

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

*Departamento de Farmacologia*

*Laboratório de Neuroanatomia & Neuropsicobiologia*

***PAPEL DO SISTEMA OPIOIDE E DAS CONEXÕES ENTRE O HIPOTÁLAMO MEDIAL E A  
SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL NOS COMPORTAMENTOS DE DEFESA  
ELICIADOS PELO BLOQUEIO DE RECEPTORES GABA<sub>A</sub> NO HIPOTÁLAMO MEDIAL***

***Maria Angélica Castiblanco Urbina***

Ribeirão Preto – SP, Brasil

2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO



***PAPEL DO SISTEMA OPIOIDE E DAS CONEXÕES ENTRE O HIPOTÁLAMO MEDIAL E A  
SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL NOS COMPORTAMENTOS DE DEFESA  
ELICIADOS PELO BLOQUEIO DE RECEPTORES GABA<sub>A</sub> NO HIPOTÁLAMO MEDIAL***

*Maria Angélica Castiblanco Urbina*

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, Brasil.  
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

Castiblanco-Urbina, Maria Angelica

Papel do Sistema Opioide e das Conexões Entre o Hipotálamo Medial e a Substância Cinzenta Periaquedutal nos Comportamentos de Defesa Eliciados Pelo Bloqueio de Receptores Gaba<sub>a</sub> No Hipotálamo Medial

82p.: 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

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Maria Angelica Castiblanco Urbina**

PAPEL DO SISTEMA OPIOIDE E DAS CONEXÕES ENTRE O HIPOTÁLAMO MEDIAL E A  
SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL NOS COMPORTAMENTOS DE DEFESA  
ELICIADOS PELO BLOQUEIO DE RECEPTORES GABA<sub>A</sub> NO HIPOTÁLAMO MEDIAL

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

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_.

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. José Alexandre de Souza Crippa

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Fabrício Calvo

Instituição: Faculdade De São Lucas

Assinatura: \_\_\_\_\_

## *DEDICO,*

Ao meu esposo *Andrés Uribe*, que além de ser o meu companheiro é meu amigo incondicional, é o meu impulsionador de sonhos. Todo dia agradeço a Deus por ter te colocado na minha vida e no meu caminho. Muito obrigada pela ajuda, compreensão, paciência e sobre tudo pelo amor. Estou muito contente que nos dois estejamos cumprindo nossos sonhos juntos, e juntos seguiremos para cumprir os que faltam. Este e todos os meus logros serão sempre os teus.

A meu pai *Carlos J Castiblanco*, que é meu exemplo de vida, sempre cheio de fortaleza, alegria, paciência e amor. Obrigada por me ensinar a rir nos momentos difíceis e a desfrutar e compartilhar os momentos felizes. Obrigada por sempre me transmitir o teu otimismo e me mostrar que apesar das circunstancias sempre existe uma saída. Sem o teu apoio nada disso seria possível, muito obrigada por me ajudar a cumprir os meus sonhos.

À minha mãe *R Ximena Urbina*, que é e tem sido o meu apoio em todo momento da minha vida. Mãe, obrigada por sempre estar do meu lado me dando os melhores conselhos e me mostrando qual é o melhor caminho a seguir. Teu carinho, amor e ajuda têm sido indispensáveis para a realização dos meus sonhos, você é uma pessoa que tem me influenciado muito para fazer de mim a pessoa que sou hoje, muito obrigada.

A meu irmãozinho *Carlos Javier Castiblanco*, meu amigão que sempre me escuta quando eu preciso. Monito, muito obrigada por estar do meu lado e por me apoiar nesta etapa da minha vida. Você sabe que eu me sinto muito orgulhosa de você, e que cada logro teu tem sido mais um motivo de alegria no meu coração, por isso hoje quero compartilhar este momento do qual você também faz parte.

À *Família Uribe Mariño*, Enrique, Maria Cristina e Moni vocês são a minha segunda família, vocês sempre me acolheram como mais um membro da sua família, me apoiaram nos momentos difíceis e compartilharam os meus triunfos e alegrias. Hoje estou culminando mais uma etapa da minha vida e me sinto muito contente de poder compartilhá-la com vocês, muito obrigada.

Ao *Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra*, que além de ser o melhor orientador é uma pessoa incrível. Agradeço cada uma das circunstâncias da vida que me levaram a conhecê-lo e trabalhar do seu lado. Muito obrigada por ter me ensinado de uma forma muito especial que atingir a *caaaalma* sempre é possível, mesmo nos momentos mais estressantes. Você sempre será para mim o meu pai brasileiro, o meu exemplo de cientista, e um modelo pessoal. Obrigada por ter me dado a oportunidade de formar parte desta bonita família que sempre estará no meu coração.

## *AGRADEÇO,*

A *Prof. Dr. José Alexandre de Sousa Crippa* e ao *Prof. Dr. Fabricio Calvo* por terem aceitado participar da banca examinadora e terem contribuído com suas sugestões para melhorar a qualidade do presente trabalho.

A toda minha família brasileira do *Laboratório de Neuroanatomia e Neuropsicobiologia (LNN)*, a todos vocês, que sempre estiveram do meu lado para me ajudar e me fazer sentir como si estivesse na minha casa, sempre encontrei em vocês uma mão amiga, um sorriso, um abraço cálido. Não tenho palavras para lhes expressar o agradecimento que sinto com cada um de vocês, sempre terão uma parte muito importante do meu coração. Lembrem sempre que minha casa é sempre a casa de vocês.

A *Lina Maria Perilla*, minha parceira no Brasil e na vida, que bom foi te conhecer e saber que existem no mundo pessoas como você que sabem valorar uma boa amizade. Muito obrigada por ser a minha amiga e conselheira; muito obrigada pelo apoio brindado neste tempo que compartilhamos neste bonito país, sei que a nossa amizade vai além da distância.

A *Julian Tejada*, o meu amigão, tenho muito que te agradecer, você foi desde a nossa chegada no Brasil uma pessoa muito especial, sempre do meu lado para me apoiar e para rir comigo, adorei encontrar uma pessoa com tantas gostos em comum com a qual podia falar sem parar de rir. Muito obrigada pelos lindos momentos, sei que a nossa amizade vai continuar por sempre.

A *Sonia Maria Stefanelli de Andrade* e *Fátima Helena Ferreira Petean*, por serem umas pessoas tão especiais para mim no Brasil. Muito obrigada pela ajuda e carinho que vocês têm me dado neste tempo que fiz parte do departamento de farmacologia, sei que sempre vou contar com o seu apoio assim como vocês sempre poderão contar com o meu, são pessoas muito especiais que sempre estarão no meu coração.

A *CAPES* e *FAPESP* pelo auxílio financeiro

*Ao BRASIL por ter me aberto as portas e ter me dado a oportunidade de estudar e de conhecer muitas pessoas maravilhosas, MUITO OBRIGADA.*



# SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	III
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Ansiedade e Pânico	1
1.2 Estruturas Envolvidas	3
1.2.1 <i>Substância cinzenta periaquedutal</i>	5
1.2.2 <i>Hipotálamo</i>	6
1.3 Comportamentos de Defesa	10
1.4. Sistema Mediado pela Neurotransmissão Opioide	11
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. MATERIAL E METODOS	17
3.1 Animais	17
3.2 Procedimento Cirúrgico	17
3.3. Estudo Neuroanatômico	18
3.3.1 <i>Procedimentos Morfológicos</i>	18
3.4. Estudo Neurofisiológico	19
3.4.1. <i>Drogas</i>	19

3.4.2. <i>Procedimento Experimental</i>	19
3.4.3. <i>Histologia</i>	20
3.4.4. <i>Análise Estatística</i>	21
3.5. Estudo Neurofarmacológico	21
3.5.1. <i>Drogas</i>	21
3.5.2. <i>Procedimento Experimental</i>	21
3.5.3 <i>Histologia</i>	22
3.5.4. <i>Análise Estatística</i>	22
3.6. Equipamentos	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Estudo Neuroanatômico	24
4.2 Estudo Neurofisiológico	32
4.3. Estudo Neurofarmacológico	42
5. DISCUSSÃO	54
5.1. Estudo Neuroanatômico	55
5.2 Estudo Neurofisiológico	56
5.3. Estudo Neurofarmacológico	58
6 CONCLUSOES	64
7. REFERÊNCIAS	66

## RESUMO

A síndrome do pânico é caracterizada por ataques de pânico, os quais são considerados como episódios de medo intenso acompanhados por palpitações, sensação de morte iminente e perda de controle, entre outros. Existem modelos experimentais que tentam reproduzir os sintomas da síndrome de pânico através da estimulação de diferentes estruturas encefálicas, com o intuito de investigar as bases fisiológicas e farmacológicas dessa patologia, culminando em achados que favoreçam o descobrimento de novos tratamentos. A estimulação elétrica e química de algumas estruturas mesencefálicas, tais como a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), as camadas profundas do colículo superior (CPCS) e o núcleo central do colículo inferior (NCCI) eliciam respostas defensivas explosivas, associadas ao medo e semelhantes àquelas que caracterizam a síndrome do pânico em humanos. O medo, presente no transtorno de pânico, pode ser considerado como uma emoção inata que induz a organização de um comportamento defensivo inato que caracteriza o instinto de sobrevivência das espécies, permitindo ao indivíduo se proteger de situações aversivas, perigosas e ameaçadoras. Curiosamente, após a estimulação intra-hipotalâmica, a resposta defensiva de fuga é caracterizada por ter uma intensidade moderada, e por ser rica em comportamento exploratório.

O objetivo do presente trabalho foi estudar o papel das conexões entre os núcleos do hipotálamo medial (HM) e a SCPd, com especial ênfase no sistema opioide, e seu envolvimento na modulação dos comportamentos defensivos elaborados pela estimulação química do HM através de uma abordagem neurofisiológica, com inativação de sinapses através da administração com cloreto de cobalto na SCPd, e por meio de uma abordagem neurofarmacológica, com pré-tratamento na SCPd com antagonistas seletivos e não-seletivos de receptores opioides.

Para isso, foi feita uma cirurgia estereotáxica e uma cânula foi implantada na SCPd e outra no HM. Em uma abordagem neuroanatômica, a droga neurotraçadora biodextrana (BDA) marcada com Cascade Blue (BDA-CB) ou com Texas Red (BDA-TR) foi administrada no HM e na SCPd, respectivamente. Esse procedimento permitiu a identificação de células com características de neurônios localizadas no núcleo ventromedial do hipotálamo (HVM), e fibras na SCPd, sugerindo que o HVM projeta-se

tanto para o HDM como para a SCPd. Foram também identificados neurônios positivos para BDA-TR nas colunas dorsais da SCPd, no núcleo dosomedial do hipotálamo (HDM), o que pode sugerir uma rede neural conectando reciprocamente o HM à SCPd, além das já conhecidas conexões intrínsecas no HM e na própria SCP. No estudo neurofisiológico, cinco dias após a cirurgia, os animais foram divididos em dois grupos. O primeiro foi submetido ao procedimento de pseudoinjeção (*Sham*) na SCPd e, após dez minutos, recebeu a microinjeção de bicuculina (40ng/0,2μL) no HM. Por sua vez, o segundo grupo recebeu a microinjeção de Cloreto de cobalto (1mmol) na SCPd seguido, após dez minutos, por microinjeções de bicuculina (40ng/0,2μL) nas redes neurais do HM. No estudo neurofarmacológico, os animais receberam salina fisiológica, naltrexona, nor-binaltorfimina ou naloxonazine na SCPd e, após 10 minutos, 2 horas ou 24 horas, respectivamente, foram tratados com microinjeção de bicuculina (40ng/0,2μL) no HM. Imediatamente após a estimulação química do HM, todos os animais foram colocados na arena e a frequência e duração dos comportamentos defensivos, tais como avaliação de risco, rotações, saltos, fuga, alerta, movimento defensivo retrógrado, e não defensivos como levantamentos e cruzamentos foram registrados.

Tais procedimentos reduziram a magnitude do comportamento de fuga orientada, sugerindo que a elaboração da resposta de defesa eliciada pelo bloqueio de receptores GABA<sub>A</sub> no HM pode recrutar conexões entre o hipotálamo e a coluna dorsal da SCP, as quais podem estar mediadas por peptídeos opioides endógenos com recrutamento de receptores opioides  $\mu_1$  e  $\kappa$ .

## ABSTRACT

Panic disorder is characterized by feelings of intense fear accompanied by increases in heart rate, imminent death sensations and loss of control, among others symptoms. Some experimental models are being developed in order to reproduce those symptoms, allowing the study of the physiological and pharmacological bases of this pathology and thus allowing the discovery of new treatments. Electrical and chemical stimulation of some mesencephalic structures, such as the periaqueductal grey matter, deep layers of superior colliculus and the central nucleus of the inferior colliculus, induce explosive defensive behaviours similar to panic attacks in humans. Fear can be considered as a defensive behaviour that represents an innate instinct for survival that protects the animal against aversive and dangerous situations. When the stimulation is made into the medial hypothalamus, the defensive response is characterized by a less intense repertoire of escape response and exploratory behaviour.

The aim of the present study was to establish the functional neuroanatomy between the medial hypothalamus (MH) and the dorsal periaqueductal grey matter (dPAG), emphasizing the role played by the opioid system, on the defensive behaviours elicited by the chemical stimulation of the medial hypothalamus with bicuculline, a GABA-A receptor antagonist, through a neurophysiological approach with synaptic inhibition by central administrations of cobalt chloride ( $\text{CoCl}_2$ ) into dPAG, and a neuropharmacological approach involving pre-treatments with selective and non-selective antagonists of opioid receptors into the dPAG.

For this purpose, animals were submitted to stereotaxic surgery and two guide cannulae were implanted in the central nervous system, one aiming at the dorsal periaqueductal grey matter and the other at the medial hypothalamus. In a neuroanatomical approach, the neurotracer biotinylated dextran amine (BDA) labeled with either Cascade Blue (BDA-CB) or Texas Red (BDA-TR) was administered in the MH and in the dPAG, respectively. This procedure allowed the identification of cells with neuronal characteristics in the ventromedial hypothalamic nucleus (VMH), positive fibres were found in the dPAG, suggesting that the VMH send inputs to both the DMH

and to dPAG. It was also identified BDA-TR-labeled neurons in the dorsal columns of the PAG, in the dorsomedial nucleus of the MH (DMH) and in the HDM, an indicative that there is a neural network connecting reciprocally the MH to dPAG, as well as the already known intrinsic connections of MH and PAG. In the neurophysiological study, five days after surgery, the animals were divided in two groups. One of them receiving a sham procedure into the dorsal periaqueductal grey matter followed, ten minutes later, by microinjection of bicuculline (40ng/0,2 $\mu$ L) into the medial hypothalamus. The second group received a microinjection of cobalt chloride (1mmol) into the dorsal periaqueductal grey matter and, ten minutes later, microinjections of bicuculline (40ng/0.2 $\mu$ L) were performed into the medial hypothalamus. In the neuropharmacological study, animals received microinjections of either physiological saline, naltrexone, nor-binaltorfimine or naloxonazine into the dorsal periaqueductal grey matter and, after 10 minutes, 2 hours or 24 hours, respectively, bicuculline (40ng/0,2 $\mu$ L) was administrated into the medial hypothalamus. After that, each animal was placed in an open field and frequency and duration of defensive behaviours such as risk assessment, turning behaviour, jumps, running, defensive attention, retrograde defensive movement, and non defensive behaviour as rearing and crossings were recorded. All pre-treatments decreased the oriented escape behavior, suggesting that the elaboration of escape in the medial hypothalamus induced by the blockade of GABA<sub>A</sub> receptors can recruit opioide pathways connecting the medial hypothalamus to the dorsal columns of the periaqueductal grey matter recruiting  $\mu_1$ - and  $\kappa$ -opioid receptors.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Ansiedade e Pânico

A manifestação dos estados de ansiedade e de respostas neurovegetativas e cognitivas ao estresse representa uma adaptação evolutiva ao ambiente e às ameaças internas e externas que podem sinalizar algum perigo para a espécie, o que pode gerar medo inato, ansiedade e pânico. Ansiedade pode ser definida como uma emoção despertada frente ao conflito gerado pela necessidade de exposição a um dado ambiente em que se identificou um estímulo aversivo gerando um conflito entre a necessidade de aproximação e de esquiva. O medo seria despertado pela motivação para escapar ou evitar um dado estímulo aversivo, ao passo que pânico, seria expresso por uma fuga vigorosa evocada por um perigo proximal, de acordo com Graeff (2007). Porém, existem circunstâncias nas quais esses padrões comportamentais emergem sem uma clara funcionalidade e impedem ao organismo se adaptar ao ambiente. Os transtornos de ansiedade constituem uma má adaptação ao meio social, apresentando respostas de caráter aversivo desproporcionadas ao estímulo estressor, sendo a maioria das vezes eliciados por situações que não apresentam uma conotação aversiva, interferindo, portanto, com a vida cotidiana do paciente (HADO DE SOUSA e cols, 2010). Os transtornos da ansiedade são um dos transtornos psiquiátricos com maior incidência e com uma prevalência de 15% a 25% (ERHARDT e cols, 2006; SIEGEL e cols, 2006).

A síndrome do pânico, também conhecida como ansiedade paroxística episódica, é uma doença que afeta as interações sociais de uma pessoa, alterando seu desempenho em atividades diárias. O transtorno do pânico é caracterizado pela presença de períodos de intenso medo e desconforto acompanhados por sintomas tais como: palpitações, tremores, dificuldades para respirar normalmente, medo de morrer e perda de controle, entre outros sintomas. Esse conjunto de respostas aparece abruptamente e atinge o seu máximo nível em, aproximadamente, dez minutos. Tais ataques de pânico caracterizam-se por serem

recorrentes e espontâneos, seguidos por uma constante preocupação a respeito das suas implicações e consequências (DEL-BEM e GRAEFF,2009). Em alguns pacientes, os ataques apresentam-se acompanhados por agorafobia ou sensação de medo excessivo de situações, tais como ingressar em espaços abertos, ou naqueles em que há muitas pessoas, dos quais escapar ou obter ajuda pode representar uma dificuldade (FOGEL, 1996).

Recentes estudos de neuroimagem em humanos têm oferecido muita informação a respeito das estruturas encefálicas envolvidas no transtorno de pânico. Estudos de ressonância magnética estrutural mostraram que regiões tais como: o córtex cingulado anterior, o sistema septo-hipocampal, o giro temporal superior, o mecesencéfalo, a ponte, o complexo amigdalóide e a SCP, entre outros, apresentam diferenças estruturais, comparado com um grupo de pacientes sem síndrome do pânico, (CRIPPA e cols, 2004; SAKAI e cols, 2006; TRZESNIAK e cols, 2010; UCHIDA e cols, 2008;). Também tem sido descrita uma alteração no funcionamento do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) em pacientes com diagnóstico de síndrome de pânico (GOLDSTAIN e cols, 1987). Quanto às alterações nos sistemas neuroquímicos, pacientes com essa doença mostram uma baixa atividade central do GABA (JOHNSON e cols, 2010).

Muito do conhecimento acerca dos substratos neurais humanos do medo, ansiedade e pânico têm sido baseados também em estudos feitos em modelos animais. Tais estudos permitiram conhecer um pouco mais da anatomia, neuroquímica e fisiologia de respostas presentes na ansiedade e em situações que induzem medo. Além disso, o desenvolvimento de técnicas avançadas tem permitido a confirmação das observações feitas em espécies animais potencialmente aplicáveis em humanos (SIEGEL e cols, 2006).

Alguns estudos têm mostrado que os sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e GABAérgico entre outros, encontram-se envolvidas na patofisiologia do transtorno do pânico. Com efeito, em relação ao envolvimento do sistema noradrenérgico na doença do pânico, pacientes relatam sintomas cardiovasculares, gastrointestinais e respiratórios associados ao *locus coeruleus* (LC), o qual é responsável pelas alterações na função dos sistemas mencionados (FOGEL e SCHIFFER, 1996). Outra série de mudanças fisiológicas resulta da ativação anormal dos neurônios do LC, a qual pode levar à expressão dos ataques de pânico.



