr. Marcus Lira Brandão e ao programa de Pós-Graduação da Psicobiologia, que colaborou do início ao fim desse projeto.

Aos funcionários do Biotério I da FORP, Sr. Antônio Sérgio Ap. Mesca e Sr. Antônio Massaro, pelo excelente profissionalismo e competência para com o tratamento dos animais.

A CAPES, PROEX e FAPESP, pelo apoio financeiro.

Aprende com teus erros, tenha humildade, reconheça o valor das pessoas, seja honesto e creia em Deus. Provavelmente você será feliz agora... "
(Fernando Toscano).

ÍNDICE

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	10
1) Comportamento Defensivo.....	10
2) Imobilidade Tônica	12
3) Amígdala	15
3.1) Aspectos anatômicos.....	15
3.2) Núcleo basolateral da amígdala.....	17
3.3) Conexões amigdalóides.....	20
4) Neuroquímica	21
4.1) Aspectos gerais dos receptores GABAérgicos	21
4.2) Aspectos gerais dos receptores serotoninérgicos	22
4.3) Farmacologia dos receptores GABAérgicos e serotoninérgicos no complexo amigdalóide.....	24
OBJETIVO	29
MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
1) Animais	29
2) Procedimento cirúrgico.....	30
3) Registro da Imobilidade Tônica.....	31
4) Teste de campo aberto	31
5) Cânula guia e microinjeção	32
6) Drogas utilizadas.....	32
7) Grupos Experimentais	33
8) Histologia.....	34
9) Análise estatística.....	34
RESULTADOS.....	35
DISCUSSÃO	42
CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
APÊNDICES	72

RESUMO

Dentre as respostas comportamentais defensivas emitidas em um confronto entre presa-predador, a resposta comportamental de imobilidade tônica (IT) é associada com situações de perigo intenso e inescapável, sendo considerada como último recurso para a manutenção da sobrevivência do animal. Com relação ao substrato neural responsável pela modulação deste comportamento, estudos anteriores demonstraram o envolvimento de várias áreas encefálicas, entre elas do complexo amigdalóide. Recentemente, foi reportado que o sistema serotoninérgico do núcleo basolateral da amígdala (BLA) pode reduzir a duração da IT em cobaias, por meio da ativação de receptores 5-HT_{1A} ou 5-HT₂. Considerando que estes dois subtipos de receptores 5-HT promovem respectivamente, inibição e excitação pós-sináptica, mecanismos distintos devem ser ativados. Assim, este trabalho avaliou o efeito da estimulação GABAérgica do BLA, bem como a possibilidade de interação GABAérgica-serotoninérgica na modulação da IT em cobaias. Nossos resultados demonstraram que a estimulação GABAérgica por meio da administração de agonista de receptores GABA_A, muscimol (0,028µg) reduziu a resposta de IT, enquanto o tratamento com o antagonista GABA_A, bicuculina (0,5µg) aumentou a duração deste comportamento. Ainda, o pré-tratamento com bicuculina (0,1µg) bloqueou a redução da IT resultante da administração do agonista para receptores 5-HT₂, o α -metil-5-HT (0,1µg). Nossos resultados mostram ainda que a estimulação GABAérgica ou serotoninérgica com as drogas em estudo, em doses efetivas com capacidade de promover alteração comportamental defensiva, não produziu efeitos no comportamento motor, avaliado pelo teste de campo aberto em cobaias. Podemos concluir que o sistema GABAérgico do BLA modula tonicamente a resposta defensiva de IT, desde que o bloqueio dos receptores GABA_A desta estrutura mostrou efeito ansiogênico, evidenciado pelo aumento da duração deste comportamento. Ainda, evidenciou-se que o sistema serotoninérgico quando ativado reduz a duração de IT, evidenciando efeito ansiolítico e/ou de redução do medo. Então, o envolvimento do sistema serotoninérgico do BLA na IT, utilizando receptores 5-HT₂, é dependente de uma sinapse GABAérgica, demonstrando assim interação GABAérgica-serotoninérgica no BLA responsável pela modulação emocional.

ABSTRACT

Among the behavioral, defensive responses emitted in a prey-predator confront, the tonic immobility (TI) response is associated with dangerous in inescapable situations and it is considered the last recourse of the animal survival. As to the of neural substrate responsible for modulation of this behavior, previous studies have reported the involvement of several brain structures, such as the amygdaloid complex. Recently, it was demonstrated that the serotonergic system of the basolateral nucleus of the amygdala (BLA) can reduce the TI duration, by means activation of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors. Since these receptors have inhibitory and excitatory effects, respectively, it is possible that the mechanism used by these receptors is different. Thus, this work evaluated the GABAergic system of BLA, as well the possible GABAergic-serotonergic interaction in the BLA in the modulation of TI in guinea pigs. Our results demonstrated that the GABAergic stimulation (muscimol, 0.028μg) reduced the TI behavior; however the treatment with bicuculine (GABAergic antagonist, 0.5μg) increased this response. Again, the pre-treatment with bicuculine (0.1μg) blocked the reduction of the TI induced by 5-HT₂ receptors serotonergic agonist (α -methyl-5-HT, 0.1μg). In addition, the different treatments used in this study did not alter the motor behavior evaluated in the open field test. Therefore, we can conclude that when GABAergic system of the BLA is activated reduces the TI duration, an ansiolitic effect. Finally, the involvement of the serotonergic system, specifically 5-HT₂ receptors, of the BLA in the TI modulation is depending on activation of GABAergic synapse.

INTRODUÇÃO

1) Comportamento Defensivo

Dentre as reações emocionais estudadas, o medo tem sido a emoção mais bem definida, pois sua expressão e manifestação se estende nas diversas culturas humanas, bem como nas demais espécies de mamíferos e outros vertebrados. Nos animais, as respostas de medo, pânico e raiva são expressas por um conjunto de alterações comportamentais e neurovegetativas, o qual se denominou sistema defensivo. Nas últimas décadas, a pesquisa dos mecanismos neurais envolvidos na elaboração das emoções e das alterações comportamentais defensivas tem sido extensivamente abordada na literatura. Este fato se deve, em grande parte, a descrições anátomo-funcionais dos sistemas neurais relacionados às resposta de medo condicionado (condicionamento Pavloviano) e medo incondicionado, este último também denominado de medo inato (Canteras, 2003).

Basicamente, a elaboração de um comportamento defensivo é determinado por vários fatores, dentre eles a característica do estímulo ameaçador, bem como pela situação (contexto) específica. Considerando estes fatores, o estudo etológico das reações defensivas de roedores em ambientes naturais ou em laboratório, frente a confronto com conspecíficos e predadores, é uma aproximação alternativa para o estudo da agressão e do medo. Nestes modelos, pode-se descrever a organização comportamental destas respostas, bem como o substrato neural envolvido na sua modulação (Blanchard e Blanchard, 1989).

Um dos pioneiros na investigação dos comportamentos emocionais, Edmunds (1974), classificou o sistema de defesa em primário e secundário. No primeiro caso, a função seria reduzir a probabilidade de encontro com o predador, utilizando, por exemplo, a camuflagem. Já o sistema defensivo secundário seria aquele responsável pelo aumento das chances de sobrevivência do animal, onde a emissão dos comportamentos de congelamento, fuga e luta, seriam os mais apropriados. Dentro desta linha de investigação, outros fatores foram considerados para analisar as respostas comportamentais de defesa, entre eles: a distância presa-predador, a espécie do animal e o grau de percepção do perigo (Fanshew e Lester, 1988; Ratner, 1967). Assim, estudos de Blanchard e Blanchard (1988, 1989) definiram níveis de defesa baseados não somente na distância presa-predador, mas também no grau de ameaça oferecido por cada situação, como descrito a seguir resumidamente:

- Quando o perigo não foi identificado, o animal pode explorar o ambiente cautelosamente com abaixamento do tronco, olhos abertos e orelhas arqueadas, e esse

comportamento foi definido como exploração cautelosa. Este padrão comportamental é essencial na avaliação de risco por promover informação necessária para determinar se a ameaça é iminente, ou não. Alternativamente, quando este comportamento promove informação necessária para determinar se o perigo foi confirmado, identificado e localizado, ocorre uma transição de um padrão de ansiedade defensiva para medo defensivo, com elaboração de comportamentos defensivos adequados.

- Quando o perigo já foi detectado pela presa, porém, está a grande distância, a presa pode entrar em fuga ou emitir o comportamento de congelamento. Durante o congelamento, um roedor irá permanecer imóvel, com exceção de movimentos leves e ocasionais das vibrissas, associado aos movimentos respiratórios. O objetivo desta postura comportamental é passar despercebido pelo possível predador, bem como, realizar avaliação mais detalhada da situação (Fanselow, 1980). Respostas autonômicas, tais como piloereção, micção, defecação e tremores mandibulares acompanham esta postura de imobilidade.
- Com a redução da distância presa-predador, e possível ocorrência do contato físico, as respostas comportamentais exibidas são de luta ou fuga, também denominada de ataque defensivo. Entretanto, quando o contato físico é prolongado e não existe alternativa para o escape, o último recurso utilizado pela presa é a imobilidade tônica ou “fingir de morto” (Klemm, 1971).

Com relação aos padrões emocionais, a análise etológica sugere que o componente motivacional de defesa, e muitos comportamentos defensivos, são pré-programados em uma variedade de espécies de mamíferos (Blanchard e Blanchard, 1984). Estas respostas pré-programadas podem ser eliciadas pela mesma classe de estímulos de perigo e ou de objetos ameaçadores em mamíferos derivados (incluindo os seres humanos) e mamíferos primitivos. Desta maneira, a variedade de respostas defensivas pré-programadas encontradas em animais primitivos, pode promover um modelo para o estudo dos fenômenos de medo e ansiedade em humanos, talvez incluindo patologias de ansiedade específicas (Blanchard e Blanchard, 1989). Com relação à ansiedade, este estado emocional pode-se caracterizar por uma resposta complexa com contínua ativação autonômica e comportamental, bem como aumento do comportamento de evitação (isolamento social) (Walker e cols., 2003; Herry e cols., 2005; Maier e Watkins, 2005; Millan, 2003). Em animais, comportamentos relacionados à ansiedade, incluem aumento da vigilância e exploração do ambiente, sendo referido como comportamento de exploração cautelosa (Blanchard e Blanchard, 1989). Assim, modelos animais podem ser extremamente valiosos no estudo de sistemas neurobiológicos

conservativos, incluindo circuitos ativados em estados emocionais (Blanchard e Blanchard, 1988). Contudo, considerando que estes padrões comportamentais emocionais são complexos, tanto em seres humano como em mamíferos primitivos, o uso destes modelos eto-experimentais para o estudo das emoções requer a provisão de situações adequadas de teste para eliciar uma completa gama de comportamentos relevantes e descrições detalhadas, bem como a análise minuciosa dos padrões de mudanças comportamentais, observando-as a partir da manipulação das variáveis fisiológicas e experimentais existentes (Blanchard e Blanchard, 1989).

2) Imobilidade Tônica

Dentre as possibilidades de respostas defensivas emocionais emitidas pelos animais, a resposta comportamental de imobilidade tônica (IT) é associada com situações de perigo intenso, tal qual o ataque de um predador. Os primeiros relatos correlacionando este comportamento com medo extremo foram feitos por Preyer (1881, *apud* Ratner 1967) e confirmados posteriormente em trabalhos onde se demonstrou que o medo, juntamente com os estímulos táteis e proprioceptivos, são fatores essenciais para o desencadeamento deste comportamento defensivo (Klemm, 1971; Gallup, 1977). Corroborando com estes achados, Klemm (1990) relata que a IT resulta tipicamente de uma reação a um conjunto de estímulos táteis, proprioceptivos e algumas vezes visuais, associados ou não ao tratamento farmacológico. Esta resposta de defesa é caracterizada por um estado reversível de profunda inatividade física e relativa falta de responsividade ao meio ambiente com perda do reflexo de endireitamento (Klemm, 1971). Durante a resposta de IT, podem ser observadas alterações neurovegetativas que sugerem similaridade com as modificações psicofisiológicas, tais como alteração da frequência cardíaca e respiratória, e modificações da temperatura corporal, observados em estado emocional aversivo, semelhantes ao medo inato (Carli, 1974; Nash e cols., 1976; Gentle e cols., 1989). Em adição, estímulos proprioceptivos e táteis cutâneos parecem ser importantes na ativação desta imobilidade reflexa, pois a maioria dos métodos de indução envolve a imposição, preferencialmente, de mudanças dramáticas na aferência sensorial para o sistema nervoso central. (Klemm, 1977; Rakshit e Klemm, 1980; Kuypers, 1982). Este comportamento defensivo é de suma importância para a sobrevivência do animal na natureza, sendo que o seu valor adaptativo foi comprovado por diversos achados na literatura (Sargeant e Ebehardt, 1975; Thompson e cols., 1981). Neste contexto, Sargeant e Ebehardt (1975), em seus experimentos, observaram raposas predando patos selvagens em

ambiente natural, e relataram que de 50 patos estudados, 29 escaparam do predador emitindo o comportamento de IT, demonstrando o alto valor adaptativo deste comportamento.

No final da década de 60, iniciaram-se os estudos sobre os mecanismos neurais envolvidos na modulação da resposta de IT. Assim, Carlton (1968, 1969) realizou uma série de experimentos para demonstrar que durante o comportamento de IT há intensa descarga adrenérgica a qual mobilizaria o sistema colinérgico de forma geral no SNC, sendo este último responsável pela modulação dessa resposta. Corroborando com esses achados, Thompson e cols. (1974) e Thompson (1977) demonstraram que a administração intraperitoneal de adrenalina, a qual promove ativação do sistema simpático, produziu aumento da duração da IT. Por outro lado, o tratamento com escopolamina (antagonista competitivo colinérgico) ou atropina (antagonista colinérgico) diminuiu significativamente a duração dos episódios de IT. Porém, a administração por via intraperitoneal de metil-escopolamina, ou metil-atropina, os quais não atravessam a barreira hemato-encefálica e, portanto, produz bloqueio do sistema parassimpático periférico, não alterou a resposta de IT (Hughes, 1982). Juntos, esses achados embasam a hipótese do Carlton (1968, 1969) e sugerem que o comportamento defensivo de IT, possivelmente é modulado por um sistema neural central que utiliza como um de seus neurotransmissores a acetilcolina.

Além das evidências da participação do sistema colinérgico na modulação da resposta de IT, vários outros sistemas de neurotransmissores, tais como serotoninérgico (Harston e cols. 1976; Hatton e cols. 1978; Hennig, 1980; Hicks e cols. 1975), adrenérgico (Hennig e cols. 1980; Thompson e Joseph, 1978), dopaminérgico (Ettinger e Thompson, 1978) e encefalinérgico (Farabollini e cols., 1990) são apontados como envolvidos na regulação da IT.

Após as considerações sobre os sistemas de neurotransmissores envolvidos na modulação da resposta defensiva de IT, passou-se a investigar o substrato neural envolvido neste comportamento. O uso de técnicas de transecção encefálica em diferentes níveis permitiu definir regiões do sistema nervoso central que participam da modulação deste comportamento em coelhos e sapos (Klemm, 1976). Neste estudo foi demonstrado o envolvimento da formação reticular bulbar na emissão da resposta de IT. Esta estrutura seria responsável por enviar projeções para a medula espinhal, e assim hiperpolarizar neurônios motores espinhais, que levam a estados de acinesia, e conseqüentemente dificultar o início dos movimentos por meio dos sistemas de vias motoras descendentes caracterizando a imobilidade reflexa. Segundo Carli (1968), os reflexos mono e polissinápticos, tanto flexores quanto extensores, encontram-se inibidos durante a IT. Além de áreas no tronco encefálico,

de acordo com Ratner (1967), o neocórtex seria responsável pelo controle inibitório das estruturas do tronco encefálico, envolvidas na modulação da resposta defensiva de IT.

Com uso de técnicas que permitem abordar estruturas encefálicas específicas, por exemplo cirurgias estereotáxicas, trabalho realizado por Menescal-de-Oliveira e Hoffmann (1993), mostrou que a área parabraquial pode modular tanto a IT como a resposta a um estímulo nocivo por meio do sistema colinérgico em cobaias. De fato, a resposta comportamental de IT pode ser associada com o sistema nociceptivo, desde que na sua ocorrência possa-se observar analgesia opióide em cobaias avaliadas no teste de formalina e da placa quente (Leite-Panissi e cols., 2001). Este conjunto de respostas (defensiva e nociceptiva) apresenta alto valor adaptativo considerando que a ocorrência da analgesia em situações de confronto, pode permitir ao animal emitir, de maneira mais eficiente, o mecanismo de defesa escolhido. Considerando outras estruturas neurais, Monassi e cols., (1997 e 1999) mostraram que a substância cinzenta periaquedutal (SCP) contém circuitos neuronais envolvidos na modulação da IT. Desta maneira, a estimulação colinérgica localizada na região dorsal da SCP, diminuiu a duração da IT, enquanto que a mesma estimulação, porém da região ventrolateral aumentou o episódio de IT. Com relação ao sistema serotoninérgico desta mesma estrutura, observou-se que a administração de serotonina (5-HT) na região ventrolateral da SCP possui efeito bifásico, ou seja, a dose baixa de 5-HT (0,1µg) promoveu aumento da duração da IT, enquanto que doses maiores (1, 3 e 6µg) produziram redução deste mesmo comportamento (Monassi e Menescal-de-Oliveira, 2004). Os autores demonstraram que este efeito possivelmente ocorreu por ativação de diferentes tipos de receptores serotoninérgicos. Assim pequenas doses de 5-HT promoveram ativação de receptores 5-HT_{1A}, conhecida por produzir inibição neuronal, e por outro lado, altas doses de 5-HT foram associadas com ativação de receptores 5-HT₂, os quais produzem excitação neuronal pós-sináptica.

Outras estruturas neurais também podem estar intimamente envolvidas na modulação da IT, entre elas o hipotálamo (Oliveira e cols., 1997), o hipocampo (Baptista, 2000), o complexo amigdalóide (Leite-Panissi e cols., 1999; 2003; 2006) e o núcleo mediano da rafe (Silva e Menescal-de-Oliveira, 2007).

Com relação a amígdala, trabalho de Leite-Panissi e cols. (1999), mostrou que a estimulação colinérgica dos núcleos central, basolateral e lateral posterior da amígdala, promoveu decréscimo das respostas defensivas de IT em cobaias. Ainda, é possível a existência de interação entre os sistemas opioidérgico e colinérgico do núcleo central da amígdala na modulação da IT e da nocicepção em cobaias, visto que o pré-tratamento com

naloxone (na dose de 1,3nmol/0,2µL) bloqueia tanto a redução da resposta de IT (Leite-Panissi e Menescal-de-Oliveira, 2002), como a antinocicepção (Leite-Panissi, e cols., 2004) obtidas pela estimulação colinérgica (com carbacol na dose de 2,7nmol/0,2µL) desta estrutura límbica.

Em suma, pode se observar que a resposta comportamental defensiva de IT, envolve diferentes sistemas de neurotransmissores bem como um complexo circuito anatômico responsável pela emissão e modulação desta resposta.

3) Amígdala

3.1) Aspectos anatômicos

Pioneiros na definição anatômica da amígdala, Völsch (1910, *apud* Pitkänen e cols., 1997) e Johnston (1923, *apud* Pitkänen e cols., 1997) descreveram esta estrutura como um agrupamento heterogêneo de núcleos localizados no lobo temporal. Em 1981, Kapp e cols. (1981) e Ursin e cols. (1981) detalharam a amígdala, ou o complexo amigdalóide como um conjunto de núcleos telencefálicos profundos no lobo temporal, estando entre a cápsula externa e o hipotálamo, e se estendendo rostralmente até o nível dos núcleos supraquiasmáticos e caudalmente para os corpos mamilares. Por meio de estudos citoarquitetônicos, Brodal (1984) dividiu o complexo amigdalóide em: núcleo corticomédial e núcleo basolateral (porção basal e lateral). Posteriormente, com base em estudos cito e quimioarquitetônicos, bem como considerando as aferências e eferências individuais, outros núcleos e subnúcleos foram descritos, são os núcleos central, lateral e medial (Price e cols., 1987; Amaral e cols., 1992) (figura-1).

O complexo de núcleos amigdalóides é um componente do sistema límbico, e tem sido mostrado sua íntima relação na integração e controle dos comportamentos emocionais e autonômicos (Kapp e cols., 1981; Ursin e cols., 1981). Uma variedade de diferentes funções tem sido atribuída ao complexo amigdalóide, as quais incluem: memória, atenção, interpretação das emoções, significado aos estímulos sensoriais, percepção dos movimentos do corpo e geração dos aspectos emocionais dos sonhos (Davis, 1992; Ono e Nishijo, 1992; Rolls, 1992; Aggleton, 1993; Young e cols., 1995; Cahill e cols., 1996; Morris e cols., 1996; Rausch e cols., 1996; Pitkänen e cols., 1997).

núcleo motor dorsal do nervo vago e substância cinzenta periaquedutal (Hopkins e Holstege, 1978; Krettek e Price, 1978a; Beitz, 1982).

