

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

**Influência dos receptores 5-HT_{1A} e GABA_A do núcleo basolateral da amígdala na
resposta eletrofisiológica evocada no colículo inferior de ratos abstinentes de
diazepam**

Luis Fernando Scozzafave de Souza-Pinto

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, como
parte das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências – Área: Psicobiologia

RIBEIRÃO PRETO-SP

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

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

**Influência dos receptores 5-HT e GABAérgicos do núcleo basolateral da amígdala
sobre a resposta eletrofisiológica evocada no colículo inferior de ratos abstinentes de
diazepam**

Luis Fernando Scozzafave de Souza-Pinto

Orientador: Prof. Dr. Manoel Jorge Nobre

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, como
parte das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências – Área: Psicobiologia

RIBEIRÃO PRETO-SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza-Pinto, L. F. S.

Influência dos receptores 5-HT e GABAérgicos do núcleo basolateral da amígdala sobre a resposta eletrofisiológica evocada no colículo inferior de ratos abstinentes de diazepam. 75 p.:il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras
de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Psicobiologia.

Orientador: Nobre, Manoel Jorge

1. Drogas de Abuso. 2.Benzodiazepínicos. 3.Ansiedade. 4.Mesencéfalo. 5.GABA. 6. Serotonina. 7. Potencial Evocado Auditivo.

Agradeço

à orientação de

Manoel Jorge Nobre

à meus grandes e necessários amigos:

Caio Moreira, Cleiton Aguiar, Lézio Bueno, Milton Ávila, Rafael Ruggiero e Cleber Octaviano;

à minha pequena e suficiente família:

Dani, Dri, Papai e Mamãe;

às minhas fontes de conhecimento e emoção:

Alcides de Souza, David Azoubel e Luis Henrique Milan Novaes,

ao meu maior presente, desafio e amor, desde a minha primeira bicicleta:

Juliana Prado Vita

“O autêntico período da presunção está entre os vinte e seis e os trinta anos de idade; é o tempo da primeira maturação, com um forte resto de acidez. Com base no que sentem dentro de si, exigem respeito e humildade de pessoas que pouco ou nada percebem deles, e, faltando isso num primeiro momento, vingam-se com aquele olhar, aquele gesto presunçoso, aquele tom de voz que um ouvido e um olho sutis reconhecem em todas as produções dessa idade, sejam poemas ou filosofias, pinturas ou composições. Homens mais velhos e mais experientes sorriem diante disso, e comovidos se recordam dessa bela idade da vida, na qual nos irritamos com as vicissitudes de ser tanto e parecer tão pouco. Depois parecemos mais, é verdade – mas perdemos a boa crença de sermos muita coisa: que continuemos então a ser, por toda a vida, incorrigíveis tolos vaidosos.”

(Friedrich Nietzsche, em *O humano, demasiado humano*. Companhia das Letras, 2000)

ÍNDICE

1. Introdução	10
Colículo Inferior	13
Colículo Inferior e reações de defesa	15
Amígdala	21
O Potencial Evocado Auditivo	23
Benzodiazepínicos	24
Abstinência de Benzodiazepínicos	26
2. Justificativa	29
3. Objetivos	31
4. Materiais e Métodos	33
Animais	34
Drogas	
Procedimento para indução de dependência/abstinência de diazepam	
Procedimentos para administração oral das drogas	35
Equipamentos	37
Procedimento para microinjeção	
Delineamento Experimental	
Linha de Base	38
Teste	
Re-teste	
Histologia	39
Análise Estatística	40
5. Resultados	41
6. Discussão	45
7. Conclusões	53
8. Figuras	55
9. Referências Bibliográficas	64

1. Lista de abreviaturas

5-HT - serotonina

AM – amígdala, complexo amigdalóide

ANOVA – análise de variância

BLA – complexo basolateral da amígdala

BZD – benzodiazepínico

CeA – núcleo central da amígdala

CI – colículo inferior

CS – colículo superior

DAG – descarboxilase do ácido glutâmico

DZP – diazepam

EPM – erro padrão médio

MUS - muscimol

NCCI – núcleo central do colículo inferior

NGM – núcleo geniculado medial do tálamo

PEA – potencial evocado

PEA – potencial evocado auditivo

SAC – solução controle (sacarose)

SEA – sistema encefálico aversivo

SCP – substância cinzenta periaquedutal

SCPD – substância cinzenta periaquedutal dorsal

SMC - semicarbazida

Resumo

A produção de respostas condicionadas e incondicionadas geradas por sinais de natureza auditiva, envolvem a transmissão do sinal do colículo inferior para o núcleo geniculado medial do tálamo e daí diretamente para a amígdala. O complexo basolateral da amígdala está envolvido na modulação das características emocionais dos estímulos aversivos enquanto que o núcleo central consiste na via de saída dos componentes somáticos e autonômicos das reações de medo para o tronco cerebral. Alguns estudos indicam que os efeitos ansiolíticos de benzodiazepínicos são também mediados pelo complexo basolateral que é uma região rica em receptores GABAérgicos.

Diferente de outros tipos de drogas de abuso, o surgimento dos sintomas de abstinência a benzodiazepínicos parece não estar vinculado a um aumento na liberação de dopamina no sistema mesolímbico, em contraste com o já conhecido aumento dessas concentrações verificado após o tratamento crônico com outras drogas de abuso. Deste modo, é possível que os efeitos comportamentais, sensoriais e autonômicos decorrentes da abstinência de BZD possam ser reflexo de alterações no funcionamento ou do próprio receptor GABAérgico ou na modulação que o GABA exerce sobre outros sistemas, como o serotoninérgico, por exemplo. Em nosso estudo sugerimos a implicação indireta da modulação do complexo basolateral da amígdala tanto na ansiedade promovida pela abstinência de benzodiazepínicos, quanto naquela induzida por estímulos que produzem medo.

Abstract

The expression of conditioned and unconditioned fear responses generated by signals of auditory nature, involve transmission from the inferior colliculus to the medial geniculate nucleus of the thalamus and thence to the amygdala. The basolateral amygdala complex is involved in the modulation of emotional characteristics of aversive stimuli, while its central nucleus is the well-known outflow of somatic and autonomic components of fear reactions to the brainstem. Some studies indicate that the anxiolytic effects of benzodiazepines are also mediated by the basolateral complex, a region rich in GABA receptors.

Unlike other types of drugs of abuse, the appearance of benzodiazepine withdrawal symptoms does not appear to be linked to increases in the dopamine release in the mesolimbic system; in contrast to the familiar increases of dopamine concentrations observed after chronic treatment with other drugs of abuse. Thus, it is possible that the behavioral, sensory and autonomic effects arising from benzodiazepine withdrawal may be a reflection of changes in the GABA receptor itself or in the modulation that GABA exerts on other systems, such as serotonergic, for example. In our study, we suggest the involvement of indirect modulation of the basolateral amygdala complex on the changes induced by withdrawal of benzodiazepines at the brainstem level.

Introdução



As estratégias utilizadas pelos diversos organismos para sobreviver em seu meio natural envolvem dois aspectos motivacionais básicos, apetitivos e defensivos, que são similares nas diversas espécies de mamíferos (Lang et al., 1998). Estes tipos de estratégias estão estreitamente vinculados à capacidade do organismo de perceber seu meio através dos cinco sistemas sensoriais básicos: olfativo, tátil, visual, gustativo e auditivo. Com referência ao sistema auditivo, uma série de trabalhos demonstra a existência de fortes pressões seletivas sobre a maioria dos grupos de vertebrados para as habilidades de codificação e processamento dos diversos tipos de sons, o que resultaria em uma eficiente detecção, localização e identificação dos diversos tipos de fontes sonoras (Popper et al., 1997; Fay et al., 2000). Disfunções nesses circuitos geram uma série de alterações funcionais levando ao aparecimento de respostas mal adaptativas (crises audiogênicas), perturbações na expressão de respostas adaptativas (orientação em direção a uma fonte sonora, prejuízo da resposta de sobressalto) e ao surgimento de respostas bizarras decorrente de hiperexcitação dos circuitos auditivos (zumbidos) (Jane et al., 1965; Li et al., 1998a; 1998b; Garcia-Cairasco, 2002). Em todo caso, a capacidade de detectar o predador, dentro de um ambiente potencialmente perigoso surge, presumivelmente, como uma das mais fundamentais funções auditivas (Gans, 1992; Casseday et al., 1996).

Vários estudos demonstraram que aumentos na intensidade de estimulação elétrica de regiões mesencefálicas, como a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCP), camadas profundas do colículo superior (CS), e colículo inferior (CI), através de seu núcleo central induz, de forma progressiva, o aparecimento de comportamentos de alerta, congelamento e fuga (Coimbra et al., 1996; Coimbra & Brandão, 1997, Melo & Brandão, 1995a; 1995b). Sabe-se que estes comportamentos refletem a natureza aversiva da

estimulação porque, quando submetidos a um procedimento de resposta operante, ratos aprendem rapidamente a interrompe-la (Brandão et al., 1982; Melo et al., 1992). Em geral, estas respostas são acompanhadas de analgesia (Fanselow, 1991; Coimbra et al., 1992) e alterações na pressão arterial, frequência cardíaca e respiração (Hilton & Redfern, 1986; Brandão et al., 1988; Carrive, 1991). Dessa forma, esse grupo de regiões encefálicas, em conjunto com alguns núcleos hipotalâmicos e com o complexo amigdalóide, vieram a ser determinados como os principais constituinte do que se caracterizou de sistema encefálico aversivo (SEA), um sistema neuronal responsável pela modulação/expressão da resposta defensiva eliciada por estímulos que naturalmente produzem medo (Graeff, 1990; Brandão et al., 1994; Brandão et al., 1999).

Sistema Encefálico Aversivo

O SEA é um sistema complexo composto por uma série de estruturas muitas delas localizadas no mesencéfalo (Pollak et al., 2003), região esta que alcança, durante a filogenia, importante desenvolvimento, anterior às regiões telencefálicas (Aitkin, 1983). As fibras mesencefálicas que carregam informações de natureza acústica compreendem uma gama de corpos neuronais e feixes de axônios, dispostos paralelamente ou em série, que convergem, em grande parte, para uma área comum (Pollak et al., 2003), o CI, estrutura que consiste de uma massa neuronal central de células circundadas por um córtex (Morest et al., 1984; Oliver et al., 1984; Faye-Lund et al., 1985). Na literatura, a maioria dos trabalhos sobre o CI versa sobre o papel dessa estrutura na transmissão e modulação da informação auditiva para estruturas superiores e na sua participação na geração e elaboração do comportamento de defesa. O CI envia fibras principalmente para o núcleo geniculado medial do tálamo. Além disso, mantém conexões indiretas com a SCP, o

hipotálamo e a amígdala (AM), dentre outras regiões (Webster, 1995). Portanto, o CI apresenta conexões importantes com estruturas que compõem o SEA (Graeff, 1990), como veremos abaixo.

Colículo Inferior

O CI é uma estrutura bilateral localizado no mesencéfalo dorsal e consiste em um relé das fibras auditivas que ascendem em direção ao córtex temporal, onde ocupa uma posição fundamental na recepção e processamento dos sinais auditivos. Inicialmente, foi verificada a existência de três principais subdivisões do CI em mamíferos: o núcleo central, núcleo externo e o núcleo pericentral (Ramon Y Cajal, 1909). Na literatura, podemos encontrar outras subdivisões e nomenclaturas para o CI, tais como as sugeridas por Morest et al. (1984) que distinguiram regiões distintas no CI de gatos; uma região tectal (composta pelo núcleo central e seus subnúcleos medial, central, lateral e ventral); um córtex (com suas partes dorsal e caudal); um núcleo paracentral (composto pelos subnúcleos comissural, dorsomedial, rostral, lateral e ventrolateral) e outra tegmental (composta basicamente por áreas pericoliculares e o núcleo do braço do CI). Posteriormente, Huffman et al. (1990) adotaram uma subdivisão em três principais núcleos: núcleo central, córtex externo e córtex dorsal, divisão utilizada neste trabalho.

Núcleo Central

O núcleo central do CI recebe as principais aferências auditivas ascendentes provenientes dos núcleos coclear dorsal e ventral, complexo olivar superior, e núcleos do lemnisco lateral (Woolard et al., 1940; Moore et al., 1963; Roth et al., 1978). Do CI as fibras da via auditiva se dirigem para o núcleo geniculado medial (NGM) e daí para o

córtex auditivo (Osen, 1973). Porém, nem todos os núcleos do CI recebem aferências diretamente dos circuitos auditivos. Moore et al. (1963) verificaram que o núcleo central é o principal alvo das fibras auditivas provenientes dos núcleos cocleares (dorsal e ventral) e do complexo olivar superior. Ainda em relação às aferências do núcleo central, grande parte delas provém do próprio CI, ou seja, das conexões intranucleares e coliculares contralaterais. Já às eferências se dirigem principalmente para a parte ventral do NGM. Todas estas projeções que ascendem em direção as áreas corticais auditivas mantêm uma incrível similaridade em uma ampla gama de mamíferos (Moore et al., 1977).

Córtex Externo

Ao contrário do núcleo central, o córtex externo recebe escassas aferências contralaterais cocleares e do núcleo olivar superior, sendo que suas principais aferências provêm das áreas cerebrais 39 e 41, ipsilaterais, núcleo da coluna dorsal (“inputs” somatossensoriais), do núcleo central (“inputs” auditivos), do núcleo parabraquial, núcleo cuneiforme, grácil, trigeminal, e da parte lateral da substância negra (Coleman and Clerici, 1987). Em relação às eferências, o córtex externo envia maciças projeções bilaterais para o núcleo coclear, para o NGM (LeDoux et al., 1987) e núcleo pontino dorsolateral (Kawamura et al., 1974). O córtex externo também apresenta conexões com estruturas envolvidas na gênese e modulação de comportamentos defensivos como a SCP, CS, hipotálamo e AM (via tálamo) (Adams, 1980; LeDoux et al., 1985; LeDoux et al., 1990).

Córtex Dorsal

O córtex dorsal também apresenta conexões com a SCP e a substância negra. Em relação às suas aferências, o córtex dorsal recebe substanciais aferências corticais

ipsilaterais de várias regiões, como as áreas 20, 36 e 41, e do globo pálido (Moriizumi et al., 1991), e diferentemente do córtex externo, envia a maioria das suas projeções para a divisão dorsal do NGM. Devido a essas diferentes conexões entre os núcleos do CI, Tokunaga (1984) propôs uma dualidade funcional dessa estrutura: o núcleo central seria, primordialmente, uma estação relé das vias auditivas, enquanto que os córtices dorsal e externo, recebendo informações não só auditivas, mas também visuais e somáticas, seriam núcleos participantes da integração sensorial-motora. Corroborando esta sugestão, Moriizumi et al., (1991) verificaram que a maioria das fibras que se originam no globo pálido, estrutura envolvida no controle motor, e que se dirigem para o CI, apresentam seus terminais no núcleo dorsal.

