

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ENVOLVIMENTO DAS REDES NEURAIS DO NÚCLEO DORSAL
DA RAFA E DA NEUROTRANSMISSÃO SEROTONINÉRGICA NO
LOCUS COERULEUS EM PROCESSOS ANTINOCICEPTIVOS
INDUZIDOS POR REAÇÕES DE FUGA ORIENTADA CAUSADAS
PELO BLOQUEIO DOS RECEPTORES GABA_A DO
HIPOTÁLAMO MEDIAL

Audrey Francisco

Ribeirão Preto-SP

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Farmacologia



**ENVOLVIMENTO DAS REDES NEURAIS DO NÚCLEO DORSAL DA RAFE E
DA NEUROTRANSMISSÃO SEROTONINÉRGICA NO *LOCUS COERULEUS*
EM PROCESSOS ANTINOCICEPTIVOS INDUZIDOS POR REAÇÕES DE
FUGA ORIENTADA CAUSADAS PELO BLOQUEIO DOS RECEPTORES
GABA_A DO HIPOTÁLAMO MEDIAL**

Audrey Francisco

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Ribeirão Preto-SP

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Francisco, Audrey

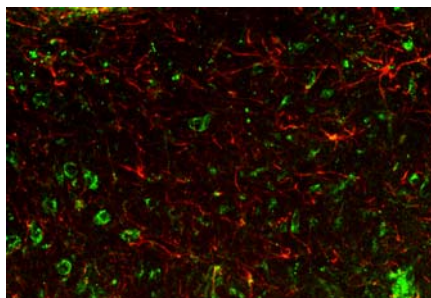
Envolvimento das Redes Neurais do Núcleo Dorsal da Rafe e da Neurotransmissão Serotoninérgica no *Locus Coeruleus* em Processos Antinociceptivos Induzidos por Reações de Fuga Orientada Causadas pelo Bloqueio dos Receptores GABA_A do Hipotálamo Medial

97p.: il.:30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

1. Antinocicepção; 2. Comportamento Defensivo;
3. Neurotransmissão serotoninérgica; 4. Hipotálamo Medial;
5. Núcleo dorsal da rafe; 6. *locus coeruleus*.



CAPA: Fotomicrografia de secções coronais do mesencéfalo em nível do núcleo dorsal da rafe. Mostrando neurônios positivos para serotonina (coloração verde, AlexaFlúor 488) e células gliais (coloração vermelho, AlexaFlúor 594). Vide figura 7B.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Audrey Francisco

ENVOLVIMENTO DAS REDES NEURAIS DO NÚCLEO DORSAL DA RAFA E DA NEUROTRANSMISSÃO SEROTONINÉRGICA NO *LOCUS COERULEUS* EM PROCESSOS ANTINOCICEPTIVOS INDUZIDOS POR REAÇÕES DE FUGA ORIENTADA CAUSADAS PELO BLOQUEIO DOS RECEPTORES GABA_A DO HIPOTÁLAMO MEDIAL

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área: Farmacologia

Aprovada em: ___/___/___/.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Henrique Azevedo Futuro Neto

Instituição: CCS-UFES

Assinatura: _____

**“E ainda que tivesse o dom de profecia,
e conhecesse todos os mistérios e toda
a ciência, e ainda que tivesse toda a fé de
maneira tal que transportasse os montes,
e não tivesse caridade, nada seria.”**

I Aos Corintios, 13:2

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família:

A meu pai, Antônio (*in memoriam*);

À minha melhor amiga e conselheira, minha mãe, Maria A Rosa; Meus irmãos, Leandro e Wesley;

A meu noivo Matheus;

Sou eternamente grata pelo carinho, amor, compreensão e principalmente por compartilharem cada momento importante de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela paz, orientação, proteção e sabedoria concedidas, sem as quais, não teria apreciado os perfumes das flores, nem o sabor dos frutos de vitória ao longo da minha vida.

Ao **Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra**, por ter aberto as portas do conhecimento para mim. Agradeço-lhe, também, pela confiança em meu trabalho, pelo incentivo aos estudos e por toda orientação para que a realização desse trabalho fosse possível.

Aos membros da banca, **Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes** e ao **Prof. Dr. Henrique Azevedo Futuro Neto**, por tão prontamente aceitarem esse convite e, ainda, pelas considerações necessárias para enriquecimento do presente trabalho.

Agradeço especialmente aos meus amigos do **Laboratório de Neuroanatomia e Neuropsicofarmacologia** (LNN):

Renato (Panda), além da colaboração e supervisão em meu trabalho, agradeço-lhe pela amizade sincera compartilhada ao longo desses anos;

André TW, por compartilhar seus conhecimentos farmacológicos, pela colaboração e principalmente pelas críticas indispensáveis;

Tati Felippotti, minha professora particular, por ter me ensinado a dar os primeiros passos dentro do laboratório;

Dani, pelo auxílio nos momentos de maior dificuldade;

Daoud, pelo apoio técnico e pela paciência necessária para me “aturar”;

Jú Silva, pelo apoio nas longas horas de estudo e de experimentos;

Meus amigos colombianos Mary, Andres e Carlos, pelo apoio, incentivo e principalmente por compartilhar seus conhecimentos;

Minha “irmã” Márcia, pelo companheirismo, pelas discussões e, o mais importante, por nunca me deixar esquecer a grandeza de nosso Pai;

E ainda, aos **meus amigos** que contribuíram indiretamente para a elaboração desse trabalho: Walter, Andressa, Rithi, Ricardo, Luana, Tati (*snake*) e Laine.

A **Vani**, técnica do laboratório de morfologia, pelas palavras de sabedoria e por contribuir efetivamente para a realização desse trabalho;

A **Soninha**, secretária do departamento de farmacologia, por toda paciência, dedicação e carinho ao me auxiliar;

Ao querido Mestrão, **Prof. Dr. Alexandre P. Corrado**, pela confiança em meu trabalho, e por ter contribuído para meu crescimento intelectual;

Ao **Prof. Dr. Hélio Zangrossi Jr.** pelas considerações como assessor durante todo o período de meu mestrado;

Em especial à minha família:

Pai Antônio (*in memoriam*), por me ensinar a ser honesta e trabalhadora, e por sempre me incentivar a conquistar um diploma;

Mãe Maria Rosa, por me ensinar a ser forte sem soberba, a conquistar sonhos sem ganância, e a crescer com humildade no coração;

Aos irmãos, Leandro, pelas críticas construtivas que me muniram de forças para nunca desistir, e Wesley, por sempre me ajudar e ajudar a todos em nossa volta, por crescer ao meu lado e crescer comigo;

Meu noivo Matheus Biagioni, pela ajuda efetiva na elaboração do presente trabalho, e também, por estar ao meu lado impedindo que minha fé se desfalecesse;

Mia Cugina Kétima, pela amizade, pelo companheirismo, pelos conselhos, pelo apoio, pelo incentivo, por acreditar em mim e por compartilhar todos os momentos de minha vida;

Minha mentora Raquel Rodrigues, por ter responsabilidade integral na minha formação acadêmica e profissional, e principalmente por me apoiar quando nem eu mesma acreditava na minha capacidade;

Ao **Departamento de Farmacologia**, por possibilitar a realização desse estudo;

Aos **técnicos do departamento**, Eleni e Tadeu, pelo apoio;

As **responsáveis pelo biotério**, Inês e Eliana, por cuidar dos animais durante os experimentos;

A **CAPES** e **FAPESP**, pelo apoio financeiro, imprescindível para a realização desse trabalho;

Aos **animais de laboratório**, indispensáveis para o desenvolvimento científico;

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste sonho.

RESUMO

As projeções serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe (NDR) para o *locus coeruleus* (LC) desempenham um importante papel na modulação da dor. Modelos de antinocicepção induzidos pelo medo têm sido amplamente utilizados para melhor compreendermos os processos de modulação da dor. Com efeito, o bloqueio dos receptores GABAérgicos no hipotálamo medial (HM) induz tanto respostas comportamentais quanto uma antinocicepção subsequente aos comportamentos defensivos. O objetivo do presente estudo foi investigar o envolvimento do sistema serotoninérgico do sistema endógeno de inibição de dor, no NDR e no LC, nos processos antinociceptivos elaborados pelo bloqueio dos receptores GABA_A do hipotálamo medial. A microinjeção do antagonista de receptores GABA_A, bicuculina (40ng/0,2μL) no HM, induziu comportamentos defensivos, elaborados concomitantemente com processos antinociceptivos. A administração de 5,7-di-hidroxitriptamina (1μg/0,2μL), uma neurotoxina específica para neurônios serotoninérgicos, no NDR diminuiu a frequência e duração dos comportamentos de alerta defensivo e de fuga. Além disso, reduziu a antinocicepção induzida pela administração de bicuculina 5 e 14 dias após a lesão. Grupos independentes de animais pré-tratados no LC com os antagonistas de receptores serotoninérgicos metisergida (não seletivo) e cetanserina (com maior afinidade pelos receptores 5-HT_{2A/2C}), na concentração de 5μg/0,2μL, tiveram redução dos limiares nociceptivos que seguem os comportamentos de fuga elaborada, organizada pelo HM, sem alteração significativa nos comportamentos defensivos. Esses dados sugerem que neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe encontram-se diretamente envolvidos na organização das respostas de fuga elaborada, bem como na subsequente antinocicepção induzida pelo medo inato. Os presentes achados sugerem, ainda, que os neurônios serotoninérgicos do NDR que se projetam para o LC, modulam apenas a antinocicepção induzida pelo medo e pelo pânico, sem alteração na organização de comportamentos induzidos pelo bloqueio de receptores GABA_A no HM.

ABSTRACT

The serotonergic projections from dorsal raphe nucleus (DRN) to the *locus coeruleus* (LC) play an important role in pain modulation. Models of fear-induced antinociception have been widely used to better understand the processes of pain modulation. Indeed, the blockade of GABA_A receptors in the medial hypothalamus evokes behavioral responses followed by antinociception. The aim of the present study was to investigate the involvement of monoamine-mediated systems of the endogenous pain inhibitory system, such as the dorsal raphe nucleus and the *locus coeruleus* in the antinociceptive processes elaborated blockade of GABAergic receptors of the medial hypothalamus (MH) by microinjection of the GABA_A receptor antagonist bicuculline (at 40ng/0.2μL). The GABA_A receptor blockade in the MH elicited defensive behaviours more elaborated, and interspread with exploratory responses. This oriented escape behaviour was followed by significant antinociception. The GABAergic receptors blockade in the HM 5 and 14 days after the serotonin-containing neurons damage with the selective neurotoxin 5,7-di-hydroxitriptamina (5,7-DHT at 1μg/0,2μL) microinjected in the DNR changed both the defensive behaviour, evidenced by decrease in the frequency and duration of defensive attention and escape, as well as the nociceptive thresholds, reducing the innate fear-induced antinociception. Independent groups pretreated with serotonin receptors antagonists methysergide (non-specific) and ketanserin (more specific for 5-HT_{2A/2C} serotonergic receptor) at 5μg/0,2μL, in the LC decreased the fear-induced antinociception, without significant changes in defensive behaviours. These data suggest that serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus are directly involved in organization of the escape responses as well as in the elaboration of the innate fear-induced antinociception. On the other hand, inputs from NDR serotonergic neurons to LC, modulate only the antinociception induced by fear but not panic-like behaviours evoked by the GABA_A receptors blockade in the MH.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
Neurobiologia do medo e do comportamento defensivo.....	15
Sistema hipotalâmico medial de defesa	18
Sistema GABAérgico hipotalâmico.....	20
Sistema de defesa e modulação da dor.....	24
Núcleo dorsal da rafe: Projeções serotoninérgicas para o locus coeruleus.....	26
O Sistema serotoninérgico e a Antinocicepção	28
OBJETIVOS.....	32
Objetivo geral.....	32
Objetivos específicos.....	32
MATERIAL E MÉTODOS	34
Animais.....	34
Teste nociceptivo	34
Drogas	35
Procedimento Cirúrgico.....	35
Procedimento Experimental	36
Estudo Neurofisiológico	36
Imunofluorescência	38
Histologia	39
Estudo neurofarmacológico	39
Histologia	40
Equipamentos.....	41
Análise Estatística.....	42
RESULTADOS	44
Efeito da lesão neurotóxica seletiva de neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe na analgesia induzida pela fuga orientada.....	44
Estudo das respostas comportamentais	44
Estudo do Limiar Nociceptivo.....	49

Estudo neurofarmacológico do envolvimento do sistema serotoninérgico na analgesia induzida pela fuga orientada.....	56
Estudo das respostas comportamentais	56
Estudo do limiar nociceptivo	60
DISCUSSÃO.....	67
CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
ANEXO	95

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Neurobiologia do medo e do comportamento defensivo

Nos primórdios da neuroetologia e da neurobiologia do medo, Darwin sugere um caráter evolutivo do comportamento emocional do homem. E as análises comportamentais em diversas espécies animais fornecem subsídios para a compreensão do sistema neural que as organiza (BRANDÃO e cols., 2003a).

O estado emocional do medo é manifestado através de respostas adaptativas mediante o prenúncio de perigo real ou potencial (MILLAN, 2003). Modelos animais de medo e ansiedade têm sido utilizados para melhor compreendermos os circuitos neurais recrutados na organização e elaboração das reações defensivas frente às mais diversas condições aversivas (BLANCHARD & BLANCHARD, 2008).

Um estímulo condicionado ou incondicionado de ameaça e dano corporal ativa circuitos neurais encefálicos responsáveis pela gênese e elaboração de estados aversivos, que são interpretados em nossa espécie como estado motivacional do medo (PANKSEPP, 1990; FANSELOW, 1991).

O comportamento defensivo é um conjunto de respostas induzidas pela presença de estímulo aversivo caracterizadas pela inibição comportamental, vigilância, fuga (COIMBRA & BRANDÃO, 1993), imobilidade defensiva ou “congelamento” (FANSELOW, 1980; COIMBRA e cols., 1989; ZHANG e cols., 1990), ou imobilidade tônica (GRAEFF, 1993; MENESCAL-DE-OLIVEIRA & HOFFMANN, 1993) e por um conjunto de posturas ameaçadoras e vocalizações seguidas por ataque na impossibilidade de fuga (MCNAUGHTON & CORR, 2004). Essas respostas comportamentais são acompanhadas por alterações neurovegetativas, tais como aumento da pressão arterial, frequência cardíaca e da respiração, piloereção, micção, defecação e exoftalmia (KEIM & SHEKHAR, 1996) e por antinocicepção (COIMBRA e cols., 1992, 2006; para revisão BRANDÃO e cols, 1999).

Baseando-se nas observações de que a estimulação de algumas estruturas encefálicas induz respostas comportamentais de defesa, Graeff (1981) propôs que o complexo amigdalóide, o hipotálamo e a substância cinzenta periaquedutal (SCP) seriam responsáveis pela elaboração e coordenação de respostas comportamentais relacionadas a estímulos aversivos. Reuniram-se tais estruturas em um sistema inicialmente denominado de Sistema Encefálico Aversivo (GRAEFF, 1981), posteriormente chamado de Sistema Encefálico de Defesa (GRAEFF & GUIMARÃES, 1999).

Através de trabalhos com estimulação das estruturas do Sistema Encefálico de Defesa, foi proposto que a substância cinzenta periaquedutal parece ser crucial para a organização de respostas rápidas e eficientes de comportamentos de defesa, primeiro engajando o animal em um comportamento de fuga explosiva e, em seguida, após a ativação do complexo amigdalóide ou do hipotálamo, pode ser elaborado um comportamento de defesa mais organizado (MCNALLY e cols., 2004). O complexo amigdalóide ainda estaria relacionado à elaboração de comportamentos defensivos relacionados aos estímulos sensoriais (LEDOUX, 1991), e o hipotálamo seria responsável por integrar respostas defensivas mais elaboradas em relação à SCP, pois os comportamentos induzidos pela estimulação daquela estrutura são caracterizados pelo aumento na atividade locomotora intercaladas por tentativas de fuga coordenada e direcionada (DI SCALA e cols., 1984; BRANDÃO e cols., 1986; FREITAS e cols., 2009).

Além das estruturas mencionadas, uma ampla interconexão anátomo-funcional entre outras estruturas encefálicas, como o colículo superior (COIMBRA & BRANDÃO, 1993), o colículo inferior (BRANDÃO e cols., 1988, 1993; CARDOSO e cols., 1994), no mesencéfalo, e o sistema septo-hipocampal (GRAY & MCNAUGHTON, 2000), no prosencéfalo, tem sido considerada estar relacionada com a elaboração das respostas comportamentais de defesa.

Com efeito, alguns estudos demonstraram que a estimulação elétrica de algumas estruturas mesencefálicas como as camadas profundas do colículo superior e o núcleo central do colículo inferior de ratos, elicia vários

comportamentos defensivos, como alerta, congelamento e fuga (COIMBRA & BRANDÃO, 1993; BRANDÃO e cols., 1993). Também foram observadas alterações autonômicas, como aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca, respiratória, micção e defecação (VARGAS, 2000). Antinocicepção (COIMBRA e col., 1992; COIMBRA & BRANDÃO, 1997) é outro fenômeno comumente observado após a estimulação dessas estruturas.

Em relação ao sistema septo-hipocampal, tem sido descrito que esse sistema seria responsável pela percepção e avaliação de estímulos (GRAY & MCNAUGHTON, 2000). Gray (1982) propôs a participação da área septal e do hipocampo em um sistema neurônico que denominou Sistema de Inibição Comportamental, baseado na observação de que a lesão da área septal e do hipocampo determina efeitos comportamentais semelhantes àqueles produzidos por administração de drogas ansiolíticas benzodiazepínicas.

O estudo da neurobiologia do medo e da ansiedade utilizando modelos etológicos contribui para a compreensão das respostas de defesa em função da distância ou da intensidade do estímulo aversivo (MCNAUGHTON & CORR, 2004; GUIMARÃES-COSTA e col., 2007).

Nesse sentido, alguns autores sugerem que a distância que a presa se encontra do predador ou a intensidade dos sinais emitidos por ele podem determinar quais substratos neurais são ativados ou, ainda, o padrão de respostas defensivas do animal que melhor se adequa à situação aversiva. Portanto, estímulos ameaçadores potenciais induzem um aumento das respostas de avaliação de risco e inibição comportamental, recrutando, para isso, estruturas como o complexo amigdalóide e o sistema septo-hipocampal. À medida que o predador se aproxima, os comportamentos de defesa se alteram para congelamento, luta e fuga desordenada sendo coordenados pela substância cinzenta periaquedutal dorsal. Quando o estímulo aversivo é distal, comportamentos defensivos de fuga ordenada e inibição da agressão são coordenados pelo hipotálamo medial, uma estrutura supraespalhal relevante para a organização das emoções, sendo também considerada como a estrutura suprasegmentar mais importante do sistema neurovegetativo

(BLANCHARD & BLANCHARD, 1988; GRAEFF, 1994; GRAY & MCNAUGHTON, 2000).

Sistema hipotalâmico medial de defesa

O hipotálamo, uma das estruturas encefálicas que compõem o sistema límbico, controla a produção hormonal e também algumas funções do sistema nervoso autônomo, respondendo aos estímulos ambientais, emocionais e às necessidades básicas do organismo. Localizado no diencéfalo, ventralmente ao tálamo e formando parte das paredes laterais do terceiro ventrículo, abaixo do sulco hipotalâmico, é constituído por três áreas: periventricular, lateral e medial. Essas áreas são divididas em quatro regiões: pré-óptica, anterior, tuberal e mamilar (MARTIN, 2003).

Com o propósito de investigar a anatomia funcional das estruturas diencefálicas, um estudo pioneiro de estimulação elétrica, realizado por Hess and Brugger (1943) mostrou o envolvimento das redes neurais do sistema límbico na organização das emoções. Através da estimulação do hipotálamo de gatos, foi descrito que a região perifornical do hipotálamo lateral elicia comportamentos defensivos seguidos por reações autonômicas. Posteriormente, um trabalho de lesão eletrolítica, realizado por Wheatley (1944), identificou o envolvimento dos núcleos dorsomedial e ventromedial na elaboração das respostas defensivas.

Estudos mais recentes, utilizando técnicas para expressão da proteína Fos, demonstraram que a exposição de ratos ao seu predador natural, o gato, ou ao seu odor, ativa redes neuronais em alguns núcleos do hipotálamo medial, como o núcleo anterior (NAH), a parte dorsomedial do núcleo ventromedial (dmHVM) e o núcleo pré-mamilar dorsal (dPM) (CANTERAS e cols. 1997; DIELENBERG cols., 2001). Estudos de investigações de projeções axoniais utilizando a técnica de *Phaseolus vulgaris leucoagglutinin*, um traçador axonal anterógrado, microinjetado na área medial do hipotálamo de ratos, demonstrou que o NAH, dmHVM e o dPM estão profusamente interconectados. Dessa maneira, o NAH e o dmHVM enviam densas projeções para o dPM,

enquanto que o NAH recebe projeções provenientes do dmHVM e dPM e, finalmente, o dmHVM recebe projeções do NAH (CANTERAS e cols., 1994; RISOLD e cols., 1994).

Nesse sentido, Canteras (2002) propôs a existência de um sistema envolvido na elaboração de respostas defensivas inata, o qual denominou Sistema Hipotalâmico Medial de Defesa.

O sistema defensivo hipotalâmico possui, ainda, importantes conexões aferentes e eferentes com estruturas procencefálicas e mesencefálicas responsáveis pela elaboração das respostas comportamentais de defesa (para revisão, CANTERAS, 2002).

Recentes estudos mostraram projeções entre o sistema defensivo hipotalâmico e o complexo amigdalóide. A parte posterior do núcleo basolateral do complexo amigdalóide, parte relacionada com a detecção de predadores, envia projeções para o HVM e, através dessa via neural, o hipotálamo medial recebe projeções diretas durante a exposição ao predador ou ao seu odor, sinalizando sobre as características aversivas dos estímulos sensoriais que chegam ao complexo amigdalóide (DIELENBERG e cols., 2001).

Dentre as conexões entre o sistema defensivo hipotalâmico e estruturas mesencefálicas, tem sido descrito que a SCP possui conexões eferentes provenientes do NAH que se projetam especificamente para as colunas dorsomedial rostral e ventrolateral caudal da SCP. O dmHVM, por outro lado, envia densas projeções para as colunas dorsolateral e dorsomedial da SCP. Finalmente, projeções do dPM para a coluna dorsolateral da SCP também já foram descritas (RISOLD e cols., 1994). Assim, o NAH, o dmHVM e o dPM estabelecem conexões com diferentes substratos neurais da SCP, que podem participar da elaboração das respostas defensivas inatas (CARRIVE, 1993). Com efeito, durante a exposição do rato a um de seus predadores naturais (gato), há aumento da expressão da proteína Fos principalmente observado nas colunas dorsomedial e dorsolateral da porção rostral da SCP e nas colunas lateral e ventrolateral da porção caudal da SCP (CANTERAS & GOTO, 1999).

O NAH e o dmHVM, constituintes do sistema defensivo hipotalâmico, enviam projeções para outro importante núcleo relacionado com reações defensivas, o núcleo dorsomedial do hipotálamo (HDM) (THOMPSON e cols., 1996).

Recentes estudos demonstraram o envolvimento do HDM nas respostas comportamentais e endócrinas relacionadas ao comportamento defensivo (EVANS e cols., 2004; FREITAS e cols., 2009). Desse modo, tem sido descrito que a inativação do HDM, através da microinjeção local de lidocaína, diminui a liberação do hormônio adrenocorticotropina (ACTH) e corticosterona pelas glândulas adrenais, sugerindo, assim, a participação do HDM nas repostas relacionadas ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (EVANS e cols., 2004). O HPA comanda as alterações endócrinas que acompanham o comportamento emocional através da secreção do hormônio liberador de corticotropina e vasopressina, os quais estão diretamente envolvidos na liberação do ACTH pela glândula pituitária. Esse hormônio, por sua vez, atinge as glândulas adrenais através da qual é liberado cortisol na corrente sanguínea do homem e corticosterona em roedores (KUPFERMAN, 1991; LEDOUX, 1991; GRAEFF, 2007).

Em harmonia com esses estudos, verificou-se que o bloqueio dos receptores GABA_A no HDM de ratos também diminui a concentração plasmática dos mesmos hormônios, ACTH e corticosterona, além de promover alterações fisiológicas, tais como aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca (KEIM & SHEKHAR, 1996). Baseando-se nessas observações, foi sugerido que uma inibição tônica mediada pelos receptores GABA_A do HDM desempenhasse algum papel na regulação de respostas fisiológicas e neuroendócrinas, o que tem sido estendido à modulação de respostas comportamentais de defesa (SHEKHAR & KEIM, 1997).

Sistema GABAérgico hipotalâmico

Várias evidências têm implicado claramente mecanismos GABAérgicos, serotoninérgicos, opióides e mediados por aminoácidos excitatórios, como

glutamato e homocisteína, no controle de substratos neurais responsáveis pela geração do comportamento defensivo em estruturas ligadas à elaboração do medo no sistema nervoso central (BANDLER e cols. 1985; BANDLER & CARRIVE 1988; BRANDÃO e cols. 1988, 1993, 1994; COIMBRA e cols. 1989, 1992, 1998; ZANG e cols., 1990; COIMBRA 1991, 1995; COIMBRA & BRANDÃO 1993, 1997; BRANDÃO e cols. 1999; EICHENBERGER e cols., 2002).

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o neurotransmissor inibitório de maior prevalência no sistema nervoso central. Sintetizado a partir do glutamato pela ação da enzima *ácido glutâmico descarboxilase*, atua em três tipos de receptores, o GABA_A, o GABA_B e o GABA_C. O receptor GABA_A consiste em um receptor ionotrópico, controlador dos canais de cloro, e é formado a partir de cinco unidades protéicas, composta por três tipos de subunidades (duas α , duas β 2 e uma γ 2) (CHEBIB & JOHNSTON, 1999; ZWANZGER & RUPPRECHT, 2004).