Reforçando o envolvimento do complexo amigdalóide na modulação emocional, a inativação desta estrutura interfere na expressão adequada das emoções (Davidson e cols., 2002; Drevets, 2001), bem como em teste de interação social realizados em ratos (Adolphs, 2001). Ainda, lesões amigdalóides restritas são responsáveis pelo bloqueio da aquisição ou da expressão de muitos aspectos das respostas comportamentais associadas com medo condicionado e incondicionado (Davis, 1994; Davis e cols., 1993; Goldstein e cols., 1996), assim como da hipoalgesia condicionada (Helmstetter e Landeira-Fernandes, 1990; Helmstetter, 1992). É possível também que conexões amigdalóides com outras áreas telencefálicas sejam essenciais para a modulação comportamental emocional. Entre estas áreas estão o hipocampo, envolvido na modulação do condicionamento contextual, e o córtex pré-frontal, relacionado com a extinção de comportamentos condicionados (LeDoux, 1998; Diorio e cols., 1993; Everitt e Robbins, 1992; LeDoux, 1996). Também, em humanos, os mecanismos neuronais amigdalóides são cruciais para processamento e modulação do comportamento social e emocional, uma vez que a lesão desta estrutura resulta em aumento da agressividade e alteração especificamente do medo (Tranel e Hyman, 1990). Em resumo, LeDoux (1994) sugeriu que a amígdala proporciona o mais refinado controle da intensidade e da escolha do momento da reação de defesa controlado pelo diencéfalo-mesencéfalo e pelas regiões periventriculares, sendo esta estrutura responsável pela detecção e organização de respostas frente a perigos naturais (como ataque predatório), bem como perigos aprendidos, prevenindo sua ocorrência. Assim a amígdala pode certamente ser vista como uma estrutura primária central controlando respostas de ameaças reais, opondo-se as ameaças potenciais (LeDoux, 1994). Dentro da amígdala, é possível que o núcleo basolateral, lateral, central e medial estejam, particularmente, associados com o comportamento defensivo relacionado ao estado emocional de medo e ansiedade (Davis, 1992; Shekhar e cols., 2003; Stutzmann e LeDoux, 1999).

3.2) Núcleo basolateral da amígdala

Para entender os mecanismos neuronais que intermedeiam o processamento das informações emocionais no núcleo basolateral da amígdala (BLA), é necessário a identificação dos tipos celulares e o conhecimento de suas participações na circuitaria

intrínseca desta região, considerando que cada população de interneurônio representa uma relação funcional na circuitaria intrínseca do BLA (Muller e cols., 2003).

A fisiologia sináptica do BLA foi caracterizada, usando-se registros intracelulares (Rainnie e cols., 1991a, b). Assim, identificou-se que neurônios individuais do BLA que recebem aferências de diferentes estruturas, sendo que, potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPSs) podem ser eliciados em neurônios piramidiformes do BLA pela estimulação da estria terminal da cápsula externa ou do núcleo lateral da amígdala (Chapman e cols., 1990; Rainnie e cols., 1991a, b). Estes PEPSs, podem ser descritos como um componente rápido, mediado pela ativação do receptor ácido hidróxi-5-metil-4-isoxazolenopropionico (AMPA)/kainato e um componente lento mediado pelo receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Calton e cols., 2000; Rainnie, 1991a; Weisskopf e LeDoux, 1999). Os PEPSs são geralmente seguidos por um potencial pós-sináptico inibitório (PIPSs) mediado pelos receptores GABA_A ou um combinado de um PIPSs rápido e um lento, possivelmente mediado também pelos receptores GABA_B (Rainnie, 1991b; Washburn e Moises, 1992a). Estudos de Wang e cols. (2001) demonstraram que a propagação internuclear dos sinais no complexo amigdalóide é determinada, principalmente, por receptores não-NMDA e GABAérgicos, sendo que os receptores NMDA participariam em menor magnitude. É possível, portanto, que este mecanismo intrínseco de ativação possa ser responsável pelo potente efeito das drogas ansiolíticas, as quais facilitam a atividade mediada pelos receptores GABA_A (Davis e cols., 1994; Sanders e Shekhar, 1995). Ainda, pode-se sugerir que a modulação dos receptores AMPA da amígdala tenha efeito ansiolítico nas respostas do medo e ansiedade, (Davis, 1992; Davis e cols., 1994). Além do mais, resultados de Li e cols. (2002), sugerem que neurônios GABAérgicos do BLA de ratos podem ser afetados por influência excitatória do sistema noradrenérgico e influência inibitória do próprio sistema GABAérgico, ou de outros sistemas de neurotransmissores.

Apesar do núcleo basolateral da amígdala ser uma estrutura sub-cortical, a anatomia e a fisiologia de seus dois maiores tipos celulares, neurônios piramidais e não-piramidais, são muito similares aos do neocórtex e hipocampo (Hall, 1972a, b; Millhouse e DeOlmos, 1983; McDonald, 1992; Washburn e Moises, 1992a; Rainnie e cols., 1993). Estudos anatômicos, utilizando a técnica de Golgi-Kopsch, (McDonald, 1982) têm caracterizado morfologicamente os neurônios do BLA em três classes distintas. A maioria ($\pm 90\%$) se assemelha aos neurônios piramidais terminais tipo I, e os demais neurônios assemelham-se a interneurônios tipo II e células neurogliforma tipo III. Seguindo a mesma linha de estudo, McDonald (2001a), relatou que os neurônios do núcleo basolateral da amígdala podem ser

subdivididos em dois tipos principais de células: a) Células P: são neurônios multipolares com espinhas (frequentemente semelhante a neurônios piramidais) com alta colateralização de axônios, sendo que esta classe de neurônios pode ter duas variações: (1) neurônios “*spiking*” que geram correntes de picos emitindo potenciais de ação de acomodação; (2) correspondendo a classe de neurônios que lembram os corticais, gerando grupamentos de potenciais de ação de alta frequência (“*fast-spiking*”) em resposta ao limiar de despolarização; b) Células aspinais, que integram a circuitaria celular local (presumidamente neurônios inibitórios) na qual, fisiologicamente, possui dois tipos neuronais. Entretanto, o sub-tipo melhor caracterizado são as células “*fast-spiking*”, que por analogia correspondem a classe de interneurônios corticais parvocelulares (Kawaguchi e Kubota, 1997), sendo que estas células geram breves potenciais de ação em pico e podem sustentar alta taxa de disparo com baixa frequência de acomodação e medeiam inibição por feedback (Smith e cols., 2000; Smith e cols., 1998; Pará e cols., 1995; Lang e Pará, 1998).

Com relação aos neurônios piramidais do BLA, estudos realizados em ratos demonstraram similaridade com neurônios corticais, exibindo imunorreatividade para o glutamato (McDonald e cols., 1989) sendo que as eferências do BLA, originam-se dessas células piramidais (McDonald, 1992b). Estes neurônios piramidais têm extensiva conexão com a “circuitaria límbica”, na qual inclui as seguintes estruturas encefálicas: córtex pré-frontal, estriato ventral, globo pálido ventral e núcleo talâmico mediodorsal. Estudos prévios tem estabelecido que os neurônios do BLA são os principais tipos celulares que se projetam para o córtex pré-frontal e o estriato ventral (McDonald e cols., 1989; McDonald, 1987, 1992b; Carlsen, 1988; Shaikh e cols., 1994).

Há ainda um acréscimo no nível de complexidade na circuitaria amigdalóide pela presença de grupos interconectados de neurônios GABAérgicos entre o complexo basolateral (núcleos lateral, basolateral e basomedial da amígdala) e o núcleo central da amígdala (CEA) (Nitecka e Ben-Ari, 1987; McDonald e Augustine, 1993; Pará e Smith, 1993b). Esse grupo de neurônios inibitórios, denominados “massa de células intercaladas” recebe aferências do complexo basolateral e projeta-se para o CEA (Millhouse, 1986; Pará e Smith, 1993b) ocupando uma posição estratégica para influenciar o fluxo de informação (Collins e Pará, 1999). Em contrapartida, o núcleo central da amígdala contém primariamente neurônios GABAérgicos os quais se projetam para estruturas do tronco encefálico e diencefalo, incluindo o lócus coeruleus, a substância cinzenta periaquedutal e o hipotálamo. Desta maneira, é possível que o núcleo basolateral seja semelhante a estruturas corticais, enquanto que o núcleo central tem sido comparado ao *estriatum* (Alheid e Heimer, 1988).

3.3) Conexões amigdalóides

Um tema dominante na literatura tem sido a importante relação funcional das projeções do complexo basolateral da amígdala para o núcleo central, o qual por sua vez emite eferências para uma variedade de estruturas envolvidas na geração da resposta do medo (Davis, 2000; LeDoux, 2000). LeDoux (1998) sugere que a organização amigdalóide é determinada não nos núcleos, mas nos sub-núcleos. Em adição, Pitkänen e cols. (1997) considera que cada núcleo do complexo amigdalóide possui subdivisões (sub-núcleos), e que há três níveis distintos de conectividade no complexo amigdalóide: internuclear, na qual as conexões ocorrem entre dois núcleos, interdivisional, na qual ocorre conexões entre os sub-núcleos de um núcleo e intradivisional, na qual ocorre conexões entre sub-núcleos de diferentes núcleos. Assim é possível que os diferentes núcleos e divisões nucleares representem unidades funcionais separadas e que o processamento da informação intra-amigdalóide envolva alto padrão organizacional de comunicação.

Alguns trabalhos mostram que as informações sensoriais para o complexo amigdalóide são recebidas por meio de aferências para os núcleos lateral e basolateral (Knuepfer e cols., 1995). Assim, LeDoux e cols. (1985) e Stutzmann e LeDoux (1999) demonstraram que as maiores projeções do tálamo acústico dirigem-se para o núcleo lateral, sendo possivelmente esta área a interface sensorial da amígdala durante o condicionamento aversivo. Krettek e Price (1978a) e Amaral (1987) demonstraram que uma das conexões eferentes do núcleo lateral é o núcleo central. Assim, o núcleo lateral seria uma via de chegada das informações aferentes ao complexo amigdalóide, considerando ainda que o núcleo lateral depende do núcleo central para controlar respostas emocionais evocadas por estímulos sensoriais auditivos. (LeDoux e cols., 1990). Por sua vez, o núcleo central é o maior sítio amigdalóide de projeções eferentes para o hipotálamo e para o tronco encefálico (Pitkänen e cols., 1997), sendo este núcleo a interface com o sistema motor e autonômico envolvido no controle das respostas condicionadas (LeDoux, 1992; Kapp e cols., 1992; Davis, 1994). Deste modo, enquanto que a lesão do CEA interfere com a expressão das respostas neurovegetativas de medo e motoras associadas ao medo condicionado, a lesão do hipotálamo lateral, bloqueia a mediação das respostas do sistema nervoso simpático (como mudanças na pressão sanguínea), e a lesão da substância cinzenta periaquedutal interfere nas respostas motoras condicionadas, tal como congelamento (LeDoux, 1998).

4) Neuroquímica

4.1) Aspectos gerais dos receptores GABAérgicos

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o mais prevalente neurotransmissor no encéfalo de mamíferos, e representa a maioria de todas as sinalizações inibitórias rápidas, principalmente por meio da ativação dos receptores GABA_A (Upon e Blackburn, 1999). A descoberta do GABA foi inicialmente descrita por Eugene Roberts e por Jorge Awapara (Awapara e cols., 1950; Roberts e Frankel, 1950), e seus resultados sugeriam que esta substância tem envolvimento essencial na transmissão inibitória central em invertebrados e vertebrados.

Os receptores GABA_A são alvo primário de muitas drogas neuroativas importantes, incluindo benzodiazepínicos (Bdzs), barbitúrios, esteróides anestésicos em geral e possivelmente o etanol (McDonald e Olsen, 1994). Estudos enfocando a natureza molecular dos receptores GABA_A, têm revelado a existência de muitos subtipos desses receptores, sendo que a composição de cada um é determinada pela formação de estruturas pentaméricas de três distintas subunidades familiares (alfa 1-6; beta 1-3; gama 1-3) (Lüdders e cols., 1995). Além disso, com o uso de técnicas *in vitro* sofisticadas, tem sido demonstrada que a regulação das propriedades funcionais GABAérgica, como também de outros moduladores de receptores GABA_A, são influenciadas pelos tipos de variações nas sub-unidades no complexo pentamérico (Lüddens e cols., 1995; Sieghart, 1995). Estudos moleculares já identificaram pelo menos 13 tipos de subunidades dos receptores GABA_A em mamíferos com diferentes distribuições nas regiões encefálicas (Wisden e cols., 1992).

De maneira geral, a ativação dos receptores GABA_A resulta em aumento da condutância da membrana neuronal ao íon cloro (McDonald e Twyman, 1992), ocasionando hiperpolarização da membrana interferindo ou mesmo bloqueando a despolarização (Bormann, 1988; Study e Barker, 1981).

Além dos receptores do tipo GABA_A as interações sinápticas também podem ser mediadas por receptores do sub-tipo GABA_B. Vale ressaltar que o uso dos agonistas seletivos para os receptores GABA_B foi indicado terapêuticamente antes mesmo da descoberta do receptor. Assim, o Baclofen (agonista GABA_B, Lioresal CIBA-Geigy) foi utilizado como medicamento com ação no sistema nervoso central tendo como, efeito relaxamento muscular, sete anos antes da descoberta do novo receptor GABA_B (Bowery e cols., 1980). É possível que o mecanismo de ação do baclofen reduza a liberação de neurotransmissores tais como o glutamato do córtex cerebral (Postashner, 1978), bem como, altera eventos pré-sinápticos

envolvidos no reflexo monossináptico na medula espinhal (Fox e cols., 1978). Em adição, o receptor GABA_B foi o primeiro a ser demonstrado nas terminações nervosas do sistema nervoso autônomo periférico, mediando a diminuição da liberação de neurotransmissores (acetilcolina e noradrenalina) (Bowery e cols., 1981; Muhyaddin e cols., 1982; Giotti e cols., 1983a; Ong e Kerr, 1983; 1990; Kleinrok e Kilbinger, 1983; Shirakawa e cols., 1987).

No sistema nervoso central, o receptor GABA_B é distribuído de maneira heterogênia com densidades distintas, em algumas regiões do encéfalo, tais como o tálamo, a camada molecular do córtex cerebelar, o núcleo interpeduncular e a coluna dorsal da medula espinhal (Bowery e cols., 1987; Chu e cols., 1990; Turgeon e Albin, 1993). O padrão de ligação difere dos locais de ligação do GABA_A, embora em muitas regiões do encéfalo os receptores GABA_A e o GABA_B parecem coexistir (Bowery e cols., 1987; Thalman, 1988; Crunelli e Leresche, 1991; Karlsson e cols., 1988; Lambert e cols., 1989; Dutar e Nicoll, 1988a). Estudos utilizando técnicas radiográficas, têm demonstrado grande distribuição dos receptores GABA_B em encéfalos de mamíferos adultos (Bowery e cols., 1987; Chu e cols., 1990). Corroborando com estas observações, técnicas eletrofisiológicas (Mott e Lewis, 1994) indicaram que os receptores GABA_B estão presente em terminais pré-sinápticos e em locais pós-sinápticos (Harrison, 1990; Harrison e cols., 1988; Dutar e Nicoll, 1988b; Thompson e Gähwiler, 1992; Alford e Grillner, 1991), sendo que a ativação dos receptores pré-sinápticos GABA_B causa redução da liberação de neurotransmissores.

Como mecanismo de ação, os receptores GABA_B possuem acoplados a proteína G de membrana bem como a guanilato e adenilato ciclase ligados aos canais de potássio e cálcio. A resposta predominante da ativação deste receptor é aumento da condutância ao potássio, produzindo hiperpolarização da membrana (Newberry e Nicoll, 1984; Gähwiler e Brown, 1985; Robertson e Taylor, 1986; Gallagher e cols., 1984; Lacey e cols., 1988; Crunelli e Leresche, 1991). Além disso, a inibição dos terminais de condutância de cálcio, primeiramente descrito por Dunlap (1981) e Desarmenien e cols. (1984), parece ser responsável por um mecanismo pré-sináptico, o qual medeia a supressão da liberação dos neurotransmissores.

4.2) Aspectos gerais dos receptores serotoninérgicos

Por mais de 100 anos, cientistas têm estado atentos a uma substância vasoconstritora endógena que está presente no sangue. Pequeno progresso na identificação desta substância foi feita até o final de 1940. Na Cleveland Clinic Foundation, Rapport, Green

e Page tentaram usar em seus experimentos uma substância vasoconstritora. Seus trabalhos resultaram na purificação de um fator plasmático o qual eles denominaram “serotonin” (Rapport e cols., 1947) identificado a substância como 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Rapport, 1949).

Em 1957, Gaddum e Picarelli mostraram que há pelo menos dois tipos distintos de efeitos da 5-HT observados em músculo liso do íleo de cobaias. O primeiro tipo de atividade da 5-HT poderia ser bloqueada pelo *dibenzyline*, e foi designado como receptor “D”. Um segundo tipo de receptor 5-HT foi envolvido em um efeito contrátil indireto da 5-HT, que ocorreu via liberação de acetilcolina e pode ser inibido pela morfina (agonista opióide), este efeito foi denominado como ativação de um receptor “M”. Posteriormente, as propriedades farmacológicas do receptor D têm sido consideradas como a ativação do receptor 5-HT₂, descritos nas membranas neuronais. Em contraste, o receptor M ainda não foi identificado em membranas encefálicas, mas posivelmnte medeia muitas funções periféricas, sendo identificado como um receptor do tipo 5-HT₃. Estudos farmacológicos avançados levaram a uma subseqüente adoção de um sistema de nomenclatura envolvendo as quatro maiores classes de receptores para 5-HT: 5-HT₁ (com os seus múltiplos subtipos, 1A, 1B, 1D, 1E e 1F), 5-HT₂ (2A, 2B e 2C), 5-HT₃ (Bradley e cols., 1986; Zifa e Fillion, 1992), e 5-HT₄ (Compan e cols., 1996).

A estrutura protéica do receptor 5-HT_{1A} é caracterizada como tendo usualmente sete domínios transmembrana de uma proteína-G acoplada ao receptor, com efeito inibitório, pois diminui a ação do AMPc e altera a condutância dos canais de potássio (hiperpolarização neuronal) (Humphrey e cols., 1993). Farmacologicamente, o receptor 5-HT_{1A}, é o mais bem caracterizado membro da família dos receptores 5-HT, e apresenta alta densidade de distribuição no hipocampo (particularmente CA1 e girus denteado), no septo lateral, núcleo central da amígdala, no córtex frontal e entorhinal e nos núcleos medial e dorsal da rafe. Estes receptores são localizados principalmente pós-sinápticamente (Hamon e cols., 1990; Sotelo e cols., 1990). As funções comportamentais dos receptores 5-HT_{1A}, têm sido estudadas pela avaliação do efeito de agonista de receptor 5-HT_{1A} específicos, tais como o 8-OH-DPAT e azapironas, assim a administração destes compostos sistematicamente em animais de laboratório leva a hiperfagia, hipotermia e vários efeitos comportamentais, demonstrando ainda ação ansiolítica em humanos (Barret e Vanover, 1993; Glennon, 1990b; Lucki, 1992).

Quanto ao receptor 5-HT₂ suas características farmacológicas estão associadas com o aumento da liberação do inositol-trifosfato (IP³) e do diacil glicerol (DAG), promovendo efeito pós-sináptico excitatório (Baxter e cols., 1995; Hoyer e cols., 1994). O mapa

autoradiográfico dos ligantes do receptor 5-HT₂, em encéfalos de ratos, tem demonstrado, particularmente, altas densidades deste receptor no claustrum, núcleo accumbens, tubérculo olfatório, córtex piriforme e lâminas 1 e 4 do neocórtex (Malgouris e cols., 1993; Pazos e cols., 1985), além de estar presente em áreas do complexo amigdalóide (Rainnie, 1999).

4.3) Farmacologia dos receptores GABAérgicos e serotoninérgicos no complexo amigdalóide

O funcionamento das estruturas cerebrais envolvidas nas reações de defesa é regulado por vários sistemas de neurotransmissores, que estão presentes em grande quantidade na amígdala os quais incluem a noradrenalina (Quirarte e cols., 1998; Tanaka e cols., 1991; Willian e cols., 2000), aserotonina (Amat e cols., 1998; Kawahara e cols., 1993), a dopamina (Inglis e Moghaddam, 1999; Uehara e cols., 2003; Young e Rees, 1998) e a acetilcolina (Melntyre e cols., 2003). Ainda, evidências experimentais indicam que possivelmente a atividade GABAérgica inibe tonicamente respostas comportamentais defensivas na região da substância cinzenta periaquedutal, no hipotálamo e na amígdala. Em adição, entre as monoaminas, a serotonina (5-HT) tem sido descrita como facilitadora da ansiedade na amígdala por agir no receptor 5-HT₂ e inibindo simultaneamente, o pânico na substância cinzenta periaquedutal por agir em receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₂(Graeff, 1994).

Com relação à neurotransmissão amigdalóide, estudos neuroquímicos têm demonstrado alta concentração de receptores benzodiazepínicos nesta estrutura (Yong e Kuhar 1980; Niehoff e Kuhar, 1983), sendo que a ativação destes receptores do núcleo lateral da amígdala atenua as respostas aversivas relacionadas a ansiedade ao teste de conflito (*water lick conflict test*) (Scheel-Kruger e Petersen, 1982). Ainda, trabalhos indicaram que a aplicação de pequena quantidade de agonistas benzodiazepínicos intra-amigdalóide resulta em seletivo efeito ansiolítico em ratos. Juntos, estes dados sugerem que a amígdala pode representar um local crítico no sistema nervoso central na mediação dos efeitos ansiolíticos promovidos pela administração sistêmica de benzodiazepínicos (Hodges e cols., 1987; Nagy e Decsi, 1973; Nagy e cols., 1979).