Com respeito ao papel do sistema serotoninérgico na síndrome do pânico, a literatura é ainda muito controversa. O núcleo dorsal de rafe (NDR) desempenha um papel importante no medo e na ansiedade, devido a suas projeções inibitórias ao LC, as quais podem ter um efeito importante na liberação de serotonina observada no córtex pré-frontal, complexo amigdalóide e hipotálamo durante a elaboração de respostas a estímulos ansiogênicos (SIEGEL e cols, 2006). Estudos realizados em humanos mostraram que pacientes com transtorno do pânico têm níveis séricos menores de 5-HT comparados com grupos controles (FOGEL e SCHIFFER, 1996).

A resposta de medo começa necessariamente pela percepção, de maneira que a informação sensitiva é enviada desde o tálamo ao córtex sensorial, o qual é responsável pelo reconhecimento e avaliação da ameaça (SIEGEL e cols, 2006; FOGEL e SCHIFFER, 1996). O medo presente no transtorno do pânico pode ser considerado como um comportamento defensivo que representa um componente inato do instinto de sobrevivência da espécie, onde o indivíduo protege-se contra situações aversivas, perigosas e ameaçadoras, tais como: ambientes desconhecidos, a silhueta de predadores, expressões emocionais que indicam raiva e ameaça de ataque, odor ou ruídos de um predador, vocalizações ameaçadoras de animais que tenham adquirido significado de advertência por precederem consistentemente a ocorrência de estímulos nocivos e dolorosos (COIMBRA, 1992; Coimbra e Cols, 2006., WALTER A e cols., 2004; MISSLIN R., 2003).

## 1.2 Estruturas Envolvidas

Há relatos na literatura evidenciando os circuitos neuronais responsáveis pela gênese e elaboração de estados aversivos, desencadeados por estímulos ambientais inatos ou aprendidos que sinalizem perigo e dano corporal, que são interpretados em nossa espécie como estado motivacional do medo (PANKSEPP, 1990; FANSELOW, 1991; VIANNA e cols, 2003; JOHNSON e col, 2010; MEZZASALMA e cols, 2004; BRANDÃO e cols, 2003 COLASANTI e cols 2010). Existem estruturas encefálicas responsáveis pela elaboração de

respostas defensivas mais rápidas e imediatas, como a SCP, a qual responde quando a ameaça é proximal, entanto que, conforme a distância do estímulo potencialmente perigoso aumenta, são recrutados circuitos mais complexos para a elaboração de estratégias defensivas que envolvem estruturas encefálicas mais recentes na escala evolutiva (MEZZASALAMA e cols, 2004).

Com efeito, estruturas como o complexo amigdalóide (CA), a substância cinzenta periaqueductal (SCP), o hipotálamo, o colículo inferior (CI) e as camadas profundas do colículo superior (CPCS), encontram-se envolvidas na integração de diferentes componentes dos estados aversivos, como congelamento, luta, reações de esquiva, imobilidade tônica e hiperalgesia (MISSLIN,R, 2003; MOTTA e BRANDÃO,1993; COIMBRA e BRANDÃO, 1997; BRANDÃO e cols, 1999.)

A informação sensorial referente a estímulos condicionados passa através do tálamo anterior até o núcleo lateral da amígdala, gerando uma rápida resposta para um estímulo com conotação de perigo potencial. Além disso, esse núcleo recebe aferências de regiões corticais responsáveis pelo processamento e avaliação da informação sensorial (DE OCA e cols.,1998). O CA liga-se com muitas estruturas envolvidas neste sistema sensorial permeado por estímulos que evocam sensações de medo. Assim, a projeção eferente do núcleo central da amígdala tem diferentes destinos: o núcleo parabraquial, responsável pelo aumento no ritmo respiratório; o núcleo hipotalâmico lateral, responsável pela ativação do sistema nervoso simpático; o *locus coeruleus*, que aumenta a liberação de noradrenalina, em núcleos que elaboram a resposta comportamental de defesa, modulando as sensações de medo, ou no corno posterior da medula espinal, modulando a via nociceptiva ascendente; o núcleo paraventricular do hipotálamo, que causa alta liberação de adenocorticóides; a SCP, responsável das respostas comportamentais explosivas que organizam os estados defensivos, como comportamentos de imobilidade defensiva e fuga explosiva (DE OCA e cols,1998; MISSLIN,R, 2003; MOTTA e BRANDÃO,1993; COIMBRA e BRANDÃO, 1997).

Muitas estruturas encefálicas que organizam o comportamento defensivo e representam um substrato neural de medo ou ansiedade têm sido estudadas através de abordagens neuroanatômicas e neurofisiológicas. Entre as estruturas envolvidas,

encontram-se regiões pré-frontais, a amígdala, o hipocampo, a área para-hipocampal, o hipotálamo, o tálamo e a substância cinzenta periaqueductal (DEL-BEN e GRAEFF,2009)

### *1.2.1. Substância cinzenta periaqueductal*

A SCP é constituída por uma população de células que rodeiam o aqueduto cerebral (aqueduto de Sylvius). Estudos da citoarquitetura mostraram que a SCP tem principalmente neurônios pequenos e medianos fusiformes, triangulares e estrelados, cujos somas e axônios estão orientados em direção rostro-caudal (BEITZ, 1985; BEITZ e SHEPARD,1985; HAMILTON, 1973; MANTYH, 1982; MELLER e DENNIS, 1990).

A SCP desempenha um papel importante no desenvolvimento de respostas a estímulos aversivos e encontra-se dividida em quatro subdivisões, a SCP lateral, ventrolateral, dorsolateral e dorsomedial (CARRIVE, 1993; BRANDÃO e VIANNA, 2003). Estudos pregressos demonstraram que a administração de aminoácidos excitatórios na SCP lateral (SCPl) provoca respostas de fuga que medeiam o medo condicionado, (Brandão e Vianna, 2003), e essa subdivisão da SCP também está envolvida, junto com a coluna dorsolateral da SCP (SCVPdl), na geração e organização de reações motoras nas respostas defensivas e de congelamento, relacionado com as crises de pânico (BORELLI e cols, 2004; BRANDÃO e VIANNA, 2003). A SCP ventrolateral (SCPvl) medeia respostas eliciadas por estímulos de medo inato ou aprendidos (VIANNA e cols, 2003). A imobilidade defensiva, ou congelamento, é observada depois da estimulação da SCPvl, e a lesão desta estrutura reduz o congelamento induzido pelo medo condicionado (BRANDÃO e VIANNA, 2003). No que se refere à SCP dorsolateral (SCPdl), sabe-se que ela pode inibir o CA e outras estruturas do prosencéfalo envolvidas no processamento de estímulos que provocam medo no momento de extremo risco de morte. A SCPdl também pode interferir no desempenho do comportamento de medo inato (COIMBRA e col., 1992; DE OCA e cols.,1998). Além disso, após a execução de respostas de congelamento, pode-se observar uma expressão de Fos aumentada na SCPdl (VIANNA e cols, 2003). Também, é possível constatar um aumento na

expressão de Fos na SCPdm, estrutura que, quando estimulada, induz reações defensivas, como congelamento e fuga (VIANNA e Cols, 2003). Assim, a SCP junto com outras estruturas mesencefálicas, coordena a geração e elaboração do medo inato e condicionado (GRAEFF, 1981).

A substância cinzenta periaqueductal encontra-se envolvida com a reação a ameaças proximais, e fármacos que aumentam a função serotoninérgica e são efetivos no tratamento de transtorno de pânico, são capazes de reduzir comportamentos que são observados normalmente quando a SCP é estimulada (DEL-BEN e GRAEFF, 2009).

Existem pelo menos duas vias que regulam os comportamentos defensivos mediados pela SCP. A primeira envolve o hipotálamo e o núcleo cuneiforme, o qual medeia respostas de defesa em situações de perigo imediato. A outra via envolve a amígdala e a parte ventrolateral da SCP, a qual medeia respostas relacionadas ao medo contextual (VIANNA e Cols, 2003). Foi evidenciada uma expressão de Fos no hipotálamo ventromedial, no núcleo pré-mamilar dorsal e no núcleo cuneiforme após a estimulação da SCPd (VIANNA e cols, 2003).

### *1.2.2. Hipotálamo*

O transtorno de ansiedade encontra-se relacionado com o eixo Hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA), o qual se encontra envolvido nas respostas ao estresse, onde a homeostase do organismo é ameaçada. Nessas circunstâncias, é eliciada uma série de mudanças no corpo chamadas “síndrome de adaptação geral”. A resposta de estresse está associada ao fator liberador de corticotrofina e aos níveis de corticóides no sangue, pela ativação do eixo HPA, o qual ativa a divisão simpática do sistema nervoso neurovegetativo, como um componente autonômico da reação de luta ou de fuga em uma situação de emergência e perigo. Nesse contexto, enquanto a noradrenalina é liberada periféricamente por fibras nervosas do sistema simpático, a adrenalina é liberada pela medula adrenal diretamente na corrente sanguínea. Na síndrome do pânico, o eixo HPA se encontra afetado

(GRAEFF, 2007; VREEBURG e cols, 2010). Modelos experimentais têm mostrado que a inalação de ar com altos conteúdos de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) incrementa as respostas de ansiedade por meio da ativação do eixo HPA (JOHNSON e col, 2010). Como seu nome indica, a atividade do eixo HPA é iniciada pelo hipotálamo, uma das estruturas mais importantes do diencefalo.

O hipotálamo estende-se desde a região do quiasma óptico até a borda caudal dos corpos mamilares, situando-se embaixo do sulco hipotalâmico sobre a parede lateral do terceiro ventrículo. O hipotálamo controla e integra as funções do sistema nervoso autônomo e os sistemas endócrinos e exerce um papel fundamental na manutenção da homeostase corporal. Também participa em atividades como: regulação da temperatura corporal, do comportamento alimentar, do comportamento sexual e das emoções (SNELL, 1999).

O hipotálamo é constituído por núcleos pequenos que, por sua vez, têm conexões e funções diferentes, muito embora integradas, devido a suas conexões intrínsecas. Os núcleos hipotalâmicos estão agrupados em três regiões longitudinais: periventricular, medial e lateral. É importante mencionar que a região medial recebe aferências de estruturas do sistema límbico e de núcleos sensitivos viscerais do tronco encefálico (PURVES e cols , 1997).

Philip Bard, em 1928 (*apud* PURVES, 2004), deu a conhecer os resultados dos seus experimentos, sugerindo o hipotálamo como o centro da coordenação entre os componentes autônomos e somáticos da conduta emocional. O experimento consistiu basicamente na hablação de ambos os hemisférios cerebrais (incluindo o córtex, a substância branca e os núcleos da base) em gatos. Após a cirurgia, os animais mostraram-se irritados e com aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca, com dilatação das pupilas e ereção dos pelos sobre o dorso e a cauda. Também mostraram comportamentos, como levantamento da cauda, arqueamento do dorso e extensão das patas, comportamento que foi denominado pelo autor como “falsa raiva”, já que não havia nenhum estímulo aversivo presente. Posteriormente, o mesmo autor mostrou que a “falsa raiva” não se apresentava quando se seccionava o encéfalo na união entre o hipotálamo e o mesencéfalo, sugerindo que a experiência subjetiva da emoção poderia depender do córtex, mas a conduta emocional não dependia necessariamente dos processos corticais.

Estudos com os de Bard levaram outros autores a seguirem pesquisando o papel do hipotálamo na modulação das emoções. Anos depois, Walter Hess complementou os estudos de Bard, mostrando que a estimulação elétrica de diferentes partes do hipotálamo em gatos acordados, em livre movimentação, induzia também uma resposta de raiva e um comportamento de ataque. A estimulação de outras subáreas do hipotálamo produziu uma resposta semelhante ao medo. Estudos como o anterior, levaram a Hess a ganhar o prêmio Nobel no ano de 1949. Mas, quiçá o mais importante é que estudos como os de Bard e os de Hess mostraram que existem circuitos básicos para os comportamentos organizados pelo diencéfalo a partir de suas conexões importantes com o tronco encefálico.

Atualmente, já é conhecido que o hipotálamo e suas conexões exercem um papel importante na elaboração e expressão das emoções (MORGAN e cols., 2005). Sendo que o núcleo medial do hipotálamo é o encarregado de coordenar a resposta fuga (GRAEFF, 1994; FREITAS e col., 2009).

Quanto ao hipotálamo ventromedial, este tem sido relacionado com uma série de comportamentos relacionados à ingesta alimentar, com o comportamento sexual e com respostas de agressividade. No concernente à porção dorsomedial do hipotálamo ventromedial, o hipotálamo anterior e o núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo, tem sido sugerido que estes formam parte de um circuito conhecido como o sistema hipotalâmico de defesa (CANTERAS, 2002). A estimulação do HVM em humanos e em ratos está relacionada com a organização de respostas de medo intenso, como os ataques de pânico (WILENT e cols, 2010).

No que se refere ao hipotálamo dorsomedial, tem sido sugerido que ele desempenha um papel importante nas alterações fisiológicas e comportamentais da ansiedade e do estresse. Essa estrutura encontra-se relacionada com as respostas autonômicas, respiratórias e endócrinas em situações estressantes. A desinibição do HDM com bicuculina, um antagonista de receptores GABA<sub>A</sub>, produz comportamentos similares aos observados em pacientes com ataques de pânico. Assim também, o bloqueio desse mesmo receptor mostrou um aumento na expressão de Fos no prosencéfalo e no tronco cerebral relacionadas com o estresse e com a ansiedade (JOHNSON e cols, 2008; SHEKHAR e cols, 1996, ZARETSKAIA e cols, 2008).

O sistema hipotalâmico de defesa está efetivamente envolvido na organização dos comportamentos defensivos inatos (BUENO e cols., 2007; HRABOVSKY e cols., 2005; McCLELLAN e cols., 2006; BLANCHARD e cols., 2005; CANTERAS, 2002; CANTERAS e cols., 2001; FREITAS e cols, 2009). Há evidências de que o hipotálamo medial também se encontra relacionado com o processamento de informação aversiva contextual (CARVALHO-NETTO e cols, 2010), sendo que o núcleo pré-mamilar dorsal o responsável pela amplificação deste processamento e pela organização dos comportamentos defensivos antipredatórios. Por sua vez, há evidências farmacológicas que sugerem que o hipotálamo medial estabelece conexões com a SCP, a qual está envolvida com a expressão de respostas defensivas condicionadas e incondicionadas (CEZARIO e cols, 2008).

Usando uma aproximação farmacológica, a função inibitória GABAérgica em neurônios diencefálicos tem mostrado estar envolvida na elaboração e na regulação dos comportamentos defensivos no hipotálamo (BUENO e cols., 2007; FREITAS e col., 2009). A microinjeção intradiencefálica de antagonistas de receptores GABA<sub>A</sub> tem sido tradicionalmente utilizada como modelo de ansiedade e pânico, já que estudos mostraram que o bloqueio de esses receptores na região dorsal do hipotálamo evoca uma série de mudanças fisiológicas e efeitos ansiogênicos (SHEKHAR e KATNER, 1995; SHEKHAR, 1994). Esse modelo farmacológico de pânico tem permitido o estudo da interação entre diferentes sistemas neuroquímicos para o entendimento dos transtornos da ansiedade.

Outro importante sistema de neurotransmissão presente no hipotálamo é o opioide, já que os precursores das endorfinas são sintetizados no núcleo infundibular do hipotálamo e as pró-encefalinas são produzidas em diferentes núcleos hipotalâmicos, dentre os quais se inclui o núcleo paraventricular, importante na coordenação de resposta ao estresse e na liberação de ACTH. Esse núcleo também recebe aferências de outras áreas do sistema límbico e de estruturas mesencefálicas relacionadas com os comportamentos defensivos (COLASANTI e cols 2010).

### 1.3 Comportamentos de Defesa

As reações de defesa desempenham um papel importante nas respostas comportamentais evocadas por um organismo quando, de maneira repentina ou inesperada, aparece um estímulo com conotação aversiva ou quando este mesmo estímulo já tinha sido aprendido previamente e associado com a mesma conotação. Por sua vez, a atividade prosencefálica, diencefálica e mesencefálica evoca uma série de reações fisiológicas e movimentos coordenados que permitem uma rápida e eficiente resposta motora ante uma situação de perigo. Esses comportamentos induzidos pelo medo são considerados como respostas explosivas ou orientadas numa situação ameaçadora. Em humanos, os comportamentos relacionados com os estados de pânico podem atingir níveis patológicos que interferem com a adaptação funcional da pessoa ao ambiente (FREITAS e cols, 2009).

Os Comportamentos defensivos, que podem ser influenciados pelo ambiente e pela experiência (MONGEAU e cols, 2003), podem expressarem-se como uma forma de inibição comportamental: vigilância (GRAY, 1982; COIMBRA e BRANDÃO, 1993), congelamento (FANSELOW, 1980; Coimbra e Cols., 1989; ZHANG e cols., 1990), fuga (PANKSEPP, 1990; COIMBRA e BRANDÃO, 1993) ou imobilidade tônica (GRAEFF, 1993; MENESCAL-DE-OLIVEIRA e HOFFMANN, 1993), junto com uma série de posturas ameaçadoras e vocalizações seguidas por ataque (na impossibilidade de fuga), que se denomina defesa afetiva (HESS e BRUGER, 1943). Posturas apaziguadoras de submissão são frequentemente apresentadas no sentido de evitar um posterior comportamento ofensivo por parte de um oponente dominante (MICZEK, 1984). A expressão do comportamento de defesa acompanha-se de acentuadas alterações neurovegetativas e endócrinas largamente estudadas (MANCIA e ZANCHETTI, 1981; HILTON, 1982).

O circuito dos comportamentos defensivos inclui estruturas encefálicas como: amígdala, hipocampo, hipotálamo ventromedial e dorsomedial, núcleo pré-mamilar dorsal, colículo superior, colículo inferior e SCP entre outros (DIELENBERG e MCGREGOR, 2001; GOTO e cols, 2005, MALICK e cols, 2000; VIANNA e cols, 2003; JOHNSON e cols, 2010; MEZZASALMA e cols, 2004; BRANDÃO e cols, 2003; COLASANTI e cols 2010)



Diferentes modelos têm sido utilizados com o fim de estudar as estruturas encefálicas envolvidas com os comportamentos de defesa. A estimulação da SCP tem sido proposto como modelo de ataques de pânico. Essa estimulação pode se dar pela administração de aminoácidos excitatórios ou de bloqueadores de receptores GABA<sub>A</sub>, como, por exemplo, a bicuculina. A desinibição GABAérgica realizada com esse antagonista farmacológico tem sido muito usada já que tem sido descrito que o 72.6% dos neurônios da SCP são inibidas por GABA e o 60.9% dos neurônios que respondem ao GABA respondem também ao mencionado antagonista, que tem sido igualmente utilizado para desinibir as redes neurais hipotalâmicas (SHEKHAR, 1994; COIMBRA e BRANDÃO, 1997; BRANDÃO e cols, 2003; MONGEAU e cols, 2003; SCHENBERG e cols, 2008; FREITAS e col., 2009). Outro modelo de pânico usado tanto em animais quanto em humanos consiste na infusão intravenosa de lactato, a qual induz ataques de pânico tanto no Homem como nos animais de laboratório (SHEKHAR e col, 2006; SHEKHAR e cols, 1990; JOHNSON e cols, 2008). Modelos experimentais menos invasivos, como a utilização de ultrassom com conotação aversiva ou a exposição a câmaras de ar com alto conteúdo de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), os quais incrementam as respostas de ansiedade, também têm sido empregados (ARGYROPOULOS e cols, 2002; MONGEAU e cols, 2003; JOHNSON e col, 2010).

#### 1.4. Sistema Mediado pela Neurotransmissão Opioide

O sistema opioide é filogeneticamente antigo. Os genes dos receptores opioides apareceram nos primeiros estágios da evolução. Estudos funcionais realizados em anfíbios relacionam o sistema opioide com a antinocicepção. Os receptores opioides de vertebrados pertencentes aos estágios primitivos da evolução e mostraram menor seletividade aos neurotransmissores opioides comparado com aqueles encontrados em humanos e em outros mamíferos (DREBORG e cols., 2008; STEVENS, 2004).