Baseado em pesquisas experimentais de comportamento, foi sugerido uma função inibitória tônica do GABA em neurônios responsáveis pela elaboração de respostas de defesa no hipotálamo (SHEKHAR, 1987; 1993).

Além das alterações fisiológicas e neuroendócrinas descritas anteriormente, o bloqueio dos receptores GABA_A, no HDM, tem sido relacionado com respostas comportamentais defensivas. Utilizando o teste de interação social, modelo de ansiedade pelo qual se estuda o tempo de interação entre dois animais (rato), foi observado um aumento da atividade locomotora e uma diminuição no tempo de interação entre os animais após a microinjeção de bicuculina, um antagonista competitivo de receptores GABA_A, no HDM (SHEKHAR & KATNER, 1994).

Posteriormente, Shekhar (1994) sugeriu que o sistema GABAérgico do DMH poderia estar envolvido com respostas relacionadas ao ataque de pânico, visto que a administração crônica de um inibidor da síntese de GABA (L-alilglicina) no HDM, após a infusão endovenosa de lactato de sódio, promove um aumento nas respostas fisiológicas de batimento cardíaco, pressão arterial e frequência respiratória, além de induzir os comportamentos sugestivos de

ansiedade similares àqueles observados em pacientes com ataques de pânico (SHEKHAR e cols., 1996; SHEKHAR & KEIM, 1997).

Baseando-se nessas observações, foi sugerido que a desinibição GABAérgica do HDM parece modular respostas comportamentais relacionadas à ansiedade e ao estresse e, ainda, parece exercer um controle sobre as alterações fisiológicas relacionadas ao medo (DIMICCO e cols., 2001; ZARETSKAIA, e cols., 2008).

Estudos de análise imuno-histoquímica de dupla marcação para receptores NMDA (receptor glutamatérgico) e para expressão da proteína c-Fos, observou-se um aumento da imunorreatividade neuronal da dupla marcação no HDM, em modelos animais de ataques de pânico, induzidos pela diminuição da síntese de GABA após a infusão endovenosa de lactato de sódio. Além disso, a administração de um antagonista de receptores NMDA (MK-801) no HDM resulta em uma diminuição dose-dependente das respostas fisiológicas relacionadas ao ataque de pânico e nas respostas comportamentais observadas no teste de interação social. Dessa maneira, foi sugerido que as respostas comportamentais relacionadas ao pânico induzidas pela inibição dos receptores GABAérgicos do HDM seriam mediadas pelos receptores NMDA (JOHNSON & SHEKHAR, 2006).

Outros estudos sugerem o envolvimento do sistema noradrenérgico na modulação do medo inato e do pânico induzidos pelo bloqueio dos receptores GABAérgicos. Assim, foi observado através de estudo de microdiálise que o bloqueio intradiencefálico dos receptores GABA_A, com administração de bicuculina no HDM resultou em um aumento da liberação de noradrenalina nesse núcleo. Ademais, a lesão seletiva dos terminais noradrenérgicos, com administração de 6-hidroxidopamina, diminuiu significativamente as respostas fisiológicas relacionadas ao ataque de pânico e induzidas pela administração de bicuculina no hipotálamo medial (SHEKHAR e cols., 2002).

Tomando-se como base essas observações, foi sugerido que as alterações fisiológicas e comportamentais causadas tanto pelo bloqueio dos receptores GABA_A quanto pela diminuição da síntese de GABA poderiam estar

sob controle neuroquímico glutamatérgico e noradrenérgico (SHEKHAR & KEIM, 2000; SHEKHAR e cols., 1994).

Um recente trabalho mostrou, também, a participação de outros núcleos hipotalâmicos, como o dmHVM, nas respostas comportamentais relacionadas ao ataque de pânico e à ansiedade. Assim, foi observado que a microinjeção de um agonista benzodiazepínico, o midazolam, no dmHVM de ratos produz efeito ansiolítico, resultando em um aumento do tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (JARDIM e cols, 2005). No mesmo sentido, foi observado no labirinto em T-elevado que a microinjeção de midazolam, muscimol (agonista de receptores GABA_A) e de baclofen (agonista dos receptores GABA_B) na divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial diminui os comportamentos de esquiva inibitória e de fuga, relacionados com um efeito ansiolítico e panicolítico, respectivamente, dos tratamentos efetuados no diencéfalo (Bueno e cols., 2007).

O bloqueio dos receptores GABA_A no HDM e no dmHVM de ratos induz comportamentos defensivos similares, caracterizados por fuga orientada (corridas moderadas, com ou sem saltos) e fuga retrógrada (movimentos defensivos de cabeça e membros rápidos, para trás) além de aumento do número de levantamentos e da atividade locomotora. Além disso, foram observadas alterações nos limiares nociceptivos, após essas respostas comportamentais, caracterizando uma antinocicepção induzida pelo medo inato (FREITAS e cols., 2009).

Efetivamente, a desinibição do sistema GABAérgico, tanto no HDM quanto no dmHVM, induz respostas comportamentais relacionadas ao medo e à ansiedade, além das alterações autonômicas relacionadas ao pânico. Com efeito, o bloqueio dos receptores GABAérgicos no HM também parece induzir a elaboração de processos de modulação da dor subsequentemente aos comportamentos defensivos induzidos farmacologicamente, como também já foi observado através da desinibição GABAérgica e da estimulação elétrica de estruturas do teto mesencefálico (COIMBRA e cols., 2000, 2006).

Sistema de defesa e modulação da dor

A antinocicepção induzida pelo medo tem sido considerada como parte integrante da reação de defesa, e uma importante resposta adaptativa do organismo em situações de emergência devido à redução da capacidade de percepção da dor (COIMBRA e cols 1995).

Bolles e Fanselow (1980) elaboraram uma teoria para explicar a relação entre os comportamentos de medo e dor denominado modelo perceptivo recuperativo. O comportamento recuperativo induzido pela dor seria responsável pelo restabelecimento do indivíduo que sofrera uma dada lesão, enquanto a fase defensiva seria o momento onde ocorre a reação ao estímulo aversivo com o aumento do medo e diminuição da dor, por ativação do sistema endógeno de inibição da dor. O estado motivacional do medo ativa mecanismos opioides endógenos, os quais inibem os comportamentos motivacionais da dor, contribuindo para a sobrevivência do indivíduo, por exemplo, em situações que envolvem a presença de predador (BASBAUM & FIELDS, 1984). Não obstante, mecanismos não-opioides também têm sido relatados como possíveis bases neurofarmacológicas dos processos de modulação da dor, durante situações aversivas (COIMBRA e cols., 1992; 2006).

O processo de modulação da dor ou antinocicepção tem sido caracterizado pela inibição da propagação dos potenciais de ação gerados por um estímulo nociceptivo periférico, por exemplo, no corno dorsal da medula espinal (CDME). Tem sido sugerido que a SCP, o núcleo magno da rafe e o bulbo rostral ventromedial são importantes estruturas supraespinais também envolvidas no controle de modulação da dor, devido às suas projeções diretas ao CDME. Acrescentem-se, ainda, nessa extensa rede neural, outras estruturas ainda mais rostrais, como o córtex cerebral, tálamo e hipotálamo, além de outras estruturas do tronco encefálico, como o *locus coeruleus* e o núcleo dorsal da rafe, que também podem participar do controle descendente inibitório da dor (para revisão BASBAUM & FIELDS, 1984).

Nesse sentido, inúmeros trabalhos demonstraram, através da estimulação elétrica de estruturas encefálicas, que algumas estruturas prosencefálicas e mesencefálicas eliciam tanto comportamentos defensivos quanto antinocicepção (REYNOLDS, 1969; FARDIN e cols., 1984a,b; BANDLER & DEPAULIS, 1988; LOVICK, 1991; DEPAULIS e cols., 1992; PARRY e col., 2006).

Com a finalidade de investigar o envolvimento do hipotálamo no processo de modulação da dor, alguns trabalhos de estimulação química e elétrica do tecido nervoso têm sido realizados em diferentes núcleos do hipotálamo. Para citar um exemplo, alguns estudos realizados por Aimone e cols., na década de 80, sugerem a participação do hipotálamo lateral (HL), um subnúcleo sabidamente relacionado com o controle do comportamento alimentar, no sistema descendente de inibição da dor, após a observação de que a estimulação elétrica dessa estrutura aumenta a latência de retirada de cauda, o que foi aferido pelo teste “tail-flick”.

Com relação às estruturas mesencefálicas, muitas evidências indicam que a estimulação das colunas dorso-lateral e ventro-lateral da SCP pode produzir efeito antinociceptivo, sendo a analgesia que segue a ativação dos aspectos dorsais da SCP quase que invariavelmente precedida por reações motoras explosivas (comportamento de fuga) induzidas pelo medo (COIMBRA & BRANDÃO, 1993; COIMBRA e cols., 1997; 2006).

Outras investigações localizaram pontos, cuja estimulação desperta forte analgesia, no núcleo dorsal da rafe (NDR), um região mesencefálica rica neurônios serotoninérgicos, localizada ventralmente à SCP (OLIVEIRAS e cols., 1979). As fibras serotoninérgicas da rafe, envolvidas no processo antinociceptivo, projetam-se pelo funículo dorsolateral ao núcleo espinal do nervo trigêmeo e para o CDME, onde inibem seletivamente os neurônios da substância gelatinosa e uma população de neurônios de projeção espinotalâmica e espinoreticular (BASBAUM & FIELDS, 1984).

Outras evidências apontam para a participação de um importante núcleo pontino, o *locus coeruleus* (LC), na via descendente de modulação da dor. Através de estudos neuroanatômicos, realizados por meio da administração de

um neurotraçador retrógrado no CDME, foi sugerido que as principais projeções noradrenérgicas que se projetam para o CDME são provenientes do LC (KWIAT & BASBAUM, 1992), as quais modulam a entrada do impulso nociceptivo no neuroeixo, através de suas conexões descendentes com os interneurônios opiodes endógenos presentes nas proximidades da primeira sinapse da via nociceptiva ascendente (para revisão, MILLAN, 2002).

Núcleo dorsal da rafe: Projeções serotoninérgicas para o locus coeruleus

Os núcleos da rafe são formados por estruturas situadas rostral e caudalmente ao longo da rafe, sendo que, a porção rostral é constituída pelos núcleos mediano da rafe, núcleo linear caudal e pelo núcleo dorsal da rafe, enquanto os núcleos magno da rafe, *obscurus* da rafe e *pallidus* da rafe, juntamente com a parte adjacente da formação reticular lateral compõem a divisão caudal da rafe (HORNUNG, 2003), a qual se estende ao longo do eixo mediano e do plano paramediano do mesencéfalo rostral ao bulbo caudal (FIELDS & BASBAUM, 1977).

Além de participar na elaboração dos comportamentos emocionais, tem sido sugerido que os neurônios serotoninérgicos do NDR participam da modulação do sistema inibitório da dor. Com efeito, Basbaum e Fields (1984) propuseram um circuito neural endógeno de modulação de dor, envolvendo estruturas da rafe e da formação reticular mesencefálica e pontina, como o núcleo dorsal da rafe e o *locus coeruleus*, ricas em neurônios monoaminérgicos, que poderiam estar modulando a entrada do impulso nociceptivo no corno dorsal da medula espinal.

Dessa maneira, foi proposto que, o sistema descendente de inibição de dor, via NDR, para a medula espinal é interconectado com a uma via que liga a SCP ao núcleo magno da rafe (NMgR). As fibras serotoninérgicas percorrerem o trato espinal do nervo trigêmeo e os fascículos dorso-laterais da medula espinal e terminam em neurônios internúcleares encefalinérgicos, situados no núcleo do trato espinal do trigêmeo e na substância gelatinosa do corno posterior da medula espinal. Esses neurônios inibem a sinapse entre os

neurônios de primeira e segunda ordem da via nociceptiva ascendente, através da liberação de um neurotransmissor opioide endógeno, como a encefalina (FIELDS & BASBAUM, 1977; WILLIS & WETLUND, 1997).

No mesmo sentido, foi proposto que o sistema monoaminérgico do *locus coeruleus* (LC), uma região pontina, rica em noradrenalina, localizada lateralmente ao quarto ventrículo (BERRIDGE & WATERHOUSE, 2003), também parece exercer um papel fundamental nos processos antinociceptivos. Dessa maneira, foi proposta uma via especificamente noradrenérgica de modulação da dor, pela qual os neurônios noradrenérgicos do LC modulariam a entrada do impulso nociceptivo no CDME, por meio de conexões com interneurônios encefalinérgicos (para revisão MILLAN, 2002).

Não obstante, estudos neuroanatômicos mais recentes sugerem uma conexão recíproca entre o NDR e o LC (KIM, e cols., 2004; LEE e cols., 2005), a qual poderia estar relacionada com a modulação da liberação de seus respectivos neurotransmissores. Essa hipótese corrobora estudos neurofisiológicos, por meio dos quais foi observado que a lesão específica de neurônios serotoninérgicos do NDR modula a taxa de disparos dos neurônios noradrenérgicos do LC, aumentando a liberação de noradrenalina, e sugerindo uma função inibitória dos neurônios serotoninérgicos na liberação de noradrenalina do LC (HADDJERI e cols., 1997).

As primeiras evidências, a respeito das projeções dos neurônios serotoninérgicos do NDR para o LC, foram obtidas na década de 70. Estudos neuroanatômicos mostraram conexões serotoninérgicas eferentes provenientes do NDR e direcionadas ao LC, as quais foram observadas através do método de transporte retrógrado de neurotraçador marcado com a enzima peroxidase (CEDARBAUM & AGHAJANIAN, 1978).

Outros estudos, utilizando técnicas de radioautografia, mostraram os padrões de densidade e distribuição de corpos celulares neuroniais positivos para neurônios serotoninérgicos em diferentes estruturas encefálicas, incluindo o LC, onde foi particularmente observada alta densidade dos ligantes [3H] paroxetina e de [3H] imipramina (marcadores seletivo e não seletivo,

respectivamente, para neurônios serotoninérgicos, devido à sua ligação ao transportador de serotonina) (HRDINA e cols., 1989).

Nesse mesmo sentido, estudos utilizando técnicas de radioautografia em cérebros humanos corroboraram o trabalho anterior ao identificar a distribuição de diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos das famílias 5-HT₁ e 5-HT₂, no LC (PAZOS e cols., 1987; VARNÄS e cols., 2004).

Uma abordagem eletrofisiológica do tronco encefálico sugeriu, ainda, que a conexão entre o NDR e o LC poderia estar envolvida em processos de modulação da dor. Com efeito, foi demonstrado que um estímulo nocivo, como a punção das pernas do animal, promove excitabilidade neuronal no LC. Essa excitabilidade, por sua vez, pode ser revertida pela estimulação dos neurônios do NDR. Nesse mesmo estudo, foi observado que a administração um antagonista serotoninérgico, a metisergida, no LC bloqueia o efeito inibitório local causado pela estimulação dos neurônios no NDR. Com base nessas observações, foi sugerido que os neurônios serotoninérgicos, que se projetam do NDR para o LC, poderiam estar envolvidos nos processos de modulação da dor (SEGAL, 1979).

Investigações mais recentes demonstraram, ainda, que a administração de antagonistas serotoninérgicos, como a metisergida e a cetanserina, no *locus coeruleus*, antagoniza processos antinociceptivos de outra natureza, como é o caso da analgesia pós-ictal, (FREITAS, 2010).

O processo de modulação da dor elaborado pelos neurônios serotoninérgicos que se projetam do NDR para o LC será o enfoque deste trabalho, sendo abordado em um modelo antinociceptivo induzido por comportamentos defensivos induzidos pelo bloqueio dos receptores GABA_A no hipotálamo medial (HDM e dmHVM).

O Sistema serotoninérgico e a Antinocicepção

A serotonina, inicialmente denominada enteramina, devido à sua presença nas células cromafins do trato gastrointestinal, identificada

quimicamente em 1948, e denominada 5-hidroxitriptamina, foi subsequentemente encontrada no sistema nervoso central (SNC). Esse neurotransmissor é sintetizado a partir do triptofano, o qual sofre ação da enzima triptofano-hidroxilase, convertendo-se em 5-hidroxitriptofano, sendo posteriormente descarboxilado, e originando a 5-hidroxitriptamina (5-HT) (OWENS & NEMEROFF, 1994). É predominantemente encontrada nos núcleos da rafe, produzindo sua ação farmacológica ao atuar em diferentes tipos e subtipos de receptores da família 5-HT₁ a 5-HT₇, os quais apresentam perfis farmacológicos distintos (para revisão, ver HOYER e cols., 1994).

Como descritas anteriormente, inúmeras evidências sugerem uma integração entre o sistema de defesa e os processos de modulação da dor. Assim, tem sido descrito que o sistema serotoninérgico poderia modular os processos antinociceptivos que seguem os comportamentos defensivos.

Evidências que dão suporte a essa teoria foram obtidas por Nichols e cols. (1989), com base em resultados obtidos através da administração de um antagonista serotoninérgico, a metisergida, na substância cinzenta periaqueductal, estrutura, cuja estimulação elétrica causa significativa antinocicepção (REYNOLDS, 1969). Assim, foi descrito que a administração de metisergida bloqueou o efeito antinociceptivo eliciado pela estimulação elétrica da SCP, sugerindo, assim, que a neurotransmissão serotoninérgica poderia modular os processos antinociceptivos induzidos pela estimulação de aspectos dorsais dessa estrutura mesencefálica, ao passo que em seus substratos ventrais, tanto mecanismos opioides como não opioides seriam recrutados durante a antinocicepção induzida por estimulação elétrica da SCP.

Posteriormente, um trabalho realizado por Coimbra e cols. (1992) mostrou que a microinjeção do mesmo antagonista no teto mesencefálico (TM), bloqueou a antinocicepção que segue os comportamentos defensivos de fuga induzidos pela estimulação elétrica e pelo bloqueio GABAérgico das colunas dorsais da SCP e das camadas profundas do colículo superior. Corroborando esses achados, outros estudos sugeriram, ainda, que a antinocicepção induzida pela estimulação do TM, seja em sítios mais craniais, seja em sítios mais caudais, poderia ser modulada por diversos subtipos de receptores

serotoninérgicos, incluindo o subtipo 5-HT_{2A/2C}, (COIMBRA & BRANDÃO, 1997; CASTILHO & BRANDÃO, 2001).

Em particular, o núcleo dorsal da rafe encontra-se dentre os núcleos mesencefálicos que possuem um papel relevante na integração de processos antinociceptivos através de projeções descendentes para a medula espinal (YAARI e cols., 1985). Entretanto, o envolvimento do sistema endógeno de inibição de dor nos processos antinociceptivos induzidos por estimulação do diencéfalo, como nos núcleos hipotalâmicos, ainda está pouco claro. Também não está elucidado se o recrutamento de receptores monoaminérgicos, tais como o receptor serotoninérgico da subfamília 5-HT₂, modula os processos antinociceptivos unicamente no mesencéfalo dorsal (COIMBRA e cols., 1992; COIMBRA & BRANDÃO, 1997), e se o mecanismo serotoninérgico de modulação da dor também se estende a núcleos hipotalâmicos ou para os núcleos do sistema endógeno de inibição de dor, como o LC.

Dessa forma, foi presentemente realizado um estudo neurofisiológico investigando o envolvimento das redes neurais do NDR na antinocicepção induzida pelo medo inato, através da lesão neurotóxica seletiva (com 5,7-dihidroxitriptamina) de neurônios serotoninérgicos ali localizados. Foi também investigada a participação dos receptores serotoninérgicos da via que conecta o NDR ao LC nas respostas comportamentais de defesa e na antinocicepção que segue a reação de fuga orientada induzida pelo bloqueio de receptores GABAérgicos no HM, através da microinjeção no LC dos antagonistas farmacológicos de receptores serotoninérgicos metisergida e cetanserina. Dessa maneira, pressupomos que os neurônios serotoninérgicos do NDR que se projetam para o LC poderiam modular os processos antinociceptivos subsequentes às respostas comportamentais de fuga elaborada induzidas pelo bloqueio dos receptores GABAérgicos do HM.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar o envolvimento da via serotoninérgica que conecta o NDR ao LC nas reações de defesa e nos processos antinociceptivos induzidos pelo bloqueio dos receptores GABA_A do hipotálamo medial (HM).

Objetivos específicos

✓ Estudar o efeito da lesão neurotóxica seletiva de neurônios serotoninérgicos do NDR, com 5,7-di-hidroxitriptamina, sobre o comportamento de defesa organizado pelo hipotálamo medial e sobre a antinocicepção induzida pelo medo inato.

✓ Estudar o efeito da microinjeção de metisergida (antagonista não-seletivo para receptores serotoninérgicos) ou de cetanserina (antagonista com maior afinidade para receptores 5HT_{2A/2C}), randomicamente, no LC, sobre o comportamento de defesa organizado pelo hipotálamo medial e sobre a antinocicepção induzida pelo medo inato.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados, no presente trabalho, ratos albinos (*Rattus norvegicus*, *Rodentia*, *Muridae*), de linhagem Wistar, pesando entre 220-260 g, os quais foram colocados em caixas com dois exemplares, e nelas ficaram acondicionados sob ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes ligadas às 7h). A temperatura foi mantida entre 22-23°C, sendo permitido aos animais livre acesso à comida e água, durante todo o experimento. Os experimentos foram realizados segundo os princípios éticos elaborados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (CETEA), que estão em conformidade com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (processo 130/2008).

Teste nociceptivo

Todos os ratos tiveram seus limiares nociceptivos aferidos, utilizando-se para o isso o teste de retirada de cauda. Cada animal foi colocado em uma cela de contenção com paredes de acrílico, e tiveram sua cauda colocada sobre o sensor de uma fonte de calor (*Tail-Flick Instrument*, Stoelting), cuja elevação progressiva de calorimetria foi automaticamente interrompida tão logo o animal retirasse a cauda do dispositivo. Um pequeno ajuste da intensidade de corrente foi realizado no início do experimento, com o propósito de se obterem três latências consecutivas de retirada de cauda (LRC), entre 2,5 e 3,5 s. Caso o animal não tivesse removido a cauda da fonte de calor dentro de 6 s, o dispositivo era desligado para prevenir danos teciduais.

A linha de base foi formada pela média de três LRC, tomadas em intervalos de 5 min. O limiar nociceptivo foi igualmente aferido por um período de 60min, tão logo as respostas comportamentais induzidas pelo bloqueio GABAérgico no hipotálamo chegasse ao fim.

Drogas

Foram utilizadas 5,7-di-hidroxitriptamina (Sigma®) na concentração de 1µg/0,2µL, sendo microinjetado 0,2µL por minuto no NDR, e bicuculina na concentração de 40ng/0,2µL, microinjetada a 0,2µL por 30 segundos no HM, dissolvidas em salina fisiológica (NaCl a 0,9%). Esta foi igualmente utilizada para controle das drogas injetadas.

Também foram utilizados os antagonistas farmacológicos metisergida (Sigma®) e cetanserina (Sigma®) na concentração de 5µg/0,2µL, dissolvidos em veículo (NaCl a 0,9% + Tween 80 a 20%), que foi igualmente utilizado para controle das drogas injetadas (tendo sido administrado 0,2µL por minuto) no LC. A concentração dos antagonistas foi estipulada segundo estudos prévios, à guisa de comparação (COIMBRA e cols., 1992; COIMBRA & BRANDÃO, 1997; COIMBRA e cols., 2006).

Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina na dose de 20mg/kg (Ketamina®) e xilasina na dose de 16mg/kg (Dopaser®) e levados a um aparelho estereotáxico (David Kopf, EUA), onde suas cabeças foram fixadas pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Antes da exposição da calota craniana, a pele e o tecido subcutâneo foram anestesiados com solução de lidocaína a 2% (0,2 mL, s.c.). Uma cânula-guia, confeccionada a partir de agulhas de injeção hipodérmica (diâmetro externo = 0,6mm; diâmetro interno = 0,4mm), foi implantada no diencéfalo e direcionada para o HM, segundo coordenadas AP= -2,80mm, ML= 0,5mm, DV= 7,8mm, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1997).

Outra cânula-guia independente foi implantada no tronco encefálico. No estudo neurofisiológico, a cânula-guia foi dirigida ao NDR, segundo as coordenadas AP= -7,80mm, ML= 0,0mm e DV= 5,20mm. No estudo neurofarmacológico, realizado em grupos independentes de animais, outra

cânula-guia foi dirigida ao LC, segundo coordenadas AP= -9,80mm, ML= 1,5mm e DV= 6,0mm, tendo o bregma como referência, e estando as suturas lambdóide e bregmática em um mesmo plano horizontal. Depois de implantada, a cânula-guia foi fixada na calvária por uma prótese de acrílico autopolimerizável que, por sua vez, foi ancorada por dois parafusos de fornitureira de aço inoxidável. Todas as cânulas-guias foram implantadas 1mm acima das estruturas de interesse.

Após a cirurgia, 60.000U.I. de penicilina G benzatina foram aplicados, por via intramuscular, em cada animal.

Procedimento Experimental

Estudo Neurofisiológico

Os animais (N=8) tiveram os registros dos valores da linha de base dos limiares nociceptivos aferidos. Posteriormente, foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implantação da cânula-guia direcionada ao HDM e ao NDR. Após o procedimento cirúrgico, foi realizada a microinjeção (microagulha de 14mm X 0,3mm) de 5,7-di-hidroxitriptamina (5,7-DHT) na concentração de 1µg/0,2µL ou a introdução da agulha injetora (grupo *sham*) no NDR. A administração de 5,7-DHT foi realizada com uma seringa Hamilton de 5µL com o auxílio de uma bomba de microinjeção.

Passado o período pós-operatório de cinco ou quatorze dias, os limiares nociceptivos foram novamente aferidos, com a finalidade de verificar se a microinjeção de 5,7-DHT, por si só, altera o limiar nociceptivo. Em seguida, os animais foram gentilmente envolvidos em uma flanela, e uma agulha injetora (microagulha de 16mm X 0,3mm) foi introduzida na cânula-guia direcionada ao HDM, por meio da qual 40ng/0,2µL de bicuculina ou 0,2µL de salina fisiológica (grupo controle) foram microinjetados no HDM com uma seringa Hamilton de 5µL com o auxílio de uma bomba de microinjeção.