Quanto a participação do circuito GABAérgico da amígdala na modulação de suas funções, Scheel-Kruger e Petersen (1982) demonstraram que a microinjeção de muscimol no núcleo basolateral da amígdala promoveu efeito ansiolítico no teste de interação social. Nesta mesma linha de investigação, a administração de benzodiazepínicos no núcleo basolateral da amígdala atenuou respostas comportamentais de medo condicionado (congelamento), bem

como a hipoalgesia condicionada em ratos (Thomas e cols., 1985). Corroborando com esses resultados, Sanders e Shekhar, (1995) demonstraram que o bloqueio GABA_A do núcleo basolateral da amígdala com bicuculina (20pmol, antagonista GABA_A) diminuiu a interação social em ratos evidenciando efeito ansiogênico. Por outro lado, a administração de bicuculina na mesma dose no núcleo central não foi efetiva no teste de interação social. Além disso, o tratamento com muscimol promoveu o efeito ansiolítico significativo quando microinjetado no núcleo central. Esses resultados sugerem a existência de um circuito inibitório tônico no núcleo basolateral, que quando bloqueado produz ansiedade, enquanto que no núcleo central, embora esse mesmo substrato esteja presente, não atua de forma tônica. Em adição, tem sido mostrado que microinjeções de antagonistas GABA (bicuculina) na região do núcleo basolateral da amígdala elicia aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (Sanders e Shekhar, 1991, 1995; Sanders e cols. 1995), bem como elicia comportamento ansiogênico (Sanders e Shekhar, 1995). Os padrões encontrados de aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca após microinjeção de antagonistas de receptores GABA_A (bicuculina), no núcleo basolateral da amígdala é consistente com reações autonômicas que acompanham estados emocionais de medo e ansiedade associados a respostas defensivas espécie-específica (Hilton e Zbrozyna, 1963; Hilton e Redfern, 1986). Esses achados suportam a hipótese do envolvimento do circuito GABAérgico no complexo amigdalóide na modulação de respostas emocionais.

Por meio de técnicas utilizando marcadores específicos, altos níveis de GABA foram encontrados no núcleo central e medial, enquanto que quantidade moderada foi detectada nas demais áreas amigdalóides (Enna e cols., 1975, Ben Ari e cols., 1976). Além disso, estudos de Le Gal La Salle (1976) e Bowery e cols. (1987) demonstraram que ambas as áreas, o córtex pré-frontal ventromedial e o núcleo amigdalóide basolateral, contêm altos níveis de receptores GABA_A, e demonstraram o envolvimento deste receptor na plasticidade neural destas estruturas, principalmente relacionado a processos emocionais tal como ansiedade. Em vista do exposto, Akirav e cols. (2006), sugerem a existência de uma relação facilitatória da neurotransmissão GABA_A no córtex pré-frontal ventromedial iniciando a extinção do medo, em contrapartida no núcleo amigdalóide basolateral a neurotransmissão GABA_A facilitaria a consolidação da extinção do medo, desde que a administração de muscimol no núcleo amigdalóide basolateral, seguida de um curto período de treino de medo condicionado facilita a extinção.

Considerando a transmissão serotoninérgica na amígdala Kawahara e cols. (1993) têm demonstrado aumento da liberação de 5-HT no BLA associado com estresse emocional.

Além disso, tem sido mostrado que lesão eletrolítica ou neurotóxica dos neurônios 5-HT do BLA, mas não no CeA, como também bloqueio dos receptores 5-HT₂ no BLA, aumenta o comportamento aversivo causado pela estimulação elétrica do colículo inferior (Macedo e cols., 2002; Maissonette e cols., 2000; Maissonette e cols., 1996). Contudo, a ativação de aferências do BLA, resulta em respostas diretas monossinápticas excitatórias pós-sinápticas na lâmina V dos neurônios piramidais do córtex pré-frontal medial (Orozco—Cabal e cols., 2005), os quais por sua vez projetam-se diretamente para o núcleo dorsal da rafe e participam do controle da atividade neuronal serotoninérgica (Hajos e cols., 1998). Evidências anatômicas sugerem que os sistemas serotoninérgicos são topograficamente organizados nos núcleos da rafe, os quais se projetam para diferentes sistemas funcionais (Imai e cols., 1986; Lowry, 2002; Abrams e cols., 2005). De fato, o complexo amigdalóide recebe fibras serotoninérgicas originárias principalmente do núcleo dorsal da rafe, por meio do trato núcleo dorsal da rafe-telencefalo (Azmitia e Segal, 1978). Ainda, segundo Mamounas e cols. (1991) a maioria das fibras originárias no núcleo dorsal da rafe é fina e apresenta pequenas varicosidades, o que resulta em contato sináptico preferencial com receptores do subtipo 5-HT₂. De maneira geral, os receptores 5-HT₂ são encontrados em maior concentração no BLA, enquanto que no núcleo central da amígdala (CEA) pode ser identificada maior quantidade de receptores 5-HT_{1A} (Stein e cols., 2000). Em adição, quando se consideram os efeitos da ativação dos receptores 5-HT₂ localizados no BLA é necessário conhecer que estes receptores encontram-se distribuídos em múltiplas populações de neurônios. Desta maneira, podemos encontrar estes receptores tanto em neurônios de projeção como também em interneurônios (Stein e cols., 2000). É reportado que a estimulação de receptores 5-HT_{2C} do BLA pode apresentar efeitos ansiolíticos desde que, a ativação destes receptores em interneurônios localizados no BLA promoveu aumento da liberação do neurotransmissor GABA (Rainnie, 1999; Stutzmann e LeDoux, 1999), e é fato que a liberação GABAérgica na amígdala possui efeitos ansiolíticos (Hodges e cols., 1987). Além do mais, a ativação serotoninérgica de interneurônios do BLA, evoca de maneira dose dependente, despolarização da membrana, sendo este efeito semelhante ao promovido por agonista dos receptores 5-HT₂ (α -metil-5HT), e não por agonistas dos receptores 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT), e em neurônios de projeção a 5-HT causa redução dose-dependente da amplitude dos estímulos evocados por PEPS e PIPS, na qual estes resultados sugerem que a liberação aguda de serotonina pode ativar diretamente interneurônios GABAérgicos do BLA via ativação dos receptores 5-HT₂ e que aumenta a liberação de GABA, ativando receptores pós-sinápticos GABA_A e promovendo aumento da frequência de sinapses inibitórias em neurônios de projeção. Considerando os neurônios de

projeção do BLA, a serotonina tem ação inibitória direta por meio da ativação de receptores pós-sinápticos 5-HT_{1A} (Rainnie, 1999). Investigando a interação entre os sistemas serotoninérgico e GABAérgico, em trabalho de Stutzmann e LeDoux (1999), a serotonina induziu inibição da atividade sináptica, que poderia ser atribuída a um efeito inibitório direto da serotonina em neurônios excitatórios pós-sinápticos para aferentes sensoriais ou pode ser atribuída a ativação de células GABAérgicas através de receptores serotoninérgicos no núcleo lateral da amígdala, inibindo células excitatórias.

Com relação às respostas defensivas, estudo recente (Leite-Panissi e cols., 2006) demonstrou que o aumento da transmissão serotoninérgica no núcleo basolateral da amígdala promoveu redução da resposta defensiva de IT em cobaias, sugerindo redução do medo ou da ansiedade. Em particular, os resultados mostraram que a administração de agonista de receptores 5-HT_{1A} ou de receptores 5-HT₂ são capazes de promover redução da duração dos episódios de IT. Ainda, a administração *per se* de ketanserina, um antagonista seletivo de receptores do tipo 5-HT₂, não produziu alteração significativa na resposta de IT, porém a pré-administração deste antagonista no BLA bloqueou a redução da resposta de IT em cobaias induzida pelo agonista 5-HT₂, α -metil-5-HT, no mesmo sítio. No entanto, para se esclarecer mais minuciosamente o mecanismo intrínseco serotoninérgico do BLA, e para avaliar se há outros sistemas de neurotransmissores envolvidos nesta resposta como, por exemplo, o sistema GABAérgico, como ocorre em outras estruturas, semelhante ao circuito 5-HT/GABA descrito para o núcleo lateral da amígdala na modulação do medo condicionado (Stutzmann e LeDoux, 1999), novos estudos ainda devem ser realizados. A figura 2 ilustra um possível mecanismo intrínseco do núcleo basolateral da amígdala, fundamentado nas informações obtidas da literatura.

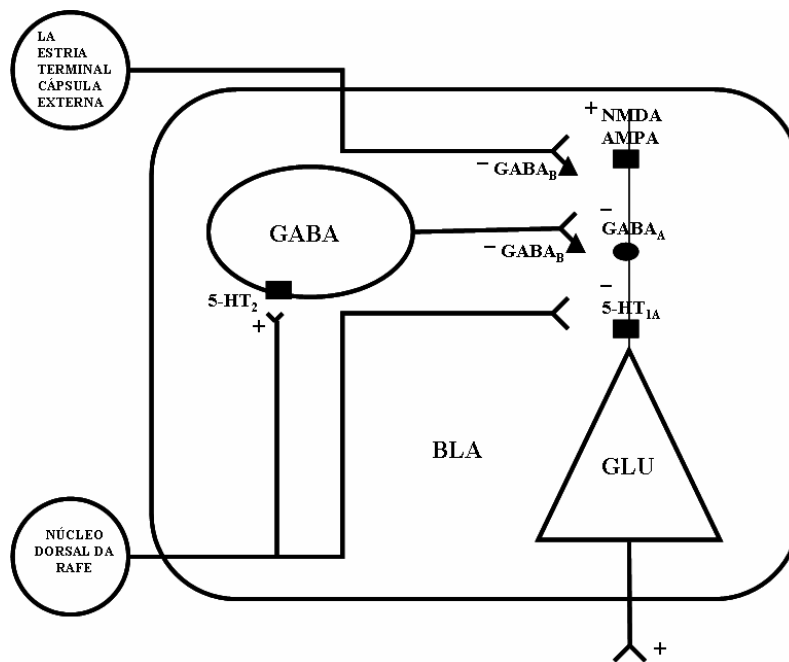


Figura 2: Esquema ilustrando os possíveis mecanismos neuroanatômicos modulatórios no núcleo basolateral da amígdala (BLA) de mamíferos durante estímulos sensoriais ameaçadores. As aferências glutamatérgicas excitatórias estimulam os neurônios piramidais do BLA por meio de receptores NMDA/AMPA, descritos por Chapman e cols. (1990) e Rainnie e cols. (1991a). As vias serotoninérgicas para o BLA segundo Azmitia e Segal (1978) liberam serotonina que atua em receptores 5-HT₂ localizados nos interneurônios GABAérgicos, estimulando-os a liberar GABA na fenda sináptica, e ativa os receptores 5-HT_{1A} inibitórios nos dendritos dos neurônios piramidais do BLA. O GABA liberado na fenda sináptica, pelos interneurônios GABAérgicos, ativam receptores GABA_A nos dendritos dos neurônios piramidais, (Rainnie, 1999), e ativam também receptores GABA_B pré-sinápticos dos axônios eferentes glutamatérgicos e GABAérgicos para os neurônios piramidais do BLA (Szinyei e cols., 2000; Yamada e cols., 1999).

OBJETIVO

Com base na literatura descrita, o objetivo deste trabalho foi avaliar uma possível interação dos sistemas serotoninérgico e GABAérgico do núcleo basolateral da amígdala (BLA) na modulação da resposta defensiva de imobilidade tônica em cobaias. Ainda avaliamos se a ativação destes dois sistemas de neurotransmissores pode alterar a resposta motora dos animais analisados em campo aberto.

Para isso, descrevemos os seguintes objetivos específicos:

1. Verificar o efeito da administração de agonista (muscimol) e do antagonista (bicuculina) dos receptores GABAérgicos ($GABA_A$) no BLA sobre a duração do comportamento de imobilidade tônica em cobaias induzidos manualmente pela inversão e contenção postural.

2. Verificar o efeito da administração de α -metil-5HT (agonista de receptores 5-HT₂) no BLA sobre a duração do comportamento de imobilidade tônica precedida da administração de bicuculina (antagonista dos receptores $GABA_A$). Este conjunto de experimentos avaliou uma possível interação entre os sistemas serotoninérgico e GABAérgico do BLA.

3. Por fim avaliamos se a administração de muscimol, bicuculina e α -metil-5HT, bem como a interação de 5-HT-GABA altera a atividade locomotora no teste do campo aberto. A realização deste conjunto de experimentos é justificada, pois o término da resposta de IT é dependente da emissão de um comportamento motor, o reflexo de endireitamento. Desta maneira, qualquer alteração motora produzida pela manipulação farmacológica pode interferir com a duração do comportamento de IT de forma inespecífica, ou seja, não alterando o medo e/ou ansiedade do animal experimental, objeto de nosso estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

1) Animais

Neste trabalho foram utilizados cobaias machos adultos (*Cavia porcellus*, 400-500g, n=51) fornecidos pelo Biotério Central do *Campus* Administrativo da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em caixas acrílicas (56 x 17 x 39cm) sendo 5 animais por caixa, forrados com maravalha, em sala climatizada a $24\pm 1^\circ\text{C}$, com ciclo de claro escuro de 12hs

(início às 7:00h), tendo livre acesso à água e comida durante todo experimento. A manutenção dos animais e todos os procedimentos experimentais obedeceram às guias internacionais que regulamentam o uso de animais e foram submetidos à Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Prefeitura do *Campus* Administrativo da USP-RP e conta com sua aprovação (Protocolo nº06.1.735.53.9).

2) Procedimento cirúrgico

Inicialmente, os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de cetamina a 10% (30mg/Kg) e xilasina (4mg/Kg). Os animais foram colocados em um aparelho estereotáxico (David Kopf Instrumentos, USA) tendo a cabeça fixada por meio de duas barras auriculares e de um suporte bucal. A peça bucal do estereotáxico permaneceu abaixo no plano horizontal por 21,4mm em relação ao ducto auricular, sendo considerado de 14,4mm a distância do ducto ao bregma. Foi injetado, subcutaneamente, 0,2ml de xilocaína associada à adrenalina, na região do escalpo a ser aberta, para reduzir a sensibilidade dolorosa e o sangramento no local. Foi realizada assepsia da pele após tricotomia, com álcool iodado e após esses procedimentos foi realizada uma incisão longitudinal na pele da cabeça e no tecido subcutâneo. A calota craniana foi exposta e efetuada nova assepsia da região com água oxigenada 10vol. e merthiolate. Após a exposição da calota craniana foram realizados dois orifícios com auxílio de um motor elétrico de baixa rotação e de uma fresa odontológica esférica de aço inoxidável número 4. Em um orifício foi rosqueado um pequeno parafuso com a finalidade de servir de apoio para o capacete de acrílico, confeccionado com resina autopolimerizável (Simplex, Dental Fillings), o outro orifício permitiu a introdução da cânula guia na região pré-estabelecida, no núcleo basolateral da amígdala, por meio do uso das coordenadas esterotáxicas do Atlas de Rössner (1965) para cobaias.

Após a completa polimerização do acrílico, removeu-se o suporte de apoio da cânula guia acoplada a torre do esterotáxico, e colocou-se na mesma, já fixada, um mandril oclisor de aço inoxidável com 0,2mm de diâmetro e do mesmo comprimento da cânula guia, para evitar uma possível obstrução.

Trinta minutos antes do início da cirurgia, os animais receberam, via subcutânea, 1mL/kg de Banamine (Schering-Plough SA, RJ) um anti-inflamatório, antipirético e analgésico de longa duração, para contribuir com a recuperação pós-cirúrgica.

3) Registro da Imobilidade Tônica

Antes e após a realização da cirurgia, os animais foram submetidos, individualmente, a um teste de imobilidade tônica. A indução de IT foi realizada por meio da inversão postural e contenção do animal manualmente até que ele não mais apresentasse resistência a este procedimento. As mãos do experimentador foram removidas sobre o animal, e cronometrou-se as durações dos episódios de IT até o momento em que o animal retornasse a sua postura habitual, emitindo o reflexo de endireitamento. As durações dos episódios de IT foram registradas em segundos com um auxílio de um cronômetro. Estas manobras foram realizadas em uma calha em forma de "V" acolchoada com espuma, medindo 25cm de comprimento, 15cm de altura e 20cm de largura.

Foram realizadas cinco manobras de indução de IT em cada sessão, sendo que somente foram considerados para o estudo, os animais que apresentaram a duração média no episódio controle de IT acima de 45 segundos. A Figura 3 apresenta uma fotografia de uma cobaia durante um episódio de IT induzido em laboratório.



Figura 3: Fotografia de uma cobaia (*Cavia porcellus*) durante um episódio de imobilidade tônica, induzido manualmente, em laboratório.

4) Teste de campo aberto

Para excluir a possibilidade de que as drogas utilizadas em nosso estudo promoveram alterações da resposta de IT de forma não específica, por meio da alteração da atividade motora espontânea, a locomoção foi monitorada após cada tratamento, em uma caixa de polietileno opaco de 60x60x60cm com solo dividido em 16 quadrados iguais de 15cm cada (Figura 4). Para este teste, o animal foi colocado no centro da caixa e a atividade locomotora foi avaliada pela observação direta do número de quadrados percorridos por minutos, durante 5 minutos, imediatamente após o tratamento. O teste foi realizado à temperatura ambiente, com luzes artificiais, semelhante às condições que os animais estavam habituados no biotério de manutenção.



Figura 4: Fotografia da arena em polietileno opaco (60X60X60cm) utilizada em nossos experimentos, quadrados medindo 15cm de cada lado.

5) Cânula guia e microinjeção

As cânulas guias foram confeccionadas a partir de segmentos de agulhas hipodérmicas de aço inoxidável com 0,6mm de diâmetro externo e 14mm de comprimento. O implante foi realizado no hemisfério esquerdo unilateral, e as coordenadas utilizadas de acordo com o Atlas de Rössner (1965), foram as seguintes:

Núcleo basolateral da amígdala: AP= -3,4mm a partir do bregma; L= +6,2mm a partir da linha média; P= -9,0mm a partir da calota craniana.

A microinjeção foi realizada com uma seringa Hamilton de 10,0 μ L (EUA), conectada a uma agulha dental, de 0,3mm de diâmetro externo e 15mm de comprimento, por um segmento de polietileno PE-10 de aproximadamente 45cm. Dessa forma, a agulha alcançou o tecido cerebral, ultrapassando em 1mm a extremidade inferior da cânula guia. Parte do polietileno foi preenchida com a droga utilizada e a outra parte, com água destilada, tendo uma bolha de ar separando os dois líquidos. A microinjeção foi realizada sempre no volume de 0,2 μ L e durante 60 segundos. Após o término da microinjeção, a agulha foi mantida no local por aproximadamente 60 segundos para evitar o refluxo da droga.

6) Drogas utilizadas

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes drogas obtidas da Sigma (St. Louis, MO): bicuculina (bicuculina metiodina, BIC), muscimol (MUS) e alfa-metil-serotonina (α -metil-5HT) dissolvidas em solução salina 0,9% (salina, sal). As doses utilizadas foram fundamentadas em estudos anteriores de Leite-Panissi e Menescal-de-Oliveira (2002) e Leite-Panissi e cols. (2006).

7) Grupos Experimentais

Protocolo 1: Estudo da interação serotoninérgica-gabaérgica no núcleo basolateral da amígdala na modulação da imobilidade tônica em cobaias.

Antes da subdivisão dos animais em diferentes grupos experimentais, após 5-6 dias de recuperação da cirurgia, os animais foram submetidos a um episódio controle de IT, sem a aplicação de drogas, para controle pós-cirúrgico (SHAM). Após 24hs dos episódios SHAM, os animais foram divididos em três grupos experimentais.

Grupo 1 ($n=6$): os animais receberam microinjeção de bicuculina (BIC) nas doses $0,1\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$ e $0,5\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$ no BLA em dois dias consecutivos e foram submetidos a IT.

Grupo 2 ($n=7$): os animais receberam microinjeção de muscimol (MUS) nas doses de $0,014\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$ e $0,028\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$ em dois dias consecutivos e foram submetidos a IT.

Grupo 3 ($n=7$): os animais receberam microinjeção no primeiro dia de α -metil-5-HT (agonista dos receptores 5-HT₂) na dose de $0,1\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$ e no segundo dia receberam microinjeção de α -metil-5-HT na dose de $0,1\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$ precedido pela microinjeção de BIC na dose de $0,1\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$ e foram submetidos a IT nos dois dias.

Protocolo 2: Estudo da interação serotoninérgica-gabaérgica no núcleo basolateral da amígdala na locomoção em cobaias.

Em todos os grupos experimentais deste conjunto de experimentos, os animais receberam a droga em estudo e foram submetidos imediatamente após ao teste de campo aberto como descrito anteriormente.

Grupo 1 ($n=5$): os animais receberam microinjeção de salina 0,9% no volume de $0,2\mu\text{L}$ no BLA.

Grupo 2 ($n=6$): os animais receberam microinjeção de BIC na dose de $0,5\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$ no BLA.

Grupo 3 ($n=10$): os animais receberam microinjeção de muscimol na dose de $0,028\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$ no BLA.

Grupo 4 ($n=4$): os animais receberam microinjeção de BIC ($0,1\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$) seguida por α -metil na dose de $0,1\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$ no BLA.

Grupo 5 ($n=6$): os animais receberam microinjeção de α -metil na dose de $0,1\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$ no BLA.