Colículo inferior e as reações de defesa

Uma série de relatos na literatura têm demonstrado que algumas estruturas do sistema nervoso central, tais como a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD), o camadas profundas do CS, hipotálamo medial e a AM, têm participação ativa na geração e elaboração de respostas defensivas (Schmitt & Karli, 1980; Graeff, 1981; Brandão et al., 1994; Brandão et al., 1999). No fim da década de 80 surgiu a proposta de se investigar a participação do CI na reação de defesa (Brandão et al., 1988). Estes autores verificaram que reações de fuga e respostas autonômicas características do comportamento defensivo eram produzidas por microinjeções de bloqueadores GABAérgicos nesta estrutura. Posteriormente, foram realizados outros experimentos que evidenciaram as propriedades aversivas da estimulação do CI. Melo et al. (1992) observaram que a administração sistêmica de midazolam ou a microinjeção de midazolam ou muscimol no CI deprime a resposta de fuga aprendida num procedimento de “switch-off”. De forma similar a

microinjeção de agonistas serotoninérgicos 5-HT_{1A} ou 5HT₂ e bloqueadores da recaptação de 5-HT diretamente no CI causa um aumento dose-dependente na latência, assim como uma redução na frequência das respostas aprendidas de switch-off induzidas pela estimulação elétrica do CI (Melo et al., 1995b). Estas drogas também causaram efeitos antiaversivos em outro modelo animal, o labirinto em cruz elevado (Melo, 1995a) sugerindo que a liberação endógena de 5-HT, nessa estrutura, seria responsável pelos efeitos observados, traçando um paralelo com os efeitos da transmissão serotoninérgica na SCPD. Cardoso et al. (1992) verificaram que a microinjeção de morfina em baixas doses também atenua as respostas de alerta, congelamento e fuga, produzidas por estimulação elétrica do CI, indicando uma modulação opióide das respostas defensivas. Posteriormente, estes autores verificaram o envolvimento de aminoácidos excitatórios no comportamento defensivo elaborado no CI. Os autores observaram que a microinjeção de baixas doses de N-metil-D-aspartato (NMDA) promove um aumento dos batimentos e da frequência cardíaca e na pressão arterial durante a fuga, alterações autonômicas características da reação de defesa eliciada em outras estruturas relacionadas ao SEA (Cardoso et al., 1994).

Estimulação química do colículo inferior

O GABA é o neurotransmissor mais amplamente distribuído no SNC de vertebrados (Bormann, 2000). As estruturas localizadas no teto mesencefálico também possuem altas concentrações dessa substância (Okada, 1974; Sandner et al., 1981), particularmente o CI (Shiraishi et al., 2001). Esses resultados foram corroborados por estudos bioquímicos (Adams, 1979; Contreras et al., 1979) e imunológicos (Thompson et al., 1985), que também revelaram a presença de GABA nessa estrutura, e das enzimas responsáveis por sua síntese – a descarboxilase do ácido glutâmico (DAG), e degradação -

a GABA transaminase (Tachibana et al., 1974; Fisher and Davies, 1976; Contreras et al., 1979; Adams & Wenthold, 1979). Outros trabalhos, utilizando ligantes específicos, também demonstraram a existência, nesta estrutura, de uma grande quantidade de receptores GABA_A (Sieghart, 1986; Bristow et al., 1988; Glendenning et al., 1988; Caspary et al., 1990; Shiraishi et al., 2001) e GABA_B (Bowery et al., 1987; Chu et al., 1990). Dados obtidos de estudos comportamentais utilizando modelos animais de ansiedade revelaram, de forma consistente, a interação das ações antiaversivas dos benzodiazepínicos com mecanismos GABAérgicos no teto mesencefálico (Brandão et al., 1982; Bovier et al., 1982; Brandão et al., 1985; Graeff et al., 1986; Leão-Borges et al., 1988; Brandão et al., 1990; Melo et al., 1992; Brandão et al., 1993; Brandão et al., 1994; Brandão et al., 1999; Pandóssio et al., 1999; 2000).

Microinjeções de agonistas GABAérgicos em estruturas relacionadas ao processamento da informação aversiva promovem efeitos ansiolíticos similares aos tranquilizantes menores (Brandão et al., 1982; Bovier et al., 1982; Audi et al., 1987). Esses efeitos característicos das drogas benzodiazepínicas, assim como dos agonistas GABAérgicos, estão vinculados à ação do GABA diretamente no receptor GABAérgico pós-sináptico (Olsen, 1982; Haefely, 1985). A administração de antagonistas GABAérgicos nessas mesmas estruturas elicia o comportamento de fuga acompanhado de respostas autonômicas características da reação de defesa (Millan et al., 1986). A participação do sistema GABAérgico do CI na mediação das respostas aversivas foi primeiramente mostrada em um estudo com a administração do antagonista de receptores GABA_A, bicuculina, nessa estrutura (Brandão et al., 1988). Os resultados revelaram uma clara ativação comportamental, acompanhada de saltos, intercalada com curtos períodos de congelamento, além de alterações autonômicas (aumentos na pressão arterial e frequência

cardíaca). Estas respostas são similares às aquelas observadas após estimulação da SCPD ou do hipotálamo medial, estruturas evidentemente envolvidas nas reações de defesa e que compõem o SEA (Graeff, 1990). Esses resultados levaram à hipótese da participação de uma inibição GABAérgica tônica sobre os estados aversivos mediados pelos substratos neurais do CI, além de sugerir ser essa também uma estrutura participante do SEA (Brandão et al., 1988). Em um estudo posterior (Melo et al., 1992), foi constatado que a administração sistêmica ou local de benzodiazepínicos ou local de agonistas GABAérgicos atenua, de maneira dose-dependente, os efeitos aversivos da estimulação elétrica do CI num procedimento de “switch-off”, no qual o animal aprende a desligar a estimulação aversiva. Da mesma forma, a administração dessas drogas gera um forte efeito depressor sobre as respostas aversivas condicionadas e incondicionadas induzidas por estimulação elétrica do CI e de outras estruturas do teto mesencefálico (Kiser et al., 1975; Schenberg et al., 1978; Brandão et al., 1982). Neste laboratório, foi demonstrado que a administração sistêmica ou central do benzodiazepínico midazolam, ou a microinjeção no CI do agonista GABA_A muscimol, atenua as consequências aversivas da estimulação elétrica dessa região sem gerar comprometimento motor (Pandóssio et al., 1999), sugerindo que a facilitação da neurotransmissão GABAérgica nessa estrutura causa efeitos antiaversivos.

O envolvimento de mecanismos GABAérgicos na regulação dos substratos neurais que processam as respostas defensivas mediadas no nível do CI pode ser melhor compreendido a partir da observação de que a resposta de congelamento induzida pela administração local de semicarbazida, substância que inibe a descarboxilase do ácido glutâmico, é acompanhada de alguns correlatos sensoriais e eletrofisiológicos, como veremos a seguir.

Estimulação elétrica do colículo inferior

As respostas de defesa expressadas pelos diferentes organismos, particularmente os mamíferos, estão organizadas dentro de um padrão hierárquico específico que varia de estados de alerta e congelamento, até a fuga (Blanchard & Blanchard, 1988). As respostas comportamentais eliciadas por estimulação elétrica do CI (Brandão et al., 1980; Melo et al., 1992; Brandão et al., 1994; Maisonnnette et al., 1996; Brandão et al., 1999; Pandóssio et al., 1999; Castilho et al., 2001; Lamprea et al., 2002; Macedo et al., 2002; Santos et al., 2002) partilham muitas das características observadas na reação de defesa induzida pela estimulação de outras estruturas pertencentes ao SEA, tais como a AM, camadas profundas do CS, SCPD e hipotálamo medial (Brandão et al., 1982; Brandão et al., 1994). Em geral, essas respostas são acompanhadas também de alterações autonômicas, mudanças na pressão arterial, frequência de batimento cardíaco e respiração (Hilton et al., 1986; Yardley et al., 1986; Brandão et al., 1988) e analgesia (Coimbra et al., 1992; 1997), que vão dar o suporte necessário ao organismo para uma possível fuga ou confronto direto em uma situação de ameaça.

Alguns experimentos utilizando o paradigma do comportamento operante, no qual os animais se engajam em tarefas que permitem interromper ou desligar a estimulação elétrica do CI (*switch-off*) nos permitem afirmar a natureza aversiva deste tipo de estímulo, assim como a característica defensiva da resposta (Melo et al., 1992; Brandão et al., 1997). Parece então que o CI está envolvido, assim como as outras estruturas do SEA, na mediação das respostas defensivas eliciadas por estímulos externos de perigo, particularmente os de natureza auditiva, no nível do teto mesencefálico.

Neste laboratório temos demonstrado que aumentos graduais na estimulação elétrica do CI de ratos geram um estado aversivo inicialmente caracterizado por comportamentos de alerta (no qual o animal interrompe qualquer atividade na qual esteja engajado, perscrutando cuidadosamente o ambiente), seguido de congelamento (imobilidade tensa acompanhada de algumas respostas autonômicas como exoftalmia, piloereção e arqueamento do dorso), e fuga (resposta caracterizada por saltos e galopes) todas elas estreitamente vinculadas a esta estimulação (Brandão et al., 1980; 1993; 1994; 1997; 1999; Melo et al., 1992; Coimbra et al., 1993; Melo et al., 1995b; Maisonnnette et al., 1996; Troncoso et al., 1998; Pandóssio et al., 1999; 2000; Cuadra et al., 2000; Castilho and Brandão, 2001; Lamprea et al., 2002; Macedo et al., 2002). A administração local de benzodiazepínicos ou agonistas GABAérgicos (Melo et al., 1992; Pandóssio et al., 1999) e agonistas ou bloqueadores da recaptção de 5-HT (Melo et al., 1995b) aumenta significativamente os limiares aversivos de estimulação elétrica e a latência para a resposta em procedimentos de “switch-off”. Foi demonstrado também que a estimulação elétrica do CI aumenta o tempo de congelamento, índice de analgesia, e frequência de respostas autonômicas, assim como diminui número de levantamentos e auto-limpeza, quando utilizada como estímulo incondicionado num paradigma de condicionamento clássico no qual foi utilizado um pareamento com luz (Castilho et al., 2001).

Além disso, a expressão da proteína Fos após estimulação elétrica do CI em intensidade de corrente que gera um contínuo de respostas que varia do alerta até a fuga, revelou a ativação de diversas estruturas cerebrais estreitamente vinculadas à modulação e produção de respostas defensivas como a AM, córtex frontal, hipocampo dorsal, e SCPD (Lamprea et al., 2002). Cumpre notar que alguns trabalhos tem sugerido também a possível mediação de outras estruturas encefálicas sobre os estados aversivos gerados por

estimulação do CI, dentre elas possivelmente a substância negra (Coimbra et al., 1989; Coimbra & Brandão, 1993), e a AM (Macedo et al., 2002).

Amígdala

A AM, localizada bilateralmente no lobo temporal anterior do encéfalo de primatas humanos e não-humanos é, na verdade, um complexo de muitos núcleos (Amaral et al., 2002), identificada pela primeira vez por Burdach no século XIX. Este autor originalmente descreveu um grupo de células conhecidas hoje como complexo basolateral da amígdala (BLA). Um grande número de estruturas que rodeia o BLA foi então sendo identificado em muitas espécies e constituem o que hoje é chamado de complexo amigdalóide. Esta estrutura atrai um contínuo interesse por causa de seu papel central no processamento emocional (Sah, 2003). Um estudo baseado em verificações químio e citoarquitetônicas em ratos, subdividiu a AM em 13 regiões diferentes (Pitkanen et al. 1997) conferindo à ela um alto grau de complexidade e grande número de interconexões entre núcleos e divisões. Neste estudo, consideramos o BLA como um complexo formado pelo núcleo lateral, basal e basal acessório (Maissonette et al., 1996; Macedo et al., 2002). Há uma variedade de funções atribuídas a AM dentre elas: a memória; atenção; interpretação de significados emocionais em estímulos sensoriais; elaboração e produção de reações emocionais de medo e comportamento social (Adolphs et al., 1995; Amaral, 2002).

A produção de respostas condicionadas e incondicionadas geradas por sinais de natureza auditiva, envolvem a transmissão do sinal do CI para o NGM e daí diretamente para a AM (LeDoux et al. 1994; Maissonette et al. 1996; 2000; Brandão et al., 1999)

sugerem a importância da AM como um relevante substrato neuronal dos processos aversivos. O BLA está envolvido em filtrar estímulos aversivos, conferindo a eles conotações emocionais, enquanto o núcleo central (CeA) consiste em uma importante via de saída dos componentes somáticos e autonômicos das reações de medo, por meio de projeções para o hipotálamo e regiões do tronco cerebral (LeDoux, 1988; 1990; 1994, Rizvi et al., 1991).

O BLA mantém conexões indiretas, via tálamo, com a CI (Lamprea et al., 2002). Há evidências de que lesões no BLA ou CeA promovem efeitos distintos na aversividade produzida por meio da estimulação elétrica do CI, de modo que a lesão do BLA facilita, enquanto que a lesão do CeA inibe a aversividade gerada; sugerindo uma relação funcional entre estados aversivos gerados no CI e a integridade da AM (Maissonette et al., 1996). Ainda, há indícios de que estados aversivos gerados no CI estão sobre influência de mecanismos regulatórios serotoninérgicos no BLA; sendo que a lesão desses neurônios promove o aumento da aversividade gerada ao nível do CI. Estes resultados sugerem que os neurônios de saída do CeA, que se projetam para áreas mesencefálicas - sabidamente envolvidas na expressão autonômica e somática do medo - estão sobre forte influência dos neurônios do BLA (Macedo et al. 2002).

Alguns estudos indicam que os efeitos ansiolíticos de benzodiazepínicos (BZD) são também mediados pelo BLA que é uma região rica em receptores GABAérgicos. A microinjeção local de midazolam e clordiazepóxido no BLA, induzem um efeito ansiolítico, enquanto que a injeção de midazolam no CeA não produz nenhum efeito (Niehoff et al., 1983; Thomas et al., 1985). Lesões dos neurônios do BLA bloqueiam a

amnésia anterógrada induzida por diazepam em uma tarefa de esquiva inibitória, enquanto lesões no CeA nada fazem (Tomaz et al.,1992).

O potencial evocado auditivo

O eletroencefalograma (EEG) descoberto no início do século XX, forneceu a possibilidade de se registrar a atividade elétrica de populações neuronais e continua sendo usada largamente como importante ferramenta para exames clínicos de distúrbios cerebrais. Mapear minuciosamente a atividade cerebral mensurando a velocidade com que informação se propaga pelos circuitos neuronais continua sendo uma tarefa impossível para os métodos não invasivos de neuro-imagem como: a ressonância magnética; tomografia computadorizada e tomografia por emissão de pósitrons. Se o potencial medido for ocasionado por um estímulo sensorial externo o EEG é caracterizado como potencial evocado (Moraes et al., 2000). Mesmo sendo um método invasivo, a inserção de eletrodos intracerebrais de registro consiste em uma ferramenta poderosa para avaliarmos a funcionalidade de populações e redes de neurônios ao longo do tempo (Nicollelis et al., 1997).

As aplicações práticas de medida de potencial evocado auditivo (PEA) têm sido usadas para propósitos clínicos. Biacabe et al. (2001) fizeram uma revisão com o objetivo de descrever a anatomia funcional de estruturas auditivas geradas pelo potencial evocado auditivo do tronco encefálico (BAEP, brainstem auditory evoked potential), e propõe aplicações clínicas como a identificação de neurinomas acústicos (tumores) ou lesões, diagnóstico precoce de problemas auditivos em crianças, e para pacientes que não respondem a testes audiométricos tradicionais. Entretanto a correlação dos sítios

anatômicos exatos e os tipos de onda gerados no BAEP continuam merecendo um estudo aprofundado.

Em laboratório, resultados obtidos por Nobre et al. (2003) mostram que microinjeções de semicarbazida (SMC) no IC induzem o comportamento de congelamento, o aumento na amplitude dos PEA (amplitude da onda P1) associado a uma redução na amplitude da resposta de sobressalto. A inibição das funções GABAérgicas no CI por meio da semicarbazida parece estar relacionada também com a reatividade dos neurônios do CI a estímulos auditivos. Brandão et al. (2001) verificaram que a microinjeção unilateral de glutamato no CI, em uma dose que causa o comportamento de congelamento - em ratos com eletrodos implantados bilateralmente - produziu um aumento ipsilateral dos PEA registrados nessa região, sugerindo que o aumento da estimulação aversiva promove um aumento na reatividade dos neurônios do CI aos estímulos auditivos. A medida do PEA também é utilizada em estudos para aferência de modificações neuronais relativas ao uso contínuo ou agudo de drogas de abuso como o álcool (Chu et al., 1978; Begleiter et al., 1981; Squires et al., 1978) e diazepam (Cabral et al., 2009).