Em seguida, os animais foram submetidos à análise quantitativa do comportamento de defesa, sendo registrado o número e a duração do alerta defensivo (interrupção do comportamento em curso, seguida de imobilidade com farejo do ar circunjascente) e da imobilidade defensiva (imobilidade perfeita com mais de 6s, com arqueamento do dorso, piloereção, exoftalmia e micção e/ou defecação). Além de latência e duração do comportamento de fuga orientada (corridas moderadas para frente, com ou sem saltos, intercaladas por intenso comportamento exploratório, e interrupções repetidas da fuga em curso) e da latência e duração de fuga retrógrada (movimentos defensivos rápidos, para trás). As respostas comportamentais de cruzamento (cruzamento com as quatro patas de uma das linhas divisórias de um dos 12 compartimentos do assoalho da arena), levantamento (apoio das patas anteriores nas amuradas da arena, ou erguimento da parte dianteira do corpo sobre as patas traseiras) e autolimpeza (movimentos sequenciais de limpeza da cabeça e pata) foram registrados através de uma câmera filmadora (Sony) de minuto a minuto, por 10 minutos.

Ao término das reações de defesa, os animais tiveram seus limiares nociceptivos aferidos segundo o protocolo do teste nociceptivo descrito anteriormente.

Após a análise experimental, os animais foram sacrificados e seus encéfalos foram retirados e processados segundo a técnica de imunofluorescência, para verificar o efeito da lesão causada pela administração de 5,7-DHT, ou histoquímica, com a finalidade de verificar se o sítio de microinjeção dos antagonistas ou seu veículo atingiram o núcleo de interesse.

Animais que não apresentaram comportamento de fuga orientada após a microinjeção de bicuculina foram descartados do experimento, considerando após a análise histológica que o sítio estimulado não coincide com as áreas visadas no presente trabalho. Contudo, tais dados foram registrados e podem ser considerados *a posteriori*, como um controle adicional.

Imunofluorescência

Os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina na dose de 20mg/Kg (Ketamina®) e xilasina na dose de 16mg/Kg (Dopaser®) e perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução de NaCl a 0,9%, em volume suficiente para retirar todo o sangue do animal, seguida de solução tamponada de paraformaldeído a 4%, em volume suficiente para fixar os tecidos encefálicos. Os encéfalos foram retirados e mantidos no fixador por no mínimo 4 horas, e posteriormente foram crioprottegidos em uma solução de sacarose a 10% e a 20% durante 12h em cada solução. Em seguida, os encéfalos foram congelados em isopentano resfriado em gelo seco. A parte rostral do encéfalo com ponto de microinjeção no HDM foi tratada pela técnica histológica descrita abaixo. A parte caudal com ponto de microinjeção localizado no NDR foi cortada com o auxílio de um criostato (Zeiss) em fatias de 16 µm de espessura. Os cortes foram montados em lâminas de vidro, gelatinizadas, secos ao ar e mantidos em solução salina tamponada no pernoite. No dia seguinte, os cortes foram lavados em solução de salina tamponada e glicina a 0,1M (30 min) e incubados com o anticorpo primário (IgG de coelho antisserotonina e IgG de camundongo anti-GFAP na proporção de 1:1000) diluídos em salina e soro bovino a 1% durante 1h. Foram realizadas seis lavagens de 5min cada, e os cortes foram incubados com anticorpo secundário (Fa,b de IgG de cabra anti-Fc de IgG de coelho marcado com AlexaFlúor 488; Fa,b de IgG de cabra anti-Fc de IgG de camundongo marcado com AlexaFlúor 594, na proporção de 1:200, cada), por 30 min, no escuro e lavados seis vezes, durante 5min por procedimento de lavagem. Utilizou-se *Fluoromount* para a montagem das lâminas. Posteriormente, os cortes histológicos foram analisados com o auxílio de microscopia de luz (Axiolmager Z1, Zeiss), utilizando filtros de excitação 44 (para AlexaFlúor 488) e 00 (para AlexaFlúor 594) em campo escuro.

Histologia

A parte rostral dos encéfalos reservados, como descrito no procedimento de imunofluorescência, foi cortada com o auxílio de um criostato (Zeiss) em fatias de 40 μ m de espessura. Os cortes foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas, secos ao ar e corados com hematoxilina-eosina. Posteriormente, os cortes histológicos foram analisados com o auxílio de microscopia de luz (fotomicroscópio AxioImager Z1, Zeiss) e a posição das extremidades finais das agulhas de microinjeção do neuroeixo foi assinalada em anagramas do atlas de Paxinos e Watson (1997). Somente animais com sinais de presença da extremidade final da agulha injetora dentro dos núcleos presentemente estudados, tais como, HDM e NDR foram incluídos na análise estatística.

Estudo neurofarmacológico

Este estudo foi realizado em grupos independentes de animais ($N=8$), os quais foram anestesiados e submetidos à cirurgia estereotáxica para a introdução de uma cânula-guia (de 13mm, fixada 1 mm acima), segundo coordenadas descritas no procedimento cirúrgico.

Após um período pós-operatório de cinco dias, os registros dos valores da linha de base dos limiares nociceptivos foram aferidos. Posteriormente, os animais foram gentilmente envolvidos em uma flanela, e receberam microinjeções (microagulha de 14mm x 0,3mm) no LC de metisergida (Sigma®), cetanserina (Sigma®) ou do veículo das soluções administradas na ponte, randomicamente, e em grupos independentes de animais. A administração dos antagonistas ou seu veículo foi realizada com o auxílio de uma seringa Hamilton de 5 μ L acoplada a uma bomba de microinjeção.

A administração de bicuculina ou salina foi feita por meio de microinjeção (microagulha de 16mm x 0,3mm) intra-hipotalâmica (HM), 5 minutos após o pré-tratamento com um dos bloqueadores farmacológicos ou de seu veículo no LC. O procedimento de microinjeção também foi realizado com o auxílio de uma seringa Hamilton de 5 μ L acoplada a uma bomba de microinjeção.

Assim, os animais foram submetidos à análise quantitativa das mesmas respostas comportamentais descritas no estudo neurofisiológico: Cruzamento (quatro patas em um dos compartimentos do assoalho da arena), levantamento (apoio das patas anteriores nas amuradas da arena) e autolimpeza (movimentos sequenciais de limpeza da cabeça e pata), bem como o número e duração do alerta defensivo (interrupção do comportamento em curso, seguida de imobilidade com farejo do ar circunjascente) e da imobilidade defensiva (imobilidade perfeita de mais de 6s, com arqueamento do dorso, piloereção, exoftalmia e micção e/ou defecação), além de latência e duração do comportamento de fuga orientada (corridas moderadas, com ou sem saltos, intercaladas por intenso comportamento exploratório, e interrupções repetidas da fuga em curso) e da latência e duração de fuga retrógrada (movimentos defensivos rápidos, para trás), o que foi registrado através de uma câmera filmadora de minuto a minuto, por 10 minutos.

Ao término das reações de defesa, os animais tiveram seus limiares nociceptivos aferidos por um período de 60 minutos, utilizando-se, para isso, o teste de retirada de cauda.

Histologia

Após a análise experimental, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina na dose de 20mg/Kg (Ketamina®) e xilasina na dose de 16mg/Kg (Dopaser®) e perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução de NaCl a 0,9%, em volume suficiente para retirar todo o sangue do animal, seguida de solução tamponada de paraformaldeído a 4%, em volume suficiente para fixar os tecidos encefálicos. Os encéfalos foram retirados e mantidos no fixador por no mínimo 4 horas, e posteriormente foram crioprotetidos em uma solução de sacarose a 10% e a 20% durante 12h em cada solução. Em seguida, os encéfalos foram congelados e cortados com o auxílio de um criostato (Zeiss) em fatias de 40 µm de espessura.

Os cortes foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas, secos ao ar e corados com hematoxilina-eosina. Posteriormente, os cortes histológicos

foram analisados com o auxílio de microscopia de luz (Axiomager Z1, Zeiss) e a posição das extremidades finais das agulhas de microinjeção do neuroeixo foi assinalada em anagramas do atlas de Paxinos e Watson (1997). Somente animais com sinais de presença da extremidade final da microagulha dentro dos núcleos presentemente estudados, tais como, HDM e LC foram incluídos na análise estatística.

Equipamentos

✓ As cirurgias estereotáxicas foram realizadas por meio de um estereotáxico ultrapreciso, desenvolvido para pequenos animais (David Kopf, 902, EEUU).

✓ As microinjeções dos fármacos foram realizadas através de uma bomba de microinjeção de drogas (*Stoelting*).

✓ A estimulação intradiencefálica foi realizada em uma arena circular (teste do “campo aberto”), de acrílico transparente, medindo 60 cm de altura x 50cm de largura, cujo assoalho é dividido em doze seções iguais.

✓ Os comportamentos de fuga orientada foram filmados de minuto a minuto por 10 min por meio de uma filmadora (*Sony Handycam*) e foram analisados por meio de um microcomputador.

✓ Os testes nociceptivos de latência retirada de cauda foram feitos através do aparelho de avaliação de dor pelo tempo de latência do reflexo de retirada de cauda (*Tail-Flick Instrument, Stoelting*).

✓ Os animais foram perfundidos, utilizando-se para isso, uma bomba de perfusão (Master Flex[®] L/S[™])

✓ A análise histológica foi feita através de um micrótomo de congelação (HM 505 E, Zeiss, Alemanha), e os resultados foram avaliados através de um fotomicroscópio de luz motorizado (Axiomager Z1, Zeiss), munido com “software” para captura e análise de imagens histológicas.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados referentes ao estudo do efeito da lesão do NDR, bem como do efeito da administração dos antagonistas no LC sobre as diversas respostas comportamentais induzidas pelo bloqueio de receptores GABA_A no hipotálamo medial foram submetidos ao teste de One-Way ANOVA, seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os limiares nociceptivos foram analisados através da análise de variância (*split-plot ANOVA*) para medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan considerando as medidas repetidas de latência de retirada de cauda.

RESULTADOS

RESULTADOS

Efeito da lesão neurotóxica seletiva de neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe na analgesia induzida pela fuga orientada

Estudo das respostas comportamentais

O bloqueio dos receptores GABAérgicos do hipotálamo dorsomedial, através da microinjeção intradiencefálica do antagonista de receptores GABA_A, a bicuculina (40ng/0,2μL), promoveu aumento significativo nos comportamentos exploratórios quando comparados com o grupo controle, Sham (intra-NDR) + Salina (0,2μL de NaCl 0,9%, intra-HM) N=8. Pôde-se observar um aumento estatisticamente significativo no número de cruzamentos ($F_{(3,32)}=6,37$; $P<0,01$), de levantamentos ($F_{(3,32)}=6,16$; $P<0,05$) e também no tempo de levantamento ($F_{(3,32)}=7,09$; $P<0,05$) em todos os grupos tratados com bicuculina (intra-HM) em comparação ao grupo controle (*Sham* (intra-NDR) + Salina (intra-HM)). A análise estatística mostrou diminuição na frequência de autolimpeza ($F_{(3,32)}=5,81$; $P<0,05$) nos grupos tratados com 5-7-DHT (intra-NDR) + Bicuculina (intra-HM) 5 e 14 dias após a lesão e no grupo *sham* (intra-NDR) + salina (intra-HM); dados representados na figura 1.

O bloqueio dos receptores GABAérgicos também promoveu comportamentos defensivos relacionados ao medo e ansiedade, caracterizados pelo alerta defensivo, congelamento, e comportamentos de fuga. A análise de *post hoc* de Newman-Keuls mostrou aumento no número ($F_{(3,32)} =17,55$; $P<0,001$) e tempo ($F_{(3,32)}=6,51$; $P<0,01$) de alerta defensivo nos grupos tratados com bicuculina quando comparados com o grupo tratado com salina (intra-HM). O pré-tratamento do NDR com neurotoxina específica para neurônios serotoninérgicos, a 5,7-di-hidroxitriptamina (5,7-DHT), diminuiu as respostas comportamentais induzidas pela administração de bicuculina 5 e 14 dias após a lesão (N=8), quando comparados com o grupo *Sham* (intra-NDR) + Bicuculina (intra-HM), N=12. A análise de variância mostrou uma diminuição da frequência ($F_{(3,32)} =17,55$; $P<0,05$) do alerta, quando comparados com o grupo *Sham* (intra-NDR) + Bicuculina (intra-HM). A análise de variância de uma via (*one-*

way ANOVA) mostrou aumento no número ($F_{(3,32)} = 3,84$; $P < 0,05$) e tempo ($F_{(3,32)} = 3,40$; $P < 0,01$) de congelamento no grupo submetido ao procedimento *Sham* (intra-NDR) + Bicuculina (intra-HM) em comparação com o grupo *Sham* (intra-NDR) + Salina (intra-HM); dados apresentados na figura 2.

Houve aumento estatisticamente significativo na frequência ($F_{(3,32)} = 5,05$; $P < 0,01$) e no tempo ($F_{(3,32)} = 2,88$; $P < 0,05$) de fuga induzida pelo grupo *Sham* (intra-NDR) + Bicuculina (intra-HM) quando comparado com o grupo *Sham* (intra-NDR) + Salina (intra-HM), e diminuição na frequência da fuga induzida pelo grupo tratado com 5,7-DHT + Bicuculina (intra-HM 14 dias após a lesão) comparado com o grupo *Sham* (intra-NDR) + Bicuculina (intra-HM). Também houve aumento na frequência ($F_{(3,32)} = 6,91$; $P < 0,05$) de fuga retrógrada (fuga para trás) nos grupos *Sham* (NDR) + Bicuculina (intra-HM) e 5-7-DHT (intra-NDR) + Bicuculina (intra-HM 5 dias após a lesão) em comparação com o grupo tratado com salina (intra-HM) e ainda aumento no tempo ($F_{(3,32)} = 2,88$; $P < 0,05$) de fuga retrógrada induzida pelo grupo submetido ao procedimento *Sham* (intra-NDR) + Bicuculina (intra-HM) em comparação com o grupo *Sham* (intra-NDR) + Salina (intra-HM). O tratamento com 5,7-DHT + Bicuculina (intra-HM 14 dias após a lesão) diminuiu a frequência ($F_{(3,32)} = 6,91$; $P < 0,05$) da fuga retrógrada em comparação com os grupos *Sham* (NDR) + Bicuculina (intra-HM) e 5-7-DHT (intra-NDR) + Bicuculina (intra-HM 5 dias após a lesão); dados mostrados na figura 3.

Não houve diferença estatisticamente significativa nas reações de defesa induzida pela administração de bicuculina 5 dias após o procedimento *sham*, quando comparados com a administração de bicuculina 14 dias após o procedimento *sham* (teste t pareado $t =$ variando de 0,244 à 1,519; $p > 0,05$ em todos os casos, de acordo com o teste t de Student); dados apresentados em anexo ao presente trabalho.

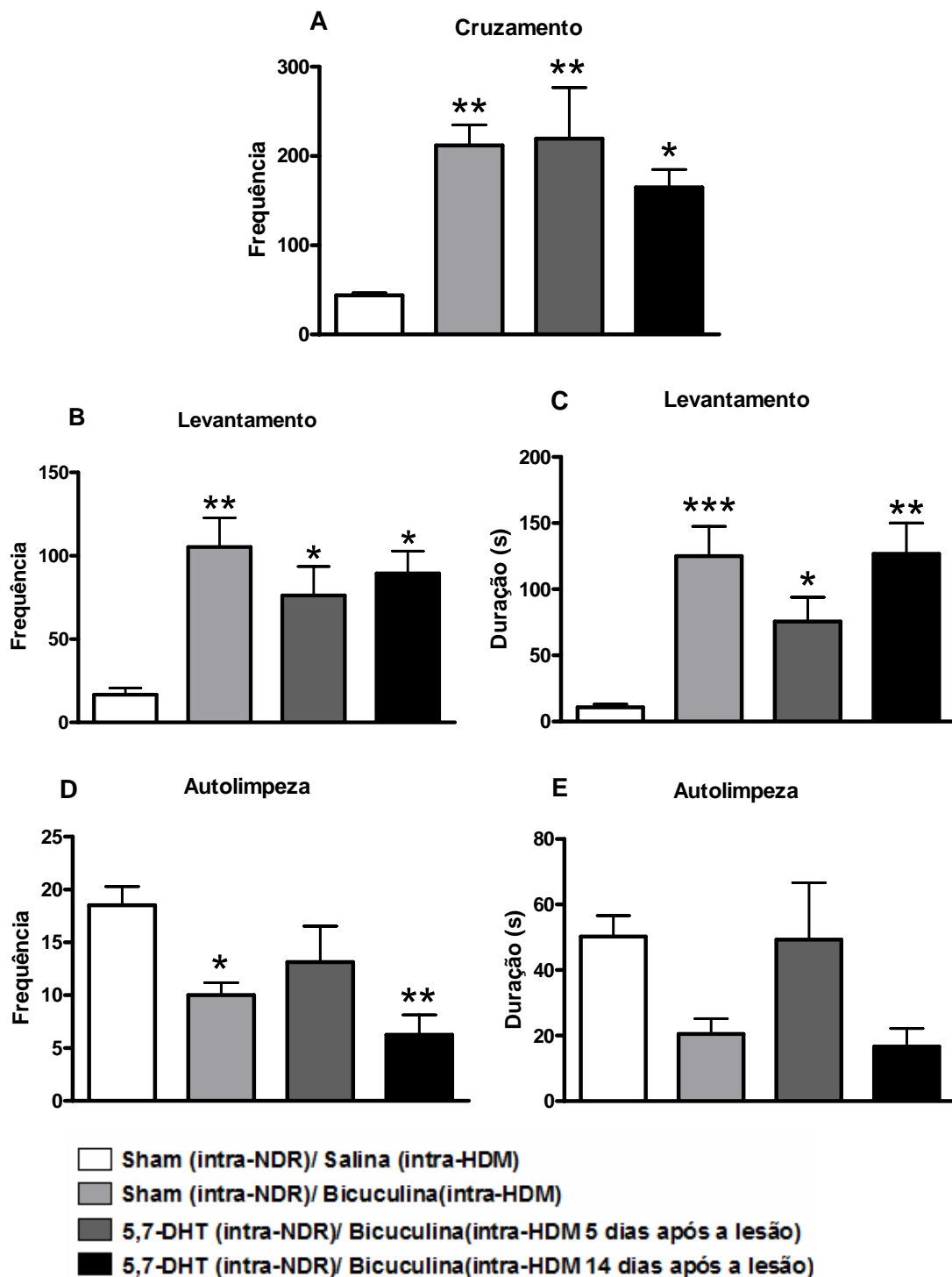


Figura 1: Efeito da administração de bicuculina no hipotálamo medial (HM), em animais lesados no núcleo dorsal da rafe (NDR) com 5,7-di-hidroxitriptamina (5,7,-DHT) sobre os comportamentos de cruzamento (A), frequência (B e D) e tempo (C e E) de levantamento e autolimpeza, respectivamente. As colunas representam a média, e as barras, o erro padrão da média. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ quando comparados com o grupo controle (Sham intra-NDR + Salina intra-HM), segundo a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida, pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

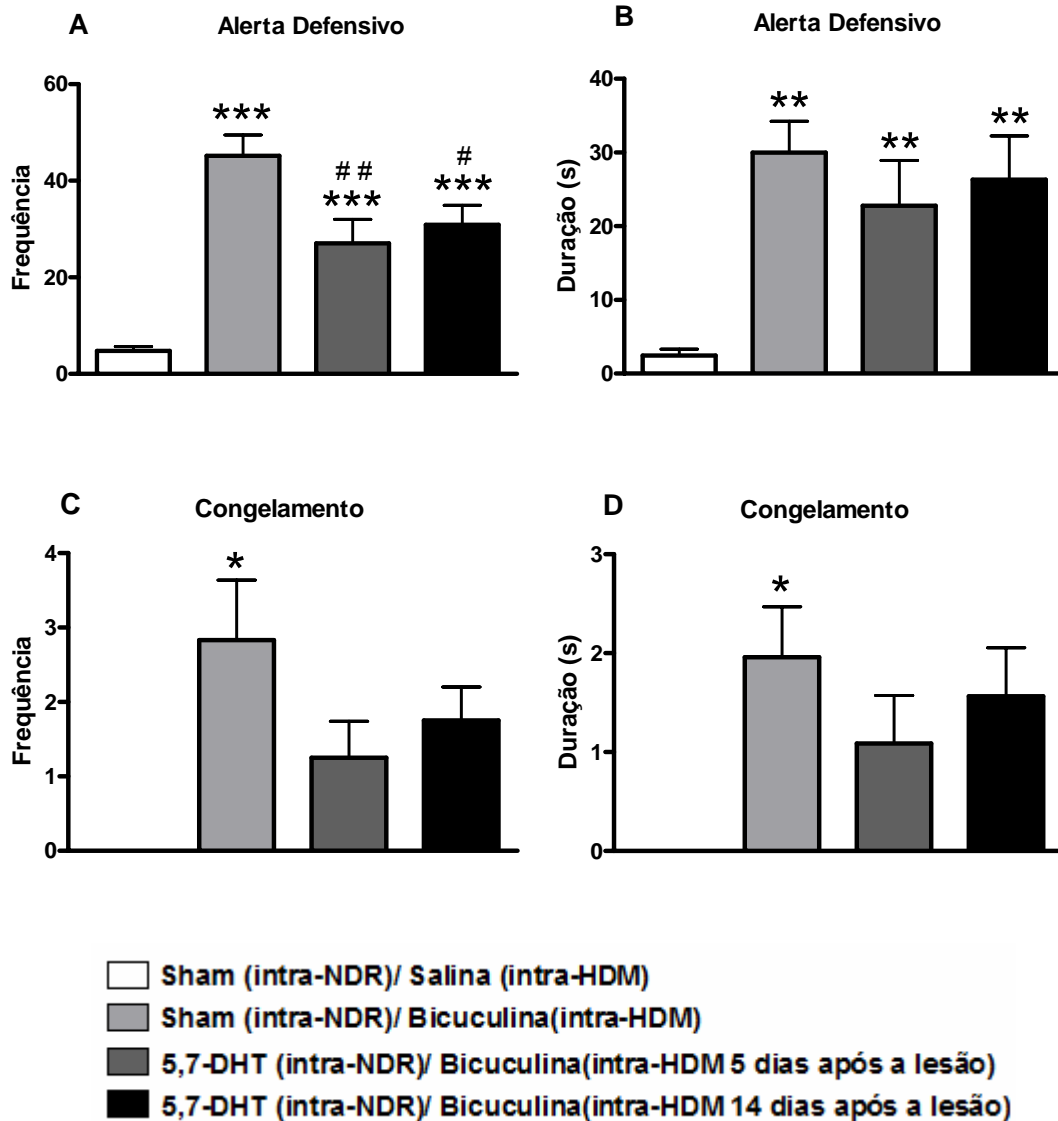


Figura 2: Efeito da lesão neurotóxica do núcleo dorsal da rafe (NDR), com 5-7-di-hidroxitriptamina (5,7-DHT) ou do procedimento *Sham* seguido pela microinjeção de bicuculina no HM em 5 ou 14 dias após a lesão ou *sham*, na frequência (A e C) e no tempo (B e D) dos comportamentos defensivos de alerta e congelamento, respectivamente. As colunas representam a média \pm EPM. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, quando comparado com o grupo controle *Sham* + Salina, segundo a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida, pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ quando comparados com o grupo *Sham* + Bicuculina.

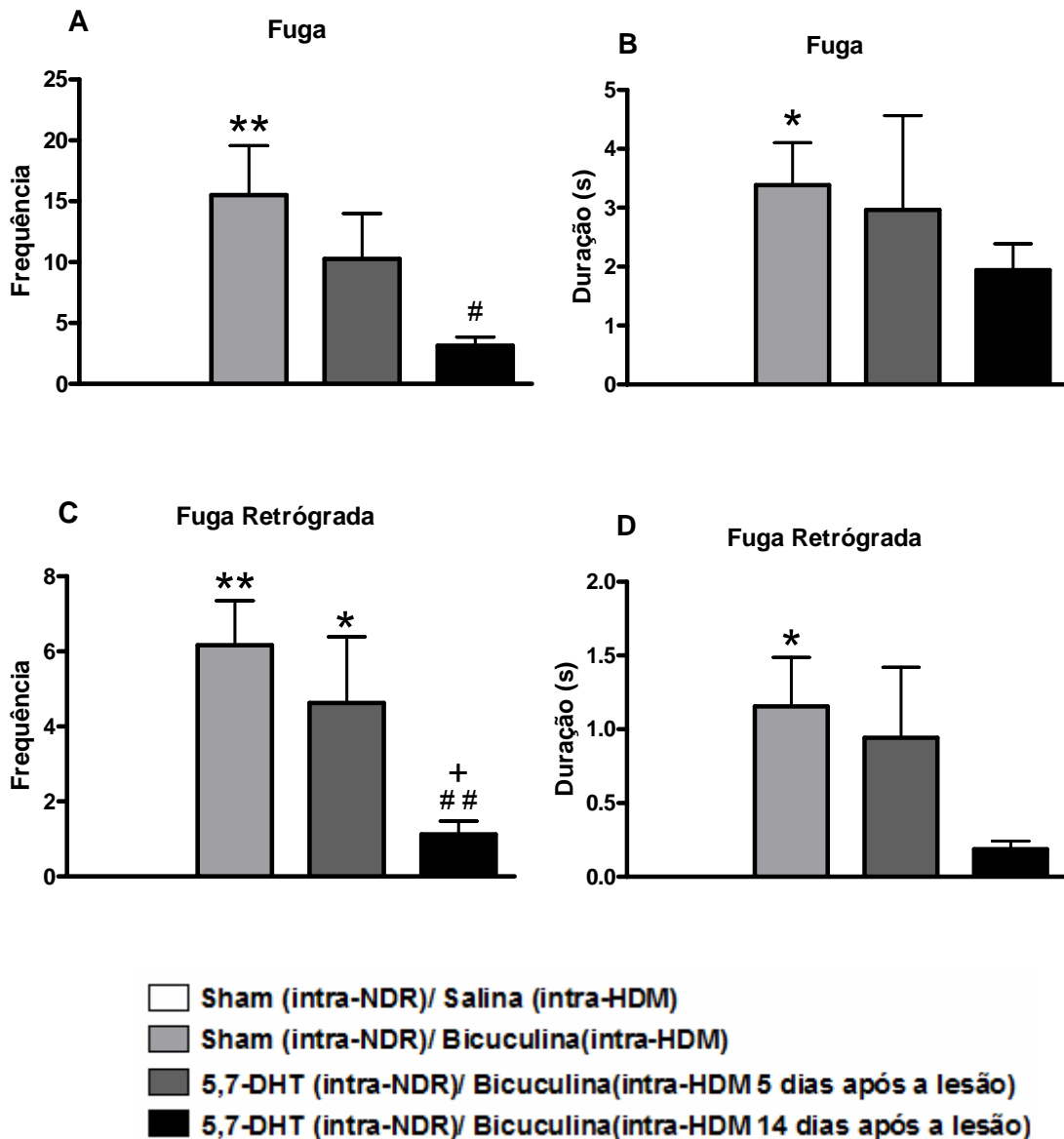


Figura 3: Efeito do pré-tratamento do núcleo dorsal da rafe (NDR) com neurotoxina específica para neurônios serotoninérgicos 5,7-di-hidroxitriptamina (5,7-DHT) ou o procedimento *Sham*, seguido pela microinjeção de bicuculina ou salina no hipotálamo medial (HM) 5 ou 14 dias após a lesão ou *sham*, na frequência (A e C) e no tempo (B e D) dos comportamentos defensivos de fuga e fuga retrógrada, respectivamente. As colunas representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; quando comparados com o grupo controle (*Sham* + Salina); # $P < 0,05$; # # $P < 0,01$ quando comparado com o grupo *Sham* + Bicuculina; + $P < 0,05$ quando comparado com o grupo 5,7-DHT + Bicuculina 5 dias após a lesão, segundo a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida, pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

Estudo do Limiar Nociceptivo

Houve um efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F_{(3,32)}=22,54$; $P<0,001$], do tempo [$F_{(10,23)} = 5,31$; $P>0,001$] e interação entre tratamento *versus* tempo [$F_{(30,65)} = 4,01$; $P>0,001$].