8) Histologia

Com o término dos experimentos, os animais foram anestesiados profundamente com hidrato de cloral a 10% (0,5ml/100g de peso corporal) e perfundidos por meio do ventrículo cardíaco esquerdo com solução fisiológica de 0,9% para remoção do sangue e após com formol a 10% para a fixação dos tecidos. Passou-se então para a remoção do encéfalo dos animais, os quais foram mantidos em formol 10% por pelo menos quatro dias. Após este período foram colocados em solução de sacarose a 20% por 48hs ou até que o material migrasse para o fundo do recipiente, indicando saturação de tecido. Após a crioproteção, os encéfalos foram cortados em micrótomo de congelação (40 μ m; Microm, EUA) e realizou-se o processo histológico utilizando a técnica de coloração de Nissl. As secções foram observadas no microscópio para determinar se as microinjeções alcançaram a estrutura alvo, no caso o núcleo basolateral da amígdala, considerando as referências anatômicas do Atlas de Rössner para cobaias (1965).

9) Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média) dos cinco episódios de IT para cada animal. Para realização da análise estatística os valores de IT (em segundos) foram transformados no logaritmo natural do número sendo então analisados por meio de uma análise de variância para medidas repetidas (MANOVA). As diferenças estatísticas entre os tratamentos foram determinadas pelo teste de Tukey, considerando os dados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

No teste de campo aberto, os dados estão expressos pelo valor médio de quadrados percorridos pelo animal no período de 5 minutos \pm EPM para cada grupo experimental. Os resultados foram analisados por uma análise de variância (One-way ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, considerando os dados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Protocolo 1: Estudo da interação serotoninérgica-gabaérgica no núcleo basolateral da amígdala na modulação da imobilidade tônica em cobaias.

Inicialmente, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a administração de bicuculina (BIC, antagonista de receptores GABA_A) na dose de 0,5µg/0,2µl aumentou a duração da resposta de imobilidade tônica em cobaias (Figura 5), enquanto que a administração de muscimol (MUS, agonista para receptores GABA_A) na dose maior reduziu a duração deste comportamento (Figura 6).

Na análise individual dos grupos experimentais, no grupo 1, onde se administrou-se BIC em diferentes doses, a análise de variância mostrou diferença significativa ($F_{3,23}=4,998$, $P=0,013$, MANOVA) quando comparado a dose de BIC 0,5µg com os demais tratamentos ($P<0,05$, teste de Tukey). Ainda não há diferença significativa entre os demais tratamentos quando comparados entre si. Neste grupo experimental, a média de duração da resposta de IT no episódio controle foi de 178,34±34,02s, no SHAM 157,07±29,02s e de 231,09±68,55s e 407,33±107,08s após BIC nas doses de 0,1µg e 0,5µg respectivamente (Figura 5).

Com relação ao grupo 2, onde os animais receberam doses distintas de muscimol, a análise de variância evidenciou ($F_{3,27}=8,761$, $P<0,001$, MANOVA) diferença significativa após a administração da dose de MUS 0,028µg quando comparado a dose de MUS 0,014µg, SHAM e Controle pelo teste *post hoc* de Tukey ($P<0,05$). Em adição, não há diferença significativa entre os demais tratamentos quando comparados entre si. Neste grupo experimental, a média de duração da resposta de IT no episódio controle foi de 281,29±37,32s, no SHAM 198,31±35,39s e de 193,95±65,73s e 78,54±29,61s após MUS nas doses de 0,014µg e 0,028µg, respectivamente (Figura 6).

Avaliando a ativação de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2A} do BLA, os nossos resultados demonstram que a administração de α-metil-5-HT na dose de 0,1µg/0,2µl, promoveu diminuição significativa ($F_{3,27}=7,77$, $P<0,001$ MANOVA) da duração do comportamento de IT quando comparado ($P<0,05$, teste de Tukey) com o controle, Sham e com a administração de α-metil-5-HT precedida por BIC (0,1µg/0,2µl) (Figura 7). Além do mais, a microinjeção de uma dose de BIC que não produz alteração na resposta de IT (0,1µg/0,2µl) foi capaz de bloquear o efeito da ativação de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2A}. Vale acrescentar que não ocorreram diferenças entre os tratamentos controle, Sham e BIC+α-metil-5-HT. Neste grupo experimental, a

duração da resposta de IT no episódio controle foi de $93,28 \pm 3,78s$, no episódio Sham foi de $88,08 \pm 8s$, após o α -metil-5-HT $24,14 \pm 7,46s$ e após BIC+ α -metil-5-HT a duração da IT foi de $87,22 \pm 23,04s$ (Figura 7).

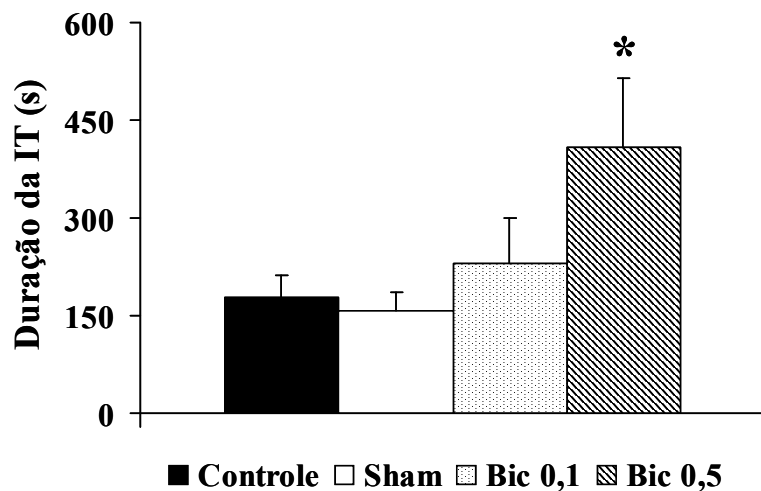


Figura 5: Representação da média da duração dos cinco episódios da resposta comportamental de Imobilidade Tônica (IT, n=6) em cobaias no episódio Controle, Sham (controle pós-cirúrgico) e após microinjeção de bicuculina (BIC) nas doses de 0,1µg/0,2µL e 0,5µg/0,2 µL no núcleo basolateral da amígdala. As barras verticais representam o erro padrão da média. *P<0,05, teste de Tukey quando comparado com os demais tratamentos.

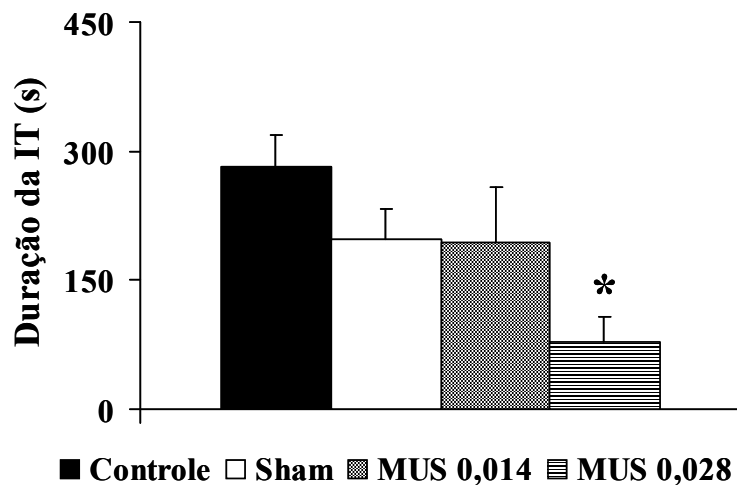


Figura 6: Representação da média da duração dos cinco episódios da resposta comportamental de Imobilidade Tônica (IT, n=7) em cobaias no episódio Controle, Sham (controle pós-cirúrgico) e após microinjeção de muscimol (MUS) nas doses de 0,014µg/0,2µL e 0,028µg/0,2 µL no núcleo basolateral da amígdala. As barras verticais representam o erro padrão da média. *P<0,05, teste de Tukey quando comparado com os demais tratamentos.

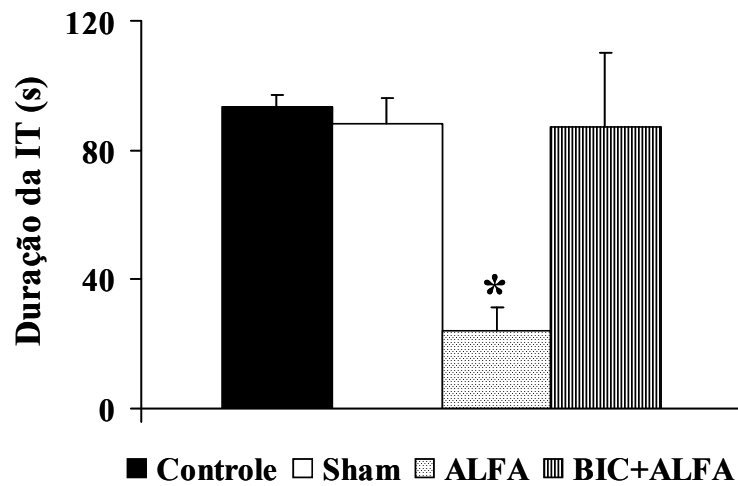


Figura 7: Representação da média da duração dos cinco episódios da resposta comportamental de Imobilidade Tônica (IT, n=7) em cobaias no episódio Controle, Sham (controle pós-cirúrgico), após microinjeção de α -metil-5-HT (alfa-metil) na dose de 0,1 μ g/0,2 μ L e após a microinjeção de bicuculina (BIC) na dose de 0,1 μ g/0,2 μ L seguida por de α -metil-5-HT na dose 0,1 μ g/0,2 μ L no núcleo basolateral da amígdala. As barras verticais representam o erro padrão da média. *P<0,05, teste de Tukey quando comparado com os demais tratamentos.

Protocolo 2: Avaliação do sistema GABAérgico e Serotoninérgico do núcleo basolateral da amígdala, na modulação da locomoção dos animais no teste de campo aberto

Nos grupos experimentais onde se realizou o teste do campo aberto a análise estatística demonstrou que não foram observadas alterações na atividade locomotora ($F_{4,30}=0,897$, $P=0,480$ One-Way ANOVA) após os diferentes tratamentos realizados (Figura 8). Neste conjunto de experimentos, a média de cruzamentos no grupo controle foi de $0,80\pm 0,37$, $1,33\pm 0,49$ após BIC na dose de $0,5\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$, $0,60\pm 0,22$ após MUS na dose de $0,028\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$, $0,50\pm 0,34$ após α -metil-5-HT na dose de $0,1\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$ e de $0,50\pm 0,50$ após o tratamento com BIC ($0,1\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$) seguida por α -metil-5-HT na dose de $0,1\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$.

As figuras 9A e B apresentam os sítios de microinjeção evidenciando os locais das microinjeções no núcleo basolateral da amígdala, após os diferentes tratamentos nos Protocolos 1 e 2 descritos. A figura 10 apresenta uma fotomicrografia de um animal representativo dos grupos experimentais realizados neste estudo.

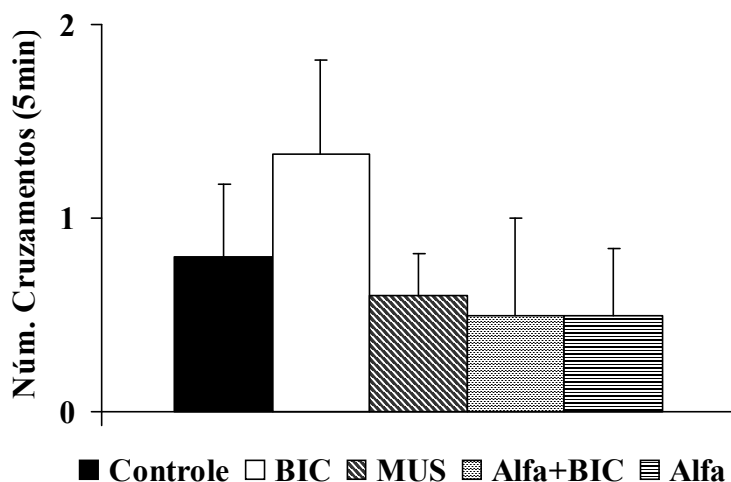


Figura 8: Representação do número de cruzamentos no teste do campo aberto em cobaias durante o tempo de 5 minutos após administração de solução salina 0,9% (Controle, $0,2\mu\text{L}$, $n=5$), após a administração de bicuculina (BIC, $n=6$) na dose de $0,5\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$, após a administração de muscimol (MUS, $n=10$, $0,028\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$), após a administração de α -metil-5-HT na dose de $0,1\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$ ($n=6$) e após a administração de α -metil-5-HT (alfa-metil) precedida por BIC (Alfa+BIC, $n=4$, $0,1\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$ para a BIC). As barras verticais representam o erro padrão da média.

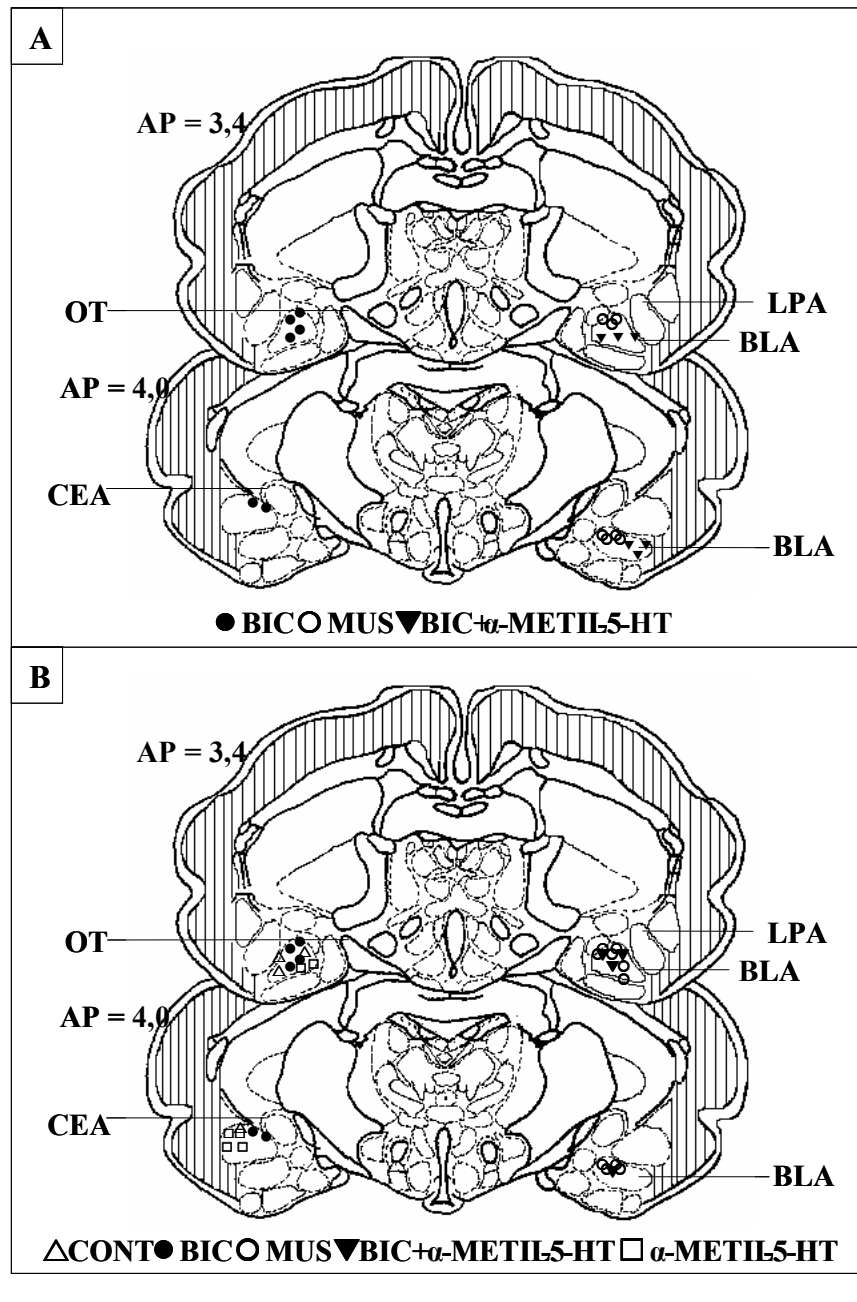


Figura 9: Representação esquemática de secções frontais obtidas em planos representativos da amígdala de cobaia. Em A: localização dos sítios de microinjeção dos animais submetidos à resposta de imobilidade tônica após a administração de bicuculina nas doses 0,1 μ g e 0,5 μ g (● BIC, n=6), muscimol nas doses de 0,014 μ g e 0,028 μ g (○; MUS, n=7) e no grupo onde administrou-se α -metil-5-HT e BIC+ α -metil-5-HT (▼; n=7). Em B: localização dos sítios de microinjeção dos animais submetidos ao teste de campo aberto após administração de solução salina 0,9% (0,2 μ L, n=5; Δ CONT), após BIC (●, n=6), após MUS (○, n=10), após o tratamento com BIC+ α -metil-5-HT (▼, n=4) e após a administração de α -metil-5-HT (□, n=6) no BLA. Todas as microinjeções foram realizadas no lado esquerdo, porém a representação é feita em ambos os lados para melhorar a visualização.

Legenda: AP: núcleo Antero-posterior; BLA: núcleo basolateral da amígdala; CEA: núcleo central da amígdala; Cx: córtex cerebral; LPA: núcleo lateral posterior da amígdala; OT: trato óptico.

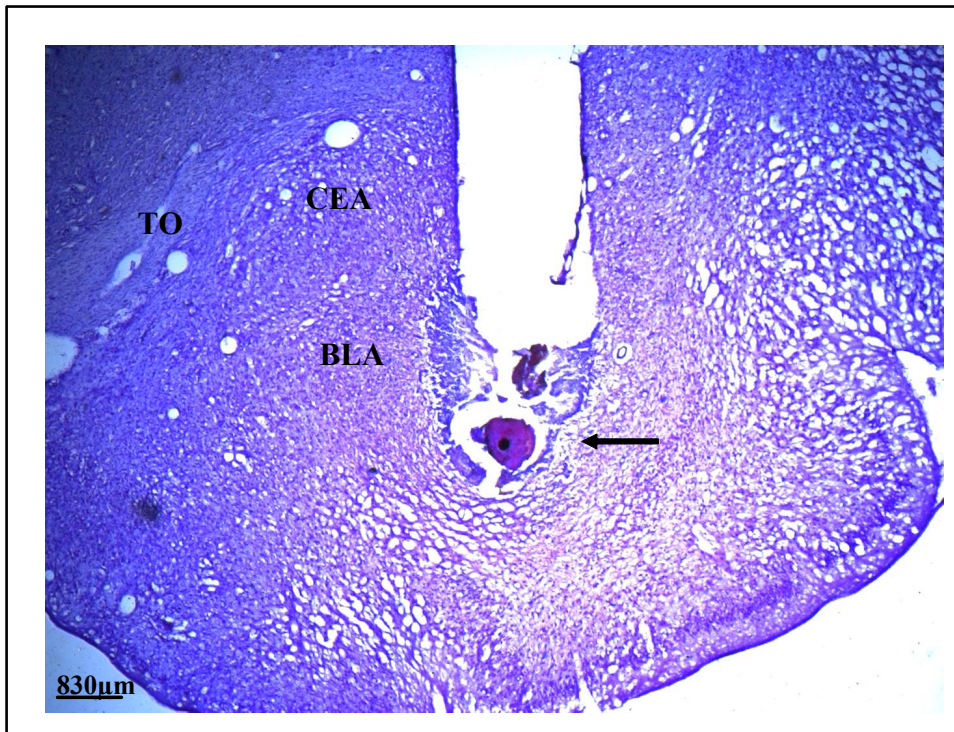


Figura 10: Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um animal representativo dos grupos experimentais apresentados neste trabalho com cânula-guia dirigida para o núcleo basolateral da amígdala (BLA) após coloração pela técnica de Nissl. Aumento de 10X. Legenda: CEA; núcleo central da amígdala; TO: trato óptico.

DISCUSSÃO

Participação do sistema GABAérgico no núcleo basolateral da amígdala na modulação do comportamento de imobilidade tônica em cobaias.

Com relação ao envolvimento do sistema GABAérgico do BLA na modulação da resposta defensiva de IT em cobaias, nossos resultados mostraram que a ativação de receptores do tipo GABA_A, por meio da administração de muscimol, promoveu redução deste comportamento, sugerindo efeito ansiolítico ou de redução do medo. Por outro lado, o tratamento com bicuculina (antagonista de receptores GABA_A) foi capaz de produzir aumento da duração da IT, possivelmente devido a um efeito ansiogênico. Este resultado reforça ainda, a hipótese da participação tônica do sistema GABAérgico do núcleo basolateral da amígdala na modulação das respostas emocionais.

Com relação à amígdala, vários são os achados da literatura que apontam esta estrutura e suas projeções eferentes como representantes de um circuito envolvido na modulação tanto da expressão como da aquisição do medo condicionado e também incondicionado (LeDoux, 1998; Davis, 1992a, b e 1997). Além disso, a amígdala está envolvida em processos pelos quais os estímulos tornam-se perigosos ou aversivos (Davis, 1992), sendo que a estimulação elétrica desta estrutura produz alterações autonômicas e comportamentais semelhantes àquelas que resultam da apresentação de sinais ameaçadores (Chapman e cols., 1954; Feindel e Penfield, 1954; Nagy e cols., 1979). Neste contexto, estudos que realizaram mapeamento funcional utilizando o proto-oncogene *c-fos* como marcador de atividade neuronal, têm confirmado que a amígdala é ativada após a exposição a um estímulo ameaçador (Campeau e cols., 1991). Com base nestas informações, a amígdala é uma estrutura que frequentemente está implicada nas respostas de medo e ansiedade, sendo assim, muitos estudos têm mostrado que injeções de benzodiazepínicos (Bdzs) nesta estrutura produzem efeitos ansiolíticos (Sanders e Shekhar, 1995a). Além do mais, corroborando com nossos resultados, a administração de um agonista inverso dos receptores Bdzs, o qual reduz a transmissão GABAérgica nos núcleos lateral posterior ou basolateral, mostrou potente efeito ansiogênico destes compostos por meio da utilização do teste de conflito social em ratos (Hodges e cols., 1987). Considerando que o comportamento de IT depende da presença de medo intenso (Klemm, 1971; Gallup, 1977) fica claro que qualquer alteração na modulação do medo e/ou da ansiedade pode interferir com a emissão desta resposta defensiva.