Benzodiazepínicos

Os benzodiazepínicos (BZD) têm sido amplamente utilizados por suas propriedades ansiolíticas, hipnóticas, sedativas, anticonvulsivantes, miorelaxantes, assim como na anestesia pré-operatória ou no tratamento da síndrome de abstinência de álcool (File 1985; Woods et al. 1992; 1995). Logo após sua introdução na prática clínica, em meados dos anos 60, o uso de benzodiazepínicos cresceu rapidamente correspondendo a 83% das vendas no mercado mundial de drogas sedativo-hipnóticas (Woods et al. 1992).

Nos anos posteriores ao seu lançamento no mercado mundial (1960), foram observados os primeiros casos de uso abusivo, além de desenvolvimento de tolerância, de síndrome de abstinência e de dependência pelos usuários crônicos de BZD. Tais evidências modificaram a postura da sociedade em relação aos BZD que, do auge do entusiasmo nos anos 70, passou à restrição do uso a partir da década seguinte. Nos Estados Unidos, por exemplo, o uso destes medicamentos pela população chegou a atingir 11,1% em 1979, diminuindo para 8,3%, em 1990 (Silva, 1999).

Toda popularidade dos BZD está principalmente ligada a sua grande eficácia, presença de mínimos efeitos colaterais assim como baixo risco de overdose, quando comparado com outros agentes ansiolíticos, como os barbitúricos. No que diz respeito aos seus efeitos colaterais os principais incluem sonolência, incoordenação motora e ataxia. Alguns desses efeitos incluem danos de memória e desinibição comportamental, que pode variar de leve excitação até agressão (Shader et al., 1993). Uma das características observadas com o uso clínico dos BZD diz respeito à rápida tolerância aos seus efeitos sedativos, mas não aos seus efeitos ansiolíticos, o que explica o fato de muitos indivíduos que utilizam essas substâncias não aumentarem, com o tempo, a dose terapêutica inicialmente prescrita (Taylor, 1989). Todos os BZD produzem seus efeitos intensificando a ação do GABA, o neurotransmissor inibitório mais importante do sistema nervoso central, tanto em relevância funcional quanto em número. Os receptores GABAérgicos estão acoplados a um canal de cloro que, quando aberto, permite o influxo de íons Cl^- causando, por sua vez, a hiperpolarização da célula nervosa. O acoplamento de um BZD, como o diazepam (DZP), no seu sítio de ação específico atua como um reforçador dos efeitos do GABA, permitindo que mais íons Cl^- entrem na célula nervosa, fazendo com

que ela fique mais resistente à excitação (Kandel et al. 2000). Os BZD não se ligam no mesmo sítio ativo que o GABA endógeno, mas se ligam a sítios distintos situados entre as subunidades α e γ contidos no receptor GABA_A. Embora a maioria dos receptores GABA_A sejam sensíveis a BZD, existe uma minoria de receptores GABA_A (contendo subunidades $\alpha 4$ e $\alpha 6$) que são insensíveis aos BDZ clássicos, mas em vez disso, são sensíveis a outras classes de drogas GABAérgicas, tais como os neuroesteróides e o álcool. Além disso, existem “receptores benzodiazepínicos periféricos” que não são associados com receptores GABA_A. Portanto, tem se recomendado que as expressões “receptor BDZ” ou “receptor GABA/BZD” sejam substituídas pelo termo “sítio benzodiazepínico” (Barnard et al., 1998).

Abstinência de benzodiazepínicos

Embora por um longo tempo a utilização dos BZD fosse considerada como livre de consequências adversas, grande atenção tem sido dada ao potencial de abuso e dependência dessa classe de drogas, sobretudo em indivíduos tratados cronicamente (File, 1985; Busto et al. 1986a; 1986b; Miller et al., 1990; Woods et al., 1992). A síndrome de abstinência de BZD é geralmente breve e resulta em poucas consequências para o indivíduo, quando comparada à abstinência de outras drogas de abuso como cocaína, nicotina e opiáceos. No entanto, a tentativa de evitar os efeitos aversivos - ainda que relativamente tênues - provocados pela abstinência, levam o paciente a querer manter o seu uso e, por si só, explica a relutância de muitos em interromper o tratamento (Busto et al., 1991). O aparecimento de uma síndrome de abstinência após a interrupção súbita do tratamento com uma droga de abuso (*withdrawal*) reflete a adaptação do organismo à

presença continuada da droga de forma que sua retirada ocasione distúrbios fisiológicos, sensoriais e afetivos acentuados, cujo sentido é geralmente oposto aos seus efeitos farmacológicos (Graeff, 1989). De fato, durante a abstinência de BZD, a ansiedade original, presente no momento da prescrição do medicamento, freqüentemente retorna de uma forma mais intensa, um fenômeno conhecido como ansiedade de reação (*rebound anxiety*) (Rickels et al. 1988a). Este tipo de ansiedade pode incluir uma gama de sintomas que variam de sintomas “psicológicos”- como apreensão, irritabilidade, insônia e disforia - até outros eminentemente somáticos, como palpitações, tremores, espasmos musculares, distúrbios gastrintestinais e outros; boa parte deles, no mais das vezes, já está presente no momento da prescrição da droga. (Lader et al.,1987; Rickels et al. 1988a; 1988b). Há também a presença de outros sintomas característicos da abstinência como: hipersensibilidade (tátil, sonora e luminosa); dores corporais e, em alguns casos, crises epiléticas e catatonia (Lader et al., 1987; Miller et al., 1990; Shader et al., 1993; Rosebush et al., 1996). Foi observado em indivíduos abstinentes ao relatar, após a expressão de um estado catatônico, um sentimento de medo extremo que os deixavam numa situação de imobilidade absoluta (Rosebush et al., 1996), descrições semelhantes foram obtidas por Nashold et al.(1969) que estimularam diversas áreas mesencéfalicas em humanos e obtiveram relatos de dor difusa e sensação extremamente desagradável.

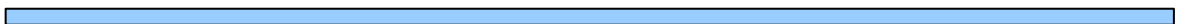
Diferente de outros tipos de drogas de abuso, o surgimento destes sintomas parece não estar vinculado a um aumento na liberação de dopamina (o principal neurotransmissor envolvido nos processos motivacionais da adição a drogas de abuso) no sistema mesolímbico (Lingford-Hughes et al. 2003). Os efeitos decorrentes da administração crônica de BZD diferem acentuadamente daqueles verificados com outras drogas de abuso na medida em que este tipo de tratamento não altera os níveis de dopamina em estruturas

límbicas, como o núcleo accumbens (Finlay et al. 1992), em contraste com o já conhecido aumento dessas concentrações verificado após o tratamento crônico com outras drogas de abuso, como a nicotina, anfetamina e opióides (Koob et al., 1988; Koob, 1992).

Sabe-se que a manutenção da auto-administração de DZP em ratos é bloqueada após injeção sistêmica de antagonistas BZD ou GABAérgicos (Pilotto et al. 1984). Por outro lado, a administração crônica de DZP deprime a sensibilidade dos neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe ao GABA sem afetar a sensibilidade à própria serotonina (5-HT). O tratamento agudo com o antagonista de receptores BZD, flumazenil, restaura de imediato a sensibilidade ao GABA; indicando que as alterações no receptor GABAérgico são mediadas no próprio sítio de ligação dos BZD (Hunkeler et al., 1981; Polc et al., 1981). Foi demonstrado também que a administração crônica de BZD leva a uma diminuição na capacidade do GABA de inibir a atividade dos neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe, ocasionando um aumento na liberação de 5-HT no BLA (Hutchinson et al. 1996).

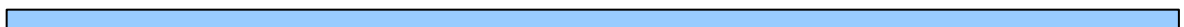
Deste modo, supõe-se que os efeitos comportamentais, sensoriais e autonômicos decorrentes da abstinência de BZD poderiam ser consequências de alterações no funcionamento ou do próprio receptor GABAérgico ou na modulação que o GABA exerce sobre outros sistemas, como o serotoninérgico, por exemplo. Assim, estados aversivos observados durante a síndrome de abstinência de BZD poderiam ser consequência de um desbalanceamento na modulação que a BLA exerce sobre áreas do tronco cerebral, envolvidas na expressão somática e autonômica de comportamentos defensivos, como o CI (Lamprea et al., 2002; Macedo et al. 2002; 2005; 2006; 2007).

Justificativa



De forma geral, boa parte dos estados emocionais alterados presentes na abstinência de uma droga de abuso são frequentemente observados em animais expostos a situações de perigo, ou a partir da estimulação elétrica ou química de estruturas do tronco cerebral pertencentes ao SEA, tais como a AM, hipotálamo medial, SCP, camadas profundas do CS e CI (Brandão et al. 1999). A facilitação da neurotransmissão serotoninérgica ou o bloqueio da neurotransmissão GABAérgica nessas estruturas produz respostas características de estados de medo e ansiedade (Bandler et al., 1988; Graeff et al. 1993), similar aquelas observadas durante a abstinência de BZP (Brandão et al. 1999; 2005; File et al. 1991; Martijena et al., 1996, Souza Pinto et al., 2007; De Ross et al. 2007) levando à hipótese de que as projeções indiretas dos núcleos da AM para o CI, façam parte do sistema que modula os estados aversivos. Sugere-se a implicação de mecanismos neurobiológicos análogos tanto na ansiedade promovida pela abstinência dessa classe de drogas, quanto naquela induzida por estímulos que produzem medo.

Objetivos



Este estudo pretende avaliar:

1 - as possíveis modificações da reatividade dos neurônios do CI induzidas pela interrupção do tratamento crônico com DZP.

2 - a importância da neurotransmissão GABAérgica e serotoninérgica do BLA nas possíveis alterações induzidas pela abstinência, através do registro dos potenciais evocados no núcleo central do CI de ratos.

Materiais e Métodos



Animais

Ratos Wistar machos, pesando entre 90 e 100 g no início dos experimentos, provenientes do Biotério Central do Campus da USP - Ribeirão Preto, mantidos no biotério setorial do Laboratório de Neuropsicofarmacologia. Os animais foram alojados em grupos de 4 por caixa (34cm x 41cm x 16cm), com cama de maravalha trocada 3 vezes por semana e temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ \text{C}$) em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com as luzes acesas às 7h, até o último dia de experimento. A água é controlada e a ração é oferecida a vontade. Os experimentos serão conduzidos segundo as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto (CEUA - Processo nº 08.1.134.53.7).

Drogas

Foram utilizadas o diazepam (DZP, Valium, Roche, 10 mg/kg/ml), o agonista de receptores de serotonina do tipo 5HT_{1A} 8-OH-DPAT (8-hidroxi-2-(di-*n*-propilamina) tetralina, 1 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$), a serotonina, (5-HT, 10 nmol/0,2 μl), o inibidor da enzima descarboxilase do ácido glutâmico semicarbazida (SMC, Sigma, USA, 6 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$) e o agonista de receptores GABA_A muscimol (MUS, RBI, USA, 1 nmol/ 0,2 μl). O DZP foi diluído numa solução de água, sacarose (5%) e propilenoglicol (5%). As drogas injetadas no BLA foram diluídas em salina, que também foi utilizada como solução controle. As soluções foram preparadas a partir de soluções stocks armazenadas a -10° imediatamente antes dos experimentos.

Procedimento para indução de dependência/abstinência de diazepam

Após 48 horas de habituação ao biotério, foram iniciados os procedimentos para indução de dependência/abstinência. Diariamente, às 19 horas, por 18 dias, os animais foram privados por 14 horas de água, sendo restituída às 9 horas da manhã do dia seguinte. Trinta minutos antes, o Diazepam foi oferecido via oral, segundo um procedimento de ingestão semi-voluntária. Ou seja, às 08h30min da manhã os animais foram isolados em caixas individuais e foram oferecidas pipetas contendo a soluções controle (SAC, propilenoglicol, 5%; sacarose, 5% diluídos em um volume de 2 ml de água) ou Diazepam (DZP, 10mg/ml por peso corporal adicionado a 2 ml de solução controle).

Procedimentos para administração oral das drogas

O DZP foi oferecido na concentração de 10mg/Kg de peso corporal. No entanto, em comparação com a administração endovenosa ou intraperitoneal, a administração oral de diazepam possui duas complicações: pouca palatabilidade associada a produção de efeitos tardios, o que, em muitos casos, prejudica a possibilidade da auto-administração. Deste modo, utilizamos um procedimento de ingestão oral adaptado de Schleimer (2005), no qual os animais foram submetidos a 14 horas de privação de água (17h às 9h), seguida de 10 horas de água ad libitum (9h às 19h). O DZP foi diluído numa solução de 2ml de água com sacarose 5% e oferecido aos animais sempre ao final do tempo de privação, após o qual a água foi novamente liberada. À exceção dos primeiros dois dias (no quais as soluções controle ou droga ficaram disponíveis por 30 minutos), e na intenção de evitar uma variabilidade demasiada nos tempos de privação, os animais que não beberam a solução dentro do tempo de 15 minutos foram descartados do experimento.

Cirurgia

Todos os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica no 15º dia de tratamento para o implante de uma cânula direcionada ao BLA e um eletrodo de registro direcionado ao NCCI, seguindo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (1997), como apresentado na tabela abaixo.

Estruturas	Antero-Posterior	Lateral	Vertical
BLA	-2,8 mm	5,3 mm	8,2 mm
NCCI	-8,8 mm	1,5 mm	5,0 mm

Os animais foram anestesiados com tribromoethanol (Sigma-Aldrich, EUA, 250 mg/Kg, i.p.), e levados a um aparelho estereotáxico digital (Insight, Brasil) onde tiveram o crânio fixado pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Após tricotomia, uma injeção subcutânea de 0,2 ml de lidocaína a 2% (Harvey, Brasil) foi aplicada na área de incisão. Durante a cirurgia cada animal recebeu, por via intramuscular, uma injeção de pentabiótico 60.000 UI (0,2 ml), e uma injeção do analgésico e antiinflamatório Banamine (2,5 mg/Kg). Logo após, o tecido subcutâneo foi removido, assim como o perióstio (por raspagem, com auxílio de pinça, algodão e hastes flexíveis com ponta de algodão). Já com a superfície craniana exposta e ajustada em posição horizontal, entre bregma e lambda, dois orifícios foram feitos nos ossos parietais com uma broca elétrica (Foredom, EUA) para fixação de parafusos que funcionam como pontos de apoio ao eletrodo e cânula implantados. Em seguida, e tomando-se o *bregma* como referência um orifício foi feito para implante do eletrodo (160µm de diâmetro) e outro para o implante da cânula (0,4 mm de diâmetro), ambos horizontalmente. Os eletrodos são isolados em toda a sua extensão com exceção da secção transversal. O crânio então foi revestido com acrílico dental (JET, Brasil) para fixação das protéses (eletrodo e cânula).

Equipamentos

Para registro das respostas eletrofisiológicas foi utilizada uma gaiola de contenção (25 x 12 x 9cm), com laterais e piso de barras de aço inoxidável espaçadas 15 mm, localizada dentro de uma gaiola de Faraday, por sua vez inserida em uma caixa de isolamento acústico e luminoso (60 x 40 x 45 cm) que ofereceu um ruído constante de 50 dB. Os PEA foram registrados e analisados por um programa de aquisição de sinais biológicos (Bionspector, Lynx, Brasil), que também controlou a apresentação e sequencia dos estímulos sonoros (100 estímulos: pulso de onda quadrada de 100 dB, 1000 Hz, com frequência de apresentação de 0,3 Hz). Antes de cada sessão experimental, foi realizada a calibração dos equipamentos, de forma a permitir uma equivalência na sensibilidade dos instrumentos ao longo dos experimentos. Os estímulos sonoros (tom puro) foram apresentados por meio de dois tweeters piezoelétricos (12 Ω , 200 W, LeSon, Brazil), montados isoladamente, 5 cm acima do piso, nas laterais da caixa de isolamento acústico e luminoso e 15 cm de distância da gaiola de contenção.

