

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Departamento de Farmacologia

Laboratório de Neuroanatomia e Neuropsicobiologia

*Envolvimento das Redes Neurais do Locus Coeruleus e da
Neurotransmissão Noradrenérgica no Núcleo Dorsal da Rafe e no
Hipotálamo Medial nas Reações de Fuga Evocadas pela Estimulação
Química do Hipotálamo Medial*

Andrés Uribe Mariño

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



***Envolvimento das Redes Neurais do Locus Coeruleus e da
Neurotransmissão Noradrenérgica no Núcleo Dorsal da Rafe e no
Hipotálamo Medial nas reações de Fuga evocadas pela Estimulação
Química do Hipotálamo Medial***

Andrés Uribe Mariño

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

Uribe-Mariño, Andrés

Envolvimento das Redes Neurais do Locus Coeruleus e da Neurotransmissão Noradrenérgica no Núcleo Dorsal da Rafe e no Hipotálamo Medial nas Reações de Fuga Evocadas pela Estimulação Química do Hipotálamo Medial

99p.: il.:30cm

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. Comportamento Defensivo; 2. Hipotálamo Medial; 3. Neurotransmissão Noradrenérgica; 4. Locus Coeruleus; 5. Nucleo Dorsal da Rafe; 6. Receptores Noradrenérgicos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Andrés Uribe Mariño

ENVOLVIMENTO DAS REDES NEURAIS DO LOCUS COERULEUS E DA NEUROTRANSMISSÃO NORADRENÉRGICA NO NÚCLEO DORSAL DA RAFE E NO HIPOTÁLAMO MEDIAL NAS REAÇÕES DE FUGA EVOCADAS PELA ESTIMULAÇÃO QUÍMICA 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: _____

Profa. Dra Anette Hoffmann

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Célio Marcos dos Reis Ferreira

Instituição: FACISA-UNIPAM

Assinatura: _____

DEDICO,

À minha esposa *Maria Angélica Castiblanco*, esse anjo que foi colocado no meu caminho e que tem me dado os melhores momentos da minha vida. Não me resulta possível expressar em palavras a gratidão que sinto pelo teu apoio, paciência, compreensão e amor. Obrigado pela tua alegria, por esse sorriso que me deu otimismo mesmo nos momentos difíceis. Esse trabalho é tanto teu quanto meu.

A *Enrique Uribe*, mais que pai, um incrível amigo e guia. Hoje termino esta etapa da minha vida graças a teu apoio e fé em mim. Acreditar nas próprias capacidades é fácil quando se tem uma pessoa como você do lado. Não tem como te agradecer pelo carinho e a força de tuas palavras toda vez que o caminho a seguir não parecia claro.

À minha mãe *Maria Cristina Mariño*, grandíssimo exemplo de paz, serenidade e sabedoria. Contigo poderia atravessar no meio da maior tempestade em absoluta calma. Obrigado pela tranquilidade e todo o amor recebido. Realmente foram uma enorme ajuda e me permitiram atingir todos meus objetivos.

A *Monica Uribe*, além de irmã, grande parceira e amiga inseparável. Obrigado por toda essa alegria que tanto caracteriza você e que tem sido a fonte de grandes momentos. Assim como compartilhamos tantas experiências através de nossa vida, hoje eu quero compartilhar esse triunfo contigo. Você sabe que apesar da distancia, você também faz parte importante dessa historia.

Ao *Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra*. São poucas as vezes na vida nas quais durante o nosso caminho encontramos pessoas que com sabedoria, humildade, grande sentido de responsabilidade e carinho, marcam as nossas ações e se tornam exemplos inesquecíveis, impactando épocas inteiras da nossa existência e cultivando em nós inúmeras capacidades e um enorme potencial para construir um grande futuro. Muito Obrigado.

AGRADEÇO,

À *Profa. Dra. Anette Hoffman* e ao *Prof. Dr. Célio Marco dos Reis Ferreira* por terem aceitado participar da banca examinadora e terem contribuído com suas sugestões para melhorar a qualidade do presente trabalho.

A todos meus grandes amigos do *Laboratório de Neuroanatomia e Neuropsicobiologia (LNN)* que sabem que foram parte do presente trabalho e constituíram um apoio incondicional dessa que foi, até o momento, a melhor experiência de minha vida. Graças a todos vocês, hoje meu coração também fala português e acredita que no mundo podem existir amizades sinceras e profundas, capazes de transcender fronteiras. Acho que nunca deixarei o Brasil pois uma parte de meu coração ficará sempre com vocês. MUCHAS GRACIAS!!!

A todos os grandes colegas que passaram pelo *LNN* e que hoje encontram-se realizando seus próprios sonhos em diferentes lugares do Brasil. Obrigado por ter me recebido e acompanhado no que foi um grande processo de adaptação. Vocês foram um grande exemplo para mim. O presente trabalho é produto também de seu esforço e dedicação.

À *Lina Maria Perilla*. No primeiro lugar, devo agradecer às circunstâncias por ter nos dado a possibilidade de iniciar essa grande amizade. Hoje não acredito mais em coincidências e sei que simplesmente existem encontros que não ocorrem ao acaso. Na verdade não sei, nem quero imaginar, o que teria sido de nós sem a tua companhia e apoio. As vezes irmã, as vezes mãe, mas sempre presente, cuidando de nós em cada passo do caminho. Amizades como a nossa, de sangue colombiana e coração brasileiro, vão além da nacionalidade e com certeza sobreviverão à distância.

A *Julian Tejada*, amigo incondicional e irmão do coração. Resulta muito difícil expressar em tão curto espaço e com tão limitadas palavras o tanto que eu preciso agradecer para você. Existem momentos nos que você conhece pessoas e desde o primeiro momento você já sabe que não precisa falar muito para se dar de conta que existe uma amizade profunda e sincera. É realmente um privilegio poder contar com um amigo como você, sempre disposto a ajudar com o mais mínimo detalhe, sem importar o dia ou a hora. Obrigado pelos bons momentos que passamos juntos e que fizeram do nosso tempo no Brasil uma experiência inesquecível. Obrigado também pelos momentos que ainda virão porque sei que amizades como a nossa permanecerão no tempo apesar de existirem grandes distancias.

À *Sonia Maria Stefanelli de Andrade* e *Fátima Helena Ferreira Petean*, pelo incondicional apoio durante esses dois anos e pela dedicação e competência nas resoluções administrativas. Obrigado pelos conselhos e por tentar sempre mostrar a melhor alternativa nos momentos difíceis. Vocês são pessoas únicas. Lembrarei sempre do seu otimismo e alegria.

À *CAPES* e *FAPESP* pelo auxilio financeiro.

,

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	III
INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. MATERIAL E METODOS	23
3.1 ANIMAIS	23
3.2 ESTUDO NEUROFISIOLOGICO	23
3.3 ESTUDO NEUROFARMACOLÓGICO NO NÚCLEO DORSAL DA RAFA	24
3.3.1 CIRURGIA	24
3.3.2 DROGAS	25
3.4 ESTUDO NEUROFARMACOLÓGICO NAS REDES NEURAS DO HIPOTÁLAMO MEDIAL	25
3.4.1 CIRURGIA	25
3.4.2 DROGAS	26
3.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	26
3.6 HISTOLOGIA	27
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27

3.8 EQUIPAMENTOS	28
4. RESULTADOS	29
4.1 ESTUDO NEUROFISIOLÓGICO	29
4.2 ESTUDO NEUROFARMACOLÓGICO NO NÚCLEO DORSAL DA RAFE	40
4.3 ESTUDO NEUROFARMACOLÓGICO NO HIPOTÁLAMO MEDIAL.	52
5 DISCUSSÃO	64
5.1 ESTUDO NEUROFISIOLÓGICO	64
5.2 ESTUDO NEUROFARMACOLÓGICO NO NÚCLEO DORSAL DA RAFE	69
5.3 ESTUDO NEUROFARMACOLÓGICO NO HIPOTÁLAMO MEDIAL	75
6 CONCLUSÃO	81
7. REFERÊNCIAS	83

RESUMO

A estimulação de regiões mesencefálicas como a substância cinzenta periaqueductal, camadas profundas do colículo superior e núcleo central do colículo inferior, eliciam respostas defensivas semelhantes àquelas que caracterizam a síndrome do pânico. Tem sido estabelecido que o bloqueio do receptor GABA_A no hipotálamo medial induz reações defensivas mais organizadas e menos intensas. Métodos utilizando neurotraçadores de captação e transporte retrógrado têm identificado conexões do hipotálamo medial com o núcleo dorsal da rafe e o locus coeruleus, assim como conexões recíprocas entre esses dois núcleos do tronco cerebral. O objetivo do presente projeto foi estudar o papel das redes neurais do locus coeruleus e da neurotransmissão noradrenérgica no núcleo dorsal da rafe e no hipotálamo nas reações de pânico evocadas pela estimulação química do hipotálamo medial. O projeto foi dividido em três estudos.

1) *Estudo Neurofisiológico*: Ratos Wistar machos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cannulas-guias no locus coeruleus e no hipotálamo medial. Durante a cirurgia, microinjeções da neurotoxina noradrenérgica DSP-4 (1µg/0.2µl) (n=8) ou procedimentos *sham* (n=8) foram realizadas diretamente no locus coeruleus. Cinco dias depois, microinjeções de bicuculina (40ng/0.2 µl) foram realizadas no hipotálamo medial.

2) *Estudo Neurofarmacológico no núcleo dorsal da rafe*: Ratos Wistar machos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cannulas-guias no núcleo dorsal da rafe e no hipotálamo medial. Cinco dias após a cirurgia, os animais foram pré-tratados no núcleo dorsal da rafe com solução salina (NaCl a 0,9%; 0.2µL, n=8) ou um dos antagonistas noradrenérgicos WB4101 (α_1 , n=8), RX 821002 (α_2 , n=8) ou propanolol (β , n=8) em uma concentração de 5 µg/0.2µl. Dez minutos depois, foi administrada bicuculina (40ng/0.2 µl) no hipotálamo medial.

3) *Estudo Neurofarmacológico no hipotálamo medial*: Ratos Wistar machos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação de uma cannula-guia no hipotálamo medial. Cinco dias após a cirurgia, os animais foram pré-tratados com solução salina (NaCl a 0,9%; 0.2µL, n=8) ou um dos antagonistas noradrenérgicos WB4101 (α_1 , n=8), RX 821002 (α_2 , n=8) ou propanolol (β , n=8) em uma concentração de 5 µg/0.2µl. Dez minutos depois, foi administrada bicuculina (40ng/0.2 µl) no hipotálamo medial. Nos estudos citados, imediatamente após a microinjeção de

bicuculina, os animais foram colocados no teste de campo aberto, onde número de cruzamentos e frequência e duração dos seguintes comportamentos foram registrados durante 15 minutos: levantamentos, avaliação de risco, atenção defensiva, movimento defensivo retrógrado, comportamento rotatório, fuga e saltos. Os dados obtidos mostram que a lesão do locus coeruleus e o antagonismo de receptores α_1 e β no núcleo dorsal da rafe e no hipotálamo medial induzem uma diminuição significativa na expressão dos comportamentos defensivos evocada pela estimulação do hipotálamo medial. Também, observou-se um aumento significativo em algumas respostas comportamentais após o bloqueio dos receptores α_2 nas duas estruturas. Assim, os achados do presente trabalho indicam que as vias que conectam o locus coeruleus com o núcleo dorsal da rafe e o hipotálamo medial, através de sua ação sobre os receptores α_1 , α_2 e β noradrenérgicos, modulam as respostas defensivas evocadas pela estimulação do hipotálamo medial.

Palavras-Chaves: Comportamento Defensivo; Hipotálamo Medial; Neurotransmissão Noradrenérgica; Locus Coeruleus; Nucleo Dorsal da Rafe; Receptores Noradrenérgicos

ABSTRACT

Stimulation of mesencephalic regions such as periaqueductal gray matter, deep layers of the superior colliculus and central nucleus of the inferior colliculus evoke defensive responses very similar to those that characterize panic disorder. It has been established that GABA_A receptor blockade in the medial hypothalamus induces more organized and less intense defensive reactions. Methods employing retrograde neurotracers have identified pathways connecting the medial hypothalamus with the dorsal raphe nucleus and the locus coeruleus together with reciprocal connections between these two brainstem nuclei. The aim of the present project was to study the role played by the neural networks of the locus coeruleus and the noradrenergic neurotransmission in the dorsal raphe nucleus and the medial hypothalamus on panic-like reactions evoked by the chemical stimulation of the medial hypothalamus. The present work was divided in three studies. 1) *Neurophysiological Study*: Male Wistar rats were submitted to stereotaxic surgery for the implantation of guide cannulae in the locus coeruleus and medial hypothalamus. During surgery, microinjections of the noradrenergic neurotoxin DSP-4 (1µg/0.2µl) (n=8) or sham procedures (n=8) were performed directly in the locus coeruleus. Five days later, microinjections of bicuculine (40ng/0.2 µl) were made in the medial hypothalamus. 2) *Dorsal raphe nucleus neuropharmacological study*: Male Wistar rats were submitted to stereotaxic surgery for the implantation of guide cannulae in the dorsal raphe nucleus and the medial hypothalamus. Five days later, the animals were pretreated in the dorsal raphe nucleus with saline solution (NaCl a 0,9%; 0.2µL, n=8) or with one of the noradrenergic antagonists WB4101 (α_1 , n=8), RX 821002 (α_2 , n=8) ou propranolol (β , n=8) in a concentration of 5 µg/0.2µl. Ten minutes later, bicuculine (40ng/0.2 µl) was administered in the medial hypothalamus. 3) *Medial hypothalamus neuropharmacological study*: Male Wistar rats were submitted to stereotaxic surgery for the implantation of a guide cannula in the medial hypothalamus. Five days after surgery, the animals were pretreated with saline solution (NaCl 0,9%; 0.2µL, n=8) or with one of the noradrenergic antagonists WB4101 (α_1 , n=8), RX 821002 (α_2 , n=8) or propranolol (β , n=8) in a concentration of 5 µg/0.2µl. Ten minutes later, bicuculine (40ng/0.2 µl) was administered in the medial hypothalamus. In the mentioned studies,

immediately after the microinjection of bicuculine, all animals were placed in an arena (open field test) where number of crossings and frequency and duration of the following behaviors were recorded during a 15- minute period: Rearing, risk assessment, defensive attention, defensive retrograde movement, turning behavior, escape and jumps. Data obtained show that the lesion of the locus coeruleus together with the antagonism of α_1 and β receptors in the dorsal raphe nucleus and medial hypothalamus induces a significant decrease in the expression of defensive behaviors evoked by the stimulation of the medial hypothalamus. In addition, a significant increase in some of the behaviors under study was observed after the blockade of α_2 receptors in these both structures. Therefore, the present findings suggest that the noradrenergic output from the locus coeruleus to the dorsal raphe nucleus and medial hypothalamus, through its actions on noradrenergic α_1 , α_2 and β receptors, modulate defensive responses elicited by the stimulation of the medial hypothalamus.

Keywords: Defensive Behavior; Medial Hypothalamus; Noradrenergic Neurotransmission; Locus Coeruleus; Dorsal Raphe Nucleus; Noradrenergic Receptors

1. INTRODUÇÃO

Através da evolução, com o surgimento do sistema nervoso central, surge a possibilidade de incrementar o repertório comportamental dos organismos e, assim, de aumentar a probabilidade de sobrevivência dos indivíduos, o que, por sua vez, aumenta as possibilidades da espécie sobreviver (SWANSON, 2004). É claro que, na medida em que avança a evolução e cresce a complexidade do ambiente ao qual os organismos tinham que se adaptar, é cada vez mais necessária a implementação de novas estratégias adaptativas que beneficiem a continuidade da espécie. Conforme se vão desenvolvendo novos repertórios de conduta, inicia uma competição entre diferentes espécies pela sobrevivência e aumenta a pressão do ambiente sobre os animais. Nesse contexto, surgem as emoções com um grande valor adaptativo, já que permitem aos organismos gerar padrões comportamentais de aproximação ou de retirada frente a diferentes estímulos, dependendo do valor que eles têm para a própria sobrevivência. Naturalmente, o aparecimento das emoções implica na presença de um substrato biológico que permita as suas manifestações. Assim, começa a evoluir uma série de subsistemas, dentro do sistema nervoso central, capazes de organizar conjuntos de respostas tanto fisiológicas quanto motoras em situações que representam extremo perigo. Desta maneira a aversão começa exercer um papel fundamental nos processos adaptativos, guiando também a evolução do próprio sistema nervoso (MOTA e cols., 2009; CABANAC e cols., 2009).

Em termos gerais, uma resposta emocional está composta por três componentes: comportamental, autonômico e hormonal. Por sua vez, o componente comportamental consiste em movimentos musculares que devem guardar relação com a situação particular na qual se encontra o organismo. Quanto às respostas autônomas, elas facilitam a execução dos comportamentos, provendo uma rápida mobilização da energia, permitindo, assim, a elaboração dos vigorosos movimentos necessários. Em relação às respostas hormonais, elas reforçam as respostas autônomas e possibilitam a organização de ações eficazes em um contexto aversivo (MIKHEENKO e cols., 2010; REEKIE e cols., 2008; MILLAN, 2003; BOUDARENE e cols., 2002; RITTENHOUSE e cols., 1992).

É notório, então, o papel dos estados aversivos no favorecimento dos processos adaptativos durante a evolução. Contudo, em nossa espécie, existem circunstâncias nas quais eles se revelam sem uma clara funcionalidade e dão lugar ao aparecimento de condições patológicas que obstruem a capacidade da pessoa de se adaptar ao ambiente (CHECHKO e cols., 2009). Particularmente, a síndrome de pânico e os distúrbios de ansiedade constituem entidades crônicas e recorrentes que incluem um conjunto de alterações emocionais, fisiológicas e comportamentais que possuem um impacto significativo no comportamento, deste modo, prejudicando a qualidade de vida do indivíduo (ROBERGE et al., 2008). Particularmente, a síndrome de pânico caracteriza-se por apresentar ataques de ansiedade discretos de maneira recorrente acompanhados por uma série de sintomas somáticos como palpitações, parestesias, hiperventilação, dor no peito, enjôo, tremores e dispnéia (FREIRE e cols., 2010). Geralmente, essa condição apresenta-se junto com agorafobia, que consiste na presença de um medo excessivo patológico de ambientes abertos, ou mesmo aquelas situações contextuais que o paciente associa aos ataques de pânico, deixando de se expor a situações como dirigir, frequentar lugares sejam abarrotados, ou ermos, entre outros locais e ações, nos quais existem dificuldades para pedir ajuda ou organizar uma fuga orientada a algum local seguro (COELHO e cols., 2010; MARKS e cols., 2010).

Usualmente, a síndrome de pânico começa com um ataque espontâneo que freqüentemente leva ao indivíduo a procurar tratamento médico, por exemplo, apresentando-se numa sala de emergência sob o pensamento de que está sofrendo um ataque ao coração, um acidente vascular cerebral, perdendo a razão ou sofrendo alguma outra condição médica. Pode passar algum tempo antes de sofrer subseqüentes ataques ou o paciente pode continuar tendo ataques frequentes. Geralmente, os pacientes começam a se sentir amedrontados e ansiosos depois do primeiro ataque, esperando isso ocorrer de novo. Usualmente, os pacientes começam a temer gradualmente o enfrentamento de situações que associam com os ataques de pânico, nas que não existe uma forma fácil de fugir, caso ocorra um ataque, daquelas em que não haverá ajuda disponível, ou daquelas em que eles possam se sentir embaraçados caso outras pessoas percebam o ataque (RUFEL e cols., 2010; BEESDO-BAUM e cols., 2009; BEESDO e cols., 2009).

Dentro da patofisiologia da síndrome de pânico, existem claras evidências de irregularidades da função noradrenérgica, já que, com frequência, os pacientes relatam

alterações cardiovasculares, gastrointestinais e respiratórias (BAILEY e cols., 2003). Devido ao papel desempenhado pela noradrenalina, como neurotransmissor, no controle desses sistemas, e tendo em mente a relevância do locus coeruleus (LC), como principal fonte de noradrenalina do tronco encefálico, pequenas mudanças fisiológicas nesses pacientes podem resultar numa ativação anormal dos neurônios do LC. (SINGEWALD e SHARP, 2000; SULLIVAN e cols., 1999). Essas interações funcionais poderiam explicar a associação entre os ataques de ansiedade e taquicardia, taquipneia, hipoglicemia e distensão visceral. Por sua vez, a importância do sistema noradrenérgico no medo condicionado pode ser responsável pelo desenvolvimento dos sintomas fóbicos nesses pacientes. Também, o envolvimento dos neurônios noradrenérgicos na aprendizagem e memória pode explicar a persistência de memórias traumáticas. Igualmente, a atribuição do sistema noradrenérgico na geração de alguns sintomas tem sido demonstrada utilizando antagonistas do receptor α_2 , os quais, quando administrados em pacientes, produzem um ataque de pânico (CHARNEY e cols., 1984; CHARNEY e cols., 1987; CHARNEY e cols., 1992). Da mesma forma, infusões de isoproterenol, uma droga seletiva para receptores β -adrenérgicos que age periféricamente, desencadeiam respostas de ansiedade, quando administradas em pacientes com síndrome de pânico, o que concorda com a hipótese de uma hipersensibilidade do receptor β_1 na síndrome de pânico (POHL e cols., 1988; POHL e cols., 1990).

Naturalmente, o sistema noradrenérgico não age sozinho para produzir os citados sintomas. Assim, cabe esperar que a interação entre o sistema noradrenérgico e outros sistemas neurotransmissores também possa estar envolvida na geração dessa patologia. Um estudo feito em pacientes com síndrome de pânico encontrou uma diminuição significativa nos níveis de serotonina (5-HT) em comparação com sujeitos controles (SCHNEIDER e cols., 1987). Portanto, tem sido proposto que interações entre o sistema noradrenérgico e o serotoninérgico poderiam mediar algumas propriedades antipânico dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina tais como clomipramina, fluvoxamina, zimelidina e fluoxetina. Por sua vez, a administração em pacientes do agente liberador de 5-HT, a flenfluramina, tem sido seguida de efeitos ansiogênicos, ao lado de incrementos nos níveis plasmáticos de prolactina e cortisol (TARGUM e MARSHALL, 1989).

É claro que, além das mencionadas alterações, existem múltiplas disfunções que agem em conjunto para produzir as manifestações clínicas que apresentam esses pacientes e que

dificultam a sua integração aos diferentes contextos da vida cotidiana. Apesar de ter conseguido grandes avanços na compreensão de alguns dos eventos neurofisiológicos que acompanham este síndrome, ainda persistem múltiplas interrogações que precisam ser esclarecidas. Consequentemente, o estudo dos eventos neurobiológicos e neuroquímicos que desencadeiam os sintomas do pânico é relevante devido ao seu potencial para o desenvolvimento de alternativas mais eficazes de intervenção farmacológica.

Grande parte do conhecimento alcançado até agora respeito ao substrato neural do medo e da ansiedade é derivado de trabalhos realizados em modelos animais, particularmente em felinos e roedores. Com a utilização de diferentes abordagens científicas, têm sido identificadas as diversas estruturas que participam na elaboração e modulação de estados aversivos que muito se assemelham àqueles experimentados por pacientes com síndrome de pânico. Dessa forma, procedimentos neuroanatômicos, neurofisiológicos e farmacológicos têm distinguido diferentes estruturas mesencefálicas e prosencefálicas com participação na elaboração de reações emocionais induzidas por estímulos aversivos (CABRAL e cols, 2006; DEL-BEM e GRAEFF, 2009; CARVALHO-NETTO e cols., 2009). Em geral, sabe-se que áreas como a substância cinzenta periaqueductal (SCP), as camadas profundas do colículo superior, o núcleo central do colículo inferior, o complexo amigdalóide, e o hipotálamo medial têm um papel fundamental na manifestação das respostas defensivas. Concebe-se que não seria muito adaptativo se somente uma ou outra estrutura estivesse a cargo da elaboração de padrões tão complexos de comportamento, já que a sua lesão ou alteração provocaria consequências muito sérias para o organismo. Pelo contrário, se a função estivesse distribuída numa série de estruturas interconectadas, existiria a possibilidade de elaborar condutas mais ricas e diversificadas, capazes de alterações plásticas com maior facilidade para se adaptar melhor ao ambiente. É por isso, então, que nenhuma de essas estruturas age de maneira independente para causar o conjunto de respostas fisiológicas e motoras que distinguem os comportamentos de medo e pânico. Pelo contrário, existem circuitos neurais que se comunicam uns com os outros e permitem uma ampla rede de atuação que muito beneficia o organismo. Baseado nisso, esse conjunto de estruturas tem sido categorizado como o sistema encefálico da aversão (REIMER e cols., 2008; CABRAL e cols., 2006; TRONCOSO e cols., 1998).

Em termos gerais, a resposta de medo necessariamente deve começar com a percepção. A respeito disso, a maior parte da informação sensorial é dirigida, pelo tálamo, em direção ao córtex sensorial responsável pelo reconhecimento e a avaliação cognitiva da ameaça. Duas exceções a essa organização da informação aversiva são as aferências olfativas, que atingem o complexo amigdalóide e o córtex entorrinal diretamente, e as aferências provenientes das vísceras (OHMAN e cols., 2007; GOOSENS e cols., 2007; BOATMAN e KIM, 2006).

Por sua vez, a SCP está localizada no mesencéfalo, uma região do tronco cerebral que conecta a ponte e o cerebelo com o prosencéfalo. O mesencéfalo está atravessado pelo aqueduto cerebral, um canal estreito que contém líquido cefalorraquidiano e conecta o terceiro e quarto ventrículos, e ao redor do qual se encontra a SCP dividida em quatro colunas: dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral. O papel da SCP na organização de padrões comportamentais de defesa tem sido amplamente estudado. Particularmente, os efeitos de estímulos aversivos sobre a atividade dessa estrutura têm sido estudados utilizando modelos animais de ansiedade e situações de confronto com predadores. Assim, após a exposição a esses estímulos, aumentos na expressão da proteína CREB na SCP foram observados, o que sugere uma maior plasticidade nas redes neurais dessa estrutura relacionada com situações que sinalizam perigo tanto potencial quanto proximal (BLUNDELL e ADAMEC, 2006). O papel diferencial desempenhado pelas quatro colunas que compõem essa estrutura mesencefálica foi recentemente abordado utilizando-se o fator liberador de corticotropina (CRF), o qual, junto com seus receptores, está implicado na regulação das respostas endócrinas, comportamentais e autonômicas relacionadas ao estresse, o medo e a ansiedade. Desta maneira, a administração do CRF ovino na coluna dorsomedial da SCP produz uma diminuição do número de entradas no braço aberto no teste do labirinto em cruz elevado, um teste de ansiedade muito utilizado em neurociências, o que sugere um aumento nas respostas de ansiedade. Por outro lado, não foram observados efeitos após a microinjeção do CRF ovino nas colunas dorsolateral e lateral da SCP, o que indica que existe uma especificação funcional dentro de cada uma das colunas que compõem a SCP (BORELLI e BRANDÃO, 2008). Com o objetivo de estudar as diferenças entre o padrão comportamental defensivo evocado pela estimulação química da SCP dorsal e o conjunto de respostas defensivas expressado espontaneamente na presença de um predador, microinjeções de um aminoácido excitatório foram realizadas na SCP em duas situações diferentes, sendo

que uma delas envolvia o confronto com um predador natural. Os resultados obtidos mostram que o comportamento defensivo elaborado pela estimulação química da SCP também depende das condições ambientais nas quais se encontra o organismo (CARVALHO-NETTO e cols., 2006).

Também no mesencéfalo, sobre a superfície dorsal do mesmo, encontram-se quatro eminências redondeadas, conhecidas como tubérculos quadrigêmeos ou colículos, os quais estão divididos em pares superiores e inferiores por um sulco vertical e um transversal. Existem, também, diversas evidências na literatura sobre o papel desempenhado por estas estruturas mesencefálicas dorsais na elaboração de estados aversivos, o que tem levado os neurocientistas a incluí-las dentro do sistema encefálico da aversão. Assim, existem consideráveis evidências apoiando a hipótese segundo a qual estímulos visuais aversivos acessariam o complexo amigdalóide através de um circuito que inclui o colículo superior. Esses dados são consistentes com o argumento evolutivo centrado no papel aversivo de estímulos visuais como, por exemplo, a visão de uma serpente, a qual representa uma inegável fonte de perigo para os primatas (OHMAN e cols., 2007) e outros animais.

Além das mencionadas estruturas, situadas no tronco encefálico, o sistema encefálico da aversão engloba também regiões prosencefálicas que se mostram fundamentais para o processamento das emoções. Um claro exemplo disso refere-se ao complexo amigdalóide, o qual é constituído por aproximadamente 12 regiões, compostas por vários agrupamentos de núcleos, cada um com diferentes padrões de aferências e eferências, localizados no interior dos lobos temporais. Essa região é, talvez, uma das mais estudadas no cérebro e possui um forte vínculo com a organização de respostas de medo e ansiedade. Essa estrutura desempenha um papel muito importante na organização de reações fisiológicas e comportamentais evocadas por situações que guardam um alto significado biológico. A respeito disso, pesquisadores em diferentes laboratórios têm demonstrado que neurônios em núcleos específicos dessa estrutura ativam-se quando estímulos emocionalmente relevantes são apresentados. A estimulação elétrica do complexo amigdalóide produz reações fisiológicas e comportamentais sugestivas de medo em animais, e aumenta a sensação de medo em humanos. Assim também, essa estimulação leva à secreção de corticosterona e à ativação do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) em animais, muito provavelmente através de eferências ao hipotálamo e ao núcleo do leito da estria terminal. Tem sido sugerido

que o complexo amigdalóide pode acionar uma espécie de gatilho para a elaboração do medo e, ao ser ativado, enviaria a informação aversiva para uma variedade de áreas do sistema encefálico da aversão (FIGUEIREDO e cols., 2003; CECCHI e cols., 2002; KUSNECOV e cols., 1999).

No diencefalo, abaixo do sulco hipotalâmico, encontra-se um conjunto de núcleos muito relevantes para a expressão dos estados aversivos. Juntos, esses núcleos formam o hipotálamo, que pode ser delimitado, rostralmente, pela lâmina terminal do hipotálamo e pelo quiasma óptico, um trato de fibras mielinizadas formado pela decussação parcial dos nervos ópticos. Os pontos de reparo anatômico que caracterizam a face ventral do hipotálamo consistem no tuber cinéreo, na eminência média e haste hipotálamo-hipofisária, e nos corpos mamilares. Uma linha imaginária que liga os núcleos mamilares à comissura epitalâmica delimita a região postertior do hipotálamo e o próprio diencefalo. O hipotálamo forma o piso e as paredes laterais do terceiro ventrículo e se comunica, através da haste hipotálamo-hipofisária com a neuro-hipófise. Devido à sua localização central no diencefalo e a sua proximidade com a hipófise, é de se esperar que o hipotálamo participe na integração da informação do prosencefalo, do tronco encefálico, e da medula espinal, integrando-se ainda ao sistema endócrino e ao sistema nervoso neurovegetativo. Ele é formado por uma grande quantidade de pequenos núcleos, cada um com um padrão específico e complexo de conexões e funções. Contudo, esses núcleos não funcionam separados, pois existem conexões muito precisas entre eles. Historicamente, o hipotálamo tem sido dividido em áreas que podem ser diferenciadas nos eixos longitudinal e mediolateral do diencefalo. Evidências recentes se harmonizam com a proposta de três regiões organizadas longitudinalmente que podem ser divididas em quatro níveis ou grupos de núcleos, baseados na sua posição no eixo rostrocaudal. As três regiões longitudinais são: periventricular, medial e lateral (PURVES e cols., 2004; SQUIRE e cols., 2003).