No entanto, além de seu envolvimento no controle da nocicepção, os peptídeos opioides endógenos têm sido frequentemente associados, aos mecanismos respiratórios, à

função cardiovascular, à motilidade gastrointestinal, e à modulação das emoções (PASTERNAK, 1988; NICHOLS e col., 1989; EICHENBERGER e col., 2002; CASTELLAN-BALDAN e cols, 2006). Além disso, os opioides endógenos, junto com outros sistemas neuroquímicos, como aquele mediado pelo GABA, pela serotonina, pela histamina e por aminoácidos excitatórios estão envolvidos na regulação dos comportamentos relacionados com ansiedade e pânico induzidos pela estimulação do *tectum* (BRANDÃO e cols, 2003; COLASANTI e cols, 2010).

Os opioides endógenos foram descobertos na tentativa de se achar um composto endógeno que imitasse a ação da morfina que havia mostrado ser um analgésico potente. Posteriormente, foram identificados os receptores e os ligantes endógenos.

No concernente aos ligantes endógenos dos receptores opioides, eles têm sido descritos como uma família de mais de 20 peptídeos opioides agrupados em três classes: leu-enkefalinas (derivadas da pró-enkefalina), dinorfinas (derivadas da pró-dinorfina) e beta-endorfinas (derivadas da pró-opiomelancortina), localizadas em neurônios com características morfológicas diferentes. Por exemplo, os neurônios que contêm  $\beta$ -endorfina formam parte do sistema de projeções longas que pertencem ao sistema endócrino do hipotálamo medial (COOPER e cols, 2003) ou do teto mesencefálico (EICHENBERGER e col., 2002; OSAKI e col., 2003). As leu-enkefalinas e as beta-endorfinas têm uma maior afinidade pelos receptores  $\delta$  e  $\mu$ , e as dinorfinas aos receptores  $\kappa$  (LORD e cols., 1977; ZADINA e cols., 1997).

Quanto aos receptores opioides, estes podem ser divididos segundo três classificações: (a) Segundo as ações comparativas com a morfina, (b) conforme seus efeitos relativos à opioides sintéticos ou endógenos e, (c) segundo às ligações químicas com a guanosina-trifosfato. Apesar do pouco conhecimento sobre os mecanismos de transdução de receptores opioides de membrana, a caracterização em nível molecular já foi descrita, a qual inclui a inibição da adenil-ciclase, inibição da condutância do cálcio, aumento da condutância de potássio, entre outros (COOPER e cols, 2003).

Alem dos três receptores opioides, um quarto tipo foirecentemente descoberto, a ORL1 ou NOP1, o qual é estruturalmente muito parecido com os receptores opioides convencionais. Não obstante, seus ligantes endógenos *orphanin* e *nociceptin* não interagem diretamente com os receptores opioidérgicos clássicos (MOGIL e PASTERNAK, 2001).

Os receptores e os peptídeos opioides encontram-se distribuídos em todo o encéfalo (ELDE e HOKFELT, 1993 e KHACHATURIAN e cols., 1993). Os receptores  $\mu$  podem ser encontrados nas camadas III e IV do neocortex, no hipocampo, na maioria dos núcleos talâmicos, no hipotálamo, no complexo amigdalóide, no núcleo *accumbens*, no núcleo caudado e *putamen*, no colículo inferior e na coluna ventral da SCP (COLASANTI e cols 2010; PADEN e cols, 1987; PILAPIL e cols,1987; PECKYS e LANDWEHRMEYER, 1999; VEINANTE e cols., 1997). Com respeito aos receptores  $\delta$ , estes estão localizados no neocortex, no giro denteado, no núcleo *accumbens*, no núcleo caudado e no *putamen*, com maior densidade e, com menor densidade, no complexo amigdalóide, no hipocampo e no globo pálido. Finalmente, os receptores  $\kappa$  se encontram em altas concentrações nas camadas profundas do neocortex, no giro dentado, no núcleo paraventricular do tálamo, no complexo amigdalóide, no núcleo *accumbens*, no *globus pallidus*, hipotálamo e SCP (COLASANTI e cols 2010; PECKYS e LANDWEHRMEYER, 1999; PILAPIL e cols., 1987).

No que se refere à distribuição dos neurônios que sintetizam peptídeos opioides, ela é complexa e depende de cada um dos peptídeos. Assim, os neurônios que contêm peptídeos derivados da pró-opiomelanocortina são amplamente localizados no núcleo infundibular do hipotálamo, o qual se projeta através de estruturas diencefálicas, incluindo outros núcleos hipotalâmicos e talâmicos, aos núcleos da base, à amígdala e a outras estruturas límbicas. Projeções rostrais entram no telencéfalo, e projeções caudais se estendem aos núcleos mesencefálicos, pontinos e bulbares (KHACHATURIAN e cols., 1984). Os neurônios que sintetizam encefalinas estão distribuídos em vários níveis do neuroeixo, desde o telencéfalo até a medula espinal, incluindo o córtex órbito-frontal, piriforme, insular, cingulado e infralímbico; amígdala central e medial; estriado; *septum* lateral; núcleo do leito da estria terminal, área pré-óptica, hipotálamo ventral e paraventricular, complexo parabraquial, núcleo do trato solitário e bulbo ventrolateral (DROLET e cols., 2001). Neurônios positivos para leu-encefalinas têm sido encontrados nas camadas profundas do colículos superior, colunas dorsal e ventral da SCP e no colículo inferior (DE OCA e cols.,1998; SANTE e cols, 2000; BRANDÃO e VIANNA, 2003; EICHENBERGER e cols, 2002; OSAKI e cols., 2003). Os neurônios que contêm dinorfinas estão localizados no córtex cingulado, no núcleo

caudado, na amígdala, no hipotálamo, no tálamo, no núcleo parabraquial e no núcleo do trato solitário (COLASANTI e cols, 2010; KHACHATURIAN e cols., 1984).

Os efeitos desses peptídeos tendem, em geral, a serem depressores do sistema nervoso central. As encefalinas inibem os mesmos neurônios que são inibidos pelo neurotransmissor GABA (OGAWA e cols, 1994; PURVES e cols , 1997).

Estudos prévios com depósitos iontoforéticos de encefalinas e  $\beta$ -endorfina mostraram que neurônios no SNC podiam ser influenciados por esses peptídeos em receptores sensitivos à naloxona. Em geral, as respostas tendiam a ser depressivas, exceto no hipocampo, onde a ação observada era uma resposta excitatória. Em 1992, os três receptores opioides foram clonados, tendo sido observado que eles atuavam de maneira semelhante com os receptores acoplados à proteína G. Um estudo com naloxona mostrou, por exemplo, um efeito no qual a droga bloqueou a potenciação a longo prazo no hipocampo (COOPER e cols, 2003, FUKUDA e cols., 1993; NISHI e cols., 1993; YASUDA e cols.,1993).

Diferentes drogas têm sido usadas para avaliar as diferentes funções e o papel dos receptores opioides no sistema nervoso central e periférico. Por sua vez, estudos feitos empregando naloxona mostraram um bloqueio da potenciação a longo prazo no hipocampo. Também tem sido observado que antagonistas de receptores  $\mu$  bloqueiam a potenciação a longo prazo em neurônios da região CA3 do hipocampo (COOPER e cols, 2003). Por outro lado, a naltrexona, antagonista não seletivo de receptores opioides, atenuou os efeitos do contexto sobre o comportamento de ingestão de álcool e suprimiu a ativação neuronal do núcleo basolateral do complexo amigdalóide e do hipocampo (MARINELLI e cols, 2010, RAY e cols, 2010). Além disso, também foi mostrada uma redução dos efeitos reforçadores e de prazer do álcool (SOYKA e ROSNER, 2008). Também já foi descrito que a estimulação dos receptores  $\kappa$  produziram disforia e *psicotomimesis* em humanos relacionando os resultados com a ubiquação dos receptores, os quais estavam presentes em estruturas cerebrais relacionadas com o controle do humor e de funções cognitivas (TEJEDA e cols, 2010). Recentemente, foi mostrado que a retirada de morfina sensibiliza os substratos neurais do medo nas estruturas do teto mesencefálico, como a SCPd e o colículo inferior. A

microinjeção de nor-binaltorfimina na SCPd e no colículo inferior mostrou efeitos antiaversivos em animais que não tinham dependência à morfina (DE ROSS e cols 2009)

Assim também, muitas drogas, tanto agonistas quanto antagonistas de receptores opioides, têm mostrado ter um efeito na modulação das emoções. Diversos estudos mostram que os estados aversivos estão influenciados por esses mecanismos na SCPd (MOTTA e cols, 1995; COIMBRA e col., 1996). Também há evidência da modulação do medo mediada pelos opioides endógenos no núcleo central do colículo inferior (COIMBRA e cols, 2000; OSAKI e cols., 2003; CASTELLAN-BALDAN e cols, 2006).

## 2. OBJETIVO

### 2.1. Objetivo Geral

Estudar o papel das conexões entre os núcleos do hipotálamo medial e a substância cinzenta periaqueductal e do sistema opioide nos comportamentos defensivos elaborados pela desinibição GABAérgica no HM, através de uma abordagem neurofisiológica, com inativação da substância cinzenta periaqueductal dorsal (SCPd), e neurofarmacológica, com pré-tratamento da SCPd com antagonistas seletivos e não-seletivos de receptores opióides.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Estudar a anatomia conectiva entre SCPd e os núcleos ventro-medial e dorso-medial do hipotálamo, utilizando microinjeções concomitantes de biodextrana 3000, um droga neurotraçadora de captação e transporte anterógrado e retrógrado, conjugada com *Cascade blue* e microinjetada no hipotálamo medial, ou marcada com *Texas Red* e microinjetada na SCPd.
- Estudar o efeito da inativação da SCPd, por meio de microinjeções locais de cloreto de cobalto sobre as diversas respostas comportamentais de defesa causadas pelo bloqueio de receptores GABA-A no hipotálamo medial.
- Estudar o efeito da microinjeção de naltrexona (antagonista não-seletivo para receptores opioidérgicos), naloxonazine (antagonista seletivo para receptores  $\mu_1$ -opioides), nor-binaltorfimina (antagonista seletivo para receptores  $\kappa$ -opioides), e de salina fisiológica, randomicamente, na SCPd sobre os comportamentos de defesa eliciados pelo bloqueio de receptores GABA<sub>A</sub> no hipotálamo medial .

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 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 dois 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 (CETEA) da FMRP-USP, que estão em conformidade com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Ética em Pesquisa Animal (COBEA). Os protocolos experimentais foram previamente aprovados CETEA (processo 140/2007).

#### 3.2. Procedimento Cirúrgico

Os animais ( $n=8$ ) 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 estereotáxico (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 foi direcionada para HM, segundo coordenadas AP= -2,5mm, ML= 0,4mm, DV= 7,4mm, de acordo com o atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (2005).

Outra cânula-guia independente foi implantada no tronco encefálico e dirigida à substância cinzenta periaqueductal dorsal (SCPd) unilateralmente, segundo coordenadas

AP= -6,5mm, ML= 1,9mm, e DV= 4,2mm, tomando-se o bregma como referência, e estando as suturas lambdoide 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.

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

### 3.3. Estudo Neuroanatômico

#### 3.3.1 *Procedimentos Morfológicos*

Como neurotraçador bi-direcional, foi utilizada a biodextrana (BDA; peso molecular 3000, Molecula Probes) a 10%, marcada com *cascade blue* ou com *Texas red*, que foi dissolvida em tampão fosfato a 0,05 M, em pH 7,3, e preparada no dia do experimento. O neurotraçador marcado com *cascade blue* ou *Texas red* foi microinjetado no hipotálamo medial ou na SCPd, respectivamente, utilizando uma bomba de infusão de drogas (Stoelting ,modelo 250) no volume de 0,2 µl, durante 5 minutos.

Após dez dias da microinjeção do neurotraçador, 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 salina tamponada (STF–solução tampão fosfato a 0,1 M; pH=7,4), seguida de paraformaldeído tamponado a 4% (0,1 M; pH=7,4) para fixação do tecido Encefálico.

Os encéfalos foram removidos e mantidos sob refrigeração em paraformaldeído a 4%, por um período de 6 horas e foram, então, mantidos em soluções crioprotetoras (sacarose a 10% e a 20%) por 12 horas em cada solução. Os encéfalos foram, por fim, congelados a -80° C, em isopentano resfriado em gelo seco, e levados a um criostato, onde secções de 10 micra foram obtidas. Estas secções foram montadas entre lâmina e lamínula,



com óleo mineral e foram analisadas em um fotomicroscópio motorizado (Axiolmager Z1; Zeiss, Alemanha) para subsequente localização do local do sítio da injeção e para a identificação de células fluorescentes. Todos os procedimentos foram realizados ou sob luz incandescente ou em microscopia de luz de campo escuro.

### 3.4. Estudo Neurofisiológico

#### 3.4.1 Drogas

As drogas utilizadas no presente estudo foram clorato de cobalto (1mmol) e antagonista de receptores GABA<sub>A</sub>, Bicuculina (40ng/0,2µl).

#### 3.4.2. Procedimento Experimental

O presente estudo foi realizado, em grupos independentes de animais (N=8). Após um período pós-operatório de cinco dias, foi realizada a microinjeção cloreto de cobalto (1mmol/0,2µl) na SCPd e, 10 minutos após, uma microagulha foi introduzida na cânula-guia direcionada ao HM, por meio da qual 40ng/0,2µl de bicuculina foram microinjetados no HM. Como controle, foi feita a introdução da microagulha sem a administração das neurotoxinas (grupo falso-operado ou “Sham”) na SCP.

Imediatamente após esse procedimento, os animais foram colocados no campo aberto (Arena circular de 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura, com superfície dividida em 12 seções), e a frequência e duração dos seguintes comportamentos foram registrados através de uma câmera filmadora (Sony), por 15 minutos: Avaliação de risco (estiramento do corpo para frente, com as patas traseiras mantidas na mesma posição, ou movimentação

cautelosa para frente, com o ventre riste ao assoalho da arena); rotações (giros de 360 graus); saltos (elevação concomitante das quatro patas); fuga (corridas ao longo de toda a arena); alerta (atenção defensiva, na qual o animal interrompe o seu comportamento em curso, para fazer uma exploração do ambiente com farejo do ar circundante); e movimento defensivo retrógrado (movimentos rápidos de todo o corpo para trás). Também foram registrados os levantamentos (posição verticalizada, colocando-se as patas anteriores no ar ou na parede da arena); e cruzamentos (quatro patas dispostas em um dos compartimentos do assoalho da arena) como medida de comportamento não defensivo.

### *3.4.3. 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 40 µm de espessura. Os cortes foram montados em lâminas de vidro, gelatinizadas, secos ao ar e corados com hematoxilina. 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 (2005). Somente animais tiveram o ponto de microinjeção dentro das estruturas-alvos (HM - SCP) foram incluídos na análise estatística.

#### 3.4.4 *Análise Estatística*

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e analisados através teste *t* de Student para amostras não-pareadas com correção de Welch.

### 3.5. ESTUDO NEUROFARMACOLÓGICO

#### 3.5.1. *Drogas*

As drogas usadas no presente estudo foram: naltrexona (5 $\mu$ g/0,2 $\mu$ l), antagonista não-seletivo para receptores opioidérgicos (Sigma); naloxonazina (5 $\mu$ g/0,2 $\mu$ l), antagonista seletivo para receptores  $\mu_1$ -opioides (Sigma); nor-binaltorfimina (5 $\mu$ g/0,2 $\mu$ l), antagonista seletivo para receptores  $\kappa$ -opioides (Sigma), salina (NaCl a 0,9%; 0,2 $\mu$ l) e bicuculina (40ng/0,2 $\mu$ l) antagonista de receptores GABA<sub>A</sub>. Os bloqueadores farmacológicos foram dissolvidos em salina fisiológica imediatamente antes do uso.

#### 3.5.2. *Procedimento Experimental*

O presente estudo foi realizado em grupos independentes de animais (N=8). Após um período pós-operatório de cinco dias, o bloqueio de receptores GABAérgicos do HM com bicuculina (40ng/0,2 $\mu$ l) foi feito após o pré-tratamento da SCPd com um dos bloqueadores farmacológicos ou seu veículo. Microinjeções intra-hipotalâmicas de bicuculina Foram realizadas 10 minutos após a microinjeção de naltrexona, 2h após nor-binaltorfimina e 24h

após naloxonazine na SCPd. Como controle, foi microinjetada salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) na SCPd.

Imediatamente após a microinjeção de bicuculina no HM, os animais foram colocados no teste do campo aberto e as mesmas respostas comportamentais descritas acima foram registradas durante 15 min.

### 3.5.3 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 40 µm de espessura. Os cortes foram montados em lâminas de vidro, gelatinizadas, secos ao ar e corados com hematoxilina. 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 estereotático de Paxinos e Watson (2005). Somente animais, cujo ponto de microinjeção dentro das estruturas alvo (HM e SCP), foram incluídos na análise estatística.

### 3.5.4. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e analisados através da análise de variância (ANOVA), seguida, quando apropriado, pelo teste *post hoc* de

Dunnett. O procedimento (microinjeção de antagonistas farmacológicos na SCPd) foi considerado como fator independente.

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

Os comportamentos de fuga orientada foram filmados de minuto a minuto por 15 min por meio de uma filmadora (*Sony*) e foram analisados por meio de do *software X-plorat*.

Os animais foram perfundidos, utilizando-se para isso, uma bomba de perfusão (Master Flex<sup>®</sup> L/S<sup>™</sup>).

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

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Resultados do Estudo Neuroanatômico

Os resultados obtidos com a microinjeção do neurotraçador bi-direcional biodextrana marcado com *cascade blue* ou com *Texas red*, microinjetado no HM e na SCPd, respectivamente, evidenciou conexões intrínsecas em cada estrutura abordada, assim como possíveis conexões entre o hipotálamo medial e a SCPd.

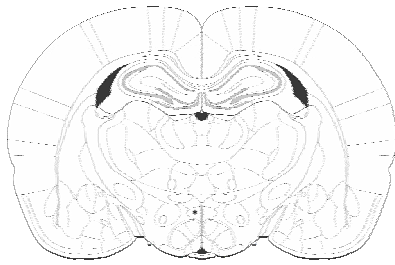
Em relação ao traçador marcado com *cascade blue*, este foi microinjetado na subdivisão dorsomedial do hipotálamo medial, como se pode observar na Figura 2, mostrando neurônios positivos tanto na porção dorsomedial quanto na ventromedial do hipotálamo medial. Por sua vez, a figura 3A e 3B mostram captação do traçador por corpos neuroniais e por fibras nervosas na subdivisão ventromedial do HM ipsilateralmente localizadas em relação ao sítio de microinjeção do neurotraçador no hipotálamo dorsomedial. Em adição, a figura 3C evidencia a presença ipsilateral do traçador em terminações nervosas e em varicosidades da SCPdl, mostrando que o transporte do neurotraçador foi desde o sítio da microinjeção no diencéfalo (HDM) até o mesencéfalo (SCPdl), o que sugere uma conexão entre tais estruturas.

Quanto à administração do traçador marcado com *Texas red*, a figura 4 ilustra o centro da microinjeção na coluna dorsolateral da SCP. Já na figura 5A observa-se fluorescência para corpos celulares e aglomerados de fibras no mesmo animal que podem se referir tanto a conexões intrínsecas entre as diferentes colunas da SCP quanto a eferências da SCPdl a outras estruturas encefálicas. Com efeito, a figura 5B exhibe fibras e células sugestivas de neurônios marcadas no HVM, mostrando o transporte do neurotraçador *Texas red*, microinjetado na SCPdl, até o diencéfalo (HVM), e sugerindo uma possível conexão recíproca entre tais estruturas.