Procedimento para micro injeção

As drogas foram administradas 10 minutos antes do teste. A agulha de injeção (agulha dental, 0,3mm de diâmetro) foi ligada a uma seringa Hamilton de 5 μ l por meio de um fino tubo flexível de polietileno. A seringa foi ativada por uma bomba eletrônica de infusão (Insight, Brasil). A agulha foi inserida dentro da cânula até ultrapassar 1 mm de sua ponta.

Delineamento experimental

Após 48 horas de habituação às condições do biotério, iniciou-se o tratamento. Diariamente, por 18 dias, às 19h, as garrafas de água eram retiradas, iniciando assim o período de privação (14 horas). Passadas 13 horas e 30 minutos de privação, os animais foram separados nas caixas por divisórias de acrílico transparente, que encerram 4 compartimentos individuais onde foram oferecidas pipetas de vidro, para cada animal, contendo 2 ml ou de solução controle ou de solução DZP por 30min, caracterizando um procedimento de ingestão semi-voluntário. No 18º dia de tratamento os animais receberam a última dose da solução controle ou DZP, e passam pelo teste de dependência. No 20º dia (48 horas sem a droga) os animais passam pelo teste e re-teste de abstinência (com a microinjeção de drogas).

Linha de Base

No último dia de tratamento (18º dia), os animais foram colocados na gaiola de contenção individual, e alojados no interior da gaiola de Faraday. Foram apresentados 100 estímulos sonoros (100 clicks, 10 ms de duração, 100 dB de amplitude, 3000 Hz, frequência de apresentação de 0,33 Hz) sendo registrados, ao mesmo tempo, os potenciais evocados no NCCI (amplitude em μV).

Teste

No 20º dia do experimento, já caracterizada a condição de abstinência (48 horas após a última ingestão de DZP), o teste anteriormente descrito na linha de base foi novamente realizado, seguindo exatamente o mesmo procedimento.

Re-teste

Uma hora após efetuado o teste, foram realizados os procedimentos de microinjeção das drogas em estudo no BLA. Após 10 min da administração, o mesmo procedimento de registro dos potenciais evocados, já descrito, foi novamente realizado.

Delineamento Experimental

EXPERIMENTO 1			
TRATAMENTO ORAL	CONDIÇÃO DE DEPENDÊNCIA	CONDIÇÃO DE ABSTINÊNCIA	
1º ao 18º dia	18º dia	20º dia	
Grupos	Linha de base	Teste	Re-teste
Sacarose	registro de PEA	registro de PEA	Administração local da droga + registro de PEA
Diazepam			

Histologia

Ao final dos experimentos os animais foram sacrificados, por meio de uma injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (100 mg/Kg). Os indicativos de morte do animal foram a ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos. A confirmação de morte foi realizada por exsanguinação por meio de perfusão intracardiaca (150ml de PBS seguido de 150ml de formalina 40%), a qual serviu também para fixação do tecido cerebral. Posteriormente os animais foram decapitados para retirada dos encéfalos, que foram mantidos numa solução de formalina por no máximo 2 horas, sendo a seguir mergulhados numa solução de sacarose (30%) por 72 horas. Os encéfalos foram então fatiados em cortes de 30µ m de espessura de acordo com o atlas de Paxinos Watson (1999). Posteriormente, as lâminas foram montadas e coradas com vermelho neutro para localização do sítio de injeção da cânula e contato do eletrodo.

Análise Estatística

Os dados foram normalizados por meio da raiz quadrada dos dados brutos e apresentados como Média $\pm$ Erro Padrão Médio (EPM). Os resultados foram analisados com a análise de variância (ANOVA) de 2 fatores sendo o Fator 1 os tratamentos (sacarose x diazepam) e o Fator 2 (repetição) a condição (efeito crônico x abstinência ou abstinência x efeito das drogas). As comparações post-hoc foram realizadas com o teste de Newman-Keuls, com $p < 0,05$.

Resultados



Efeitos da abstinência de diazepam sobre a amplitude dos PEA registrados no núcleo central do CI de ratos Wistar

A ANOVA de dois fatores com medidas repetidas revelou efeitos significativos do tratamento (sucrose x diazepam: $F_{1,62}=12,51$; $p<0,05$), entre as condições (efeitos do tratamento crônico x abstinência: $F_{1,62}= 61,65$; $p<0,05$), assim como interação significativa entre os dois fatores (tratamento x condição: $F_{1,62}= 64,55$; $p<0,05$). O teste de Newman-Keuls mostrou que esses efeitos se devem ao aumento pronunciado na amplitude dos PEA evocados no CI durante a abstinência de DZP quando comparados com as medidas registradas nos animais testados sobre o efeito do benzodiazepínico (efeito do tratamento crônico) (Figuras.3 e 4). Não foram observados efeitos significativos do tratamento crônico ou abstinência nos animais tratados com a solução controle (água + sucrose).

Efeitos da administração do agonista de receptores $GABA_A$ muscimol no BLA sobre os PEA registrados no CI de ratos abstinentes de DZP

A análise de variância detectou efeitos significativos para o fator tratamento (sucrose x diazepam: $F_{1,14}=46,24$; $p<0,05$), entre as condições (efeitos da abstinência x muscimol: $F_{1,14}=6,44$; $p<0,05$), e interação significativa entre os dois fatores (tratamento x condição: $F_{1,14}=10,93$; $p<0,05$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que o muscimol, quando administrado diretamente na BLA, foi eficaz em reduzir a amplitude dos PEA nos animais do grupo controle, sem produzir qualquer efeito sobre o aumento nos PEA observados nos animais abstinentes de DZP (fig. 5).

Efeitos da administração do inibidor indireto da síntese de GABA semicarbazida, administrado diretamente no BLA, sobre os PEA registrados no CI de ratos abstinentes de DZP

ANOVA detectou efeitos significativos no fator tratamento (sucrose x diazepam: $F_{1,14}=11,62$; $p<0.05$), na condição (efeitos da abstinência x SMC: $F_{1,14}=4,98$; $p<0.05$), assim como interação significativa entre os fatores (tratamento x condição: $F_{1,14}=8,57$; $p<0.05$). As comparações *a posteriori* mostraram que a administração de SMC diretamente no BLA induziu um aumento significativo na amplitude dos PEA dos animais do grupo controle sem, no entanto, e similar aos efeitos observados com o muscimol, produzir qualquer alteração nos PEA registrados no CI dos animais abstinentes de DZP (Fig. 6).

Efeitos da administração de serotonina (5-HT) no BLA, sobre os PEA registrados no CI de ratos abstinentes de diazepam

Não foram encontrados significativos para o fator tratamento (sucrose x diazepam: $F_{1,14}=4,14$; $p>0.05$) e tampouco interação significativa entre os fatores (tratamento x condição: $F_{1,14}=1,70$; $p>0.05$). Entretanto, a ANOVA detectou diferença significativa para o fator condição (efeitos da abstinência x 5-HT: $F_{1,14}=39,80$; $p<0.05$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que a administração de 5-HT no BLA aumentou de forma significativa a amplitude dos PEA registrados no núcleo central do CI de ambos os grupos de animais, controle e experimental. De fato, a 5-HT promoveu um aumento ainda mais pronunciado na amplitude dos PEA dos animais abstinentes de DZP (Fig. 7).

Efeitos da administração do agonista de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT no BLA sobre os PEA registrados no CI de ratos abstinentes de DZP

A ANOVA mostrou efeito significativo no fator tratamento (sucrose x diazepam: $F_{1,14}=43,35$; $p<0.05$), no fator condição ($F_{1,14}=23,55$; $p<0.05$), mas ausência de interação significativa entre os dois fatores (tratamento x condição: $F_{1,14}=2,73$; $p>0.05$). De forma inversa aos resultados obtidos com a 5-HT, o teste de Newman-Keuls mostrou que a administração de 8-OH-DPAT no BLA reduziu a amplitude dos PEA nos animais dos grupos controle assim como reduziu também a amplitude desses potenciais nos animais abstinentes de DZP. O teste também mostrou que a droga promoveu uma redução mais acentuada nos animais tratados com solução placebo (Fig. 8).

Discussão



Os mecanismos moleculares que estão subjacentes a abstinência de BDZs não estão totalmente claros, entretanto, algumas possibilidades são consideradas: (1) “Down-regulation” dos receptores GABA_A; (2) mudança na produção de ligantes endógenos; (3) mudanças prolongadas na conformação do receptor; (4) alteração na composição da subunidade do receptor. (Miller et al., 1990). Em função disso, alguns trabalhos tem sugerido que os efeitos comportamentais, sensoriais e autonômicos observados após a interrupção do tratamento crônico com essas substâncias talvez reflitam uma alteração homeostática resultante de respostas neuro-adaptativas consequentes à ativação de outros sistemas de neurotransmissores como, por exemplo, o serotoninérgico. Dessa forma, a redução nos níveis de inibição, decorrente da interrupção do tratamento crônico com um BZD, poderia resultar na exacerbação de forças excitatórias que podem estar subjacentes à expressão de alguns dos sintomas observados durante a abstinência. Como parte desse mecanismo compensatório promovido pelo tratamento crônico, no qual a atividade GABAérgica sofre um declínio em suas funções, é possível que outros mecanismos se tornam mais sensíveis e atuantes (Pratt et al., 1998; Allison et al., 2003; Souza-Pinto et al., 2007; Cabral et al., 2009). Sugere-se então que a abstinência de DZP promova uma ruptura da homeostasia de circuitos elementares de áreas do tronco cerebral que comumente modulam as respostas incondicionadas de medo e ansiedade (como o colículo inferior) regiões estas que, por cumprirem um papel adaptativo, mantiveram-se quase que inalteradas no decorrer do processo evolutivo.

Resultados consistentes têm evidenciado o papel crítico da AM na modulação de respostas condicionadas e incondicionadas a estímulos de perigo (Blanchard & Blanchard, 1972, LeDoux et al., 1988). Dentre os núcleos considerados de maior importância para a

compreensão das respostas condicionadas e incondicionadas de medo estão o lateral e o basal, que compõem o que se resolveu chamar de complexo basolateral (BLA) (Amaral et al., 1992). Nesse sentido, vários estudos atribuem a amígdala o status de receptora de sinais de perigo, onde são avaliados quanto ao seu grau de ameaça para o organismo. Dessa forma, a AM parece atuar como uma espécie de interface sensório-afetiva da reação de defesa. O BLA é o principal sítio de recepção destes sinais, sendo o CeA a principal estação de saída para as regiões encefálicas responsáveis pela expressão do medo e da ansiedade (LeDoux et al., 1988, Davis, 1992).

Dentre suas diversas conexões sabe-se que o CI mantém ligações indiretas com o BLA, particularmente através do NGM. Lesões ou estimulações desses núcleos interferem de forma significativa na aversividade gerada pela estimulação elétrica do CI (Maisonnette et al., 1996), sugerindo que a AM parece interferir diretamente na aversão promovida pela estimulação dessa estrutura. De fato, Alguns estudos têm sugerido que a resposta defensiva elaborada no teto mesencefálico está sob influência da AM (Davis, 1992; Davis et al. 1994; Maisonnette et al. 1996; Zangrossi Jr. et al. 1999; Brandão et al. 1999; Macedo et al., 2002; 2005; 2006). O BLA estaria envolvido na regulação dos aspectos emocionais dos estímulos aversivos, enquanto o CeA regularia os componentes somáticos e autonômicos das reações de medo, por meio de projeções para o hipotálamo e regiões do tronco cerebral (Davis et al., 1994; LeDoux, 1990; 1988; 1994), modulando, desta forma, a resposta defensiva gerada em áreas do teto mesencefálico, como o CI (Macedo et al. 2002; 2006; Maisonnette et al., 1996).

Em nosso trabalho, demonstramos que a abstinência de diazepam, após 18 dias de tratamento crônico, induz alterações eletrofisiológicas significativas nos neurônios do

núcleo central do CI, como revelado pelo aumento pronunciado na amplitude do potencial evocado por um estímulo auditivo nos animais abstinentes. Resultado similar foi encontrado após a microinjeção de baixas doses de SMC (que induz a resposta de congelamento) diretamente nessa região (Nobre et al., 2003). Esses resultados sugerem que aumentos na amplitude do PEA podem refletir aumentos na valência negativa do estímulo sonoro (clic) utilizado para eliciar os PEA, em nosso estudo.

Se considerarmos a hipótese acima, podemos sugerir que a administração local de muscimol diretamente no BLA produziu um efeito do tipo ansiolítico nos animais do grupo controle já que reduziu significativamente a amplitude dos PEA nesses animais. Por outro lado, nenhum efeito foi obtido com o uso da droga nos animais abstinentes de DZP. De forma quase similar, a SMC (substância que inibe a enzima que transforma o glutamato em GABA), que nos animais do grupo controle induziu um aumento na amplitude dos PEA, não produziu também qualquer efeito nos indivíduos abstinentes. Isto pode indicar que mecanismos GABAérgicos do BLA parecem influenciar o processamento da informação sensorial auditiva no CI apenas nos animais não dependentes. Vale ressaltar que efeitos análogos para as duas drogas foram encontrados em um estudo no qual a resposta defensiva foi induzida pela estimulação química do CI (Macedo et al., 2006). Por outro lado, o descompasso homeostático criado pela interrupção do tratamento crônico parece romper com a modulação GABAérgica dos neurônios do BLA sobre a reatividade neural dos neurônios do CI. Os testes realizados ao fim do tratamento crônico com DZP mostraram que a amplitude do PEA registrados no CI não é modificada nos animais testados sobre o efeito do placebo ou sobre o efeito do diazepam sugerindo que as propriedades ansiolíticas da droga podem não interferir no processamento da informação auditiva. A ausência de efeitos do MUS sobre os PEA do CI dos animais abstinentes de

DZP, quando injetado no BLA, pode também ser resultado de um processo de *down-regulation* dos receptores GABA nessa estrutura induzido pelo tratamento crônico (Ishirara et al., 1993), ocasionando a diminuição dos sítios de ligação (Tietz et al., 1986) para o MUS e, consequentemente, a diminuição de seu efeito.

De fato, alguns trabalhos mostraram a presença de interneurônios neurônios GABAérgicos (Nitecka et al., 1987; McDonald et al., 1993) entre o BLA e o CeA. Essa massa de neurônios recebe informações do BLA e as projeta para o CeA (Millhouse, 1986;), constituindo uma importante interface inibitória entre as duas áreas. (Royer et al., 1999). Essa função regulatória poderia então explicar em parte os estados aversivos gerados durante a abstinência de DZP já que a abstinência causaria uma diminuição das funções GABAérgicas como um todo (Hutchinson et al. 1996; Tietz et al., 1986; Ishirara et al., 1993) tendo como consequência uma diminuição da ação inibitória do BLA sobre CeA, promovendo então o estado aversivo característico observado nessa condição.

As aminas biogênicas como a dopamina e 5-HT tem sido amplamente estudadas no campo da neurobiologia do medo e da ansiedade (Graeff et al., 1991; 2004; Millan et al., 2003). Têm sido proposto que lesões de todo o BLA (Maisonnette et al., 1996) ou lesões seletivas para neurônios 5-HT (Macedo et al., 2002) do BLA, mas não do CeA, aumentam a aversidade da estimulação elétrica do CI, confirmando algumas hipóteses na literatura de que neurônios no CeA - cujas projeções para áreas do tronco encefálico participam da geração e elaboração das respostas somáticas e autonômicas de medo - estão sob influência inibitória dos neurônios do BLA (Davis et al., 1994). Em nosso estudo a administração de 5-HT no BLA causou um aumento da amplitude dos PEA eliciados no CI tanto dos animais controle quanto dos animais tratados com diazepam. Por outro lado, a

administração do 8-OH-DPAT (um agonista de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A}) produziu um decréscimo significativo dessas amplitudes em ambos os grupos.