Estudos de Akirav e cols. (2006), sobre o sistema telencefálico GABAérgico mostrou que há grande envolvimento dos receptores GABA_A na plasticidade existente entre o córtex pré-frontal ventromedial e o núcleo basolateral da amígdala. Ainda, esta plasticidade parece ser essencial para os processos emocionais e motivacionais de medo condicionado e incondicionado. Assim, é possível que os receptores GABA_A do complexo amigdalóide, em particular do núcleo basolateral, participem da sinalização inibitória das reações do medo em diferentes mecanismos modulatórios (Samson e cols., 2003).

Vários estudos realizados por meio de técnicas eletrofisiológicas e manipulações farmacológicas (Ben-Ari e Kelly, 1976; Le Gal Salle e Ben-Ari, 1981; Takaji e Yamamoto, 1981) indicam que a porção basolateral da amígdala possui um sistema inibitório potente, o qual utiliza o GABA como um dos seus principais neurotransmissores. Em adição, a amígdala basolateral tanto de ratos (Marcel e cols., 1986; Niehoff e Kuhar, 1983), como de humanos (Niehoff e Whitehouse, 1983; Zezula e cols., 1988) possui alta concentração de receptores Bdzs, quando comparados com outros núcleos amigdalóides. Estes sítios modulatórios benzodiazepínicos participam como facilitadores dos mecanismos GABAérgicos, e promovem inibição neuronal no núcleo basolateral da amígdala (Chou e Wang, 1977). Em vista do exposto, achados de Scheel-Kruger e Petersen (1982) demonstraram que a administração do agonista de receptores GABA_A, muscimol, no núcleo basolateral da amígdala, produziu efeito anticonflito (ansiolítico) em ratos, similares àqueles obtidos com microinjeção de Bdzs na mesma área, com o mesmo teste.

Considerando a circuitaria GABAérgica do BLA, estudos anátomo-fisiológicos (Muller e cols., 2006) mostraram que que 50% dos interneurônios GABAérgicos do núcleo basolateral da amígdala realizam interações sinápticas com neurônios piramidais locais, sendo estas sinapses extremamente importantes na determinação da atividade neural desta região, determinando o ritmo de oscilação de potenciais de ação local, o qual seria responsável pelo processamento das aferências sensoriais envolvidas nos processos de atenção e plasticidade sináptica (Singer, 1993). Além do envolvimento do sistema GABAérgico, evidências tem mostrado que a atividade basal dos neurônios de projeção do BLA é regulado, mais especificamente, por um balanço entre a inibição GABAérgica e a excitação glutamatérgica (Rainnie e cols., 1991; Smith e Dudek, 1996). Dentro deste contexto, trabalhos têm demonstrado que a administração de antagonistas dos receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA

(N-metil-D-aspartato) (Campeau e Davis, 1995; Kim e McGaugh, 1992; Miserendino e cols., 1990) ou do subtipo não-NMDA (Bianchin e cols., 1993; Kim e Campeau, 1993; Mesches e cols., 1996) no núcleo basolateral da amígdala, reduziu respostas de ansiedade, bem como bloqueou a aquisição e a expressão do medo condicionado. Isto mostra que tanto a excitação glutamatérgica bem como a inibição GABAérgica do BLA é crítica na elaboração de respostas emocionais relacionadas com estados de medo e ansiedade.

Considerando os resultados do presente trabalho, podemos sugerir que a microinjeção de muscimol no BLA promoveu aumento da atividade dos receptores GABAérgicos, provavelmente presente nos neurônios piramidais glutamatérgicos eferentes locais (Rainnie, 1999), causando alteração (diminuição) da oscilação dos ritmos de disparos sinápticos excitatórios eferentes para outras regiões, tal como o núcleo central da amígdala (CEA) e para a substância cinzenta periaquedutal (SCP), principais áreas de projeção do BLA (Da Costa Gomez e cols., 1996). Dentro desta perspectiva, estudo de Martinez e cols. (2006) demonstrou que o congelamento pós-estimulação elétrica da SCP dorsal pode ser modulado por aferências amigdalóides, sendo esta modulação com característica ansiolítica. Estes dados podem dar suporte aos nossos achados, onde a estimulação GABAérgica do BLA promoveu redução da duração da IT em cobaias, sugerindo efeito ansiolítico.

Ainda investigando o envolvimento do circuito GABAérgico amigdalóide na modulação emocional, Sanders e Shekhar (1995b), demonstraram que o bloqueio da inibição GABAérgica na região anterior do núcleo basolateral da amígdala de ratos, elicia mudanças fisiológicas que podem ser associadas com reações defensivas. Dentre estas alterações tem sido reportado aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca, acompanhados de aumento da ansiedade (Sanders e Shekhar, 1991 e 1995; Sanders e cols., 1995). Ainda, foi demonstrado que microinjeções de droga que bloqueia a função do receptor GABA_A (Bicuculina na dose de 20pmol) na região do núcleo basolateral da amígdala pode ocorrer aumento da atividade cardíaca e de sinais de fulga, sugerindo a existência de um circuito GABAérgico tônico nesta região (Sanders e Shekhar 1995b). Semelhante resultado foi obtido com o bloqueio GABAérgico, por meio da administração de bicuculina, no núcleo central da amígdala promovendo aumento da duração da resposta defensiva de imobilidade tônica em cobaias (Leite-Panissi e Menescal-de-Oliveira, 2002) e o efeito ansiogênico deste tratamento. Juntos, estes achados dão suporte aos nossos resultados que demonstram que a administração *per se*

de bicuculina (0,5µg) no BLA é capaz de promover efeito ansiogênico e/ou aumento do medo, o qual pode ser observado pelo acréscimo na duração da resposta defensiva inata de imobilidade tônica em cobaias. Ainda, podemos sugerir que em nosso caso, o efeito obtido com a ativação (administração de muscimol) ou inibição da transmissão GABAérgica (tratamento com bicuculina) do BLA tenha ocorrido especificamente pela alteração dos níveis de medo e ansiedade, e não pela ativação de outro tipo de comportamento, tal qual a locomoção descrita por Sanders e Shekhar (1995a). Isso porque a administração no BLA de doses efetivas na modulação da IT de muscimol (0,028µg) ou de bicuculina (0,5µg) não produziram qualquer alteração na locomoção dos animais avaliados no teste do campo aberto. Estas observações são justificadas considerando que a resposta de IT é um comportamento de inibição motora, e o seu término depende da emissão do reflexo de endireitamento. Desta maneira, uma alteração motora induzida pela manipulação farmacológica poderia alterar a duração deste comportamento sem, no entanto estar relacionada com a modulação da resposta emocional de medo inato, parâmetro indicado pela duração da resposta de IT (Klemm, 1971, Ratner, 1967).

Fundamentado nos achados da literatura, podemos explicar nossos resultados sobre a modulação GABAérgica do BLA sugerindo que a diminuição da atividade inibitória dos interneurônios GABAérgicos no BLA por meio da administração de bicuculina promoveu alteração na atividade basal dos neurônios glutamatérgicos piramidais locais, alterando o ritmo de despolarização dos mesmos (Singer, 1993) e levando a alteração da emissão de respostas comportamentais emocionais, tal como a resposta de IT.

Interação GABAérgica-Serotoninérgica no núcleo basolateral da amígdala na modulação do comportamento de imobilidade tônica.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a modulação serotoninérgica no BLA da resposta de IT em cobaias é dependente da ativação de pelo menos uma sinapse GABAérgica. Isto porque, embora a ativação de receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT₂ no BLA, pela administração de α -metil-5-HT, promova redução do comportamento de IT (Leite-Panissi e cols., 2006), o bloqueio de receptores GABA_A, por meio do pré-tratamento com bicuculina (0,1µg) no mesmo sítio, é capaz de bloquear este efeito de redução do medo e/ou da ansiedade.

Considerando a anatomia e fisiologia do sistema serotoninérgico, os receptores serotoninérgicos podem ser agrupados em sete classes de receptores, definidos entre 5-HT₁ e 5-HT₇ (Hoyer, 1996). Em adição, há múltiplos subtipos de receptores 5-HT no sistema nervoso central, sendo que a amígdala possui níveis de moderados a altos de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄ e 5-HT₆ (Barnes e cols., 1989; Eglen e cols., 1995; Morales e cols., 1996; Morilak e cols., 1993; Radja e cols., 1991; Ward e cols., 1995). Esta distribuição de receptores 5-HT não é homogênea considerando os distintos núcleos amigdalóides. Assim, os receptores 5-HT_{1A} são encontrados predominantemente no núcleo central da amígdala, enquanto que, os subtipos 5-HT₂, 5-HT₃ e 5-HT₆ são encontrados preferencialmente no BLA. Funcionalmente, a serotonina, bem como os diferentes subtipos de receptores 5-HT, são considerados importantes moduladores dos circuitos relacionados com ansiedade, porém os mecanismos através dos quais a serotonina e os receptores 5-HT participa destes circuitos em associação com respostas fisiológicas e comportamentais não são totalmente entendidas (Iversen, 1984; Handley, 1995; Graeff e cols., 1996, 1997; Maier e Watkins, 1998, 2005; Millan, 2003).

De fato, a amígdala tem sido crucialmente implicada na modulação do medo e da ansiedade (Davis, 1992). Em adição, foi encontrado aumento da liberação de serotonina no complexo amigdalóide em ratos submetidos a situações que produzem aumento da ansiedade, tal como a retirada abrupta de diazepam (Fernandez e cols., 1994), bem com em animais submetidos a estresse emocional agudo (Kawahara e cols., 1993). Anatomicamente, esta aferência serotoninérgica amigdalóide tem origem no núcleo dorsal da rafe (Ma e cols., 1991; Azmitia e Segal, 1978), realizando sinapse principalmente no núcleo basolateral da amígdala. Ainda, estudos indicam que receptores pós-sinápticos serotoninérgicos amigdalóides modulam a ansiedade (Gonzalez e cols., 1996). Neste estudo, a microinjeção bilateral do agonista seletivo para receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, no núcleo basolateral da amígdala aumentou o comportamento de interação social em ratos, indicando efeito ansiolítico. No entanto, este mesmo tratamento não alterou a resposta no teste do labirinto em cruz elevado. Outros trabalhos demonstraram efeitos distintos após a administração do 8-OH-DPAT no núcleo basolateral da amígdala. No paradigma de Geller-Seifter observou-se efeito ansiogênico, com microinjeção de 8-OH-DPAT (doses de 125ng e 500ng/0,5µL) (Hodges e cols., 1987), por outro lado o mesmo tratamento, com microinjeção de 8-OH-DPAT (doses de 8nmol e 16nmol), promoveu efeito ansiolítico, no teste do labirinto em

T elevado (Zangrossi e cols. 2001). Em conjunto, estas observações demonstram que a atividade serotoninérgica da amígdala, especialmente do núcleo basolateral, é complexa e pode envolver distintas relações entre outros sistemas de neurotransmissores, bem como ter sensibilidade diferente de acordo com o tipo de modelo experimental abordado.

Em estudo recente envolvendo a neurotransmissão serotoninérgica do núcleo basolateral da amígdala a ativação de receptores do tipo 5-HT_{1A}, bem como de receptores 5-HT₂, promoveu redução do comportamento defensivo de IT (Leite-Panissi e cols., 2006). Neste estudo, os autores aventam a possibilidade de que o mecanismo de ação dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₂ seriam distintos, considerando que tanto a ativação de um receptor inibitório (5-HT_{1A}) como excitatório (5-HT₂) teriam efeito ansiolítico ou de redução do medo, promovendo redução da resposta de IT em cobaias. Neste estudo demonstramos que o efeito da administração do agonista para receptores 5-HT₂, o α -metil-5-HT, seria mediado pela ativação de receptores GABA_A, desde que o tratamento prévio com bicuculina (0,1 μ g) bloqueou a redução da IT resultante da ativação de receptores 5-HT₂ do BLA. De maneira semelhante aos nossos resultados, trabalho de Stutzmann e LeDoux (1999), mostrou que a serotonina modula as aferências sensoriais excitatórias, proveniente do tálamo e do córtex acústico, no núcleo lateral da amígdala, por meio da ativação de interneurônios GABAérgicos, os quais, modulam localmente os neurônios glutamatérgicos eferentes. Reforçando esta interação serotoninérgica-GABAérgica, Rainnie (1999) relatou que a liberação aguda de serotonina no núcleo basolateral da amígdala pode diretamente ativar interneurônios GABAérgicos, via ativação de receptores 5-HT₂, aumentando a frequência de eventos sinápticos inibitórios em neurônios piramidais glutamatérgicos de projeção. A interação dinâmica entre a expressão relativa de PEPSs e PIPSs no núcleo basolateral da amígdala pode ser diretamente influenciado por manipulações farmacológicas tanto da transmissão glutamatérgica, como GABAérgica promovendo alterações marcantes nas respostas comportamentais em estudo (Davis e cols., 1994). Conseqüentemente, se as monoaminas neuromodulatórias, como a serotonina, alterar o balanço normal entre a transmissão excitatória e inibitória, é possível que possam ocorrer modificações nas respostas comportamentais dependentes deste processamento (Rainnie, 1999).

Em muitas áreas do sistema nervoso central, os principais receptores que medeiam à inibição serotoninérgica pós-sináptica é o subtipo de receptor 5-HT_{1A} (Saxena, 1995), porém os baixos níveis de expressão dos receptores 5-HT_{1A} no BLA,

sugerem que a inibição mediada pela serotonina nos disparos celulares do BLA pode não resultar da ativação direta dos receptores pós-sinápticos 5-HT_{1A}, mas através de uma inibição indireta da liberação do glutamato via ativação pré-sináptica dos receptores 5-HT_{1A} (Bocker e Williams, 1989). Ainda, a expressão dos receptores 5-HT₂ em interneurônios do núcleo basolateral da amígdala sugere que a inibição dos potenciais de ação neuronais podem ser facilitados por excitação direta de interneurônios GABAérgicos (Alreja, 1996; Sheldon e Aghajanian, 1991). Corroborando com estes achados, Rainnie (1999) demonstrou que atividade neural no BLA é regulada por uma interação recíproca complexa entre neurônios de projeção e interneurônios, de dois modos distintos. Inicialmente, a ação da serotonina seria via excitação de interneurônios provavelmente via ativação de receptores 5-HT₂ pós-sináptico, e esta ativação pode resultar em concomitante inibição indireta de neurônios de projeção por aumento da liberação de GABA e ativação de receptores GABA_A. Por outro lado, há uma minoria de neurônios de projeção, onde a serotonina possui ação inibitória direta via ativação de receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos.

Interação semelhante, envolvendo circuitarias serotoninérgicas e GABAérgicas semelhantes a que ocorre no complexo amigdalóide pode ocorrer em todo sistema nervoso central. No hipocampo, neurônios serotoninérgicos do núcleo medial da rafe inervam densamente interneurônios GABAérgicos na região CA1 hipocampal (Moore e Halaris, 1975). Nestes neurônios, pode ser identificada alta densidade de receptores 5-HT₃, responsáveis por suprimir o disparo das células piramidais CA1 (Ropert e Guy, 1991). Em adição, em neurônios cerebelares que recebem aferências serotoninérgicas é observada interação semelhante, onde a ativação serotoninérgica reduz a liberação de aminoácidos excitatórios, por meio do aumento do efeito inibitório da neurotransmissão GABAérgica (Kitzman e Bishop, 1997).

Avaliando o substrato neural envolvido nestes processos emocionais e motivacionais, a amígdala, juntamente com a substância cinzenta periaquedutal (SCP) e o hipotálamo medial, são considerados integrantes de um circuito fundamental encefálico que comanda comportamentos defensivos emocionais aversivos. De fato, a estimulação elétrica ou química destas regiões induz padrões de comportamentos defensivos espécie-específico (Graeff, 1990). Em adição, tanto a amígdala como a SCP são inervadas por fibras serotoninérgicas originárias do núcleo dorsal da rafe (Azmitia, 1978). Estas fibras nervosas são finas, com pequenas varicosidades, estabelecendo contato preferencialmente com receptores 5-HT_{2A/2C} (McTavish e Heel, 1992). Além

disso, a estimulação do núcleo dorsal da rafe resulta em facilitação de disparo em neurônios de sub-regiões da amígdala (Jacobs, 1972), bem como a aplicação iontoforética de 5-HT na amígdala de ratos, reduz a ativação glutamatérgica (Mah e Cunningham, 1993; Stutzman e cols., 1998).

A relação dos mecanismos serotoninérgicos na modulação da IT, tem sido demonstrada também por meio de estudos sistêmicos (Wallnau e Gallup, 1977; Wallnau e cols., 1981). Porém, a interpretação destes dados em comparação com os obtidos neste estudo não é possível desde que os estudos anteriores citados utilizam abordagens sistêmicas, o que, conseqüentemente altera a neurotransmissão serotoninérgica em todo o organismo, incluindo o sistema nervoso central e não apenas em uma estrutura em particular, como investigamos neste estudo o núcleo basolateral da amígdala.

Por fim, vale ressaltar que a manipulação serotoninérgica, bem como a interação serotoninérgica-GABAérgica realizada em nosso estudo, possivelmente, foi capaz de alterar apenas a expressão de respostas relacionadas ao medo e/ou ansiedade, sem estar comprometida com alterações motoras. Isto porque a administração de α -metil-5-HT, bem como o tratamento com bicuculina seguida por α -metil-5-HT, não alterou a locomoção em cobaias avaliadas no teste do campo aberto.

CONCLUSÕES

- Nossos resultados demonstraram que o sistema GABAérgico do núcleo basolateral da amígdala quando ativado tem efeito ansiolítico e/ou de redução do medo, evidenciado pela redução da duração da resposta de IT em cobaias.
- O sistema GABAérgico do BLA possui envolvimento tônico na modulação comportamental emocional desde que a administração *per se* de bicuculina (antagonista de receptores GABA_A) produziu aumento do comportamento de IT em cobaias, sugerindo efeito ansiogênico desta estimulação.
- Foi observada interação entre os sistemas serotoninérgico-GABAérgico do BLA envolvido na modulação da IT. Isto porque a redução do comportamento defensivo de IT promovido pela administração de agonista para receptores 5-HT₂, α -metil-5-HT, no BLA, é bloqueado pelo pré-tratamento com bicuculina (antagonista GABA_A) no mesmo sítio.
- Finalmente, as manipulações dos sistemas GABAérgico e serotoninérgico realizadas em nosso estudo, em doses que produziram efeitos comportamentais, não alteraram a locomoção em cobaias avaliadas no teste do campo aberto. Estes resultados demonstram a especificidade das manipulações farmacológicas em promover alterações dos níveis de medo e/ou ansiedade e não um efeito secundário devido a possibilidade de alteração da atividade motora, que por si só poderia interferir na expressão da resposta defensiva de imobilidade tônica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, J. K.; JOHNSON, P. L.; HAY-SCHMIDT, A.; MIKKELSEN, J. D.; SHEKHAR, A.; LOWRY, C. A. Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs. *Neuroscience* 133: 983-997, 2005.
- ADOLPHS, R. The neurobiology of social cognition. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11(2): 231-239, 2001.
- AGGLETON, J. P. The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. *Trends. Neurosci.* 16: 328-333, 1993.
- AKIRAV, I.; RAIZEL, H.; MAROUN, M. Enhancement of conditioned fear extinction by infusion of the GABA_A agonist muscimol into the rat prefrontal cortex and amygdala. *Eur. J. Neurosci.* 23: 758-764, 2006.
- ALFORD, S.; GRILLNER, S. The involvement of GABA_B receptors and coupled G-proteins in spinal GABAergic presynaptic inhibition. *J. Neurosci.* 11: 3718-3726, 1991.
- ALHEID, G. F.; HEIMER, L. New perspective in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatry disorder: the striatopallidal amygdaloid and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27(1): 1-39, 1988.
- ALREJA, M. Excitatory actions of serotonin on GABAergic neurons of the medial septum and diagonal band of Broca. *Synapse* 22: 15-27, 1996.
- AMARAL, D. G.; E COL., In: The amygdala: Neurobiological Aspects of emotion, memory and mental dysfunction (Aggleton, J. P., ed), pp. 1-66, Wiley-Liss, 1992.
- AMARAL, D. Memory: anatomical organization of candidate brain regions In: **Handbook of Physiology**. Sect.1: Neurophysiology, Vol 5: Higher Function of the brain, F. Plum. Ed. Pp. 211-294, American Physiological Society, Bethesda, MD, 1987.
- AMAT, J.; MATUS-AMAT, P.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat. *Brain Res.* 812: 113-120, 1998.
- AWAPARA, J.; LANDUA, A. J.; FUERST, R.; SEALE, B. Free gamma-aminobutyric acid in the brain. *J. Biol. Chem.* 187: 35-39, 1950.
- AZMITIA, E.C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 179: 641-668, 1978.
- BAPTISTA, V. **Participação do sistema colinérgico da formação hipocampal dorsal na modulação da imobilidade tônica em cobaias.** Ribeirão Preto, 2000. 94p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

- BARNES, J. M.; BARNES, N. M.; COSTALL, B.; IRONSIDE, J. W.; NAYLOR, R. J. Identification and characterization of 5-hydroxytryptamine 3 recognition sites in human brain tissue. **J. Neurochem.** 53: 1787-1793, 1989.
- BARRET, J.; VANOVER, K. E. 5-HT receptors as targets for the development of novel anxiolytic drugs: Models, mechanisms and future directions. **Psychopharmacol.** 112: 1-12, 1993.
- BAXTER, G.; KENNETT, G.; BLANEY, F.; BLACKBURN, T. 5-HT² receptor subtypes: A family re-united? **Trends Pharmacol. Sci.** 16: 105-110, 1995.
- BEITZ, A. J. The organization of afferent projections to the midbrain periarqueductal gray of the rat. **Neuroscience** 7: 133-159, 1982.
- BEN-ARI, Y.; KAMAZAWA, T.; IUGMOND, Z. E. Regional distribution of glutamate decarboxylase and GABA within the amygdaloid complex and stria terminalis system of the rat. **J. Neurochem.** 26: 1279-1283, 1976.
- BEN-ARI, Y.; KELLY, J. S. Dopamine evoked inhibition of single cells of the feline putamen and basolateral amygdala. **J. Physiol. Lond.** 256: 1-21, 1976.
- BIANCHIN, M.; WALZ, R.; RUSCHEL, A. C.; ZANATTA, M. S.; DA SILVA, R. C.; BUENO E SILVA, M.; PACZKO, N.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Memory expression is blocked by infusion of CNQX into the hippocampus and or amygdala up to 20 days after training. **Behav. Neural Biol.** 59: 83-86, 1993.
- BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches of the biology of emotion. **Ann. Rev. Psychol.**, 39: 43-68, 1988.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Affect and aggression: An animal model applied to human behavior. In advances in the study of aggression, Vol. I, R. J. Blanchard and D. C. Blanchard (Eds.), PP. 2-63, academic Press. 1984.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.** 13: S3-S14, 1989.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. Annual Review of Psychology, Vol. 39, Annual Reviews, Palo Alto, 1988.
- BOBKER, D. H.; WILLIAMS, J. T. Serotonin agonists inhibit synaptic potentials in the rat rat locus ceruleus in vitro via 5-hydroxytryptamine_{1A} and 5-hydroxytryptamine_{1B} receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 250: 37-43, 1989.
- BORMANN, J. Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. **Trends Neurosci.** 11: 112-116, 1988.
- BOWERY, N. G. GABA_B receptor pharmacology. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 33: 109-147, 1993.