Os núcleos da região periventricular são adjacentes ao tecido ependimal do terceiro ventrículo. Seus neurônios estão densamente agrupados no interior de uma área estreita adjacente ao epêndima e ocasionalmente expandem-se em grupos de núcleos citoarquitectonicamente diferentes. Esses núcleos incluem os núcleos paraventricular e supraóptico, os quais contêm neurônios secretores, cujos axônios estendem-se até a hipófise posterior. Neurônios dispersos na região periventricular elaboram neuropeptídios conhecidos

como fatores de liberação ou inibição, que vão controlar a secreção de hormônios na hipófise anterior. Os axônios desses neurônios projetam-se para a eminência mediana, região localizada na união do hipotálamo com o tronco hipofisiário, onde são secretados os peptídeos na circulação que irriga a hipófise anterior. Outros neurônios no núcleo paraventricular projetam-se para o tronco encefálico e a medula espinal, onde inervam os neurônios autônomos pré-ganglionares. A região periventricular também contém o núcleo supraquiasmático, o qual recebe aferências retinianas diretas e regula os ritmos circadianos, tanto viscerais quanto comportamentais. Esses núcleos recebem múltiplas aferências de outras áreas do hipotálamo (PURVES e cols., 2004; SQUIRE e cols., 2003).

Quanto à região lateral do hipotálamo, ela contém neurônios difusamente distribuídos, fenotipicamente diferentes e com conexões muito diversas. É melhor considerá-la como uma continuação rostral da formação reticular mesencefálica. Por esse motivo, os neurônios dessa região não estão agrupados em núcleos, mas encontram-se dispersos entre as fibras do feixe prosencefálico medial, o qual percorre através do hipotálamo lateral. Essas células controlam a ativação cognitiva e a focalização dos processos atencionais, especialmente em relação a atividades reprodutivas e homeostase (PURVES e cols., 2004; SQUIRE e cols., 2003).

A região medial encontra-se imediatamente adjacente à região paraventricular e contém uma série de grupos celulares que variam em tamanho e morfologia celular. Os núcleos da área medial incluem o núcleo dorsomedial e o ventromedial junto com os núcleos dos corpos mamilares, participando, assim, na alimentação, comportamento reprodutivo, comportamento paternal, termorregulação, balanço hídrico e respostas a estímulos aversivos. Esses núcleos recebem aferências desde as estruturas do sistema límbico aos núcleos viscerais do tronco encefálico, o que faz com que eles possam desempenhar um papel fundamental no processamento e na integração da informação correspondente a estímulos aversivos e na elaboração das reações fisiológicas que acompanham as respostas de medo na presença de ameaças no ambiente (PURVES e cols., 2004; SQUIRE e cols., 2003).

O Hipotálamo tem sido considerado como um centro cerebral integrador essencial para a sobrevivência dos organismos. Na medida em que foi avançando a evolução, os sistemas reguladores foram emergindo e permitindo a cada organismo se adaptar a seu ambiente, facilitando também o controle das complexas interações entre fisiologia e

comportamento. O papel regulador do hipotálamo está evidenciado pela sua organização estrutural e o seu padrão de conexões. Poderia ser afirmado que quase toda subdivisão maior do neuroeixo comunica-se com o hipotálamo e é susceptível de ser influenciada por ele. Some-se a isso o fato de que o hipotálamo comunica-se com sistemas periféricos através da conversão da informação sináptica em sinais humorais que viajam pelo sangue. Assim também, o hipotálamo responde às aferências dos sistemas periféricos que ele mesmo regula. Assim, o hipotálamo constitui um importante complexo de neurônios dedicados ao controle de funções homeostáticas e comportamentais essenciais para a sobrevivência (SQUIRE e cols., 2003).

Por sua vez, fortes evidências indicam que as manifestações emocionais são, pelo menos em parte, coordenadas e integradas ao nível hipotalâmico. Dessa maneira, tanto em homens quanto em animais, modificações comportamentais têm sido obtidas como consequência de alterações do hipotálamo (DUCROCQ et al., 2001; SCMITT et al., 1986). Com respeito ao papel dessa estrutura diencefálica na organização das emoções, a análise de sua anatomia e de suas conexões com diferentes regiões do sistema límbico sugere que o hipotálamo desempenha um papel muito importante no controle e na expressão do comportamento emocional. Alguns experimentos clássicos na literatura têm demonstrado seu papel na elaboração dos estados emocionais. Em 1928, utilizando técnicas de ablação, Phillip Bard evidenciou a importância do hipotálamo na elaboração das respostas defensivas de ataque em gatos. Foi sugerido que, enquanto a experiência subjetiva da emoção poderia depender do córtex cerebral, a coordenação dos comportamentos defensivos não dependeria de estruturas corticais, mas sim de regiões subcorticais. Também sugeriu que o fato das respostas emocionais estarem presentes em distintas espécies de animais, unido à importância que representam os estados aversivos para a própria sobrevivência, implicaria na participação de regiões do sistema nervoso central filogeneticamente mais antigas. Posteriormente, esses resultados foram complementados utilizando procedimentos de estimulação intracerebral em diferentes núcleos hipotalâmicos, eliciando respostas de raiva, medo e ataque (PURVES e cols., 2004; BRANDÃO e cols., 2003a; BRANDÃO e cols., 2003b).

De fato, o hipotálamo encontra-se diretamente envolvido nos mecanismos neurais que controlam as funções hipofisárias, comandando, assim, as alterações endócrinas que acompanham o comportamento emocional (KUPFERMAN, 1991; LEDOUX, 1991;

MARTIN, 1998). Geralmente, toda conduta emocional está composta por uma série de respostas fisiológicas e motoras. Por sua vez, o padrão de respostas fisiológicas que acompanha os comportamentos de medo está ligado à atividade do sistema nervoso autônomo, o qual constitui uma via efetora fundamental para a criação do perfil metabólico necessário na execução de comportamentos defensivos. Contudo, não é tarefa fácil separar as respostas autônomas das respostas motoras esqueléticas que acompanham as reações de defesa. As redes neurais do hipotálamo apresentam uma grande vantagem quanto à organização do repertório que caracteriza os comportamentos defensivos, devido a sua complexa rede de conexões tanto com o sistema nervoso autônomo quanto com o sistema motor somático. Projeções descendentes do hipotálamo para grupos celulares autonômicos do tronco cerebral e a medula espinal afetam as divisões simpática e parassimpática do sistema nervoso autônomo. Os principais alvos das eferências hipotalâmicas estão localizados na formação reticular do tronco cerebral, onde estão os circuitos que controlam a função cardiovascular, a respiração, a micção, o vômito e a deglutição. Esses neurônios recebem aferências hipotalâmicas e dos sistemas efetores somáticos e autônomos do tronco cerebral e da medula espinal. Por isso, a sua atividade pode produzir respostas autônomas e somáticas difusas, que podem até anular a função reflexa e afetar quase todos os órgãos do corpo (PURVES e cols., 2004; SQUIRE e cols., 2003; STANLEY e cols., 2010; UYAMA e cols., 2004).

Através da sua influência sobre a atividade do sistema nervoso autônomo, o hipotálamo pode organizar ajustes contínuos na química sanguínea, respiração, circulação, digestão e respostas imunes que protegem a integridade do meio interno e permitem a coordenação dos músculos esqueléticos em situações de alta conotação aversiva. Um exemplo claro é aquele dado pelos experimentos fisiológicos de Cannon, em 1939, nos quais a destruição do sistema nervoso autônomo prejudicou enormemente a capacidade dos animais para ajustar a sua temperatura corporal, seu equilíbrio eletrolítico e os níveis de açúcar séricos para mobilizar o organismo em resposta a ameaças externas. Os ajustes autonômicos caracterizam-se por serem respostas rápidas e fásicas que ocorrem com latências e velocidades típicas dos reflexos neurais (SQUIRE e cols., 2003, CAVDAR e cols., 2001; BANDLER e cols., 2000).

É sabido que os estados aversivos característicos de fuga ou luta, nos quais o animal encontra-se em situações de risco iminente, demandam amplas mudanças metabólicas no organismo que são efetivadas pela influência hipotalâmica sobre a subdivisão simpática do sistema nervoso autônomo, a qual cumpre uma função catabólica. Nessas circunstâncias, deve ocorrer um aumento na frequência cardíaca e na pressão arterial que permita aos músculos terem um maior nível de oxigênio para a atividade física intensa. Também acontece uma redistribuição das colunas sanguíneas, aumentando-se o diâmetro das artérias e dos capilares na musculatura estriada esquelética e diminuindo-o no trato gastrointestinal, favorecendo, assim, a mobilização dos recursos energéticos para as regiões cuja atividade é fundamental na execução de respostas motoras explosivas. As pupilas se dilatam, melhorando a visão e possibilitando reagir a estímulos no ambiente que sinalizem perigo. A digestão no trato gastrointestinal é inibida e a liberação de glicose no fígado é facilitada. Em acréscimo, o organismo começa a transpirar, reduzindo, assim, a fricção entre os membros e o tronco, melhorando a tração e promovendo a dissipação do calor para que os músculos possam trabalhar de maneira mais eficiente nos comportamentos de defesa ou escape, caso for necessário. Essa sinergia de ajustes indica a execução de um programa coordenado de respostas adaptativas que acontecem imediatamente e sem uma avaliação cognitiva. Talvez a característica mais importante do mencionado padrão comportamental seja a latência curta na execução dessas respostas (SQUIRE e cols., 2003; BLECHERT e cols., 2007, MELZIG e cols., 2007). Assim, é possível que além do papel essencial do mesencéfalo dorsal na geração e elaboração das respostas rápidas e eficientes de defesa, o hipotálamo seja uma estrutura igualmente importante na produção de um comportamento defensivo mais bem organizado (GRAEFF, 1994). Contudo, o papel dos diferentes núcleos hipotalâmicos na organização desse padrão comportamental ainda não está muito claro.

A esse respeito, CANTERAS e cols. (2002) têm sugerido a presença de um circuito diencefálico que inclui as redes neurais hipotalâmicas e que participaria na elaboração dos estados aversivos. Assim, empregando abordagens farmacológicas, anatômicas, imuno-histoquímicas e comportamentais, tem sido proposto que regiões do hipotálamo medial encontram-se crucialmente envolvidas na organização dos comportamentos defensivos innatos. Dessa maneira, utilizando paradigmas experimentais de confronto entre presa e predador, aumentos na expressão da proteína c-fos foram observados no núcleo hipotalâmico anterior, na subdivisão dorsomedial do núcleo ventromedial e no núcleo pré-mamilar dorsal

do hipotálamo. Lesões químicas dessa última estrutura praticamente eliminaram componentes relevantes das respostas defensivas causadas pela presença do predador, sugerindo, assim, que esse núcleo hipotalâmico caudal desempenha um papel fundamental na execução de comportamentos fundamentais para a sobrevivência do indivíduo (CANTERAS e cols., 1997). Naturalmente, a expressão desses comportamentos em nível diencefálico encontra-se modulada por influências cognitivas que provêm dos hemisférios cerebrais, incluindo estruturas como o complexo amigdalóide e a formação hipocampal. Assim, utilizando algumas das técnicas já mencionadas, tem sido demonstrado que existem células no complexo amigdalóide que se projetam topograficamente para o sistema defensivo hipotalâmico direta e indiretamente, via aferências ao hipocampo ventral que, por sua vez, projetam-se para o hipotálamo medial (PETROVICH e cols., 2001).

Conclusões similares às descritas previamente foram elaboradas, utilizando procedimentos farmacológicos e anatômicos em um modelo de confronto entre indivíduos da mesma espécie com diferentes níveis de dominância, o que sugere que as redes neurais hipotalâmicas são necessárias para a expressão do padrão comportamental defensivo tanto na presença de predadores quanto na de outros estímulos aversivos que ameaçam a integridade corporal do indivíduo (MOTTA e cols., 2009).

Com respeito às conexões do hipotálamo que podem desempenhar um papel muito importante na organização dos estados aversivos, a administração de neurotraçadores retrógrados no hipotálamo medial e lateral tem identificado neurônios marcados no núcleo dorsal da rafe, substância negra, camadas profundas do colículo superior e no locus coeruleus (CARSTENS, 1990; SAKAI et al., 1990). Assim também, a microinjeção de traçadores retrógrados feita no NDR e no LC mostrou marcações positivas no hipotálamo, o que pode sugerir que as conexões entre esta estrutura diencefálica e os núcleos do tronco cerebral são recíprocas (LEE et al., 2005; LUPPI et al., 1995). Além disso, métodos radioautográficos têm evidenciado a existência de circuitos que comunicam o hipotálamo ventromedial com o LC (SAPER et al., 1976). De qualquer modo, ainda é necessário determinar com precisão as vias existentes entre os núcleos específicos do hipotálamo medial e os núcleos do tronco cerebral envolvidos nas reações de defesa.

Por sua vez, empregando abordagens farmacológicas, ensaios bioquímicos, técnicas de neuroimagem e modelos animais, um número variado de sistemas neuroquímicos junto

com seus relevantes circuitos neurais tem sido implicado nas respostas de medo e ansiedade. Assim, diferentes sistemas neuroquímicos têm sido propostos como moduladores das respostas a estímulos aversivos, modificando direta ou indiretamente a atividade de algumas das estruturas já mencionadas. O sistema GABAérgico é um deles, constituindo o alvo principal no tratamento de quadros de ansiedade generalizada com benzodiazepínicos; por exemplo, com a administração de alprazolam para tratar a ansiedade antecipatória ou os próprios ataques de pânico.

O neurotransmissor GABA constitui o principal sistema neuroquímico inibitório do sistema nervoso central e tanto ele quanto a sua enzima de síntese, a ácido glutâmico-decarboxilase (GAD), parecem ter distribuição tanto no encéfalo quanto na medula espinal. O GABA é produzido do ácido glutâmico pela ação da enzima ácido glutâmico-decarboxilase (GAD), através de uma reação irreversível, culminando na remoção do grupo carboxil. Nos vertebrados, os receptores GABAérgicos têm sido amplamente identificados, principalmente nas membranas celulares de neurônios localizados no sistema nervoso central. Até o momento, dois receptores GABAérgicos foram claramente definidos: o GABA_B e o GABA_A. Ambos subtipos mostram localizações pré e pós-sinápticas e agem de maneira independente na transmissão sináptica. O primeiro é metabotrópico e controla um canal de potássio. Por sua vez, o receptor GABA_A é o maior receptor inibitório do encéfalo e constitui o alvo de muitas drogas clinicamente relevantes. Esse subtipo de receptor medeia efeitos ansiolíticos, sedativos, anticonvulsivantes e amnésicos. Ele é ionotrópico e é considerado o mais prevalente dos dois subtipos de receptores GABAérgicos no SNC. De maneira similar ao receptor nicotínico, ele é composto de cinco subunidades, dentre os 18 subtipos existentes, que formam um canal iônico transmembrana condutor de íons de cloreto. Devido ao fato de que o potencial de equilíbrio do cloreto é muito próximo ao potencial de repouso na maioria de neurônios, o incremento na permeabilidade dos íons de cloreto hiperpolariza o neurônio e diminui os efeitos despolarizantes da aferência excitatória, reduzindo, assim, a excitabilidade da membrana pós-sináptica (HASHIMOTO e cols., 2010; MACDONALD e cols., 2010; OLSEN e BETZ, 2006).

O receptor GABA_A pode ser alostericamente modulado por duas classes de drogas: os benzodiazepínicos e os barbitúricos. Ele contém pelo menos cinco diferentes sítios de ligação. O principal é, naturalmente, o sítio de ligação para o neurotransmissor GABA, o qual

é bloqueado pela droga bicuculina, que age como um antagonista competitivo seletivo para o receptor GABA-A. Um segundo sítio de ligação no receptor GABA_A é aquele no qual agem algumas drogas tranqüilizantes, os já mencionados benzodiazepínicos, como o diazepam e o clordiazepóxido, drogas muito utilizadas para reduzir a ansiedade. Drogas que interagem com os receptores GABAérgicos podem ser classificadas em duas categorias: antagonistas e agonistas. A ação do GABA no complexo receptor-canal iônico pode ser bloqueada por antagonistas de maneira direta, por competição com o GABA pelo seu sítio de ligação, ou indiretamente, modificando o receptor ou inibindo o canal iônico ativado pelo neurotransmissor. Os dois anatonistas GABAérgicos clássicos, a bicuculina e a picrotoxina, parecem agir por mecanismos diferentes. A bicuculina age como um antagonista competitivo direto do GABA em nível de receptor, enquanto que a picrotoxina age como um antagonista não competitivo, possivelmente devido a sua capacidade para bloquear o canal iônico ativado pelo GABA (ANDRE e cols., 2010; OLSEN e BETZ, 2006).

A maior parte dos receptores GABA_A presentes no cérebro constitui um alvo para o diazepam e outros BDZ. Por esse motivo, existe um considerável interesse em caracterizar os efeitos dos BDZ em função da sua ação sobre os diferentes subtipos de receptores GABA_A. Com esse fim, utilizando-se camundongos *knockout*, tem sido demonstrado que os efeitos sedativos, anticonvulsivantes e amnésicos do diazepam, mas não os ansiolíticos, devem-se a sua ação sobre uma subunidade específica do receptor GABAérgico. Por sua vez, uma outra subunidade do mesmo receptor presente predominantemente no córtex e no hipocampo parece ser a responsável pelos efeitos ansiolíticos do diazepam (MOHLER e cols., 2002; SIEGEL e cols., 2006).

Com respeito ao papel da neurotransmissão GABAérgica no hipotálamo medial na geração e controle das respostas de defesa, BUENO e cols., (2007) realizaram microinjeções de agonistas GABAérgicos no hipotálamo ventromedial (HVM) e encontraram uma diminuição no comportamento de fuga, o que é equivalente a um efeito panicolítico, enquanto que a administração de agonistas GABAérgicos inversos na mesma estrutura produziu aumento nas respostas de defesa, ou seja, um efeito panicogênico. Além disso, o bloqueio na síntese de GABA no hipotálamo dorsomedial (HDM) tem demonstrado uma exacerbação na resposta de pânico e o surgimento de um maior número de receptores NMDA nessa estrutura, o que indica que o sistema glutamatérgico tem uma importante participação

nos comportamentos de defesa organizados no hipotálamo medial (JOHNSON e SHEKHAR, 2006). Além disso, abordagens farmacológicas com microinjeção de agonistas do receptor GABA-A diretamente no hipotálamo dorsomedial, têm demonstrado a importância dessa subdivisão diencefálica na elaboração de respostas de fuga, o que sugere que o citado núcleo encontra-se envolvido na expressão de comportamentos defensivos e é modulado por neurônios GABAérgicos (NASCIMENTO e cols., 2010).

Outro sistema neurotransmissor muito relacionado com a expressão dos estados aversivos é o sistema noradrenérgico, o qual faz parte do conjunto das catecolaminas. O termo catecolamina refere-se genericamente a todos os compostos orgânicos que contêm um anel de benzeno com dois radicais hidroxil adjacentes mais um grupo amina. As catecolaminas são formadas no encéfalo a partir do aminoácido precursor tirosina por uma sequência de passos enzimáticos nos quais a tirosina hidroxylase converte a L-tirosina em 3,4-di-hidroxifenilalanina (DOPA). Em seguida, a enzima DOPA-descarboxilase remove um grupo carboxil o que leva à formação de noradrenalina. Enquanto os corpos celulares noradrenérgicos contêm concentrações relativamente baixas do neurotransmissor (10-100mg/g), os terminais nervosos e as varicosidades apresentam concentrações muito altas (1000-3000 mg/g). Seus axônios consistem em fibras altamente ramificadas e pouco mielinizadas. Existem basicamente dois grandes agrupamentos de corpos celulares noradrenérgicos no sistema nervoso central, dos quais se projetam axônios que vão inervar diferentes estruturas do eixo. O *locus coeruleus* (LC) é uma das mais importantes fontes de vias noradrenérgicas do tronco encefálico e está localizado na porção caudal da ponte. Suas eferências são bastante ramificadas, formando extensos colaterais que se projetam amplamente ao longo de tratos bem definidos, como o trato tegmental central, o fascículo longitudinal dorsal e o trato prosencefálico ventral. Essas vias são, em sua maioria, ipsilaterais, mas existem decussações em algumas espécies de aproximadamente 25% das fibras. Essas três projeções ascendentes inervam o córtex, núcleos específicos do tálamo e hipotalâmicos e o bulbo olfatório. Outro grande fascículo integra o pedúnculo cerebelar superior para inervar o córtex cerebelar. Outro importante trato toma um sentido descendente, em direção à medula espinal, projetando-se para o local da primeira sinapse da via nociceptiva ascendente, no corno posterior da medula espinal (TULLY, e BOLSHAKOV, 2010; SIEGEL e cols., 2006; NAKASHIMA e cols., 2009).

Uma outra origem de projeções noradrenérgicas no sistema nervoso central são neurônios que se encontram na área tegmental lateral da ponte.. De maneira geral, essas fibras se misturam com aquelas que provêm do LC e proporcionam grande parte da inervação noradrenérgica da amígdala e do septum. Quando a noradrenalina é liberada de um terminal nervoso ou da glândula adrenal, ela é reconhecida por uma série de moléculas receptoras específicas na membrana plasmática das células neuroefetoras culminando em uma dada resposta fisiológica. Classicamente, os receptores noradrenérgicos têm sido divididos em dois grupos: α e β . O desenvolvimento de drogas sintéticas que agem sobre esses receptores tem permitido a classificação desses receptores em α_1 , α_2 , β_1 e β_2 . Os genes para esses subtipos de receptores noradrenérgicos têm sido clonados, mostrando que essas moléculas são componentes de uma família maior de receptores hormonais, cuja atividade depende da interação com uma das proteínas regulatórias que se ligam à guanina (Proteína G). Além da classificação tradicional baseada em seu perfil farmacológico, os receptores noradrenérgicos podem ser divididos em três grandes classes, dependendo da sua ligação específica com as proteínas G. Assim, os receptores β -adrenérgicos ativam a proteína G_s para estimular a adenilil ciclase. Já os receptores α_2 , quando ativados, diminuem a atividade dessa enzima através da ligação com a proteína G_i . Por sua vez, os receptores adrenérgicos α_1 estimulam a ação da fosfolipase C, através da proteína G_q (FUXE E COLS., 2010; KASPAROV e TESCHEMACHER, 2009)

Diferentes mecanismos têm sido propostos como moduladores da liberação da noradrenalina na fenda sináptica. Talvez o principal mecanismo homeostático para a regulação da quantidade de neurotransmissor liberado envolva a interação da catecolamina liberada com receptores pré-sinápticos específicos localizados nos diferentes terminais nervosos. Na maioria dos sistemas que contêm catecolaminas, a administração de agonistas catecolaminérgicos diminui a liberação de catecolaminas induzida pela estimulação local, entanto que a administração de antagonistas noradrenérgicos aumenta a liberação de catecolaminas. Essas abordagens farmacológicas têm sugerido que os receptores pré-sinápticos modulam a recaptação de noradrenalina, respondendo à concentração das catecolaminas na sinapse. No sistema noradrenérgico, diferentes tipos de autorreceptores têm sido demonstrados no processo de inibição da liberação de neurotransmissores, incluindo receptores noradrenérgicos α_2 , muscarínicos, opioides e dopaminérgicos. A esse respeito, a ativação dos receptores α_2 inibe a liberação de noradrenalina através de diferentes

mecanismos, tais como a redução da quantidade de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico, pela inibição dos canais de Ca^{2+} ativados por voltagem, a abertura de canais de potássio no terminal pré-sináptico que leva à hiperpolarização da membrana pré-sináptica, ou à inibição da adenilil-ciclase, resultando em uma diminuição nas concentrações de cAMP e Ca^{2+} intracelular (KUHAR e cols., 2006).

Estudos pré-clínicos, utilizando manipulações farmacológicas e procedimentos de estimulação elétrica, têm sugerido o envolvimento do sistema noradrenérgico e do LC na organização dos estados aversivos (SIEGEL e cols., 2006). Por um lado, as eferências noradrenérgicas parecem ter uma função fundamental no controle da resposta periférica simpática. Assim, a atividade do LC parece necessária para a geração de uma resposta fisiológica aos estímulos ansiogênicos. Além disso, o LC poderia agir como mediador da informação sensorial na via que comunica o córtex com o tálamo, também cumprindo um papel na focalização dos recursos atencionais em direção a estímulos ameaçadores. Já em pacientes com síndrome de pânico, acréscimos nos níveis séricos, na urina e no líquido cefalorraquidiano de norepinefrina e alguns de seus metabólitos têm sido demonstrados, o que sugere que o desequilíbrio do sistema noradrenérgico poderia estar na base da expressão patológica dos estados aversivos (KALK e cols., 2010, DE BERARDIS e cols., 2008).

Por sua vez, os receptores noradrenérgicos α_2 encontram-se presentes nos corpos celulares e terminais sinápticos dos neurônios noradrenérgicos, onde regulam a taxa de disparos e a quantidade de norepinefrina liberada por cada potencial de ação. Em relação a esse achado, alguns estudos feitos em pacientes com síndrome de pânico utilizando antagonistas seletivos desses receptores, como a yohimbina, mostraram um aumento nos estados de ansiedade e na frequência dos ataques de pânico quando comparados com sujeitos controles (CHARNEY e cols., 1984; UHDE e cols., 1984). Além dos efeitos comportamentais, dados neurobiológicos mostram que a yohimbina incrementa as respostas cardiovasculares e os níveis plasmáticos de cortisol em pacientes com síndrome de pânico. Contribuições farmacológicas adicionais têm esclarecido o papel das projeções noradrenérgicas que partem do LC na ansiedade. Estudos utilizando clonidina, um agonista de receptores α_2 , que mostraram uma diminuição tanto na taxa de disparos no LC quanto na quantidade de norepinefrina liberada na fenda sináptica. Dessa maneira, a clonidina possui alguma eficácia no tratamento da ansiedade e da síndrome de pânico (SIEGEL e cols., 2006).

Já no que diz respeito ao papel da neurotransmissão noradrenérgica na elaboração do medo pelo sistema hipotalâmico de defesa, tem sido sugerido que aferências noradrenérgicas ao núcleo pré-mamilar dorsal que agem sobre receptores β poderiam participar na organização do padrão comportamental do medo inato e condicionado (DO MONTE e cols., 2008).

Com respeito à participação da neurotransmissão noradrenérgica nas reações de defesa evocadas pelo hipotálamo medial, tem sido comprovado que a microinjeção de bloqueadores de receptores GABA_A ou do fator liberador de corticotropina no HDM elicia um aumento nos níveis extracelulares de norepinefrina nesta estrutura. Consequentemente, a lesão dos neurônios noradrenérgicos no HDM com 6-hidroxydopamina (6-OHDA) produz uma redução dos componentes fisiológicos associados à resposta de pânico. Assim, os terminais noradrenérgicos no HDM são indispensáveis para a o conjunto de respostas que acompanham os comportamentos de defesa (SHEKHAR et al., 2002; SWIERGIEL et al., 2008).

Além dos sistemas neuroquímicos já mencionados, diversas evidências sugerem que o sistema serotoninérgico, e particularmente as projeções que partem dos núcleos de rafe, poderia estar implicado no controle da ansiedade e do medo. As principais origens das projeções serotoninérgicas no encéfalo encontram-se em nove grupos celulares, a maioria dos quais localizados nos núcleos da rafe do mesencéfalo, da ponte e do bulbo. De maneira similar à noradrenalina, a serotonina é liberada principalmente de varicosidades ao longo dos axônios, e não em terminais sinápticos. Os dois grupos celulares serotoninérgicos mais importantes são os núcleos dorsal da rafe e mediano da rafe. Ambos os citados núcleos projetam seus axônios para o córtex cerebral, para os núcleos da base, para o giro denteado e outras partes da formação hipocampal, entre outros alvos sinápticos, proporcionando, assim, uma extensa inervação serotoninérgica ao telencefalo e diencefalo. O precursor da serotonina é o aminoácido triptofano. A enzima triptofano- hidroxilase adiciona ao triptofano um grupo hidroxil, produzindo o 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Logo depois, a enzima 5-HTP-descarboxilase remove um grupo carboxil do 5-HTP e produz a serotonina (5-HT). Quanto a seus receptores, em torno de nove tipos de receptores serotoninérgicos foram identificados até o presente: 5-HT_{1A-1B}, 5-HT_{1D-1F}, 5-HT_{2A-2C}, e 5-HT₃. Entre esses, o 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} agem como autorreceptores pré-sinápticos. Todos os receptores são metabotrópicos, à

exceção do 5-HT₃ que é ionotrópico e controla um canal de cloreto, produzindo, assim, um efeito pós-sináptico inibitório (KRIEGEBAUM e cols., 2010; HENSLER, 2006).

Com respeito ao papel das projeções serotoninérgicas no controle dos comportamentos defensivos, os dados presentes na literatura ainda são muito controversos. Com efeito, trabalhos utilizando marcadores da densidade e/ou atividade dos transportadores de serotonina têm mostrado aumentos, decrementos ou ausência de efeitos sobre expressão dessa proteína em pacientes com síndrome de pânico, dependendo do estudo e das condições experimentais. Porém, a administração do agente liberador de serotonina, fenfluramina, tem demonstrado um efeito ansiogênico junto com aumentos nos níveis plasmáticos de prolactina e cortisol em pacientes com síndrome de pânico. Assim também, o agonista serotoninérgico m-chlorophenyl-piperazina (mCPP) tem produzido acréscimos nos estados de ansiedade e nos níveis plasmáticos de cortisol em pacientes (CHARNEY e DREVETS, 2002; CHARNEY e BREMMER, 1999). Além disso, outros estudos têm demonstrado incrementos nos níveis de serotonina e de triptofano- hidroxilase no HVM e HDM após a estimulação do NDR ou após a submissão de animais a um modelo de estresse, o que propõe a presença de mecanismos serotoninérgicos no hipotálamo medial na elaboração de respostas emocionais ao estresse (CULMAN et al., 1984; DE FANTI et al., 2000). De modo similar, a estimulação química do HDM em ratos pré-dispostos a apresentar respostas de pânico diminui a expressão de proteína c-Fos no NDR, o que sugere que a disfunção do sistema serotoninérgico pode contribuir para os estados de pânico (JHONSON et al., 2008). Em acréscimo, a ativação do NDR provoca uma inibição da resposta de fuga induzida pela estimulação do hipotálamo medial, o que mostra o papel da serotonina no controle dos comportamentos de defesa eliciados pelo hipotálamo medial (SCHMITT et al., 1983). Contudo, ainda está pouco claro o papel desempenhado por esse sistema neurotransmissor nos estados aversivos organizados ao nível hipotalâmico.

Quanto à interação entre os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico no controle dos estados aversivos, tem sido descrita uma via excitatória que comunica o LC com o núcleo dorsal da rafe (NDR) e que poderia ser importante na liberação de serotonina observada no cortex pré-frontal, o complexo amigdalóide e o hipotálamo em resposta a estímulos ansiogênicos. Por sua vez, existem projeções que partem do NDR e estendem-se até o LC, exercendo um efeito inibitório sobre essa estrutura, sugerindo, então, um possível mecanismo

de retroalimentação negativa. Dessa forma, a administração crônica de inibidores seletivos da recaptação de serotonina diminui a taxa de disparos no LC em ratos. Assim também, a administração de serotonina (5-HT) diretamente nos neurônios do LC resulta numa inibição tônica da atividade elétrica desse núcleo (SEGAL, 1979). Por sua vez, agonistas não seletivos para receptores noradrenérgicos injetados no NDR produzem aumentos nos influxos catiônicos nestes neurônios, com acréscimos nas taxas de disparos (BROWN et al., 2002).