Os comportamentos defensivos induzidos pela administração de bicuculina induziram elevação dos limiares nociceptivos no grupo *Sham* (intra-NDR) + Bicuculina (intra-HM) N=12, perdurando por 20 minutos. Muito embora o grupo tratado com 5,7-DHT (intra-NDR) + Bicuculina (intra-HM 5 dias após a lesão) N=8, tenha apresentado alguma analgesia induzida pelo medo inato imediatamente após o término do comportamento de fuga (tempo zero), quando comparado com o grupo controle (*Sham* intra-NDR + Salina intra-HM) N=8, a análise de *post hoc* de Duncan mostrou que os dois grupos pré-tratados no NDR com a neurotoxina seletiva para neurônios serotoninérgicos (5,7-DHT) apresentaram diminuição da elevação dos limiares nociceptivos causada pelo medo inato, quando comparado com o grupo *Sham* (intra-NDR) + Bicuculina (intra-HM). Também houve diminuição estatisticamente significativa da antinocicepção induzida pelo medo no grupo tratado com 5,7-DHT (intra-NDR) + Bicuculina (intra-HM 14 dias após a lesão) N=8, quando comparado o grupo tratado com 5,7-DHT (intra-NDR) + Bicuculina (intra-HM 5 dias após a lesão) no tempo 0 (zero). A análise de variância de medidas repetidas mostrou efeito significativo do tratamento sobre o limiar nociceptivo, de 0 até 20min [$F_{(3,32)} =$ variando de 12,91 até 24,40; $P<0,001$], como demonstrado na figura 8.

Não houve diferença estatisticamente significativa nos limiares nociceptivos pela administração de bicuculina 5 dias após o procedimento *sham*, quando comparados com a administração de bicuculina 14 dias após o procedimento *sham* (teste *t* pareado de Student, $t= 0,41$; $P>0,05$); dados apresentados em anexo.

Uma representação esquemática dos sítios de microinjeção de salina ou bicuculina no HM é ilustrada na figura 5.

Uma fotomicrografia representativa de um sítio de microinjeção da bicuculina a 40ng/0,2 μ L intra-HM é demonstrada na Figura 6.

O sítio de microinjeção de 5,7-DHT ou do procedimento *sham* é representado esquematicamente na figura 7.

A técnica de imunofluorescência, uma análise qualitativa, evidenciou diminuição de corpos celulares positivos para a serotonina em animais lesados no NDR e aumento de células positivas para GFAP, demonstrando a rarefação dos neurônios serotoninérgicos e a gliose causada pelo tratamento do NDR com 5,7-DHT (Figura 8).

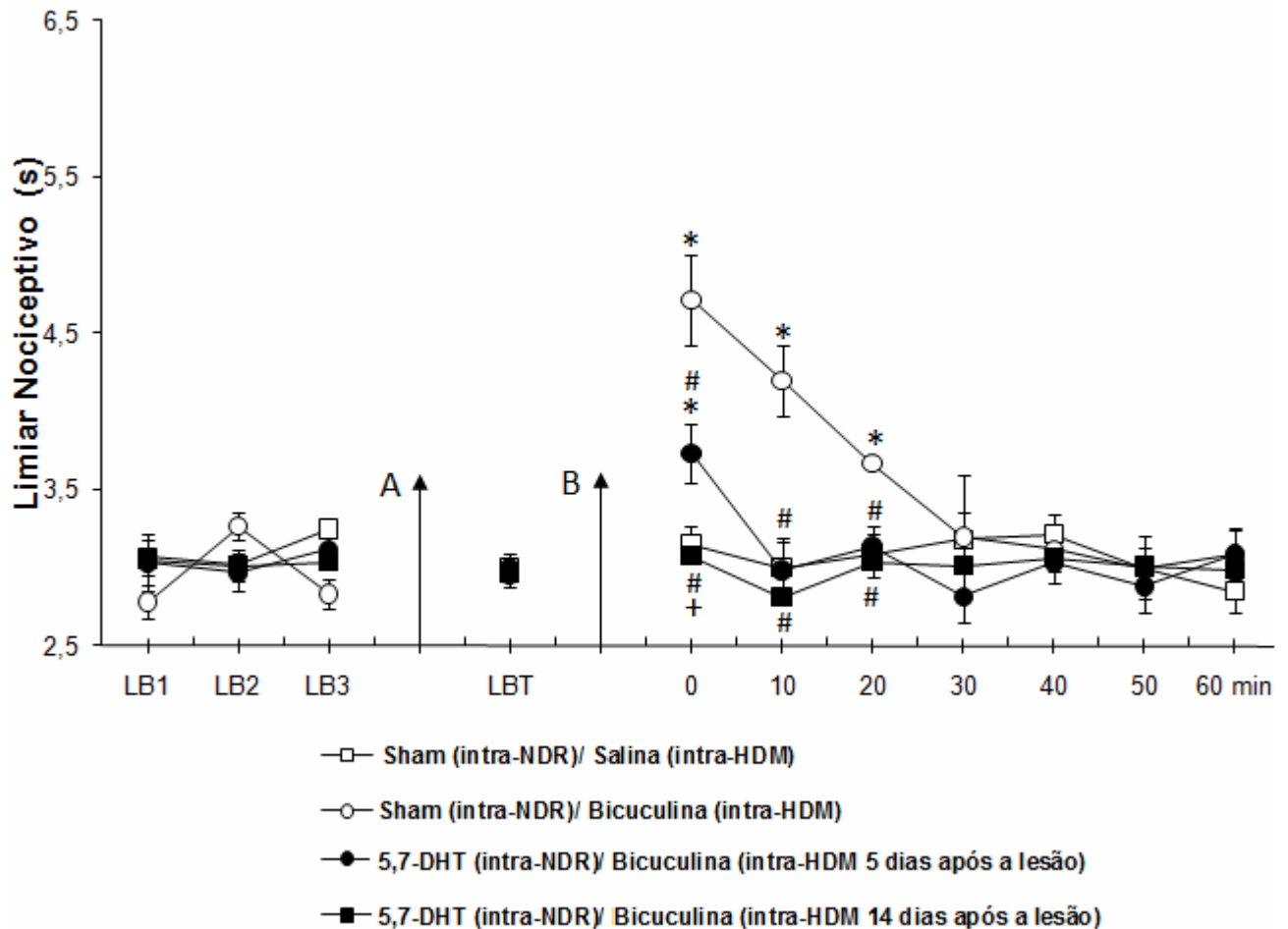


Figura 4: Efeito da lesão neuroquímica, com microinjeções de 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT) no núcleo dorsal da rafe (NDR) sobre o limiar nociceptivo, N=8 ou 12. * $P < 0,001$ quando comparado com o grupo submetido ao procedimento *Sham* no NDR + Salina no HM; # diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo *Sham* (intra-NDR) + Bicuculina (intra-HM); + $p < 0,001$ quando comparado com o grupo tratado com 5,7-DHT (intra-NDR) + Bicuculina (intra-HM 5 dias após a lesão), de acordo com a análise de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. LB: Linha de base, medida antes do procedimento cirúrgico. LBT: Linha de base verificada antes do procedimento experimental. A: indica a administração da neurotoxina no NDR (lesão) ou procedimento *sham*. B: Administração de bicuculina ou salina intra-HM. Aumentos nos limiares nociceptivos foram representados como médias \pm EPM.

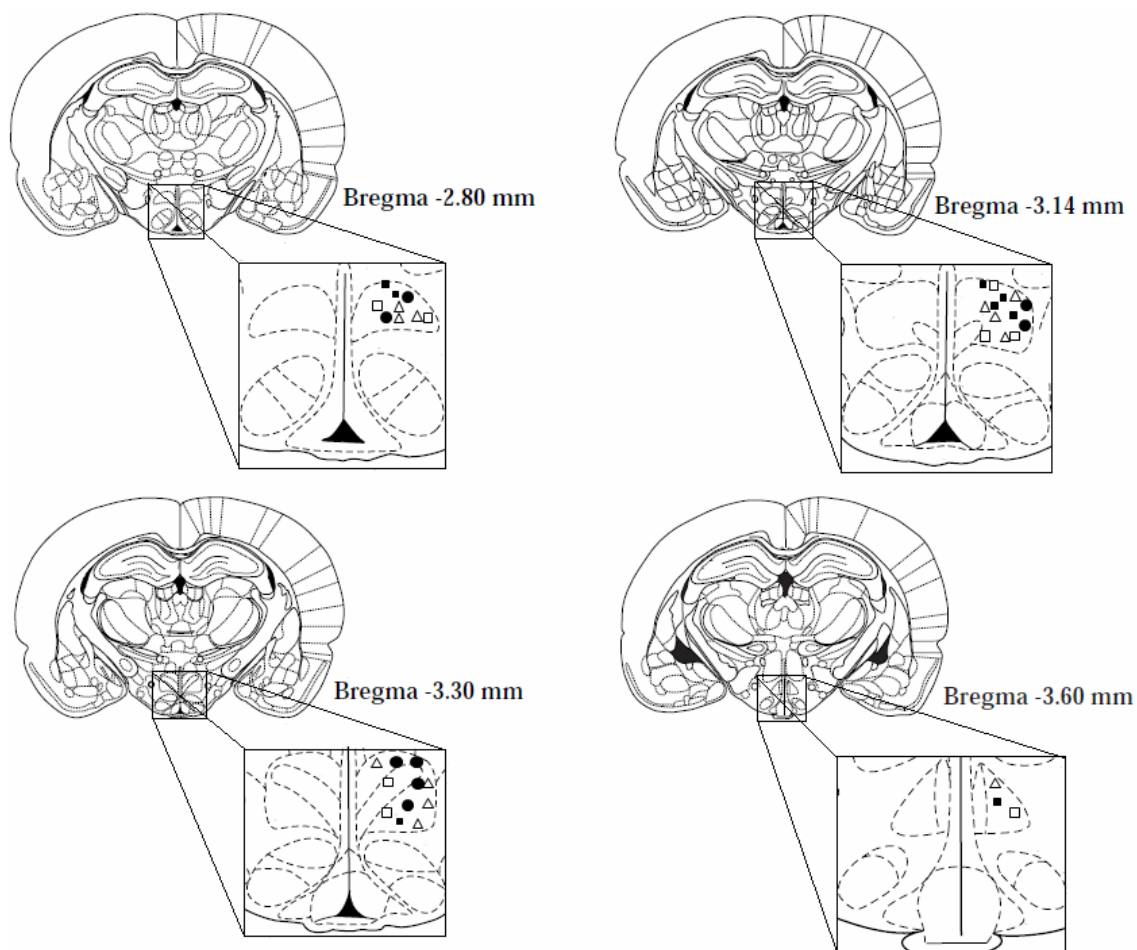


Figura 5: Representação esquemática dos sítios de microinjeção de salina ou bicuculina no HM: (□-□) grupo controle submetido ao procedimento *sham* intra-NDR + salina intra-HM; (■-■) grupo tratado com 5,7-DHT intra-NDR 5 dias antes da administração de bicuculina no HM; (●-●) grupo tratado com 5,7-DHT intra-NDR 14 dias antes da administração de bicuculina no HM ; (Δ-Δ) grupo submetido ao procedimento *Sham* (intra-NDR), 5 ou 14 dias antes da microinjeção de bicuculina no HM, dispostos em anagramas do atlas de Paxinos e Watson (1997). NDR: Núcleo dorsal da rafe; HM: hipotálamo medial; *SHAM*: procedimento de pseudo-injeção no NDR; 5,7-DHT: 5,7-dihidroxitriptamina.

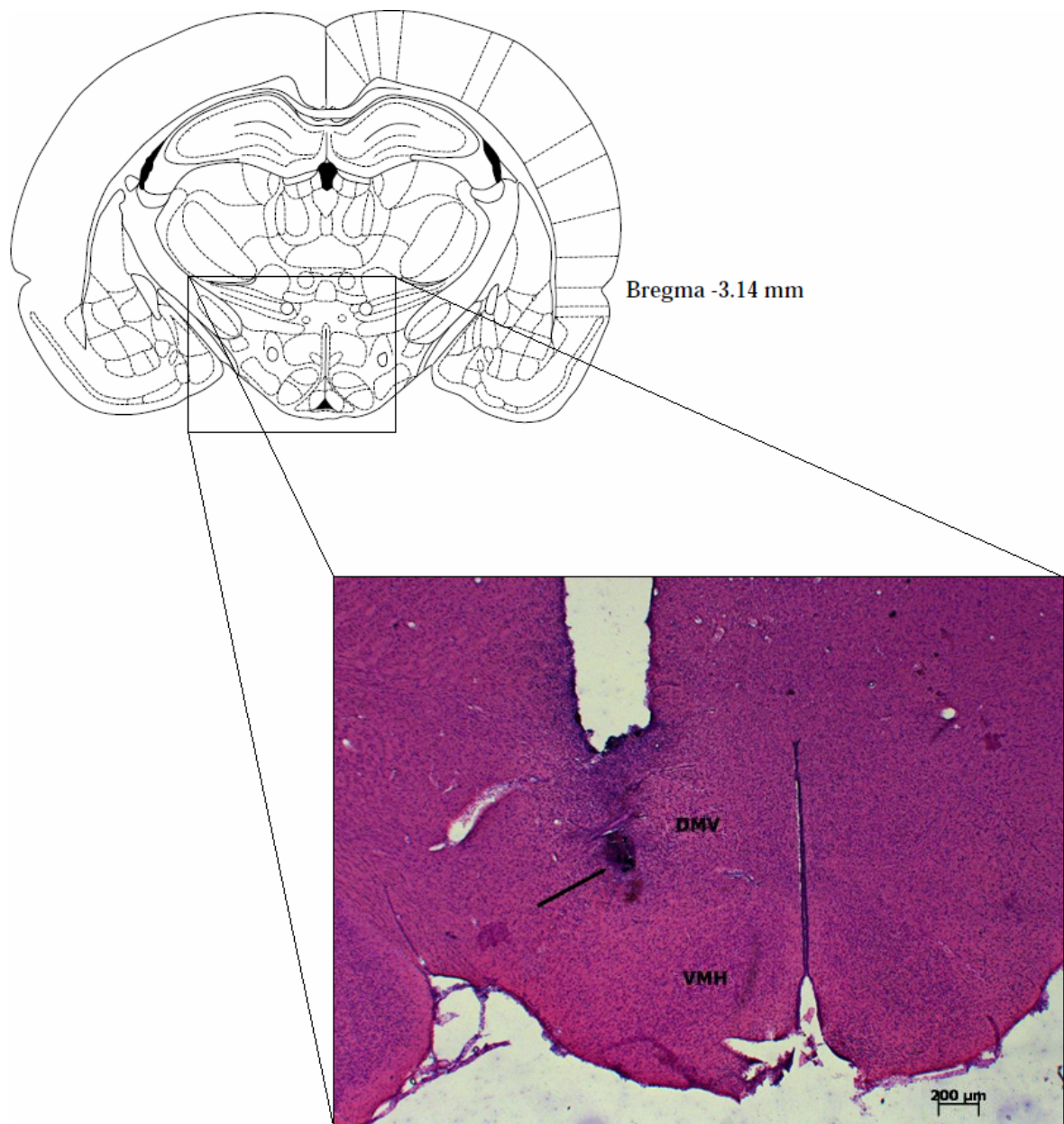


Figura 6: Fotomicrografia de secção coronal do diencefalo em nível do hipotálamo medial. A seta indica o ponto de microinjeção de Bicuculina a 40ng/0,2 μ L no hipotálamo dorsomedial. DMD: Hipotálamo dorsomedial. VMH: Hipotálamo ventromedial. Coloração: Hematoxilina-eosina. Barra: 200 μ m.

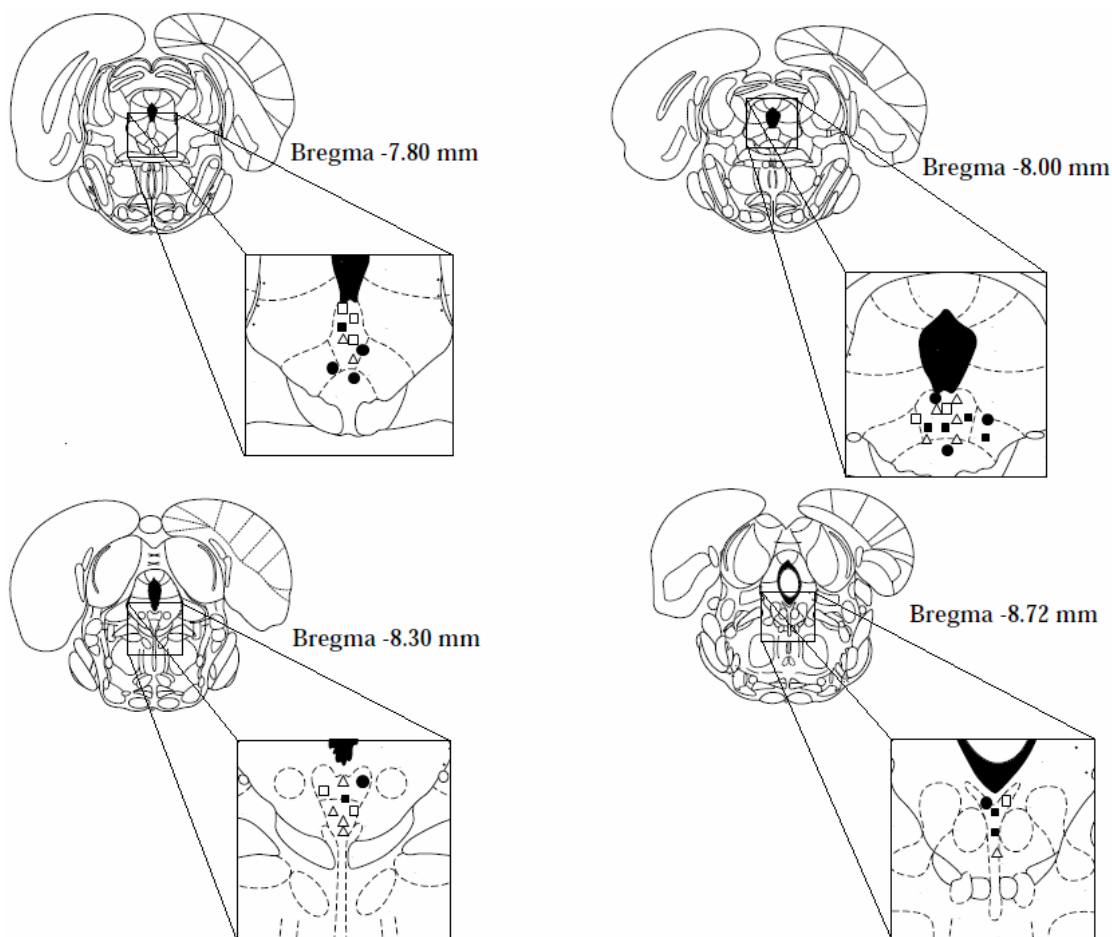


Figura 7: Representação esquemática de sítios de microinjeção de (■-■) 5,7-dihidroxitriptamina (1 μ g/0,2 μ L intra-NDR) + Bicuculina (40ng/0,2 μ L intra-HM 5 dias após a lesão) e (●-●) 5,7-DHT intra-NDR + Bicuculina (40ng/0,2 μ L intra-HM 14 dias após a lesão) ou (Δ - Δ) *Sham* (intra-NDR) + Bicuculina (40ng/0,2 μ L intra-HM) e (\square - \square) procedimento *Sham* (intra-NDR) + Salina (NaCl a 0.9%-0.2 μ L, intra-HM) em anagramas do atlas de Paxinos e Watson (1997). NDR: Núcleo dorsal da rafe; HM: hipotálamo medial; *SHAM*: procedimento de pseudo-injeção no NDR.

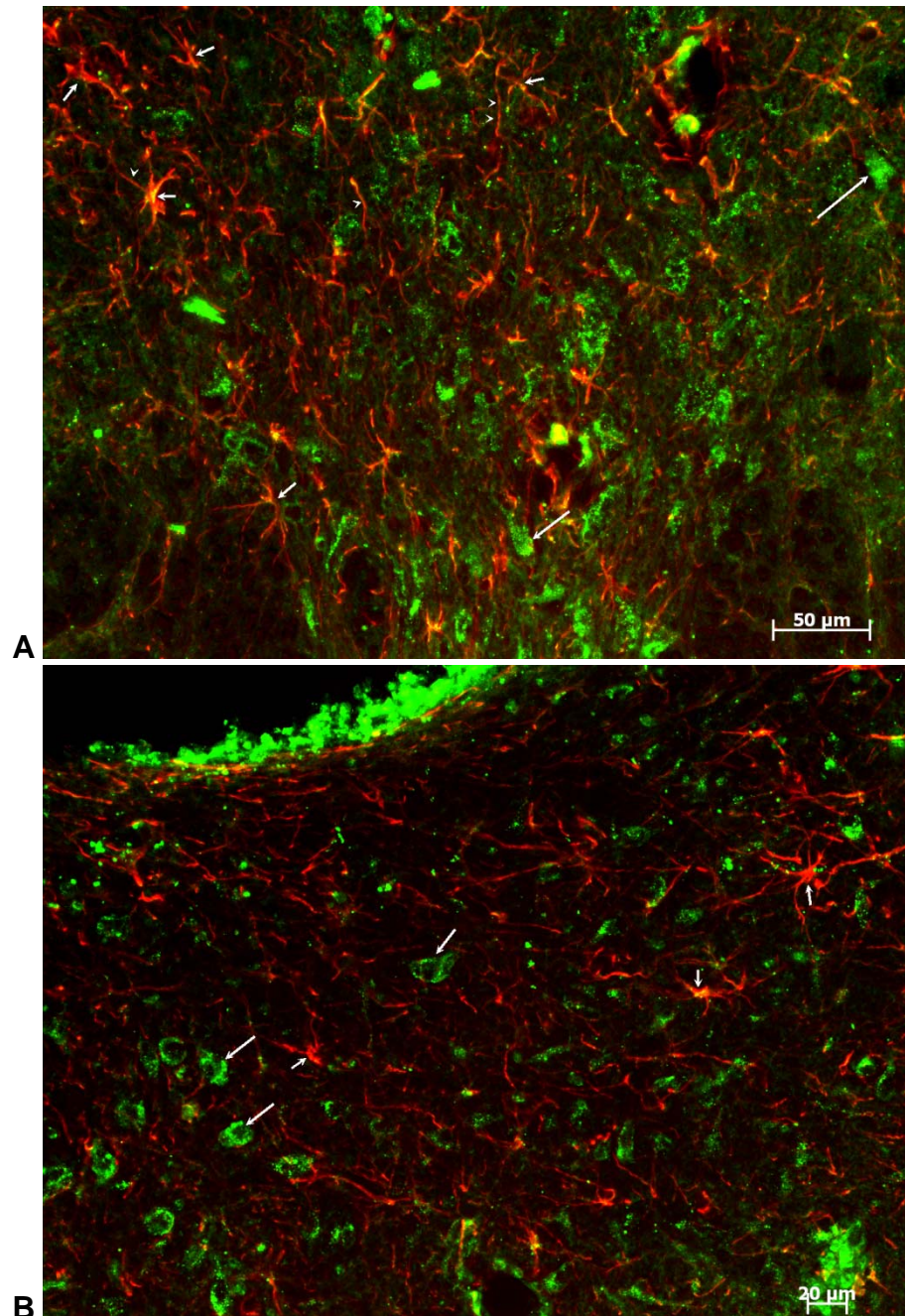


Figura 8: Fotomicrografias de secções coronais do mesencéfalo em nível do núcleo dorsal da rafe. A: Procedimento *Sham* (introdução da agulha injetora no núcleo dorsal da rafe). B: Lesão resultante da microinjeção de -5,7-dihidroxitriptamina (1 μ g/0,2 μ L) no núcleo dorsal da rafe. Setas grandes indicam neurônios positivos para serotonina. As setas pequenas indicam células gliais. Marcação celular: AlexaFlúor 488 (coloração verde) e AlexaFlúor 594 (coloração vermelha). Barra: 50 μ m na figura A e 20 μ m na figura B.