- BOWERY, N. G.; DOBLE, A.; HILL, D. R.; HUDSON, A. L.; SHAW, J. S.; TURNBULL, M. J.; WARRINGTON, R. Bicuculline-insensitive GABA receptors on the peripheral autonomic nerve terminals. **Eur. J. Pharmacol.** 71: 53-70, 1981.
- BOWERY, N. G.; HILL, D. R.; HUDSON, A. L.; SHAW, J. S.; TURNBULL, M. J.; DOBLE, A.; MIDDLEMISS, D. N. (-) Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. **Nature** 283: 92-94, 1980.
- BOWERY, N. G.; HUDSON, A. L.; PRICE, G. W. GABA_A and GABA_B receptor site distribution in the rat central nervous system. **Neurosci** 20; 365-383, 1987.
- BRADLEY, P. B.; ENGEL, G.; FENIUK, W.; FOZARD, J. R.; HUMPHREY, P. P. A.; MIDDLEMISS, D. N.; MYLECHARANE, E. J.; RICHARDSON, B. P.; SAXENA, P. R. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. **Neuropharmacol.** 25: 563-576, 1986.
- BRODAL, A. As vias olfatórias. A amígdala. O hipotálamo. O sistema límbico. Em: Anatomia Neurológica com correlações clínicas. Livraria Roca (editora). Brasil, 515-562, 1984.
- CAHILL, L.; RICHARD, J. H.; JAMES, F.; MICHAEL, T. A.; CHEUK, T.; DAVID K.; JOSEPH, W.; JAMES, L. M. Amygdala activity at encoding correlated with long-term, free recall of emotional information. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93:8016-8021, 1996.
- CALTON, J. L.; KANG, M. H.; WIJSON, W. A.; MOORE, S. D. NMDA-receptors-dependent synaptic activation of voltage-dependent calcium channels in basolateral amygdala. **J. Neurophysiol.** 83: 685-692, 2000.
- CAMPEAU, S.; DAVIS, M. 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. **J. Neurosci.** 15: 2301-2311, 1995.
- CAMPEAU, S.; HAYWARD, M. D.; HOPE, B. T.; ROSEN, J. B.; NESTLER, E. J.; DAVIS, M. Induction of *c-fos* proto-oncogene in rat amygdala during unconditioned and conditioned fear. **Brain Res.** 565: 349-352, 1991.
- CANTERAS, N. S. Análise crítica dos sistemas neurais envolvidos nas respostas de medo inato. **Rev. Bras. Psiquiatr.** 25 (Supl 2): 21-24, 2003.
- CARLI, G. Blood pressure and heart rate in the rabbit during animal hypnosis. **Electroenceph. Clin. Neurophysiol.**, 37:231-237, 1974.
- CARLI, G. Depression of somatic reflexes during rabbit hypnosis. **Brain Res.** 11:453-456, 1968.
- CARLSEN, J. Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in the rat basolateral amygdaloid nucleus with special reference to GABAergic innervations of amigdalostriatal projection neurons. **J. Comp. Neurol.** 273: 513-526, 1988.
- CARLTON, P.L. Brain acetylcholine and inhibition. J.T. Tappé (ed), Reinforcement and Behavior. **New York Academic**, 1969.

- CARLTON, P.L. Cholinergic mechanisms in central behavior. *Psychopharmacology: a review of papers 1957-1967. Public Health Service Publication*, 1968.
- CHAPMAN, P. F.; KAIRISS, E. W.; KEENAN, C. L.; BROWN, T. H. Long-term synaptic potentiation in the amygdale. *Synapse* 6: 271-278, 1990.
- CHAPMAN, W. P.; SCHOROEDER, H. R.; GEYER, G.; BRAZIER, M. A. B.; FAGER, C.; POPPEU, J. L.; SOLOMON, H. C.; YAKOLEV, P. I. Physiological evidence concerning the importance of the amygdaloid nuclear region in the integration of circulating function and emotion in man. *Science*, 129: 949-950, 1954.
- CHOU, D. T.; WANG, S. C. Unit activity of the amygdala and hippocampal neurons: Effects of morphine and benzodiazepines. *Brain Res.* 126: 427-440, 1977.
- CHU, D. C. M.; ALBIN, R. L.; YOUNG, A. B.; PENNEY, J. B. Distribution and kinetics of GABA_B binding sites in the rat central nervous system: a quantitative autoradiographics study. *Neuroscience* 34: 341-357, 1990.
- COBB, S. R.; BUHL, E. H.; HALASY, K.; PAULSEN, P.; SOMOGYI, P. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378: 75-78, 1995.
- COBB, S. R.; HALASY, K.; VIDA I.; NYIRI, G.; TAMAS, G.; BUHL, E. H.; SOMOGYI, P. Synaptic effects of identified interneurons innervating both interneurons and pyramidal cell in the rat hippocampus. *Neuroscience* 79: 629-648, 1997.
- COLLINS, D. R.; PARÉ, D. Reciprocal changes in the firing probability of lateral and central medial amygdala neurons. *J. Neurosci.* 19: 836-844, 1999.
- COLLINS, D. R.; PELLETIER, J. G.; PARÉ, D. Slow and fast (gamma) neuronal oscillation in the perirhinal cortex and lateral amygdala. *J. Neurophysiol.* 85: 1661-1972, 2001.
- COMPAN, V.; DAUZUTA, A.; PASCAL, S.; SELEBEN, M.; BOCKAERT, J.; DUMUIS, A. Lesion study of the distribution of serotonin 5-HT₄ receptors in the rat ganglia and hippocampus. *Europ. J. Neurosci.* 8 (12): 2591-2598, 1996.
- CRUNELLI, V.; LERESCHE, N. A role for GABA_B receptors in excitation and inhibition of thalamocortical cells. *Trends Neurosci.* 14: 16-21, 1991.
- DA COSTA GOMEZ, T.; CHANDLER, S. D.; BEHBEHANI, M. M. Therole of basolateral nucleus of the amygdala in the pathway between yhe amygdala and the midbrain periaqueductal gray in the rat. *Neurosci. Letters* 214: 5-8, 1996.
- DAVIDSON, R. J.; PIZZAGALLI, D.; NITSCHKE, J. B.; PUTMAM, K. Depression: perspectives from affective neuroscience. *Ann. Rev. Psych.* 53: 545-574, 2002.
- DAVIS, M. In: **The amygdala: Neurobiological Aspects of emotion, memory and mental dysfunction** (Aggleton, J. P., ed), 1992 pp. 255-305, Wiley-Liss.
- DAVIS, M. Neurobiology of fear responses: the role of amygdala. *J. Neuropsych. Clin. Neurosci.* 9: 382-402, 1997.

- DAVIS, M. The amygdala and conditioned fear. In: Aggleton, J.P. (Ed.), **The amygdala. Neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction**. Wiley-Liss, 1992 pp. 255-305.
- DAVIS, M. The role of amygdala in conditioned and unconditioned fear and anxiety, in the amygdala. A functional analysis. J. P. Aggleton, Ed: 213-287. **Oxford University Press. Oxford**, U K, 2000.
- DAVIS, M. The role of amygdala in unconditioned fear. In: J.P. Aggleton (ed.), **The amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction**. Willy-Liss, New York, 1992a, p. 255-305.
- DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. **Ann. Rev. Neurosci.**, 15: 353-375, 1992b.
- DAVIS, M. The role of the amygdala in the emotional learning. **Int. Rev. Neurobiol.** 36: 225-334, 1994.
- DAVIS, M.; FALLS, W.A.; CAMPEAU, S.; KIM, M. Fearpotentead starth: a neuronal pharmacological analyses. **Behav. Brain. Res.** 58: 175-198, 1993.
- DAVIS, M.; RAINNIE, D.; CASSEL, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. **Trends Neurosci.** 17: 208-214, 1994.
- DESARMENIEN, M.; FELTZ, P.; OCCHIPINTI, G.; SANTANGELO, F.; SCHILICHTER, R. Coexistence of GABA_A and GABA_B receptors on A and C primary afferents. **Br. J. Pharmacol.** 81: 327-333, 1984.
- DIORIO, D.; VIAU, V.; MEANEY, M. J. The role of medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **J. Neuosci.** 13: 3839-3847, 1993.
- DREVETS, W. C. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive emotional feature of mood disorders. **Curr. Opin. Neurobiol.** 11(2): 240-249, 2001.
- DUNLAP, K. Two types of gama aminobutyric acid receptor on embryonic sensory neurons. **Br. J. Pharmacol.** 74: 579-585, 1981.
- DUTAR, P.; NICOLL, R. A. A physiological role for GABA_B receptors in the central nervous system. **Nature** 332: 156-158, 1988a.
- DUTAR, P.; NICOLL, R. A. Pre- and postsynaptic GABA_B receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. **Neuron** 1: 585-598, 1988b.
- EDMUNDS, M. Defense in animals: a survey of anti-predator defense. **Longman Group Ltd. Harlow, Essex**, 1974.
- EGLLEN, R. M.; WONG, E. H. F.; DUMUIS, A.; BOCKAERT, J. Central 5-HT₄ receptors. **Trends Pharmacol. Sci.** 16: 391-398, 1995.

- ENNA, S. J.; KUHAR, J.; SNYDER, S. H. Regional distribution of postsynaptic receptor binding for gamma aminobutyric acid (GABA) in monkey brain. **Brain Res.** 93: 168-174, 1975.
- ETTINGER, R. H.; THOMPSON, R.W. The role of dopaminergic systems in the mediation of tonic immobility (animal hypnosis) in chickens. **Bull. Psychon. Soc.** 12: 301-302, 1978.
- EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Amygdala-ventral striatal interactions and reward-related processes. In: Aggleton, J. P., editor. **The amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction.** New York: Wiley-Liss, 1992 pp. 401-429.
- FANSELLOW, M. S. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. **Pavlov J. Biol. Sci.** 15: 177-182, 1980.
- FANSELLOW, M. S.; LESTER, L. S. **A functional behaviorist approach to aversively motivated behavior: Predatory imminence as a determinant of the topography of defense behavior in evolution and learning.** Bolles R. C. and Bucher M. D. (Editors) Erlbaum, Hillsdale, 1988 pp. 185-212.
- FARABOLLINI, F. FACCHINETTI, F.; LUPO, C.; CARLI, G. Time course of opioid and pituitary-adrenal hormone modification during the immobility reaction in rabbits. **Physiol. Behav.**, 47:337-341, 1990.
- FEINDEL, W.; PENFIELD, W. Localization of discharge in temporal lobe automatism. **Arch. Neurol. Psych.** 72: 605-630, 1954.
- FERNANDES, C.; ANDREWS, N.; FILE, S. E. Diazepam withdrawal increases [3H]5-HT release from rat amygdaloid slices. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 49: 359-362, 1994.
- FOX, S.; KRNEVIC, K.; MORRIS, M. E.; PUIL, E.; WERMAN, P. Action of baclofen on mammalian synaptic transmission. **Neuroscience** 3: 445-515, 1978.
- FREUND, T. F.; BUZSÁKI, G. Interneurons of hippocampus. **Hippocampus** 6: 347-470, 1996.
- GADDUM, J. H.; PICARELLI, Z. P. Two kinds of tryptamine receptor. **Brit. J. Pharmacol.** 12: 323-328, 1957.
- GÄHWILER, B. H.; BROW, D. A. GABA_B receptor activated K⁺ current in voltage-clamped CA₃ pyramidal cell in hippocampal cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 82: 1558-1562, 1985.
- GALLAGHER, J. P.; STEVENS, D. R.; SHINNICK-GALLAGHER, P. Actions of GABA and baclofen on neurons of the dorsolateral septal nucleus (DLSN) in vitro. **Neuropharmacology** 23: 825-826, 1984.
- GALLUP, G. G.Jr. Tonic immobility role of fear and predation. **Psychol. Rec.**, 27: 41-61, 1977.
- GENTLE, M.J.; JONES, R.B.; WOOLEY, S.C. Physiological changes during tonic immobility in Gallus gallus domesticus. **Physiol. Behav.** 46:843-847, 1989.
- GIOTTI, A.; LUZZI, S.; SPAGNESI, S.; ZILLETTI, L. GABA_A and GABA_B receptor mediated effect in guinea-pig ileum. **Br. J. Pharmacol.** 78: 469-478, 1983a.

- GLENNON, R. Serotonin receptors: Clinical implications. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 14: 35-47, 1990b.
- GOLDSTEIN, L. E.; RASMUSSEN, B. S.; BUNNEY, B. S.; ROTH, R. H. Role of amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. **J. Neurosci.** 16: 4784-4798, 1996.
- GONCHAR, Y.; BURKBALTER, A. Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. **Cereb. Cortex** 7: 347-358, 1997.
- GONZALEZ, L. E.; ANDREWS, N.; FILE, S. E. 5-HT_{1A} and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevate plus-maze. **Brain Res.** 732: 145-153, 1996.
- GRAEFF, F. G. Brain defense systems and anxiety. In: Roth M, Burrows GD, Noyes R (eds) Handbook of anxiety, vol 3. The neurobiology of anxiety. Elsevier, Amsterdam, pp 307-354, 1990.
- GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behavior and related emotions in mammals. **Bras. J. Med. Biol. Res.** 27: 811-829, 1994.
- GRAEFF, F. G.; GUIMARAES, F. S.; DE ANDRADE, T. G.; DEAKIN, J. F. Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 54: 129-141, 1996.
- GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; MORA, P. O. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. **Neurosci. Biobehav.** 21: 791-799, 1997.
- HAJOS, M.; RICHARDS, C. D.; SZEKELY, A. D.; SHARP, T. An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projections to the midbrain raphe nuclei in the rat. **Neuroscience** 87: 95-108, 1998.
- HALL, E. Some aspects of the structural organization of the amygdala. In: **The Neurobiology of the amygdala**. Ed. Eleftherious. NY Plenum 95-121, 1972a.
- HAMON, M.; GOZLAN, H.; MESTIKAWYS, S.; EMERIT, M. B.; BOLAÑOS, F.; SCHECHTER, L. The central 5-HT_{1A} receptors: Pharmacological, biochemical, functional, and regulatory properties. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 600: 114-131, 1990.
- HANDLEY, S. L.; MCBLANE, J. W. 5-HT drugs in animal models of anxiety. **Psychopharmacol.** 112: 13-20, 1993.
- HARRISON, N. L. On the presynaptic action of baclofen at inhibitory synapses between cultured rat hippocampal neurones. **J. Physiol.** 422: 433-446, 1990.
- HARRISON, N. L.; LANGE, G. D.; BARKER, J. L. (-) Baclofen activates presynaptic GABA_B receptor on GABAergic inhibition neurons from embryonic rat hippocampus. **Neurosci. Lett.** 85: 105-109, 1988.
- HARSTON, C. T.; SIBLEY, D. H.; GALLUP Jr, G. G.; WALLMAN, W. B. Effects of intraventricular injections of imipramine and 5-hydroxytryptamine on tonic immobility in chickens. **Bull. Psychon. Soc.** 8: 403-405, 1976.

- HARSTON, C.T.; SIBLEY, D.H.; GALLUP, G.G. Jr., WALLMAN, W.B. Effects of intraventricular injections of imipramine and 4-hydroxytryptamine on tonic immobility in chickens. **Bull. Psychon. Soc.** 8:403-405, 1976.
- HATTON, D. C.; TANKLE, R.; LANTHORN, T.; MEYER, M. Serotonin and tonic immobility in the rabbit. **Behav. Biol.** 24: 97-100, 1978.
- HELMSTETTER, F. J. The amygdala is essential for the expression of conditional hypoalgesia. **Behav. Neurosci.** 106: 518-528, 1992.
- HELMSTETTER, F. J.; LANDEIRA-FERNANDES, J. Conditional hypoalgesia is attenuated by naltrexone applied to the PAG. **Brain Res.** 537: 88-92, 1990.
- HENNIG, C.W. Biphasic effect of serotonin on tonic immobility in domestic fowl. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 12:519-523, 1980.
- HENNIG, C.W.; DUNLAP, W.P.; HARSTON, C.T.; MACPHEE, A.A. Tonic immobility and the alphaadrenergic system in chicken. **Physiol. Behav.** 24:21-25, 1980.
- HERRY, C.; BACH, D.; SCHEFFLER, K.; SEIFRITZ, E.; LUTHI, A. The amygdala as a detector of unpredictability in mice and humans 2005 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Online. 416.1.2005.
- HICKS, L.E.; MASTER, J.D.; GORDON, G.G.Jr.; EDSON, P.H. Possible serotonergic mediation of tonic immobility effects of morphine and serotonin blockade. **Psychopharmacol.** 42:51-56, 1975.
- HILTON, S. M.; REDFERN, W. S. A search for brainstem groups integrating the defense reaction in the rat. **J. Physiol. (Lond)** 378: 213-228, 1986.
- HILTON, S. M.; ZBROZYNA, A. W. Amygdaloid region for defense reaction and its efferent pathway to the brainstem. **J. Physiol. (Lond)** 165: 160-173, 1963.
- HODGES, H.; GREEN, S.; GLENN, B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. **Psychopharmacol (Berl.)** 92: 491-504, 1987.
- HOPKINS, D. A.; HOLSTEGE, G. Amygdala projection to the mesencephalon pons and medulla oblonga in the cat. **Brain Res.** 32: 529-547, 1978.
- HOYER, D. VII International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). **Pharmacol. Rev.** 46: 157-203, 1996.
- HOYER, D.; CLARKE, D. E.; FOZARD, J. R.; HARTIG, P. R.; MARTIN, G. R.; MYLECHARANE, E. J.; SAXENA, P. R.; HUMPHREY, P. P. A. VII. International Union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). **Pharmacol. Rev.** 46: 157-203, 1994.
- HUGHER, R.A., Anticholinergic drugs, blood brain- barrier and tonic immobility in chickens. **Physiol. Behav.** 29:67-71, 1982.