Tomando-se como premissa que o LC, através de vias noradrenérgicas ascendentes, modula a atividade de neurônios tanto do NDR como do HM, pretende-se estudar, no presente trabalho, a resposta de medo elaborada pelas subdivisões ventromedial e dorsomedial do hipotálamo através de uma abordagem neurofisiológica, com lesão neurotóxica seletiva dos neurônios noradrenérgicos do locus coeruleus, e por meio de uma abordagem neurofarmacológica da conexão noradrenérgica ascendente, estudando-se o efeito do pré-tratamento do NDR e do HM com antagonistas seletivos e não seletivos de receptores noradrenérgicos sobre a resposta de medo induzida pela desinibição GABAérgica do HM. No presente trabalho, após a desinibição GABAérgica diencefálica, serão causadas mudanças comportamentais que, por sua vez, serão estudadas dentro do repertório de reações defensivas, o que constitui o alvo do presente estudo. Segundo um estudo prévio (Freitas e col., 2009), tais respostas incluem comportamentos de atenção defensiva, de avaliação de risco, comportamento defensivo retrógrado, rotação, fuga em linha reta, expressa por corridas e saltos verticais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o papel desempenhado pelas vias neurais noradrenérgicas que partem do locus coeruleus e se projetam para o núcleo dorsal da rafe e para o diencéfalo nos estados aversivos organizados pelo hipotálamo medial.

2.2 Objetivos Específicos

1. Estudar o efeito da lesão neurotóxica seletiva das projeções noradrenérgicas do LC com DSP-4 sobre os comportamentos defensivos evocados pelo bloqueio de receptores GABA_A no hipotálamo medial.
2. Estudar o efeito da microinjeção de salina, WB4101 (antagonista seletivo para receptores α_1 -noradrenérgicos), RX 821002 (antagonista seletivo para receptor α_2 -noradrenérgico) ou propanolol (antagonista não-seletivo para receptor β -noradrenérgico), randomicamente, no NDR (uma estrutura rica em serotonina, mas que recebe aferências noradrenérgicas provenientes do LC) sobre as respostas de medo induzidas por desinibição GABAérgicas dos núcleos do HVM e HDM.
3. Estudar o efeito da microinjeção de salina, WB4101 (antagonista seletivo para receptores α_1 -noradrenérgicos), RX 821002 (antagonista seletivo para receptor α_2 -noradrenérgico)

ou propanolol (antagonista não-seletivo para receptor β -noradrenérgico), randomicamente, no HM, sobre as respostas de medo evocadas por estimulação química do HM.

3. MATERIAL E METODOS

3.1 Animais

Foram utilizados, no presente trabalho, ratos albinos (*Rattus norvegicus*, *Rodentia*, *Muridae*), de linhagem Wistar, pesando entre 200-250 g. Esses animais foram colocados em caixas com cinco exemplares, e ficaram acondicionados sob ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes ligadas às 7h), e com temperatura entre 22-23°C, sendo-lhes permitido livre acesso à comida e água, durante todo o experimento. Os experimentos foram realizados segundo os princípios éticos elaborados segundo as normas que regulamentam aspectos éticos da utilização de animais de laboratório, elaboradas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP, que estão em conformidade com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Ética em Pesquisa Animal (COBEA).

3.2 Estudo Neurofisiológico

Os animais foram anestesiados com uma solução na proporção de 0,1ml de cetamina (Ketamina, frasco de 10ml) para 0,2ml de xilasina (Dopaser, frasco de 10ml) e levados a um aparelho estereotático (David Kopf, EUA), onde suas cabeças foram fixadas pelo rochedo temporal e incisivos superiores. 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= -2,5mm, ML= 0,4mm, DV= 7,4mm,, respectivamente, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1997).

Outra cânula-guia independente foi implantada no tronco encefálico e dirigida ao *locus coeruleus* (LC) unilateralmente, segundo coordenadas AP= -9,80mm, ML= 1,5mm, e

DV= 6,0mm, tomando-se 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.

Terminada a cirurgia, foi introduzida uma microagulha na cânula direcionada ao locus coeruleus e foi realizada a microinjeção da neurotoxina seletiva para neurônios noradrenérgicos, DSP-4, na concentração de 1µg/0.2µl (n=8). Como um controle, foi introduzida a microagulha sem a administração da neurotoxina (Grupo *Sham*) na intimidade do LC (n=8). Após um período pós-operatório de cinco dias, uma microagulha foi introduzida na cânula-guia direcionada ao HM, por meio da qual 40ng/0,2µL de bicuculina foram microinjetados. Após a administração intra-diencefálica do antagonista de receptores GABAérgicos (bicuculina), o comportamento dos roedores foi registrado de minuto a minuto, durante 15 minutos.

3.3 Estudo Neurofarmacológico no Núcleo Dorsal da Rafe

3.3.1) Cirurgia

Os animais foram anestesiados com uma solução na proporção de 0,1ml de cetamina a 10% (Agener, na dose de 25mg/kg, i.p.) para 0,2ml de xilasina a 4% (Dopaser, na dose de 10mg/kg, i.p.), 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% (0,1mL, 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= -2,5mm, ML= 0,4mm, DV= 7,4mm, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1997). Outra cânula-guia independente foi

implantada no tronco encefálico e dirigida ao NDR, segundo coordenadas AP= -7,80mm ML= 0,0mm e DV= 4,80mm, tomando-se o bregma como referência, e estando as suturas lambdóide e bregmática em um mesmo plano horizontal. Depois de implantadas, as cânulas-guias foram fixadas na calvária por uma prótese de acrílico autopolimerizável que, por sua vez, foi ancorada por dois parafusos de forniture de aço inoxidável. Após a cirurgia, 60.000U.I. de penicilina G benzatina eram aplicados, por via intramuscular, em cada animal.

3.3.2) Drogas

Cinco dias após a cirurgia, os animais foram gentilmente envolvidos em uma flanela e receberam microinjeções de WB4101 (Sigma), RX 821002 (Sigma), propranolol (Sigma) ou salina (NaCl a 0,9%; 0,2μL) no NDR, randomicamente e em grupos independentes de animais. Os bloqueadores farmacológicos foram dissolvidos em salina fisiológica imediatamente antes do uso. A estimulação química, que foi feita por meio da microinjeção intra-hipotalâmica de bicuculina (40ng/0,2μL), após o pré-tratamento com um dos bloqueadores farmacológicos ou de seu veículo, foi realizada 10 minutos após a administração dos antagonistas noradregérgicos no NDR.

3.4 Estudo Neurofarmacológico no Hipotálamo Medial

3.4.1) Cirurgia

Os animais foram anestesiados com uma solução na proporção de 0,1ml de cetamina a 10% (Agener, na dose de 25mg/kg, i.p.) para 0,2ml de xilasina a 4% (Dopaser, na dose de 10mg/kg, i.p.), 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% (0,1mL, 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 coordendas AP= -2,5mm, ML= 0,4mm, DV= 7,4mm, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1997). 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. Após a cirurgia, 60.000U.I. de penicilina G benzatina eram aplicados, por via intramuscular, em cada animal.

3.4.2) *Drogas*

Cinco dias após a cirurgia, os animais foram gentilmente envolvidos em uma flanela e receberam microinjeções de WB4101 (Sigma), RX 821002 (Sigma), propranolol (Sigma) ou salina (NaCl a 0,9%; 0,2µL) no HM, randomicamente e em grupos independentes de animais. Os bloqueadores farmacológicos foram dissolvidos em salina fisiológica imediatamente antes do uso. A estimulação química, que foi feita por meio da microinjeção intra-hipotalâmica de bicuculina (40ng/0,2µL), após o pré-tratamento com um dos bloqueadores farmacológicos ou de seu veículo, foi realizada 10 minutos após a administração dos antagonistas noradregérgicos no HM.

3.5 Procedimento Experimental

Imediatamente após a estimulação química das redes neurais hipotalâmicas e durante um período de 15 minutos, o número de cruzamentos e a frequência e duração de levantamentos (apoio das patas anteriores nas amuradas da arena), avaliação de risco (posição esticada da porção anterior do corpo, com um aumento concomitante da superfície abarcada pelo animal e acompanhado por movimentos da cabeça e farejamento do ar), atenção defensiva (interrupção do comportamento em curso, seguida de imobilidade efêmera de até 6s, com farejo do ar circunjascente), movimento retrógrado defensivo (deslocamento do animal em direção retrógrada, com movimento tanto das patas anteriores quanto das posteriores e mantendo o focinho em direção à frente), rotações (giros de 360 graus), fuga (corridas moderadas em forma de galope, intercaladas por intenso comportamento exploratório), e saltos (levantamento concomitante das quatro patas), foram registrados através de uma câmera filmadora (Sony) de minuto a minuto.

3.6 Histologia

Os animais foram anestesiados com uma solução na proporção de 0,1ml de cetamina (Ketamina, frasco de 10ml) para 0,2ml de xilasina (Dopaser, frasco de 10ml) 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. Os encéfalos foram retirados e mantidos no fixador por no mínimo 4 horas, após o que foram congelados e cortados com o auxílio de um criostato (Leica) em fatias de 40µm de espessura. Os cortes foram montados em lâminas de vidro, gelatinizadas, secos ao ar e corados com azul de metileno. Posteriormente, os cortes foram analisados com o auxílio de microscopia de luz e a posição das pontas 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, o HVM, o HDM, o LC ou o NDR foram incluídos na análise estatística.

3.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados do estudo neurofisiológico foram analisados através do teste *t* de Student para amostras não-pareadas com correção de Welch. Por sua vez, os resultados dos estudos neurofarmacológicos foram analisados através da análise de variância (ANOVA), seguida, quando apropriado, pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnet.

3.8 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 minuto a minuto por 15 min por meio de uma filmadora (*Sony*) e foram analisados por meio do software X-plorat.

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 (AxioImager Z1, Zeiss), munido com software para captura e análise de imagens histológicas.

4. RESULTADOS

4.1 Estudo Neurofisiológico

No presente trabalho, o antagonismo dos receptores GABA_A no Hipotálamo Medial cinco dias após o procedimento *sham* no LC (n=8) induziu um padrão de comportamentos caracterizados por levantamentos, atenção defensiva, avaliação de risco, movimento defensivo retrógrado, comportamento rotatório, fuga e saltos. Já no grupo de animais com microinjeções de bicuculina no hipotálamo medial cinco dias após a lesão do LC com microinjeções de DSP-4 (n=8), o repertório motor da estimulação não apresentou maiores diferenças qualitativas do eliciado no grupo *sham*, salvo por uma ausência de saltos e poucas respostas de fuga. Não obstante, a intensidade dos comportamentos apresentados pelo grupo lesado pareça ser menor quando comparada com o grupo *sham*.

A respeito aos comportamentos defensivos registrados depois da administração de bicuculina intra-hipotalâmica cinco dias após o procedimento *sham* ou a microinjeção de DSP-4, o teste *t* não pareado mostrou uma ausência de efeitos significativos para frequência e duração de avaliação de risco, movimento defensivo retrógrado e comportamento rotatório (teste *t* não pareado; *t* variando de 0.03117 até 1.528, $P > 0.05$) (Figuras 1, 3, e 4). Por sua vez, a microinjeção de bicuculina no hipotálamo medial cinco dias após a lesão do LC com DSP-4 mostrou uma redução significativa na frequência (teste *t* não pareado; $t = 4.288$, $P < 0.01$) e duração (teste *t* não pareado; $t = 4.307$, $P < 0.01$) de levantamentos (Ver Figura 7), na frequência (teste *t* não pareado; $t = 3.862$, $P < 0.01$) e duração (teste *t* não pareado; $t = 2.719$, $P < 0.05$) de atenção defensiva (Figura 2), na frequência (teste *t* não pareado; $t = 3.237$, $P < 0.05$) e duração (teste *t* não pareado; $t = 3.287$, $P < 0.05$) de saltos e na frequência (teste *t* não pareado; $t = 8.183$, $P < 0.0001$) e duração (teste *t* não pareado; $t = 6.866$, $P < 0.001$) da fuga (Figura 5) quando comparado com o grupo *sham*.

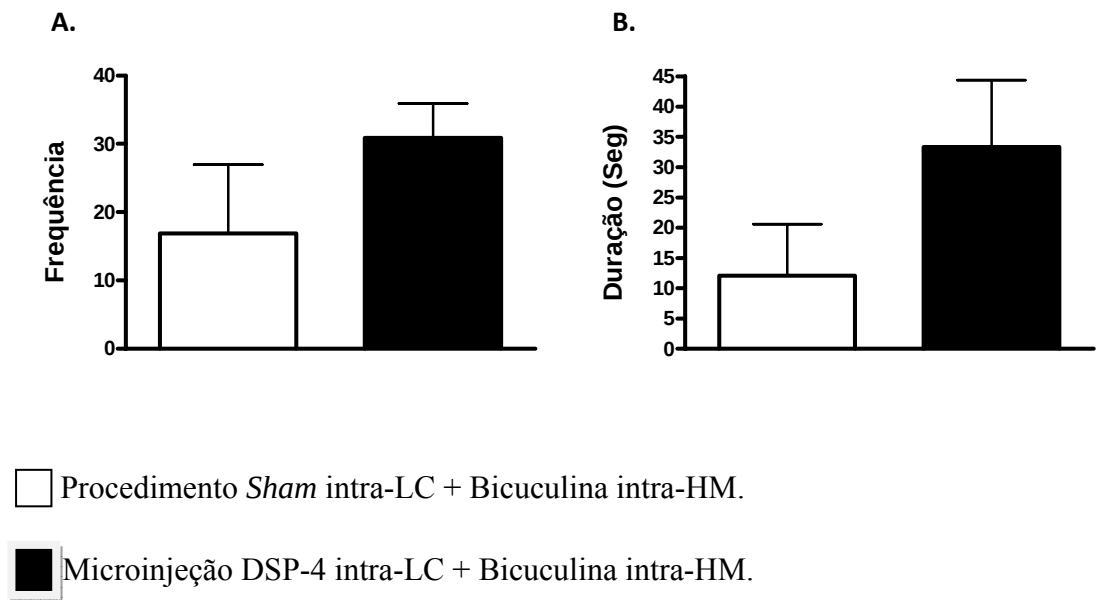


Fig 1. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial cinco dias após o procedimento *sham* (n=8) ou a microinjeção de DSP-4 (1µg/0.2µl) (n=8) no locus coeruleus sobre (A) frequência e (B) duração do comportamento de avaliação de risco. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; $p > 0.05$, em ambos os casos, quando comparado com o grupo controle (*sham*), segundo o teste *t* de Student para amostras não-pareadas, com correção de Welch.

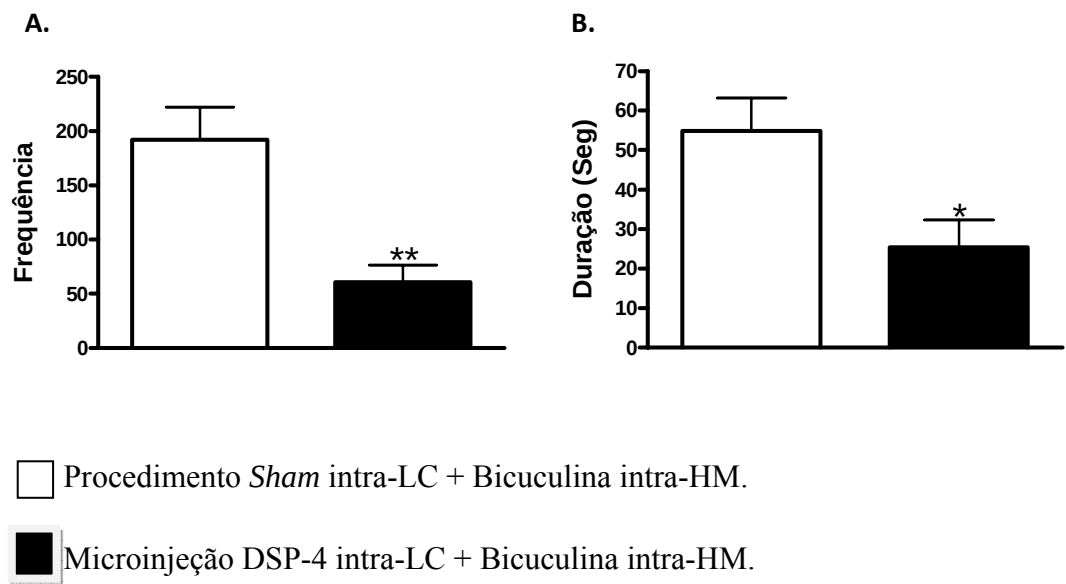


Fig 2. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial cinco dias após o procedimento *sham* (n=8) ou a microinjeção de DSP-4 (1µg/0.2µl) (n=8) no locus coeruleus sobre (A) frequência e (B) duração de atenção defensiva. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; *p<0.05 , **P<0.01 , comparado com o grupo controle (*sham*), segundo o teste *t* de Student para amostras não-pareadas, com correção de Welch.

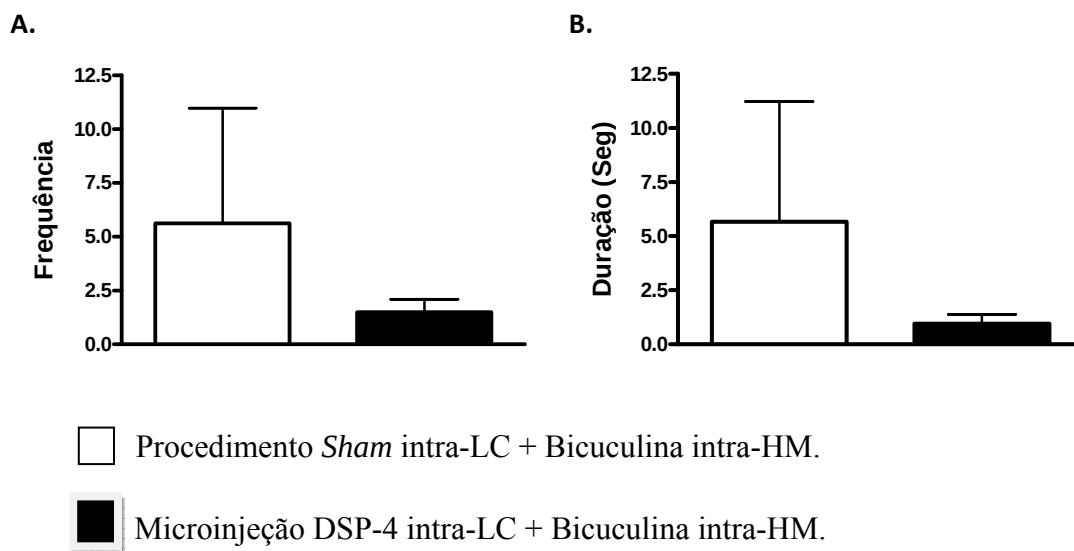


Fig 3. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial cinco dias após o procedimento *sham* (n=8) ou a microinjeção de DSP-4 (1µg/0.2µl) (n=8) no locus coeruleus sobre (A) frequência e (B) duração do movimento defensivo retrógrado. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; $P > 0.05$, em ambos os casos, quando comparado com o grupo controle (*sham*), segundo o teste *t* de Student para amostras não-pareadas, com correção de Welch.

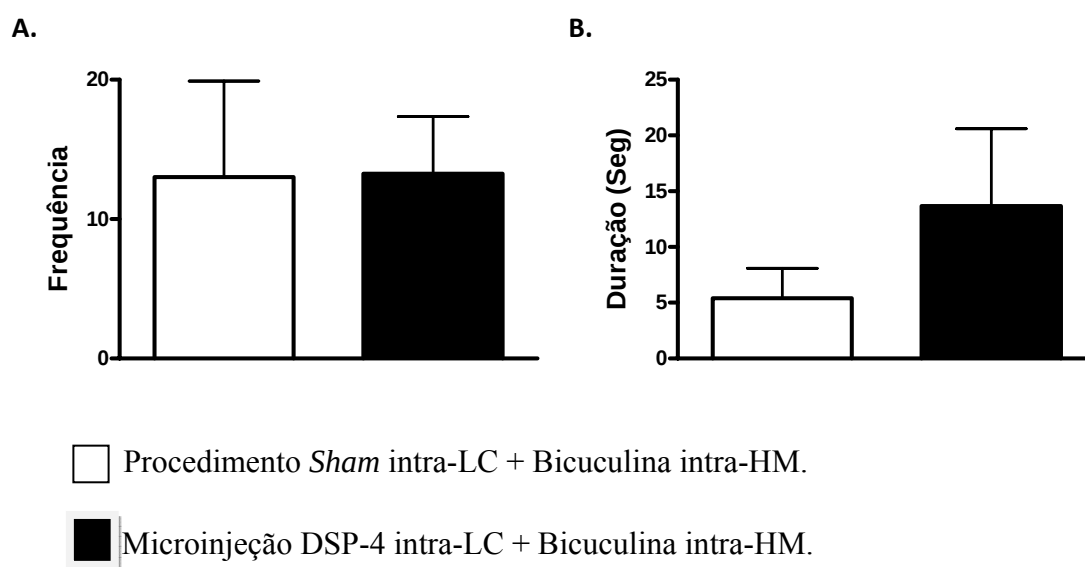


Fig 4. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2 μ l) no hipotálamo medial cinco dias após o procedimento *sham* (n=8) ou a microinjeção de DSP-4 (1 μ g/0.2 μ l) (n=8) no locus coeruleus sobre (A) frequência e (B) duração do comportamento rotatório. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; $P > 0.05$, em ambos os casos, quando comparado com o grupo controle (*sham*), segundo o teste *t* de Student para amostras não-pareadas, com correção de Welch.

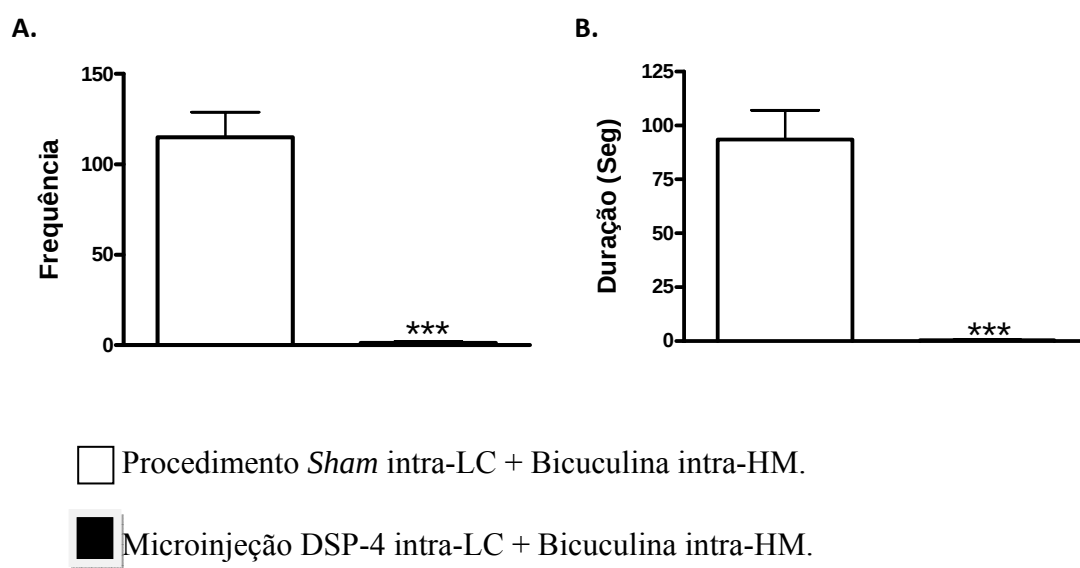


Fig 5. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial cinco dias após o procedimento *sham* (n=8) ou a microinjeção de DSP-4 (1µg/0.2µl) (n=8) no locus coeruleus sobre (A) frequência e (B) duração da fuga. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; ***P<0.001, quando comparado com o grupo controle (*sham*), segundo o teste *t* de Student para amostras não-pareadas, com correção de Welch.

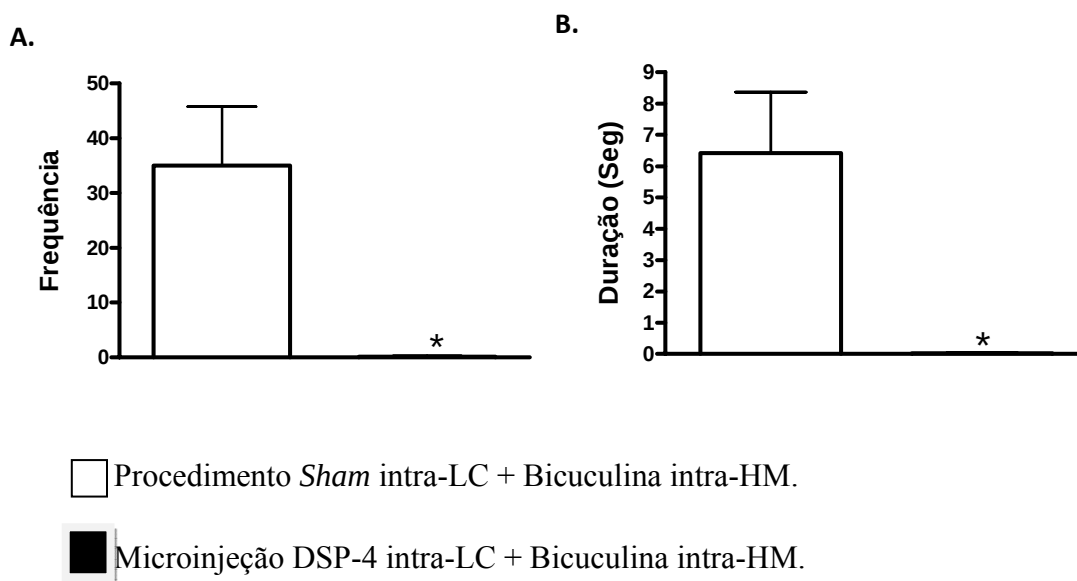


Fig 6. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial cinco dias após a pseudo-lesão (procedimento *sham*) (n=8) ou a microinjeção de DSP-4 (1µg/0.2µl) (n=8) no locus coeruleus sobre (A) frequência e (B) duração dos saltos. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; *P<0.05, , quando comparado com o grupo controle (*sham*), segundo teste *t* de Student para amostras não-pareadas, com correção de Welch.

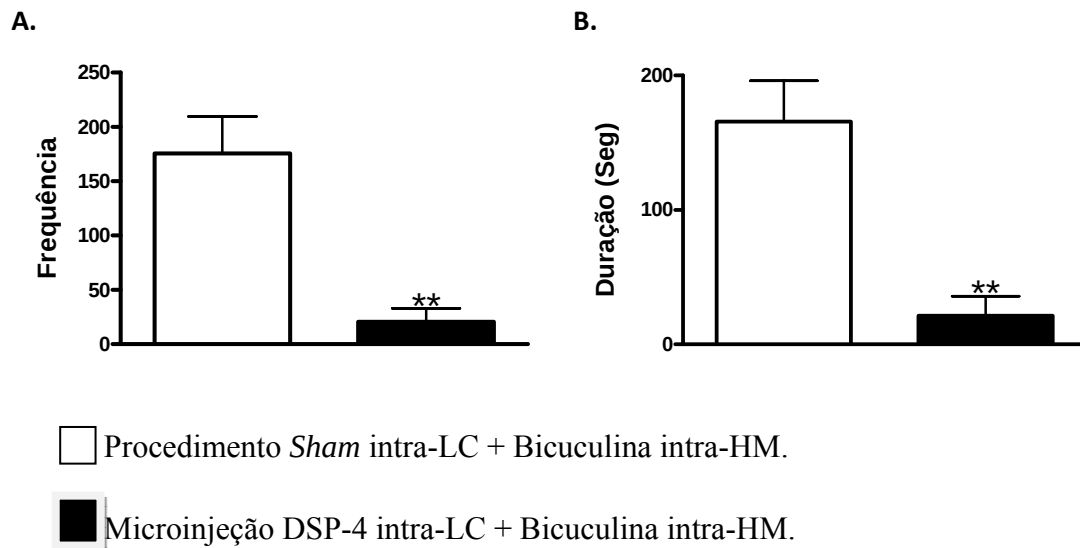


Fig 7. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial cinco dias após a pseudo-lesão (*sham*) (n=8) ou a microinjeção de DSP-4 (1µg/0.2µl) (n=8) no locus coeruleus sobre (A) frequência e (B) duração de levantamentos. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; **p<0.01, quando comparados com o grupo controle (*sham*) utilizando-se o teste *t* de Student para amostras não-pareadas, com correção de Welch.

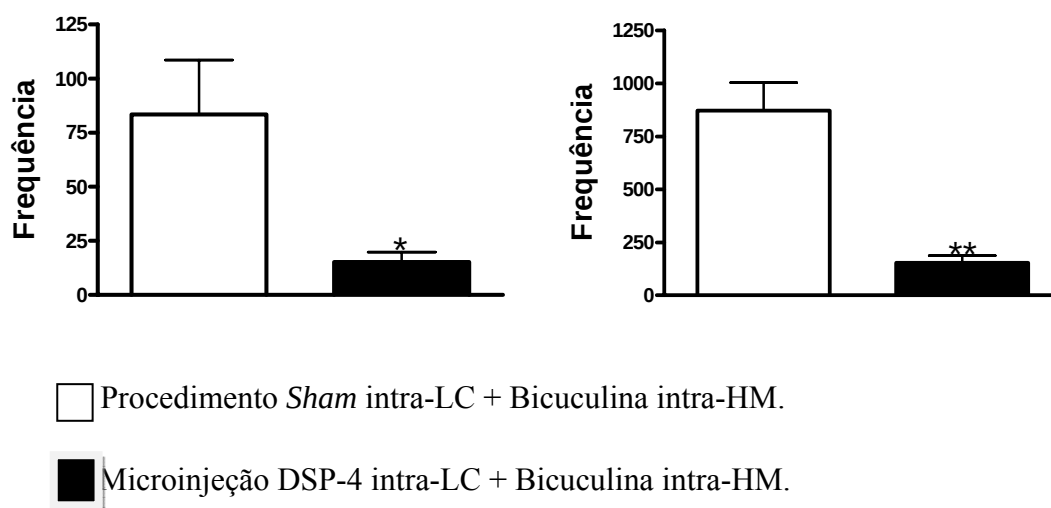
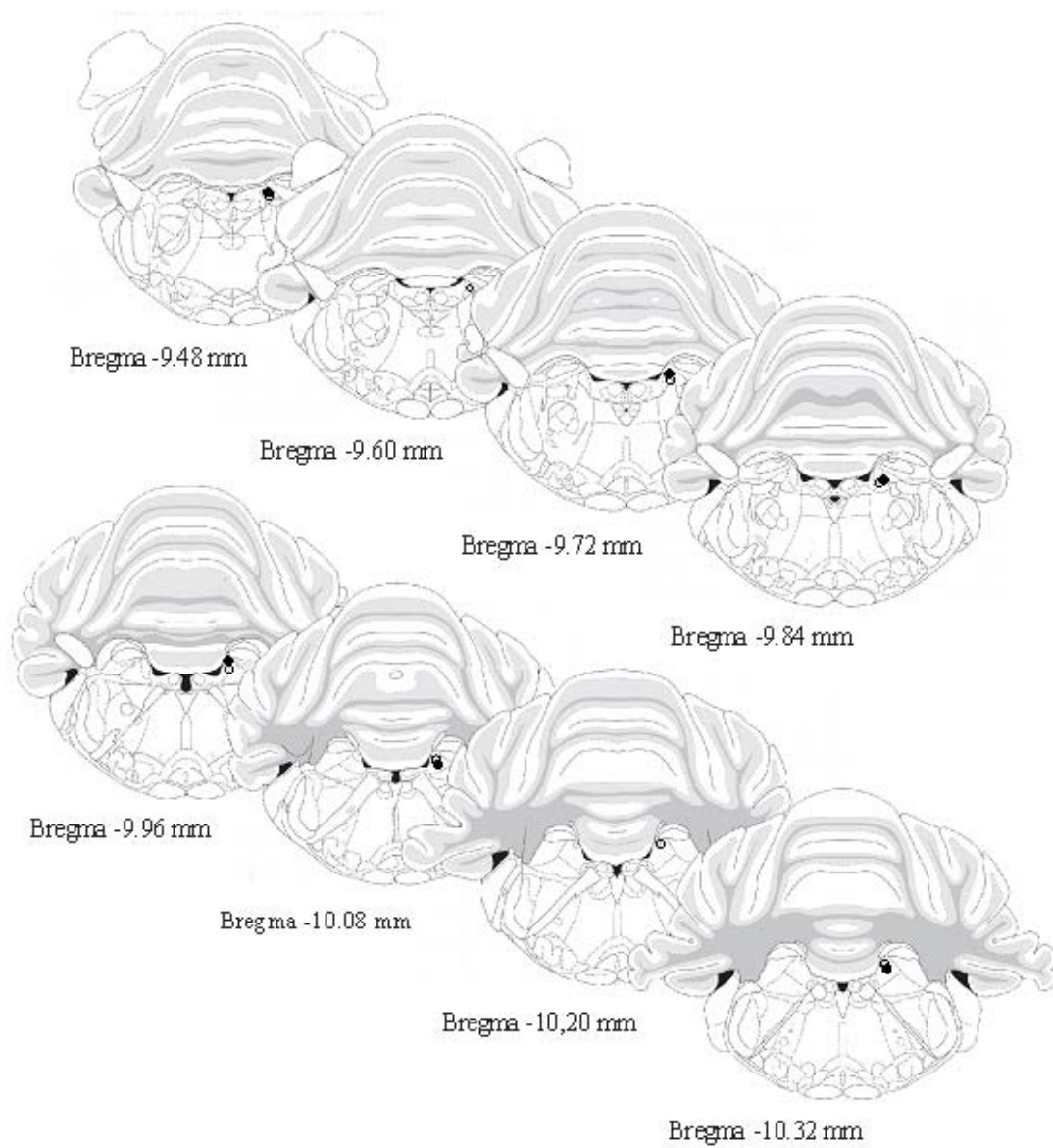


Fig 8. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial cinco dias após a pseudo-lesão (*sham*) (n=8) ou a microinjeção de DSP-4 (1µg/0.2µl) (n=8) no locus coeruleus sobre (A) frequência de cruzamentos no centro e (B) na periferia do campo aberto. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; **p<0.01, quando comparados com o grupo controle (*sham*) utilizando-se o teste *t* de Student para amostras não-pareadas, com correção de Welch.