Estudo neurofarmacológico do envolvimento do sistema serotoninérgico na analgesia induzida pela fuga orientada

Estudo das respostas comportamentais

A microinjeção do antagonista de receptores GABA_A, a bicuculina, na concentração de 40ng/0,2μL no hipotálamo medial, promoveu aumento significativo nos comportamentos exploratórios e defensivos quando comparados com o grupo controle (veículo intra-LC + Salina Fisiológica intra-HM). A análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*) mostrou um aumento estatisticamente significativo no número ($F_{(3,28)}=8,38$; $P<0,05$) de cruzamentos, e na frequência ($F_{(3,28)}=13,92$; $P<0,001$) e no tempo ($F_{(3,28)}=13,13$; $P<0,001$) de levantamento nos grupos tratados com bicuculina intra-HM e com antagonistas farmacológicos (metisergida e cetanserina) ou seu veículo intra-LC, randomicamente, quando comparados com o grupo controle. Houve diminuição na frequência ($F_{(3,28)}=5,73$; $P<0,05$) e no tempo ($F_{(3,28)}=4,88$; $P<0,05$) de autolimpeza entre os grupos tratados com cetanserina ou veículo intra-LC e o grupo controle; dados mostrados na figura 9.

A análise de “*post hoc*” de Newman-Keuls mostrou aumento no número ($F_{(3,28)}=7,29$; $P<0,01$) e no tempo ($F_{(3,28)}=5,15$; $P<0,05$) de alerta defensivo, sem variação no comportamento de congelamento ($P>0,05$) em comparação com todos os grupos tratados com bicuculina intra-HM e o grupo controle, como mostrado na 10.

A análise estatística mostrou, também, aumento na frequência ($F_{(3,28)}=5,73$; $P<0,05$) e no tempo ($F_{(3,28)}=5,73$; $P<0,05$) de fuga dos todos os grupos tratados com bicuculina, quando comparados com o grupo controle, e aumento no número ($F_{(3,28)}=5,73$; $P<0,05$) e no tempo ($F_{(3,28)}=5,73$; $P<0,05$) do comportamento de fuga retrógrada nos grupos pré-tratados no LC com metisergida ou seu veículo em comparação com o grupo controle, como mostrado na figura 11.

Porém, não houve alterações estatisticamente significativas ($F_{(3,28)}$ = variando de 5,15 a 13,92; $P>0,05$) do tratamento do LC com antagonistas serotoninérgicos nas respostas comportamentais induzidas pela administração de bicuculina no HM, quando comparado com o controle.

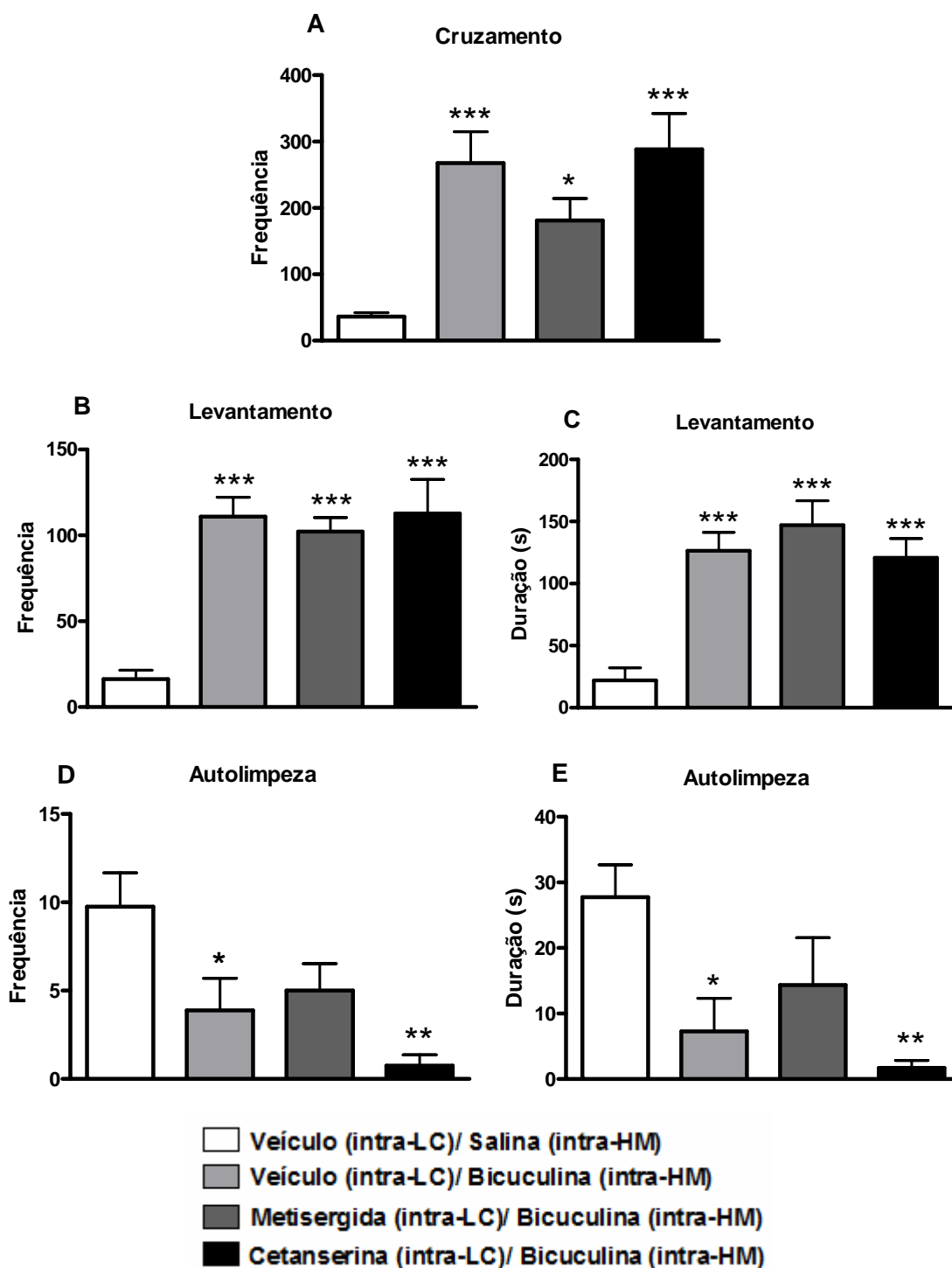


Figura 9: Efeito da microinjeção de metisergida, cetanserina ou veículo no locus coeruleus (LC), seguida pela microinjeção de bicuculina ou salina no hipotálamo medial (HM), sobre os comportamentos exploratórios de cruzamento (A), e levantamento (B e C), e sobre a frequência (D) e tempo (E) de autolimpeza (N=8). As colunas representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ quando comparado com os controles, segundo a análise de variância de uma via (one-way ANOVA), seguida pelo teste post hoc de Newman-keuls.

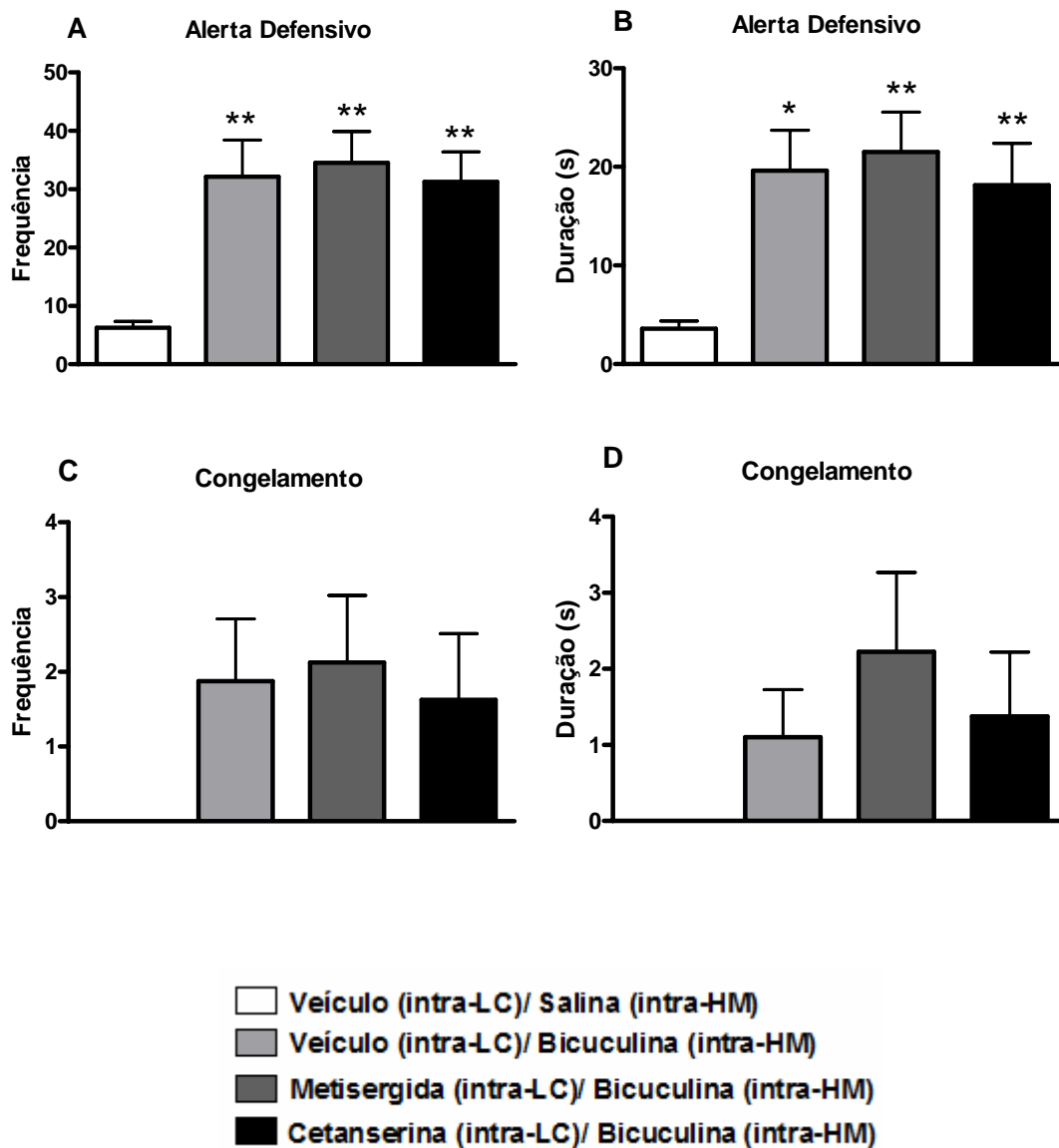


Figura 10: Efeito da microinjeção de metisergida, cetanserina ou veículo no *locus coeruleus* (LC), seguida pela microinjeção de bicuculina no hipotálamo medial (HM), na frequência (A e C) e no tempo (B e D) dos comportamentos defensivos de alerta e congelamento, respectivamente. (N=8); * P<0,05; ** P<0,01; quando comparados com o grupo controle, segundo a análise de variância de uma via (one-way ANOVA), seguida pelo teste *post hoc* de Newman-keuls. As colunas representam a média \pm EPM.

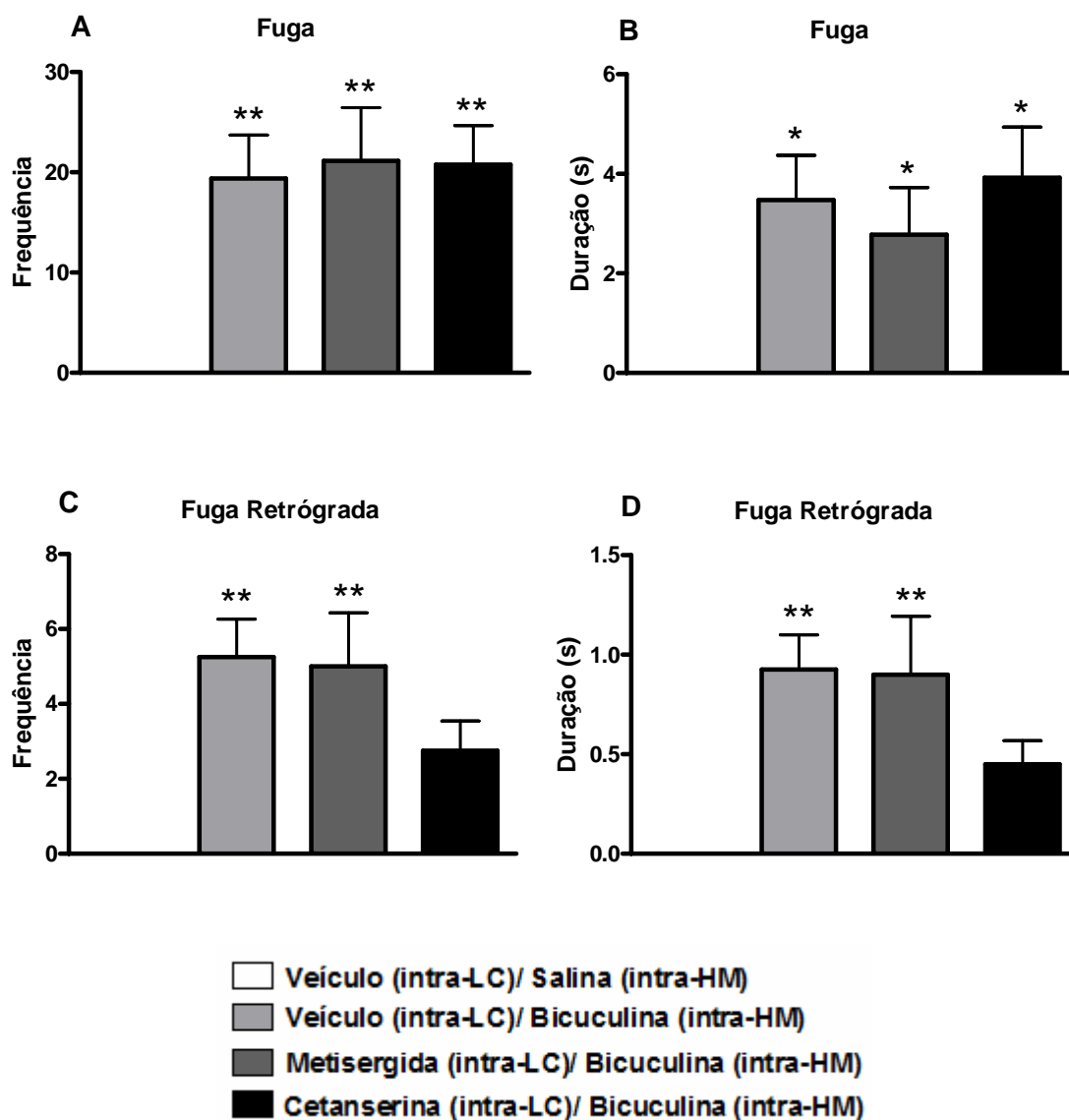


Figura 11: Efeito da microinjeção de metisergida, cetanserina ou veículo no *locus coeruleus* (LC), seguida pela microinjeção de bicuculina ou salina no hipotálamo medial (HM), na frequência (A e C) e no tempo (B e D) dos comportamentos defensivos de fuga e fuga retrógrada, respectivamente. (N=8). As colunas representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, quando comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância de uma via (one-way ANOVA), seguida pelo teste *post hoc* de Newman-keuls.

Estudo do limiar nociceptivo

Houve um efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F_{(2,28)}=25,17$; $P<0,001$], interação do tratamento *versus* tempo [$F_{(50,33)}=2,35$; $P<0,01$] e do tempo [$F_{(18,11)}=11,86$; $P>0,001$].

Os resultados presentemente obtidos sugerem a participação dos receptores serotoninérgicos, especificamente do subtipo de receptores 5-HT_{2A/2C} na analgesia induzida pelos comportamentos defensivos observados após o bloqueio dos receptores GABAérgicos do hipotálamo medial. A análise de variância de medidas repetidas mostrou efeito significativo do tratamento sobre o limiar nociceptivo, de 0 até 30min [$F_{(3,28)}$ variando de 5,66 até 27,43; $P<0,05$].

A análise de variância para medidas repetidas (*split-plot ANOVA*) mostrou que o bloqueio de receptores GABAérgicos no hipotálamo medial, através da administração de bicuculina (40ng/0,2 μ L) nos núcleos mediais do hipotálamo aumentou os limiares nociceptivos, quando comparado com o grupo controle (veículo das soluções intra-LC + salina fisiológica intra-HM). O pré-tratamento da ponte com administrações de metisergida (antagonista serotoninérgico não-seletivo) intra-LC diminuiu a analgesia induzida pelo medo imediatamente após o término dos comportamentos defensivos, sendo este antagonismo mais expressivo que o pré-tratamento do LC com cetanserina (droga com maior afinidade pelos receptores 5-HT_{2A/2C}), o qual também promoveu diminuição da antinocicepção induzida pelo medo em 5, 15 e 20 minutos após o fim dos comportamentos de defesa, quando comparado com seu veículo (0,2 μ L de NaCl 0,9% + Tween 80 a 20% intra-LC + Salina NaCl 0,9%/0,2 μ L), como representado na figura 12.

Uma fotomicrografia representativa de um sítio de microinjeção da bicuculina (intra-HM) é mostrada na figura 13, e uma fotomicrografia representativa de um sítio de microinjeção da bicuculina a 40ng/0,2 μ L intra-HM é mostrada na Figura 14.

Microinjeções de antagonistas de receptores serotoninérgicos metisergida e cetanserina ou seu veículo são representadas esquematicamente na figura 15, e outra fotomicrografia de um sítio de microinjeção de metisergida (intra-LC) é representada na figura 16.

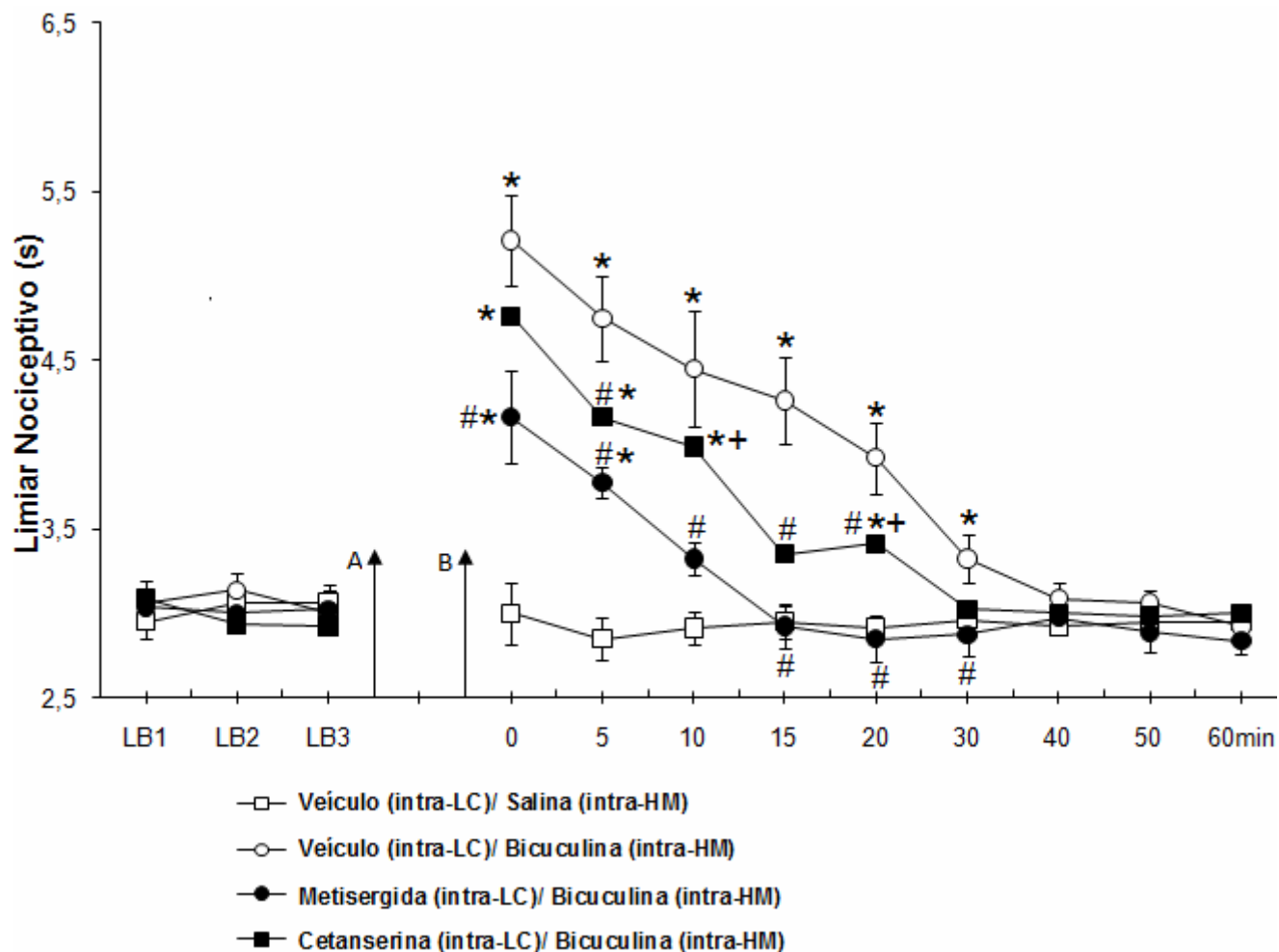


Figura 12: Efeito da microinjeção de metisergida, cetanserina ou veículo das soluções no *locus coeruleus* (LC), seguida pela microinjeção de bicuculina ou salina no hipotálamo medial (HM) nos limiares nociceptivos. N=8; * diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) quando comparado com o grupo Veículo das soluções no LC + Salina no HM; # $P < 0,05$ quando comparado com o grupo Veículo no LC + Bicuculina no HM; + $P < 0,001$ quando comparado com o grupo tratado com metisergida no LC + bicuculina no HM, segundo a análise de variância de mediadas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. LB: Linha de base, medida antes do procedimento experimental. As setas indicam a administração dos antagonistas serotoninérgicos ou de seu veículo no LC (A) e de bicuculina ou salina no HM (B). Eixo x: tempo (em minutos) em que medidas consecutivas da latência de retirada de cauda foram tomadas. Eixo y: Limiar Nociceptivo (aferido em segundos) medido pelo teste de latência de retirada da cauda. Aumentos nos limiares nociceptivos foram representados como médias \pm EPM.

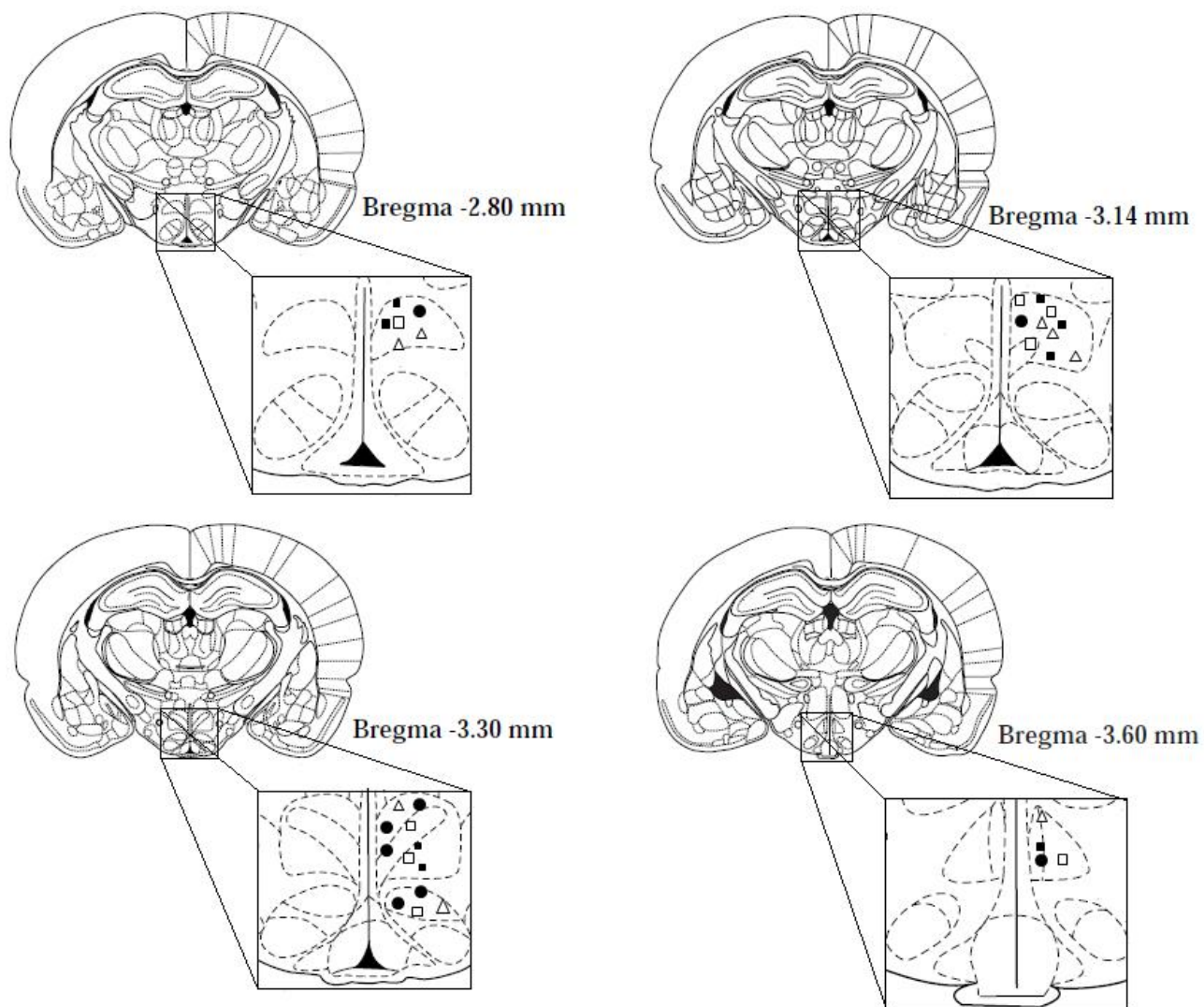


Figura 13: Representação esquemática dos sítios de microinjeção de bicuculina ou salina no HM: (□-□) grupo controle, tratado com administração de veículo intra-LC + salina intra-HM; e os grupos pré-tratados com (■-■) metisergida (●-●) cetanserina ou (Δ-Δ) com o veículo das soluções no LC, e bicuculina no HM, dispostos em anagramas do atlas de Paxinos e Watson (1997). LC: *locus coeruleus*; HM: hipotálamo medial.