- HUMPHREY, P. P. A.; HARTIG, P.; HOYER, D. A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. **Trends Pharmacol. Sci.** 14: 233-236, 1993.
- IMAI, H.; STEINDLER DA, KITAI, S. T. The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. **J. Comp. Neurol.** 243: 363-380, 1986.
- INGLIS, F. M.; MOGHADDAM, B. Dopaminergic innervation of the amygdala is highly responsive to stress. **J. Neurochem.** 72: 1088-1094, 1999.
- IVERSEN, S. D. 5-HT and anxiety. **Neuropharmacol.** 23: 1553-1560, 1984.
- JACOBS, B. L. Amygdala unit activity as a reflection of functional changes in brain serotonergic neurons. **Brain Res.** 281-289, 1972.
- JEFFERYS, J. G.; TRAUB, R. D.; WHITTINGTON, M. A. Neuronal network for induced '40Hz' rhythms. **Trends Neurosci.** 19: 202-208, 1996.
- JOHNSTON, G. A. R. GABA_C receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? **Trends. Pharmacol. Sci.** 17: 319-323, 1996.
- KAPP, B. S. E COL., In: The amygdala: Neurobiological Aspects of emotion, memory and mental dysfunction (Aggleton, J. P., ed), pp. 229-254, Wiley-Liss, 1992.
- KAPP, E. S.; GALLAGHER, M. M.; FRYSSINGER, R. S.; APPLGATE, C. D. The amygdale, emotion and cardiovascular conditioning. In: **The Amygdaloid Complex**, Ben-Ari (ed.). Amsterdam: Elsevier/North-Holland. 355-366, 1981.
- KARLSSON, G.; POZZA, M.; OLPE, H. R. Phaclofen: a GABA_B blocker reduces long-duration inhibition in the neocortex. **Eur. J. Pharmacol.** 148: 485-486, 1988.
- KAWAGUCHI, Y.; KUBOTA, Y. Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin and calbindin D28k immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. **J. Neurophysiol.** 70: 387-396, 1993.
- KAWAGUCHI, Y.; KUBOTA, Y. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. **Cereb. Cortex** 7: 476-486, 1997.
- KAWAGUCHI, Y.; KUBOTA, Y. Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cell in the rat frontal cortex. **Neuroscience** 85: 677-701, 1998.
- KAWAGUCHI, Y.; KUBOTA, Y. Physiological and morphological identification of somatostatin or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. **J. Neurosci.** 16: 2701-2715, 1996.
- KAWAHARA, H.; YOSHIDA, M.; YOKOO, H.; NISHI, M.; TANAKA, M. Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. **Neurosci. Lett.** 162: 81-84, 1993.
- KEMPPAINEN, S.; PITKANEN, A. Distribution of the parvalbumin, calretinin and calbindin-D28k immunoreactive in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid. **J. Comp. Neurol.** 426: 441-467, 2000.

- KIM, M.; CAMPEAU, S.; FALLS, W. A.; DAVIS, M. Infusion of non-NMDA receptor antagonist CNQX into the amygdala blocks the expression of the fear-potentiated startle. **Behav. Neural Biol.** 59: 5-8, 1993.
- KIM, M.; MCGAUGH, J. L. Effects of intra-amygdala injections of NMDA antagonists on acquisition and retention of inhibitory avoidance. **Brain Res.** 585: 35-48, 1992.
- KITZMAN, P.; BISHOP, G. The physiological effects of serotonin on spontaneous and amino acid-induced activation of cerebellar nuclear cells: an in vivo study in the cat. **Prog. Brain Res.** 114: 209-223, 1997.
- KLEINROK, A.; KILBINGER, H. γ -aminobutyric acid and cholinergic transmission in the guinea-pig ileum. **Naunyn Schimiedebergs Arch. Pharmacol.** 322: 216-220, 1983.
- KLEMM, W. R. Behavioral inhibition. In: Brainstem mechanism of behavior. New York: Wiley Interscience, 489-533, 1990.
- KLEMM, W. R. Identity of sensory and motor system that are critical to the immobility reflex ("animal hypnosis"). **Psychol. Rec.** 27: 145-159, 1977.
- KLEMM, W.R. Identity of sensory and motor system that are critical to the immobility reflex (animal hypnosis). **J. Neurosci. Res.** 2: 57-69, 1976.
- KLEMM, W.R. Neurophysiologic studies of the immobility reflex ("Animal hypnosis"). **Neurosci. Res.** 4:165-212, 1971.
- KNUEPFER, M. M.; EISMANN, A.; SCHÜTZE, I.; STUMPF, H.; STOCK, G. Responses of single neurons in amygdala to interoceptive and exteroceptive in conscious cats. **Am. Physiol. Soc.** R666-R675, 1995.
- KRETTEK, J. E.; PRICE, J. L. A description to the amygdala complex in the rat and cat with observation on intra-amygdaloid axonal connections. **J. Comp. Neurol.** 178: 255-279, 1978.
- KUBOTA, Y.; HATTORI, R.; YUI, Y. Three distinct subpopulation of GABAergic neurons in the rat frontal agranular cortex. **Brain Res.** 649: 159-173, 1994.
- KUBOTA, Y.; KAWAGUCHI, Y. Two distinct subgroups of cholecystokinin immunoreactive cortical interneurons. **Brain Res.** 752: 175-183, 1997.
- KUYPERS, H. G. J. M. A new look at the organization of the motor system. In: Anatomy of descending pathways to the spinal cord, Progress in Brain Research, Vol. 57, ed by H. G. J. M. Kuypers and G. F. Martin. Elsevier, Amsterdam. pp. 381-403, 1982.
- LACEY, M. G.; MERCURI, N. B.; NORTH, R. A. On the potassium conductance increase activated by GABA_B and dopamine D₂ receptors in the substantia nigra neurons. **J. Physiol.** 401: 437-453, 1988.
- LAMBERT, N. A.; HARRISON, N. L.; KERR, D. I. B.; ONG, J.; PRAGER, R. H.; TEYLER, T. J. Blockade of the late IPSP in rat CA1 hippocampal neurons by 2-hydroxysaclofen. **Neurosci. Lett.** 107: 125-128, 1989.

- LANG, E. J.; PARÉ, D. Synaptic responsiveness of interneurons of the cat lateral amygdaloid nucleus. **Neuroscience** 83: 877-889, 1998.
- LE GAL LA SALLE, G. Unitary responses in the amygdaloid complex following stimulation of various diencephalic structures. **Brain Res.** 24: 475-478, 1976.
- LE GAL LA SALLE, G.; BEN-ARI, Y. Unit activity in the amygdaloid complex: a review. In: The amygdaloid complex (ed. Ben-Ari Y.) pp. 227-237. Elsevier, Amsterdam, 1981.
- LEDOUX, J. E. Brain mechanisms of emotion and emotional learning. **Curr. Opin. Neurobiol**, 2: 191-198, 1992.
- LEDOUX, J. E. Emotion and the amygdala. In: Aggleton, J. P., editor. The amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction. New York: Wiley-Liss. 339-351, 1992.
- LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Ann. Rev. Neurosci.** 23: 155-184, 2000.
- LEDOUX, J. E. The emotional brain. New York: Simon and Schuster. 1996.
- LEDOUX, J. E.; CICCHETTI, P.; XAGORARIS, ROMANSKI, L. M. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. **J. Neurosci.** 10: 1062-1069, 1990.
- LEDOUX, J. E.; RUGGIERO, D. A.; REIS, D. J. Projections to the subcortical areas of the rat medial geniculate body. **J. Comp. Neurol.** 242: 182-213, 1985.
- LEDOUX, J. Fear and the brain: Where have we been, and where are we going? **Biol. Psychiatry** 44: 1229-1238, 1998.
- LEDOUX, J. **O cérebro emocional: os misteriosos alicerces da vida emocional.** Trad. Terezinha Batista dos Santos, 2ª Ed. Rio de Janeiro, Objetiva, 1998.
- LEDOUX, J.E. Emotion, memory and the brain. **Sci. Am.** 270: 50-57, 1994.
- LEITE PANISSI, C. R. A.; MENESCAL DE OLIVEIRA, L. Central nucleus of the amygdala and the control of tonic immobility in guinea pigs. **Brain Res. Bull.** 58(1): 13-19, 2002.
- LEITE-PANISSI, C. R. A.; COIMBRA, N. C.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. The cholinergic stimulation of the central amygdala modifying the tonic immobility response and antinociception in guinea pigs depends on the ventrolateral periaqueductal gray. **Brain Res. Bull.** 60:167-178, 2003.
- LEITE-PANISSI, C. R. A.; FERRARESE, A. A.; TERZIAN, A. L. B.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Serotonergic activation of the basolateral amygdala and modulation of tonic immobility in guinea pig. **Brain Res. Bull.** 69: 356-364, 2006.
- LEITE-PANISSI, C. R. A.; MONASSI, C. R.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Role of amygdaloid nuclei in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. **Physiol. Behav.** 67: 717-724, 1999.

- LI, R.; ISHIJO, H.; ONO T.; OHTANI, Y.; OHTANI, O. Synapses on GABAergic neurons in the basolateral nucleus of the rat amygdala: double-labeling immunoelectron microscopy. **Synapse** 43: 42-50, 2002.
- LOWRY, C. A. Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **J. Neuroendocrinol.** 14: 911-923, 2002.
- LUCKI, I. 5-HT₁ receptors and behavior. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 16: 83-93, 1992.
- LÜDDERS, H.; KORPI, E. R.; SEEBURG, P. H. GABA_A benzodiazepine receptor heterogeneity: neurophysiological implications. **Neuropharmacol.** 34: 245-254, 1995.
- MA, Q. T.; YIN, G. F.; AI, M. K. HAN, J. S. Serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the amygdala in the rat. **Neurosci. Lett.** 134: 21-24, 1991.
- MACEDO, C. E.; CASTILHO, V. M.; DE SOUZA SILVA, M.A.; BRANDÃO, M. L. Dual 5-HT mechanisms in basolateral and central nuclei of amygdala in the regulation of the defensive behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus, **Brain Res Bull** 59: 189-195, 2002.
- MAH, E. J.; CUNNINGHAM, K. A. Electrophysiological studies of the serotonergic modulation of glutamate-evoked activity in the amygdala. **Soc. Neurosci. Abstr.** 19: 1554, 1993.
- MAIER, S. F.; WATKINS, L. F. Stressor controllability, anxiety and serotonin. **Cognitive Therapy Res.** 22: 595-613, 1998.
- MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Stressor controllability and learned helplessness: The roles of dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-release factor. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 29: 829-841, 2005.
- MAISONNETTE, S. S.; KAWASAKI, M. C.; COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus, **Brain Res Bull** 40: 93-98, 1996.
- MAISONNETTE, S.; VILLELA, C.; CAROTTI, A. P.; LANDEIRA FERNANDEZ, J., Microinfusion of nefazodone into the basolateral nucleus of the amygdala enhances defensive behavior induced by NMDA stimulation of the inferior colliculus, **Physiol Behav** 70: 243-247, 2000.
- MALGOURIS, C.; FLAMAND, F.; DOBLE, A. Autoradiography studies of RP-62203, a potent 5-HT₂ receptor antagonist: Pharmacological characterization of [³H]RP-62203 binding in the rat brain. **Eur. J. Pharmacol.** 233: 37-45, 1993.
- MAMOUNAS, L.A.; MULLEN, C.A.; O'HEARN, E.; MOLLIVER, M.E. Dual serotonergic projection to forebrain in the rat: Morphologically distinct 5-HT axon terminals exhibit differential vulnerability to neurotoxin amphetamine derivatives. **J. Comp. Neurol.** 314:558-586, 1991.

- MARCEL, D.; WEISSMANN-NANOPOULOS, D.; MACH, E.; PUJOL, J. F. Benzodiazepine binding sites: localization and characterization in the limbic system of the rat brain. **Brain Res. Bull.** 16: 573-596, 1986.
- MARTINEZ, R. C. R.; OLIVEIRA, A. R.; BRANDÃO, M. L. Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. **Neurobiol. Learn. Memo.** 85: 58-65, 2006.
- MASCAGNI, F.; MCDONALD, A. J. Immunohistochemical characterization of cholecystokinin containing neurons in the rat basolateral amygdala. **Brain Res.** 943: 237-244, 2002.
- MCDONALD, A. J. Cell types and intrinsic connections of the amygdala. In: **The amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction.** J. P. Aggleton, Ed.: Wiley-Liss. New York 1992a pp: 67-69.
- MCDONALD, A. J. Neurons of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei: a Golgi study in the rat. **J. Comp. Neurol.** 212: 293-312, 1982.
- MCDONALD, A. J. Organization of amygdaloid projections to the mediodorsal thalamus and prefrontal cortex: a fluorescence retrograde transport study in the rat. **J. Comp. Neurol.** 262: 46-58, 1987.
- MCDONALD, A. J. Projection neurons of the basolateral amygdala: a correlative Golgi and retrograde tract tracing study. **Brain Res. Bull.** 28: 179-185, 1992b.
- MCDONALD, A. J.; AUGUSTINE, J. R. Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala. **Neuroscience.** 52: 281-294, 1993.
- MCDONALD, A. J.; BEITZ, A. J.; LARSON, A. A.; KURIYAMA, R.; SELITTO, C.; MADL, J. E. Colocalization of glutamate and tubulin in putative excitatory neurons of the hippocampus and amygdala: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies. **Neuroscience** 30: 405-421, 1989.
- MCDONALD, A. J.; BETETTE, R. Parvalbumin containing neurons in the rat basolateral amygdala: morphology and colocalization of calbindin D28k. **Neuroscience** 102: 413-425, 2001.
- MCDONALD, A. J.; MASCAGNI, F. Colocalization of calcium-binding proteins and gamma-aminobutyric acid in neurons of the rat basolateral amygdala. **Neuroscience** 105: 681-693, 2001a.
- MCDONALD, A. J.; MASCAGNI, F. LPAPE, H. C.; ocalization of CB1 type cannabinoid receptors in the rat basolateral amygdala: high concentration in the subpopulation of cholecystokinin containing interneurons. **Neuroscience** 107: 641-652, 2001b.
- MCDONALD, A. J.; PEARSON, J. C. Coexistence of GABA and peptide immunoreactivity in non-pyramidal neurons of the basolateral amygdala. **Neurosci. Lett.** 100: 53-58, 1989.

- MCDONALD, R. L.; OLSEN, R. W. GABA_A receptor channels. **Ann. Rev. Neurosci.** 17: 569-602, 1994.
- MCDONALD, R. L.; TWYMAN, R. E. Kinetic properties and regulation of GABA_A receptor channels in *Ion Channels*, vol. 3 Narahashi, T., ed. Plenum Press, New York, 1992 pp. 315-343.
- MELNTYRE, C. K.; MARRIOTT, L. K.; GOLD, P. E. Cooperation between memory system: acetylcholine release in the amygdala correlates positively with performance on a hippocampus-dependent task. **Behav. Neurosci.** 117: 320-326, 2003.
- MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L.; HOFFMANN, A. The parabrachial region as a possible region modulating simultaneously pain and tonic immobility. **Behav. Brain Res.** 56: 127-132, 1993.
- MESCHES, M. H.; BIANCHIN, M.; MCGAUGH, J. L. The effects of intra amygdaloid infusion of the ampa receptor antagonist CNQX on retention performance following aversive training. **Neurobiol. Learn. Mem.** 66: 324-340, 1996.
- MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Prog. Neurobiol.** 70: 83-244, 2003.
- MILLHOUSE, O. E. The intercalated cell of the amygdala. **J. Comp. Neurol.** 247: 146-271, 1986.
- MILLHOUSE, O.E.; OLMOS, J. Neuronal configuration in lateral and basolateral amygdala. **Neuroscience** 10:1269-1300, 1983.
- MISERENDINO, M. J. D.; SANANES, C. B.; MELIA, K. R.; DAVIS, M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. **Nature** 345: 716-718, 1990.
- MONASSI, C. R.; HOFFMANN, A.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Involvement of the cholinergic system and periaqueductal gray matter in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. **Physiol. Behav.** 62: 53-59, 1997.
- MONASSI, C. R.; LEITE-PANISSI, C. R. A. Serotonin 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptors in the periaqueductal gray matter differentially modulate tonic immobility in guinea pig. **Brain Res.** 1009: 169-180, 2004.
- MONASSI, C. R.; LEITE-PANISSI, C. R. A.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Ventrolateral periaqueductal gray matter and the control of tonic immobility. **Brain Res. Bull.** 50: 201-208, 1999.
- MONASSI, C.R.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Serotonin 5 HT₂ and 5- HT_{1A} receptors in the periaqueductal gray matter differentially modulate tonic immobility in guinea pig. **Brain Res.**, 1009:169-180, 2004.
- MOORE, R.; HALARIS, A. Hippocampal innervations by serotonin neurons of midbrain raphe in the rat. **J. Comp. Neurol.** 164: 171-183, 1975.

- MORALES, M.; BATTENBERG, E.; DE LECEA, L.; SANNA, P. P.; BLOOM, F. E. Cellular and subcellular immunolocalization of the type 3 serotonin receptors in the rat central nervous system. **Mol. Brain Res.** 36: 251-260, 1996.
- MORILAK, D. A.; GARLOW, S. J.; CIARANELLO, R. D. Immunocytochemical localization and description of neurons expressing serotonin-2 receptors in the rat brain. **Neuroscience.** 54: 701-717, 1993.
- MORRIS, J. S.; FRITH, C. D.; PERRETT, D. I.; ROWLAND, A.; YOUNG, A. W.; CALDER, A. J.; DOLAN, R. J. A differential neural response in the human amygdala to fearful and happy facial expressions. **Nature** 383:812-815, 1996.
- MOTT, D. D.; LEWIS, D. L. The pharmacology and function of GABA_B receptors. **Int. Rev. Neurobiol.** 36: 97-223, 1994.
- MUHYADDIN, M.; ROBERTS, P. J.; WOODRUFF, G. N. Presynaptic γ -aminobutyric acid receptors in the rat anococcygeus muscle and their antagonism by 5-aminovaleric acid. **Br. J. Pharmacol.** 77: 163-168, 1982.
- MULLER, J. F.; MASCAGNI, F.; MCDONALD, A. J. Pyramidal cells of the rat basolateral amygdala; synaptology and innervation by parvalbumin-immunoreactive interneurons. **J. Comp. Neurol.** 494: 635-650, 2006.
- MULLER, J. F.; MASCAGNI, F.; MCDONALD, A. J. Synaptic connections of distinct interneuronal subpopulations in the rat basolateral amygdalar nucleus. **J. Comp. Neurol.** 456: 217-236, 2003.
- NAGY, J.; DECSI, L. Location of the site of tranquilizing action by diazepam by intralimbic application. **Neuropharmacol.** 12: 757-768, 1973.
- NAGY, J.; ZAMBO, K.; DESCI, L. Anti-anxiety action of diazepam after intra-amygdaloid application in the rat. **Neuropharmacol.** 18: 573-576, 1979.
- NASH, R.F.; GALLUP,G.G. Jr.; CZECH, D.A. Psychophysiological correlates of tonic immobility in domestic chicken (*Gallus gallus*). **Physiol. Behav.**, 17:413-418, 1976.
- NEWBERRY, N. R.; NICOLL, R. A. Direct hyperpolarizing action of baclofen on hippocampal pyramidal cells. **Nature** 308: 450-452, 1984.
- NIEHOFF, D. J.; WHITEHOUSE, P. J. Multiple benzodiazepine receptors: autoradiographic localization I normal human amygdala. **Brain. Res.** 276: 45-55, 1983.
- NIEHOFF, D. L.; KUHAR, M. J. Benzodiazepine receptors: localization in the rat amygdala. **J. Neuroscience** 3: 2091-2097, 1983.
- NITECKA, L.; BEN-ARI, Y. Distribution of GABA-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. **J. Comp. Neurol.** 266: 45-55, 1987.
- OLIVEIRA, L.; HOFFMANN, A.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. The lateral hypothalamus in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. **NeuroReport**, 8: 3489-3493, 1997.

- ONG, J.; KERR, D. I. B. GABA receptors in the peripheral tissues. **Life Sci.** 46: 1489-1501, 1990.
- ONG, J.; KERR, D. I. B. GABA_A and GABA_B receptor mediated modification of intestinal motility. **Eur. J. Pharmacol.** 86: 9-17, 1983.
- ONO, T.; NISHIJO, H. In: The amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction (Aggleton, J. P., ed), pp. 167-190, Wiley-Liss, 1992.
- OROZCO-CABAL, L.; POLLANDT, S.; LIU, J.; VERGARA, L.; SHINNICK GALLAGHER, P.; GALLAGHER, J. P. A novel rat medial prefrontal cortical slice preparation to investigate synaptic transmission from amygdala to layer V prelimbic pyramidal neurons. **J. Neurosci. Methods**, Sep 7; [Epub ahead of print], 2005.
- PAPE, H. C.; PARÉ, D.; DRIESANG, R. B. Two types of intrinsic oscillations in neurons of the lateral and basolateral nuclei of amygdala. **J. Neurophysiol.** 79; 205-216, 1998.
- PARÉ, D.; GAUDREAU, H. Projection cells and interneurons of the lateral and basolateral amygdala; distinct firing patterns and differential relation to theta and delta rhythms in conscious cats. **J. Neurosci.** 16: 3334-3350, 1996.
- PARÉ, D.; PAPE, H. C.; DONG, J. M. Bursting and oscillating neurons of the cat basolateral amygdaloid complex in vivo: Electrophysiological properties and morphological features. **J. Neurophysiol.** 74: 341-352, 1995.
- PARÉ, D.; SMITH, Y. Distribution of GABA immunoreactivity in the amygdaloid complex of the cat. **Neuroscience** 57: 1077-1090, 1993b.
- PARÉ, D.; SMITH, Y. The intercalated cell masses project to the central and medial nuclei of the amygdala in cats. **Neuroscience** 57: 1077-1090, 1993b.
- PAZOS, A.; CORTÉS, R.; PALACIOS, J. M. Quantitative autoradiographics mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. **Brain Res.** 346: 231-249, 1985.
- PITKÄNEN, A.; SAVANDER, V.; LEDOUX, J. E. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. **Trends Neurosci.** 20: 517-523, 1997.
- POSTASHNER, S. J. Baclofen: effect on amino acid release. **Can. J. Pharmacol.** 56: 150-154, 1978.
- PRICE, J. L.; RUSSCHEN, F. T.; AMARAL, D. G. In: Handbook of chemical Neuroanatomy (Vol. 5/I) (Björklung, A, Hökfelt, t., Swanson, L. W., eds), pp. 279-388, Elsevier, 1987.
- QUIRARTE, G. L.; GALVEZ, R.; ROOZENDAAL, B; MCGAUGH, J. L.; Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. **Brain Res.** 808: 134-140, 1998.