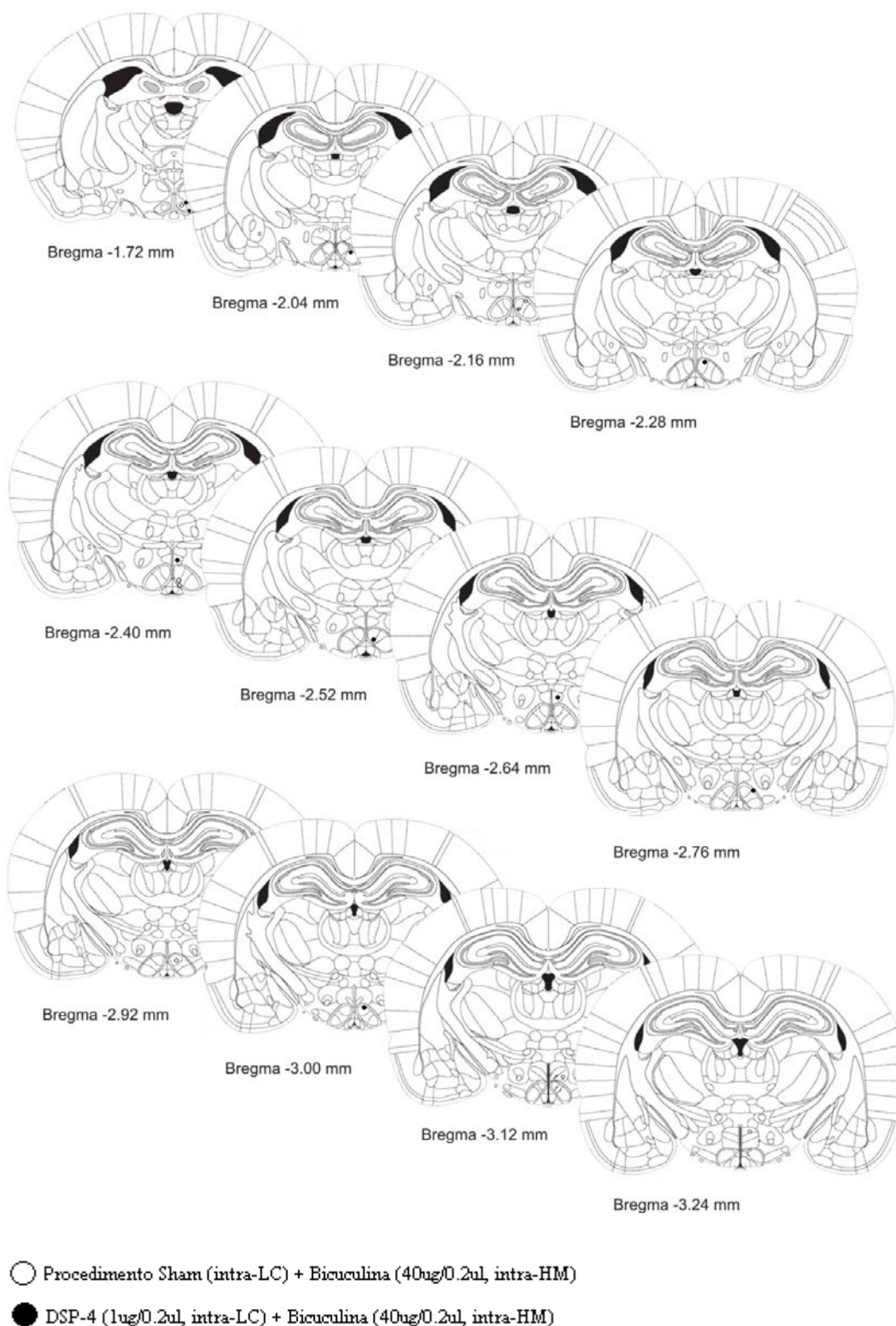


Fig 9. Representação esquemática dos sítios do procedimento Sham intra-LC + Bicuculina (40ng/0,2μL) intra-HM (círculos brancos) e da microinjeção da neurotoxina DSP-4 (1μg/0,2μL) intra-LC + Bicuculina (40ng/0,2μL) intra-HM (círculos pretos) em anagramas de secções coronais do encéfalo de *Rattus norvegicus* do Atlas de Paxinos e Watson (1997).

4.2 Estudo Neurofarmacológico no Núcleo Dorsal da Rafe

No presente trabalho, o antagonismo dos receptores GABA_A no Hipotálamo Medial 10 minutos após a administração de salina (n=8) no núcleo dorsal da rafe produziu um conjunto de respostas motoras caracterizadas por levantamentos, atenção defensiva, avaliação de risco, movimento defensivo retrógrado, comportamento rotatório, fuga e saltos. Por sua vez, foram observadas algumas diferenças qualitativas entre os grupos de animais pré-tratados com antagonistas seletivos dos receptores α_1 (n=8), α_2 (n=8) ou β (n=8) noradrenérgicos nos comportamentos defensivos eliciados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos nos núcleos hipotalâmicas mediais. Assim, tanto o grupo pré-tratado com salina quanto aquele pré-tratado com o antagonista do receptor α_1 apresentaram saltos em sentido vertical quando os animais encontravam-se apoiados sobre a parede da arena circular, entanto que os animais com bloqueio dos receptores α_2 apresentaram saltos em sentido horizontal, sempre que o animal encontrava-se com as quatro patas sobre a superfície da arena. Por sua vez, a fuga observada nos animais pré-tratados com salina e com o antagonista do receptor α_1 caracterizou-se por apresentar corridas prolongadas ao lado da amurada da arena, entanto que o grupo pré-tratado com o antagonista α_2 mostrou corridas muito curtas e efêmeras. Não obstante, a intensidade dos comportamentos apresentados por esse último grupo de animais parece ter sido maior, quando comparado com o controle, pois muitas vezes superaram em frequência e duração tanto em relação ao grupo controle quanto ao grupo pré-tratado com o antagonista α_1 . Com respeito à fenomenologia comportamental no grupo de animais pré-tratados com o antagonista de receptores β , observou-se uma evidente manifestação de comportamentos rotatórios junto a comportamentos defensivos retrógrados que não foi eliciado nos demais grupos de animais.

Quanto aos comportamentos de defesa observados após a administração de salina ou dos antagonistas dos receptores α_1 , α_2 ou β no núcleo dorsal da rafe e a estimulação química do hipotálamo medial, a ANOVA de uma via mostrou efeitos significativos para número de cruzamentos no centro e na periferia da arena, frequência e duração de levantamentos, avaliação de risco, atenção defensiva, movimento defensivo retrógrado, comportamento rotatório, fuga e saltos. A análise *post hoc*, utilizando o teste de comparação múltipla de Dunnet, evidenciou uma diminuição significativa no número de cruzamentos no centro e na

periferia da arena ($F(3, 36)$ =variando de 10.66 a 42.31, $P<0.05$ e $P<0.01$, respectivamente, Figura 17), na frequência e duração dos levantamentos ($F(3,36)$ = variando de 15.49 a 18.65, $P<0.01$, Figura 16), atenção defensiva ($F(3,36)$ = variando de 13.74 a 20.81, $P<0.01$ e $P<0.05$, respectivamente, Figura 11), fuga ($F(3, 36)$ = variando de 5.369 a 12.62, $P<0.01$, Figura 14) e frequência de saltos ($F(3,36)$ = 4.213, $p<0.05$, Figura 15) no grupo pré-tratado com o antagonista para receptores α_1 no núcleo dorsal da rafe quando comparado com o grupo controle. Em relação ao pré-tratamento com antagonistas para receptores α_2 , o *post hoc* revelou uma diminuição significativa no número de cruzamentos na periferia da arena ($F(3,36)$ =42.31, $P<0.01$, Figura 17B) quando comparado com o grupo controle. Por sua vez, a análise *post hoc* mostrou aumentos significativos no grupo de animais pré-tratados com o antagonista para receptores α_2 na frequência e duração da avaliação de risco ($F(3,36)$ =variando de 4.901 a 5.912, $P<0.05$; Figura 10) e atenção defensiva ($F(3,36)$ =variando de 13.74 a 20.81, $P<0.01$, Figura 11). A mesma análise indicou uma diminuição significativa no grupo de animais pré-tratado com propranolol no número de cruzamentos na periferia da arena ($F(3,36)$ =42.31, $P<0.01$, Figura 17B), na frequência e duração dos levantamentos ($F(3,36)$ =variando de 15.49 a 18.65, $P<0.01$, Figura 16), frequência de fuga ($F(3,36)$ =12.62, $P<0.01$, Figura 14) e saltos ($F(3,36)$ =4.213, $P<0.05$, Figura 15) quando comparado com o grupo controle. Por fim, o teste de comparação múltipla de Dunnet evidenciou aumentos significativos no número de cruzamentos no centro da arena ($F(3,36)$ =10.66, $P<0.05$, Figura 17A), na frequência e duração do movimento defensivo retrógrado ($F(3,36)$ =variando de 4.512 a 5.054, $P<0.05$, Figura 12) e comportamento rotatório ($F(3,36)$ =variando de 10.02 a 10.29, $P<0.01$, Figura 13) no grupo pré-tratado com propranolol quando comparado com o grupo controle.

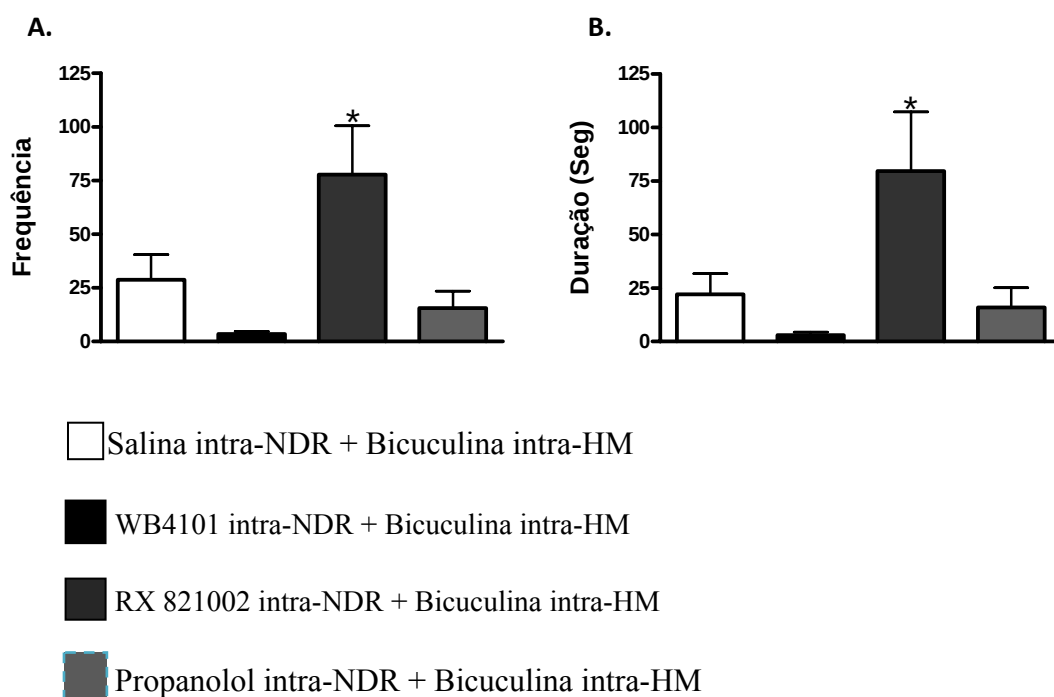


Fig 10. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial 10 minutos após a microinjeção de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) (n=8), WB4101 (5µg/0.2µl) (n=8), RX 821002 (5µg/0.2µl) (n=8) ou propanolol (5µg/0.2µl) (n=8) no núcleo dorsal da rafe sobre (A) frequência e (B) duração da avaliação de risco. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; * $p < 0.05$, comparado com o grupo controle, utilizando-se análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida, quando apropriado, pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett.

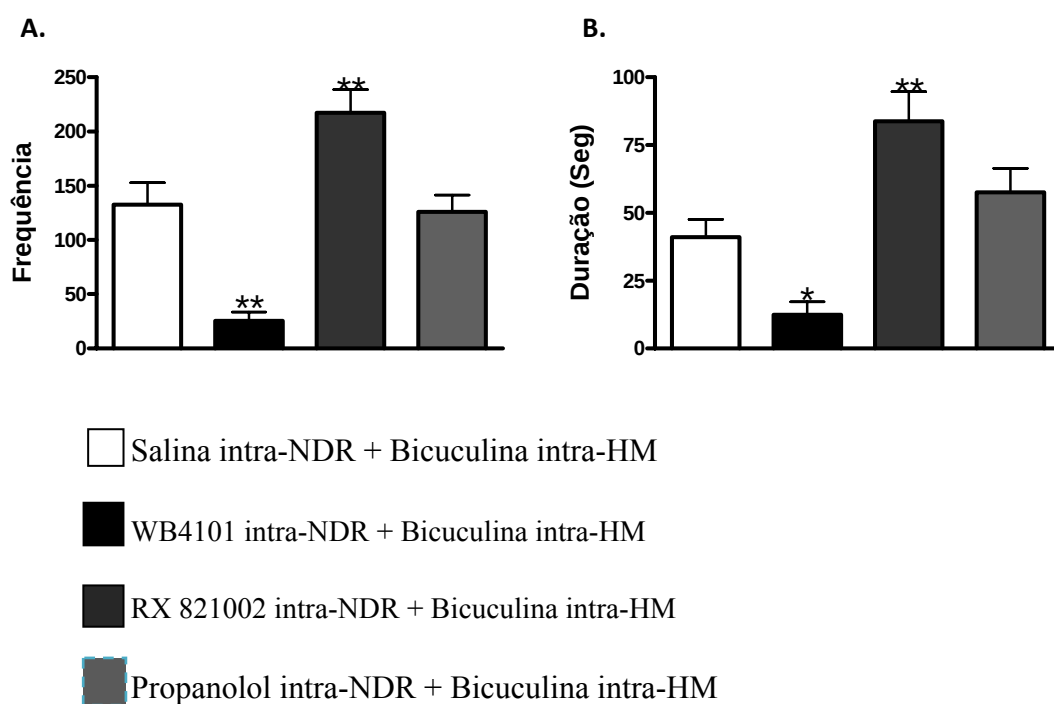


Fig 11. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial 10 minutos após a microinjeção de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL)(n=8), WB4101 (5µg/0.2µl) (n=8), RX 821002 (5µg/0.2µl) (n=8) ou propanolol (5µg/0.2µl) (n=8) no núcleo dorsal da rafe sobre (A) frequência e (B) duração da atenção defensiva. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; *p<0.05, **P<0.01, comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida, quando apropriado, pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett.

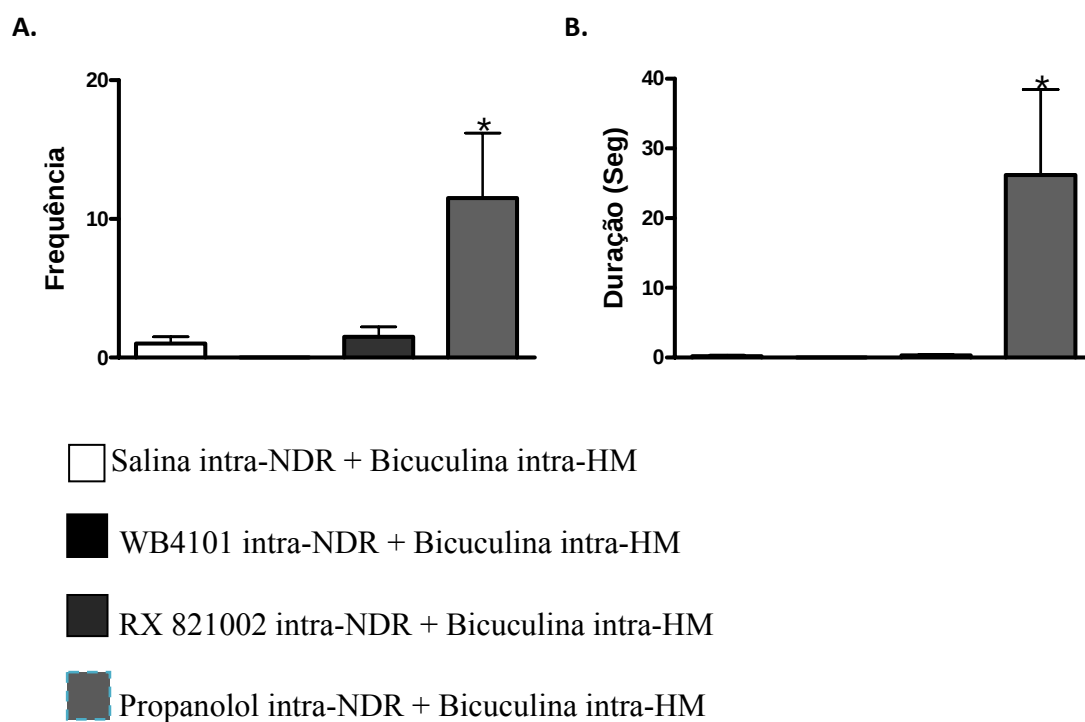


Fig 12. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2μl) no hipotálamo medial 10 minutos após a microinjeção de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2μL)(n=8), WB4101 (5μg/0.2μl) (n=8), RX 821002 (5μg/0.2μl) (n=8) ou propanolol (5μg/0.2μl) (n=8) no núcleo dorsal da rafe sobre (A) frequência e (B) duração do movimento defensivo retrógrado. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; *p<0.05, comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida, quando apropriado, pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett.

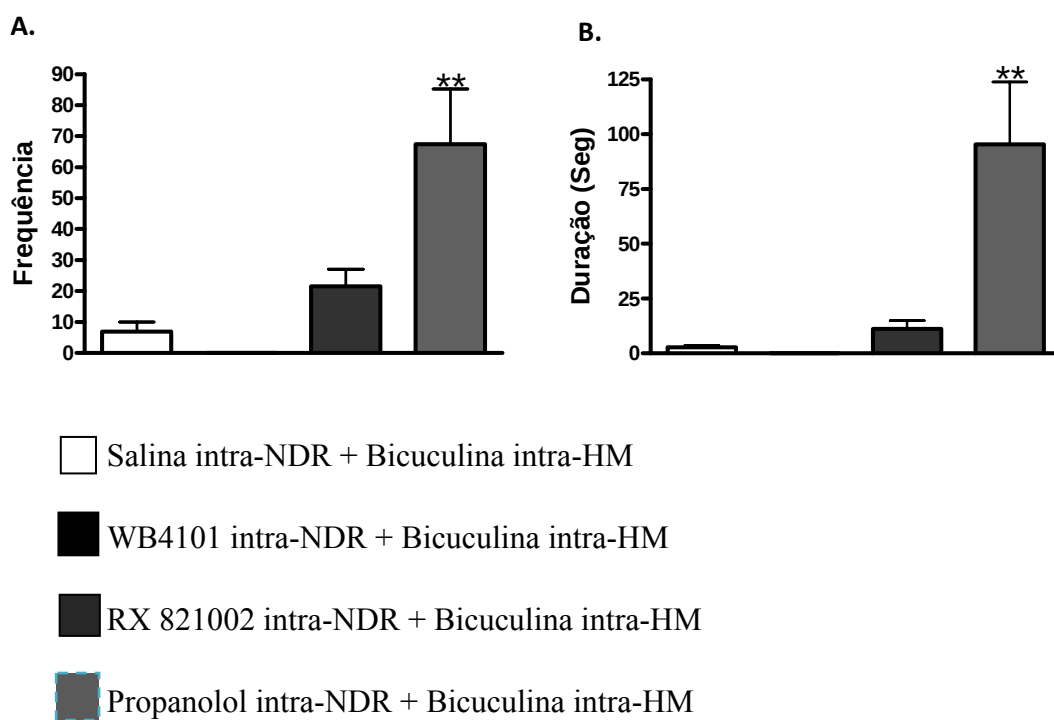


Fig 13. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2μl) no hipotálamo medial 10 minutos após a microinjeção de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2μL) (n=8), WB4101 (5μg/0.2μl) (n=8), RX 821002 (5μg/0.2μl) (n=8) ou propanolol (5μg/0.2μl) (n=8) no núcleo dorsal da rafe sobre (A) frequência e (B) duração do comportamento rotatório. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; **P<0.01, comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida, quando apropriado, pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett.

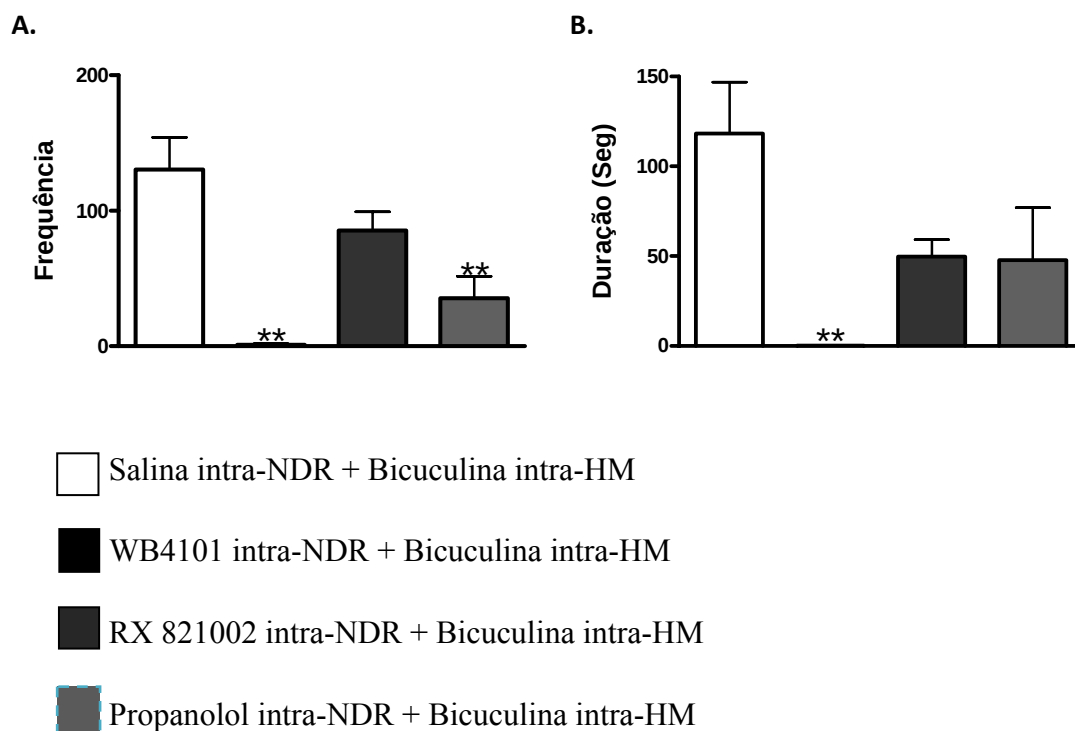


Fig 14. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial 10 minutos após a microinjeção de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) (n=8), WB4101 (5µg/0.2µl) (n=8), RX 821002 (5µg/0.2µl) (n=8) ou propanolol (5µg/0.2µl) (n=8) no núcleo dorsal da rafe sobre (A) frequência e (B) duração da fuga. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; **P<0.01, quando comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida, quando apropriado, pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett.

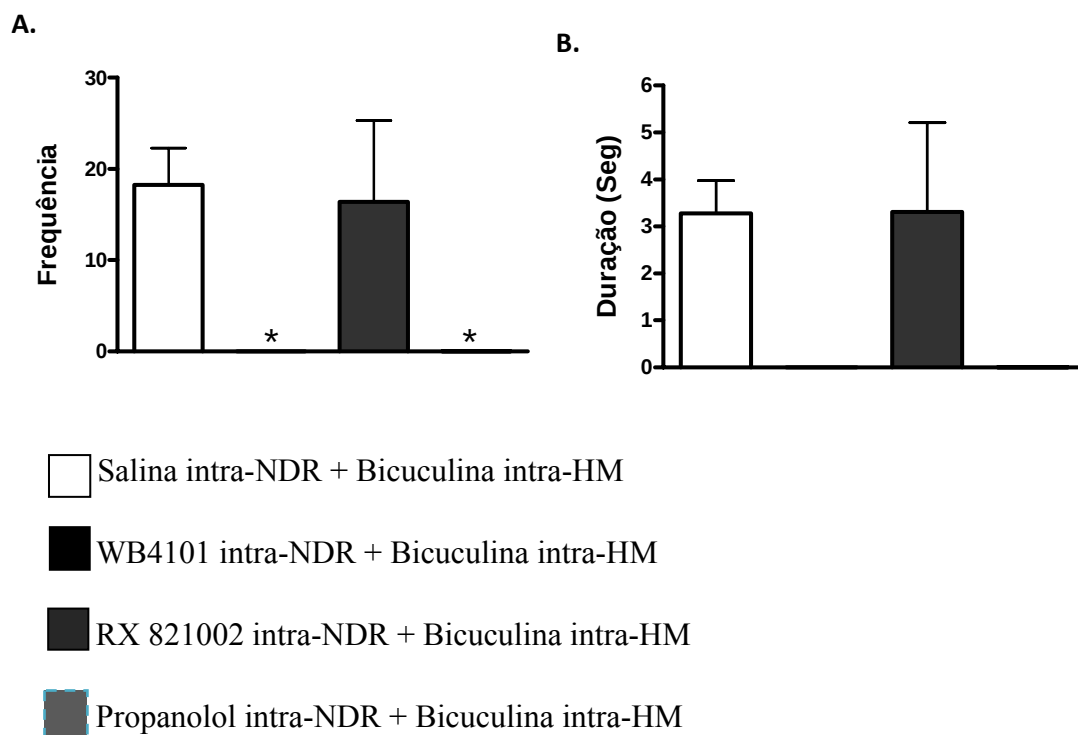


Fig 15. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2μl) no hipotálamo medial 10 minutos após a microinjeção de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2μL) (n=8), WB4101 (5μg/0.2μl) (n=8), RX 821002 (5μg/0.2μl) (n=8) ou propanolol (5μg/0.2μl) (n=8) no núcleo dorsal da rafe sobre (A) frequência e (B) duração dos saltos. *p<0.05, quando comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida, quando apropriado, pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett.

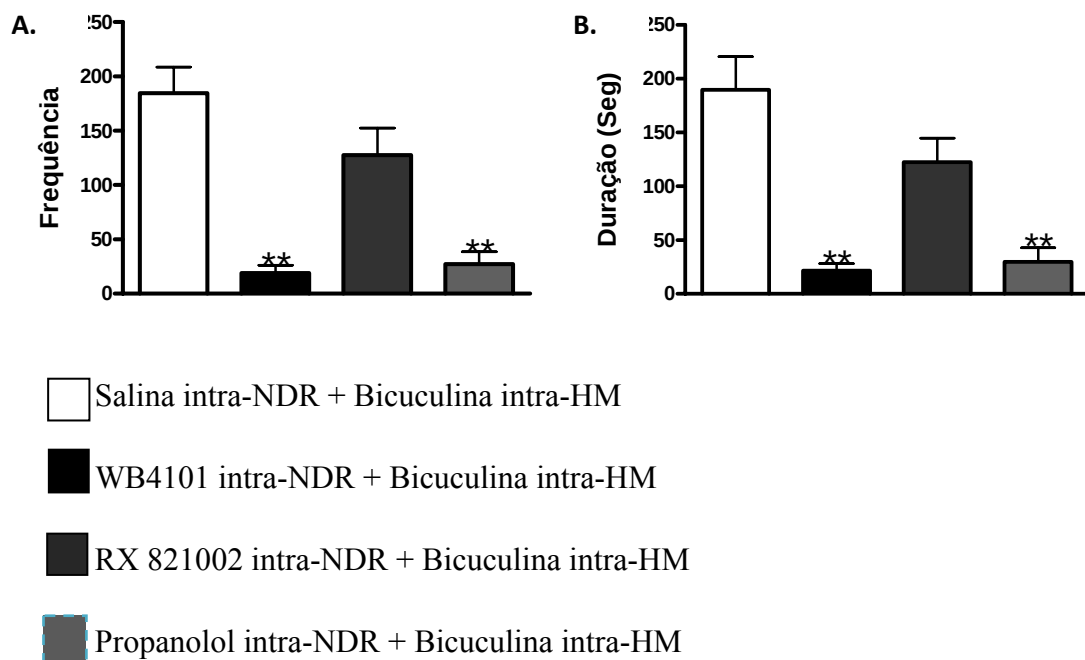


Fig 16. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial 10 minutos após a microinjeção de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) (n=8), WB4101 (5µg/0.2µl) (n=8), RX 821002 (5µg/0.2µl) (n=8) ou propanolol (5µg/0.2µl) (n=8) no núcleo dorsal da rafe sobre (A) frequência e (B) duração do comportamento de levantamentos. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; **P<0.01, comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida, quando apropriado, pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett.