Esses últimos achados foram confrontados na figura 6, que mostra uma comparação entre duas fotomicrografias do mesmo núcleo hipotalâmico (HVM), realizadas na mesma

área, e no mesmo animal, empregando-se os filtros correspondentes para cada um dos neurotraçadores utilizados no presente estudo, evidenciando que os dois neurotraçadores foram captados pelos mesmos neurônios no HVM. Isso sugere a possibilidade de que os mesmos neurônios do HVM que se conectam ipsilateralmente com o núcleo hipotalâmico dorsomedial enviam eferências também ipsilaterais para as colunas dorsais da SCP

**A.**



**B.**

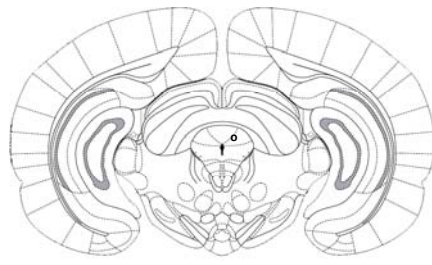


Fig 1. Representações esquemáticas dos sítios de microinjeção dos neurotraçadores. A: cacade blue no HVM. B: Texas Red na SCP dorsolateral, dispostos em anagramas de secções coronais do encéfalo do rato, segundo o atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (2005).



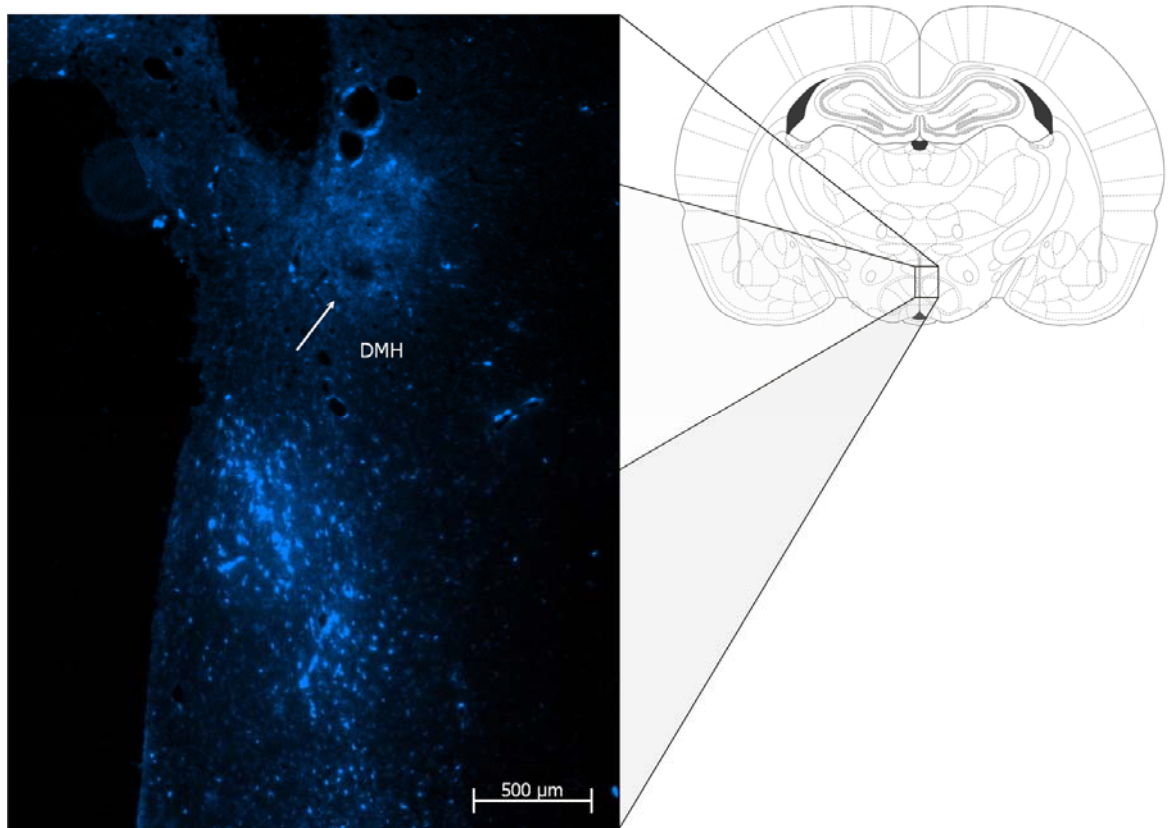


Fig 2. Fotomicrografia de secção coronal do diencéfalo, mostrando o sitio de microinjeção do neurotraçador biodextrana conjugado com cascade blue no hipotálamo dorsomedial (HDM).

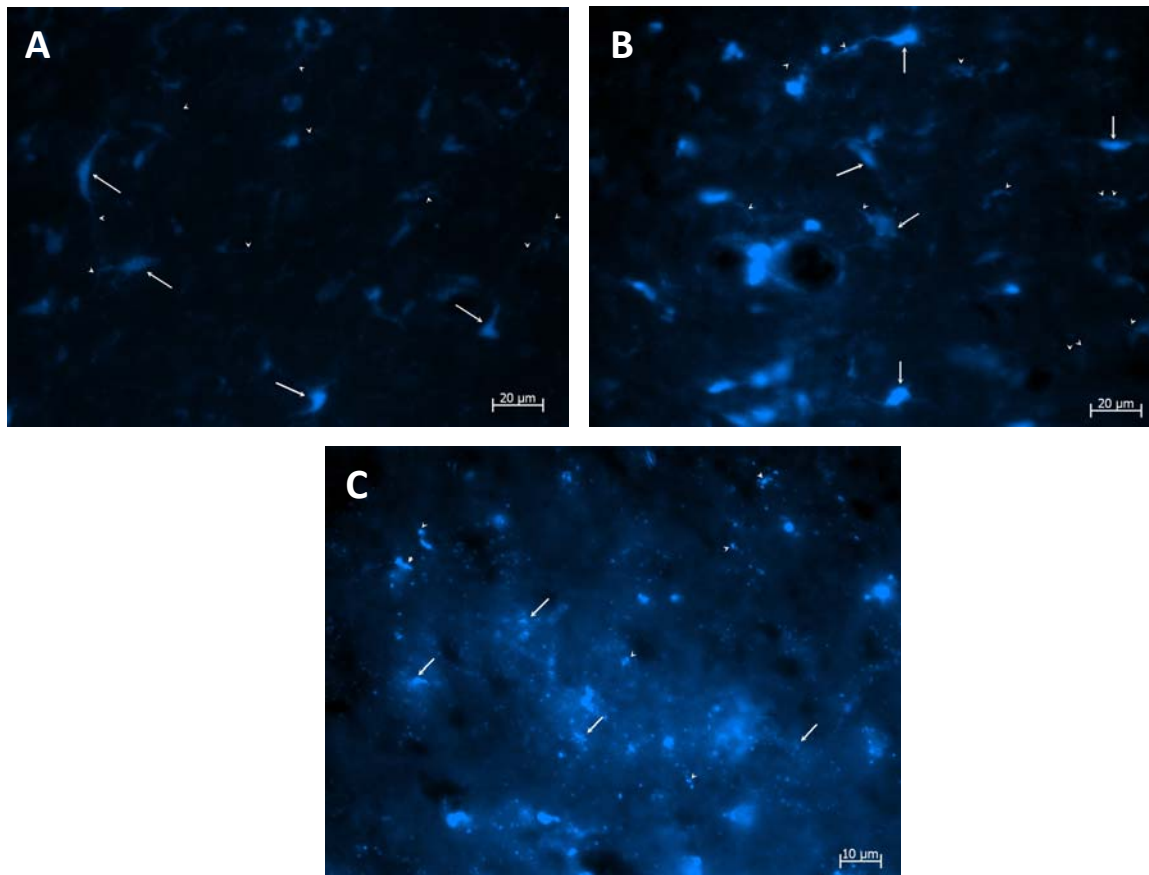


Fig 3. A e B: Fotomicrografias de secções transversais do diencéfalo de rato Wistar, em nível a subdivisão ventromedial do hipotálamo medial (HVM), mostrando as conexões intrínsecas entre o HVM e o núcleo dorsomedial do hipotálamo (HDM). As setas apontam a células sugestivas de neurônios, e as pontas de setas apontam fibras neurônicas positivas para a biodextrana conjugada ao cascade blue microinjetada no HDM. C: Fotomicrografia de uma secção transversal do mesencéfalo cranial, passando pela coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal, mostrando (pontas de setas) axônios positivos para a biodextrana conjugada ao cascade blue reunidos em fascículos positivos para o neurtraçador, seccionados transversalmente.

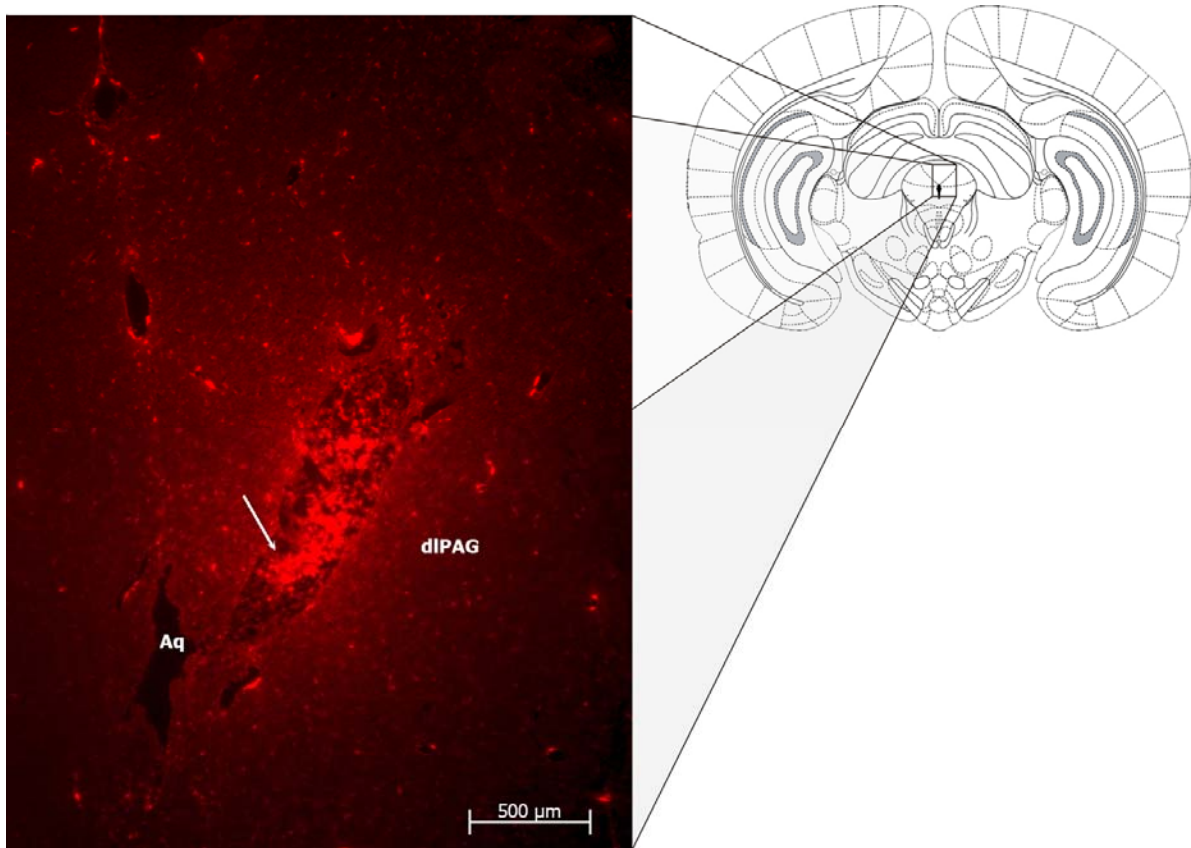


Fig 4. Fotomicrografia de secção transversal do teto mesencefálico, passando pela substância cinzenta periaquedutal dorsal, mostrando o sítio (seta) de microinjeção do neurotraçador biodextrana conjugada com Texas red na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral. Ag: Aqueduto de Sylvius. dIPAG: substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (sigla em inglês).

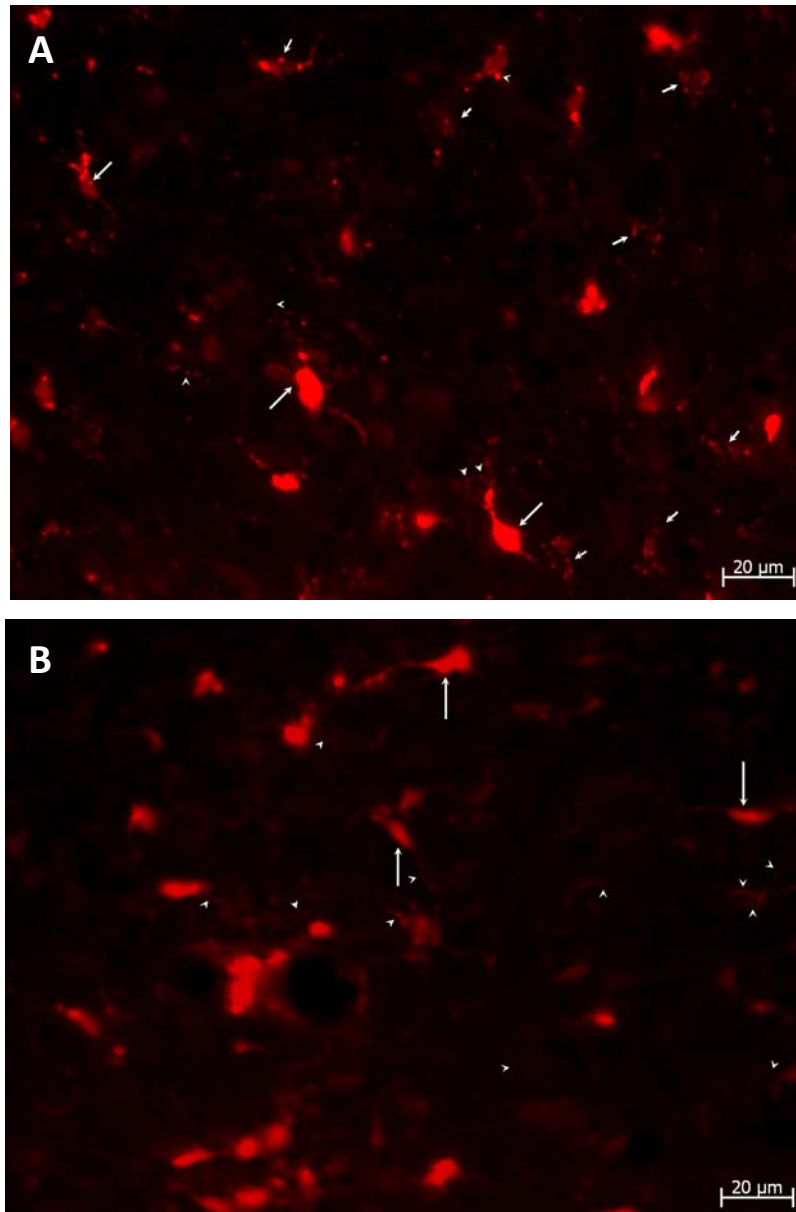


Fig 5. A: Fotomicrografia de secção coronal do teto mesencefálico em nível da coluna dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd), onde se observam neurônios (setas) e fibras (pontas de setas) positivas para a biodextrana conjugada ao Texas red e que se conectam intrisecamente ao longo do eixo rostro-caudal dentro da própria substância cinzeta periaquedutal (SCP), e que também podem se projetar para o hipotálamo medial. B: Fotomicrografia de um corte transversal do hipotálamo medial de rato Wistar, passando pela subdivisão ventromedial do hipotálamo medial, onde se observam fibras (pontas de setas) que provêm da SCPd, além de células sugestivas de neurônios (setas) marcadas com o neurotraçador bidirecional, conjugado a Texas red e que fora microinjetado na SCPd.

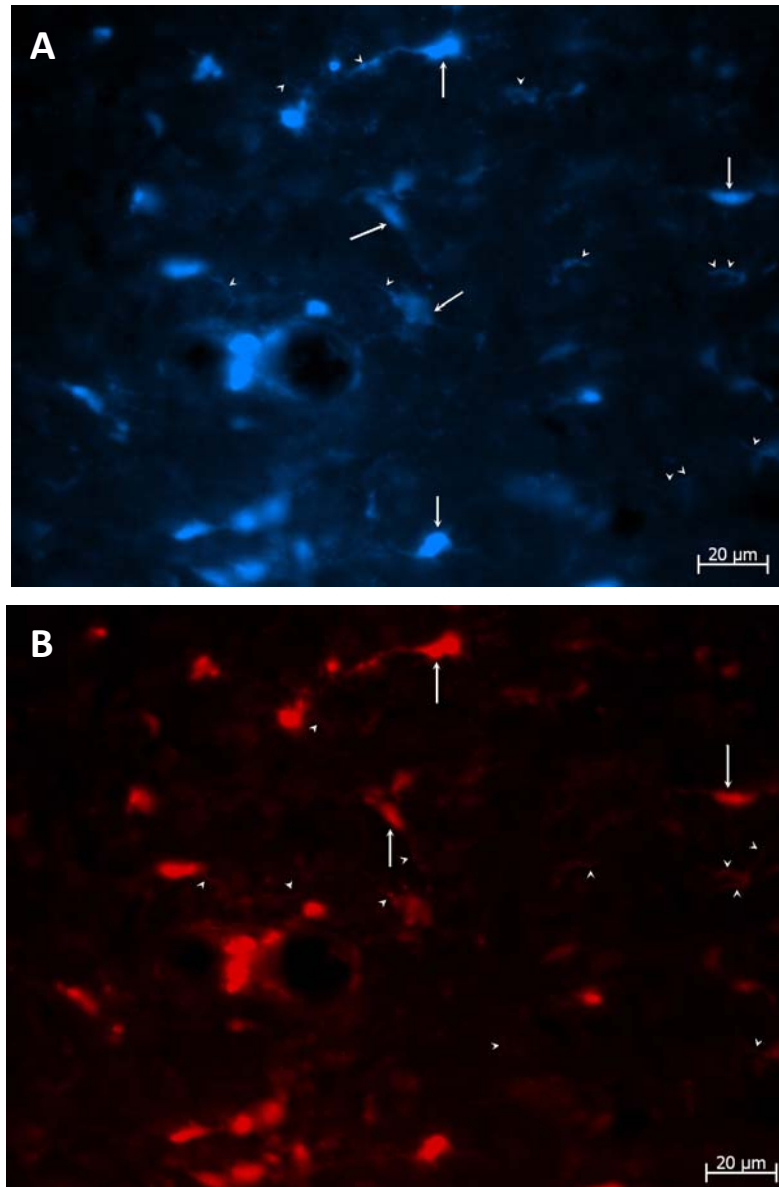


Fig 6. Comparação de duas fotomicrografias (A e B) de uma secção coronal do diencefalo em nível a subdivisão ventromedial do hipotálamo medial de um rato Wistar, tomadas na mesma área hipotalâmica do mesmo animal, onde se observa uma marcação positiva dos mesmos neurônios tanto para o traçador biodextrana, conjugado com *cascade blue* e microinjetado no núcleo dorsomedial do hipotálamo, e com biodextrana conjugada a Texas red e microinjetada na coluna dorso-medial da substância cinzenta periaquedutal. As setas apontam células sugestivas de neurônios, e as pontas de setas apontam fibras axônicas ou dendríticas.

## 4.2 Resultados do Estudo Neurofisiológico

A microinjeção de cloreto de cobalto na SCPd, seguida pela administração de bicuculina no hipotálamo medial causou uma diminuição estatisticamente significativa na frequência e duração do comportamento de saltos (Fig 11 A-B) (teste *t* de Student para mostras não-pareadas; *t*= variando de 2.616 a 2.658;  $P < 0.05$ ), de fuga (Fig 12 A-B) (teste *t* de Student para mostras não-pareadas; *t*= variando de 3.761 a 3.349;  $P < 0.01$ ), na frequência de alerta (Fig 8A) (teste *t* de Student para mostras não-pareadas;  $t = 3.336$ ;  $P < 0.01$ ) e de cruzamentos na periferia da arena (Fig 14A) (teste *t* de Student para mostras não-pareadas;  $t = 7.427$ ;  $P < 0.001$ ).