A AM possui receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, e 5-HT₆ existindo diferenças na densidade desses receptores em cada região desta estrutura. Receptores 5-HT_{1A} são encontrados predominantemente na CeA enquanto receptores 5-HT₂, 5-HT₃, e 5-HT₆ são encontrados predominantemente na BLA (Rainnie, 1999). Em muitas áreas do sistema nervoso central o principal receptor que medeia a inibição por serotonina é o receptor 5-HT_{1A} (Saxena, 1995). Entretanto o baixo nível de receptores 5-HT_{1A} na BLA sugere que a inibição dos disparos celulares por meio da 5-HT podem não resultar da ativação direta dos receptores pós-sinápticos 5-HT_{1A}, mas, ao invés disso, por inibição indireta de vias glutamatérgicas por ativação de receptores pré-sinápticos 5-HT_{1A} (Bobker et al., 1989). Tem sido demonstrado também que a estimulação de auto-receptores somatodendríticos 5-HT_{1A} pelo agonista 8-OHDPAT hiperpolariza a célula, bloqueando a atividade elétrica dos neurônios serotoninérgicos, de maneira dose dependente, e diminuindo a neurotransmissão serotoninérgica (Young et al., 1980; Hoyer et al., 1994). Os efeitos do agonista 5-HT_{1A}, 8-OHDPAT, são bastante variáveis dependendo da estrutura envolvida, podendo apresentar efeitos ansiolíticos, quando administrados no NDR (File et al., 1996; Hogg et al., 1994), ou ansiogênicos, quando administrado no hipocampo dorsal (Romaniuk et al., 2001), por exemplo. Neste sentido, muitos trabalhos indicam que os receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos no NDR quando ativados por buspirona, ipsapirona, gepirona ou 8-OHDPAT produzem efeitos ansiolíticos (Jolas et al., 1995; Plaznik et al., 1994; Przegalinski et al., 1992; Schreiber et al., 1993), indicando que a diminuição da neurotransmissão serotoninérgica como um todo ocasiona uma redução do estado aversivo, como verificado em testes comportamentais variados.

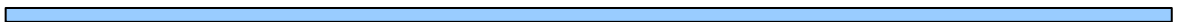
Diferente disso, Graeff et al. (1997) demonstraram o papel duplo da serotonina na modulação do comportamento defensivo. Neurônios 5-HT no NDR são supostamente ativados em situações ameaçadoras. Suas projeções facilitam que neurônios da amígdala identifiquem uma situação de perigo (ansiedade e elaboração de respostas de medo condicionado) e, ao mesmo tempo, inibem o comportamento de fuga em neurônios da SCPD (elaboração de respostas ao medo incondicionado). Então, os dois tratos serotoninérgicos - o trato posencefálico (direcionado à AM) e o trato periventricular do NDR (direcionado à SCPD) - exercem efeitos opostos nos mecanismos neurais que medeiam o medo e ansiedade aprendidos e o medo inato, respectivamente. Sendo assim, a 5-HT diretamente na amígdala, por vias do NDR, promoveria uma facilitação de estados relativos à ansiedade e medo condicionado. De modo similar, em nosso experimento a administração de 5-HT na BLA promoveu um aumento dos PEA em animais do grupo controle. É importante ressaltar que na literatura, o aumento de PEA, indicando um aumento na reatividade neuronal do CI, tem sido relacionado à expressão de respostas de medo incondicionado como: congelamento (Nobre et al. 2003); estimulação química por glutamato (Brandão et al., 2001) e estados aversivos gerados pela abstinência de drogas (Chu et al., 1978; Begleiter et al., 1981; Squires et al., 1978; Cabral et al., 2009).

Em nosso estudo, o agonismo de receptores 5-HT_{1A} no BLA promoveu uma diminuição significativa na amplitude dos PEA de ambos os grupos testados indicando que mecanismos inibitórios entre BLA e CeA mediados por receptores 5-HT_{1A}, podem também participar da mediação das respostas aversivas medidas ao nível do CI. Os efeitos contrários observados com a própria 5-HT podem ser devidos à ação generalizada da serotonina nos seus receptores, diferente da ação do 8-OH-DPAT, cuja ação é mais seletiva

para receptores 5HT_{1A} pré-sinápticos, cuja ação é sabidamente inibitória (Avanzi & Brandão, 2001; Brandão et al., 1994).

Em resumo, nossos resultados sugerem que a abstinência de benzodiazepínicos (do qual o diazepam é o agente prototípico) que promove uma série de alterações no funcionamento de áreas do tronco cerebral estreitamente envolvidas com a expressão da resposta incondicionada de medo, leva também a alterações funcionais em estruturas prosencefálicas que apresentam um papel modulador sobre esses comportamentos, como a amígdala, através de seu núcleo basolateral.

Conclusões



- 1- O tratamento crônico com diazepam, não altera o processamento da informação sensorial auditiva elaborada no núcleo central do CI, como revelado pela registro dos PEA.
- 2- A abstinência de diazepam induz um aumento pronunciado na amplitude desses potenciais, sugerindo que o descompasso homeostático induzido pelo tratamento crônico pode alterar a sensibilidade do organismo a estímulos inócuos.
- 3- A inativação ou excitação dos neurônios GABAérgicos do BLA, através da administração do agonista de receptores GABA_A muscimol ou do inibidor da descarboxilase do ácido glutâmico altera amplitude dos PEA dos animais do grupo controle sem apresentar qualquer influência nos PEA dos animais abstinentes. De DZP. O redução no número de receptores GABA induzidos pelo tratamento crônico pode estar subjacente a este efeito já que ambas as drogas produziram os efeitos esperados, quando administradas nos animais do grupo controle. O retorno a condição basal talvez seja concomitante ao tempo de duração da síndrome de abstinência.
- 4- O que foi descrito acima parece não se aplicar aos mecanismos serotoninérgicos do BLA já que ambas as drogas utilizadas induziram alterações expressivas nos PEA tanto dos animais tratados com placebo quanto aqueles tratados com diazepam. Podemos inferir que mecanismos serotoninérgicos na BLA, inclusive aqueles mediados por receptores 5-HT_{1A}, são importantes para a determinação do processamento sensorial no núcleo central do CI.

Figuras





Fig.1. Acima, fotomicrografia representativa da estimulação química do BLA. Os quadros adicionais mostram os sítios de microinjeção no BLA segundo o atlas de Paxinos e Watson (1997).

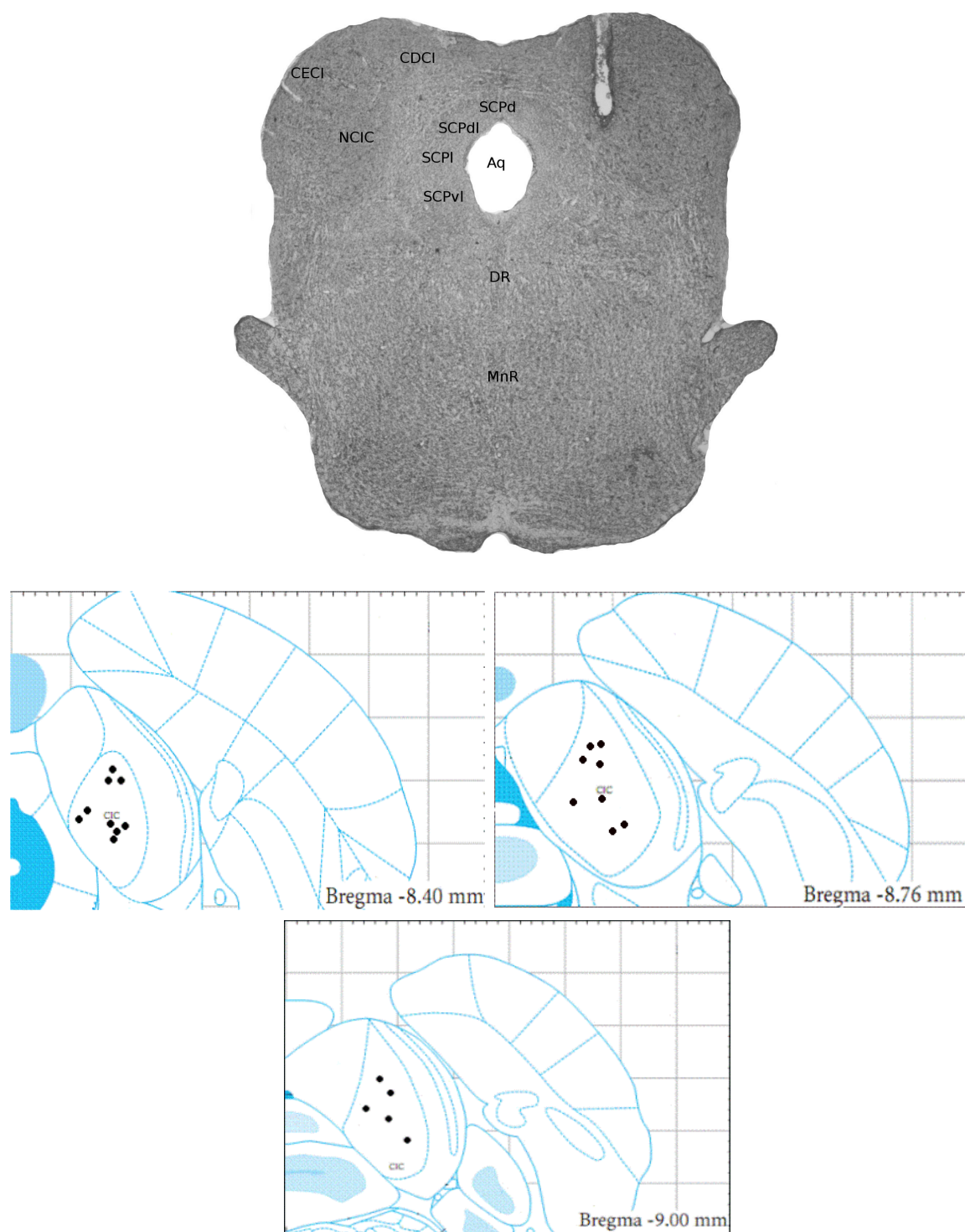


Fig.2 Acima, fotomicrografia representativa do ponto de registro dos potenciais evocados auditivos do CI. Os quadros adicionais mostram os sítios de microinjeção segundo o atlas de Paxinos e Watson (1997)

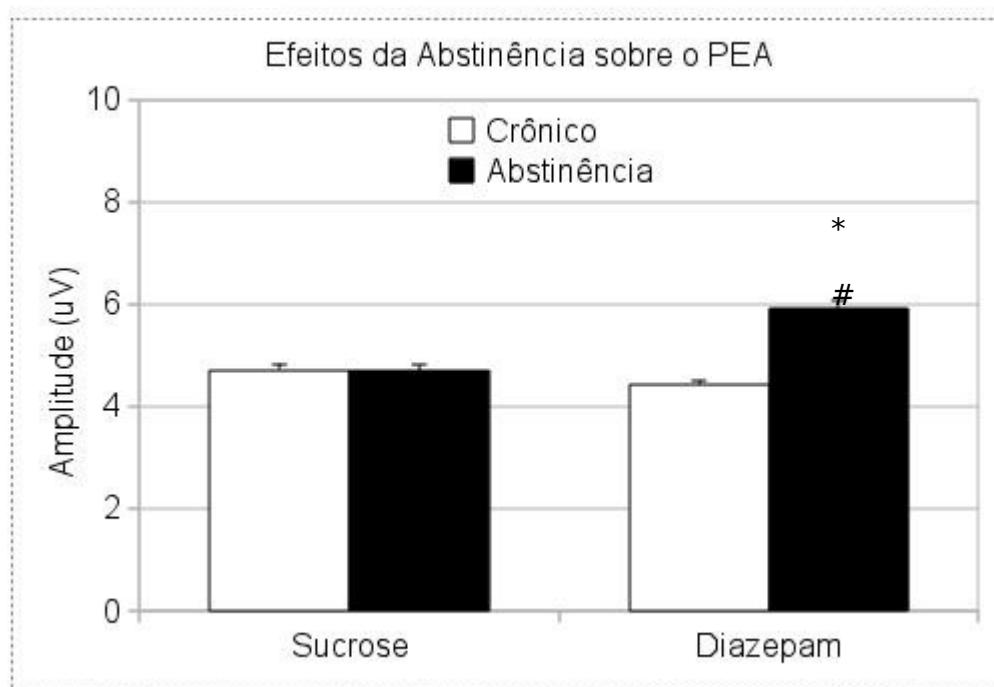


Fig.3 Histogramas demonstram os efeitos da interrupção do tratamento crônico com sucrose ou diazepam (48 horas de abstinência) sobre a amplitude dos potenciais evocados auditivos (PEA) registrados no núcleo central do CI. # Diferença significativa entre tratamentos (sucrose x diazepam). * Diferença significativa entre condições (efeito do tratamento crônico x abstinência). Os dados, normalizados, estão apresentados como média±EPM. Para comparação estatística foi utilizada a ANOVA de dois fatores com medidas repetidas. As comparações *a posteriori* foram feitas com o teste de Newman-Keuls. $P < 0.05$ para significância estatística.

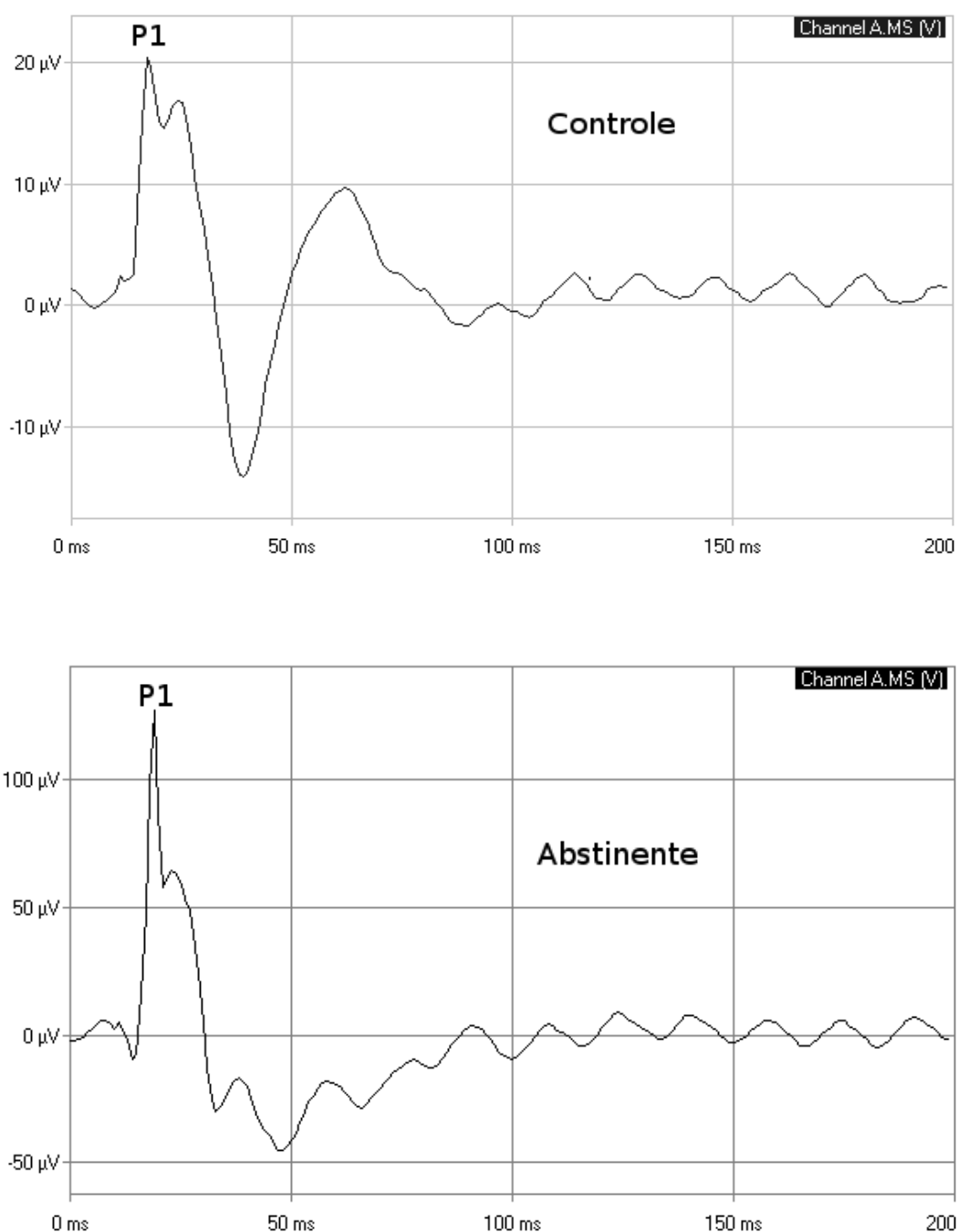


Fig.4. Forma de onda característica do potencial evocado auditivo eliciado no núcleo central do CI de dois animais submetidos a interrupção do tratamento crônico com sucrose (controle) ou diazepam (abstinente). Os testes foram conduzidos 48 horas após a interrupção dos tratamentos. A amplitude do sinal (eixo Y) é dada em microvolts (μV). Notar o aumento pronunciado da amplitude da primeira onda positiva (P1) do animal abstinente (abaixo) quando comparado com seu controle (acima).