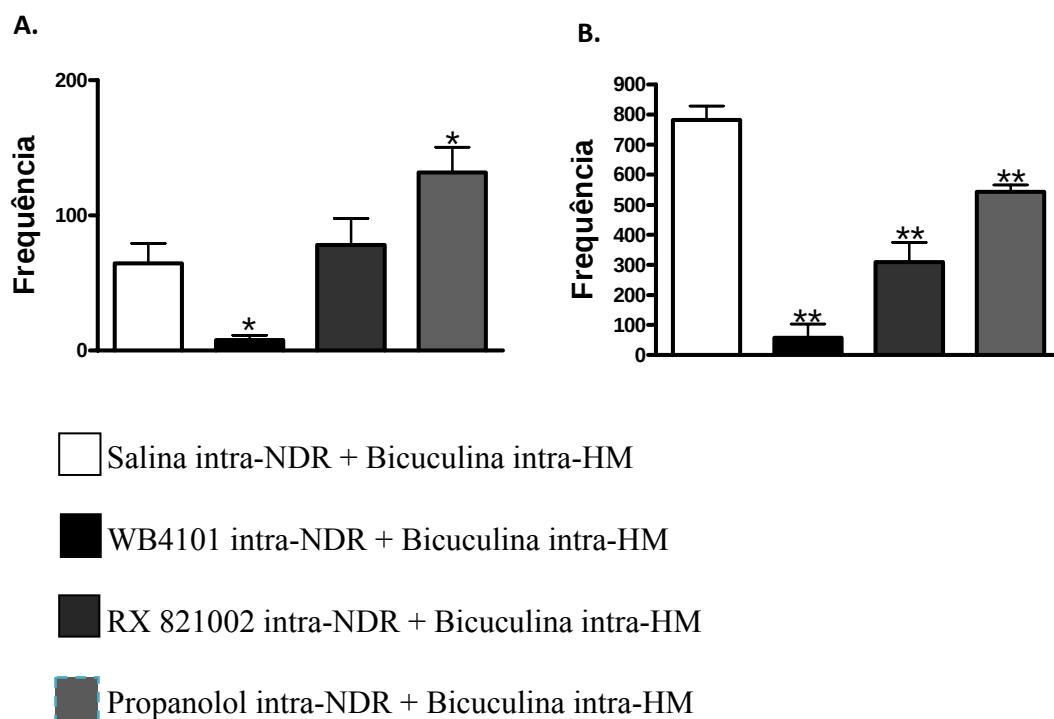
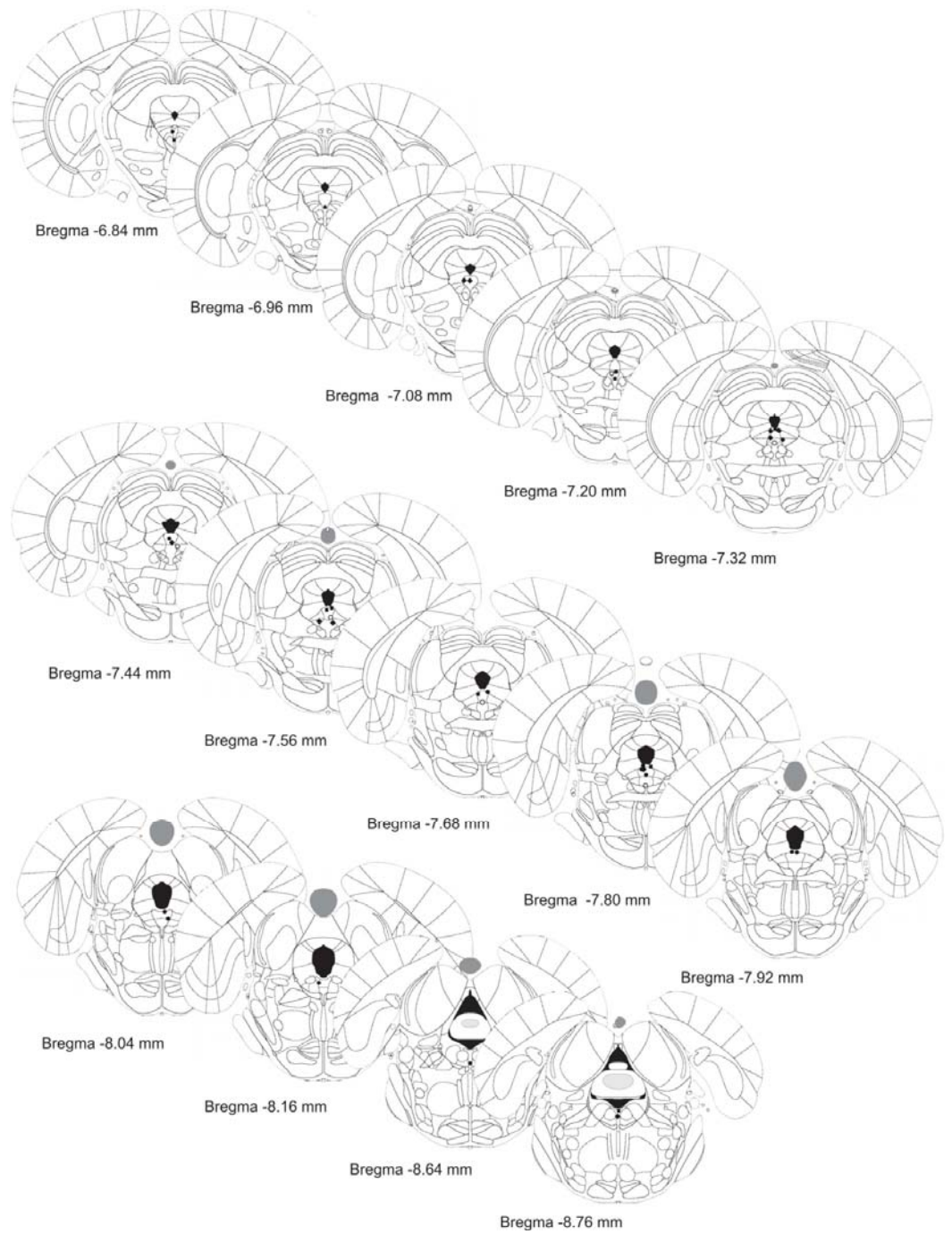
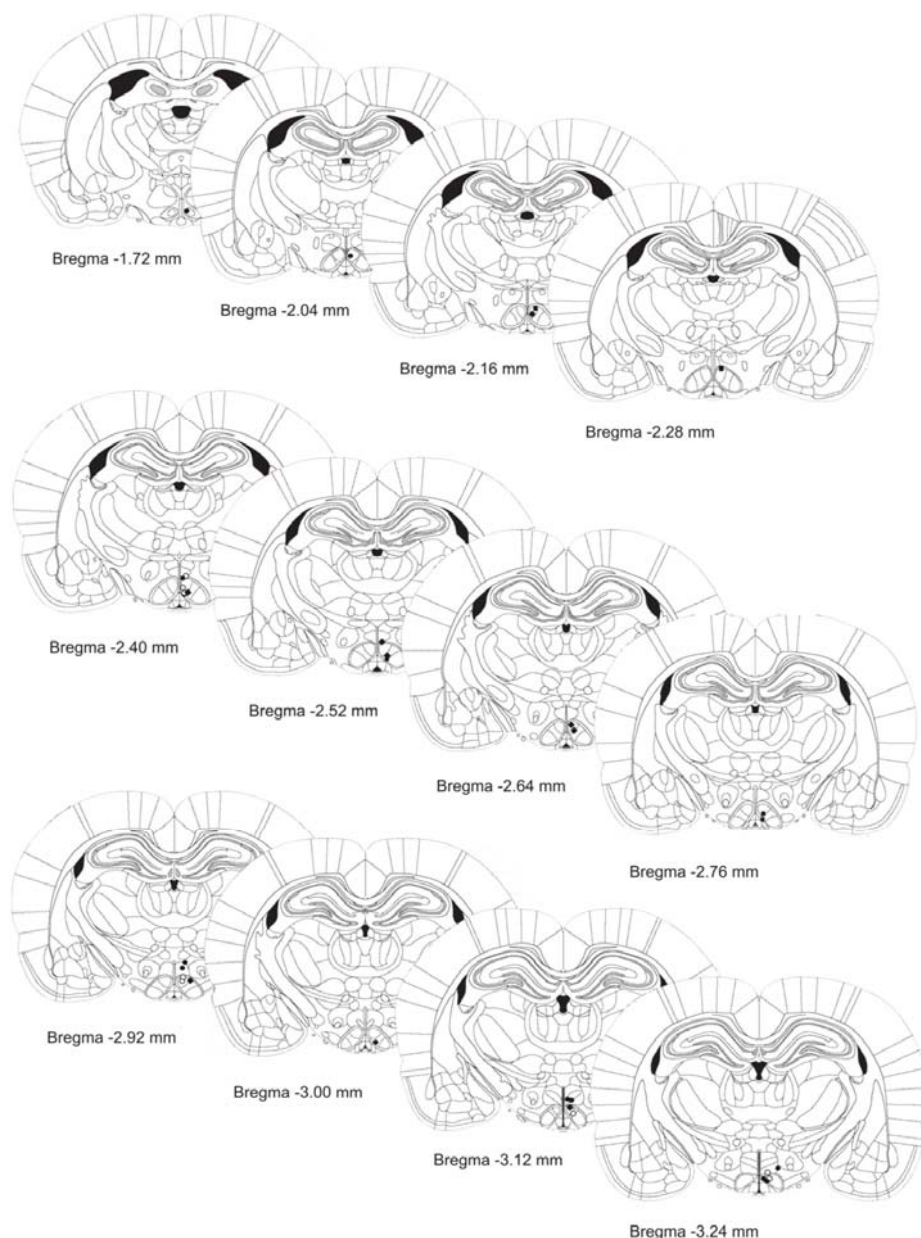


Fig 17. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial 10 minutos após a microinjeção de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) (n=8), WB4101 (5µg/0.2µl) (n=8), RX 821002 (5µg/0.2µl) (n=8) ou propanolol (5µg/0.2µl) (n=8) no núcleo dorsal da rafe sobre (A) frequência de cruzamentos no centro da arena e (B) frequência de cruzamentos na periferia da arena. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; *p<0.05, **P<0.01, quando comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida, quando apropriado, pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett.





- Salina (intra-NDR) + Bicuculina (40ng/0.2ul, intra-HM)
- Wb4101 (5ug/0.2ul, intra-NDR) + Bicuculina (40ng/0.2ul, intra-HM)
- Rx821002 (5ug/0.2ul, intra-NDR) + Bicuculina (40ng/0.2ul, intra-HM)
- ◆ Propanolol (5ug/0.2ul, intra-NDR) + Bicuculina (40ng/0.2ul, intra-HM)

Fig 18. Representação esquemática dos sítios de microinjeção de salina fisiológica (0.9%) intra-NDR + Bicuculina (40ng/0,2μL) intra-HM (círculos brancos); WB4101 (5μg/0.2μl) intra-NDR + Bicuculina (40ng/0,2μL) intra-HM (círculos pretos); Rx821002 (5μg/0.2μl) intra-NDR + Bicuculina (40ng/0,2μL) intra-HM (quadrados pretos) and Propanolol (5μg/0.2μl) intra-NDR + Bicuculina (40ng/0,2μL) intra-HM (diamantes pretos) em anagramas de secções coronais do encéfalo de *Rattus norvegicus* do Atlas de Paxinos e Watson (1997).

4.3 Estudo Neurofarmacológico no Hipotálamo Medial.

O bloqueio de receptores GABAérgicos no HM 10 minutos após a microinjeção de salina (n=8) no mesmo substrato neural eliciou uma série de reações defensivas e não defensivas tais como levantamentos, atenção defensiva, avaliação de risco, movimento defensivo retrógrado, fuga e saltos. O pré-tratamento do HM com os diferentes antagonistas farmacológicos para os receptores α_1 (n=8), α_2 (n=8) e β (n=8) noradrenérgicos, causou algumas diferenças estatisticamente significantes no comportamento de defesa evocado pela diminuição da atividade GABAérgica no HM. O pré-tratamento do HM com antagonista para receptores β causou saltos em sentido vertical quando os animais encontravam-se apoiados sobre as paredes da arena e sempre antecidos por um comportamento exploratório de levantamento, entando que os animais com microinjeções do antagonista para receptores α_2 exibiu também saltos em sentido horizontal, quando o animal se encontrava com as quatro patas sobre a superfície da arena. Já os animais pré-tratados com antagonistas para receptores α_1 mostraram uma ausência de saltos. Por sua vez, o comportamento de fuga expressado nos grupos de animais pré-tratados com antagonistas para receptores α_1 e β consistiu em corridas prolongados ao lado da amurada da arena. Por outro lado, os animais pré-tratados com antagonistas para receptores α_2 mostrou-se mais agitado, com sacudidas ocasionais e com corridas muito curtas e efêmeras.

Com respeito às reações de defesa induzidas pela microinjeção de bicuculina nas subdivisões ventromedial ou dorsomedial do hipotálamo 10 minutos após a administração de salina ou dos antagonistas para receptores α_1 , α_2 ou β noradrenérgicos também no HM, a ANOVA de uma via mostrou uma ausência de efeitos significativos na duração do comportamento rotatório e na frequência e duração do movimento defensivo retrógrado e de saltos ($F(3,31)$ = variando de 0.8612 a 2.754, $P>0.05$, Figuras 21, 22B, 24). Por sua vez, a ANOVA de uma via mostrou efeitos significativos para frequência de comportamento rotatório, frequência e duração de levantamentos, avaliação de risco, atenção defensiva e fuga. A análise *post hoc*, utilizando o teste de comparação múltipla de Dunnet, evidenciou uma diminuição significativa na frequência do comportamento rotatório ($F(3,31)$ = 3.762,

P<0.05, Figura 22A), frequência e duração dos levantamentos (F(3,31)= variando de 5.417 a 6.202, P<0.01 e P<0.05, respectivamente, Figura 25), atenção defensiva (F(3,31)= variando de 6.516 a 17.02, P<0.01 e P<0.05, respectivamente, Figura 20) e fuga (F(3,31)= variando de 3.794 a 11.13, P<0.01 e P<0.05, respectivamente) no grupo de animais pré-tratado com o antagonista para receptores α_1 no HM quando comparado com o grupo controle.

Em relação aos animais pré-tratados com o antagonista para receptores α_2 no HM, houve um aumento significativo na frequência e duração da avaliação de risco (F(3,31)= variando de 4.084 a 4.451, P<0.01, Figura 19) após a microinjeção de bicuculina no HM, quando comparado com o grupo controle. O grupo de animais é-tratados com propanolol mostrou diminuição na frequência do comportamento rotatório (F(3,31)= 3.762, P<0.05), na frequência e duração dos levantamentos (F(3,31)= variando de 5.417 a 6.202, P<0.01 e P<0.05, respectivamente, Figura 25), na atenção defensiva (F(3,31)= variando de 6.516 a 17.02, P<0.01 e P<0.05, respectivamente, Figura 20) e na fuga (F(3,31)= variando de 3.794 a 11.13, P<0.01 e P<0.05, respectivamente) quando comparado com o grupo controle.

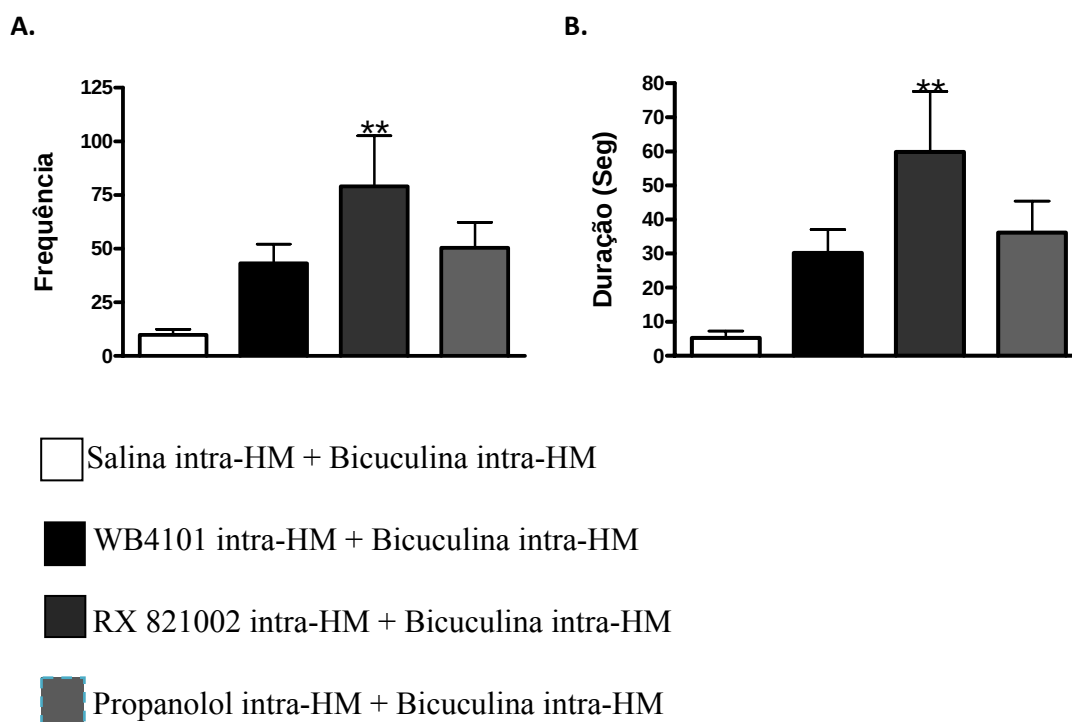


Fig 19. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial 10 minutos após a microinjeção de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) (n=8), WB4101 (5µg/0.2µl) (n=8), RX 821002 (5µg/0.2µl) (n=8) ou propanolol (5µg/0.2µl) (n=8) no hipotálamo medial sobre (A) Frequência e (B) duração da avaliação de risco. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; **P<0.01, quando comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida, quando apropriado, pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett.

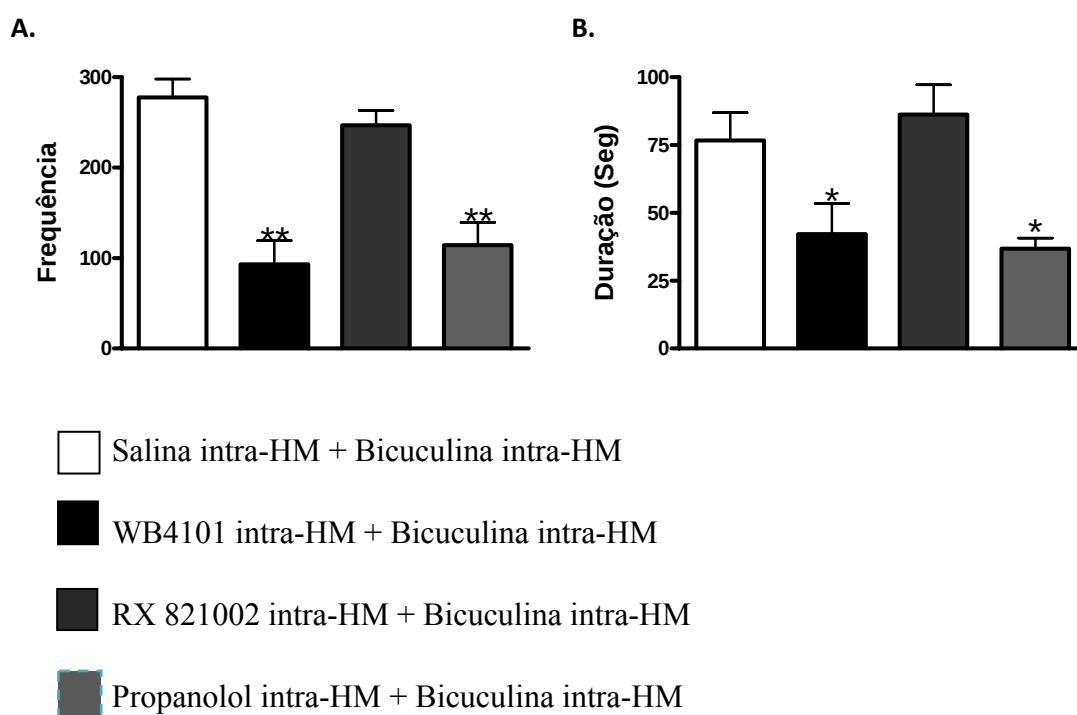


Fig 20. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2μl) no hipotálamo medial 10 minutos após a microinjeção de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2μL) (n=8), WB4101 (5μg/0.2μl) (n=8), RX 821002 (5μg/0.2μl) (n=8) ou propanolol (5μg/0.2μl) (n=8) no hipotálamo medial sobre (A) Frequência e (B) duração de atenção defensiva. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; *p<0.05, **P<0.01, comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida, quando apropriado, pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett.

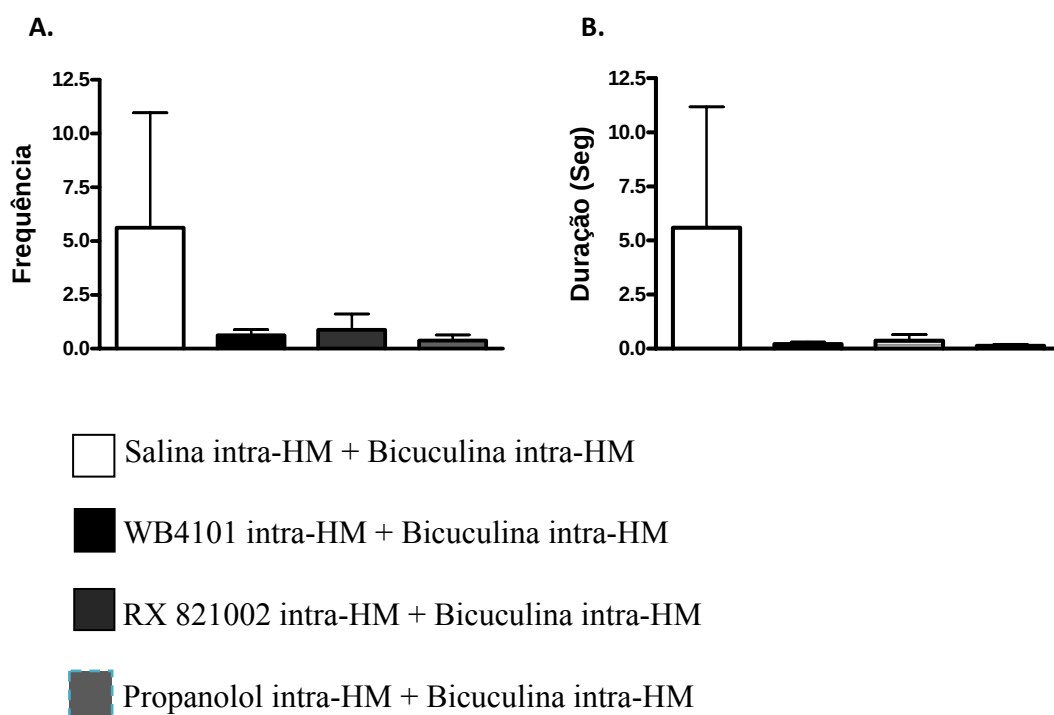


Fig 21. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial 10 minutos após a microinjeção de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) (n=8), WB4101 (5µg/0.2µl) (n=8), RX 821002 (5µg/0.2µl) (n=8) ou propanolol (5µg/0.2µl) (n=8) no hipotálamo medial sobre (A) Frequência e (B) duração do movimento defensivo retrógrado. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; $p > 0.05$, em ambos os casos, comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett.

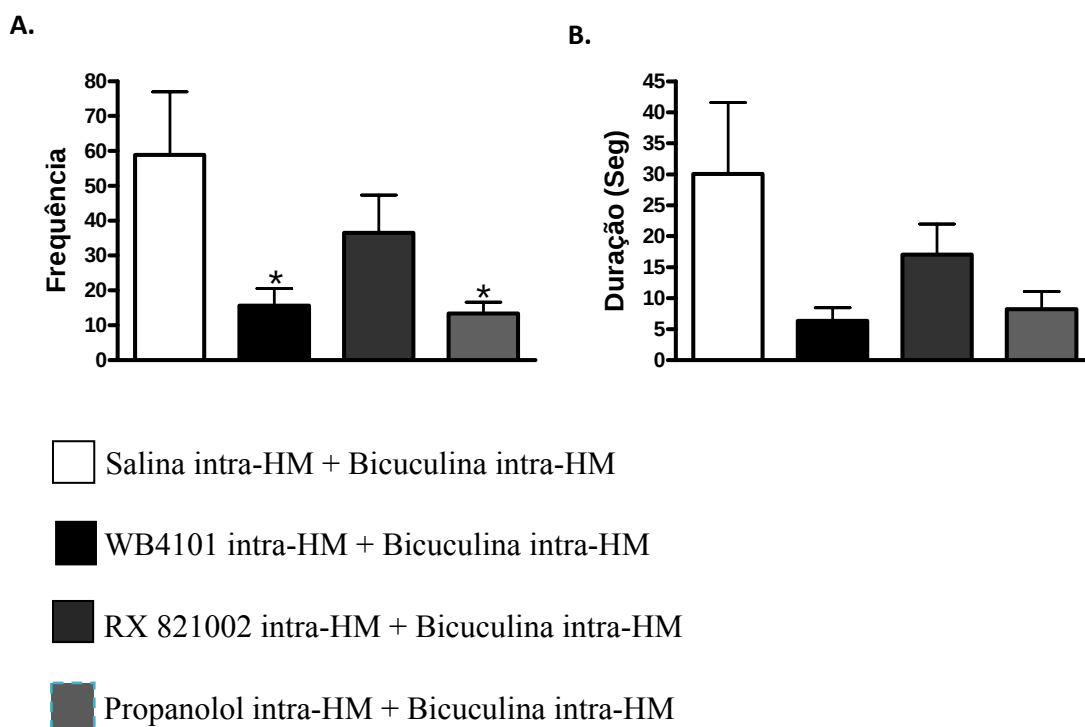


Fig 22. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2μl) no hipotálamo medial 10 minutos após a microinjeção de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2μL) (n=8), WB4101 (5μg/0.2μl) (n=8), RX 821002 (5μg/0.2μl) (n=8) ou propanolol (5μg/0.2μl) (n=8) no hipotálamo medial sobre (A) Frequência e (B) duração do comportamento rotatório. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; *p<0.05, comparados com o grupo controle, segundo análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett.

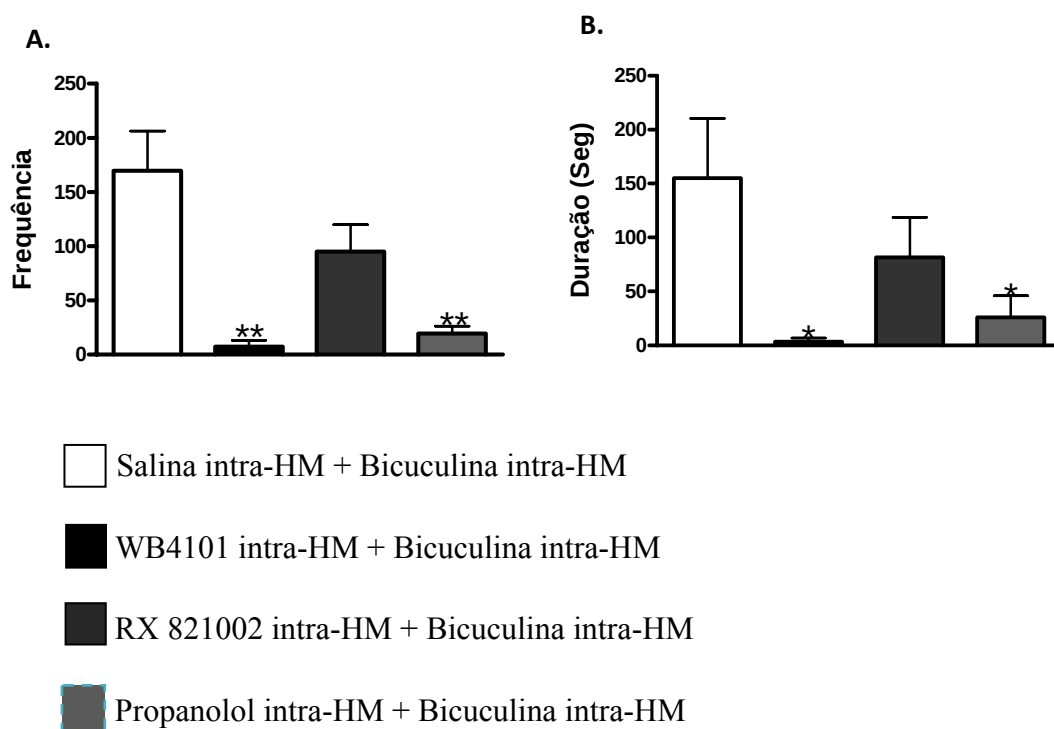


Fig 23. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial 10 minutos após a microinjeção de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) (n=8), WB4101 (5µg/0.2µl) (n=8), RX 821002 (5µg/0.2µl) (n=8) ou propanolol (5µg/0.2µl) (n=8) no hipotálamo medial sobre (A) Frequência e (B) duração da fuga. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; *p<0.05 , **P<0.01, comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida, pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett.

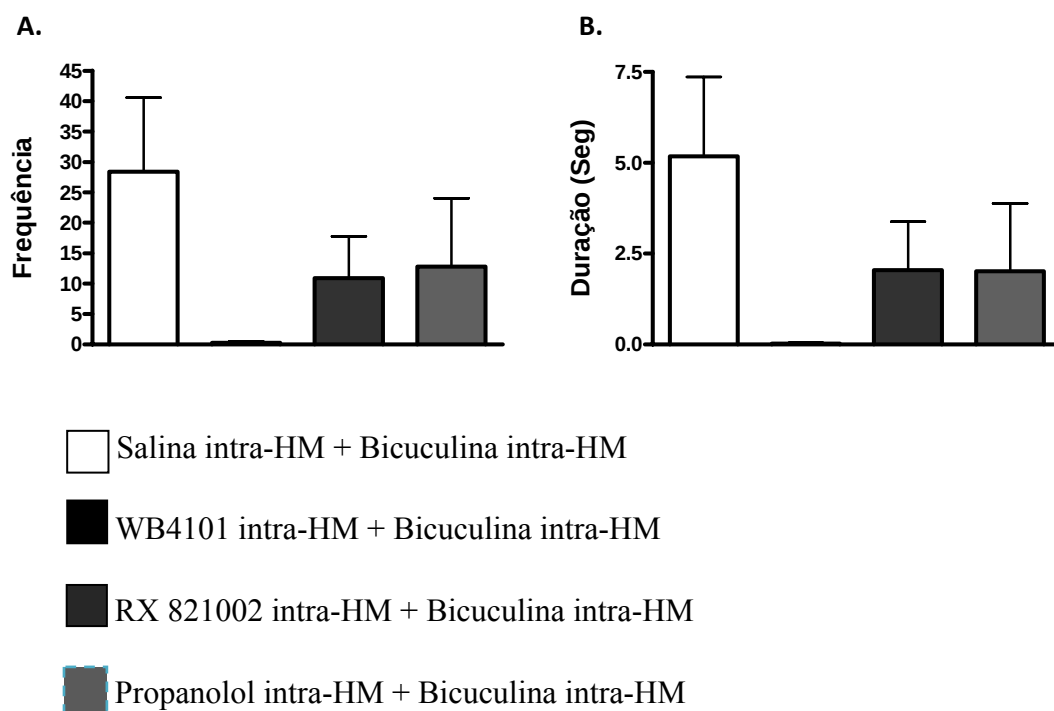


Fig 24. Efeitos da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial 10 minutos após a microinjeção de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) (n=8), WB4101 (5µg/0.2µl) (n=8), RX 821002 (5µg/0.2µl) (n=8) ou propanolol (5µg/0.2µl) (n=8) no hipotálamo medial sobre (A) Frequência e (B) duração dos saltos. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; $p > 0.05$ em ambos os casos, quando comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett.