Contudo, o pré-tratamento da SCPd com cloreto de cobalto, seguido pelo bloqueio de receptores GABA-A no HM, mostrou somente uma tendência não estatisticamente significativa de redução tanto na frequência como na duração dos comportamentos de avaliação de risco (Fig 7 A-B), de movimento defensivo retrógrado (Fig 9 A-B), de rotações (Fig 4 A-B), na frequência de levantamentos, mas não em sua duração (Fig 13 A-B) (teste *t* de Student para mostras não-pareadas ; *t*= variando de 0.5170 a 1.96;  $P > 0.05$ , em todos os casos), não tendo havido também alterações estatisticamente significantes frequência de cruzamentos no centro da arena (Fig 14B) (teste *t* de Student para mostras não-pareadas;  $t = 1.457$ ;  $P > 0.05$ ) e na duração do comportamento de alerta defensivo (Fig 8B) (teste *t* de Student para mostras não-pareadas;  $t = 0.9708$ ;  $P > 0.05$ ).

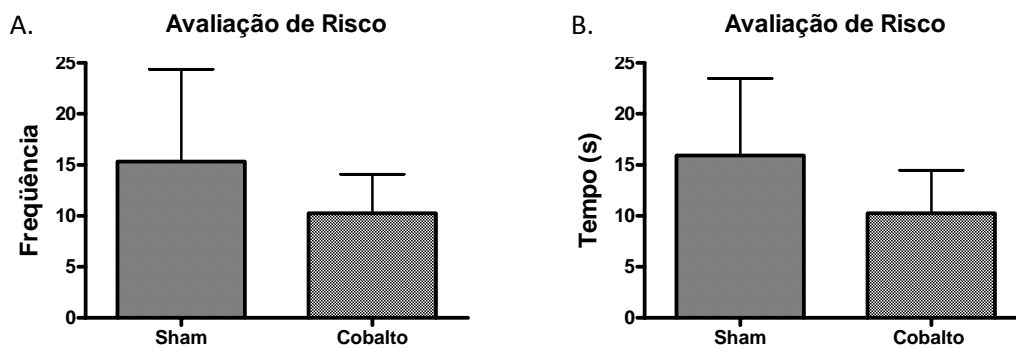


Fig 7. Efeitos da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2 $\mu$ l) no hipotálamo medial 10 minutos após a lesão *sham* ou a microinjeção de cloreto de cobalto (1 nmol) na substância cinzenta periaqueductal dorsal (n=8) sobre a (A) frequência e (B) duração de avaliação de risco. As colunas representam médias e as barras o erro padrão das médias. N=8;  $p > 0,05$  em ambos os casos, comparado com o grupo controle, segundo o teste *t* de Student para amostras não-pareadas, com correção de Welch.

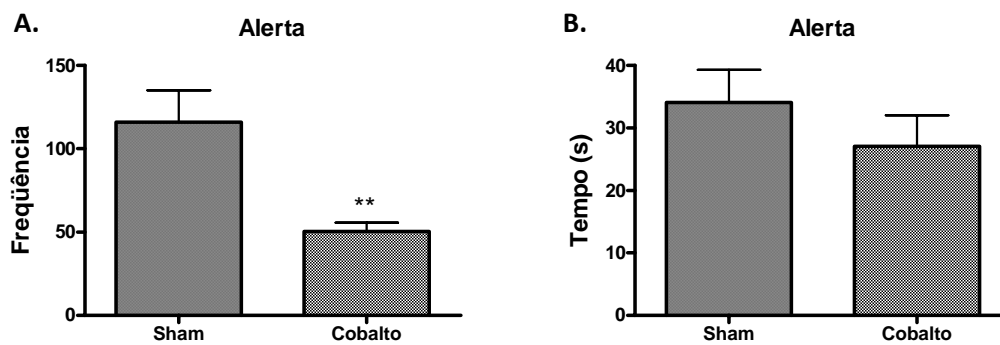


Fig 8. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial 10 minutos após a lesão *sham* ou a micoinjeção de cloreto de cobalto (1 nmol) na substância cinzenta periaqueductal dorsal (n=8) sobre a (A) frequência e (B) duração do comportamento de alerta defensivo. As colunas representam médias e as barras o erro padrão das médias. N=8; \*\*P<0.01, quando comparado com o grupo controle, segundo o teste *t* de Student para amostras não-pareadas com correção de Welch.



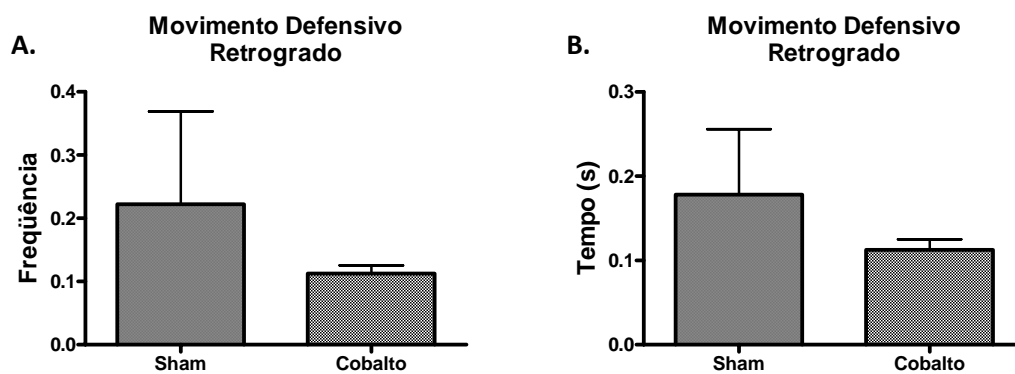


Fig 9. Efeitos da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial 10 minutos após a lesão *sham* ou a microinjeção de cloreto de cobalto (1 nmol) na Substância cinzenta periaquedutal dorsal (n=8) sobre a (A) frequência e (B) duração do movimento defensivo retrógrado. As colunas representam médias e as barras o erro padrão das médias. N=8; \*P>0,05 em ambos os casos, quando comparado com o grupo controle, segundo o teste *t* de Student para amostras não-pareadas com correção de Welch.

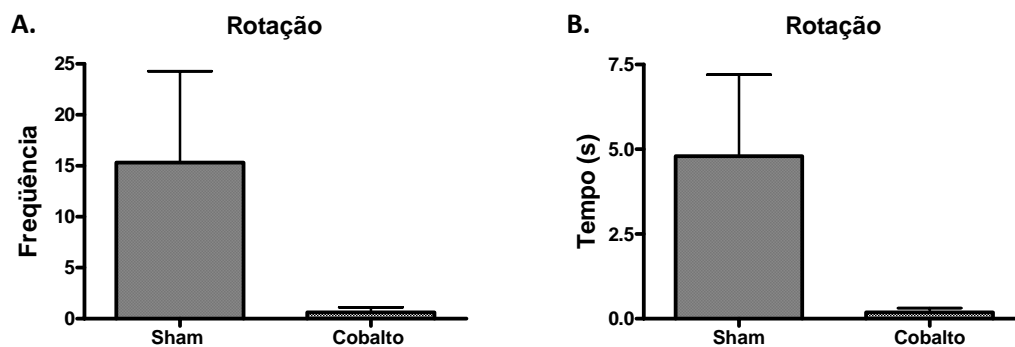


Fig 10. Efeitos da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2 $\mu$ l) no hipotálamo medial 10 minutos após a lesão *sham* ou a microinjeção de cloreto de cobalto (1 nmol) na substância cinzenta periaquedutal dorsal (n=8) sobre a (A) frequência e (B) duração do comportamento de rotações. As colunas representam médias e as barras o erro padrão das médias. N=8; P>0,05 em ambos os casos, quando comparado com o grupo controle, segundo o teste *t* de Student para amostras não-pareadas com correção de Welch.

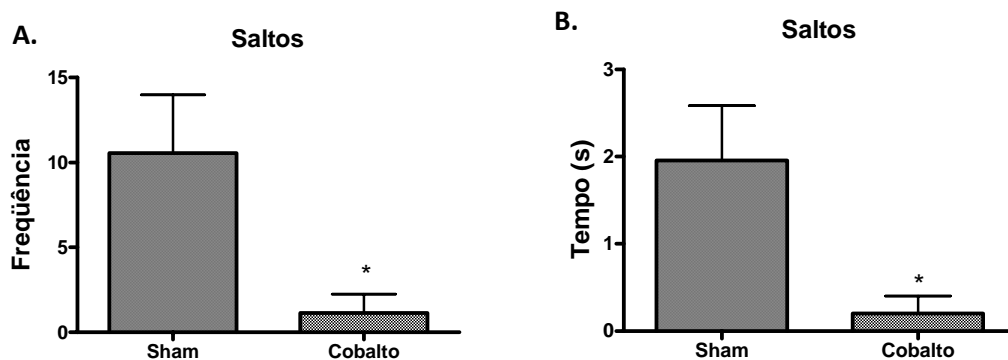


Fig 11. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial 10 minutos após a lesão *sham* ou a microinjeção de cloreto de cobalto (1 nmol) na substância cinzenta periaqueductal dorsal (n=8) sobre a (A) frequência e (B) duração de saltos. As colunas representam médias e as barras o erro padrão das médias. N=8; \*p<0.05, quando comparado com o grupo controle, segundo o teste t de Student para amostras não-pareadas com correção de Welch.

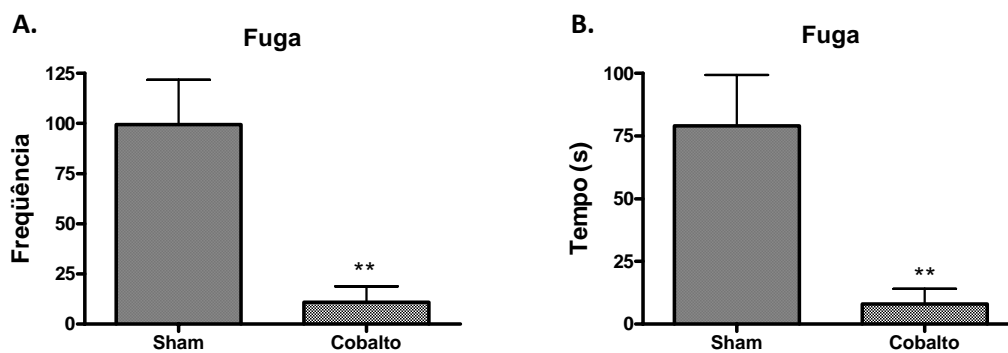


Fig 12. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial 10 minutos após a lesão *sham* ou a microinjeção de cloreto de cobalto (1 nmol) na substância cinzenta periaqueductal dorsal (n=8) sobre a (A) frequência e (B) duração do comportamento de Fuga. As colunas representam médias e as barras o erro padrão das médias. N=8; \*\*P<0.01, quando comparado com o grupo controle, segundo o teste *t* de Student para amostras não-pareadas com correção de Welch.

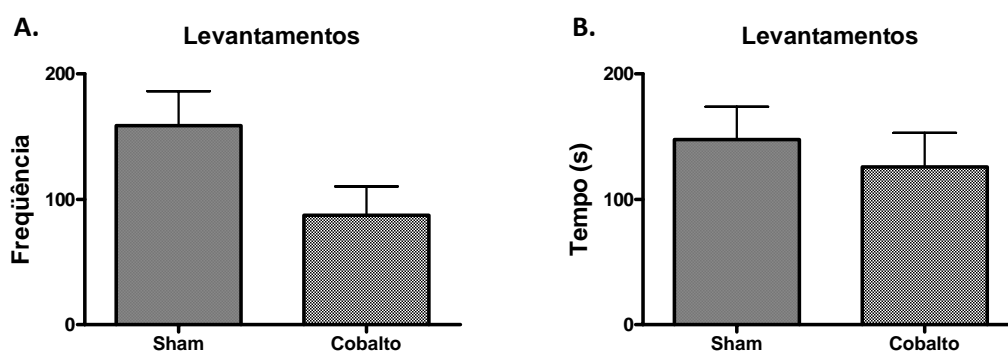


Fig 13. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial 10 minutos após a lesão *sham* ou a microinjeção de cloreto de cobalto (1 nmol) na substância cinzenta periaquedutal dorsal (n=8) sobre a (A) frequência e (B) duração do comportamento de levantamentos. As colunas representam médias e as barras o erro padrão das médias. N=8; P>0,05, em ambos os casos, quando comparado com o grupo controle, segundo o teste *t* de Student para amostras não-pareadas com correção de Welch.

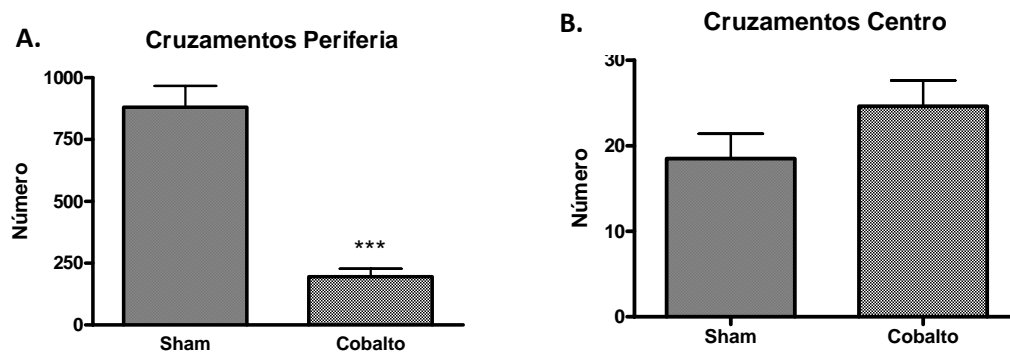
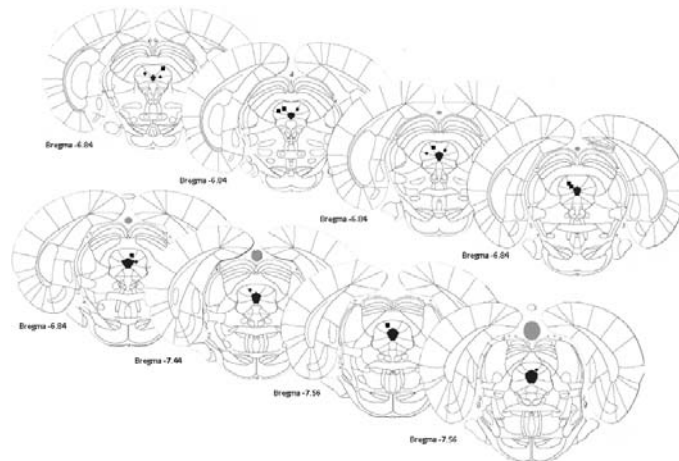
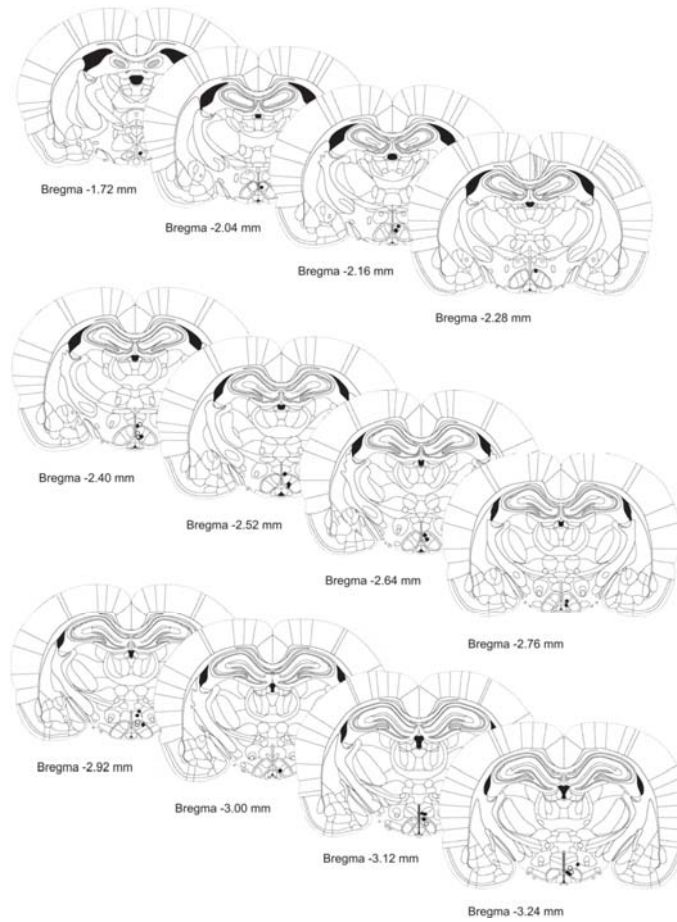


Fig 14. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial 10 minutos após a lesão *sham* ou a microinjeção de cloreto de cobalto (1 nmol) na substância cinzenta periaquedutal dorsal (n=8) sobre cruzamentos feitos na (A) periferia e (B) centro da arena. As colunas representam médias e as barras o erro padrão das médias. N=8; \*\*\*P<0.001, quando comparado com o grupo controle, segundo o teste *t* de Student para amostras não-pareadas com correção de Welch.

A.



B.



● Sham    ■ Cobalto

Fig 15. Representação esquemática dos sítios de microinjeção de cloreto de cobalto (quadrado preto) e do procedimento *Sham* (circulo preto) na substância cinzenta periaquedutal dorsal, em A, e pontos de microinjeção de bicuculina (40ng/0,2μL) no hipotálamo medial, em B, dispostos em anagramas de secções coronais do encéfalo do rato, segundo o atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (2005).

#### 4.3. Resultados do estudo neurofarmacológico

Os resultados apresentados nesta seção correspondem ao estudo neurofarmacológico. Foi comparado o grupo controle (microinjeção de salina fisiológica, NaCl a 0,9%; 0,2µL) com os grupos tratados com antagonista não-seletivo de receptores opioidérgicos, a naltrexona (5µg/0,2µL), com antagonista seletivo de receptores κ-opioides, a nor-binaltorfimina (5µg/0,2µL) ou com antagonista seletivo para receptores µ<sub>1</sub>-opioides, a naloxonazina (5µg/0,2µL) na SCPd, seguido pela microinjeção de bicuculina (40ng/0,2µL) no hipotálamo medial, 10 minutos, 2 horas ou 24 horas, após o pré-tratamento da SCPd com os antagonistas não-seletivo e seletivos de receptores opioides, respectivamente.

Os comportamentos dos sujeitos experimentais registrados foram caracterizados pela presença de comportamento de avaliação de risco, alerta defensivo, movimento defensivo retrógrado, rotações, saltos, fuga, levantamentos e atividade motora (cruzamentos).

O bloqueio inespecífico de receptores opioidérgicos, com naltrexona, na SCPd, seguido do bloqueio de receptores GABA<sub>A</sub> no HM, foi seguido por uma ausência de alterações estatisticamente significantes na frequência e tempo de alerta (Fig 17 A-B) ( $F_{3,31}= 1,647$  e  $1,233$ , respectivamente,  $P>0.05$ , em ambos os casos), e no tempo de: avaliação risco (Fig 16B), movimento defensivo retrógrado (Fig 18B), rotação (Fig 19B) ( $F_{3,31}=$  variando de 1,72 até 5,045,  $P>0.05$ , em todos os casos) e cruzamentos no realizados no centro da arena (Fig 23B) ( $F_{3,31}= 6.224$ ,  $P>0.05$ ). Contudo, foi observado um aumento significativo na frequência de avaliação de risco (Fig 16A) ( $F_{3,31}= 9,412$ ;  $p<0.05$ ) e uma diminuição significativa na frequência de movimento defensivo retrógrado (Fig 18A) ( $F_{3,31}= 3,562$ ;  $p<0.05$ ), na frequência de rotação (Fig 19A) ( $F_{3,31}= 15,25$   $p<0.01$ ), na frequência e tempo de saltos (Fig 20 A-B) ( $F_{3,31}= 3,892$  e  $3,756$ , respectivamente,  $p<0.05$  em ambos os casos), na frequência e tempo de fuga (Fig 21 A-B) ( $F_{3,31}= 14,95$  e  $19,78$ , respectivamente;  $p<0.01$ , em ambos os casos), na frequência e tempo de levantamentos (Fig 22 A-B) ( $F_{3,31}= 12,47$  e  $6,974$ , respectivamente;  $p<0.01$ , em ambos os casos) e no número de cruzamentos realizados na periferia da arena (Fig 23A) ( $F_{3,31}=18.41$ ;  $p<0.01$ ).