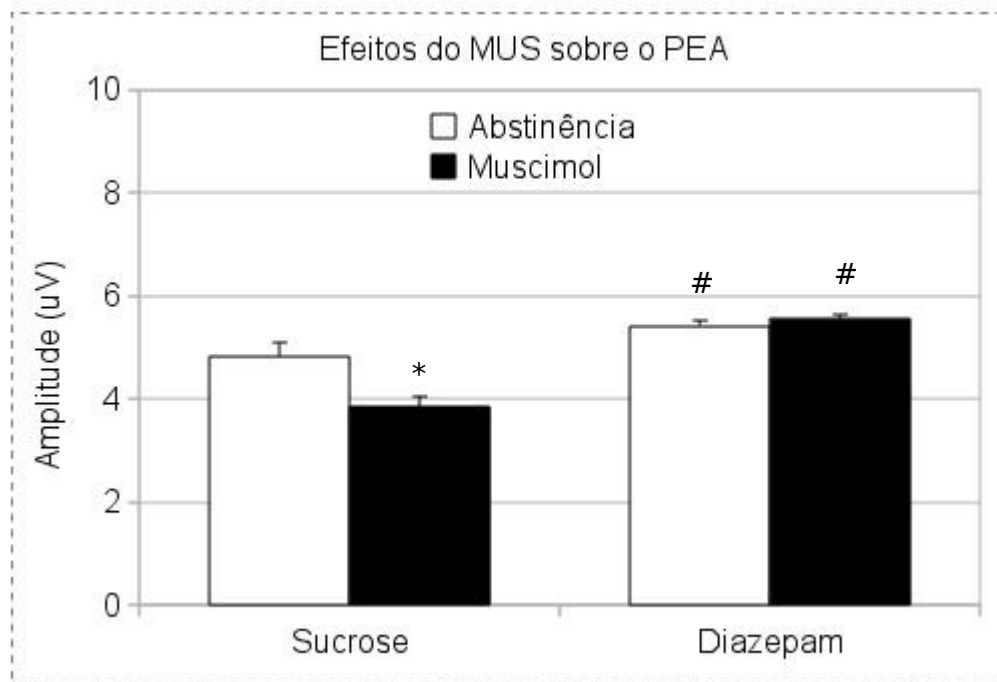


Fig.5. Histogramas demonstram os efeitos da microinjeção do agonista de receptores GABA_A muscimol, diretamente no núcleo basolateral da amígdala (BLA), sobre o aumento na amplitude dos potenciais evocados auditivos (PEA) registrados no núcleo central do CI de ratos abstinentes de diazepam (48 horas de abstinência), quando comparado com o grupo controle (sucrose). # Diferença significativa entre tratamentos (sucrose x diazepam). * Diferença significativa entre condições (efeito da abstinência x muscimol). Os dados, normalizados, estão apresentados como média±EPM. Para comparação estatística foi utilizada a ANOVA de dois fatores com medidas repetidas. As comparações *a posteriori* foram feitas com o teste de Newman-Keuls. $P < 0.05$ para significância estatística.

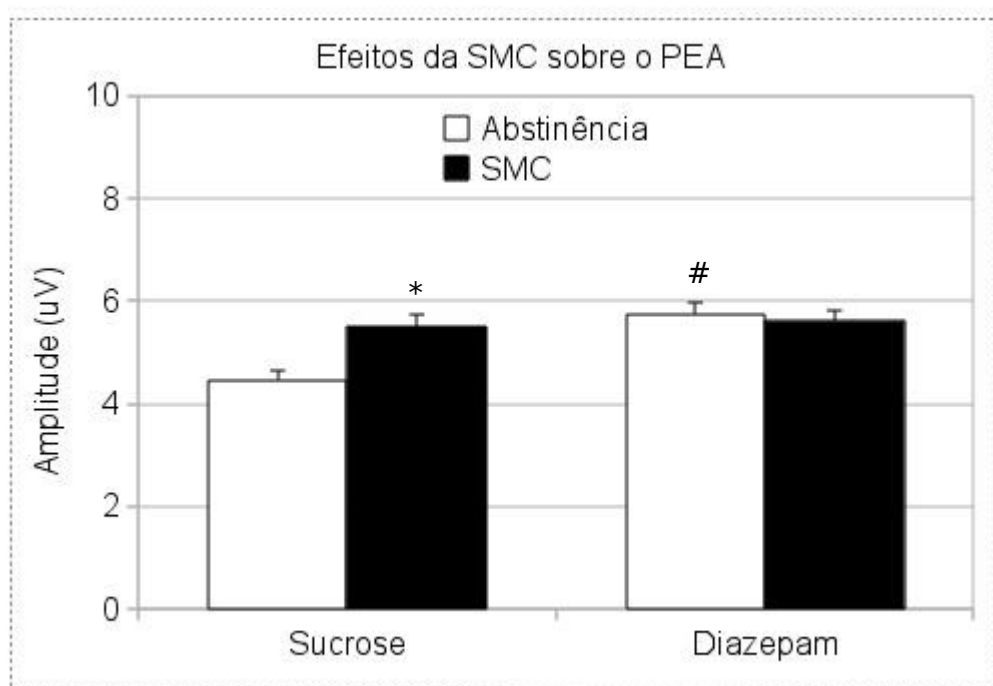


Fig.6. Histogramas demonstram os efeitos da microinjeção do inibidor indireto da síntese de GABA semicarbazida (SMC), administrado diretamente no núcleo basolateral da amígdala (BLA), sobre o aumento na amplitude dos potenciais evocados auditivos (PEA) registrados no núcleo central do CI de ratos abstinentes de diazepam (48 horas de abstinência), quando comparado com o grupo controle (sucrose). # Diferença significativa entre tratamentos (sucrose x diazepam). * Diferença significativa entre condições (efeito da abstinência x SMC). Os dados, normalizados, estão apresentados como média±EPM. Para comparação estatística foi utilizada a ANOVA de dois fatores com medidas repetidas. As comparações *a posteriori* foram feitas com o teste de Newman-Keuls. $P < 0.05$ para significância estatística.

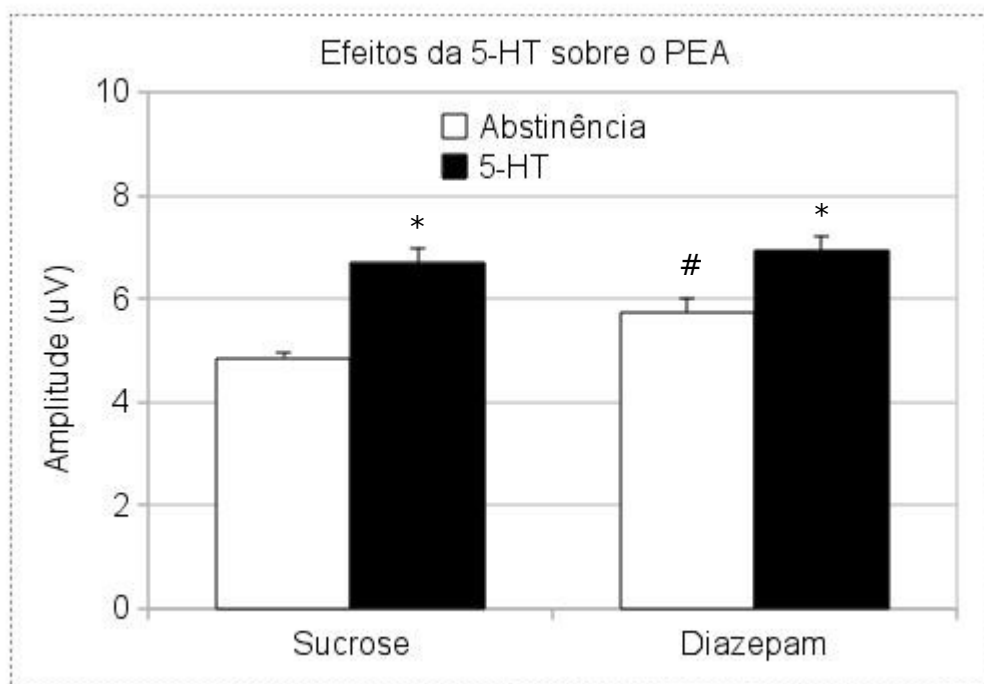


Fig.7. Histogramas demonstram os efeitos da microinjeção de serotonina (5-HT), administrada diretamente no núcleo basolateral da amígdala (BLA), sobre o aumento na amplitude dos potenciais evocados auditivos (PEA) registrados no núcleo central do CI de ratos abstinentes de diazepam (48 horas de abstinência), quando comparado com o grupo controle (sucrose). # Diferença significativa entre tratamentos (sucrose x diazepam). * Diferença significativa entre condições (efeito da abstinência x 5-HT). Os dados, normalizados, estão apresentados como média±EPM. Para comparação estatística foi utilizada a ANOVA de dois fatores com medidas repetidas. As comparações *a posteriori* foram feitas com o teste de Newman-Keuls. $P < 0.05$ para significância estatística.

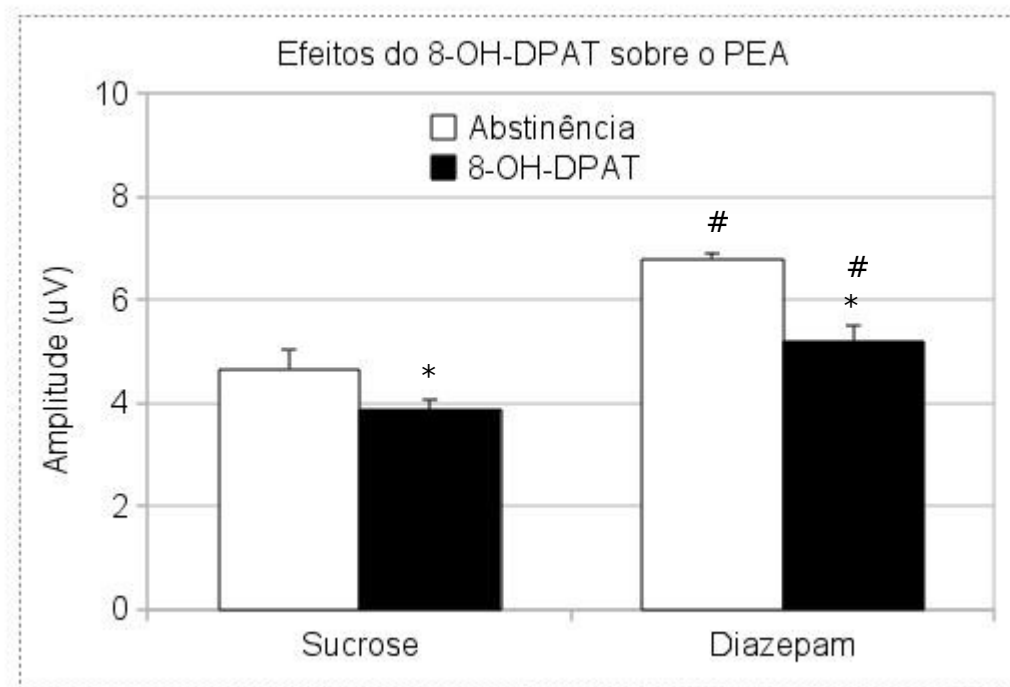


Fig.8. Histogramas demonstram os efeitos da microinjeção do agonista de receptores de serotonina do tipo 1A (5HT_{1A}), administrada diretamente no núcleo basolateral da amígdala (BLA), sobre o aumento na amplitude dos potenciais evocados auditivos (PEA) registrados no núcleo central do CI de ratos abstinentes de diazepam (48 horas de abstinência), quando comparado com o grupo controle (sucrose). # Diferença significativa entre tratamentos (sucrose x diazepam). * Diferença significativa entre condições (efeito da abstinência x 8-OH-DPAT). Os dados, normalizados, estão apresentados como média±EPM. Para comparação estatística foi utilizada a ANOVA de dois fatores com medidas repetidas. As comparações *a posteriori* foram feitas com o teste de Newman-Keuls. P<0.05 para significância estatística.

Referências Bibliográficas



Adams, J.C. 1979. Ascending projections to the inferior colliculus. *J Comp Neurol* 183: 519-538.

Adams, J.C. & Wenthold, R.J. 1979. Distribution of putative amino acid transmitters, choline acetyltransferase and glutamate decarboxylase in the inferior colliculus. *Neuroscience* 4: 1947-1951.

Adams, J.C. 1980. Crossed and descending projections to the inferior colliculus. *Neurosci Lett* 19: 1-5.

Adolphs, R., Tranel, D., Damasio, H., Damasio, A.R. 1995 Fear and the human amygdala. *J. Neurosci*, 15: 5879-5891.

Aitkin, L. 1983. *The Auditory Midbrain*. New Jersey: Humana Press.

Allison C. & Pratt, J.A. 2003. Neuroadaptive processes in GABAergic and glutamatergic systems in benzodiazepine dependence. *Pharmacol. Ther.*, 98(2):171-95.

Allison C. & Pratt, J.A. 2006. Differential effects of two chronic diazepam treatment regimes on withdrawal anxiety and AMPA receptor characteristics. *Neuropsychopharmacology*, 31: 602–619.

Alreja, M. 1996. Excitatory actions of serotonin on GABAergic neurons of the medial septum and diagonal band of Broca. *Synapse*, 22: 15–27.

Amaral, D.G. 1992. Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. In: Aggleton, J.P. (ed). *The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental disfunction*. Wiley-Liss Inc. New York, p.1-66.

Amaral, D.G. 2002. The primate amygdala and the neurobiology of social behavior: implications for understanding social anxiety. *Biol Psychiatry*, 51: 11–17.

Audi, E.A. & Graeff, F.G. 1987. GABAA receptors in the midbrain central grey mediate the antiaversive action of GABA. *Eur J Pharmacol* 135: 225-229.

Avanzi, V., Brandão, M.L. 2001. Activation of somatodendritic 5-HT 1A autoreceptors in the median raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. *Behav Brain Res*, 126: 175-184.

Bandler, R. & Depaulis, A. 1988. Elicitation of intraspecific defence reactions in the rat from midbrain periaqueductal grey by microinjection of kainic acid, without neurotoxic effects. *Neurosci. Lett.*, 88: 291-296.

Barnard, E.A., Skolnick, P., Olsen, R.W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A.N. & Langer, S.Z. 1998. "International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function". *Pharmacol. Rev.* 50(2): 291–313.