- RADJA, F.; LAPORTE, A. M.; DAVAL, G.; VERGE, D.; GOZLAN, H.; HAMON, M. Autoradiographic of serotonin receptors subtypes in the nervous central system. **Neurochem. Int.** 1-15, 1991.
- RAINNIE, D. G.; ASPRODINI, E. K.; SHINNICK-GALLAGHER, P. Excitatory transmission in the basolateral amygdala. **J. Neurophysiol.** 66: 986-998, 1991a.
- RAINNIE, D. G.; ASPRODINI, E. K.; SHINNICK-GALLAGHER, P. Inhibitory transmission in the basolateral amygdala. **J. Neurophysiol.** 66: 999-1009, 1991b.
- RAINNIE, D. G.; ASPRODINI, E. K.; SHINNICK-GALLAGHER, P. Intracellular recordings from morphologically identified neurons of the basolateral amygdala. **J. Neurophysiol.** 69: 1350-1361, 1993.
- RAINNIE, D.G. Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. **J. Neurophysiol.** 82: 69-85, 1999.
- RAKSHIT, A.; KLEMM, W. R. Depth-duration profile of the immobility reflex: Theoretical implications for its triggering, sustaining, and terminating mechanisms. **J. Neurosci. Res.** 5: 253-262, 1980.
- RAPPORT, M. M. Serum vasoconstrictor (serotonin) V. Presence of creatinine in the complex. A proposed structure of the vasoconstrictor principle. **J. Biol. Chem.** 180: 961-969, 1949.
- RAPPORT, M. M.; GREEN, A. A.; PAGE, I. H. Purification of the substance which is responsible for vasoconstrictor activity of serum. **Federation Proc.** 6: 184, 1947.
- RATNER, S.C. Comparative aspects of hypnosis. Handbook of Clinical and Experimental Hypnosis. **Macmillan**, 550-587, 1967.
- RAUSCH, S. L.; E COL. Arch. Gen. Psychiatry 53: 380-387, 1996.
- ROBERTS, E.; FRANKEL, S. Gama-aminobutyric acid in brain: Its formation from glutamic acid. **J. Biol. Chem.** 187: 55-63, 1950.
- ROBERTSON, B.; TAYLOR, R. Effect of α -aminobutyric acid and (-) baclofen on calcium and potassium current in cat dorsal root ganglion neurons in vitro. **Br. J. Pharmacol.** 89: 661-672, 1986.
- ROLLS, E. T. In: The amygdala: Neurobiological Aspects of emotion, memory and mental dysfunction (Aggleton, J. P., ed), pp. 143-166, Wiley-Liss, 1992.
- ROPERT, N.; GUY, N. Serotonin facilitates GABAergic transmission in the CA1 region of the rat hippocampus in vitro. **J. Physiol.** 441: 121-136, 1991.
- RÖSSNER, W. **Steretaktischer hirnatlas von meerchwlinchen.** Palla Velag, Munich, 1965.
- ROYER, S.; MARTINA, M.; PARÉ, D. Na inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output station of the amygdala. **J. Neurosci.** 19: 10575-10583, 1999.
- SAMSON, R. D.; DUMONT, F. C.; PARE, D. Feedback inhibition defines transverse processing modules in the lateral amygdala. **J. Neurosci.** 23: 1966-1973, 2003.

- SANDERS, S. K.; MORZORATI, S. L.; SHEKHAR, A. Priming of experimental anxiety by repeated sub threshold GABA blockade in the rat amygdala. **Brain Res.** 699: 250-259, 1995.
- SANDERS, S. K.; SHEKHAR, A. Anxiolytic effects of chlordiazepoxide blocked by injection of GABA_A and benzodiazepine receptor antagonists in the region of the anterior basolateral amygdala of rats. **Biol. Psychiatry** 37(7): 473-476, 1995.
- SANDERS, S. K.; SHEKHAR, A. Blockade of GABA_A receptor in the region of the anterior basolateral amygdala of rats elicits increases in heart rate and blood pressure. **Brain Res.** 576: 101-110, 1991.
- SANDERS, S. K.; SHEKHAR, A. Regulation of anxiety by GABA_A receptor in the rat amygdala. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 52(4): 701-706, 1995b.
- SARGENT, A.B.; EBERHARDT, L.E. Death feigning by ducks in response to predation by red foxes (*Vulpes fulva*). **Am. Midl. Natur.** 94: 108-119, 1975.
- SAXENA, P. R. Serotonin receptors: subtypes, functional responses and therapeutic relevance. **Pharmacol. Ther.** 66: 339-368, 1995.
- SCHEEL KRUGER, J.; PETERSEN, E. N. Anticonflict effect of the benzodiazepines mediated by a GABAergic mechanism in the amygdala. **Eur. J. Pharmacol.** 82: 116-116, 1982.
- SHAIKH, M. B.; SLEBABERT, K.; SIEGEL, A. Basal amygdaloid facilitation of midbrain periaqueductal gray elicited defensive rage behavior in the cat is mediated through NMDA receptors. **Brain Res.** 635: 187-195, 1994.
- SHEKHAR A.; SAJDYK, T. J.; GEHLERT, D. R.; RAINNIE, D. G. The amygdala, panic disorders and cardiovascular responses. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 985: 308-325, 2003.
- SHELDON, P. W.; AGHAJANIAN, G. K. Excitatory responses to serotonin in the neurons of the rat piriform cortex: evidence for mediation by 5-HT_{1C} receptors in pyramidal cells and 5-HT₂ receptors in interneurons. **Synapse** 9: 208-218, 1991.
- SHIRAKAWA, J.; TANIYAMA, K.; TANAKA, C. Gamma-aminobutyric acid induced modulation of acetylcholine release from the guinea pig lung. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 243: 364-369, 1987.
- SIEGHART, W. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acid(a) receptor subtypes. **Pharmacol. Rev.** 47: 181-234, 1995.
- SILVA, L. F. S.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Role of opioidergic and GABAergic neurotransmission of the nucleus raphe magnus in the modulation of tonic immobility in guinea pig. **Brain Res. Bull.**, 72: 25-31, 2007.
- SINGER, W. Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and learning. **Ann. Rev. Physiol.** 55: 349-374, 1993.
- SMITH, B. N.; DUDEK, F. E. Amino acid mediated regulation of spontaneous synaptic patterns in the rat basolateral amygdala. **J. Neurophysiol.** 76: 1958-1967, 1996.

- SMITH, Y.; PARÉ, J. F.; PARÉ, D. Cat intraamygdaloid inhibitory network: Ultra-structural organization of parvalbumin-immunoreactive elements. **J. Comp. Neurol.** 391: 164-179, 1998.
- SMITH, Y.; PARÉ, J. F.; PARÉ, D. Differential innervation of parvalbumin-immunoreactive interneurons of the basolateral amygdaloid complex by cortical and intrinsic inputs. **J. Comp. Neurol.** 416: 496-508, 2000.
- SOLTIS, R. P.; COOK, G. C.; GREGG, A. E.; SANDERS, B. J. Interaction of GABA and excitatory amino acids in the basolateral amygdala: role in cardiovascular regulation. **J. Neurosci.** 17(23): 9367-9374, 1997.
- SOTELO, C.; CHOLLEY, B.; EL MESTIKAWY, S.; GOZLAN, H.; HAMON, M. Direct immunohistochemical evidence of existence of 5-HT_{1A} autoreceptors on serotonergic neurons in the midbrain raphe nuclei. **Eur. J. Neurosci.** 2: 1144-1154, 1990.
- STEIN, D.J.; DAVIDOWA, A.; ALBRECHT, D. 5-HT(1A) receptor-mediated inhibition and 5-HT(2) as well as 5-HT(3) receptor-mediated excitation in different subdivisions of the amygdala. **Synapse**, 38: 328-337, 2000.
- STUDY, R. E.; BARKER, J. L. Diazepam and (-) pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured central neurones. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 78: 7180-7184, 1981.
- STUTZMAN, G. E.; MCEWANS, B. S.; LEDOUX, J. E. Serotonin modulation of sensory inputs to the lateral amygdala: dependency on corticosterone. **J. Neurosci.** 15: 9529-9538, 1998.
- STUTZMANN, G. E.; LEDOUX, J. E. GABAergic antagonists block the inhibitory effects of serotonin in the lateral amygdala: a mechanism for modulation of sensory inputs related to fear conditioning. **J Neurosci.** 19: 1-4, 1999.
- SWANSON, L.W. Brain Maps: Structure of the Rat Brain (2nd edn), (1998) Elsevier.
- SZINYEI, C.; HEINBOCKEL, T.; MONTAGNE, J.; PAPE, H. C. Putative cortical and thalamic inputs elicit convergent excitation in a population of GABAergic interneurons of the lateral amygdala. **J. Neurosci.** 20: 8909-8915, 2000.
- TAKAJI, M.; YAMAMOTO, C. The long lasting inhibition recorded *in vitro* from the lateral nucleus of the amygdala. **Brain Res.** 206: 474-478, 1981.
- TANAKA, T.; YOKOO, H.; MIZOGUCHI, K.; YOSHIDA, M. TSUDA, A.; TANAKA, M. Noradrenaline release in the rat amygdala is increase by stress: studies with intracerebral microdialysis. **Brain Res.** 544: 174-176, 1991.
- THALMANN, R. H. Evidence that guanosine triphosphate (GTP)-binding proteins control a synaptic response in brain: effect of pertussis toxin and GTP S on the late inhibitory postsynaptic potential of hippocampal CA3 neurons. **J. Neurosci.** 8: 4589-4602, 1988.

- THOMAS, S. R.; LEWIS, M. E.; IVERSEN, S. D. Correlation of [3H]diazepam binding density with anxiolytic locus in the amygdaloid complex of the rat. **Brain Res.** 342: 85-90, 1985.
- THOMPSON, R.W. A central cholinergic inhibition system as a basis for tonic in mobility in chickens. **Psychol. Rec.** 1:109-121, 1977.
- THOMPSON, R.W.; FOLTIN, R.K.R.; BOYLAN, R.J.; SWEET, A.; GRAVES, C.A.; LOVWITF, C.E. Tonic immobility in japanese quail can reduced the probability of sustained attack by cats. **Anim. Learn. Behav.** 9: 145-149, 1981.
- THOMPSON, R.W.; JOSEPH, S. The effect of nor epinephrine on tonic immobility in chickens. **Bull. Psychon. Soc.** 12:301-302, 1978.
- THOMPSON, R.W.; PIROCH, J.; FALLEN, D.; HATTON, D. A central cholinergic inhibitory system as a basis for tonic in mobility (animal Hypnosis) in chickens. **J. Comp. Physiol.** 87:507-512. 1974.
- THOMPSON, S. M.; GAHWILER, B. H. Comparison of the action of baclofen at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. **J. Physiol.** 451: 329-345, 1992.
- TRANEL, D. HYMAN, T. Neuropsychological correlates of bilateral amygdala damage. **Arch. Neurol.** 47:349-355, 1990.
- TURGEON, S. M.; ALBIN, R. L. Pharmacology, distribution, cellular localization, and development of GABA_B binding in rodent cerebellum. **Neuroscience** 55: 311-323, 1993.
- UEHARA, T.; SUMIYOSHI, T.; ITOH, H.; KURACHI, M.; Modulation of stress induced dopamine release by excitotoxic damage of the entorhinal cortex in the rat. **Brain Res.** 989: 112-116, 2003
- UPTON, N.; BLACKBURN, T. Pharmacology of Mammalian GABA_A receptors. In: Bowery, N. G. The GABA receptors. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1999, Cap. 4, p. 81-112.
- URSIN, H.; JELLESTAD, F.; CABRERA, I. G. The amygdale exploration and fear In: The Amygdaloid Complex, edited by Ben-Ari. Amsterdam: **Elsevier/North-Holland.** 317-330, 1981.
- WALKER, D. L.; TOUFEXIS, D. J.; DAVIS, M. Role of the bed nucleus of the stria terminals versus the amygdale in fear, stress and anxiety. **Eur. J. Pharmacol. Revol.** 463: 199-216, 2003.
- WALLNAU, L. B.; BORDASH, G. D.; CORSO Jr, P. The effects of tryptophan and manipulations of serotonergic receptors on tonic immobility in chickens. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 14: 463-468, 1981.
- WALLNAU, L. B.; GALLUP Jr, G. G. A serotonergic, midbrain-raphé model of tonic immobility. **Biobehav. Rev.** 1: 35-43, 1977.
- WANG, C.; WILSON, W. A.; MOORE, S. D. Role of NMDA, non-NMDA, and GABA receptors in signal propagation in the amygdale formation. **J. Neurophysiol.** 86: 1422-1429, 2001.

- WARD, R. P.; HAMBLIN, M. W.; LACHOWICZ, J. E.; HOFFMAN, B. J.; SIBLEY, D. R.; DORSA, D. M. Localization of serotonin receptor subtype 6 receptor messenger RNA in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. **Neuroscience** 64: 1105-1111, 1995.
- WASHBURN, M. S.; MOISES, H. C. Electrophysiological and morphological properties of rat basolateral amygdaloid neurons in vitro. **J. Neurosci.** 12: 4066-4079, 1992a.
- WEISSKOPF, M. G.; LEDOUX, J. E. Distinct population of NMDA receptors at subcortical and cortical inputs to principal cells of the lateral amygdala. **J. Neurophysiol.** 81: 930-934, 1999.
- WILLIAN, C. L.; MEN, D.; CLAYTON, E. C.; The effects of noradrenergic activation of the nucleus tractus solitarius on memory and in potentiating norepinephrine release in the amygdala. **Behav. Neurosci.** 114: 1131-1144, 2000.
- WISDEN, W.; LAURIE, D. J.; MONYER, H.; SEEBURG, P. H. The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. **J. Neurosci.** 12: 1040-1062, 1992.
- YAMADA, J.; SAITOW, F.; SATAKE, S.; KIYOHARA, T.; KONISHI, S. GABA_B receptor-mediated presynaptic inhibition of glutamatergic and GABAergic transmission in the basolateral amygdala. **Neuropharmacol.** 38: 1743-1753, 1999.
- YONG, W. S. III e KUHAR, M. J. Radiohistochemical localization of benzodiazepine receptor in the rat brain. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 212: 337-346, 1980.
- YOUNG, A. M.; REES, K. R. Dopamine release in the amygdaloid complex of the rat, studies by brain microdialysis. **Neurosci. Lett.** 249: 49-52, 1998.
- YOUNG, A.; AGGLETON, J. P.; HELLAWELL, D. J.; JOHNSON, M.; BROKS, P.; HANLEY, J. R. E. Face processing impairments after amygdalotomy. **Brain Res.** 118: 15-24, 1995.
- ZANGROSSI Jr, H.; VIANA, M. B.; ZANOVELI, J.; BUENO, C.; NOGUEIRA, R. L.; GRAEFF, F. G. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 25: 637-645, 2001.
- ZEZULA, J.; CORTES, R.; PROBST, A.; PALACIOS, J. M. Benzodiazepine receptor sites in the human brain: autoradiographic mapping. **Neuroscience.** 25: 771-795, 1988.
- ZIFA, E.; FILLION, G. 5-Hydroxytryptamine receptors. **Pharmacological Reviews** 44: 401-458, 1992.

APÊNDICES

Tabela I: Resultados individuais da média de cinco episódios de IT (em segundos) e os dados transformados (logaritmo natural) de animais no controle, após o controle pós-cirúrgico (SHAM) e após a microinjeção de bicuculina (BIC, 0,1µg e 0,5µg em 0,2µL) no núcleo basolateral da amígdala (BLA).

Imobilidade Tônica - Grupo Bicuculina (duração da IT em segundos)								
Animal	Controle	ln Controle	Sham	ln Shan	BIC 0,1	ln BIC 0,1	BIC 0,5	ln BIC 0,5
1	183,50	5,21	270,00	5,60	341,75	5,83	403,00	6,00
2	124,80	4,83	152,00	5,02	161,00	5,08	779,00	6,66
3	200,00	5,30	152,75	5,03	130,50	4,87	218,00	5,38
4	55,50	4,02	50,20	3,92	64,40	4,17	51,40	3,94
5	303,60	5,72	181,70	5,20	519,50	6,25	613,60	6,42
6	202,60	5,31	135,80	4,91	169,40	5,13	379,00	5,94
Média	178,33	5,06	157,07	4,94	231,09	5,22	407,33	5,72
EPM	34,02	0,23	29,02	0,22	68,81	0,3	107,08	0,39

Tabela II: Resultados individuais da média de cinco episódios de IT (em segundos) e os dados transformados (logaritmo natural) de animais no controle, após o controle pós-cirúrgico (SHAM) e após a microinjeção de muscimol (MUS, 0,014µg e 0,028µg em 0,2µL) no núcleo basolateral da amígdala (BLA).

Imobilidade Tônica - Grupo Muscimol (duração da IT em segundos)								
Animal	Controle	ln Controle	Sham	ln Shan	MUS 0,014	ln MUS 0,014	MUS 0,028	ln MUS 0,028
1	370,20	5,91	248,60	5,52	488,00	6,19	67,60	4,21
2	298,60	5,70	133,20	4,89	87,60	4,47	22,60	3,12
3	250,25	5,52	183,00	5,21	23,20	3,14	6,80	1,92
4	309,25	5,73	156,20	5,05	78,60	4,36	41,00	3,71
5	362,60	5,89	217,20	5,38	219,60	5,39	113,20	4,73
6	300,75	5,71	370,00	5,91	368,00	5,91	238,20	5,47
7	77,40	4,35	80,00	4,38	92,60	4,53	60,40	4,10
Média	281,29	5,54	198,31	5,19	193,94	4,85	78,54	3,89
EPM	37,32	0,2	35,39	0,18	65,73	0,39	29,61	0,43

Tabela III: Resultados individuais da média de cinco episódios de IT (em segundos) e os dados transformados (logaritmo natural) de animais no controle, após o controle pós-cirúrgico (SHAM) e após a microinjeção de bicuculina precedido de α -metil-5-HT (BIC, 0,1µg e α -metil-5-HT 0,1µg em 0,2µL) no núcleo basolateral da amígdala (BLA).

IMOBILIDADE TÔNICA-GRUPO ALFA+BIC (Duração em segundos)								
Animal	Controle	Ln Controle	Sham	Ln Sham	BIC+ALFA	Ln BIC+Alfa	ALFA	Ln Alfa
1	96,4	1,98	96,2	1,98	122	2,09	55	1,74
2	87,8	1,94	102,2	2,01	60,4	1,78	6,6	0,82
3	93,6	1,97	79,6	1,90	11,2	1,05	16	1,20
4	99,2	2,00	98,8	1,99	13,6	1,13	5,2	0,72
5	104,6	2,02	60,2	1,78	95,2	1,98	26,8	1,43
6	97,6	1,99	116,8	2,07	163,4	2,21	46,8	1,67
7	73,8	1,87	62,8	1,80	144,8	2,16	12,6	1,10
MÉDIA	93,29	1,97	88,09	1,93	87,23	1,77	24,14	1,24
EPM	3,78	0,08	8,00	0,12	23,40	0,23	7,46	0,22

Tabela IV: Resultados da média do número de cruzamentos no teste do campo aberto em cobaias durante o tempo de 5 minutos no grupo controle que recebeu solução salina fisiológica (Salina 0,9 %, 0,2μL, n=5) no núcleo basolateral da amígdala.

ARENA-GRUPO CONTROLE (n° de quadrados percorridos)	
ANIMAL	QUADRADOS
1	0
2	1
3	1
4	0
5	2
Média	0,8
EPM	0,37

Tabela V: Resultado da média do número de cruzamentos no teste do campo aberto em cobaias durante o tempo de 5 minutos no grupo onde se administrou bicuculina (BIC, n=6, 0,5μg/0,2μL) no núcleo basolateral da amígdala.

ARENA-GRUPO BICUCULINA (n° de quadrados percorridos)	
ANIMAL	QUADRADOS
1	3
2	0
3	2
4	1
5	2
6	0
Média	1,3
EPM	0,5

Tabela VI: Resultado da média do número de cruzamentos no teste do campo aberto em cobaias durante o tempo de 5 minutos no grupo onde se administrou muscimol (MUS, n=10, 0,028μg/0,2μL) no núcleo basolateral da amígdala.

ARENA-GRUPO MUSCIMOL (n° de quadrados percorridos)	
ANIMAL	QUADRADOS
1	0
2	1
3	0
4	1
5	0
6	1
7	0
8	2
9	1
10	0
Média	0,6
EPM	0,22

Tabela VII: Resultado da média do número de cruzamentos no teste do campo aberto em cobaias durante o tempo de 5 minutos no grupo que recebeu α -metil-5-HT (Alfa, n=6, 0,1 μ g/0,2 μ L) microinjetado no núcleo basolateral da amígdala.

ARENA-GRUPO ALFA (n° de quadrados percorridos)	
ANIMAL	QUADRADOS
1	0
2	2
3	0
4	1
5	0
6	0
Média	0,5
EPM	0,34

Tabela VIII: Resultado da média do número de cruzamentos no teste do campo aberto em cobaias durante o tempo de 5 minutos no grupo que recebeu a microinjeção de α -metil-5-HT precedida por bicuculina (Alfa+BIC, n=4, 0,1 μ g/0,2 μ L para o α -metil 5-HT e para a BIC) no núcleo basolateral da amígdala.

ARENA-GRUPO BIC+ALFA (n° de quadrados percorridos)	
ANIMAL	QUADRADOS
1	0
2	1
3	1
4	0
Média	0,5
EPM	0,5

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](#)