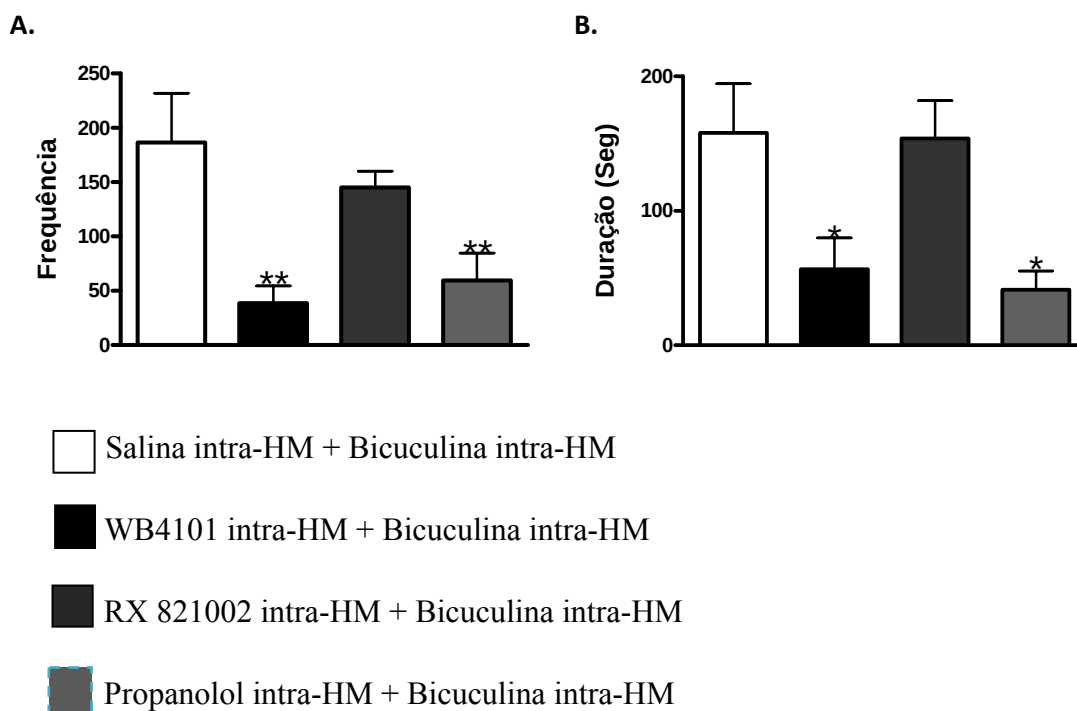


Fig 25. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial 10 minutos após a microinjeção de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) (n=8), WB4101 (5µg/0.2µl) (n=8), RX 821002 (5µg/0.2µl) (n=8) ou propanolol (5µg/0.2µl) (n=8) no hipotálamo medial sobre (A) Frequência e (B) duração dos levantamentos. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; *p<0.05, **P<0.01, comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett.

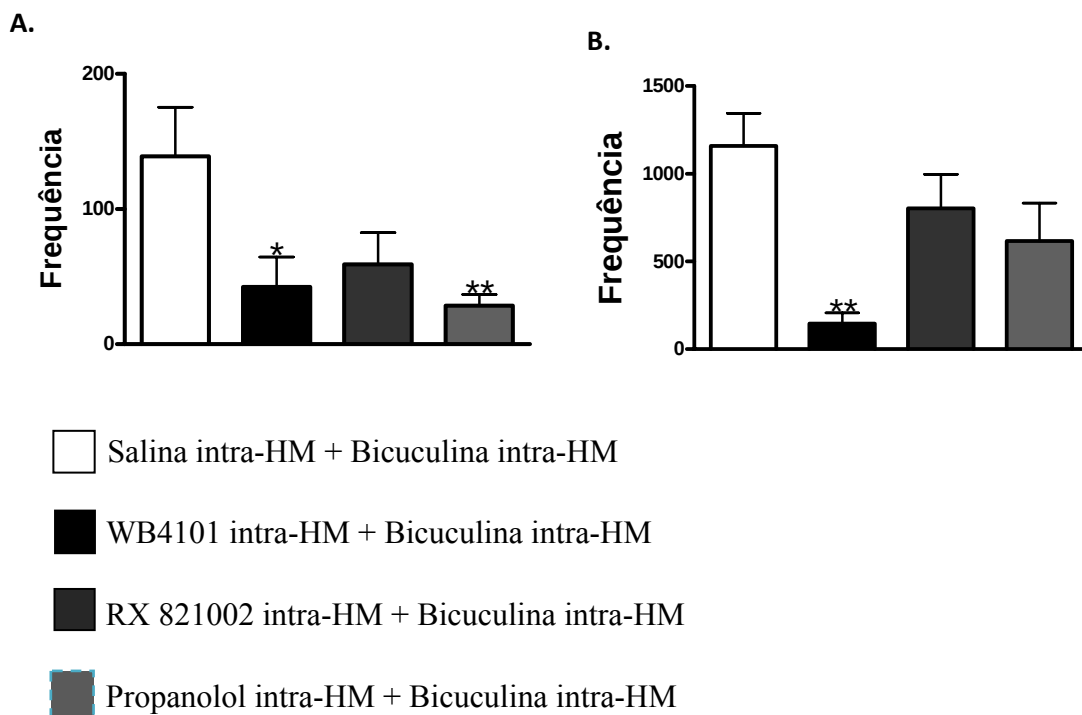


Fig 26. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2μl) no hipotálamo medial 10 minutos após a microinjeção de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2μL) (n=8), WB4101 (5μg/0.2μl) (n=8), RX 821002 (5μg/0.2μl) (n=8) ou propanolol (5μg/0.2μl) (n=8) no hipotálamo medial sobre (A) Frequência de cruzamentos no centro e (B) na periferia do campo aberto. Os dados foram representados como média e erro padrão da média; *p<0.05, **P<0.01, comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett.

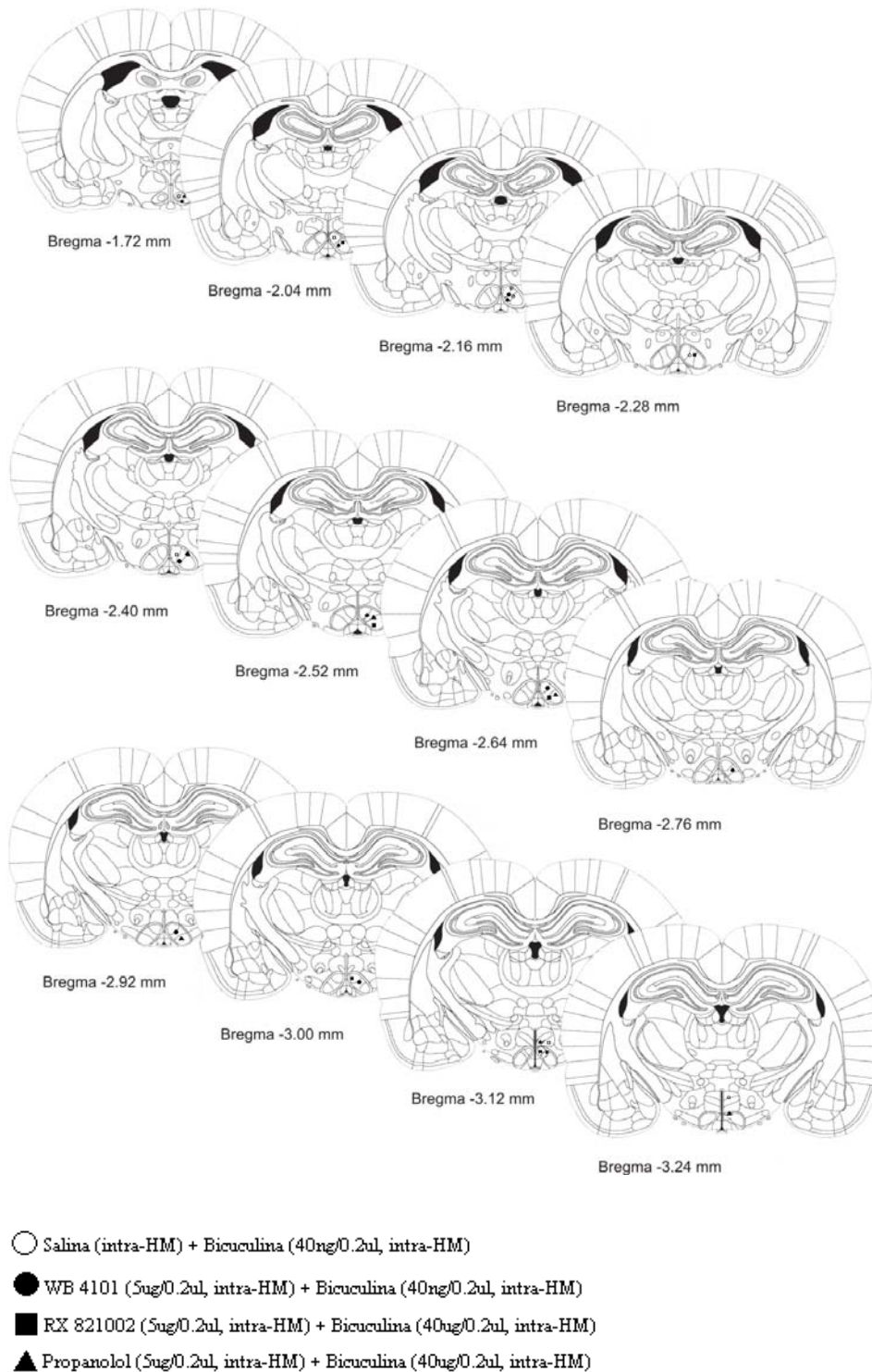


Fig 27. Representação esquemática dos sítios de microinjeção de salina fisiológica (0.9%) intra-HM + Bicuculina (40ng/0,2μL) intra-HM (círculos brancos); WB4101 (5μg/0.2μl) intra-HM + Bicuculina (40ng/0,2μL) intra-HM (círculos pretos); Rx821002 (5μg/0.2μl) intra-HM + Bicuculina (40ng/0,2μL) intra-HM (quadrados pretos) e Propanolol (5μg/0.2μl) intra-HM + Bicuculina (40ng/0,2μL) intra-HM (triângulos pretos) em anagramas de secções coronais do encéfalo de *Rattus norvegicus* do Atlas de Paxinos e Watson (1997).

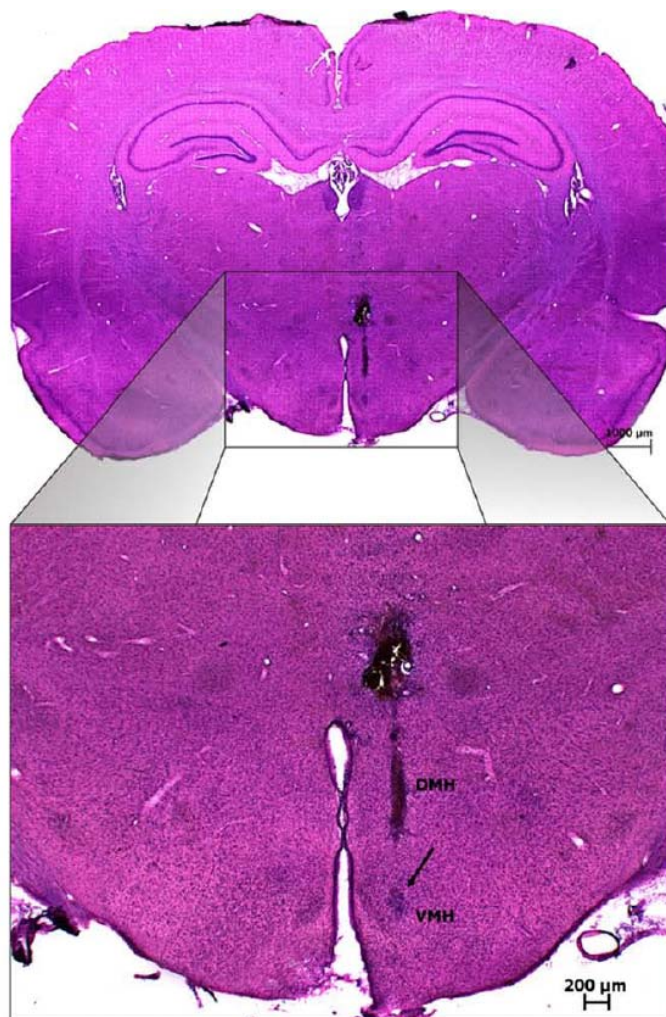


Fig 25. Fotomicrografia de uma secção coronal do cérebro de *Rattus norvegicus*, mostrando um sítio representativo de uma administração central de bicuculina (seta preta) com uma concentração de 40ng/0.2μl no núcleo ventromedial do hipotálamo. Pode-se observar, desde o aspecto mais dorsal até o mais ventral, o trajeto da cânula-guia e da agulha de microinjeção. DMH: hipotálamo dorsomedial; VMH: hipotálamo ventromedial. Coloração: Hematoxilina-eosina.

5 DISCUSSÃO

5.1 Estudo Neurofisiológico

No presente estudo, o antagonismo dos receptores GABA_A nas divisões ventromedial e dorsomedial do hipotálamo no grupo controle provocou um conjunto de respostas caracterizadas por interrupção do comportamento em curso, e extensão das patas anteriores com elevação da cabeça e farejamento do ar circundante (atenção defensiva), alongamento da porção anterior do corpo sem movimentar a porção posterior do mesmo (avaliação de risco), deslocamento abrupto do corpo em direção retrógrada com a cabeça riste à frente (movimentos defensivos retrógrados), comportamento rotatório (rotação de 360°), corridas (fuga) e saltos. Esse padrão comportamental é semelhante ao registrado em circunstâncias de conotação aversiva, onde estímulos específicos indicam a existência de um perigo real para a integridade corporal do organismo. Portanto, os presentes dados sugerem a existência de mecanismos GABAérgicos presentes nas redes neurais do hipotálamo medial, os quais mantêm uma inibição tônica dos circuitos neurais que, quando ativados, organizam uma série de condutas adaptativas na procura da sobrevivência do organismo (FREITAS e cols, 2009; SANTOS e cols., 2008; JOHNSON e SHEKHAR, 2006).

Por sua vez, vale a pena considerar o fato de que o padrão de respostas registradas após a interrupção da neurotransmissão GABAérgica nos núcleos hipotalâmicos ventromedial e dorsomedial resulta em um conjunto de respostas comportamentais sensivelmente diferente daquele eliciado depois de administrar o mesmo antagonista farmacológico de receptores GABA_A em outras estruturas mais caudais do sistema encefálico da aversão, como, por exemplo a substância cinzenta periaquedutal dorsal e os corpos quadrigêmeos (GRAEFF e cols., 1993, RIBEIRO e cols., 2005, CASTELLAN-BALDAN e cols., 2006). Com efeito, quando comparados ambos os repertórios comportamentais, é

possível observar que existem algumas diferenças tanto na frequência quanto na duração das respostas de defesa, apresentando as respostas estudadas no presente trabalho uma menor intensidade, o que poderia sugerir que as divisões ventromedial e dorsomedial do hipotálamo estão envolvidas na organização de comportamentos aversivos mais elaborados e menos explosivos. A esse respeito, o fato dos animais, após a estimulação química prosencefálica, apresentarem corridas de curta duração e a constatação de que os saltos serem sempre direcionados à porção superior do campo aberto e precedidos por um comportamento exploratório de levantamento na parede lateral da arena suportam essa hipótese. Também, observaram-se situações nas quais os roedores tentavam escavar na superfície de vidro da arena ou morder as paredes de acrílico da mesma aparentemente à procura de uma saída. Dessa maneira, o substrato neural abordado no presente projeto poderia ser empregado para o estudo da expressão patológica de estados aversivos.

O padrão comportamental observado no presente estudo após a administração intra-hipotalâmica de bicuculina em animais com lesão do LC mostra uma diminuição significativa nos levantamentos, o que poderia sugerir um decremento nas respostas exploratórias dos animais após a lesão daquela importante fonte de eferências noradrenérgicas. Alguns estudos na literatura têm sugerido o papel do LC na expressão de comportamentos exploratórios motivados, dando apoio à teoria segundo a qual a atividade tônica das vias noradrenérgicas que partem do LC exerce um efeito direto sobre a execução de comportamentos alternativos em diferentes situações (STONE e cols., 2009; STON-JONES e COHEN, 2005). Por sua vez, achados farmacológicos têm permitido a proposição de que quando o organismo encontra-se na presença de ambientes novos, ocorre uma ativação dos neurônios noradrenérgicos do LC, os quais participam ativamente na expressão da atividade exploratória (LIN e cols., 2008). Assim, os resultados do presente trabalho podem sugerir que o LC encontra-se envolvido na modulação de condutas direcionadas à exploração de ambientes novos.

Também é importante mencionar que a citada diminuição nos levantamentos após a administração de bicuculina no hipotálamo medial cinco dias depois da lesão do LC apresenta-se acompanhada por um decremento significativo na frequência e duração dos saltos. A esse respeito, a resposta de pânico eliciada pelo bloqueio da transmissão GABAérgica no hipotálamo medial parece estar caracterizada pela procura de uma saída do contexto aversivo no qual se encontra o organismo submetido a uma diminuição aguda da

neurotransmissão GABAérgica no hipotálamo medial (FREITAS e cols, 2009). Levando em consideração as características físicas do teste comportamental empregado no trabalho, o teste de campo aberto, a única via de escape viável encontra-se na porção superior da amurada. De fato, no grupo controle, todos os saltos eliciados pela desinibição GABAérgica no HM apresentaram-se quando o animal encontrava-se apoiando suas patas traseiras na superfície do campo aberto e as anteriores sobre a parede lateral do mesmo, direcionando os saltos para porção superior da amurada. Desta maneira, nesse grupo, todo salto esteve precedido por um levantamento, mas não todo levantamento esteve seguido por um salto. Assim, o mencionado decremento na frequência e duração dos levantamentos induzida pelo antagonismo dos receptores GABA_A no hipotálamo medial 5 dias após a lesão do LC poderia também estar relacionado ao efeito antiaversivo da lesão noradrenérgica.

Os resultados obtidos no presente estudo também mostram uma diminuição significativa na frequência e duração das respostas de atenção defensiva no grupo de animais com lesão do LC quando comparado com o grupo *sham*. Sabe-se que existe uma gradação dos estados aversivos que depende do contexto no qual se encontra o organismo. Assim, em situações nas quais ainda não tem sido claramente identificada a fonte de perigo ou em que a distância existente entre o estímulo aversivo e o organismo ainda é grande, o sistema encefálico da aversão executa uma série de respostas fisiológicas que aumentam os níveis de vigilância e preparam o organismo para agir no caso do nível de perigo aumentar. Geralmente, esse aumento nos estados de vigilância envolve um recrutamento dos recursos atencionais, que permitem ao organismo focalizar a atenção sobre estímulos no ambiente que sinalizem uma ameaça para a sua sobrevivência. Muitos autores têm caracterizado esse estado de ativação como um alerta defensivo, e são muitas as evidências que vinculam esse alerta com as projeções noradrenérgicas que partem do LC. De tal modo que as redes neurais do LC induziriam um aumento nos estados de alerta que, por sua vez, reduziriam a janela atencional ao redor de um ponto no ambiente (TRACY e cols, 2000). Dessa maneira, tem sido sugerido que as eferências do LC facilitariam o processamento de informação relevante, modulando a coleta de informação sensorial saliente, através de uma série de circuitos sensoriais, atencionais e mnésicos, tanto corticais quanto subcorticais. Assim, a desregulação da neurotransmissão noradrenérgica que parte do LC poderia contribuir para disfunções cognitivas associadas com transtornos psiquiátricos, tais como a síndrome de estresse pós-traumático (BERRIDGE e WATERHOUSE, 2003; SARA e SEGAL, 1991). Resumindo, a

diminuição significativa observada no presente estudo na frequência e duração das respostas de atenção defensiva após a lesão das eferências noradrenérgicas que partem do LC sugere que essa estrutura desempenha um papel fundamental na execução do padrão fisiológico e comportamental que prepara ao organismo para agir em situações de conotação aversiva.

Quanto à frequência e duração dos saltos e da fuga, o bloqueio da neurotransmissão GABAérgica nas divisões ventromedial e dorsomedial do hipotálamo cinco dias após a lesão do LC evidenciou uma significativa diminuição de sua expressão, quando comparado com o grupo controle. Comumente, quando o organismo está em um contexto aversivo, no qual o nível de risco representa um dano iminente para a integridade corporal, o sistema encefálico da aversão exerce um conjunto de respostas fisiológicas e motoras que ajudam ao organismo para agir com eficácia e posicionar-se ao abrigo da fonte de perigo. Em geral, esse padrão comportamental inclui condutas que envolvem um alto gasto energético, pois requerem ações rápidas que consigam deslocar ao organismo fora da situação de perigo na qual se encontra. Nesse caso, os saltos e a fuga representam respostas que obedecem a essas necessidades. Com respeito ao papel do LC na elaboração de tais comportamentos, estudos utilizando estimulação química de estruturas mesencefálicas têm demonstrado um aumento na expressão da proteína c-fos no LC quando eliciado o comportamento de escape (FERREIRA-NETTO e cols., 2007; BORELLI e cols., 2006). Por sua vez, utilizando abordagens farmacológicas, tem sido proposto que a lesão do LC produz uma diminuição nas respostas de escape perante estímulos nocivos que sinalizam dano corporal iminente, sugerindo que as projeções noradrenérgicas que partem dessa estrutura desempenham um papel muito importante na modulação de comportamentos aversivos que favorecem a sua autoconservação (HAJOS e ENGBERG, 1991). Assim também, tem sido descrita uma significativa projeção noradrenérgica que parte do LC e se projeta para o hipotálamo, a qual poderia modular as respostas neuroendócrinas que seguem uma situação altamente estressante mediante sua ação sobre neurônios, por exemplo, liberadores do fator liberador de corticotropina (ITOI e SUGIMOTO, 2010). É provável, então, que as eferências noradrenérgicas que partem do LC e conectam com o hipotálamo participem nas mudanças metabólicas necessárias para a rápida utilização dos recursos energéticos em situações aversivas. Isso ajudaria a explicar o efeito da lesão do LC na frequência e duração da fuga e dos saltos após a estimulação química do hipotálamo medial.

Conforme os resultados obtidos no presente trabalho e os mencionados achados na literatura, que vêm ao encontro do presente trabalho, é possível supor, então, que a lesão do LC gera um efeito depressor nos comportamentos defensivos eliciados pela interrupção da neurotransmissão GABAérgica nas redes neurais do hipotálamo medial. Contudo, a abordagem empregada no presente estudo não permite determinar com precisão se os efeitos da lesão das vias noradrenérgicas devem-se ao bloqueio das conexões existentes entre o LC e o hipotálamo medial ou se tais efeitos são produto da ablação das vias que comunicam o LC com estruturas recrutadas pelo hipotálamo medial na elaboração das respostas de pânico, como, por exemplo o núcleo dorsal da rafe. No primeiro caso, existiria uma modulação direta sobre o substrato neural responsável da organização dos estados aversivos. Já no caso de afetar as eferências do LC para outras regiões que possam também interferir na atividade de neurônios do hipotálamo medial, estar-se-ia falando de uma modulação indireta noradrenérgica nas condutas de medo elaboradas ao nível hipotalâmico. Não obstante, não podemos afastar a possibilidade de que as duas hipóteses sejam verdadeiras. Sabe-se que o LC constitui a principal origem das projeções noradrenérgicas no sistema nervoso central, particularmente, que se projetam ao prosencéfalo. Assim, as eferências que partem dessa estrutura localizada no tronco cerebral oferecem uma ampla possibilidade de conexões com diferentes estruturas que podem, por sua vez, interferir com a atividade de núcleos mais caudais, como o hipotálamo. Naturalmente, têm sido descritas conexões entre o LC e núcleos hipotalâmicos, o que poderia sugerir que existe uma influência direta, noradrenérgica, nas áreas diencefálicas que controlam os estados aversivos. Não obstante, também têm sido descritas conexões entre o LC e outras estruturas do sistema límbico que participam na organização das respostas defensivas.. Assim, a organização neuroanatômica do sistema noradrenérgico faz com que ele consiga modular rapidamente e globalmente a função encefálica em resposta a mudanças do ambiente, tais como o surgimento de estímulos aversivos. Portanto, o incremento na taxa de disparos no próprio LC pode induzir manifestações comportamentais sugestivas de medo, tais como dorso arqueado e piloereção no gato (Bremner e cols., 1996). Em harmonia com esse achado, microinjeções de bicuculina diretamente no LC produzem ataques de pânico em camundongos (PRIOLO e cols., 1991). Enfim, os presentes dados sugerem que a disfunção das projeções que partem do LC diminui significativamente o padrão comportamental de medo induzido pelo bloqueio da neurotransmissão GABAérgica no hipotálamo medial.

5.2 Estudo Neurofarmacológico no Núcleo Dorsal da Rafe

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram uma diminuição significativa nos levantamentos e saltos no grupo de animais tratados com administração intra-hipotalâmica de bicuculina 10 minutos após o pré-tratamento do NDR com antagonistas de receptores α_1 ou β . Apesar dos levantamentos em geral serem considerados uma medida do comportamento motor e exploratório do animal (YAGUCHI e cols., 2010, KLENEROVA e cols., 2009), é importante mencionar que o aspecto organizado da resposta de pânico do modelo fisiológico de medo empregado no presente trabalho caracteriza-se por apresentar tentativas de escape direcionadas à uma possível saída da área aversiva (FREITAS e cols, 2009). Por sua vez, devido às propriedades físicas do campo aberto, a única saída disponível para o animal encontra-se na porção superior da arena. De acordo com isso, a maioria das tentativas de escape estaria direcionada à única saída disponível no teste de *open-field*. De fato, no grupo controle, todos os saltos ocorreram quando o animal encontrava-se levantado sobre as suas patas traseiras e apoiado sobre uma das paredes da arena, com o focinho direcionado para a porção superior do campo aberto.. Já no grupo pré-tratado com os antagonistas para receptores α_1 ou β , observou-se uma diminuição significativa nos levantamentos acompanhada por uma ausência de saltos, o que sugere que o decréscimo nos levantamentos não está necessariamente associado a uma deficiência no comportamento motor e exploratório dos animais, mas também poder-se-ia encontrar diretamente relacionado com as respostas elaboradas de medo organizadas ao nível hipotalâmico visadas no presente trabalho.

Ainda em relação ao comportamento motor, o grupo de animais pré-tratados com antagonista para receptores α_1 no núcleo dorsal da rafe evidenciou uma diminuição no número de cruzamentos nas duas regiões do campo aberto estudadas. É claro que esses efeitos poderiam guardar uma relação com os comportamentos defensivos estudados no presente trabalho, já que o citado antagonismo também produziu uma diminuição na frequência e duração da fuga, comportamento que está caracterizado por um excesso de atividade locomotora e que envolve amplos deslocamentos, portanto, dando lugar a um elevado número de cruzamentos. Contudo, também existem dados na literatura sugerindo que

aumentos na liberação de serotonina em diferentes regiões do sistema nervoso central, incluindo o hipotálamo medial, podem afetar o comportamento exploratório dos animais no teste experimental do campo aberto (BRODERICK e PHELIX, 1997; LI e cols., 2004). Assim também, utilizando técnicas de imuno-histoquímica, tem sido demonstrado que, após a exposição ao campo aberto, ocorre um aumento significativo na expressão de c-fos no núcleo dorsal da rafe, o que sugere o envolvimento das projeções serotoninérgicas que partem dessa estrutura na organização de respostas exploratórias (HALE e cols., 2008). Os presentes achados indicam que, devido ao efeito excitatório dos receptores α_1 , seu antagonismo no núcleo dorsal da rafe poderia diminuir a atividade dessa estrutura e, conseqüentemente, reduzir a liberação de serotonina em regiões encefálicas relacionadas com a execução do comportamento exploratório. Assim, os receptores α_1 presentes no NDR poderiam também desempenhar um papel na elaboração de condutas direcionadas à exploração de ambientes novos.

Quanto à diminuição em respostas como atenção defensiva e fuga, os dados obtidos indicam que as aferências noradrenérgicas ao núcleo dorsal da rafe que agem sobre receptores α_1 modulam a atividade do circuito que conecta o núcleo dorsal da rafe com os núcleos do hipotálamo medial ou com outras estruturas recrutadas pelo hipotálamo medial na elaboração de respostas defensivas (LOWRY, 2002; JOHNSON e cols., 2008; STONE e cols., 2007; JUDGE e GARTSIDE, 2006). De fato, tem sido demonstrado que o antagonismo de receptores α_1 no núcleo dorsal da rafe bloqueia os processos de condicionamento aversivo, o que sugere que a ativação desses receptores cumpre um papel fundamental na elaboração de respostas defensivas (GRAHN e cols., 2002). Deste modo, os receptores α_1 presentes no núcleo dorsal da rafe desempenham um papel importante no controle das respostas defensivas eliciadas pela alteração do sistema GABAérgico no hipotálamo medial. Sabe-se que o receptor α_1 é geralmente pós-sináptico e produz um efeito fisiológico excitatório no neurônio, quando ativado. Baseando-se nisso, é de se esperar que seu antagonismo no núcleo dorsal da rafe produza uma diminuição da atividade nesse núcleo, a qual, por sua vez, vai diminuir a sua influência sobre as conexões que possui com o hipotálamo medial.

Com respeito ao bloqueio dos receptores GABA_A no hipotálamo medial 10 minutos após o antagonismo dos receptores α_2 no núcleo dorsal da raphe, os dados revelaram aumentos significativos na frequência e duração dos comportamentos de avaliação de risco e

atenção defensiva. Sabe-se que o sistema encefálico da aversão responde diferencialmente em função da situação na qual se encontra o organismo, organizando padrões de resposta que correspondam ao grau de perigo e permitam ao animal agir com eficiência. Assim, em circunstâncias em que ainda não tem sido claramente identificada a fonte de perigo ou em que o estímulo aversivo ainda é distal, o sistema encefálico da aversão elabora comportamentos de modo a preparar ao organismo caso o nível de perigo aumente, exercendo um aumento nos estados de alerta. A esse respeito, condutas como avaliação de risco e atenção defensiva são executadas quando existe uma ameaça potencial no ambiente e ainda é necessário definir com mais precisão o risco que corre o organismo. Por sua vez, os receptores noradrenérgicos α_2 geralmente localizam-se no neurônio pré-sináptico, perto do terminal sináptico, e cumprem um papel regulador da neurotransmissão noradrenérgica, pois, quando ativados, geram um efeito fisiológico inibitório, o que diminui a excitabilidade do neurônio e faz com que ele libere menos noradrenalina na fenda sináptica (STARKE, 2001; BYLUND, 1992; BOEHM e HUCK, 1996). Desta maneira, quando antagonizados os receptores α_2 no núcleo dorsal da rafe, os neurônios noradrenérgicos não conseguiriam mais regular a liberação de noradrenalina através do auto-receptor inibitório, o que poderia aumentar os níveis do neurotransmissor na fenda sináptica junto com as probabilidades de ativar os receptores pós-sinápticos excitatórios (como o α_1 e o β), fazendo com que aumentasse a atividade fisiológica das vias que conectam o núcleo dorsal da rafe com o hipotálamo medial, causando os citados acréscimos na frequência e a duração nos comportamentos já mencionados. Dessa forma, dos presentes achados pode-se concluir que há efeitos antagônicos causados pelo bloqueio de receptores α_1 e α_2 no NDR, sobre as respostas de defesa organizadas pelo hipotálamo medial, já que enquanto o primeiro tratamento possui a propriedade de diminuir a frequência e a duração das respostas de defesa hipotalâmicas, o segundo foi capaz de induzir alguns aumentos significativos nas respostas defensivas.