Em relação a os efeitos do antagonista seletivo para receptores  $\kappa$ -opioides, norbinaltorfimina, na SCPd, nas diversas respostas comportamentais organizados pelo hipotálamo medial, após o bloqueio local de receptores GABAérgicos do tipo A, encontrou-se uma ausência de diferenças estatisticamente significantes na frequência e duração do comportamento de avaliação de risco (Fig 16 A-B), de alerta defensivo (Fig 17 A-B) ( $F_{3,31}$ = vaiando de 1,233 até 9,412,  $P>0.05$ , em todos os casos) e no tempo de movimento defensivo retrógrado (Fig 18B), e de rotação (Fig 19B) ( $F_{3,31}$ = 2,057 e 1,72, respectivamente,  $P>0.05$  em ambos os casos). Não obstante, foi observado uma diminuição estatisticamente significativa na frequência de movimento defensivo retrógrado (Fig 18A) ( $F_{3,31}$ = 3,562  $p<0.05$ ), na frequência de rotação (Fig 19A) ( $F_{3,31}$ = 15,25  $p<0.01$ ), na frequência e tempo de saltos (Fig 20 A-B) ( $F_{3,31}$ = 3,892 e 3,756, respectivamente;  $p<0.05$  em ambos os casos), na frequência e tempo de fuga (Fig 21 A-B) ( $F_{3,31}$ = 14,95 e 19,78, respectivamente,  $p<0.01$  em ambos os casos), na frequência e tempo de levantamentos (Fig 22 A-B) ( $F_{3,31}$ = 12,47 e 6,974, respectivamente;  $p<0.01$  em ambos os casos) e no número de cruzamentos no periferia e no centro (Fig 23 a-b) ( $F_{3,31}$ = 18,41 e 6,224, respectivamente,  $p<0.01$ ).

No que se refere aos efeitos do antagonista seletivo para receptores  $\mu_1$ -opioides, naloxonazine, microinjectado na SCPd sobre as diversas respostas comportamentais causadas pelo bloqueio de receptores GABA<sub>A</sub> no hipotálamo medila, houve uma ausência de diferenças estatisticamente significantes na frequência e tempo de alerta (Fig 17 A-B) ( $F_{3,31}$ = 1,647 e 1,233, respectivamente;  $P>0.05$  em ambos os casos) e no tempo de movimento defensivo retrógrado (Fig 18B), e de rotação (Fig 19B) ( $F_{3,31}$ = 2,057 e 1,72, respectivamente;  $P>0.05$  em ambos os casos). No entanto, foi observado um aumento estatisticamente significativo na frequência e no tempo de avaliação de risco (Fig 16 A-B) ( $F_{3,31}$ = 9,412 e 5,045, respectivamente;  $p<0.01$  em ambos os casos) e uma diminuição significativa na frequência de movimento defensivo retrógrado (Fig 18A) ( $F_{3,31}$ = 3,562;  $p<0.05$ ), na frequência de rotação (Fig 19A) ( $F_{3,31}$ = 15,25;  $p<0.01$ ), na frequência e no tempo de saltos (Fig 20 A-B) ( $F_{3,31}$ = 3,892 e 3,756, respectivamente;  $p<0.05$  em ambos os casos), na frequência e tempo de fuga (Fig 21 A-B) ( $F_{3,31}$ = 14,95 e 19,78, respectivamente;  $p<0.01$  em ambos os casos), na frequência e tempo de levantamentos (Fig 22 A-B) ( $F_{3,31}$ = 12,47 e 6,974, respectivamente;

p<0.01 em ambos os casos) e no número de cruzamentos realizados no periferia e no centro da arena (Fig 23 A-B) ( $F_{3,31}= 18,41$  e  $6,224$ , respectivamente; p<0.01, em ambos os casos).

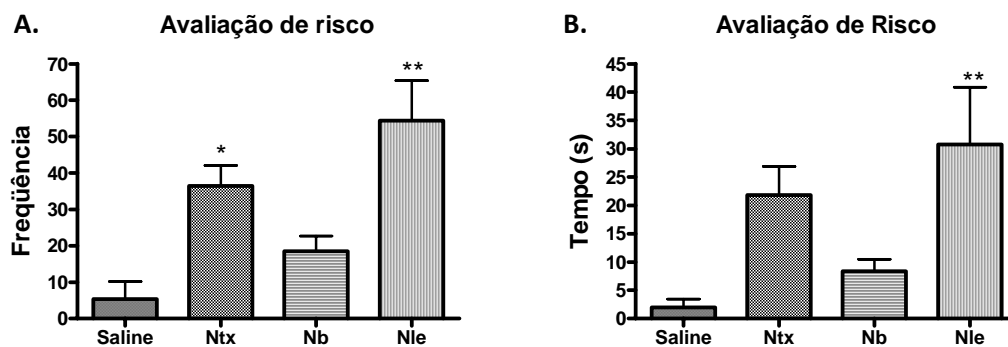


Fig 16. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial, 10 minutos após a microinjeção de naltrexona (Ntx)(5µg/0,2µL), 2 horas após administração de Norbinaltorfimina (NB) (5µg/0,2µL, e 24 horas após a microinjeção de Naloxonazine (Nle) (5µg/0,2µL) ou de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) na substância cinzenta periaquedutal dorsal sobre a (A) frequência e (B) duração do comportamento de avaliação de risco. As colunas representam médias e as barras o erro padrão da média. N=8 por grupo; \*p<0.05 , \*\*P<0.01, quando comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida, pelo teste *post hoc* de Dunnett.

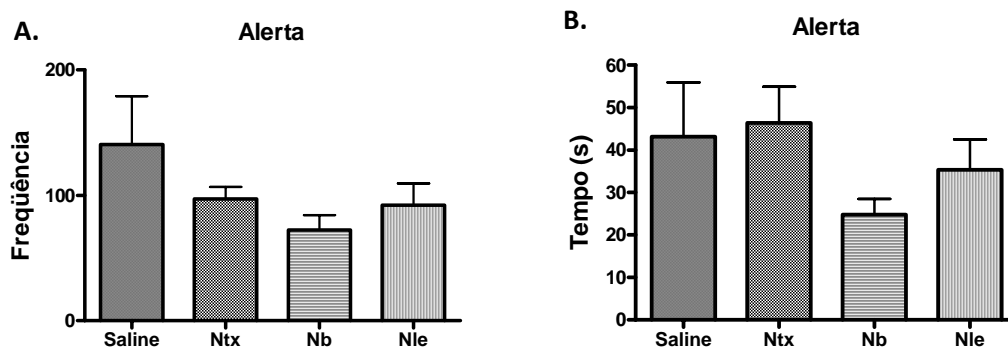


Fig 17. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial, 10 minutos após a microinjeção de naltrexona (Ntx)(5µg/0,2µL), 2 horas após administração de Norbinaltorfimina (NB) (5µg/0,2µL), 24 horas após a microinjeção de Naloxonazine (Nle) (5µg/0,2µL) ou de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) na substância cinzenta periaquedutal dorsal sobre a (A) frequência e (B) tempo do comportamento de alerta defensivo. As colunas representam médias e as barras o erro padrão da média. N=8 por grupo;  $p>0,05$  em todos os casos, quando comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett.

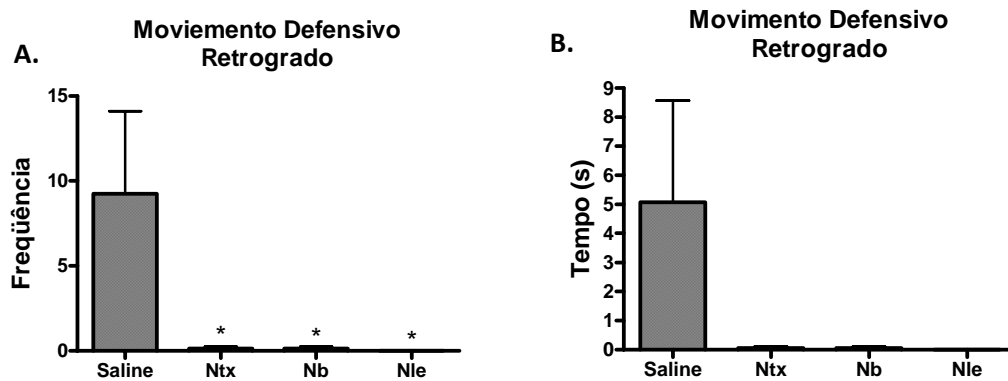


Fig 18. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial, 10 minutos após a microinjeção de naltrexona (Ntx)(5µg/0,2µL), 2 horas após administração de Norbinaltorfimina (NB) (5µg/0,2µL), 24 horas após a microinjeção de Naloxonazine (Nle) (5µg/0,2µL) ou de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) na substância cinzenta periaquedutal dorsal sobre a (A) frequência e (B) duração do movimento defensivo retrógrado. As colunas representam médias e as barras o erro padrão da média. N=8 por grupo; \*p<0,05, quando comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett.

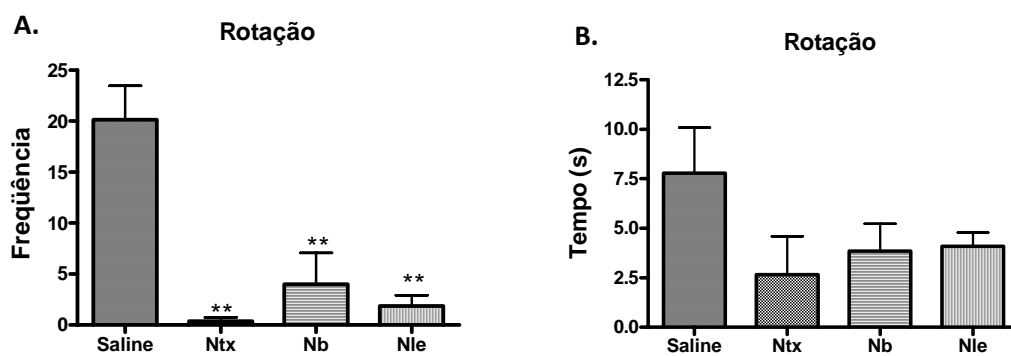


Fig 19. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial, 10 minutos após a microinjeção de naltrexona (Ntx)(5µg/0,2µL), 2 horas após administração de Norbinaltorfimina (NB) (5µg/0,2µL), 24 horas após a microinjeção de Naloxonazine (Nle) (5µg/0,2µL) ou de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) na substância cinzenta periaquedutal dorsal sobre a (A) frequência e (B) duração do comportamento de rotação. As colunas representam médias e as barras o erro padrão da média. N=8 por grupo; \*\*p<0,01, quando comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett.

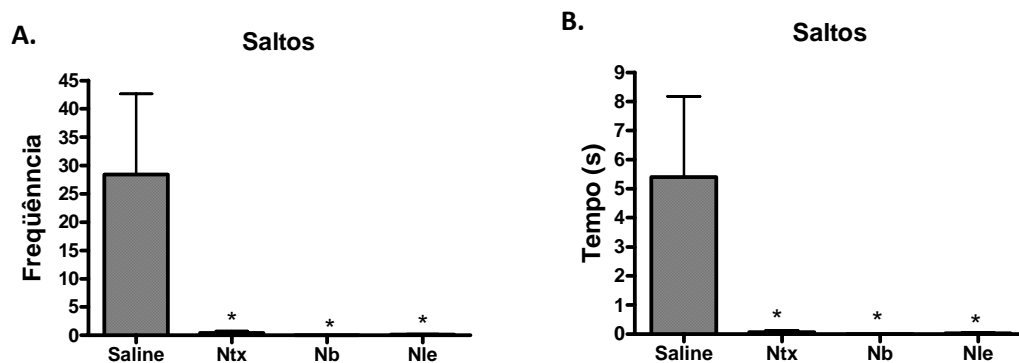
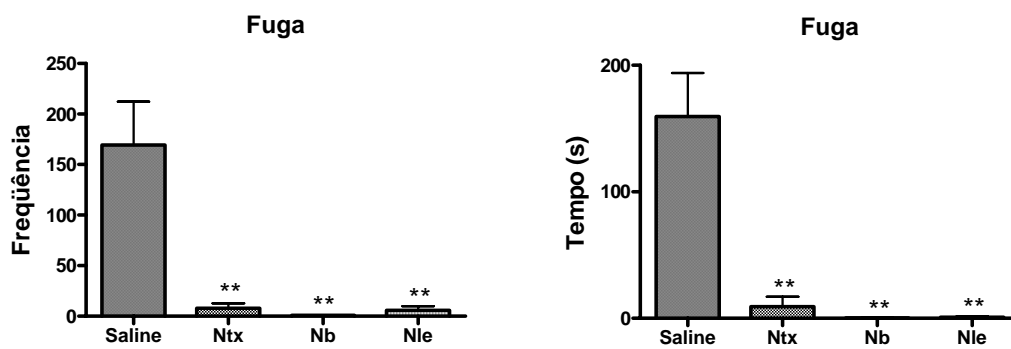


Fig 20. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial, 10 minutos após a microinjeção de naltrexona (Ntx)(5µg/0,2µL), 2 horas após administração de Norbinaltorfimina (NB) (5µg/0,2µL), 24 horas após a microinjeção de Naloxonazine (Nle) (5µg/0,2µL) ou de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) na substância cinzenta periaquedutal dorsal sobre a (A) frequência e (B) duração de saltos. As colunas representam médias e as barras o erro padrão da média. N=8 por grupo; \*p<0,05, quando comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett.



**A.** efeito da microinjeção de bicucul (0,2µl) no hipotálamo medial, 10 minutos após a microinjeção de naltrexona (Ntx)(5µg/0,2µL), 2 horas após administração de Norbinaltorfimina (NB) (5µg/0,2µL), 24 horas após a microinjeção de Naloxonazine (Nle) (5µg/0,2µL) ou de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) na substância cinzenta periaquedutal dorsal sobre a (A) frequência e (B) tempo do comportamento de fuga. As colunas representam médias e as barras o erro padrão da média. N=8 por grupo; \*\*p<0,01, quando comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett.



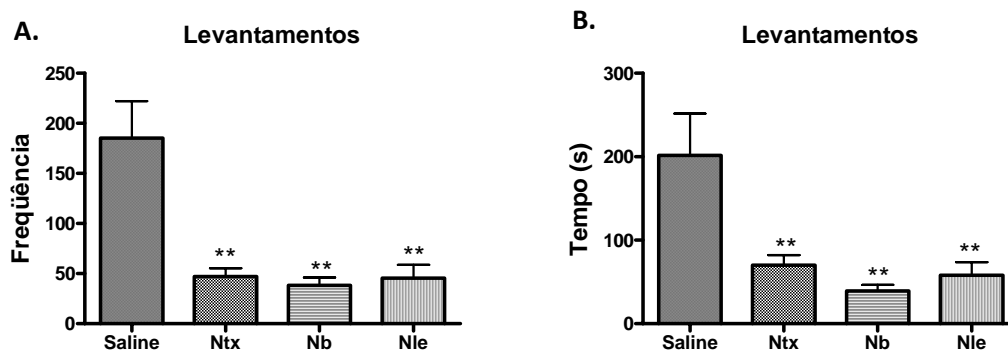


Fig 22. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial, 10 minutos após a microinjeção de naltrexona (Ntx)(5µg/0,2µL), 2 horas após administração de Norbinaltorfimina (NB) (5µg/0,2µL), 24 horas após a microinjeção de Naloxonazina (Nle) (5µg/0,2µL) ou de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) na substância cinzenta periaquedutal dorsal sobre a (A) frequência e (B) tempo de levantamentos. As colunas representam médias e as barras o erro padrão da média. N=8 por grupo; \*\*p<0,01, quando comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett

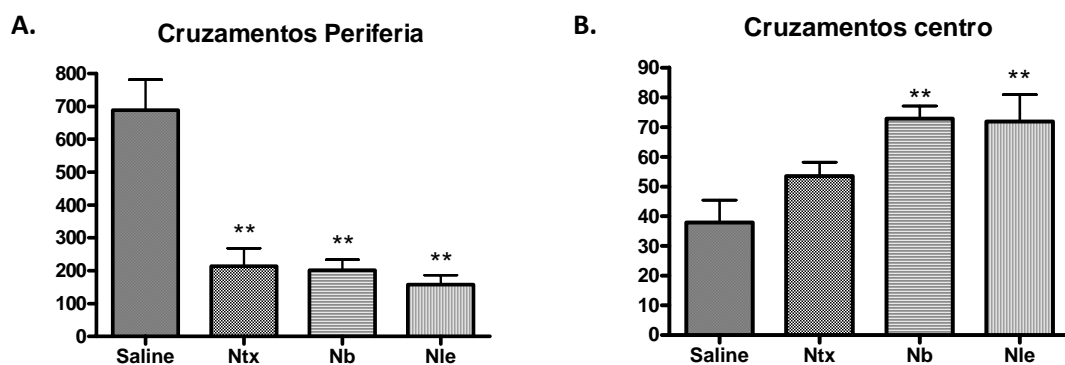
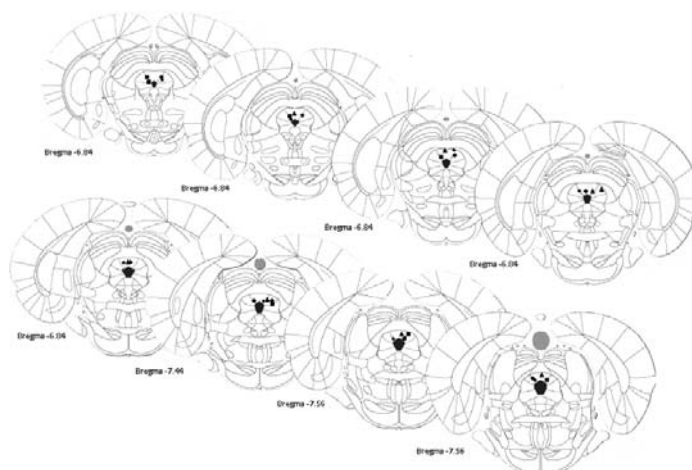
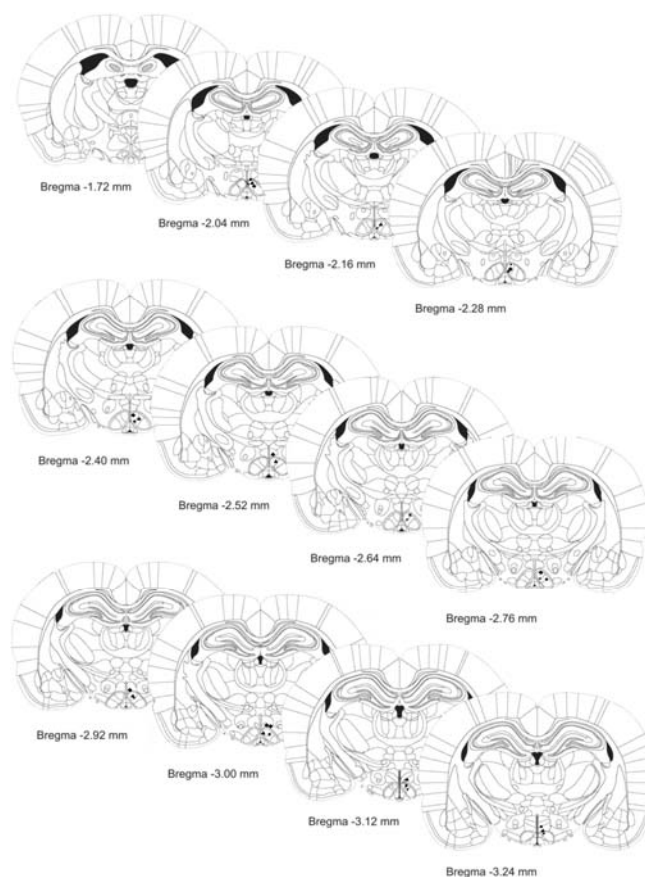


Fig 23. Efeito da microinjeção de bicuculina (40ng/0.2µl) no hipotálamo medial, 10 minutos após a microinjeção de naltrexona (Ntx)(5µg/0,2µL), 2 horas após administração de Norbinaltorfimina (NB) (5µg/0,2µL), 24 horas após a microinjeção de Naloxonazine (Nle) (5µg/0,2µL) ou de salina fisiológica (NaCl a 0,9%; 0.2µL) na substância cinzenta periaquedutal dorsal sobre a incidência de cruzamentos na (A) periferia ou no (B) Centro da arena. As colunas representam médias e as barras o erro padrão da média. N=8 por grupo; \*\*p<0,01, quando comparado com o grupo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett.