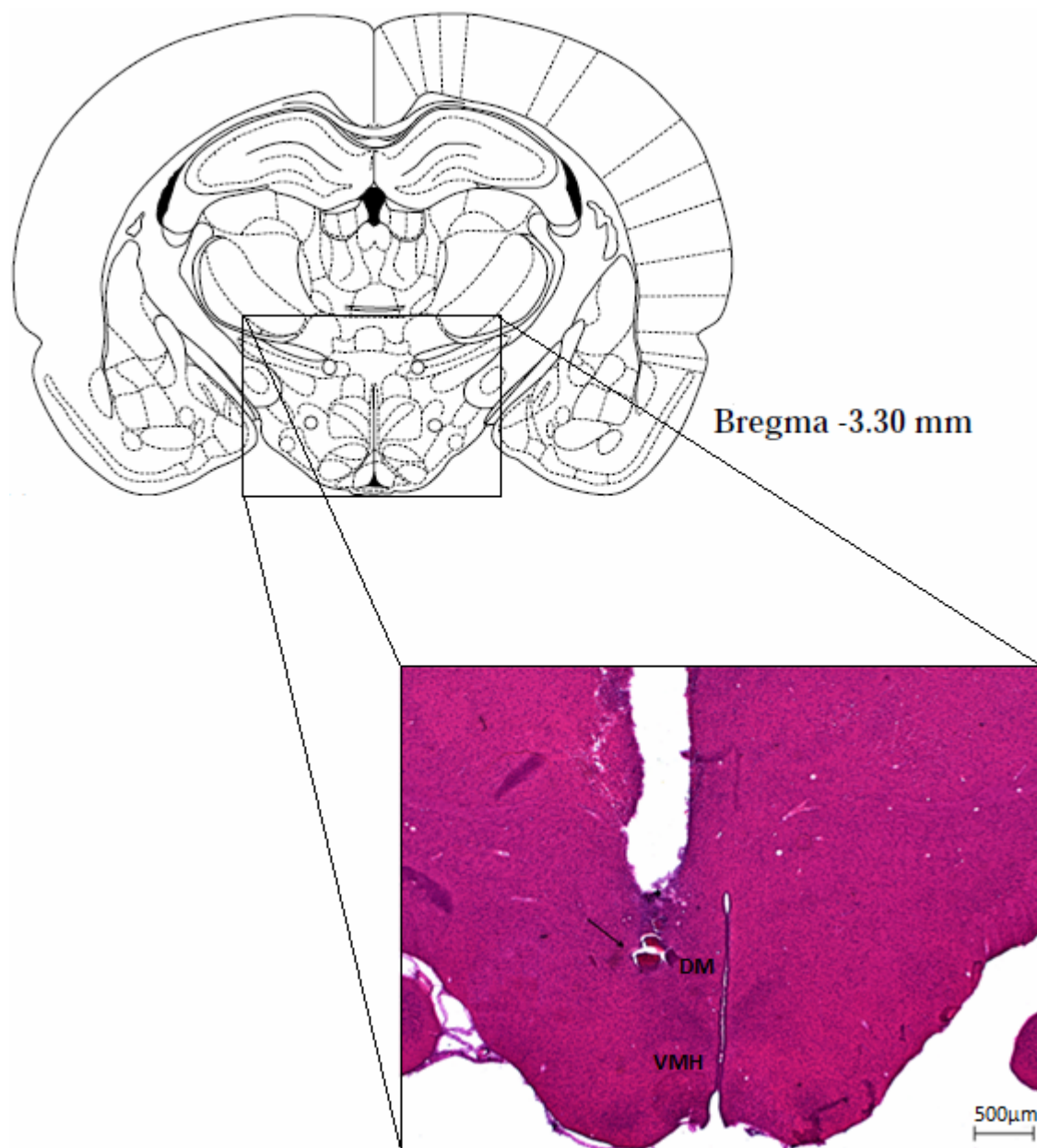


Figura 14: Fotomicrografia de secção coronal do diencéfalo em nível do hipotálamo medial. A seta indica o ponto de microinjeção de Bicuculina a 40ng/0,2µL no hipotálamo dorsomedial. DM: Hipotálamo dorsomedial. VMH: Hipotálamo ventromedial. Coloração: Hematoxilina-eosina. Barra: 500µm.

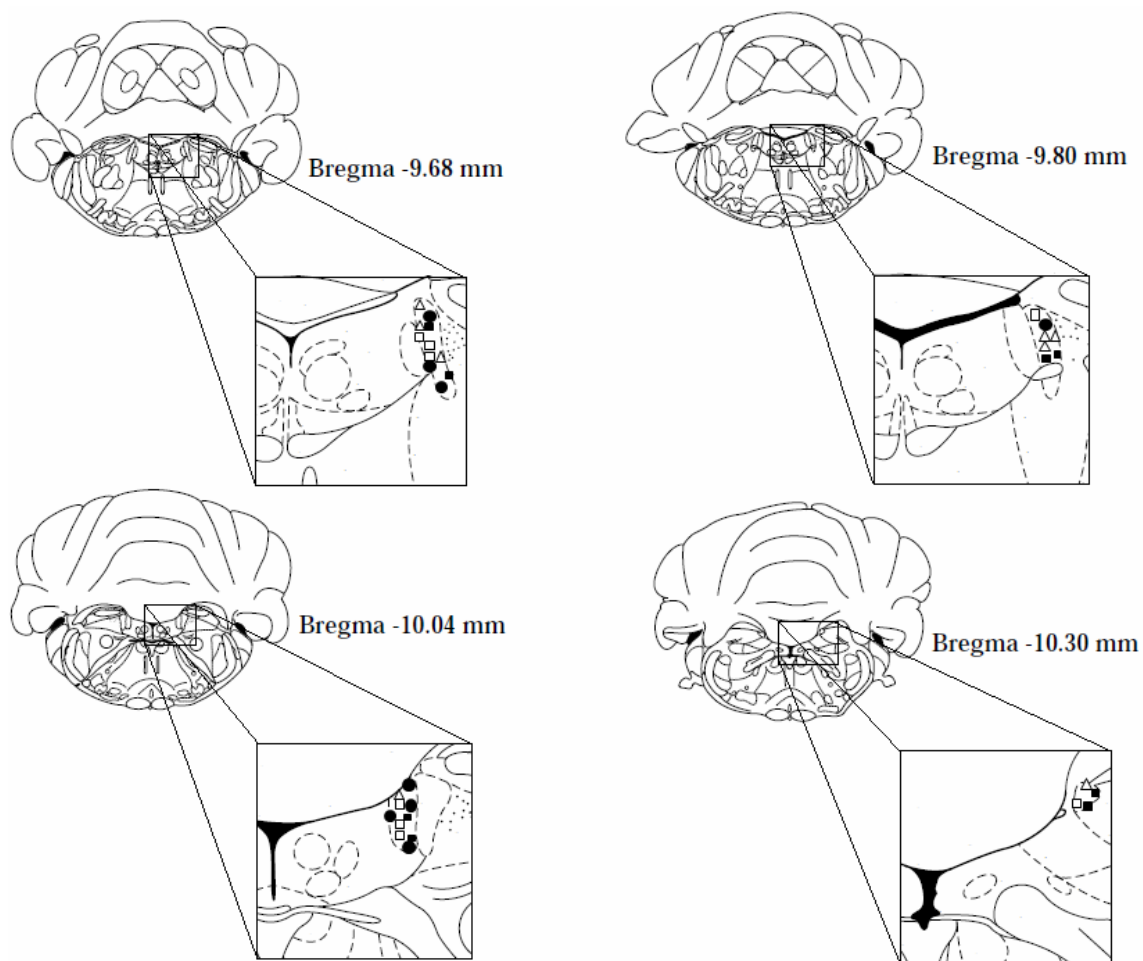


Figura 15: Representação esquemática dos sítios de microinjeção de metisergida, cetanserina ou salina no LC: (□-□) microinjeção do véculo das soluções intra-LC + salina intra-HM, e os grupos pré-tratados com (■-■) metisergida, (●-●) cetanserina ou (Δ-Δ) com o véculo das soluções no LC microinjeção de bicuculina intra-HM, dispostos em anagramas do atlas de Paxinos e Watson (1997). LC: *locus coeruleus*; HM: hipotálamo medial.

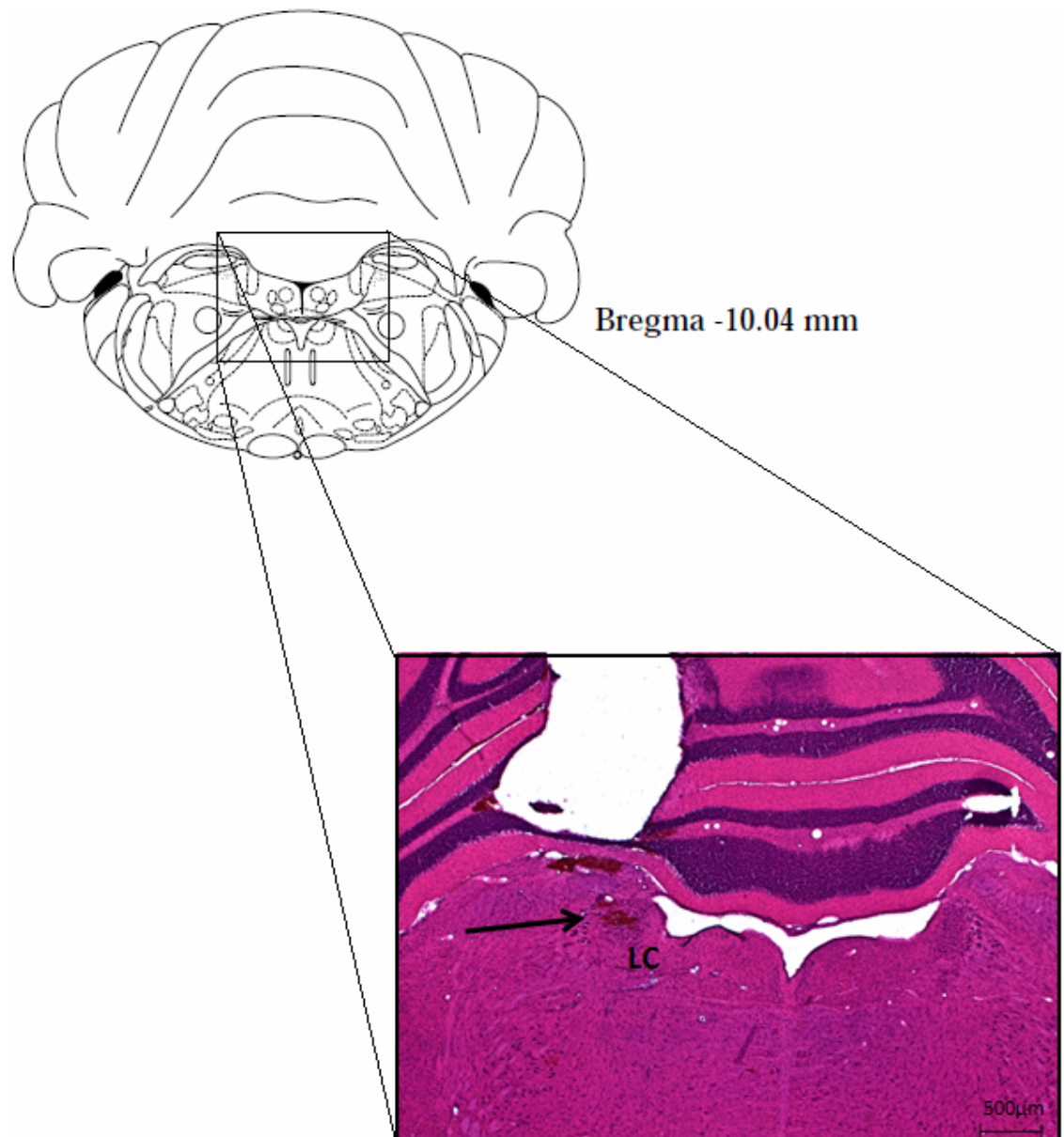


Figura 16: Fotomicrografia de secção coronal da ponte em nível do *locus coeruleus*. A seta indica o ponto de microinjeção de metisergida no *locus coeruleus*. LC: *locus coeruleus*. Barra: 500μm.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

No presente estudo, a desinibição GABAérgica do diencéfalo com microinjeções de antagonista de receptores GABA_A no hipotálamo medial induziu respostas comportamentais de defesa, principalmente caracterizadas por atenção defensiva e comportamentos de fuga, além de intenso comportamento exploratório, seguidas de uma significativa antinocicepção, quando comparado com o grupo controle.

As bases neurais das respostas comportamentais de defesa têm sido extensamente investigadas através da aplicação de estímulos aversivos naturais ou por procedimentos experimentais baseados na estimulação química com aminoácidos excitatórios, na desinibição GABAérgica e na estimulação elétrica de estruturas prosencefálicas e mesencefálicas (CARDOSO e cols., 1994; SHEKHAR e cols., 2003; BORRELI e cols., 2004; GUIMARAES-COSTA e cols., 2007). Dessa maneira, trabalhos prévios mostraram o envolvimento do neurotransmissor GABA na modulação de respostas defensivas induzidas por estimulação elétrica e pela desinibição GABAérgica do teto mesencefálico (SCHENBERG e col., 1983; COIMBRA e cols., 1989). Assim, tem sido descrito que a desinibição GABAérgica da substância cinzenta periaquedutal induz respostas autonômicas características da reação de defesa qualitativamente similares às respostas observadas após a estimulação do hipotálamo. As respostas comportamentais eliciadas pela estimulação de estruturas do teto mesencefálico têm sido descritas como explosivas e não direcionadas, enquanto os comportamentos de defesa eliciados pela estimulação do hipotálamo são mais orientados, de menor intensidade e precedidos por exuberante comportamento exploratório (DI SCALA e cols., 1984; BRANDÃO et al., 1994).

Em harmonia com esses trabalhos, estudos mais recentes observaram respostas comportamentais defensivas de fuga mais elaborada observadas após a desinibição GABAérgica do hipotálamo medial (FREITAS e col, 2009). Tais respostas comportamentais são também normalmente induzidas por um

estímulo ameaçador iminente, como observado no confronto proximal entre presa e predador (CANTERAS, 2002).

De fato, o hipotálamo medial exerce um importante papel na expressão das respostas comportamentais defensivas. Além disso, os resultados presentemente obtidos sugerem, ainda, um papel relevante do hipotálamo na modulação dos estímulos nociceptivos. Com efeito, após a elaboração de respostas defensivas, induzidas pelo medo, houve aumento do limiar nociceptivo, o que já foi, no entanto, recentemente descrito, no que se refere ao hipotálamo medial (FREITAS e cols., 2009). Resultados semelhantes também foram obtidos em outros modelos animais de pânico e ansiedade, observados após os comportamentos defensivos induzidos pela estimulação de outras estruturas do sistema encefálico da aversão e de estruturas mesencefálicas (BRANDÃO e cols. 1982, 1991; COIMBRA e cols., 1992; COIMBRA e cols., 2006). A atividade integrada das estruturas envolvidas no processo modulatório da dor e na elaboração dos comportamentos defensivos, favorece as respostas comportamentais de fuga, ao invés de comportamentos recuperativos induzidos pela dor, em casos de eventuais ferimentos nas situações de confronto entre presa e predador (MENESCAL-DE-OLIVEIRA & HOFFMAN, 1993).

Os resultados do estudo neurofisiológico do presente trabalho sugerem a participação de neurônios serotoninérgicos do NDR na modulação dos comportamentos defensivos. Essa proposição é sustentada pelo fato de que a lesão neurotóxica seletiva de neurônios serotoninérgicos do NDR (com 5,7-dihidroxitriptamina intra-NDR) diminuiu a frequência dos comportamentos de alerta defensivo e fuga retrógrada, e também a duração e frequência da fuga induzidos pela estimulação do hipotálamo medial.

De acordo com a literatura, as vias ascendentes serotoninérgicas provenientes do NDR desempenham um papel modulatório também nos comportamentos relacionados ao medo, primariamente relacionadas com a ansiedade generalizada e possivelmente também implicadas no transtorno do pânico (GRAEFF e cols., 1996). Apesar de haver conexões recíprocas entre o HM e o NDR (PERYON e cols., 1998), em modelos animais de ansiedade não

foi observado aumento da liberação de serotonina no HM (SAJDYK e cols., 1997). Além disso, curiosamente, os neurônios serotoninérgicos presentes no HDM não sintetizam serotonina; ao invés disso, promovem recaptação exógena daquele neurotransmissor por um mecanismo de transporte específico inerente ao sistema serotoninérgico (VANHATALO & SOINILA, 1998). Dessa forma, as alterações comportamentais decorrentes da lesão seletiva dos neurônios serotoninérgicos do NDR, podem estar envolvidas diretamente com a citoarquitetura desse núcleo. Evidências que suportam essa hipótese foram baseadas nas observações de que a estimulação química do NDR induz respostas comportamentais de defesa (ABRAMS e cols., 2005).

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a lesão seletiva de neurônios serotoninérgicos do NDR produz um efeito ansiolítico e panicolítico em animais tratados com microinjeções de bicuculina no HM. Essa hipótese se sustenta pela observação de que há diminuição estatisticamente significativa dos comportamentos de alerta e fuga induzidos pela administração de bicuculina no HM, após a lesão do NDR. Corroborando os resultados obtidos no presente estudo, outros trabalhos mostraram que a administração de agonista 5-HT_{1A} no NDR produz um efeito ansiolítico através diminuição da liberação de serotonina no próprio NDR, em modelos animais (JAHANSHAH e cols., 2010).

Outro fator relevante destacado pelos presentes resultados relaciona-se com o tempo de ativação comportamental observado após a lesão neurotóxica do NDR. Como foi observado no presente estudo, o bloqueio de receptores GABAérgicos no HM realizado 5 dias após a lesão seletiva dos neurônios serotoninérgicos diminuiu o limiar de alerta defensivo. Porém, quando o procedimento experimental de indução de respostas de defesa hipotalâmicas se realizou 14 dias após a administração da neurotoxina específica no NDR, além do alerta defensivo, os comportamentos de fuga orientada também foram significativamente diminuídos em relação ao grupo controle. Além disso, foram observadas diferenças estatisticamente significantes no que se refere à expressão da fuga retrógrada, uma resposta muito comum após “estimulação química” (desinibição GABAérgica) do hipotálamo medial (FREITAS e col., 2009), entre os grupos tratados com bicuculina 5 e 14 dias após a lesão do

NDR; fato possivelmente relacionado com a inervação serotoninérgica de outras estruturas do neuroeixo. Estudos utilizando técnicas de microdiálise mostraram que, uma semana após a lesão dos núcleos da rafe, há diminuição da liberação serotoninérgica apenas no hipocampo (NETTO e cols., 2002), ao passo que 14 dias após a lesão observa-se depleção serotoninérgica no striatum, córtex pré-frontal e no complexo amigdalóide (SENA e cols., 2003). Assim também, três semanas após o mesmo procedimento, foi observado diminuição de serotonina no córtex pré-frontal e no hipocampo (LIU e cols., 2007). Dessa maneira, não apenas os mecanismos intrínsecos de neurônios do NDR, mas também as inervações serotoninérgicas específicas de outras estruturas envolvidas na regulação dos estados emocionais podem desempenhar um importante papel na elaboração dos comportamentos emocionais defensivos (LOWRY e cols., 2008).

Além das alterações observadas nos comportamentos relacionados ao medo e ao pânico, após lesão do NDR, o estudo do efeito da lesão seletiva dos neurônios serotoninérgicos dessa estrutura pode sugerir a participação do NDR na modulação da antinocicepção decorrente do comportamento defensivo elaborado pelo HM. O aumento dos limiares nociceptivos induzido pela administração de bicuculina no HM foi parcialmente ou totalmente revertido, respectivamente, 5 dias e 14 dias após a lesão do NDR. De acordo com outros estudos, a lesão neuroquímica dos neurônios do NDR também tem a propriedade de diminuir a magnitude de outros processos antinociceptivos, como a antinocicepção pós-ictal, possivelmente por interferir na integridade das vias descendentes serotoninérgicas que se originam no NDR (FREITAS e cols., 2005). De fato, o NDR desempenha um importante papel no controle da percepção do estímulo doloroso, através das vias ascendentes e descendentes que se projetam para outras estruturas do tronco encefálico, também envolvidas na modulação da dor, como o núcleo pré-tectal anterior, a substância cinzenta periaqueductal dorsal e as camadas profundas do colículo superior (ROSA e cols., 1998; COIMBRA e cols., 2006)

Há evidências de que conexões serotoninérgicas adjacentes apresentam não apenas importância na modulação de comportamentos defensivos relacionados com o pânico e ansiedade, como observado no presente trabalho,

mas também na integração dos processos antinociceptivos decorrentes dos estados emocionais de medo intenso (NOGUEIRA & GRAEFF, 1995; COIMBRA E COLS., 2000; CASTILHO E COLS., 2001; COIMBRA e cols., 2006). Não obstante, pelo menos no que se refere às respostas de defesa organizadas pelo hipotálamo medial, esta é a primeira evidência de que os neurônios serotoninérgicos do NDR podem desempenhar um papel de destaque na modulação tanto do comportamento de defesa como dos processos antinociceptivos a ele inerentes.

Efetivamente, a antinocicepção que segue tais reações defensivas parece ter parte de seus mecanismos sediados nos núcleos do sistema endógeno de modulação da dor (FREITAS e cols., 2005; COIMBRA e cols., 2006), pois a diminuição da atividade de neurônios serotoninérgicos, causada pela lesão neurotóxica seletiva de tais pericários no núcleo dorsal da rafe, antagonizou consistentemente a antinocicepção induzida pelos comportamentos de fuga elaborada, cujo substrato neural tem sido proposto situar-se no hipotálamo medial.

O efeito da diminuição da neurotransmissão serotoninérgica proveniente do NDR na organização de comportamentos defensivos induzidos pelo bloqueio dos receptores GABA_A do HM, como observado no presente estudo, causando diminuição da frequência e da duração do alerta defensivo e da fuga elaborada, além da antinocicepção induzida pelo medo sugere uma possível correlação entre tais respostas de defesa e os processos endógenos de modulação da dor. Essa proposição é sustentada pelo fato de que a lesão seletiva do NDR alterou a frequência e duração dos comportamentos defensivos e da antinocicepção que segue sua eliciação; porém, não alterou as respostas motoras de cruzamentos, de levantamento, e do comportamento de autolimpeza, que também se mantiveram aumentadas após o bloqueio GABAérgico no hipotálamo dorsomedial em animais lesados no NDR. Esse fato também é um indicativo de que a diminuição da antinocicepção induzida pela fuga elaborada pelo hipotálamo medial após a lesão do NDR não se deve a um eventual comprometimento motor, mas sim à diminuição de atividade de serotoninérgicas descendentes.

A técnica de imunofluorescência, realizada no presente trabalho, identificou abundantes pericários serotoninérgicos distribuídos no NDR. Evidências da localização histológica dos corpos celulares serotoninérgicos no neuroeixo já estão bem demonstradas na literatura (STEINBUCH, 1981; HORNING, 2003; COIMBRA e col., 2006). A abordagem imuno-histoquímica, realizada no núcleo dorsal da rafe, em animais controles e lesados com a neurotoxina, permitiu avaliar, por meio da observação de características morfológicas do tecido nervoso estudado, a ação da neurotoxina específica para os neurônios serotoninérgicos. Através dessa técnica, foi possível observar a rarefação neuronal, como uma evidência da diminuição da densidade de neurônios serotoninérgicos no núcleo estudado.. Além disso, foi possível visualizar a proliferação da neurógliia ou a gliose reacional dos astrócitos, corroborando trabalhos prévios, que sugerem que a lesão neuronal serotoninérgica dos núcleos da rafe após a administração local de 5,7-DHT, causa eficaz depleção de serotonina no neuroeixo (TOMAZ e cols., 2000; ANDRADE & GRAEFF, 2001; REX e cols., 2003).

A análise estatística dos dados referentes aos grupos controles, não mostrou diferença com relação ao tempo de administração de bicuculina (intra-HM) 5 ou 14 dias após o procedimento *sham* intra-NDR em relação à expressão das diversas respostas comportamentais de defesa induzidas pelo bloqueio GABAérgico no hipotálamo medial e à magnitude da antinocicepção induzida pelo medo. Portanto, o intervalo de tempo entre os procedimentos invasivos realizados no NDR e a desinibição GABAérgica do hipotálamo medial é relevante apenas no que se refere ao tratamento do NDR com 5,7-DHT.

Além da participação do sistema serotoninérgico no NDR, os dados neurofarmacológicos do presente estudo sugerem a presença de receptores serotoninérgicos no LC, os quais podem participar da modulação dos processos antinociceptivos induzidos pelo medo inato organizado pelo hipotálamo medial. Axônios dos corpos celulares serotoninérgicos, provenientes do NDR, se projetam para diversas regiões diencefálicas, mesencefálicas (LEE e cols., 2005) e pontinas, como o LC (KIM e cols., 2004), modulando respostas comportamentais defensivas e processos nociceptivos (SEGAL, 1979; COIMBRA, 1995).