Contudo, o possível aumento na atividade das aferências noradrenérgicas sobre o núcleo dorsal da rafe, induzido pelo bloqueio de receptores α_2 , parece não ter um correlato comportamental significativo em respostas aversivas como a fuga e os saltos, fundamentais na proposta de modelo de ataques de pânico.

O sistema das catecolaminas, particularmente o sistema noradrenérgico, modula a liberação de noradrenalina através de dois mecanismos diferentes. Um deles está representado pela presença de autorreceptores inibitórios que, quando ativados pelo neurotransmissor (noradrenalina), diminuem a atividade fisiológica do neurônio pós-sináptico e reduzem a quantidade de neurotransmissor liberado. O receptor α_2 é um deles (PUPO e MINNEMAN, 2001; ALTMAN e cols., 1999, KABLE e cols., 2000). Não obstante, além do receptor α_2 , existem autorreceptores de tipo muscarínico, opioide e dopaminérgico que se encontram nos neurônios noradrenérgicos e regulam a quantidade de noradrenalina liberada na fenda sináptica (KUBISTA e cols., 2009; KREIBICH e cols., 2008). O segundo mecanismo consiste na recaptação do neurotransmissor através de uma proteína da membrana celular que capta o neurotransmissor para o interior do neurônio, sendo que uma porção dele é armazenada e a outra degradada (AMARA e KUCHAR, 1993; ZIGMOND e cols., 1989; AXELROD, 1971). No caso da noradrenalina, quando ela é recaptada e armazenada, ela se liga à enzima tirosina- hidroxilase e consegue inibir a síntese de novo neurotransmissor (ALOUSI e WEINER, 1966). Baseado nisso, é muito provável que só o antagonismo dos autorreceptores α_2 não seja suficiente para produzir aumentos significativos em comportamentos defensivos, como a fuga e os saltos, eliciados pelo bloqueio dos receptores GABA_A no HM. Talvez, para observar um efeito significativo nesse sentido seria necessário bloquear os demais sistemas de modulação da liberação noradrenérgica já mencionados.

Em relação aos efeitos do bloqueio dos receptores β adrenérgicos no NDR sobre os cruzamentos na arena, eles mostram um padrão caracterizado por uma diminuição significativa no número de cruzamentos na periferia da arena e um aumento significativo nos cruzamentos no centro da mesma. Em relação aos testes comportamentais para estudar atividade exploratória em roedores, alguns autores têm proposto que a parte do assoalho da arena que se encontra próxima a uma parede são preferidas pelos roedores, devido a informações tigmotáticas, o que lhes poderia proporcionar um efeito ansiolítico. Já nas regiões centrais, existe uma ausência de estimulação tigmotática, o que poderia sinalizar um perigo potencial para o roedor devido à sua clara exposição aos predadores, o que torna o animal um alvo fácil e faz com que a dita região adquiriria um caráter ansiogênico (TRZCTNSKA et al., 1999, LIM et al., 2008; DAVIDSON et al., 2007). Assim, o aumento significativo no número de cruzamentos na porção central da arena após o antagonismo dos receptores β adrenérgicos no NDR e a estimulação química do HM, sugere um efeito

antiaversivo do pré-tratamento do NDR com o antagonista de receptores beta-noradrenérgicos, o que possibilita a exploração de áreas mais ansiogênicas do teste comportamental de *open-field*, quando comparado com o grupo controle.

Ainda em relação ao grupo de animais tratados com bicuculina no hipotálamo medial 10 minutos após a administração de propanolol diretamente no NDR, a análise estatística revelou uma diminuição significativa de levantamentos, de fuga e de saltos, tendo havido aumentos significativos no movimento defensivo retrógrado e no comportamento rotatório. Através do processo evolutivo, o sistema encefálico da aversão foi desenvolvendo estratégias mais eficazes e adaptativas para permitir aos organismos agir com eficiência, dependendo das circunstâncias das diversas situações aversivas. Assim, em função do tipo de estímulo e do risco que ele representa para o organismo, diferentes padrões comportamentais poderiam ser eliciados. As manifestações comportamentais que acompanham os estados de ansiedade caracterizam-se por apresentar respostas defensivas menos explosivas. Pelo contrário, em casos de extremo perigo, o sistema encefálico da aversão participa na elaboração de comportamentos motores explosivos que favorecem a sobrevivência do animal (BLANCHARD e cols., 2003; BLANCHARD e BLANCHARD, 1999). No presente trabalho, ambos os tipos de respostas foram registradas. Comportamentos como a fuga e os saltos são geralmente eliciados em condições de alto risco, que envolvem confrontos proximais com predadores. Por sua vez, respostas como atenção defensiva, avaliação de risco, movimentos defensivos retrógrados e comportamento rotatório são executadas pelo organismo quando a fonte de perigo ainda não tem sido totalmente identificada ou quando a distância entre ela e o animal é suficientemente grande a ponto de ainda não representar um perigo real. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que os receptores β noradrenérgicos do núcleo dorsal da rafe possuem efeitos diferenciais sobre as respostas de ansiedade em comparação com as respostas de pânico. Assim, enquanto o antagonismo apresenta diminuição de comportamentos de pânico, também induz aumentos nas respostas de ansiedade.

O papel modulador das projeções serotoninérgicas que partem do núcleo dorsal da rafe sobre os comportamentos defensivos organizados por diferentes estruturas do sistema encefálico da aversão tem sido amplamente descrito na literatura (LEE e cols., 2007; ABRAMS e cols., 2004; ISHIDA e cols., 2002). Assim, tem sido sugerido que um aumento na atividade das vias serotoninérgica que comunicam o núcleo dorsal da rafe com as redes

neurais hipocampais tem efeito ansiogênico (MERALI e cols., 2006). Por sua vez, outro estudo utilizando técnicas de microdiálise mostrou que, após a administração do fator liberador de corticotropina no núcleo dorsal da rafe, ocorrem aumentos nos níveis de serotonina no núcleo central do complexo amigdalóide que correlaciona positivamente com um aumento no comportamento de imobilidade defensiva (FORSTER e cols., 2006). Igualmente, a administração de aminoácidos excitatórios no núcleo dorsal da rafe induz comportamentos defensivos associados a situações que envolvem a presença de um estressor inescapável (GRAHN e cols., 2000).

Com respeito ao controle serotoninérgico da atividade das redes neurais hipotalâmicas, tem sido proposto que existem sistemas serotoninérgicos topograficamente organizados e funcionalmente diversos, que exercem efeitos opostos sobre as respostas fisiológicas associadas ao medo, eliciadas pelo hipotálamo. Desse modo, neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe projetam-se diretamente para o sistema hipotalâmico e sensibilizam a atividade do eixo Hipotalâmico-Pituitário-Adrenal, incrementando as reações fisiológicas que acompanham as respostas de medo e ansiedade. Por sua vez, um outro grupo de neurônios serotoninérgicos, localizado no núcleo mediano da rafe, projeta-se para o *subiculum* ventral e potencia a atividade inibitória do circuito límbico sobre a função neuroendócrina associada ao estresse (LOWRY, 2002).

Conforme mencionado anteriormente, os dados apresentados no presente trabalho sugerem que os efeitos das conexões existentes entre o núcleo dorsal da rafe e o hipotálamo medial sobre os estados aversivos organizados nessa estrutura diencefálica encontram-se regulados por aferências noradrenérgicas que agem sobre receptores α_1 , α_2 e β . Os resultados também indicam que cada um desses receptores contribui de maneira diferente na regulação dos comportamentos defensivos. Por exemplo, o receptor α_1 no núcleo dorsal da rafe parece cumprir uma função pró-aversiva para estados tanto de ansiedade quanto de pânico, o que poderia ser explicado pelo seu efeito excitatório sobre as projeções serotoninérgicas que partem para o hipotálamo. Já o receptor α_2 , através da regulação da liberação de noradrenalina, poderia modular a atividade da via NDR-HM e, assim, diminuir alguns comportamentos associados aos estados aversivos organizados ao nível hipotalâmico. Finalmente, o receptor β presente no núcleo dorsal da rafe, quando ativado, favoreceria estados de medo intenso, possivelmente também pelo seu efeito excitatório sobre as vias

serotoninérgicas que se projetam para os núcleos hipotalâmicos responsáveis pela elaboração de estados aversivos.

5.3 Estudo Neurofarmacológico no Hipotálamo Medial

De maneira similar aos demais estudos realizados no presente projeto, a interrupção da neurotransmissão GABAérgica nos núcleos ventromedial e dorsomedial do hipotálamo após a administração de salina na mesma estrutura diencefálica produziu um conjunto de comportamentos motores caracterizados por levantamentos, atenção defensiva, avaliação de risco, movimentos defensivos retrógrados, rotações, corridas e saltos, o que sugere que a administração da salina nas diferentes estruturas não afetou a fenomenologia das respostas eliciadas pela estimulação química do hipotálamo medial. Contudo, podem-se observar algumas leves diferenças quanto à frequência e duração dos mencionados comportamentos entre os grupos tratados com salina, que podem obedecer a variações interespecíficas entre os sujeitos utilizados nos diferentes estudos. Por mais uma vez, esses dados indicam a presença de neurônios GABAérgicos diencefálicos que modulam tonicamente a atividade dessas redes neurais e participam na elaboração de estados aversivos (FREITAS e cols, 2009; SANTOS e cols., 2008; JOHNSON e SHEKHAR, 2006; DIELENBERG e cols., 2001).

Vale a pena esclarecer que os presentes dados permitem incluir os núcleos hipotalâmicos abordados no conjunto de estruturas que integram do sistema encefálico da aversão, pois o padrão de respostas observadas após a sua estimulação guarda relação com os comportamentos eliciados após a mesma manipulação farmacológica em outras estruturas mesencefálicas que formam o citado sistema, tais como a substância cinzenta periaquedutal e os corpos quadrigêmeos (GRAEFF e cols., 1993, RIBEIRO e cols., 2005, CASTELLANBALDAN e cols., 2006). Entretanto, a magnitude das condutas registradas no atual projeto apresenta um caráter menos explosivo em comparação com aquele mencionado na literatura

para as estruturas mesencefálicas, o que alude ao papel do hipotálamo medial na organização de estados aversivos de menor intensidade ou, pelo menos, mais direcionados.

O bloqueio dos receptores GABA_A no HM dez minutos após a administração dos antagonistas para receptores α_1 e β noradrenérgicos na mesma estrutura foi seguido por uma diminuição significativa nos levantamentos. Sabe-se que ao se enfrentar a ambientes novos, os organismos geralmente elaboram uma série de comportamentos exploratórios que lhes permitem obter informação respeito às características do lugar e identificar possíveis estímulos que possam indicar a presença de algum risco. Assim, a elaboração de respostas exploratórias guarda alguma relação com os estados aversivos já que permite estabelecer o nível de perigo. Por isso, é de se esperar que regiões como o HM possam mediar a organização dessas condutas (GALVIS-ALONSO e cols., 2010; GOELHER e cols., 2008; VEENEMA e cols., 2007). De fato, tem sido proposto que o hipotálamo desempenha um papel muito importante nos estados de ativação ou alerta, permitindo aos organismos manter níveis adequados de atenção ao ambiente para reagir em caso de mudanças salientes ou de aparecer algum estímulo que sinalize perigo para o animal (BONNAVION e LECEA, 2010; BOUTREL e cols., 2010; MURILLO-RODRÍGUEZ e cols., 2008). Quanto ao papel das projeções noradrenérgicas no HM na elaboração dessas atividades, existem evidências na literatura sugerindo o envolvimento das vias noradrenérgicas que partem do LC na exploração de ambientes novos (VANKOV e cols., 1995; SARA e cols., 1994).

A esse respeito, também vale a pena considerar que a mencionada diminuição significativa esteve acompanhada por uma ausência de saltos no grupo de animais pré-tratados com o antagonista para receptores α_1 no HM. Devido ao caráter aversivo da desinibição GABAérgica empregada no presente trabalho, é possível que o comportamento exploratório eliciado estivesse encaminhado à obtenção de informação útil para o organismo quanto à existência de possíveis vias de escape do ambiente de estímulo. Como já mencionado, baseando-se nas características do teste comportamental utilizado, a única saída disponível encontra-se na porção superior da arena. Precisamente, após o antagonismo dos receptores GABA_A no HM, o comportamento aversivo evidenciado pelo grupo salina caracterizou-se por apresentar saltos em sentido vertical nas paredes da arena enquanto o animal encontrava-se apoiando suas patas traseiras sobre a superfície e as anteriores sobre as paredes laterais. Desta maneira, todo salto foi antecedido por um levantamento, o que denota um padrão de atividade motora organizado e encaminhado à única via de escape. Tais

achados sugerem que a redução significativa nos levantamentos após o antagonismo dos receptores GABA_A no HM no grupo de animais pré-tratados com antagonista de receptores α_1 na mesma estrutura, poderia guardar alguma relação com o componente aversivo das respostas observadas.

Já entrando na expressão dos comportamentos defensivos, os presentes dados mostram uma diminuição significativa na frequência e duração da atenção defensiva após a estimulação química do HM nos animais pré-tratados com antagonistas para receptores α_1 e β noradrenérgicos no HM. É de se esperar que diante contextos nos quais ainda não tem sido identificada a fonte de perigo ou naquelas em que o estímulo aversivo ainda é distal, ocorrem uma série de mudanças fisiológicas no organismo que o preparam para agir caso o nível de risco aumente. Assim, nesses casos, o sistema encefálico da aversão organiza um padrão de respostas com caráter antecipatório que ajudam ao animal para focalizar seus recursos atencionais no ambiente e diminuem seus limiares para reagir com eficácia caso se apresente uma alteração súbita na situação (POURTOIS e VUILLEUMIER, 2006; GODDARD e cols., 2010; TSIGOS e CHROUSOS, 2002). É aqui onde comportamentos, como a atenção defensiva, desempenham um papel fundamental. A esse respeito, os presentes dados sugerem que existem aferências noradrenérgicas no HM que agem sobre receptores α_1 e β que poderiam modular a elaboração desses estados defensivos. Em harmonia com esses achados, tem sido proposto que o hipotálamo, através de suas conexões com a substância cinzenta periaquedutal, a qual conecta-se com a formação reticular ativadora ascendente (COIMBRA e col., 2006), se encarrega de incrementar os estados de vigília no prosencéfalo, resposta muito necessária em situações de conotação aversiva (LIN, 2000).

Além dos mencionados resultados, também foi observado um decremento significativo na frequência do comportamento rotatório após o bloqueio dos receptores GABA_A no HM nos grupos de animais pré-tratados com antagonistas de receptores α_1 e β na mesma região diencefálica. Conforme alguns achados na literatura, existe uma relação entre os estados aversivos e o comportamento rotatório, entendido como uma alteração do equilíbrio corporal, que vincula o hipotálamo às projeções noradrenérgicas que partem do LC. Assim, existem dados sugerindo que uma região do núcleo parabraquial contém células que respondem à rotação corporal e à posição relativa do corpo, e que mantêm conexões com o hipotálamo e outras estruturas do sistema límbico. De acordo com o autor, esse circuito poderia desempenhar um papel muito importante no processamento da convergência da

informação somática vestibular e visceral que medeiam estados de ansiedade e de medo inato. Por sua vez, existiria uma regulação noradrenérgica do citado circuito mediante projeções que partem da porção caudal do LC e que provavelmente mediaríamos efeitos de alerta e vigilância sobre a sensibilidade dos circuitos vestibulo-motores (BALABAN, 2002).

O pré-tratamento do HM com antagonistas para receptores α_1 e β noradrenérgicos seguido pela desinibição GABAérgica da mesma região diencefálica produziu uma diminuição significativa na frequência e duração da fuga orientada. Esses resultados permitem concluir que as aferências noradrenérgicas no hipotálamo medial que agem sobre receptores α_1 e β noradrenérgicos modulam também as respostas motoras mais enérgicas do padrão comportamental eliciado pela disfunção GABAérgica nessa estrutura. Tem sido proposto que o sistema noradrenérgico que parte do LC constitui um modulador geral da atividade do sistema nervoso central devido às suas amplas conexões com diferentes estruturas do encéfalo (BREMNER e cols., 1996). Também, tem sido sugerido seu papel na regulação dos estados de pânico eliciados pela atividade de diferentes regiões do sistema encefálico da aversão (USUNOFF e cols., 2006; BAAS e cols., 2006, TANAKA e cols., 2000). Conforme o exposto até agora, os dados obtidos propõem que os receptores α_1 e β presentes no HM ajudam o hipotálamo na elaboração de comportamentos defensivos em circunstâncias de perigo potencial ou distal. Além disso, os presentes resultados sugerem que tais receptores participam também na organização de padrões motores vigorosos que poderiam vir se apresentar em situações nas quais existe uma clara ameaça à integridade corporal do organismo, sendo a conduta de escape uma alternativa prioritária.

Sabe-se que o efeito fisiológico decorrente da ativação desses receptores noradrenérgicos é um efeito excitatório. Assim, a sua ativação poderia induzir um aumento na atividade fisiológica dos neurônios presentes nas divisões ventromedial e dorsomedial do hipotálamo, após o que ocorreria uma facilitação do substrato neural responsável pela organização de estados aversivos. Os resultados obtidos no presente trabalho se harmonizam com dita hipótese já que o bloqueio desses receptores diminuiria a excitabilidade dos neurônios hipotalâmicos e, assim, reduziria os efeitos produzidos pela sua excitação após a administração local de bicuculina. É isso precisamente o que foi observado no atual estudo.

Com respeito ao bloqueio dos receptores GABA_A no hipotálamo medial 10 minutos após o antagonismo dos receptores α_2 no mesmo substrato neural, os dados revelaram

aumentos significativos na frequência e duração do comportamentos de avaliação de risco. Talvez uma das maiores vantagens da distribuição do substrato neural das respostas defensivas em diferentes circuitos neuronais constitui a possibilidade de coordenar uma ampla gama de padrões comportamentais específicos em função das condições de perigo que circundam ao organismo. De acordo com isso, situações nas quais a distância entre a fonte de perigo e o organismo ainda é grande ou em que a origem da ameaça não ter sido claramente identificada, o sistema encefálico da aversão organizaria um conjunto de reações encaminhadas à preparação das condições fisiológicas necessárias para agir com eficácia, caso o grau de perigo aumentasse. Naturalmente, a mencionada especificidade estaria caracterizada não só pela existência de circuitos exclusivos, mas também por modulações exercidas por receptores particulares. Assim, os presentes achados sugerem que os receptores noradrenérgicos de tipo α_2 poderiam participar na regulação da atividade dos núcleos ventromedial e dorsomedial do hipotálamo apenas em situações aversivas nas quais o risco de vida ainda não é iminente.

Contudo, para a melhor compreensão do papel desempenhado por esses receptores noradrenérgicos nas respostas defensivas organizadas pelo HM, ainda é necessário ter em consideração algumas das suas características. Assim, os receptores α_2 com localização pré-sináptica modula a liberação de noradrenalina através da diminuição de potencial elétrico do neurônio. Desta maneira, esses receptores, quando ativados, produzem um efeito fisiológico inibitório com o que conseguem diminuir a quantidade de noradrenalina liberada na fenda sináptica (STARKE, 2001; BYLUND, 1992; BOEHM e HUCK, 1996). Ao serem antagonizados esses receptores no HM, as projeções noradrenérgicas não poderiam mais modular a quantidade de noradrenalina liberada, fazendo com que essa aumentasse e ativasse um maior número de receptores pós-sinápticos excitatórios (α_1 e β).

Entretanto, pode-se observar que a disfunção dos mecanismos de retroalimentação negativa do sistema noradrenérgico no HM e, portanto, o possível aumento na quantidade de noradrenalina liberada conseqüentemente, não conseguiu aumentar outras reações defensivas, produtos da estimulação química do HM. Isso se poderia dever ao fato de que esse não é o único mecanismo regulatório do sistema noradrenérgico. Pelo contrário, existem diversas formas mediante as quais esse sistema neuroquímico se autorregula, como especificado anteriormente. É possível que a modulação dos neurônios responsáveis pela execução de

respostas mais enérgicas como a fuga ou os saltos, estivessem também reguladas por algum outro neurotransmissor ou neuromodulador nas estruturas hipotalâmicas.

Em conclusão, os dados obtidos no presente estudo sugerem que existem aferências noradrenérgicas nas subdivisões ventromedial e dorsomedial do hipotálamo que muito provavelmente provém do LC e cujos efeitos sobre os comportamentos defensivos eliciados pelo bloqueio de receptores GABA_A no HM dependem da ativação de pelo menos dois subtipos específicos de receptores noradrenérgicos. Assim, a ativação dos receptores α_1 e β noradrenérgicos poderia aumentar a atividade fisiológica desses núcleos e incrementar a sua excitabilidade, ajudando na manifestação do conjunto de respostas defensivas diante de uma situação de perigo, induzindo, por exemplo aumentos nos levantamentos e nas respostas de atenção defensiva, comportamento rotatório e fuga. Por sua vez, a ativação dos autorreceptores inibitórios α_2 diretamente no HM, devido a seu papel regulador da liberação de noradrenalina, poderia diminuir a manifestação de respostas motoras de ansiedade, tais como a avaliação de risco, exercendo um controle sobre os estados aversivos.

Baseado nos resultados apresentados no presente trabalho, caberia a possibilidade de que a expressão patológica de estados aversivos nos humanos fosse em parte um resultado de uma disfunção na regulação tônica das redes neurais hipotalâmicas mediais, o que daria lugar a sua estimulação e, por tanto, à manifestação de reações aversivas em situações em que não existe uma conotação que sinalize perigo. Assim, o modelo fisiológico de medo empregado no presente estudo poderia servir como alvo para o estudo de patologias como distúrbios de ansiedade, síndrome de pânico e transtorno de estresse pós-traumático, nos quais emergem estados emocionais de medo sem uma clara funcionalidade que afetam grandemente a qualidade de vida dos pacientes e impedem a sua adaptação aos contextos cotidianos.

Enfim, o presente trabalho sugere que o sistema noradrenérgico e, particularmente as projeções que partem do LC, poderiam agir como um modulador fásico da atividade tanto no HM quanto em outras estruturas, e em sistemas neuroquímicos recrutados pelo HM na elaboração do padrão comportamental de medo. Assim, é provável que em situações de risco de vida, em que existem estímulos salientes com uma elevada significância biológica, ocorra um recrutamento das redes neurais do LC, as quais, através de sua ação sobre receptores α_1 e β noradrenérgicos, incrementam a excitabilidade do HM e facilitam a elaboração das respostas de pânico.

6. CONCLUSÃO

- Os presentes dados sugerem que as redes neurais diencefálicas das subdivisões ventromedial e dorsomedial do hipotálamo estão envolvidas na organização de comportamentos defensivos
- O substrato neural hipotalâmico responsável pela elaboração do padrão comportamental sugestivo de medo apresenta-se sob uma modulação tônica GABAérgica que depende da ativação de receptores GABA_A
- O modelo fisiológico de medo empregado no presente estudo pode servir como alvo para o estudo de patologias como distúrbios de ansiedade, síndrome de pânico e transtorno de estresse pós-traumático, nos quais emergem estados emocionais de medo intenso sem uma clara funcionalidade que afetam a qualidade de vida dos pacientes e impedem a sua adaptação aos contextos cotidianos.
- O locus coeruleus exerce uma forte influência nas reações de defesa organizadas pelo hipotálamo medial, já que a sua lesão diminui o conjunto de respostas elaboradas após a desinibição GABAérgica diencefálica.
- As projeções noradrenérgicas que inervam os núcleos ventromedial e dorsomedial do hipotálamo, através da ativação de receptores α_1 e β , parecem aumentar a atividade fisiológica desses núcleos e incrementar a sua excitabilidade, ajudando na manifestação do conjunto de respostas defensivas diante de uma situação de perigo.
- Os autorreceptores inibitórios noradrenérgicos α_2 presentes no HM, devido a seu papel regulador da liberação de noradrenalina, diminuem a manifestação de respostas motoras de pânico, exercendo um controle sobre os estados aversivos organizados no hipotálamo medial.

- As vias noradrenérgicas podem controlar a atividade das redes neurais hipotalâmicas também através de mecanismos indiretos, modulando a ação de outros sistemas neuroquímicos que, por sua vez, podem estabelecer conexões com os núcleos hipotalâmicos visados no presente estudo.
- Aferências noradrenérgicas ao NDR, cuja ação sobre os receptores α_1 , α_2 e β afetam a atividade fisiológica das projeções possivelmente serotoninérgicas que partem desse núcleo e desempenham algum papel no controle dos comportamentos defensivos induzidos pela desinibição GABAérgica do HM.
- O sistema noradrenérgico, e particularmente as projeções que partem do LC, podem agir como um modulador fásico da atividade tanto no HM como no NDR, modulando a atividade de neurônios do HM durante a elaboração do padrão comportamental de medo inato.

REFERÊNCIAS

ABRAMS, J.K.; JOHNSON, P.L.; HOLLIS, J.H.; LOWRY, C.A. *Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus*. **Ann.N.Y.Acad.Sci.** 1018: 46-57, 2004.

ALTMAN,J.D.; TRENDELENBURG,A.U.; MACMILLAN,L.; BERNSTEIN,D.; LIMBIRD,L.; STARKE,K.; KOBILKA,B.K.; HEIN,L.. *Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha 2A- adrenergic receptor knockout mice*. **Mol. Pharmacol.** 56: 164-161, 1999. `

ALOUSI, A.; WEINER, N. *The regulation of norepinephrine synthesis in sympathetic nerves: effect of nerve stimulation, cocaine, and catecholamine-releasing agents*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 56:1491-1496, 1966.

AMARA, S.G.; KUCHAR, M.J. *Neurotransmitter transporters: recent progress*. **Annu Rev. Neurosci.** 16: 73-93, 1993.

ANDRE,V.M.; CEPEDA,C.; VINTERS,H.V.; HUYNH,M.; MATHERN,G.W.; LEVINE,M.S. *Interneurons, GABAA currents, and subunit composition of the GABAA receptor in type I and type II cortical dysplasia*. **Epilepsia.** 51 (3): 166-170, 2010.

AXELROD, J. *Noradrenaline: fate and control of its biosynthesis*. **Science.** 173: 598-606, 1971.

BAAS,J.M.; MILSTEIN,J.; DONLEVY,M.; GRILLON,C. *Brainstem correlates of defensive states in humans*. **Biol.Psychiatry.** 59 (7): 598-593, 2006.

BALABAN,C.D. *Neural substrates linking balance control and anxiety*. **Physiol Behav.** 77 (4-5): 469-475, 2002.

BANDLER,R.; KEAY,K.A.; FLOYD,N.; PRICE, J. *Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping*. **Brain Res.Bull.** 53 (1): 95-104, 2000.

BAILEY,J.E.; ARGYROPOULOS,S.V.; LIGHTMAN,S.L.; NUTT,D.J. *Does the brain noradrenaline network mediate the effects of the CO2 challenge?* **J.Psychopharmacol.** 17 (3): 252-259, 2003.

BEESDO,K.; KNAPPE,S.; PINE,D.S. *Anxiety and anxiety disorders in children and adolescents: developmental issues and implications for DSM-V*. **Psychiatr.Clin.North Am.** 32 (3): 483-524, 2009.

BEESDO-BAUM,K.; HOFER,M.; GLOSTER,A.T.; KLOTSCHKE,J.; LIEB,R.; BEAUDUCEL,A.; BUHNER,M.; KESSLER,R.C.; WITTCHEN,H.U. *The structure of common mental disorders: a replication study in a community sample of adolescents and young adults*. **Int.J.Methods Psychiatr.Res.** 18 (4): 204-220, 2009.

BERRIDGE,C.W.; WATERHOUSE,B.D. *The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes*. **Brain Res.Brain Res.Rev.** 42(1): 33-84, 2003.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. *The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic*. **European Journal of Pharmacology.** 463: 97– 116, 2003.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. *Cocaine potentiates defensive behaviors related to fear and anxiety*. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 23: 981–991, 1999.

BLECHERT,J.; MICHAEL,T.; GROSSMAN,P.; LAJTMAN,M.; WILHELM,F.H. *Autonomic and respiratory characteristics of posttraumatic stress disorder and panic disorder*. **Psychosom.Med.** 69 (9): 945-943, 2007.

BLUNDELL,J.; ADAMEC,R. *Elevated pCREB in the PAG after exposure to the elevated plus maze in rats previously exposed to a cat*. **Behav.Brain Res.** 175: 285-295, 2006.

BOATMAN,J.A.; KIM,J.J. *A thalamo-cortico-amygdala pathway mediates auditory fear conditioning in the intact brain*. **Eur.J.Neurosci.** 24 (3): 894-900, 2006.

BOEHM, S., HUCK, S. *Inhibition of N-type calcium channels: the only mechanism by which presynaptic alpha 2- autoreceptors control sympathetic transmitter release*. **Eur. J. Neurosc.** 8:1924-1931, 1996.

BONNAVION,P.; DE,LECEA L. *Hypocretins in the control of sleep and wakefulness*. **Curr.Neurol.Neurosci.Rep.**10 (3): 174-179, 2010.

BORELLI,K.G.; BRANDAO,M.L. *Effects of ovine CRF injections into the dorsomedial, dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray: a functional role for the dorsomedial column.* **Horm.Behav.** 53: 40-50, 2008.

BORELLI,K.G.; FERREIRA-NETTO,C.; BRANDAO,M.L. *Distribution of Fos immunoreactivity in the rat brain after freezing or escape elicited by inhibition of glutamic acid decarboxylase or antagonism of GABA-A receptors in the inferior colliculus.* **Behav.Brain Res.** 170 (1): 84-93, 2006.

BOUDARENE,M.; LEGROS,J.J.; TIMSIT-BERTHIER,M. *Study of the stress response: role of anxiety, cortisol and DHEAs.* **Encephale.** 28 (2): 139-146, 2002.

BOUTREL,B.; CANNELLA,N.; DE,LECEA L. *The role of hypocretin in driving arousal and goal-oriented behaviors.* **Brain Res.** 1314: 103-11, 2010.

BRANDAO,M.L.; VIANNA,D.M.; MASSON,S.; SANTOS,J. *Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety.* **Rev.Bras.Psiquiatr.** 25 (S2): 36-41, 2003^a

BRANDAO,M.L.; TRONCOSO,A.C.; DE SOUZA SILVA,M.A.; HUSTON,J.P. *The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations.* **Eur.J.Pharmacol.** 463 (1-3): 225-233, 2003b.

BREMNER,J.D.; KRYSTAL,J.H.; SOUTHWICK,S.M.; CHARNEY,D.S. *Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies.* **Synapse.** 23 (1): 28-38, 1996.

BRODERICK,P.A.; PHELIX,C.F. *I. Serotonin (5-HT) within dopamine reward circuits signals open-field behavior. II. Basis for 5-HT-DA interaction in cocaine dysfunctional behavior.* **Neurosci.Biobehav.Rev.** 21 (3): 227-260, 1997.

BROWN,R.E.; SERGEEVA,O.A.; ERIKSSON,K.S.; HAAS,H.L. *Convergent excitation of dorsal raphe serotonin neurons by multiple arousal systems (orexin/hypocretin, histamine and noradrenaline).* **J.Neurosci.** 22 (20): 8850-8859, 2002.

BUENO,C.H.; ZANGROSSI,H.,JR.; VIANA,MDE B. *GABA/benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus regulate both anxiety and panic-related defensive responses in the elevated T-maze.* **Brain Res.Bull.** 74 (1): 134-141, 2007.

BYLUND, D.B. *Subtypes of alpha 1- and alpha 2- adrenergic receptors.* **FASEB J.** 6: 832-839, 1992.

CABANAC,M.; CABANAC,A.J.; PARENT,A. *The emergence of consciousness in phylogeny.* **Behav.Brain Res.** 198 (2):267-272, 2009.