Begleiter, H., Porjesz, B & Chou, C.L. 1981. Auditory brainstem potentials in chronic alcoholics. *Science*, 211(4486): 1064-1066.

Biacabe, B., Chevallier, J.M., Avan, P. & Bonfils, P. 2001. Functional anatomy of auditory brainstem nuclei: application to the anatomical basis of brainstem auditory evoked potentials. *Auris Nasus Larynx*, 28: 85–94.

Blanchard, D.C., Blanchard, R.J. 1972. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 81: 281-290.

Blanchard, D.C. & Blanchard, R.J. 1988. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol* 39: 43-68.

Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., Agullana, R. & Weiss, S.M. 1991. Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiol Behav* 50: 967-972.

Bobker, D.H. & Williams, J. T. 1989. Serotonin agonists inhibit synaptic potentials in the rat locus ceruleus in vitro via 5-hydroxytryptamine_{1A} and 5-hydroxytryptamine_{1B} receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250: 37–43.

Bowery, N.G., Hudson, A.L. & Price, G.W. 1987. GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 20: 365-383.

Bormann, J. 2000. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21: 16-19.

Bovier, P., Broekkamp, C.L., Lloyd, K.G. 1982. Enhancing GABAergic transmission reverses the aversive state in rats induced by electrical stimulation of the periaqueductal grey region. *Brain Res* 248: 313-320.

Brandão, M.L., Fontes, J.C. & Graeff, F.G. 1980. Facilitatory effect of ketamine on punished behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 13: 1-4.

Brandão, M.L., De Aguiar, J.C. & Graeff, F.G. 1982. GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. *Pharmacol Biochem Behav* 16: 397-402.

Brandão M.L., Vasquez, E.C., Cabral, A.M. & Schmitt, P. 1985. Chlordiazepoxide and morphine reduce pressor response to brain stimulation in awake rats. *Pharmacol Biochem Behav* 23: 1069-1071.

Brandão ML, Coimbra NC, Borges PC (1990) Effects of morphine and midazolam on reactivity to peripheral noxious and central aversive stimuli. *Neurosci Biobehav Rev* 14: 495-499.

Brandão, M.L., Tomaz, C., Borges, P.C., Coimbra, N.C. & Bagri, A. 1988. Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. *Physiol Behav*. 44: 361-365.

Brandão, M.L., Melo, L.L. & Cardoso, S.H. 1993. Mechanisms of defense in the inferior colliculus. *Behav Brain Res*. 58: 49-55.

Brandão, M. L., Cardoso, S. H., Melo, L. L., Motta, V., & Coimbra, N. C. 1994. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 18: 339–346.

Brandão, M.L., Cardoso, S.H., Melo, L.L., Motta, V., Coimbra, N. C. 1994. The neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neurosci. Biobehav. Rev*, 18: 339–346.

Brandão, M.L., Troncoso, A.C, Melo, L.L., Sandner, G. 1997. Active avoidance learning using brain stimulation applied to the inferior colliculus as negative reinforcement in rats: evidence for latent inhibition. *Neuropsychobiology*, 35: 30–35.

Brandão, M.L., Anseloni, V.Z., Pandossio, J.E., DeAraujo, J.E. & Castilho, V.M. 1999. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 23: 863-875.

Brandão, M.L., Coimbra, N.C. & Osaki, M.Y. 2001. Changes in the auditory-evoked potentials induced by fear-evoking stimulations. *Physiol Behav.*, 72: 365-372.

Brandão, M.L., Borelli, K.G., Nobre, M.J., Santos, J.M., Albrechet-Souza, L., Oliveira, A.R. & Martinez, R.C. 2005. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29: 1299-1311.

Bristow, D.R., Martin, I.L. 1988. Light microscopic autoradiographic localisation in rat brain of the binding sites for the GABAA receptor antagonist [3H] SR 95531: comparison with the [3H] GABAA receptor distribution. *Eur J Pharmacol* 148: 283-288.

Brudzynski, S.M. & Chiu, E.M. 1995. Behavioural responses of laboratory rats to playback of 22 kHz ultrasonic calls. *Physiol Behav* 57: 1039-1044.

Busto, U.E., Sellers, E.M., Naranjo, C.A., Cappell, H., Sanchez-Craig, M. & Sykora, K. 1986a. Withdrawal reaction after long-term therapeutic use of benzodiazepines. *N. Engl. J. Med.*, 315: 854-859.

Busto, U. E., Sellers, E.M., Naranjo, C.A., Cappell, H.D., Sanchez-Craig, M. & Simpkins, J. 1986b. Patterns of benzodiazepine abuse and dependence. *Br. J. Addict.*, 81: 87-94.

Busto, U.E. & Sellers, E.M. 1991. Anxiolytics and sedative/hypnotics dependence. *Br. J. Addict.*, 86: 1647-1652.

Cabral, A., De Ross, J., Castilho, V.M., Brandão, M.L., Nobre, M.J. 2009. Glutamate receptor antagonism in inferior colliculus attenuates elevated startle response of high-anxiety diazepam-withdrawn rats. *Neuroscience*, 161: 707-17.

Cardoso, S.H., Melo, L., Coimbra, N.C., Brandao, M.L. 1992. Opposite effects of low and high doses of morphine on neural substrates of aversion in the inferior colliculus. *Behav Pharmacol* 3: 489-495.

Cardoso, S.H., Coimbra, N.C. & Brandao, M.L. 1994. Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. *Behav. Brain Res.*, 63: 17-24.

Carrive, P. 1991. Functional organization of PAG neurons controlling regional vascular beds. In: A. DePaulis and R. Bandler, Editors, *The Midbrain Periaqueductal Grey Matter: Functional, Anatomical and Immunohistochemical Organization*, Plenum, New York, pp. 67–100.

Caspary, D.M., Raza, A., Lawhorn-Armour, B.A., Pippin, J. & Arneric, S.P. 1990. Immunocytochemical and neurochemical evidence for age-related loss of GABA in the inferior colliculus: implications for neural presbycusis. *J Neurosci* 10: 2363-2372.

Castilho, V.M. & Brandão, M.L. 2001. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT_{2A} receptors in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 155: 154-162.

Casseday, J.H. & Covey, E. 1996. A neuroethological theory of the operation of the inferior colliculus. *Brain Behav Evol* 47: 311-336.

Chu, N.C., Squires, K.C. & Starr, A. 1978. Auditory Brain Stem Potentials in Chronic Alcohol Intoxication and Alcohol Withdrawal *Arch Neurol.* 35(9): 596-602.

Chu, D.C., Albin, R.L., Young, A.B. & Penney, J.B. 1990. Distribution and kinetics of GABAB binding sites in rat central nervous system: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* 34: 341-357.

Coimbra NC, Leao-Borges PC, Brandão ML (1989) GABAergic fibers from substantia nigra pars reticulata modulate escape behavior induced by midbrain central gray stimulation. *Braz J Med Biol Res* 22: 111-114.

Coimbra, N.C., Tomaz, C. & Brandão, M.L. 1992. Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum. *Behav Brain Res* 50: 77-83.

Coimbra, N.C., Brandão, M.L. 1993. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. *Behav Brain Res* 59: 131-139.

Coimbra, N.C., Eichenberger, G.C.D., Gorchinski, R.T., Maisonnnette, S. 1996. Effects of the blockade of opioid receptor on defensive reactions elicited by electrical stimulation within the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. *Brain Res.* 736: 348–352.

Coimbra, N.C. & Brandão, M.L. 1997. Effects of 5-HT₂ receptors blockade on fear induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. *Behav Brain Res* 87: 97-103.

Coleman, J.R. & Clerici, W.J. 1987. Sources of projections to subdivisions of the inferior colliculus in the rat. *J Comp Neurol* 262: 215-226.

Contreras, N.E., Bachelard, H.S. 1979. Some neurochemical studies on auditory regions of mouse brain. *Exp Brain Res* 36: 573-584.

Cuadra, G., Zurita, A., Macedo, C.E., Molina, V.A. & Brandão M.L. 2000. Electrical stimulation of the midbrain tectum enhances dopamine release in the frontal cortex. *Brain Res Bull* 52: 413-418.

Davis, M. 1992. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual Review of Neuroscience*, 15: 353–375.

Davis, M., Rainnie, D. & Cassell, M. 1994. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends in Neurosciences*, 17: 208–214.

De Ross, J., Castilho, VM., Brandão, M.L., Nobre, M.J. 2007. Analysis of the chronic intake of and withdrawal from diazepam on emotional reactivity and sensory information processing in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32:794-802.

DeVry, J., Benz, U., Schreiber, R., Traber, J. 1993. Shock-induced ultrasonic vocalization in young adult rats: a model for testing putative anti-anxiety drugs. *Eur J Pharmacol.*, 249: 331–9.

Fanselow, M.S. 1991. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: A. DePaulis and R. Bandler, Editors, *The Midbrain Periaqueductal Grey Matter: Functional, Anatomical and Immunohistochemical Organization*, Plenum, New York, pp. 151–173.

Fay, R.R. & Popper A.N. 2000. Evolution of hearing in vertebrates: the inner ears and processing. *Hear Res.*, 149: 1-10.

Faye-Lund, H., Osen, K.K. 1985. Anatomy of the inferior colliculus in rat. *Anat Embryol (Berl)* 171: 1-20.

Feenstra MG, Botterblom MH, van Uum JF (1995) Novelty-induced increase in dopamine release in the rat prefrontal cortex in vivo: inhibition by diazepam. *Neurosci Lett* 189: 81-84.

File, S.E. 1985. Tolerance to the behavioral actions of benzodiazepines. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 9: 113-121.

File, S.E. 1996. Recent developments in anxiety, stress, and depression. *Pharmacol Biochem Behav.*, 54: 3–12.

File, S.E. & Gonzalez, L.E. 1996. Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT_{1A}-receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav.*, 54: 123–8.

Finlay, J.M., Damsma, G. & Fibiger, H.C. 1992. Benzodiazepine-induced decreases in extracellular concentrations of dopamine in the nucleus accumbens after acute and repeated administration. *Psychopharmacology (Berl)*, 106: 202-208.

Fisher, S.K., Davies, W.E. 1976. GABA and its related enzymes in the lower auditory system of the guinea pig. *J Neurochem* 27: 1145-1155.

Fontanesi, L.B., Ferreira, R., Cabral, A., Castilho, V.M., Brandão, M.L. & Nobre, M.J. 2007. Brainstem areas activated by diazepam withdrawal as measured by Fos-protein immunoreactivity in rats. *Brain Res.*, 1166: 35–46.

Gans, C. 1992. An overview of the evolutionary biology of hearing. (Webster DB, Popper AN, eds).

Garcia-Cairasco, N. 2002 A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hear Res* 168: 208-222.

Glendenning, K.K. & Baker, B.N. 1988. Neuroanatomical distribution of receptors for three potential inhibitory neurotransmitters in the brainstem auditory nuclei of the cat. *J Comp Neurol* 275: 288-308.

Graeff, F.G. 1981. Minor tranquilizers and brain defense systems. *Braz J Med Biol Res* 14: 239-265.

Graeff, F.G., Brandão, M.L., Audi, E.A., Milani, H. 1986. Role of GABA in the anti-aversive action of anxiolytics. *Adv Biochem Psychopharmacol* 42: 79-86.

Graeff, F.G. 1989. Drogas psicotrópicas e seu modo de ação. [2a]. 1989. São Paulo, EPU.

Graeff, F.G. 1990. Brain defense systems and anxiety. In: Roth, M.; Burrow, G.D.; Noyes, R. (eds). *Handbook of Anxiety*, vol.3. New York, Elsevier. pp: 307-354.

Graeff, F.G., Silveira, M.C., Nogueira, R.L., Audi, E.A. & Oliveira, R.M. 1993. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav. Brain Res.*, 58: 123-131.

Haefely, W. 1985. Pharmacology of benzodiazepine antagonists. *Pharmacopsychiatry* 18: 163-166.

Hilton, S.M. & Redfern, W.S. 1986. A search for brain stem cell groups integrating the defence reaction in the rat. *J Physiol* 378: 213-228.

Hogg, S., Andrews, N. & File, S.E. 1994. Contrasting behavioural effects of 8-OH-DPAT in the dorsal raphe nucleus and ventral hippocampus. *Neuropharmacology*, 33: 865-8.

Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R. & Humphrey, P.P. 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.* 46 (2): 157–203.

Huffman, R.F., Henson, O.W.. 1990. The descending auditory pathway and acoustic-motor systems: connections with the inferior colliculus. *Brain Res Rev*, 15: 295-323.

Hunkeler, W., Mohler, H., Pieri, L., Polc, P., Bonetti, E.P., Cumin, R., Schaffner, R. & Haefely, W. 1981. Selective antagonists of benzodiazepines. *Nature*, 290: 514-516.

Hutchinson, M.A., Smith, P.F. & Darlington, C.L. 1996. The behavioural and neuronal effects of the chronic administration of benzodiazepine anxiolytic and hypnotic drugs. *Prog. Neurobiol.*, 49: 73-97.

Ishihara, S., Hiramatsu, M., Kameyama, T. & Nabeshima, T. 1993. Development of tolerance to anxiolytic effects of chlordiazepoxide in elevated plus-maze test and decrease of GABA_A receptors. *J. Neurotransm.* 91: 27-37.

Jane, J.A., Masterton, R.B. & Diamond, I.T. 1965. The function of the tectum for attention to auditory stimuli in the cat. *J Comp Neurol* 125: 165-191.

Jolas, T., Schreiber, R., Laporte, A.M., Chastanet M, DeVry, J., Glaser, J., Adrien, J. & Hamon, M. 1995. Are postsynaptic 5-HT_{1A} receptors involved in the anxiolytic effects of the 5-HT_{1A} receptor agonists and their inhibitory effects on the firing of serotonergic neurons in the rat. *J Pharmacol Exp Theor.*, 272: 920–9.

Kiser, R.S. & Lebovitz, R.M. 1975. Monoaminergic mechanisms in aversive brain stimulation. *Physiol Behav* 15: 47-53.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H. & Jessell, T.M. *Princípios da Neurociência*. 2000. São Paulo, Manole. 2000.

Kawamura, S., Sprague, J.M. & Niimi, K. 1974. Corticofugal projections from the visual cortices to the thalamus, pretectum and superior colliculus in the cat. *J Comp Neurol* 158: 339-362.

Koob, G.F. 1992. Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 654: 171-191.

Koob, G.F. & Bloom, F.E. 1988. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science*, 242: 715-723.

Lader, M.H. & File, S.E. 1987. The biological basis of benzodiazepine dependence. *Psychol Med* 17: 539-547.

Lang, P.J., Bradley, M.M., Cuthbert, B.N. 1990. Emotion, attention, and the startle reflex. *Psychol Rev* 97: 377-395.

Lang PJ, Bradley MM, Cuthbert BN (1998) Emotion, motivation, and anxiety: brain mechanisms and psychophysiology. *Biol Psychiatry* 44: 1248-1263.

Lamprea, M.R., Cardenas, F.P., Vianna, D.M., Castilho, V.M., Cruz-Morales, S.E., Brandão, M.L. 2002. The distribution of fos immunoreactivity in rat brain following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Res.*, 950: 186-194.

Lingford-Hughes, A.R., Davies, S.J., McIver, S., Williams, T.M., Daglish, M.R. & Nutt, D.J. 2003. Addiction. *Br. Med. Bull.*, 65: 209-222.

Leão-Borges, P.C., Coimbra, N.C. & Brandão, M.L. 1988. Independence of aversive and pain mechanisms in the dorsal periaqueductal gray matter of the rat. *Braz J Med Biol Res* 21: 1027-1031.

LeDoux, J.E., Iwata, J. & Reis, D.J. 1985. Projections to the amygdala from the medial geniculate-body mediate arterial-pressure conditioning in the rat. *Circulation*, 72(4): 244-244.