Com efeito, os presentes achados demonstram que, a via monoaminérgica, que se origina no NDR e se projeta ao LC, está intimamente relacionada com a modulação dos processos antinociceptivos desencadeados pelas respostas comportamentais defensivas organizadas no hipotálamo medial, através de receptores da subfamília 5-HT₂, localizados em neurônios do LC, pois o tratamento do LC com antagonista não-seletivo de receptores serotoninérgicos (metisergida) e com um antagonista farmacológico com maior afinidade para receptores 5-HT_{2A/2C} reduziu significativamente a elevação do limiar nociceptivo subsequentes as respostas defensivas organizadas no hipotálamo medial. Esses achados reforçam a hipótese do envolvimento da via serotoninérgica que conecta o NDR ao LC na elaboração dos processos antinociceptivos.

Possivelmente, a ação do sistema serotoninérgico que conecta o NDR ao LC, na antinocicepção induzida pelo medo, ainda envolve outros subtipos de receptores da serotonina, uma vez que a ação do antagonista serotoninérgico seletivo não reverteu a elevação dos limiares nociceptivos durante a elaboração das respostas defensivas induzidas pelo medo tanto quanto o antagonista serotoninérgico não seletivo. É também possível que essa conexão ainda envolva outros sistemas neurais e outros tipos de neurotransmissores, muito provavelmente o sistema noradrenérgico, do qual o LC é ricamente constituído.

Os resultados obtidos demonstraram ausência do efeito do tratamento com antagonistas serotoninérgicos no LC nas respostas comportamentais induzidas por estímulos de natureza aversiva, sugerindo que essa via serotoninérgica descendente que parte do NDR ao LC esteja modulando mais propriamente as vias nociceptivas, e não os sistemas neurais que elaboram os comportamentos defensivos.

Em conclusão, os dados obtidos no presente estudo demonstram a participação do sistema serotoninérgico tanto na modulação dos padrões comportamentais de defesa organizados pelo hipotálamo medial, possivelmente através de uma via serotoninérgica que conecta o NDR ao hipotálamo medial, como na modulação da antinocicepção induzida pelo medo

inato, também organizado pelo hipotálamo medial, mas agora através da via serotoninérgica que conecta o NDR ao LC, possivelmente, influenciando a atividade da clássica via noradrenérgica que conecta o LC ao corno posterior da medula espinal. Contudo, não podemos afastar a possibilidade de outras projeções ascendentes e descendentes que partem do núcleo dorsal da rafe e mesmo do LC para outras estruturas mais craniais do neuroeixo e mesmo para a formação reticular, rica em serotonina e em noradrenalina. Estruturas estas que poderiam estar modulando respostas defensivas e antinociceptivas. Neste último caso, por influenciar a entrada do impulso nociceptivo no corno dorsal da medula espinal e no núcleo espinal do nervo trigêmeo (BASBAUM & FIELDS, 1984; JULIUS & BASBAUM, 2001).

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

- ✓ Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem a participação do sistema GABAérgico do hipotálamo medial na modulação tônica de neurônios que elaboram os comportamentos defensivos que têm sido associados ao medo e ao pânico e, de certo modo, na organização da antinocicepção subsequente ao medo inato, pois a microinjeção de bicuculina (antagonista de receptores GABA_A) no hipotálamo medial induziu comportamentos defensivos mais bem elaborados, seguidos pela elevação nos limiares nociceptivos.
- ✓ Os neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe participam da elaboração dos comportamentos de alerta e fuga elaborada, pois a lesão específica de neurônios serotoninérgicos através da microinjeção de 5,7-DHT no núcleo dorsal da rafe diminuiu a frequência e duração desses comportamentos defensivos organizados pelo hipotálamo medial.
- ✓ Neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe podem estar crucialmente envolvidos na elaboração da antinocicepção induzida pelo medo inato, pois a lesão específica desses pericários reduziu a elevação dos limiares nociceptivos que segue os comportamentos defensivos elaborados pelo hipotálamo medial.
- ✓ Aferências serotoninérgicas ao *locus coeruleus* modulam os processos antinociceptivos induzidos pelo medo, mas não participam da elaboração das respostas comportamentais organizadas no hipotálamo medial, considerando que a microinjeção de metisergida (antagonista serotoninérgico não seletivo) e de cetanserina (antagonista farmacológico competitivo com maior afinidade para receptores 5-HT_{2A/2C}) no *locus coeruleus* antagonizou a antinocicepção que segue os comportamentos defensivos induzidos pelo bloqueio GABA_A no hipotálamo medial, sem influenciar a expressão das diversas respostas comportamentais de defesa.
- ✓ Receptores serotoninérgicos da subfamília 5-HT_{2A/2C} do *locus coeruleus* parecem mediar pelo menos parte da modulação serotoninérgica da antinocicepção induzida pela fuga elaborada pelo hipotálamo medial, o que pode também depender da integridade do eixo conectivo entre o NDR e o LC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, J.K.; JOHNSON, P.L.; HAY-SCHMIDT, A.; MIKKELSEN, J.D.; SHEKHAR, A. & LOWRY, C.A. Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs. **Neuroscience 133 : 983–997, 2005.**

ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S. & TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research 1000: 40–56, 2004.**

ANDRADE, T.G.C.S. & GRAEFF, F.G. - Effect of electrolytic and neurotoxic lesions of the median raphe nucleus on anxiety and stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior 70: 1 –14, 2001.**

ASAHINA, M.; SUZUKI, A; MORI, M; KANESAKA, T; HATTORI, T. - Emotional sweating response in a patient with bilateral amygdala damage. **Int. J. Psychophysiol.**, 4:87-93, 2003.

BAJIC, D.; PROUDFIT, H. K. & VAN BOCKSTAELE, E. J. - Periaqueductal gray neurons monosynaptically innervate extranuclear noradrenergic dendrites in the rat pericoerulear region. **J. Comp. Neurol.**, 4:649-62, 2000.

BANDLER, R. & DEPAULIS, A. Elicitation of intraspecific defence reactions in the rat from midbrain periaqueductal grey by microinjection of kainic acid, without neurotoxic effects. **Neurosci Lett.**, 3: 291-6, 1988.

BANDLER, R. & CARRIVE, P. – Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. **Brain Res.**, 439: 95-106, 1988.

BANDLER, R.; DEPAULIS, A. & VERNES, M. - Identification of midbrain neurones mediating defensive behaviour in the rat by microinjections of excitatory amino acids. **Behavioral Brain Research.**, 15: 107-109, 1985.

BASBAUM, A. I. & FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annu. Rev. Neurosci.**, 7: 309-338, 1984.

BASBAUM, A. I. & BUSHNELL, M.C. **Science of pain.** Elsevier. Oxford. U.K. (2009).

BERRIDGE, C.W. & WATERHOUSE, B.D. *The locus coeruleus–noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes.* **Brain Research Reviews** 42 33–84, 2003.

BHATNAGAR, S. VINING C, DENSKI K. - *Regulation of chronic stress-induced changes in hypothalamic-pituitary-adrenal activity by the basolateral amygdale.* **Ann N Y Acad Sci.** 1032:315-9, 2004.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. *Ethoexperimental approaches of the biology of emotion.* **Annu. Rev.Psycol.** 39:43-68, 1988.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. *Defensive behaviors, fear, and anxiety.* **Handbook of Anxiety and Fear**, 17- 63:79, 2008.

BOLLES, R. C. & FANSELOW, M. S.- *Perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain.* **The Behavioral and Brain. Sciences**, 3: 291-323, 1980.

BORELLI, K.G.; NOBRE, N.J.; BRANDÃO, M.L. & COIMBRA, N.C. *Effects of acute and chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter.* **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 77: 557–566, 2004.

BRANDÃO, M. L.; AGUIAR, J. C. & GRAEFF, F. G. – *GABA mediation of the antiaversive action of the minor tranquilizers.* **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 16: 397-402, 1982.

BRANDÃO, M. L.; DI SCALA, G.; BOUCHET, M. J. & SCHMITT, P. - *Escape behavior induced by blockade of glutamic acid decarboxilase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus.* **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 24: 497-501, 1986.

BRANDÃO, M. L. & TOMAZ, C.; LEÃO-BORGES, P. C.; COIMBRA, N. C. & BAGRI, A. *Defense reaction induced by microinjections of bicuculine into inferior colliculus.* **Physiol. Behav.**, 44: 361-365, 1988.

BRANDÃO, M. L.; LOPEZ-GARCIA, J. A.; GRAEFF, F.G. & ROBERTS, M.H.T. *Electrophysiological evidence for excitatory 5-HT₂ and depressant 5-HT_{1A} receptors on neurons of the rat midbrain tectum.* **Brain Res.**, 556: 259-266, 1991 .

BRANDÃO, M. L.; MELO, L. L. & CARDOSO, S. H. – *Mechanisms of defense in the inferior colliculus.* **Behavioural Brain Res.**, 58: 49-55, 1993.

BRANDÃO, M. L.; CARDOSO, S. H.; MELO, L. L.; MOTTA, V. & COIMBRA, N. C. – *Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum*. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 18: 339-346, 1994.

BRANDÃO, M. L.; ANSELONI, V. Z.; PANDÓSSIO, J. E.; DE ARAÚJO, J. E. & CASTILHO, V. M. – *Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain*. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 23: 863-875, 1999.

BRANDÃO, M.L. *Psicofisiologia As bases fisiológicas do comportamento*. Atheneu, São Paulo 152-169, 2001.

BRANDÃO, M.L. VIANNA, D.M.; MASSON, S.; SANTOS, J. *Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade*. **Rev Bras Psiquiatr.**, 25(Supl II):36-41, 2003a.

BRANDÃO, M.L.; TRONCOSO, A.C.; SILVA, M.A.S. & HUSTON, J.P. - *The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations*. **European Journal of Pharmacology** 463:225– 233, 2003b.

BUENO, C.H.; ZANGROSSI, H.J. & VIANA, M.B. *GABA/benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus regulate both anxiety and panic-related defensive responses in the elevated T-maze*. **Brain Research Bulletin** 74: 134-141, 2007.

CANTERAS, N.S., CHIAVEGATTO, S., RIBEIRO DO VALLE, L.E. & SWANSON, L.W. - *Severe reduction of defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions*. **Brain Res. Bull.**, 44, 297–305, 1997.

CANTERAS, N.S., RIBEIRO-BARBOSA, E.R. & COMOLI, E. -*Tracing from the dorsal premammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses*. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 25: 661–668, 2001.

CANTERAS, N.S. - *The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 71: 481– 491, 2002.

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

CARRIVE, P. – *The periaqueductal gray and defensive behaviour: functional representation and neuronal organization.* **Behav. Brain Res.**, 58: 27-47, 1993.

CASTILHO, V. M; AVANZI, V. & BRANDÃO, M.L. – *Antinociception elicited by aversive stimulation of the inferior colliculus.* **Pharmacol. Biochem. BE**, 62: (3) 425-431, 1999.

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

CEDARBAUM, J.M. & AGHAJANIAN, G.K. - *Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique.* **J Comp Neurol.**178(1):1-16,1978.

CEZARIO, A.F.; RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; BALDO, M.V.C.; CANTERAS, N.S. *Hypothalamic sites responding to predator threats – the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior.* **European Journal of Neuroscience**, 28: 1003–1015, 2008.

CHEBIB, M. & JOHNSTON, G.A.R. - *The ‘ABC’ of GABA receptors: A Brief review.* **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** 26: 937–940,1999.

COIMBRA, N. C., LEÃO-BORGES, P. C. & BRANDÃO, M. L. - *GABAergic fibers from substantia nigra, pars reticulata modulate escape behaviour induced by midbrain central gray stimulation.* **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 22: 111-114, 1989.

COIMBRA, N. C. - *Influence of GABAergic nigrocollicular pathways on aversive behaviour induced by electrical and chemical stimulation of the mesencephalic tectum of Rattus norvegicus (Rodentia, Muridae).* **Master in Sciences, Thesis (in Portuguese), Faculty of Philosophy, Sciences and Literature of Ribeirão Preto of the University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brasil**, 1-160, 1991.

COIMBRA, N. C.; TOMAZ, C. & BRANDÃO, M. L. – *Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum.* **Behav. Brain**, 50: 77-83, 1992.

COIMBRA, N. C. & BRANDÃO, M. L. – *GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behavior elicited by midbrain tectum stimulation.* **Behav. Brain Res.**, 59: 131-139, 1993.

COIMBRA, N. C. *Identification of opioid and serotonergic neurons of the mesencephalic tectum and their role on antinociception induced by aversive stimulation of the midbrain. Thesis (in Portuguese), Faculty of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brasil, 1-119, 1995.*

COIMBRA, N. C. & BRANDÃO, M. L. – *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, 1997.

COIMBRA, N. C.; KAWASAKI, M. C.; CISCATO, JR., J. G.; CARDOSO, S. H. & CORRÊA S. A. L. – *Nigro-tectal pathway: neuroanatomy and role on defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation.* **Soc. Neurosci. Abstr.**, 24: 1930, 1998.

COIMBRA, N. C.; OSAKI, M.Y.; EICHENBERGER, G.C.; CISCATO, J.G.; JUCÁ, C.E. & BIOJONE, C.R. - *Effects of opioid receptor blockade on defensive behavior elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior colliculus in Rattus norvegicus (Rodentia, Muridae).* **Psychopharmacology (Berl)**. 152(4):422-30, 2000.

COIMBRA, N. C.; DE OLIVEIRA, R.; FREITAS, R. L.; RIBEIRO, S. J.; BORELLI, K. G.; PACAGNELLA, R. C.; MOREIRA, J. E.; DA SILVA, L. A.; MELO, L. L.; LUNARDI, L. O. & BRANDÃO, M. L. *Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia.* **Exp. Neurol.**, 197: 93–112, 2006.

DEAKIN, J.F. & GRAEFF, F.G. *5-HT and mechanism of defence.* **Psychopharmacology** 5:19-32, 1991.

DEPAULIS, A; KEAY, K. A & BANDLER, R. - *Longitudinal neuronal organization of defensive reactions in the midbrain periaqueductal gray region of the rat.* **Exp Brain Res.**, 2: 307-18, 1992.

DI SCALA, G.; SCHMITT, P & KARLI, P – *Flight induced by infusion of bicuculine methiodide into periventricular structures.* **Brain Res.**, 309: 199, 1984.

DIELENBERG, R.A.; HUNT, G.E. & MCGREGOR, I.S. - "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. **Neuroscience**. 104(4):1085-97, 2001.

DIMICCO, J.A.; SAMUELS, B.C.; ZARETSKAIA, M.V. & ZARETSKY, D.V. - *The dorsomedial hypothalamus and the response to stress Part renaissance, part revolution*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 71:469– 480, 2002.

DUCROCQ, F; VAIVA, G; COTTENCIN, O; MOLEND, S & BAILLY, D.- *Post-traumatic stress, post-traumatic depression and major depressive episode: literature*. **Encephale.**, 2:159-68, 2001.

EICHENBERGER, G. C. D.; RIBEIRO, S. J.; OSAKI, M. Y.; MARUOKA, R. Y.; RESENDE, G. C. C.; CASTELLAN-BALDAN, L.; CORRÊA, S. A L.; DA SILVA, L. A & COIMBRA, N. C. - *Neuroanatomical and psychopharmacological evidences for interactions between opioid and GABAergic neural pathways in the modulation of the defensive behavior elicited by electrical and chemical stimulation of the dorsal mesencephalon*. **Neuropharmacology**, 42: 48-59, 2002.

EVANS, S.B.; WILKINSON, C.W.; GRONBECK, P.; BENNETT, J.L.; ZAVOSH, A.; TABORSKY, G.J. JR & FIGLEWICZ, D.P. - *Inactivation of the DMH selectively inhibits the ACTH and corticosterone responses to hypoglycemia*. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 286(1):R123-8, 2004.

FANSELOW, M. S. – *Conditional and unconditional components of post-shock freezing*. **J. Biol. Sci.**, 15: 177-182, 1980.

FANSELOW, M. S. – *The midbrain pariaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety*. In: *The Midbrain Pariaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Immunohistochemical Organization*. **Plenum Publishing Corporation**, New York 151-173, 1991.

FARDIN, V.; OLIVERAS, J. L. & BESSON, J. M. - *A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. I. The production of behavioral side effects together with analgesia*. **Brain Res.**, 1-2:105-23, 1984a.

FARDIN, V.; OLIVERAS, J. L. & BESSON, J. M. - *A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. II. Differential characteristics of the analgesia induced by ventral and dorsal PAG stimulation*. **Brain Res.**, 1-2:125-39, 1984b.

FERNANDEZ DE MOLINA, A & HUNSPERGER, R. W. – *Central representation of affective reaction in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis and adjacent structures.* **J. Physiol.**, 145: 251-265, 1959.

FERREIRA, M.D. & MENESCAL-DE-OLIVEIRA, - L. *Role of dorsal raphe nucleus 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in tonic immobility modulation in guinea pigs.* **Brainreseach**, 69 – 76, 2009.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I.; CLANTON, C. H. & ANDERSON, S. D. *Nucleus raphe magnus inhibition of spinal cord dorsal horn neurons.* **Brain Res.**, 126: 441-453, 1977.

FREITAS, R. L., FERREIRA, C. M. R., RIBEIRO, S. J., CARVALHO, A. D., ELIAS-FILHO, D. H., GARCIA-CAIRASCO, N. & COIMBRA, N. C. *Intrinsic neural circuits between dorsal midbrain neurons that control fear-induced responses and seizure activity and nuclei of the pain inhibitory system elaborating postictal antinociceptive processes: a functional neuroanatomical and neuropharmacological study.* **Exp. Neurol.**, 191: 225-242, 2005.

FREITAS, R. L., BASSI, G.S., OLIVEIRA, M.A. & COIMBRA, N.C. *Serotonergic neurotransmission in the dorsal raphe nucleus recruits in situ 5-HT_{2A/2C} receptors to modulate the post-ictal antinociception.* **Experimental Neurology** 213: 410–418, 2008.

FREITAS, R. L., URIBE-MARIÑO, A.; CASTIBLANCO-URBINA, M.A. ELIAS-FILHO, D. H., & COIMBRA, N. C. *GABAA receptor blockade in dorsomedial and ventromedial nuclei of the hypothalamus evokes panic-like elaborated defensive behaviour followed by innate fear-induced antinociception.* **Brain Res.**, 1305:118-131, 2009.

FREITAS, R.L. – *Envolvimento de circuitos serotoninérgicos do hipocampo dorsal e de vias opióides e serotoninérgicas do sistema endógeno de inibição de dor na analgesia pós-ictal.* Tese de Doutorado **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.** Ribeirão Preto. Brasil. 2010.

FUCHS, S. A G.; & SIEGEL, A – *Neural pathways mediating hypothalamically elicited flight behaviour in the cat.* **Brain Res.**, 306: 263-281, 1984.

FUCHS, S. A G.; EDINGER, H. M. & SIEGEL, A – *The role of the anterior hypothalamus in affective defense behaviour elicited from the ventromedial hypothalamus of the cat.* **Brain Res.**, 330: 93-107, 1985.

GRAEFF, F. G. – *Brain defense systems and anxiety. Em: Handbook of Anxiety, M. Roth; G. D. Burrows e R. Noyes (eds.), vol. 3, Elsevier Science Publishers, Amsterdam 307-354, 1990.*

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

GRAEFF, F. G. & BRANDÃO, M. L. – *Neurobiologia das doenças mentais. Lemos editorial & Gráficos Ltda, São Paulo, 109-143, 1993.*

GRAEFF, F. G. - *Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. Braz J. Med. Biol. Res. 27(4): 811-829, 1994.*

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S.; ANDRADE, T.G.C.S. & DEAKIN, J.F.W. - *Role of 5-HT in Stress, Anxiety, and Depression. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 54: 129-141, 1996.*

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B. & MORA, P.O. - *Dual Role of 5-HT in Defense and Anxiety. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 21: (6)791–799, 1997.*

GRAEFF, F.G. - *The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 23: 237–246, 1998.*

GRAEFF, F. G. *Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Rev Bras Psiquiatr. 29(Supl I):S3-6, 2007.*

GRAY, J. A. – *Neuropharmacology of Anxiety. Oxford University Press, New York, 1982.*

GRAY JA, MCNAUGHTON N. *The neuropsychology of anxiety. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2000.*

GREVE, K. W; HOUSTON, R. J; ADAMS, D.; STANFORD, M. S; BIANCHINI, K. J; CLANCY, A & RABITO, F. J. Jr. *The neurobehavioural consequences of St. Louis encephalitis infection. Brain Inj., 10:917-27, 2002.*

GUIMARÃES-COSTA,R.; GUIMARÃES-COSTA, M.B.; PIPPA-GADIOLI, L.; WELTSON, A.; UBIALI, W.A.; PASCHOALIN-MAURIN,T.; TOCCHINI FELIPPOTTI, T.; ELIAS-FILHO,D.H.; LAURE, C.J.; COIMBRA, N.C. *Innate defensive behaviour and panic-like reactions evoked by rodents during aggressive encounters with Brazilian constrictor snakes in a complex labyrinth:*

*Behavioural validation of a new model to study affective and agonistic reactions in a prey versus predator paradigm. **Journal of Neuroscience Methods** 165: 25–37, 2007.*

HADDJERI, N.; MONTIGNY, C. & BLIER, P.- Modulation of the firing activity of noradrenergic neurones in the rat locus coeruleus by the 5-hydroxytryptamine system. **British Journal of Pharmacology** 120: 865 ± 875, 1997.

HEINRICHER, M.M.; TAVARES, I.; LEITH, J.L. & LUMB, B.M. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brainresearch reviews** 60: 214 – 225, 2009.

HERRERA, M.; SANCHEZ, DEL CAMPO, F.; RUIZ, A. & SMITH AGREDA, V. - Neuronal relationships between the dorsal periaqueductal nucleus and the inferior colliculus (nucleus commissuralis) in the cat. A Golgi study. **J. Anat.**, 158: 137-45, 1, 1988.

HESS, W. & BRUGER, M. - Das subkortikale zentrum der affektiven bewehrreaktion. *Helv. **Physiol. Pharmacol. Acta** 1: 33–52, 1943.*

HILTON, S. M. – The defense –arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. **J. Exp. Biol.**, 100: 159-174, 1982.

HOOD, S.D.; HINCE D.A.; DAVIES, S.J.C.; ARGYROPOULOS, S.; ROBINSON, H.; POTOKAR, J. & NUTT, D.J. Effects of acute tryptophan depletion in serotonin reuptake inhibitor-remitted patients with generalized anxiety disorder. **Psychopharmacology** 208:223–232, 2010.

HOYER, D.; CLARKE, D.E.; FOZARD, J.R.; HARTIG, P.R.; MARTIN, G.; MYLECHARANE, E.J.; SAXENA, P.R. & HUMPHREY, P.P.A. International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin). **Pharmacological reviews** 46(2): 157-203, 2002.

HUFFMAN, R. F. & HENSON, O. W. JR. - The descending auditory pathway and acousticomotor systems: connections with the inferior colliculus. **Brain Res. Rev.**, 3: 295-323, 1990.

JAHANSHAH, A.; LIM, L.W.; STEINBUSCH, H.W.N.; VISSER-VANDEWALLE, N. & TEMEL, Y. Buspirone-induced changes in the serotonergic and non-serotonergic cells in the dorsal raphe nucleus of rats. **Neuroscience Letters** 473 (2010) 136–140.

JARDIM, M.C. & GUIMARÃES, F.S. - *GABAergic and glutamatergic modulation of exploratory behavior in the dorsomedial hypothalamus. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 69: 579–584, 2001.*

JARDIM, M.C.; AGUIAR, D.C.; MOREIRA, F.A. & GUIMARÃES, F.S. - *Role of glutamate ionotropic and benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus on anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 82 : 182 – 189. , 2005.*

JOHNSON, P.L.; LOWRY, C.A.; TRUITT, W.; SHEKHAR, A. – *Disruption of GABAergic tone in the dorsomedial hypothalamus attenuates responses in a subset of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus following lactate-induced panic. **Journal of Psychopharmacology**, 22(6): 642-652, 2008.*

JOHNSON, P.L.; SHEKHAR, A. – *Panic-Prone State Induced in Rats with GABA Dysfunction in the Dorsomedial Hypothalamus Is Mediated by NMDA Receptors. **Journal of Neuroscience**, 26(26): 7093-7104, 2006.*

JONES, S.L. - *Descending noradrenergic influences on pain. **Prog. Brain Res.** 88:381-394, 1991.*

JULIUS, D. & BASBAUM, A.L. - *Molecular mechanisms of nociception. **Nature** 143: 203-210, 2001.*

KEIM, S.R. & SHEKHAR, R.H. – *Effects of GABA_A receptor blockade in the dorso-medial hypothalamus of rats on ACTH and corticosterona secretion. **Brain Res.** 739:46-51, 1996.*

KIM, M. A. LEE, H. S. & WATERHOUSE, B. D. - *Reciprocal connection between subdivision of the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. **Brain Research**, 56-67, 2004.*

KUPFERMAN, I. – *Hypothalamus and limbic system: Motivation. In Kandel, E. R., Schwartz, J.H. & Jessell, T. M. (eds.), **Principles of Neural Science**, 3rd ed. New York: Elsevier, 751-760, 1991.*

KWIAT, G.C. & BASBAUM, A.I. - *The origin of brainstem noradrenergic and serotonergic projections to the spinal cord dorsal horn in the rat. **Somatosens Mot Res.** 9(2):157-73, 1992.*

LANCTÔT, K.L.; HUSSEY, D.F.; HERRMANN, N.; BLACK, S.E.; RUSJAN, P.M.; WILSON, A.A.; HOULE, S.; KOZLOFF, N.; VERHOEFF, N.P. & KAPUR,

S. - *A positron emission tomography study of 5-hydroxytryptamine-1A receptors in Alzheimer disease.* **Am J Geriatr Psychiatry.** 15(10):888-98, 2007.