A.



B.



• Salina    ■ Naltrexona    ◆ Nor-binaltorfimina    ▲ Naloxonazine

Fig 24. Representação esquemática dos sítios de microinjeção dos antagonistas opioidérgicos (naltrexona, nor-binaltorfimina, naloxonazine) e da salina fisiológica na substância cinzenta periaquedutal dorsal (A) e pontos de microinjeção de bicuculina (40ng/0,2µl) no hipotálamo medial (B) dispostos em anagramas de secções coronais do encéfalo do rato do atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (2005).

## 5. DISCUSSÃO

Atualmente, são muitos os transtornos psiquiátricos que ainda estão sendo estudados com a finalidade de elucidar e obter uma melhor compreensão sobre os sistemas de neurotransmissão e as bases neuronais destas desordens. Além da esquizofrenia e das psicoses, os distúrbios de ansiedade e o transtorno de pânico estão entre as patologias psiquiátricas mais estudadas e conhecidas.

Modelos experimentais sugerem que as reações de fuga após a estimulação de algumas estruturas do teto mesencefálico (TM) se assemelham aos sintomas presentes no transtorno do pânico (COIMBRA e cols., 1996; COIMBRA e cols., 2000; OSAKI e cols., 2003; CASTELLAN-BALDAN e cols, 2006). Recentes evidências sugerem que as respostas comportamentais menos explosivas enquadram-se melhor no perfil comportamental de um paciente em crise de pânico (BUENO e cols, 2007). A resposta de fuga seguida da estimulação do HM caracteriza-se por apresentar respostas de fuga e aumentos na atividade locomotora (SHEKHAR e cols, 1987), apresentando-se como um novo modelo experimental deste transtorno, modelo que no presente trabalho foi empregado para estudar o papel do sistema opioide e das conexões entre o hipotálamo medial e a SCPd nos comportamentos de defesa eliciados pelo bloqueio de receptores GABA<sub>A</sub> no hipotálamo medial.

Tem sido mostrado que o bloqueio do receptor GABA<sub>A</sub> na região dorsal do hipotálamo evoca uma série de alterações fisiológicas e efeitos ansiogênicos, tais como: aumento da frequência cardíaca e respiratória, na pressão arterial, na atividade locomotora e em comportamentos similares aos presentes nos ataques de pânico em humanos (Shekhar e Katner, 1995; Shekhar, 1994). Alguns estudos com drogas ansiolíticas demonstraram que essas drogas têm seu efeito antiaversivo devido ao aumento da modulação GABAérgica (SHEKHAR, 1994). Com efeito, a administração de imipramina e o clonazepam bloqueia o efeito induzido pela desinibição dos neurônios GABAérgicos no HDM (SHEKHAR, 1994).

## 5.1. Estudo Neuroanatômico

Os resultados observados após a administração de neurotraçadores no hipotálamo medial sugerem a presença de conexões intrínsecas entre as subdivisões dorsomedial e ventromedial do hipotálamo. Desta maneira, as marcações positivas para biodextrana conjugada a *cascade blue em neurônios e fibras* do HVM, após a microinjeção desse traçador no HDM, demonstra a existência de uma conexão eferente entre o HVM e o HDM, e embasam o fato de que o antagonismo dos receptores GABA<sub>A</sub> em qualquer uma das mencionadas subdivisões, poderia levar à ativação da outra. Assim, é possível supor que os comportamentos defensivos abordados no presente estudo podem ser produto da ativação do hipotálamo medial como um todo, independentemente da subdivisão na qual a bicuculina fora microinjetada. Este correlato morfológico suporta os achados obtidos por Freitas e cols (2009), nos quais foi demonstrada uma ausência de acentuadas diferenças entre os comportamentos eliciados pela desinibição GABAérgica do HDM quando comparado com a expressão comportamental de defesa desencadeada pela desinibição GABAérgica do HVM.

Em adição, foram observadas fibras nervosas positivas para o neurotraçador conjugado ao *cascade blue* nas redes neurais da SCPd, o que indica a presença de botões terminais ou varicosidades provenientes do local onde foi administrado o neurotraçador, ou seja, no HDM. Esses achados sugerem uma conexão entre o hipotálamo dorsomedial e as colunas dorsolaterais da SCP, o que se soma a achados prévios que sugerem também que a SCP recebe projeções de outros núcleos hipotalâmicos. Com efeito a área lateral do hipotálamo se projeta à SCPvl, e a SCPvl e a SCPl também recebem inputs do hipotálamo dorsal e medial (FLOYD e cols., 2001; VEENING e cols, 1991). Esses resultados sugerem que as reações de pânico elaboradas pelo hipotálamo medial poderiam recrutar as redes neurais da SCPd. De fato, é sabido que a desinibição GABAérgica na SCPd produz uma série de comportamentos de escape ou fuga em situações de perigo proximal (SCHENBERG e cols, 2005; BANDLER e SHIPLEY, 1994; MORGAN e cols., 1998).

Por sua vez, a microinjeção do neurotraçador marcado com *Texas red* nas colunas dorsais da SCP mostrou a presença de fibras e neurônios positivos na própria SCP, o que

poderia sugerir conexões intrínsecas de neurônios situados em diferentes substratos neurais da SCPd considerando o eixo crânio-caudal, a coluna dorsomedial e mesmo as demais outras colunas dessa estrutura. Curiosamente, foram também encontradas células positivas para *Texas red* no HVM o que, junto com o achado de fibras e neurônios positivos na SCPdl, , sugerem que os corpos neuroniais que se projetam intrinsecamente na própria SCP também enviariam conexões com o HVM. A presença de marcações positivas para o mesmo traçador tanto em fibras como em pericários no HVM provenientes do sítio da microinjeção na SCPdl e no HDM, favoreceria a hipótese das citadas conexões serem recíprocas.

Estudos predecessores efetivamente mostraram a presença de projeções da coluna dorsolateral da SCP, conectando-se com a parte dorsal, posterior e anterior do hipotálamo, assim como com a porção dorsomedial do HVM (FLOYD e cols., 2001; VEENING e cols, 1991). O HM também recebe aferências da coluna lateral da SCP (ALLEN e CECHETTO,1992; DENOVELLIS e cols., 1995). Assim, é preciso conceber a possibilidade de haver uma influência mútua entre essas duas estruturas, onde cada uma delas poderia modular as respostas defensivas elaboradas pela outra.

É importante mencionar que os achados do presente trabalho, referentes à dupla marcação dos mesmos neurônios no HVM que se conectam com o HDM e com a SCPdl sugerem efetivamente a existência das conexões recíprocas entre as citadas estruturas o que lhes confere a possibilidade de integração durante a organização do comportamento que tem sido associado ao medo inato e aos ataques de pânico.

## 5.2. Estudo Neurofisiológico

Os resultados obtidos no estudo neurofisiológico mostraram que a inativação das sinapses na SCPd com microinjeções locais de cloreto de cobalto diminuíram, de maneira geral, as respostas defensivas desencadeadas pelo bloqueio de receptores GABA<sub>A</sub> no hipotálamo medial, especificamente nos núcleos hipotalâmicos dorsomedial e ventromedial.

Tem sido sugerido que tais núcleos são parte integrante do sistema hipotalâmico de defesa, proposto por Canteras, em 2002.

Com efeito, um comportamento comumente presente em estados de ansiedade antecipatória, como no caso de um de um perigo potencial no ambiente, a avaliação de risco, mostrou uma tendência à diminuição tanto em sua frequência quanto em sua duração, após a microinjeção de cloreto de cobalto na SCPd. O comportamento de alerta defensivo mostrou uma diminuição estatisticamente significativa em sua frequência e tendência à diminuição em sua duração. Esses dados sugerem que a coluna dorsal da SCP pode ser recrutada pelo hipotálamo medial diante situações que geram ansiedade, situações nas quais o perigo é potencial, e a fonte de estímulos aversivos ainda não for identificada.

Com relação aos comportamentos comumente relacionados na literatura a ataques de pânico, é conhecido que estruturas encefálicas como a SCP são responsáveis pela elaboração de respostas defensivas mais rápidas e imediatas. Essa estrutura é ativada quando se apresenta uma situação na qual a sensação de perigo deve-se a uma ameaça proximal (MEZZASALAMA e cols, 2004). Os presentes resultados mostraram que, além de ter ocorrido uma tendência à diminuição do movimento defensivo retrógrado e das rotações, houve uma redução estatisticamente significativa da expressão do comportamento de fuga e de saltos, tanto em sua frequência quanto em sua duração. Esses achados podem ser considerados um indicativo de que tais respostas dependem da integridade das conexões existentes entre o HM e a SCPd.

A resposta comportamental observada após a estimulação do HM caracteriza-se por um comportamento de fuga mais elaborado, acompanhado por um aumento na atividade locomotora, especificamente no que se refere aos levantamentos (SILVEIRA e GRAEFF, 1992; GRAEFF, 2007, SHEKHAR e DIMICCO, 1987; BANDLER e cols, 1991; BANDLER e SHIPLEY, 1994; CARRIVE e cols., 1987; MORGAN e cols., 1998), além da presença de saltos direcionados à parte superior da arena. Não obstante, a fuga observada após estimulação da SCPd tem sido descrita como um comportamento mais explosivo, no qual se pode observar congelamento, corridas intensas, saltos não direcionados a nenhuma saída particular do local em que a estimulação central for efetuada, seguindo-se alterações neurovegetativas, como exoftalmia, micção e defecação (BITTENCOURT e cols, 2005; SCHENBERG e cols, 2005;

Coimbra e cols, 2006). Tendo em consideração o caráter explosivo das respostas eliciadas pela SCPd e os dados obtidos no presente trabalho, poder-se-ia sugerir que os componentes mais explosivos do padrão defensivo eliciado pelo hipotálamo poderiam estar mediados pelo aumento de atividade das redes neurais que conectam o HM com a SCPd.

No concernente aos comportamentos exploratórios, os resultados referentes à incidência e duração dos levantamentos indicam que a interrupção das sinapses na SCPd não afeta a avaliação de um espaço desconhecido. Por outro lado, o bloqueio de sinapses na SCPd causou uma diminuição significativa do número de cruzamentos efetuados na periferia da arena e uma tendência ao aumento de sua incidência na parte central da arena. Os presentes achados podem ser explicados pela relação que tem a atividade locomotora com o comportamento de fuga que, geralmente, é caracterizado por um aumento na movimentação do animal. Com efeito, no presente estudo, observou-se, também, uma diminuição estatisticamente significativa do comportamento de fuga organizado pelo hipotálamo medial.

Não obstante, os resultados presentemente obtidos só permitem sugerir que a interrupção das sinapses na SCPd diminui os comportamentos defensivos relacionados ao medo inato evocado pelo bloqueio de receptores GABA-A no hipotálamo medial, mas não esclarece os mecanismos específicos pelos quais esta resposta está sendo mediada. Novos estudos se fazem necessários no sentido de esclarecer quais neurotransmissores encontram-se envolvidos nessa mediação química.

### 5.1. Estudo Neurofarmacológico

O sistema de neurotransmissão opioide encontra-se estreitamente relacionado com o sistema da aversão, muito embora não pareça haver um consenso sobre suas ações, apesar de sabidamente desempenharem um papel importante na neurobiologia da ansiedade e do pânico. Se há evidências farmacológicas que sugerirem que o agonismo



sobre receptores opioides leva à diminuição das respostas de defensivas, há trabalhos abordando tanto técnicas neurofarmacológicas quanto morfológicas, demonstrando que o antagonismo de receptores opioides no mesencéfalo dorsal e ventral causa um claro efeito anti-pânico, baseado na interação entre vias opioides e GABAérgicas (COLASANTI e cols, 2010). Com efeito, recentemente, foi mostrado que a retirada de morfina sensibiliza os substratos neurais do medo nas estruturas do tectum, como a SCPd e o colículo inferior (DE ROSS e cols 2009). Contudo, relatos prévios demonstraram que a microinjeção de antagonistas de receptores opioides do tipo  $\mu_1$  e  $\kappa$  nessas mesmas estruturas causa efeito antiaversivo (COIMBRA e cols, 1996, 2000; RIBEIRO e cols, 2005; CASTELLAN-BALDAN e cols, 2006).

No presente trabalho, a microinjeção de antagonistas de receptores opioides na SCPd influenciou a organização do comportamento que tem sido relacionado ao medo inato e ao pânico, deprimindo as respostas de defesa elaboradas pelo hipotálamo medial, em núcleos que se encontram tonicamente inibidos por projeções GABAérgicas ao diencéfalo. Esses achados sugerem que os comportamentos defensivos eliciados pela estimulação do HM podem ser modulados por vias opioides que conectam o hipotálamo medial com a SCPd.

Efetivamente, a microinjeção de antagonistas opioides na SCPd diminuiu a expressão dos comportamentos defensivos organizados pelo hipotálamo medial. Curiosamente, o comportamento de avaliação de risco aumentou significativamente após a administração de naltrexona e de naloxonazine, mas não de nor-binaltorfimina na SCPd. Esse fato sugere que o receptor  $\mu_1$ , mas não o receptor opioide  $\kappa$ , presentes na SCPd, encontra-se envolvido na elaboração dessa resposta após a desinibição GABAérgica do hipotálamo medial. Estudos confirmam que mecanismos mediados pelos receptores  $\mu$  na SCPd podem estar envolvidos com o comportamento de avaliação de risco. Por outro lado, tem sido proposto que os efeitos pró-aversivos produzidos pela microinjeção de morfina na SCPd podem ser mediados pela sua ação sobre receptores  $\kappa$  (NOBRE e cols, 2000). Contudo, os presentes resultados vão de encontro a essa última proposição, pois que tanto o bloqueio de receptores opioides do tipo  $\mu_1$  como do tipo  $\kappa$  localizados nas colunas dorsais da SCP causaram um claro efeito antiaversivo sobre as diversas respostas comportamentais que têm sido relacionadas ao medo inato, organizadas pelo hipotálamo medial.

No que se refere ao comportamento de alerta defensivo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas após nenhum dos pré-tratamentos da SCPd com os antagonistas seletivos e não seletivos de receptores opioides, o que sugere que as aferências opioides à SCPd podem não ter uma influência direta sobre respostas de ansiedade evocadas pelo bloqueio de receptores GABAérgicos no hipotálamo medial.

Contudo, o pré-tratamento da SCPd com naltrexone, naloxonazine e nor-binaltorfimina reduziu a expressão das respostas motoras defensivas retrógradas, recentemente descritas na literatura como um dos repertórios comportamentais de defesa organizados pelo hipotálamo medial (FREITAS e cols, 2009). O mesmo efeito foi observado no que se refere ao comportamento rotatório. Esses dados sugerem o envolvimento de receptores opioides  $\mu_1$  e  $\kappa$  da SCPd na organização de tais respostas evocadas pela desinibição GABAérgica no hipotálamo medial.

O comportamento rotatório encontra-se relacionado com estados aversivos (BALABAN, 2002), e pelo menos no que se refere ao comportamento de defesa organizado no mesencéfalo dorsal, tal resposta surge durante o arrefecimento do comportamento de fuga explosiva evocado pelo bloqueio de receptores GABA<sub>A</sub> na SCPd e nas camadas profundas do colículo superior, durante a elevação do limiar do comportamento de defesa mais explosivo, tendo sido sugerido fazer parte do repertório comportamental da agressividade, ao invés do repertório comportamental do medo inato, propriamente (COIMBRA e BRANDÃO, 1993). À semelhança do que ocorreu no estudo neurofisiológico, o antagonismo de receptores opioides na SCPd causou uma diminuição estatisticamente significativa tanto em frequência como em tempo de saltos e de fuga após o bloqueio de receptores GABAérgicos no hipotálamo medial. Como tais comportamentos têm sido considerados uma manifestação de medo inato comumente relacionado aos ataques de pânico, é possível que as respostas sugestivas de pânico, organizadas no hipotálamo medial, dependam, pelo menos em parte, de aferências opioides às colunas dorsais da SCP, recrutando receptores opioides do tipo  $\mu_1$  e  $\kappa$ . Com efeito, o bloqueio de receptores opioides no teto mesencefálico tem sido seguido de um claro efeito antipânico (COIMBRA e cols, 1996; RIBEIRO e cols, 2005), o que também depende da interação entre vias opioides e

GABAérgicas intramesencefálicas (EICHENBERGER e col., 2002; OSAKI e col., 2003; CASTELLAN-BALDAN e cols, 2006).

No que se refere ao comportamento exploratório, tão presente, entremeando-se nas respostas comportamentais de fuga orientada que seguem o bloqueio de receptores GABAérgicos no hipotálamo medial (FREITAS e col., 2009), os levantamentos também se mostraram estatisticamente reduzidos, tanto em sua incidência, como em sua duração, após o bloqueio de receptores opioides não específicos e específicos ( $\mu_1$  e  $\kappa$ ) na SCPd. É importante mencionar que houve uma relação entre as respostas de levantamentos e de saltos, sendo que o animal, antes de realizar os saltos sempre realizava um levantamento, muito embora, nem toda a resposta de levantamento fosse seguida por salto. Uma possível interpretação do observado pode consistir no fato de que durante a resposta de defesa orientada, que caracteriza a estimulação do hipotálamo medial, a resposta de salto sendo precedida por comportamento exploratório era menos explosiva do que a mesma resposta obtida pela estimulação do teto mesencefálico, por exemplo. De fato, após a estimulação do HM, o animal aparentava estar à procura de uma possível saída do ambiente de estimulação aversiva. Como na arena circular utilizada no presente trabalho, a borda superior (elevada a 60 cm de altura) é a única entrada e saída do ambiente experimental, a elaboração do comportamento exploratório de levantamento, precedendo a resposta de saltos, poderia caracterizar efetivamente a já mencionada resposta de fuga orientada caracteristicamente organizada pelo hipotálamo medial (FREITAS e cols, 2009, GRAEFF, 1994), o que, no entanto, também parece recrutar receptores opioides  $\mu_1$  e  $\kappa$  da SCPd, para sua elaboração.

Por outro lado, alguns estudos apontam o fato de que nem todos os levantamentos constituem um comportamento exploratório, já que tem sido proposta a existência de levantamentos com conotação defensiva em casos nos quais estes ocorram em um ambiente de caráter aversivo e se apresentem em direção ao estímulo que sinaliza perigo. Esse levantamento é chamado de “*vigilant rearing*” (DIELENBERG e MCGREGOR, 2001).