LeDoux, J.E., Ruggiero, D.A., Forest, R., Stornetta, R., Reis, D.J. 1987. Topographic organization of convergent projections to the thalamus from the inferior colliculus and spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 264: 123-146.

LeDoux, J.E., Iwata, J. Cichetti, P. & Reis, D.J. 1988. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J. Neurosci.* 8: 2517–2519.

LeDoux, J.E., Cicchetti, P., Xagoraris, A. & Romanski, L. M. 1990. The lateral amygdaloid nucleus: Sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J. Neurosci.* 10: 1062–1069.

LeDoux, J. 1994. The amygdala: Contributions to fear and stress. *Semin. Neurosci.* 6: 231–237.

LeDoux, J.E. 1995. Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol.*, 46: 209–235.

Li, L., Korngut, L.M., Frost, B.J. & Beninger R.J. 1998a. Prepulse inhibition following lesions of the inferior colliculus: prepulse intensity functions. *Physiol Behav* 65: 133-139.

Li, L., Priebe, R.P. & Yeomans, J.S. 1998b. Prepulse inhibition of acoustic or trigeminal startle of rats by unilateral electrical stimulation of the inferior colliculus. *Behav Neurosci* 112: 1187-1198.

Macedo, C.E., Castilho, V.M., DeSouza e Silva, M.A. & Brandão, M.L. 2002. Dual 5-HT mechanisms in basolateral and central nuclei of amygdala in the regulation of the defensive behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Research Bulletin*, 59(3): 189–195.

Macedo, C.E., Martinez, R.C.R., DeSouza e Silva, M.A., & Brandão M.L. 2005. Increases in extracellular levels of 5-HT and dopamine in the basolateral, but not in the central, nucleus of amygdala induced by aversive stimulation of the inferior colliculus. *European Journal of Neuroscience*, 21: 1131–1138.

Macedo, C.E., Martinez, R.C. & Brandão, M.L. 2006. Conditioned and unconditioned fear organized in the inferior colliculus are differentially sensitive to injections of muscimol into the basolateral nucleus of the amygdala. *Behav. Neurosci.*, 120: 625-631.

Macedo, C.E., Martinez, R.C.R. , Albrechet-Souza, L., Molina, V.A. Brandão, M.L. 2007. 5-HT₂ and D₁ mechanisms of the basolateral nucleus of the amygdala enhance conditioned fear and impair unconditioned fear. *Behavioural Brain Research* 177: 100–108

Maisonnette, S.S., Kawasaki, M.C., Coimbra, N.C. & Brandão, M.L. 1996. Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Res. Bull.* 40: 93–98.

Maisonnette, S.S., Villela, A.P., Carotti, A.P. & Landeira-Fernandez, J. 2000. 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.

Martijena, I.D., Tapia, M. & Molina, V.A. 1996. Altered behavioral and neurochemical response to stress in benzodiazepine-withdrawn rats. *Brain Res.*, 712: 239–44.

McDonald, A.J. 1998. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* 55: 257–332.

McDonald, A.J. & Augustine, J.R. 1993. Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala. *Neuroscience* 52: 281–294.

Melo, L.L., Cardoso, S.H. & Brandão, M.L. 1992. Antiaversive action of benzodiazepines on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Physiol Behav* 51: 557-562.

Melo, L.L. & Brandão, M.L. 1995a. Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the inferior colliculus in aversive states induced by exposure of rats to the elevated plus-maze test. *Behav Pharmacol* 6: 413-417.

Melo, L.L. & Brandão, M.L. 1995b Role of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in the aversion induced by electrical stimulation of inferior colliculus. *Pharmacol Biochem Behav* 51: 317-321.

Millan, M.H., Meldrum, B.S., Faingold, C.L. 1986. Induction of audiogenic seizure susceptibility by focal infusion of excitant amino acid or bicuculline into the inferior colliculus of normal rats. *Exp Neurol* 91: 634-639.

Miller, N.S. & Gold, M.S. 1990. Benzodiazepines: tolerance, dependence, abuse, and addiction. *J. Psychoactive Drugs*, 22: 23-33.

Millhouse, O.E. 1986. The intercalated cells of the amygdala. *J Comp Neurol.*, 247: 246–271.

Marcio F.D. Moraes, M.F.D., Del Vecchio, F., Terra, V.C. & Garcia-Cairasco, N. 2000. Time evolution of acoustic 'information' processing in the mesencephalon of Wistar rats. *Neuroscience Letters* 284: 13-16.

Moore, R.Y. & Goldberg, J.M. 1963. Ascending projections of the inferior colliculus in the monkeys. *Experimental Neurology* 121: 109-136.

Moore, J.K., Karapas, F., Moore, R.Y. 1977. Projections of the inferior colliculus in insectivores and primates. *Brain Behav Evol* 14: 301-327.

Moraes, M.F.D., Del Vecchio, F., Terra, V.C., Garcia-Cairasco, N. 2000. Time evolution of acoustic 'information' processing in the mesencephalon of Wistar rats. *Neurosci Lett*, 21: 13-16.

Morest, D.K. & Oliver, D.L. 1984. The neuronal architecture of the inferior colliculus in the cat: defining the functional anatomy of the auditory midbrain. *J Comp Neurol.*, 222: 209-236.

Moriizumi, T., Hattori, T. 1991. Pallidotectal projection to the inferior colliculus of the rat. *Exp Brain Res* 87: 223-226.

Nashold, B.S., Wilson Jr, W.P. & Slaughter, D.G. 1969. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J. Neurosurg.*, 30: 14-24.

Niehoff, D.L. & Kuhar, M.J. 1983. Benzodiazepine receptors: localization in rat Amygdala. *J. Neurosci.* 10: 2091-2097.

Nicolelis, M.A.L., Ghazanfar, A.A., Faggin, B.M., Votaw, S., & Oliveira, L.M.O. 1997. Reconstructing the engram: simultaneous, multisite, many single neuron recordings. *Neuron*, 18: 529–537.

Nitecka, L. & Ben-Ari, Y. 1987. Distribution of GABA-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *J Comp Neurol.*, 266: 45–55.

Nobre, M.J., Sandner, G. & Brandão, M.L. 2003. Enhancement of acoustic evoked potentials and impairment of startle reflex induced by reduction of GABAergic control of the neural substrates of aversion in the inferior colliculus. *Hear. Res.*, 184: 82-90.

Okada, Y. 1974. Distribution of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the layers of the superior colliculus of the rabbit. *Brain Research*, 75: 362–366.

Oliver, D.L. & Morest, D.K. 1984. The central nucleus of the inferior colliculus in the cat. *J Comp Neurol* 222: 237-264.

Olsen, R.W. 1982. Drug interactions at the GABA receptor-ionophore complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 22: 245-77.

Osen, K. 1973. Organization of cat cochlear nuclei and projection of inferior colliculus. *Arch Otolaryngol* 98: 401-404.

Pandóssio, J.E. & Brandão M.L. 1999. Defensive reactions are counteracted by midazolam and muscimol and elicited by activation of glutamate receptors in the inferior colliculus of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 142: 360-368.

Pandóssio, J.E., Molina, V.A. & Brandão, M.L. 2000. Prior electrical stimulation of the inferior colliculus sensitizes rats to the stress of the elevated plus-maze test. *Behav Brain Res* 109: 19-25.

Paxinos, G. & Watson, C. 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Third edn. New York: Academic Press.

Pilotto, R., Singer, G. & Overstreet, D. 1984. Self-injection of diazepam in naive rats: effects of dose, schedule and blockade of different receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 84: 174-177.

Pitkanen, A., Savander, V., LeDoux, J.E. 1997. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci*, 20: 517-23.

Plaznik, A., Kostowski, W. & Stefaninski, R. 1994. Limbic mechanisms of anxiolytics acting on 5-HT receptors. *Pol J Pharmacol.*, 46: 473–477.

Pollak, G.D., Burger, R.M. & Klug, A. 2003. Dissecting the circuitry of the auditory system. *Trends Neurosci.*, 26: 33-39.

Polc, P., Laurent, J.P., Scherschlicht, R. & Haefely, W. 1981. Electrophysiological studies on the specific benzodiazepine antagonist Ro15-1788. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 316: 317-325.

Popper, A.N. & Fay, R.R. 1997. Evolution of the ear and hearing: issues and questions. *Brain Behav Evol* 50: 213-221.

Pratt, J.A., Brett, R.R. & Laurie, D.J. 1998. Benzodiazepine dependence: from neural circuits to gene expression. *Pharmacol. Biochem.Behav.* 59: 925–934.

Przegalinski, E., Chojnacka, E. & Filip, M. 1992. Stimulation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors responsible for the anticonflict effect of ipsapirone in rats. *J Pharm Pharmacol*, 44: 780–2.

Ramon Y Cajal, S. 1909. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Paris.

Rickels, K., Fox, I.L., Greenblatt, D.J., Sandler, K.R. & Schless, A. 1988a. Clorazepate and lorazepam: clinical improvement and rebound anxiety. *Am. J. Psychiatry*, 145: 312-317.

Rickels, K., Schweizer, E., Case, G.W. & Garcia-Espana, F. 1988b. Benzodiazepine dependence, withdrawal severity, and clinical outcome: effects of personality. *Psychopharmacol. Bull.*, 24: 415-420.

Rizvi, T.A., Ennis, M., Behbehani, M.M. & Shipley, M.T. 1991. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: Topography and reciprocity. *J. Comp. Neurol.* 303: 121–131.

Rosebush, P.I. & Mazurek, M.F. 1996. Catatonia after benzodiazepine withdrawal. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 16: 315-319.

Roth, G.L., Aitkin, L.M., Andersen, R.A., Merzenich, M.M. 1978. Some features of the spatial organization of the central nucleus of the inferior colliculus of the cat. *J Comp Neurol* 182: 661-680.

Royer, S., Martina, M. & Pare, D. 1999. An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdale. *The Journal of Neuroscience*, 19(23): 10575–10583.

Sah, P., Faber, E.S.L., Lopez de Armentia, M. & . Power, J. 2003. The Amygdaloid Complex: Anatomy And Physiology. *Physiol Rev*, 83: 803–834.

Sandner, G., Dessort, D., Schmitt, P. & Karli, P. 1981. Distribution of GABA in the periaqueductal gray matter. Effects of medial hypothalamic lesions. *Brain Res* 224: 279-290.

Santos, N.R., Husto, J.P., Brandao, M.L. 2002. Further evidence for the involvement of histamine H2 receptors in the control of defensive behaviour generated in the midbrain tectum. *Behav Pharmacol* 13: 73-80.

Saxena, P. R. 1995. Serotonin receptors: subtypes, functional responses and therapeutic relevance. *Pharmacol. Ther.* 66: 339–368.

Schenberg, L.C. & Graeff, F.G. 1978. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 9: 287-295.

Schleimer, S.B., Johnston, G.A. & Henderson, J.M. 2005. Novel oral drug administration in an animal model of neuroleptic therapy. *J. Neurosci. Methods*, 146: 159-164.

Schmitt, P. Karli, P. 1980. Escape induced by combined stimulation in medial hypothalamus and central gray. *Physiol Behav* 24: 111-121.

Schreiber, R. & DeVry, J. 1993. Neuronal circuits involved in the anxiolytic effects of the 5-HT_{1A} receptor agonists 8-OH-DPAT, ipsapirone and buspirone in the rat. *Eur. J Pharmacol.*, 249: 341–51.

Shader, R.I. & Greenblatt, D.J. 1993. Use of benzodiazepines in anxiety disorders. *N. Engl. J. Med.*, 328: 1398-1405.

Shiraishi, S., Shiraishi, Y., Oliver, D.L. & Altschuler, R.A. 2001. Expression of GABA(A) receptor subunits in the rat central nucleus of the inferior colliculus. *Brain Res Mol Brain Res* 96: 122-132.

Sieghart, W. 1986. Comparison of benzodiazepine receptors in cerebellum and inferior colliculus. *J Neurochem* 47: 920-923.

Silva, J.A. 1999. História dos Benzodiazepínicos. In: Bernik MA, editor. *Benzodiazepínicos, quatro décadas de experiência*. São Paulo (SP): Edusp; p. 15-28..

Souza-Pinto, L.F., Castilho, V.M., Brandão, M.L. & Nobre, M. J. 2007. The blockade of AMPA-kainate and NMDA receptors in the dorsal periaqueductal gray reduces the effects of diazepam withdrawal in rats. *Pharmacol. Biochem. and Behav.*, 87: 250–257.

Squires, K.C., Chu, N.S. & Starr, A. 1978. Acute effects of alcohol on auditory brainstem potentials in humans. *Science*, 201(4351): 174-176.

Tachibana, M. & Kuriyama, K. 1974. Gamma-aminobutyric acid in the lower auditory pathway of the guinea pig. *Brain Res* 69: 370-374.

Taylor, F.K. 1989. The damnation of benzodiazepines. *Br. J. Psychiatry*, 154: 697-704.

Thomas, S. R.; Lewis, S. R.; Iversen, S. D. 1985. Correlation of [3H] diazepam binding density with anxiolytic locus in the amygdaloid complex of the rat. *Brain Res.* 342:85–90;

Thompson, G.C., Cortez, A.M. & Lam, D.M. 1985. Localization of GABA immunoreactivity in the auditory brainstem of guinea pigs. *Brain Res.*, 339: 119–22.

Tietz, E.I., Rosenberg, H.C. & Chiu, T.H. 1986. Autoradiographic localization of benzodiazepine receptor downregulation. *J. Pharmacol. Ecp. Ther.* 236: 284-292.

Tokunaga, A., Sugita, S. & Otani, K. 1984. Auditory and non-auditory subcortical afferents to the inferior colliculus in the rat. *J Hirnforsch* 25: 461-472.

Tomaz, C., Dickinson-Anson, H. & McGaugh, J. L. 1992. Basolateral amygdala lesions block diazepam-induced anterograde amnesia in an inhibitory avoidance task. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:3615–3619.

Troncoso AC, Cirilo-Junior G, Sandner G, Brandao ML (1998) Signaled two-way avoidance learning using electrical stimulation of the inferior colliculus as negative reinforcement: effects of visual and auditory cues as warning stimuli. *Braz J Med Biol Res* 31: 391-398.

Vivian, J.A. & Miczek, K.A. 1993. Diazepam and gepirone selectively attenuate either 20–32 or 32–64 KHz ultrasonic vocalizations during aggressive encounters. *Psychopharmacology (Berl)*. 112: 66–73.

Vivian, J.A., Farrell, W.J., Sapperstein, S.B. & Miczek, K.A. 1994. Diazepam withdrawal: effects of diazepam and gepirone on acoustic startle-induced 22 KHz ultrasonic vocalizations. *Psychopharmacology (Berl)*, 114: 101–8.

Webster, W.R. 1995. Auditory System. In: Paxinos, R. *Rat Nervous System*. Academic Press, New York, pp. 797-832.

Woods, J.H., Katz, J.L. & Winger, G. 1992. Benzodiazepines: use, abuse, and consequences. *Pharmacol. Rev.*, 44: 151-347.

Woods, J.H. & Winger, G. 1995. Current benzodiazepine issues. *Psychopharmacology (Berl)*, 118: 107-115.

Woolard, H.H. & Harpman, J.A. 1940. The Connections of the inferior colliculus and the dorsal nucleus of lateral lemniscus. *Journal of Anatomy* 74: 458.

Yardley, C.P. & Hilton, S.M. 1986. The hypothalamic and brainstem areas from which the cardiovascular and behavioural components of the defence reaction are elicited in the rat. *J Auton Nerv Syst* 15: 227-244.

Zangrossi Jr, H., Viana, M.B. & Graeff, F.G. 1999. Anxiolytic effect of intra-amygdala injection of midazolam and 8-hydroxy-2-di-n-propylamino tetralin in the elevated T-maze. *European Journal of Pharmacology*, 369: 267–270.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)