LEDOUX, J. E. – *Emotion and the limbic system concept.* **Concepts in Neuroscience, 2: 169-199, 1991.**

LEE, H. S.; KIM, M. A. & WATERHOUSE, B. D. - *Retrograde double-labeling study of common afferent projections to the dorsal raphe nucleus and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat.* **J. Comp. Neurol.**, 481: 179-193, 2005.

LEITE-PANISSI, C. R.; COIMBRA, N. C. & MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. - *The cholinergic stimulation of the central amygdala modifying the tonic immobility response and antinociception in guinea pigs depends on the ventrolateral periaqueductal gray.* **Brain Res Bull.**, 60: 167-178, 2003.

LI, N.; WEI, S. Y.; YU, L. C.; MORIYAMA, K.; MITCHELL, J. & PALMER, P. P. - *Role of nociceptin in the modulation of nociception in the arcuate nucleus of rats.* **Brain Res.**, 1025: 67-74, 2004.

LIU, J.; CHU, Y.X.; QIAO, J.Z.; WANG, S. FENG, J. & LI, Q. *5,7-Dihydroxytryptamine lesion of the dorsal raphe nucleus alters neuronal activity of the subthalamic nucleus in normal and 6-hydroxydopamine-lesioned rats.* **Brain Research** 1149: 216- 222, 2007.

LOVICK, T. A. - *Selective modulation of the cardiovascular response but not the antinociception evoked from the dorsal PAG, by 5-HT in the ventrolateral medulla.* **Pflugers Arch.**, 1-2: 222-4, 1990.

LOWRY, C.A.; HALE, M.W.; EVANS, A.K.; HEERKENS, J.; STAUB, D.R.; GASSER, P.J. & SHEKHAR, A. - *Serotonergic Systems, Anxiety, and Affective Disorder. Stress, Neurotransmitters, and Hormones:* **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1148: 86–94 2008.

LUC, J.; DUC, T.; DAVID, W.; RICHAR, D.P.; PAUL, G.G.; GABRIELLA, J. PETER, T.O. - *The NK1 receptor mediates both the hyperalgesia and the resistance to morphine in mice lacking noradrenaline.* **PNAS.** 99: 1029-1034, 2002.

LUPPI, P.H.; ASTON-JONES, G.; AKAOKA, H.; CHOUVET, G. & JOUVET, M. - *Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin.* **Neuroscience** 65:119–160, 1995.

MANCIA, G. & ZANCHETTI, A – *Hypothalamic control of autonomic functions*. Em: **Handbook of Hypothalamus**, P. J. Morgani e J. Panksepp (eds.), Marcel Dekker, New York (1981) pp. 147-201.

MARTIN, J. H. – *Neuroanatomia, cap. VII (2 ed.)* Editora Artes Médicas, Porto Alegre, 1998.

MARTIN, J.H. - *Neuroanatomy text and atlas*. **Mc Graw Hill**.3^o edition. Pg 351-353. New York, 2003.

MCNALLY, G. P; PIGG, M. & WEIDEMANN, G. - *Opioid receptors in the midbrain periaqueductal gray regulate extinction of pavlovian fear conditioning*. **J. Neurosci.**, 31:6912-9, 2004.

MCNAUGHTON, N., CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 28: 285-305, 2004.

MEININGER, V.; POL, D. & DERER, P – *The inferior colliculus of the mouse. A nissl and golgi study*. **Neuroscience**, 17 (4):1159-1179, 1986.

MELZACK, R.; WALL, P.D. **Textbook of Pain**. 4.ed. Londres: Churchill Livingstone. v.18, 1999.

MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. & HOFFMANN, A. – *The parabrachial region as a possible region modulating simultaneously pain and tonic immobility*. **Behav. Brain Res.**, 56: 127-132, 1993.

MILLAN, J.M. - *The Induction of pain: An Integrative review*. **Progress in Neurobiology** 57, pp. 1 to 164, 1999.

MILLAN, J.M. - *Descending control of pain*. **Progress in Neurobiology** 66: 355–474, 2002.

MILLAN, J.M. - *The neurobiology and control of anxious states*. **Progress in Neurobiology** 70: 83–244, 2003.

MIYASE, C. I.; KISHI, R.; FREITAS, R. L.; PAZ, D. A. & COIMBRA, N. C. - *Involvement of pre- and post-synaptic serotonergic receptors of dorsal raphe nucleus neural network in the control of the sweet-substance-induced analgesia in adult Rattus norvegicus (Rodentia, Muridae)*. **Neurosci. Lett.**, 379 (3): 169-73, 2005.

NASH, J.R.; SARGENTE, P.A.; RABINER,, E.A.; SEAN D. HOOD, SPILIOS V. ARGYROPOULOS JOHN P. POTOKAR, PAUL M. GRASBY AND DAVID J. NUTT. - *Serotonin 5-HT_{1A} receptor binding in people with panic disorder: positron emission tomography study*. **The British Journal of Psychiatry** 193, 229–234, 2008.

NETTO, S.M.; SILVEIRA, R.; COIMBRA, C.N. JOCA, S.R.L. & GUIMARÃES, F.S. - *Anxiogenic effect of median raphe nucleus lesion in stressed rats*. **Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 26 1135– 1141, 2002.

NICHOLS, D. S.; THORN, B. E. & BERSTSON, G. G. - *Opiate and serotonergic mechanisms of stimulation-produced analgesia within the periaqueductal gray*. **Brain Res. Bull.**, 22: 717-724, 1989.

NOGUEIRA, R.L. & GRAEFF, F.G. - *Role of 5-HT Receptor Subtypes in the Modulation of Dorsal Periaqueductal Gray Generated Aversion*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 52: 1-6, 1995.

OLIVEIRAS, M.A.; GUILBAUD, G. & BESSON, J.M.A. - *Map of serotonergic structures involved in stimulation producing analgesia in unrestrained freely moving cats*. **Brain Res.**, 164: 317-322, 1979.

OLDS, M. E. & OLDS J.- *Approach avoidance analysis of rat diencephalon*. **J. Comp. Neurol.**, 120:259-295, 1963.

OWENS, M.J. & NEMEROFF, C.B. - *Role of Serotonin in the Pathophysiology of Depression: Focus on the Serotonin Transporter*. **GUN. CHEM.** 40/2, 288-295, 1994.

PAKSEPP, J. – *The psychoneurology of fear: evolutionary perspectives and the role of animal models in understanding human anxiety*. Em: *Handbook of Anxiety*, G. D. Burrows; M. Roth e R. Noyers, Jr. (eds.), vol. 3, **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam (1990) pp. 3-58.

PAXINOS, G. & WATSON, C. - *The Rat Brain: In Stereotaxic Coordinates*. **Academic Press**, Sidney (1997).

PAZOS, A.; PROBST, A. & PALACIOS, J.M. - *Autoradiographic Distribution of Serotonin Transporters and Receptor Subtypes in Human Brain*. **Neuroscience** 21:1: 123-139, 1987.

PEYRON, C; PETIT, J.M.; RAMPON, C.; JOUVET M. & LUPPI, P.H. - *Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods.* **Neuroscience** 82, 2: 443–468, 1998.

POOBE, R.L.H. & ZANGROSSI, H.J. - *5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal Gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus.* **Psychopharmacology** 183: 314–321, 2005.

REYNOLDS, D.V. - *Surgery in rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation.* **Science**, 164: 444-445, 1969.

REX, A.; THOMAS, H.; HORTNAGL, H.; VOITS, M. & FINK, H. - *Behavioural and microdialysis study after neurotoxic lesion of the dorsal raphe nucleus in rats.* **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 74: 587–593, 2003.

ROSA, M.L.N.M.; OLIVEIRA, M.A.; VALENTE, R.B.; COIMBRA, N.C. & PRADO, W.A. - *Pharmacological and neuroanatomical evidence for the involvement of the anterior pretectal nucleus in the antinociception induced by stimulation of the dorsal rafe nucleus in rats.* **Pain.**, 74: 171-179, 1998.

SANTOS, J.M.; MACEDO, C.E.; BRANDÃO, M.L. - *Gabaergic mechanisms of hypothalamic nuclei in the expression of conditioned fear.* **Neurobiology of Learning and Memory** 90:560–568., 2008

SAJDYK, T.J.; KATNER, J.S. & SHEKHAR, A. – *Monoamines in the dorsomedial hypothalamus of rats following exposure to different tests of “anxiety”.* *Prog. Neuropsychopharmacol. & Biol. Psychiat.* 21: 193-208, 1997.

SCHENBERG, L.C.; DE AGUIAR JC, GRAEFF FG. - *GABA modulation of the defense reaction induced by brain electrical stimulation.* **Physiol Behav.** 31(4):429-37, 1983.

SCHMITT, P.; DI SCALA, G.; JENCK, F. & SANDNER, G. *Periventricular strutures, elaboration of aversive effects and processing of sensory enformation. In: Bandler R, editor. Modulation of sensorimotor activity during alterations in behavioral states. New York: Epub., Alan Liss, 1984.*

SCHMITT, P.; CARRIVE, P.; DISCALA, G.; JENCK, F.; BRANDÃO, M. L.; BAGRI, A.; MOREAU, J. L. & SANDLER, G. - *A neuropharmacological study of the periventricular neural substrate involed in flight.* **Behav. Brain Res.**, 22:181-190., 1986

SEGAL, M.- *Serotonergic innervation of the locus coeruleus from the dorsal raphe and its action on responses to noxious stimuli.* **J. Physiol.**, 286: 401-415, 1979.

SENA, L.M.; BUENO, C.; POOBE, R.L.H.; ANDRADE, T.G.C.S.; ZANGROSSI, H. & VIANA, M.B.- *The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats.* **Behavioural Brain Research** 142: 125–133, 2003.

SHEKHAR, A., KEIM, S.R., SIMON, J.R., MCBRIDE, W.J. - *Physiological arousal elicited by sodium lactate infusion in rats with dorsomedial hypothalamic GABA dysfunction.* **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, 55 (2): 249-256, 1996.

SHEKHAR, A. & KEIM, S.R. – *The Circumventricular Organs form a potential neural pathway for lactate sensitivity: Implication for panic disorder.* **The Journal of Neuroscience**, 17 (24): 9726-9735

SHEKHAR A, KATNER JS, SAJDYK TJ, KOHL RR. - *Role of norepinephrine in the dorsomedial hypothalamic panic response: an in vivo microdialysis study.* **Pharmacol Biochem Behav.** 71(3):493-500, 2002.

SHEKHAR, A., SAJDYK, T.J.; GEHLERT, D.R. & RAINNIE, D.G. *The amygdala, panic disorder, and cardiovascular responses.* **Ann N Y Acad Sci.** 985:308-25, 2003.

SIEGEL, A & POTT, C. B. – *Neural substrates of aggression and flight in the cat.* **Prog. Neurobiol.**, 31: 261-283, 1988.

STAMFORD, J.A. - *Descending control of pain.* **British Journal of Anaesthesia**; 75: 217-227, 1995.

TOMAZ, H.; FINK, H.; SOHR, T.R. & VOITS, M. - *Lesion of the median raphe nucleus: a combined behavioral and microdialysis study in rats.* **Pharmacol Biochem Behav.** 65(1):15-21, 2000.

UNDERWOOD, MD, KHAIBULINA AA, ELLIS SP, MORAN A, RICE PM, MANN JJ, ARANGO V. - *Morphometry of the dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in suicide victims.* **Biol Psychiatry.** 46(4):473-83, 1999.

VANHATALO, S. & SOINILA, S. - *Serotonin is not synthesized, but specifically transported in the neurons of the hypothalamic dorsomedial nucleus.* **Eur J Neurosci.** 10(5):1930-5, 1998.

VARGAS, L.C., MARQUES, T.A. & SCHENBERG, L.C. - *Micturition and defensive behaviors are controlled by distinct neural networks within the dorsal periaqueductal gray and deep gray layer of the superior colliculus of the rat.* **Neurosci Lett.** 280(1):45-8, 2000.

VARNÄS, K.; HALLDIN, C. & HALL, H. - *Autoradiographic Distribution of Serotonin Transporters and Receptor Subtypes in Human Brain.* **Human Brain Mapping** 22:246–260, 2004.

WEISS, J. M.; GLAZER, H. I. & POHORECKY, L. A. - *Coping behavior and neurochemical changes: An alternative explanation for the original "learned helplessness" experiments.* In: Serban, G.; Kling, A., eds. **Animal models in human psychobiology.** New York: Plenum Press; 141-173, 1976.

WILLIS, W. D. & WESTLUND, K. N. - *Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain.* **J. Clin. Neurophysiol.**, 14: 2-31, 1997.

YAARI, Y. & DEVOR, M. - *Phenytoin suppresses spontaneous ectopic discharge in rat sciatic nerve neuromas.* **Neurosci Lett.** 4;58(1):117-22, 1985.

YIP J. T, LEUNG K. K., LI L. S., LEE T. M. - *The role of sub-cortical brain structures in emotion recognition.* **Brain Inj.**, 12:1209-17, 2004.

ZANGROSSI, H.J.; VIANNA, M.B. & GRAEFF, F.G. - *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, 1999.

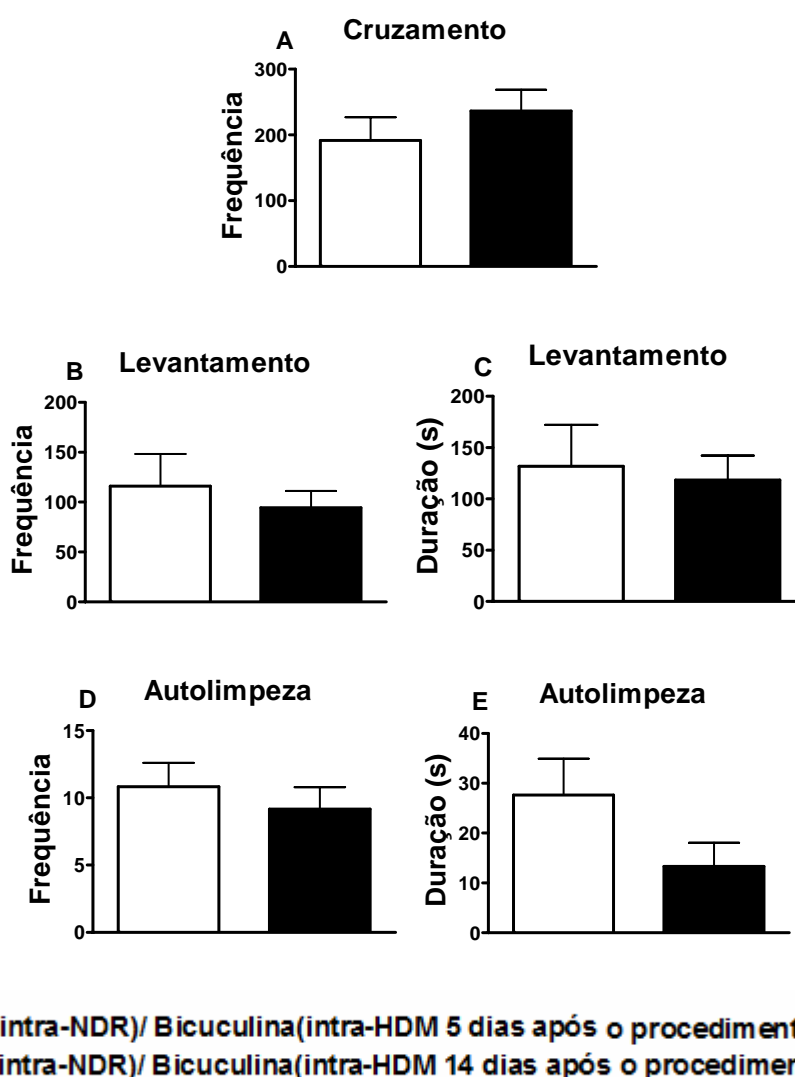
ZHANG, S. P.; BANDLER, R. & CARRIVE, P. – *Flight and immobility evoked by excitatory amino acid microinjection within distinct parts of the subtentorial midbrain pariaqueductal gray of the cat.* **Brain Res.**, 520: 73-82, 1990.

ZARETSKAIA, M.V; ZARETSKY, D.V.; SARKAR, S.; SHEKHAR, A. & DIMICCO, J.A. - *Induction of Fos-Immunoreactivity in the Rat Brain Following Disinhibition of the Dorsomedial Hypothalamus.* **Brain Res.** 1200C: 39–50, 2008.

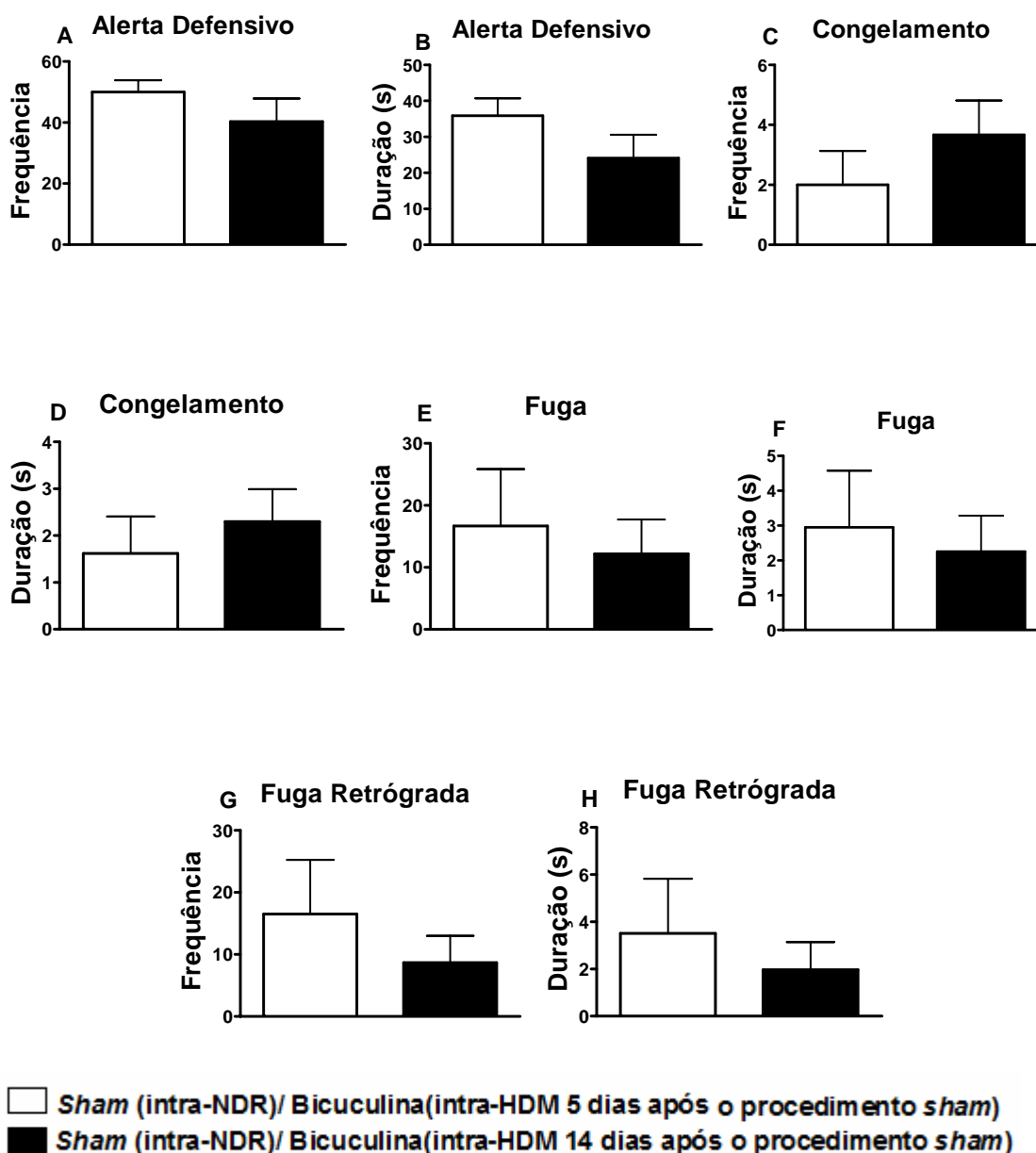
ANEXO

ANEXO

Análise Comportamental: Efeito da ação da bicuculina no hipotálamo medial (HM) (40ng/0,2 μ L intra-HM) 5 e 14 dias após o procedimento *sham* no núcleo dorsal da rafe (intra-NDR) (N=6), em grupos independentes de animais, sobre as respostas comportamentais. A análise estatística não mostrou diferença estatisticamente significativa nos comportamentos exploratórios e defensivos ($t= 0,244$ à $1,519$; $P>0,05$ em todos os casos de acordo com o teste *t* de Student).

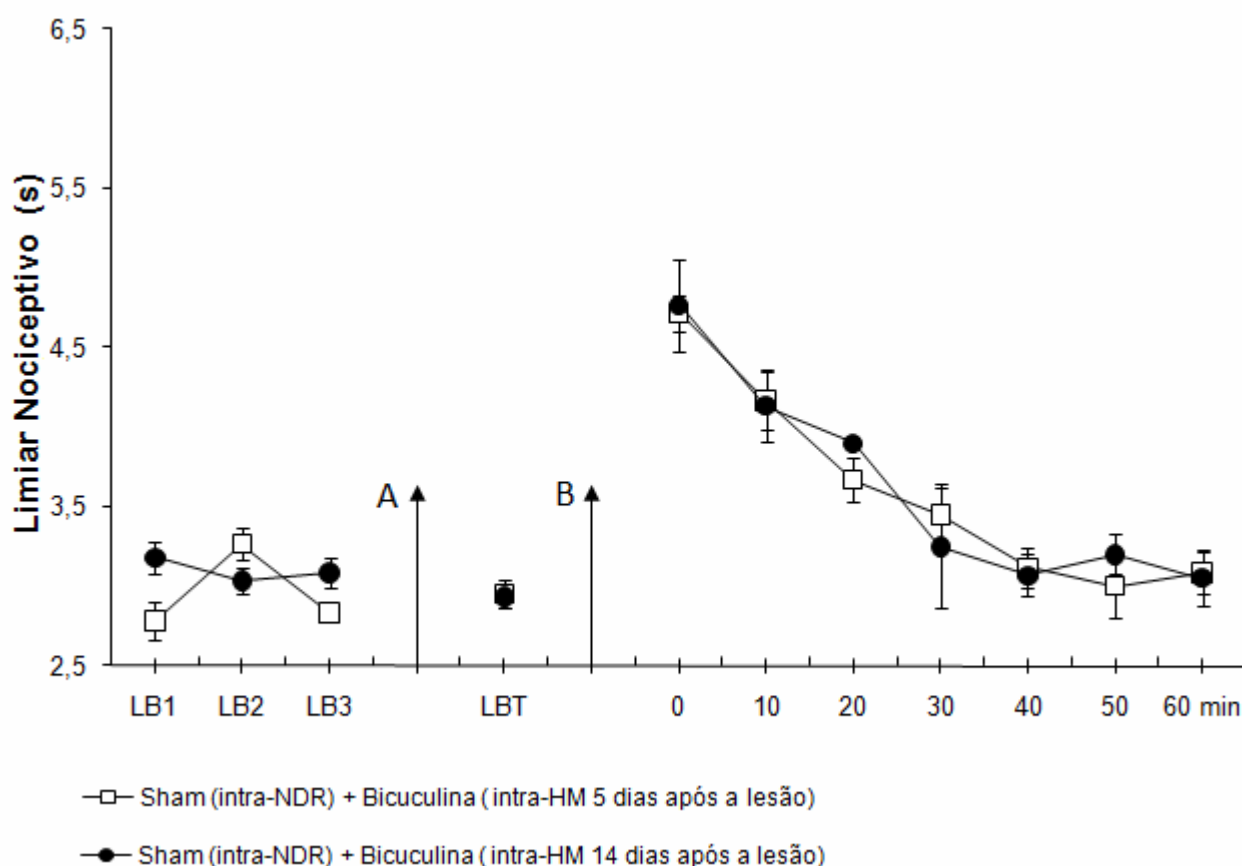


Efeito da microinjeção de bicuculina no hipotálamo medila (HM), 5 ou 14 dias após o procedimento *Sham no núcleo drosal da rafe* (intra-NDR), sobre os comportamentos exploratórios de cruzamento (A), frequência (B e D) e tempo (C e E) de levantamento e autolimpeza, respectivamente (N=6); $P>0,05$ em todos os casos, segundo o teste *t* de Student. As colunas representam a média \pm EPM.



Efeito da microinjeção de bicuculina no hipotálamo medial (HM), 5 ou 14 dias após o procedimento controle no núcleo dorsal da rafe (NDR) (*Sham* intra-NDR), na frequência (A, C, E e G) e no tempo (B, D, F e H) dos comportamentos de alerta defensivo, congelamento, fuga e fuga retrógrada, respectivamente. (N=6); $P > 0,05$ em todos os casos, segundo o teste *t* de Student. As colunas representam a média \pm EPM.

Análise do limiar nociceptivo: Efeito da administração de bicuculina no hipotálamo medial (HM) (40ng/0,2 μ L intra-HM) 5 e 14 dias após o procedimento *sham* no núcleo dorsal da rafe (intra-NDR) (N=6), em grupos independentes de animais, sobre o limiars nociceptivos aferidos pela latência de retirada da cauda. A análise estatística não mostrou diferença significativa na analgesia induzida pelos comportamentos defensivos (teste *t* pareado de Student, $t = 0,41$; $P > 0,05$).



Efeito da administração de bicuculina no hipotálamo medial (HM) 5 e 14 dias após o procedimento *sham* no núcleo dorsal da rafe (NDR) nos limiars nociceptivos, N=6. $P > 0,05$ em todos os casos, de acordo com o teste *t* de Student. LB: Linha de Base, medida antes do procedimento cirúrgico. LBT: Linha de base verificada antes do procedimento experimental. A: indica o procedimento *sham*. B: Administração de bicuculina intra-HM. Eixo x: tempo (minutos) em que medidas consecutivas da latência de retirada de cauda foram tomadas. Eixo y: Limiar Nociceptivo (em segundos) medido pela latência de retirada da cauda. Aumentos nos limiars nociceptivos foram representados como médias \pm EPM.

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](#)