CABRAL,A.; ISOARDI,N.; SALUM,C.; MACEDO,C.E.; NOBRE,M.J.; MOLINA,V.A.; BRANDAO,M.L. *Fear state induced by ethanol withdrawal may be due to the sensitization of the neural substrates of aversion in the dPAG.* **Exp.Neurol.** 200: 200-208, 2006.

CANTERAS,N.S. *The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications.* **Pharmacol.Biochem.Behav.** 71 (3): 481-491, 2002.

CANTERAS,N.S.; CHIAVEGATTO,S.; RIBEIRO,DO,V; SWANSON,L.W. *Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions.* **Brain Res.Bull.** 44 (3): 297-305, 1997

CARSTENS,E.; LEAH,J.; LECHNER,J.; ZIMMERMANN,M. *Demonstration of extensive brainstem projections to medial and lateral thalamus and hypothalamus in the rat.* **Neuroscience.** 35 (3): 609-626, 1990.

CARVALHO-NETTO,E.F.; MARKHAM,C.; BLANCHARD,D.C.; NUNES-DE-SOUZA,R.L.; BLANCHARD,R.J. *Physical environment modulates the behavioral responses induced by chemical stimulation of dorsal periaqueductal gray in mice.* **Pharmacol.Biochem.Behav.** 85:140-147, 2006.

CARVALHO-NETTO,E.F.; GOMES,K.S.; AMARAL,V.C.; NUNES-DE-SOUZA,R.L. *Role of glutamate NMDA receptors and nitric oxide located within the periaqueductal gray on defensive behaviors in mice confronted by predator.* **Psychopharmacology (Berl).** 204: 617-625, 2009.

CASTELLAN-BALDAN,L.; DA COSTA,KAWASAKI M.; RIBEIRO,S.J.; CALVO,F.; CORREA,V.M.; COIMBRA,N.C. *Topographic and functional neuroanatomical study of GABAergic disinhibitory striatum-nigral inputs and inhibitory nigrocollicular pathways: neural hodology recruiting the substantia nigra, pars reticulata, for the modulation of the neural activity in the inferior colliculus involved with panic-like emotions.* **J.Chem.Neuroanat.** 32(1): 1-27, 2006.

CAVDAR,S.; ONAT,F.; AKER,R.; SEHIRLI,U.; SAN,T.; YANANLI,H.R. *The afferent connections of the posterior hypothalamic nucleus in the rat using horseradish peroxidase.* **J.Anat.** 198 (4): 463-472, 2001.

CECCHI,M.; KHOSHBOUEI,H.; MORILAK,D.A. *Modulatory effects of norepinephrine, acting on alpha 1 receptors in the central nucleus of the amygdala, on behavioral and neuroendocrine responses to acute immobilization stress.* **Neuropharmacology.** 43 (7): 1139-1147, 2002.

CHARNEY, D.S.; HENINGER, G.R.; BREIER, A. *Noradrenergic function in panic anxiety: effects of yohimbine in healthy subjects and patients with agoraphobia and panic disorder.* **Arch Gen Psychiatry.** 41: 751-763, 1984.

CHARNEY, D.S.; WOODS, S.W.; GOODMAN, W.K.; HENINGER, G.R. *Neurobiological mechanisms of panic anxiety: biochemical and behavioral correlates of yohimbine-induced panic attacks.* **Am J Psychiatry.** 144: 1030-1036, 1987.

CHARNEY, D.S.; WOODS, S.W.; KRYSTAL, J.H.; NAGY, L.M.; HENINGER, G.R. *Noradrenergic neuronal dysregulation in panic disorder: the effects of intravenous yohimbine and clonidine in panic disorder patients.* **Acta Psychiatr Scand.** 86: 273-282, 1992.

CHARNEY, D.S.; BREMMER, J.D. *The neurobiology of anxiety disorders.* **Neurobiology of mental illness.** Ed Bunney, B.S. New York: Oxford University Press. pp494-517, 1999.

CHARNEY, D.S.; DREVETS, W.C. *The neurobiological basis of anxiety disorders.* **Neuropsychopharmacology: the Fifth Generation of Progress.** Ed. Nemeroff, C. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp901-930, 2002

CHECHKO,N.; WEHRLE,R.; ERHARDT,A.; HOLSBOER,F.; CZISCH,M.; SAMANN,P.G. *Unstable prefrontal response to emotional conflict and activation of lower limbic structures and brainstem in remitted panic disorder.* **PLoS.One.** 4 (5): e5537, 2009.

COELHO,C.M.; GONCALVES,D.C.; PURKIS,H.; POCINHO,M.; PACHANA,N.A.; BYRNE,G.J. *Specific phobias in older adults: characteristics and differential diagnosis.* **Int.Psychogeriatr.** 22 (5): 702-711, 2010.

CULMAN,J.; KISS,A.; KVETNANSKY,R. *Serotonin and tryptophan hydroxylase in isolated hypothalamic and brain stem nuclei of rats exposed to acute and repeated immobilization stress.* **Exp.Clin.Endocrinol.** 83 (1): 28-36, 1984.

DAVIDSON, L.P.; CHEDESTER, A.L.; COLE, M.N.; *Effects of cage density on behavior in young adult mice.* **Comp. Med.** 57, 355–359, 2007.

DE,BERARDIS D.; SERRONI,N.; CARANO,A.; SCALI,M.; VALCHERA,A.; CAMPANELLA,D.; D'ALBENZIO,A.; DI,GIUSEPPE B.; MOSCHETTA,F.S.; SALERNO,R.M.; FERRO,F.M. *The role of duloxetine in the treatment of anxiety disorders.* **Neuropsychiatr.Dis.Treat.** 4 (5): 929-935, 2008.

DE FANTI,B.A.; GAVEL,D.A.; HAMILTON,J.S.; HORWITZ,B.A. *Extracellular hypothalamic serotonin levels after dorsal raphe nuclei stimulation of lean (Fa/Fa) and obese (fa/fa) Zucker rats.* **Brain Res.** 869 (1): 6-14, 2000.

DEL-BEN,C.M.; GRAEFF,F.G. *Panic disorder: is the PAG involved?.* **Neural Plast.** 108-135, 2009.

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): 1085-1097, 2001.

DO MONTE,F.H.; CANTERAS,N.S.; FERNANDES,D.; ASSREUY,J.; CAROBREZ,A.P. *New perspectives on beta-adrenergic mediation of innate and learned fear responses to predator odor.* **J.Neurosci.** 28 (49):13296-13302, 2008.

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

FERREIRA-NETTO,C.; BORELLI,K.G.; BRANDAO,M.L. *Distinct Fos expression in the brain following freezing behavior elicited by stimulation with NMDA of the ventral or dorsal inferior colliculus.* **Exp.Neurol.** 204 (2): 693-704, 2007.

FIGUEIREDO,H.F.; BODIE,B.L.; TAUCHI,M.; DOLGAS,C.M.; HERMAN,J.P. *Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis.* **Endocrinology.** 144 (12): 5249-5258, 2003.

FREIRE,R.C.; PERNA,G.; NARDI,A.E. *Panic disorder respiratory subtype: psychopathology, laboratory challenge tests, and response to treatment.* **Harv.Rev.Psychiatry.** 18 (4): 220-229, 2010.

FORSTER,G.L.; FENG,N.; WATT,M.J.; KORZAN,W.J.; MOUW,N.J.; SUMMERS,C.H.; RENNER,K.J. *Corticotropin-releasing factor in the dorsal raphe elicits temporally distinct serotonergic responses in the limbic system in relation to fear behavior.* **Neuroscience.** 141 (2): 1047-1055, 2006.

FREITAS, R.L.; URIBE-MARINO,A.; CASTIBLANCO-URBINA,M.A.; ELIAS-FILHO,D.H.; COIMBRA,N.C. *GABA(A) 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.

FUXE,K.; DAHLSTROM,A.B.; JONSSON,G.; MARCELLINO,D.; GUESCINI,M.; DAM,M.; MANGER,P.; AGNATI,L. *The discovery of central monoamine neurons gave volume transmission to the wired brain.* **Prog.Neurobiol.** 90 (2): 82-100, 2010.

GALVIS-ALONSO,O.Y.; GARCIA,A.M.; OREJARENA,M.J.; LAMPREA,M.R.; BOTELHO,S.; CONDE,C.A.; MORATO,S.; GARCIA-CAIRASCO,N. *A combined study of behavior and Fos expression in limbic structures after re-testing Wistar rats in the elevated plus-maze.* **Brain Res.Bull.** 81 (6): 595-599, 2010.

GODDARD,A.W.; BALL,S.G.; MARTINEZ,J.; ROBINSON,M.J.; YANG,C.R.; RUSSELL,J.M.; SHEKHAR,A. *Current perspectives of the roles of the central norepinephrine system in anxiety and depression.* **Depress.Anxiety.** 27 (4): 339-350, 2010.

GOEHLER,L.E.; PARK,S.M.; OPITZ,N.; LYTE,M.; GAYKEMA,R.P. *Campylobacter jejuni infection increases anxiety-like behavior in the holeboard: possible anatomical substrates for viscerosensory modulation of exploratory behavior.* **Brain Behav.Immun.** 22(3): 354-366, 2008.

GOOSSENS,L.; SCHRUERS,K.; PEETERS,R.; GRIEZ,E.; SUNAERT,S. *Visual presentation of phobic stimuli: amygdala activation via an extrageniculostriate pathway?* **Psychiatry Res.** 155 (2): 113-120, 2007.

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.; SILVEIRA,M.C.; NOGUEIRA,R.L.; AUDI,E.A.; OLIVEIRA,R.M. *Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic.* **Behav.Brain Res.** 58 (1-2): 123-131, 1993.

GRAHN,R.E.; HAMMACK,S.E.; WILL,M.J.; O'CONNOR,K.A.; DEAK,T.; SPARKS,P.D.; WATKINS,L.R.; MAIER,S.F. *Blockade of alpha1 adrenoreceptors in the dorsal raphe nucleus prevents enhanced conditioned fear and impaired escape performance following uncontrollable stressor exposure in rats.* **Behav.Brain Res.** 134 (1-2):387-392, 2002.

GRAHN,R.E.; WATKINS,L.R.; MAIER,S.F. *Impaired escape performance and enhanced conditioned fear in rats following exposure to an uncontrollable stressor are mediated by glutamate and nitric oxide in the dorsal raphe nucleus.* **Behav.Brain Res.** 112 (1-2): 33-41, 2000.

HAJOS,M.; ENGBERG,G. *Impaired escape reaction from noxious and nonnoxious heat in rats treated with the selective noradrenergic neurotoxin DSP-4.* **Pharmacol.Biochem.Behav.** 39 (3): 809-811, 1991.

HALE,M.W.; HAY-SCHMIDT,A.; MIKKELSEN,J.D.; POULSEN,B.; BOUWKNECHT,J.A.; EVANS,A.K.; STAMPER,C.E.; SHEKHAR,A.; LOWRY,C.A. *Exposure to an open-field arena increases c-Fos expression in a subpopulation of neurons in the dorsal raphe nucleus, including neurons projecting to the basolateral amygdaloid complex.* **Neuroscience.** 157 (4): 733-748, 2008.

HASHIMOTO,T.; MATSUBARA,T.; LEWIS,D.A. *Schizophrenia and cortical GABA neurotransmission.* **Seishin Shinkeigaku Zasshi.** 112(5):439-452, 2010.

HENSLER, J. G. *Cap 13: Serotonin.* In: **Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects.** San Diego: Elsevier Academic Press, 2006.

ISHIDA,Y.; HASHIGUCHI,H.; TAKEDA,R.; ISHIZUKA,Y.; MITSUYAMA,Y.; KANNAN,H.; NISHIMORI,T.; NAKAHARA,D. *Conditioned-fear stress increases Fos expression in monoaminergic and GABAergic neurons of the locus coeruleus and dorsal raphe nuclei.* **Synapse.** 45 (1): 46-51, 2002.

ITO,I,K.; SUGIMOTO,N. *The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety and depression.* **J.Neuroendocrinol.** 22 (5): 355-361, 2010.

JOHNSON,P.L.; SHEKHAR,A. *Panic-prone state induced in rats with GABA dysfunction in the dorsomedial hypothalamus is mediated by NMDA receptors.* **J.Neurosci.** 26 (26): 7093-7104, 2006.

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.* **J.Psychopharmacol.** 2008

JUDGE, S.J.; GARTSIDE,S.E. *Firing of 5-HT neurones in the dorsal and median raphe nucleus in vitro shows differential alpha1-adrenoceptor and 5-HT1A receptor modulation.***Neurochem.Int.** 48 (2): 100-107, 2006.

KABLE, J. W., MURRIN, L.C., BYLUND, D.B. *In vivo gene modification elucidates subtype specific functions of alpha (2)-adrenergic receptors.* **J.Pharmacol. Exp. Ther.** 293: 1-7, 2000.

KALK,N.J.; NUTT,D.J.; LINGFORD-HUGHES,A.R. *The Role of Central Noradrenergic Dysregulation in Anxiety Disorders: Evidence From Clinical Studies.* **J.Psychopharmacol.** Article in Press, 2010.

KASPAROV,S.; TESCHEMACHER,A.G. *The use of viral gene transfer in studies of brainstem noradrenergic and serotonergic neurons* **Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.** 364(1529): 2565-2576, 2009.

KLENEROVA,V.; KREJCI,I.; SIDA,P.; HLINAK,Z.; HYNIE,S. *Modulatory effects of oxytocin and carbetocin on stress-induced changes in rat behavior in the open-field.* **J.Physiol Pharmacol.** 60 (2): 57-62, 2009.

KREIBICH,A.; REYES,B.A.; CURTIS,A.L.; ECKE,L.; CHAVKIN,C.; VAN BOCKSTAELE,E.J.; VALENTINO,R.J. *Presynaptic inhibition of diverse afferents to the locus ceruleus by kappa-opiate receptors: a novel mechanism for regulating the central norepinephrine system.* **J.Neurosci.** 28 (25): 6516-6525, 2008.

KRIEGEBAUM,C.; GUTKNECHT,L.; SCHMITT,A.; LESCH,K.P.; REIF,A. *Serotonin now: Part 1. Neurobiology and developmental genetics.* **Fortschr.Neurol.Psychiatr.** 78 (6): 319-331.

KUBISTA,H.; KOSENBURGER,K.; MAHLKNECHT,P.; DROBNY,H.; BOEHM,S. *Inhibition of transmitter release from rat sympathetic neurons via presynaptic M(1) muscarinic acetylcholine receptors.* **Br.J.Pharmacol.** 156 (8): 1342-1352, 2009.

KUHAR, M. J.; MINNEMAN, K.; MULY, E., C. *Cap 12: Catecholamines*. In: **Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2006.

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.

KUSNECOV, A.W.; LIANG, R.; SHURIN, G. *T-lymphocyte activation increases hypothalamic and amygdaloid expression of CRH mRNA and emotional reactivity to novelty*. **J.Neurosci.** 19 (11): 4533-4543, 1999.

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

LEE, H.S.; EUM, Y.J.; JO, S.M.; WATERHOUSE, B.D. *Projection patterns from the amygdaloid nuclear complex to subdivisions of the dorsal raphe nucleus in the rat*. **Brain Res.** 1143: 116-125, 2007.

LEE, H.S.; KIM, M.A.; WATERHOUSE, B.D. *Retrograde double-labeling study of common afferent projections to the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat*. **J.Comp Neurol.** 481 (2): 179-193, 2005.

LI, Q.; HOLMES, A.; MA, L.; VAN DE KAR, L.D.; GARCIA, F.; MURPHY, D.L. *Medial hypothalamic 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A} receptors regulate neuroendocrine responses to stress and exploratory locomotor activity: application of recombinant adenovirus containing 5-HT_{1A} sequences*. **J.Neurosci.** 24 (48): 10868-10877, 2004.

LIM, L.W.; BLOKLAND, A.; VISSER-VANDERWALLE, V.; VLAMINGS, R.; SESIA, T.; STEINBUSCH, H.; SCHRUERS, K.; GRIEZ, E.; TEMEL, Y. *High-frequency stimulation of the dorsolateral periaqueductal gray and ventromedial hypothalamus fails to inhibit panic-like behavior*. **Behav. Brain Res.** 193, 197–203, 2008.

LIN, Y.; QUARTERMAIN, D.; DUNN, A.J.; WEINSHENKER, D.; STONE, E.A. *Possible dopaminergic stimulation of locus coeruleus α ₁-adrenoceptors involved in behavioral activation*. **Synapse.** 62 (7): 516-523, 2008.

LIN,J.S. *Brain structures and mechanisms involved in the control of cortical activation and wakefulness, with emphasis on the posterior hypothalamus and histaminergic neurons.* **Sleep Med.Rev.**4 (5): 471-503, 2000.

LOWRY,C.A. *Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.* **J.Neuroendocrinol.** 14(11): 911-923, 2002.

LUPPI,P.H.; STON-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 (1): 119-160, 1995.

MACDONALD,R.L.; KANG,J.Q.; GALLAGHER,M.J. *Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies.* **J.Physiol.** 11: 1861-1869, 2010.

MARKS,S.L.; WEGELIN,J.A.; BOURGEOIS,J.A.; PERKINS,J. *Anxiety disorders in rural primary care: use of the MINI to estimate prevalence in clinic patients.* **J.Health Care Poor Underserved.** 21 (2): 680-690, 2010.

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

MELZIG,C.A.; WEIKE,A.I.; ZIMMERMANN,J.; HAMM,A.O. *Startle reflex modulation and autonomic responding during anxious apprehension in panic disorder patients.* **Psychophysiology.** 44 (6): 846-854, 2007.

MERALI,Z.; BEDARD,T.; ANDREWS,N.; DAVIS,B.; MCKNIGHT,A.T.; GONZALEZ,M.I.; PRITCHARD,M.; KENT,P.; ANISMAN,H. *Bombesin receptors as a novel anti-anxiety therapeutic target: BB1 receptor actions on anxiety through alterations of serotonin activity.* **J.Neurosci.** 26 (41): 10387-10396, 2006.

MIKHEENKO,Y.; MAN,M.S.; BRAESICKE,K.; JOHNS,M.E.; HILL, G.; GUSTIN-PAVON, C.; ROBERTS, A.C. *Autonomic, behavioral, and neural analyses of mild conditioned negative affect in marmosets.* **Behav.Neurosci.** 124 (2): 192-203, 2010.

MILLAN,M.J. *The neurobiology and control of anxious states.* **Prog.Neurobiol.** 70 (2): 82-244, 2003.

MOHLER, H., FRITSCHY, J.M., RUDOLPH, U. *A new benzodiazepine pharmacology.* **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 300: 2-8, 2002.

MOTTA,S.C.; GOTO,M.; GOUVEIA,F.V.; BALDO,M.V.; CANTERAS,N.S.; SWANSON,L.W. *Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders.* **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** 106 (12): 4870-4875, 2009.

MURILLO-RODRIGUEZ,E.; VAZQUEZ-LUIS,E.; MILLAN-ALDACO,D.; HARO,R.; DRUCKER-COLIN,R. *Promoting of wakefulness by administrations of modafinil into anterior hypothalamus and into the pedunculo pontine tegmental nucleus in rats.* **Neurosci.Lett.** 436 (2): 283-287, 2008.

NASCIMENTO,J.O.; ZANGROSSI,H.,JR.; VIANA,M.B. *Effects of reversible inactivation of the dorsomedial hypothalamus on panic- and anxiety-related responses in rats* **Braz.J.Med.Biol.Res.** 43 (9): 869-873, 2010

NAKASHIMA,A.; HAYASHI,N.; KANEKO,Y.S.; MORI,K.; SABBAN,E.L.; NAGATSU,T.; OTA,A. *Role of N-terminus of tyrosine hydroxylase in the biosynthesis of catecholamines.* **J.Neural Transm.** 116 (11): 1355-1362

OHMAN,A.; CARLSSON,K.; LUNDQVIST,D.; INGVAR,M. *On the unconscious subcortical origin of human fear.* **Physiol Behav.** 92 (1-2): 180-185, 2007.

OLSEN, R. W.; BETZ, H. *Cap16: GABA and Glycine.* In: **Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects.** San Diego: Elsevier Academic Press, 2006.

PETROVICH,G.D.; CANTERAS,N.S.; SWANSON,L.W. *Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems.* **Brain Res.Brain Res.Rev.**38 (1-2) 247-289, 2001.

POHL,R.; YERAGANI,V.K.; BALON,R.; RAINEY,J.M.; LYCAKI,H.; ORTIZ,A.; BERCHOU,R.; WEINBERG,P. *Isoproterenol induced panic attacks.* **Biol Psychiatry.** 1988; 24: 891-902.

POHL, R.; YERAGANI, V.K.; BALON, R. *Effects of isoproterenol in panic disorder patients after antidepressant treatment.* **Biol Psychiatry.** 28: 203-214, 1990.

POURTOIS,G.; VUILLEUMIER,P. *Dynamics of emotional effects on spatial attention in the human visual cortex.* **Prog.Brain Res.**156: 67-91, 2006.

PRIOLO,E.; LIBRI,V.; LOPILATO,R.; DAVID,E.; NAPPI,G.; NISTICO,G. *Panic-like attack induced by microinfusion into the locus coeruleus of antagonists and inverse agonists at GABAA-receptors in rodents.* **Funct.Neurol.** 6 (4): 393-403, 1991.

PUPPO, A., MINNEMAN, K. *Adrenergic pharmacology: Focus on the central nervous system.* **CNS Spectr.** 6: 656-662, 2001.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L. C.; LAMANTIA, A. S.; MCNAMARA, J. O. **Invitación a la neurociencia.** Cap. 27: *Emociones.* Montevideo: Editorial Medica Panamericana, 2004.

REEKIE,Y.L.; BRAESICKE,K.; MAN,M.S.; ROBERTS,A.C. *Uncoupling of behavioral and autonomic responses after lesions of the primate orbitofrontal cortex.* **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** 105(28): 9787-9792, 2008.

REIMER,A.E.; OLIVEIRA,A.R.; BRANDAO,M.L. *Selective involvement of GABAergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray and inferior colliculus on the memory of the contextual fear as assessed by the fear potentiated startle test.* **Brain Res.Bull.** 76 (5): 545-550, 2008.

RIBEIRO,S.J.; CISCATO,J.G.,JR.; DE,OLIVEIRA R.; DE OLIVEIRA,R.C.; NGELO-DIAS,R.; CARVALHO,A.D.; FELIPPOTTI,T.T.; REBOUCAS,E.C.; CASTELLAN-BALDAN,L.; HOFFMANN,A.; CORREA,S.A.; MOREIRA,J.E.; COIMBRA,N.C. *Functional and ultrastructural neuroanatomy of interactive intratectal/tectonigral mesencephalic opioid inhibitory links and nigrotectal GABAergic pathways: involvement of GABAA and mu1-opioid receptors in the modulation of panic-like reactions elicited by electrical stimulation of the dorsal midbrain.* **J.Chem.Neuroanat.** 30 (4): 184-200, 2005.

RITTENHOUSE,P.A.; BAKKUM,E.A.; O'CONNOR,P.A.; CARNES,M.; BETHEA,C.L.; VAN DE KAR,L.D. *Comparison of neuroendocrine and behavioral effects of ipsapirone, a 5-HT1A agonist, in three stress paradigms: immobilization, forced swim and conditioned fear.* **Brain Res.** 580 (1-2): 205-214, 1992.

ROBERGE,P.; MARCHAND,A.; REINHARZ,D.; SAVARD,P. *Cognitive-behavioral treatment for panic disorder with agoraphobia: a randomized, controlled trial and cost-effectiveness analysis.* **Behav.Modif.** 32 (3): 333-351, 2008.

RUFER,M.; ALBRECHT,R.; ZAUM,J.; SCHNYDER,U.; MUELLER-PFEIFFER,C.; HAND,I.; SCHMIDT,O. *Impact of alexithymia on treatment outcome: a naturalistic study of short-term cognitive-behavioral group therapy for panic disorder.* **Psychopathology.** 43 (3): 170-179, 2010.

SAKAI,K.; YOSHIMOTO,Y.; LUPPI,P.H.; FORT,P.; EL,MANSARI M.; SALVERT,D.; JOUVET,M. *Lower brainstem afferents to the cat posterior hypothalamus: a double-labeling study.* **Brain Res.Bull.** 24 (3): 437- 455, 1990.

SANTOS,J.M.; MACEDO,C.E.; BRANDAO,M.L. *Gabaergic mechanisms of hypothalamic nuclei in the expression of conditioned fear.* **Neurobiol.Learn.Mem.** 90 (3): 560-568, 2008.

SAPER,C.B.; SWANSON,L.W.; COWAN,W.M. *The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat.* **J.Comp Neurol.** 169 (4): 409-442, 1976.

SARA,S.J.; VANKOV,A.; HERVE,A. *Locus coeruleus-evoked responses in behaving rats: a clue to the role of noradrenaline in memory.* **Brain Res.Bull.** 35 (5-6): 457-465, 1994.

SARA,S.J.; SEGAL,M. *Plasticity of sensory responses of locus coeruleus neurons in the behaving rat: implications for cognition.* **Prog.Brain Res.** 88: 571-585, 1991.

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 involved in flight.* **Behav. Brain Res.** 22:181-190, 1986.

SCHMITT,P.; SANDNER,G.; COLPAERT,F.C.; DE,WITTE P. *Effects of dorsal raphe stimulation on escape induced by medial hypothalamic or central gray stimulation.* **Behav.Brain Res.** 8 (3): 289-307, 1983.

SCHNEIDER, L.S.; MUNJACK, D.; SEVERSON, J.A; PALMER, R. *Platelet 3H-imipramine binding in generalized anxiety disorder, panic disorder and agoraphobia with panic attacks.* **Biol Psychiatry.** 21: 33-41, 1987.

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.

SHEKHAR,A.; KATNER,J.S.; SAJDYK,T.J.; KOHL,R.R. *Role of norepinephrine in the dorsomedial hypothalamic panic response: an in vivo microdialysis study.* **Pharmacol.Biochem.Behav.** 71 (3): 493-500.

SIEGEL, G. J.; ALBERS, R. W.; BRADY., S. T.; PRICE, D.L. *Cap. 55: Neurobiology of severe mood and anxiety disorders.* In: **Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects.** San Diego: Elsevier Academic Press, 2006.

SINGEWALD,N.; SHARP,T. *Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry.* **Neuroscience.** 98 (4): 759-770, 2000.

SQUIRE, L. R., BLOOM, F. E., MCCONNELL, S. K., ROBERTS, J. L., SPITZER, N. C., ZIGMOND M. J. *Cap. 34: The Hypothalamus: An overview of regulatory systems.* In: **Fundamental Neuroscience.** San Diego: Elsevier Science, 2004.

STANLEY,S.; PINTO,S.; SEGAL,J.; PEREZ,C.A.; VIALE,A.; DEFALCO,J.; CAI,X.; HEISLER,L.K.; FRIEDMAN,J.M. *Identification of neuronal subpopulations that project from hypothalamus to both liver and adipose tissue polysynaptically.* **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** 107 (15): 7024-7029, 2010.

STARKE, K. *Presynaptic autoreceptors in the third decade: focus on alpha2-adrenoceptors.* **J. Neurochem.** 78: 685-693, 2001.

STON-JONES,G.; COHEN,J.D. *An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance.* **Annu.Rev.Neurosci.** 28: 403-450, 2005.

STONE,E.A.; LIN,Y.; SARFRAZ,Y.; QUARTERMAIN,D. *Marked behavioral activation from inhibitory stimulation of locus coeruleus alpha1-adrenoceptors by a full agonist.* **Brain Res.** 1291: 21-31, 2009.

STONE,E.A.; QUARTERMAIN,D.; LIN,Y.; LEHMANN,M.L. *Central alpha1-adrenergic system in behavioral activity and depression.* **Biochem.Pharmacol.** 73 (8): 1063-1075, 2007.

SULLIVAN,G.M.; COPLAN,J.D.; KENT,J.M.; GORMAN,J.M. *The noradrenergic system in pathological anxiety: a focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias.* **Biol.Psychiatry.**46 (9): 1205-1218, 1999.

SWANSON, L. W. *Cap. 2: The Architecture of Nervous Systems*. In: **Fundamental Neuroscience**. 18-45. San Diego: Elsevier Science, 2004.

SWIERGIEL,A.H.; LI,Y.; WEI,Z.Y.; DUNN,A.J. *Effects of chlordiazepoxide on footshock- and corticotropin-releasing factor-induced increases in cortical and hypothalamic norepinephrine secretion in rats*. **Neurochem.Int.** 52 (6): 1220-1225, 2008.

TANAKA,M.; YOSHIDA,M.; EMOTO,H.; ISHII,H. *Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies*. **Eur.J.Pharmacol.** 405 (1-3): 397-406, 2000.

TARGUM, S.D.; MARSHALL, L.E; *Fenfluramine provocation of anxiety in patients with panic disorder*. **Psychiatry Res.** 28: 295-306, 1989

TRACY,J.I.; MOHAMED,F.; FARO,S.; TIVER,R.; PINUS,A.; BLOOMER,C.; PYRROS,A.; HARVAN,J. *The effect of autonomic arousal on attentional focus*. **Neuroreport**. 11(18): 4037-4042, 2000.

TRONCOSO,A.C.; CIRILO-JUNIOR,G.; SANDNER,G.; BRANDAO,M.L. *Signaled two-way avoidance learning using electrical stimulation of the inferior colliculus as negative reinforcement: effects of visual and auditory cues as warning stimuli*. **Braz.J.Med.Biol.Res.** 31 (3): 391-398, 1998.

TRZCTNSKA, M.; TONKISS, J.; GALLER, J.R. *Influence of prenatal protein malnutrition on behavioral reactivity to stress in adult rats*. **Stress** 3, 71–83, 1999.

TSIGOS,C.; CHROUSOS,G.P. *Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress*. **J.Psychosom.Res.** 53 (4): 865-871, 2002.

TULLY,K.; BOLSHAKOV,V.Y. *Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity* **Mol.Brain**. 3: 15, 2010.

UHDE,T.W.; BOULENGER,J.P.; POST,R.M.; SIEVER,L.J.; VITTONI,B.J.; JIMERSON,D.C.; ROY-BYRNE,P.P. *Fear and Anxiety: relationship to noradrenergic function*. **Psychopathol.** 1984; 17 (Suppl 3): 8-23.

USUNOFF,K.G.; ITZEV,D.E.; ROLFS,A.; SCHMITT,O.; WREE,A. *Brain stem afferent connections of the amygdala in the rat with special references to a projection from*

the parabigeminal nucleus: a fluorescent retrograde tracing study. **Anat.Embryol.(Berl)** 211 (5): 475-496, 2006.

UYAMA,N.; GEERTS,A.; REYNAERT,H. *Neural connections between the hypothalamus and the liver.* **Anat.Rec.A Discov.Mol.Cell Evol.Biol.** 280 (1): 808-820, 2004.

VANKOV,A.; HERVE-MINVIELLE,A.; SARA,S.J. *Response to novelty and its rapid habituation in locus coeruleus neurons of the freely exploring rat.* **Eur.J.Neurosci.** 7 (6): 1180-1187, 1995.

VEENEMA,A.H.; BREDEWOLD,R.; NEUMANN,I.D. *Opposite effects of maternal separation on intermale and maternal aggression in C57BL/6 mice: link to hypothalamic vasopressin and oxytocin immunoreactivity* **Psychoneuroendocrinology.** 32 (5): 437-450, 2007.

YAGUCHI,T.; NAGATA,T.; YANG,D.; NISHIZAKI,T. *Interleukin-18 regulates motor activity, anxiety and spatial learning without affecting synaptic plasticity.* **Behav.Brain Res.** 206 (1): 47-51, 2010.

ZIGMOND, R.E.; SCHWARZSCHILD, M.A.; RITTENHOUSE, A.R. *Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation.* **Annu.Rev. Neurosc.** 12: 415-461, 1989.

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](#)