No que se refere aos cruzamentos, há evidências de que a administração central de antagonistas opioides reduz a atividade locomotora dos ratos (LEVENTHAL e cols, 1996). O efeito oposto é observado quando é administrada morfina, um agonista opioidérgico não seletivo, o qual produz um aumento significativo da atividade locomotora (KAMEI e cols,

1995), mesmo como sinal de estado aversivo, dependendo da dose (CARDOSO e cols, 1992). Os resultados do presente estudo foram semelhantes aos achados na literatura que sugerem um papel pró-aversivo dos neurotransmissores opioides, dependendo da estrutura sobre a qual agem (COIMBRA e cols, 1996, 2000; EICHENBERGER e cols, 2002; OSAKI e cols, 2003), já que o pré-tratamento da SCPd com os antagonistas opioides seguido pelo bloqueio de receptores GABAérgicos no hipotálamo medial causou uma diminuição significativa na realização de cruzamentos na periferia do assoalho da arena. Além disso, observou-se um aumento na incidência de cruzamentos no centro da arena, o que sugere um claro efeito antiaversivo do bloqueio de receptores opioides  $\mu_1$  e  $\kappa$  da SCPd nas respostas de defesa desencadeadas pelo bloqueio de receptores GABA<sub>A</sub> no hipotálamo medial, o que ainda se harmoniza com o efeito antipânico do antagonismo de receptores opioides inespecíficos da SCPd, caracterizado pela diminuição das respostas de fuga explosiva localmente organizadas (Coimbra e col., 1996). Com efeito, o aumento significativo de cruzamentos na parte central da arena pode estar relacionado com a diminuição geral dos comportamentos defensivos e nos níveis de medo e de ansiedade, já que diferentes estudos têm mostrado que quanto maior for a exploração do animal de áreas centrais do campo aberto, menor é o nível de ansiedade (FREITAS e cols, 2009; DAVIDSON e cols., 2007; LIM e cols, 2008; TRZCTNSKA e cols, 1999).

Por outro lado, é importante mencionar a relação existente entre o sistema GABAérgico e o sistema de neurotransmissão opioide, o que pode embasar o efeito ansiolítico e panicolítico causados pelo antagonismo de receptores opioides realizado no presente trabalho. Tem sido demonstrado que as vias opioides têm conexões recíprocas com interneurônios GABAérgicos, e que a interação entre tais vias modula as respostas de pânico eliciadas pela estimulação de estruturas mesencefálicas (EICHENBERGER e cols, 2002; OSAKI e cols, 2003; RIBEIRO e cols, 2005; CASTELLAN-BALDAN e cols, 2006). Os presentes resultados mostraram um claro efeito antiaversivo causado tanto pela administração de um antagonista não seletivo de receptores opioides na SCPdl, como após o pré-tratamento da SCP com antagonistas opioidérgicos seletivos para receptores  $\mu_1$  e  $\kappa$ , o que vai ao encontro de resultados obtidos em estudos prévios, onde o pré-tratamento do mesencéfalo dorsal ou ventral com os mesmos fármacos diminuiu a respostas defensivas após a estimulação

elétrica do teto mesencefálico (COIMBRA e cols, 2000; RIBEIRO e cols, 2005; OSAKI e cols, 2003; CALVO e COIMBRA, 2006).

Em harmonia com os presentes achados, há evidências de que a endomorfina, um agonista de receptores opioides do tipo  $\mu$ , é liberada nas projeções estabelecidas entre o hipotálamo e a SCP, podendo mediar ou modular diferentes funções (CHEN e cols, 2008). A esse respeito, o estudo atual mostra que essas ações fisiológicas podem estar relacionadas com os comportamentos defensivos elaborados pelo hipotálamo medial.

Os achados do presente trabalho permitem ampliar o conhecimento vigente sobre as bases neurais e psicofarmacológicas do medo inato, aumentando a possibilidade de compreendermos mais claramente as bases anatômicas e neuroquímicas de algumas desordens psiquiátricas, como os distúrbios da ansiedade e o transtorno do pânico, culminando no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que possam melhorar a qualidade de vida de pacientes que estejam sendo afetados por tais doenças.

## 6. CONCLUSÕES

- O bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A nos núcleos hipotalâmicos dorsomedial e ventromedial é seguido por um conjunto de respostas comportamentais sugestivas de medo inato e de pânico, como alerta defensivo, fuga orientada a uma eventual saída do ambiente aversivo, além de algumas clássicas respostas de ansiedade antecipatória, como o comportamento de avaliação de risco.
- O comportamento de defesa organizado pelos núcleos do hipotálamo medial parece depender da integridade de aferências à coluna dorsal da substância cinzenta periaquedutal.
- A elaboração do comportamento de fuga pelo hipotálamo medial recruta vias que se projetam para a coluna dorsal da substância cinzenta periaquedutal, uma estrutura mesencefálica que pode ser responsável pela elaboração de componentes mais explosivos da resposta de defesa organizada pelo hipotálamo medial. Além disso, vias que conectam o hipotálamo medial às colunas dorsais da substância cinzenta periaquedutal também podem estar relacionadas com os estados pró-aversivos que sinalizem perigo iminente.
- O pré-tratamento da substância cinzenta periaquedutal dorsal com antagonistas opioides seguido da desinibição GABAérgica no hipotálamo medial aumentou a expressão de comportamentos que têm sido relacionado com a ansiedade antecipatória, comumente evocados na presença de um perigo distal, como consiste a avaliação de risco, mas não alterou a resposta de alerta defensivo.
- O pré-tratamento da substância cinzenta periaquedutal dorsal com antagonistas de receptores opioides, seguido pela desinibição GABAérgica no hipotálamo medial, diminuiu significativamente os comportamentos associados aos ataques de pânico, como o comportamento de fuga e saltos.
- As respostas de pânico organizadas por neurônios do hipotálamo medial, os quais se encontram tonicamente inibidos pelo sistema GABAérgico, parecem depender da integridade de uma via mediada por polipeptídeos opioides endógenos que recruta

receptores  $\mu_1$  e  $\kappa$  localizados nas colunas dorsais da substância cinzenta periaquedutal, considerada a principal via de saída do sistema encefálico da aversão.

## 7. REFERÊNCIAS

ANDREATINI R.; BLANCHARD C.; BLANCHARD R.; BRANDAO ML.; CAROBREZ AP.; GRIEBEL G.; GUIMARAES FS.; HANDLEY SL.; JENCK F.; LEITE JR.; RODGERS J.; SCHENBERG LC.; DA CC.; GRAEFF FG. *The brain decade in debate: II. Panic or anxiety? From animal models to a neurobiological basis.* **Braz. J. Med. Biol. Res.** 34: 145-54, 2001.

ARGYROPOULOS SV.; BAILEY JE.; HOOD SD.; KENDRICK AH.; RICH AS.; LASZLO G.; NASH JR.; LIGHTMAN SL.; NUTT DJ. *Inhalation of 35% CO(2) results in activation of the HPA axis in healthy volunteers.* **Psychoneuroendocrinology** 27: 715-729, 2002.

ARVIDSSON U.; DADO RJ.; RIEDL M.; LEE JH.; LAW PY.; LOH HH.; ELDE R.; WESSENDORF MW. *delta-Opioid receptor immunoreactivity: distribution in brainstem and spinal cord, and relationship to biogenic amines and enkephalin.* **J Neurosci** 15: 1215-1235, 1995.

BALABAN CD. *Neural substrates linking balance control and anxiety.* **Physiol Behav** 77: 469-475, 2002.

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

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

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

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

BATTAGLIA M.; OGLIARI A. *Anxiety and panic: from human studies to animal research and back.* **Neurosci Biobehav Rev** 29: 169-179, 2005.



BEITZ, AJ. *The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat.* **Neuroscience** 7, 133–159, 1982

BEITZ, AJ. *The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions.* **J. Comp. Neurol.** 237, 445–459, 1985

BEITZ, A.J.; SHEPARD, R. D. *The midbrain periaqueductal gray in the rat. II. A golgi analysis.* **J. Comp. Neurol.** 237, 460–475, 1985.

BITTENCOURT AS.; NAKAMURA-PALACIOS EM.; MAUAD H.; TUFIK S.; SCHENBERG LC. *Organization of electrically and chemically evoked defensive behaviors within the deeper collicular layers as compared to the periaqueductal gray matter of the rat.* **Neuroscience** 133: 873-892, 2005.

BORELLI KG.; NOBRE MJ.; BRANDAO ML.; COIMBRA NC. *Effects of acute and chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter.* **Pharmacol. Biochem. Behav.** 77: 557-66, 2004

BUENO CH.; ZANGROSSI H, JR.; VIANA MB. *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: 134-141, 2007.

BLANCHARD DC.; LI CI.; HUBBARD D.; MARKHAM CM.; YANG M.; TAKAHASHI LK.; BLANCHARD RJ. *Dorsal premammillary nucleus differentially modulates defensive behaviors induced by different threat stimuli in rats.* **Neurosci Lett** 345: 145-148, 2003.

BLANCHARD RJ, YUDKO E, DULLOOG L, BLANCHARD DC. *Defense changes in stress nonresponsive subordinate males in a visible burrow system.* **Physiol Behav** 72: 635-642, 2001.

BRANDÃO, ML.; ANSELONI, VZ.; PANDÓSSIO, JE.; DE ARAÚJO, JE.; CASTILHO, VM. *Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain.* **Neurosci. Biobehav. Rev.** 23: 863-875 , 1999

BRANDÃO, ML.; COIMBRA, NC. & OSAKI, MY. *Changes in the auditory-evoked potentials induced by fear-evoking stimulations.* **Physiology and Behavior.** 72: 365-372, 2001

BRANDÃO, ML.; AGUIAR, JC. & GRAEFF, F G. *GABA mediation of the antiaversive action of the minor tranquilizers.* **Pharmacol. Biochem. Behav.** 16: 397-402, 1982

BRANDÃO, ML.; CARDOSO, SH.; MELO, LL.; MOTTA, V.; COIMBRA, NC. *Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum.* **Neurosci. Biobehav. Rev.** 18: 339-346, 1994

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

BRANDÃO, ML.; LOPEZ-GARCIA, JA.; GRAEFF, FG.; ROBERTS, MHT. *Electrophysiological evidence for excitatory 5-HT<sub>2</sub> and depressant 5-HT<sub>1A</sub> receptors on neurons of the rat midbrain tectum.* **Brain Res.** 556: 259-266, 1991

BRANDÃO, ML.; MELO, LL.; CARDOSO, SH. *Mechanisms of defense in the inferior colliculus.* **Behavioural Brain Res.** 58: 49-55, 1993

BRANDÃO, ML.; TOMAZ, C.; LEÃO-BORGES, PC.; COIMBRA, NC.; BAGRI, A. *Defense reaction induced by microinjections of bicuculine into inferior colliculus.* **Physiol. Behav.** 44: 361-365, 1988

BRANDAO ML, TRONCOSO AC, DE SOUZA SILVA MA, HUSTON JP. *The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations.* **Eur J Pharmacol.** 463: 225-233, 2003.

CALVO F, COIMBRA NC. *Interactions between opioid-peptides-containing pathways and GABA(A)-receptors-mediated systems modulate panic-like-induced behaviors elicited by electric and chemical stimulation of the inferior colliculus.* **Brain Res** 1104: 92-102, 2006.

CARVALHO-NETTO EF, MARTINEZ RC, BALDO MV, CANTERAS NS. *Evidence for the thalamic targets of the medial hypothalamic defensive system mediating emotional memory to predatory threats.* **Neurobiol Learn Mem** 93: 479-486, 2010.

CARDOSO, SH.; COIMBRA, NC.; BRANDÃO ML. *Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus*, **Behav. Brain Res.** 63: 17-24, 1994

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

CEZARIO AF, RIBEIRO-BARBOSA ER, BALDO MV, CANTERAS NS. *Hypothalamic sites responding to predator threats--the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior*. **Eur J Neurosci** 28: 1003-1015, 2008.

CHEN T, HUI R, WANG XL, ZHANG T, DONG YX, LI YQ. *Origins of endomorphin-immunoreactive fibers and terminals in different columns of the periaqueductal gray in the rat*. **J Comp Neurol** 509: 72-87, 2008.

CHOI GB, DONG HW, MURPHY AJ, VALENZUELA DM, YANCOPOULOS GD, SWANSON LW, ANDERSON DJ. *Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus*. **Neuron** 46: 647-660, 2005

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

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

COIMBRA, NC.; BRANDÃO, ML. *Effects of 5 HT<sub>2</sub> receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray*. **Behav. Brain Res.** 87: 97-103, 1997.

COIMBRA, NC.; BRANDÃO, ML. *GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behavior elicited by midbrain tectum stimulation*. **Behav. Brain Res.** 59: 131-139, 1993.

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

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

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

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

COIMBRA NC, OSAKI MY, EICHENBERGER GC, CISCATO JG, JR., JUCA CE, BIOJONE CR: *Effects of opioid receptor blockade on defensive behavior elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior colliculus in Rattus norvegicus (Rodentia, Muridae)*. **Psychopharmacology** 152: 422-430, 2000.

COLASANTI A, RABINER EA, LINGFORD-HUGHES A, NUTT DJ: *Opioids and Anxiety*. **J Psychopharmacol**, 2010.

CORBETT AD, PATERSON SJ, KOSTERLITZ HW. *Selectivity of ligands for opioid receptors*. In: *Handbook of experimental pharmacology, Opioids I (Herz A, ed)*, pp 645-679. Berlin: Springer, 1993

CRIPPA JA, UCHIDA R, BUSATTO GF, GUIMARAES FS, DEL-BEN CM, ZUARDI AW, SANTOS AC, ARAUJO D, MCGUIRE PK, GRAEFF FG. *The size and prevalence of the cavum septum pellucidum are normal in subjects with panic disorder*. **Braz J Med Biol Res** 37: 371-374, 2004.

CRIPPA JA, DERENUSSON GN, FERRARI TB, WICHERT-ANA L, DURAN F, MARTI N-S, SIMOES MV, BHATTACHARYYA S, FUSAR-POLI P, ATAKAN Z, SANTOS FA, FREITAS-FERRARI MC, MCGUIRE P, ZUARDI AW, BUSATTO G, HALLAK JE: *Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: a preliminary report.* **J Psychopharmacol**, 2010.

DE OCA BM, DECOLA JP, MAREN S, FANSELOW MS. *Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses.* **J Neurosci** 18: 3426-3432, 1998.

DE RJ, AVILA MA, RUGGIERO RN, NOBRE MJ, BRANDAO ML, CASTILHO VM. *The unconditioned fear produced by morphine withdrawal is regulated by mu- and kappa-opioid receptors in the midbrain tectum.* **Behav Brain Res** 204: 140-146, 2009.

DEL-BEN CM, GRAEFF FG: *Panic disorder: is the PAG involved?* **Neural Plast** 2009: 108135, 2009.

DIELENBERG RA, MCGREGOR IS: *Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review.* **Neurosci Biobehav Rev** 25: 597-609, 2001.

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

DREBORG S, SUNDSTROM G, LARSSON TA AND LARHAMMAR D. *Evolution of vertebrate opioid receptors.* **Proc Natl Acad Sci USA** 105: 15487–15492, 2008

DROLET G, DUMONT EC, GOSSELIN I, KINKEAD R, LAFOREST S AND TROTTIER JF. *Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response.* **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 25: 729–741, 2001.

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

ELDE R, HOKFELT T. *Coexistence of opioid peptides with other neurotransmitters.* In: *Handbook of experimental pharmacology, Opioids I* (Herz A, ed), pp 585-624. Berlin: Springer, 1993

ERHARDT A, ISING M, UNSCHULD PG, KERN N, LUCAE S, PUTZ B, UHR M, BINDER EB, HOLSBOER F, KECK ME: *Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in patients with panic disorder.* **Neuropsychopharmacology** 31: 2515-2522, 2006.

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

FANSELOW, M. S. *The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety.* In: *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Immunohistochemical Organization*, A Depaulis and R. Blander (eds.), Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 151-173, 1991

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

FREITAS RL, URIBE-MARINO A, CASTIBLANCO-URBINA MA, ELIAS-FILHO DH, COIMBRA NC: *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

FOGEL, B.S.; SCHIFFER, R.B. *Neuropsychiatry.* Williams & Wilkins. (1996). Cap 13.

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

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

FUKUDA K, KATO S, MORI K, NISHI M, TAKESHIMA H (1993) *Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor delta and mu-subtypes.* **FEBS Lett** 327:3 11-14.

GOLDSTEIN S, HALBREICH U, ASNIS G, ENDICOTT J, ALVIR J: *The hypothalamic-pituitary-adrenal system in panic disorder*. **Am J Psychiatry** 144: 1320-1323, 1987.

GOTO M, CANTERAS NS, BURNS G, SWANSON LW: *Projections from the subfornical region of the lateral hypothalamic area*. **J Comp Neurol** 493: 412-438, 2005.

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

GRAEFF FG, DEL-BEN CM: *Neurobiology of panic disorder: from animal models to brain neuroimaging*. **Neurosci Biobehav Rev** 32: 1326-1335, 2008.

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

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

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

GRAEFF FG: *Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. **Rev Bras Psiquiatr** 29 Suppl 1: S3-S6, 2007.

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

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

HADO-DE-SOUSA JP, ARRAIS KC, ALVES NT, CHAGAS MH, DE MENESES-GAYA C, CRIPPA JA, HALLAK JE. *Facial affect processing in social anxiety: Tasks and stimuli*. **J Neurosci Methods**, 2010

HAHN, E. F. & PASTERNAK, G. W. *naloxonazine, potent long-lasting inhibitor of opiate binding-sites*. **Life Sci.** 31: 1385-1388, 1982

HAMILTON, B. L. *cytoarchitectural subdivisions of the periaqueductal gray matter in the cat.* **J. Comp. Neurol.** 149, 1–27, 1973

HAMILTON, B. L. Projections of the nuclei of the periaqueductal gray matter in the cat. **J. Comp. Neurol.** 152, 45–58, 1973

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

JOHNSON P, LOWRY C, 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** 22: 642-652, 2008.

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

JOHNSON PL, TRUITT WA, FITZ SD, LOWRY CA, SHEKHAR A. *Neural pathways underlying lactate-induced panic.* **Neuropsychopharmacology** 33: 2093-2107, 2008.

JOHNSON PL, FITZ SD, HOLLIS JH, MORATALLA R, LIGHTMAN SL, SHEKHAR A, LOWRY CA. *Induction of c-Fos in 'panic/defence'-related brain circuits following brief hypercarbic gas exposure.* **J Psychopharmacol**, 2010.

JOHNSON PL, TRUITT W, FITZ SD, MINICK PE, DIETRICH A, SANGHANI S, TRASKMAN-BENDZ L, GODDARD AW, BRUNDIN L, SHEKHAR A: *a key role for orexin in panic anxiety.* **nat med** 16: 111-115, 2010.

KAMEI J, OHSAWA M, SAITOH A, IWAMOTO Y, SUZUKI T, MISAWA M, NAGASE H, KASUYA Y: *Modification of mu-opioid agonist-induced locomotor activity and development of morphine dependence by diabetes.* **J Pharmacol Exp Ther** 274: 700-706, 1995.

KALYUZHNY AE, WESSENDORF MW. *Relationship of mu- and delta-opioid receptors to GABAergic neurons in the central nervous system, including antinociceptive brainstem circuits.* **J. Comp Neurol.**, 1998; 392: 528-47.



KHACHATURIAN H, SCHAFFER MKH, LEWIS ME. *Anatomy and function of the endogenous opioid systems. In: Handbook of experimental pharmacology, Opioids I* (Herz A, ed), pp 471-497. Berlin: Springer, 1993

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

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

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

LEVENTHAL L, COLE JL, BODNAR RJ. *Reductions in locomotor activity following central opioid receptor subtype antagonists in rats*. **Physiol Behav** 60: 833-836, 1996.

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.

LING, G. S. F.; SIMANTOV, R.; CLARK, J. A. & PASTERNAK, G. W. *Naloxonazine actions in vivo*. **Eur. J. Pharmacol**. 129: 33-38, 1986

LORD JA, WATERFIELD AA, HUGHES J AND KOSTERLITZ HW. *Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors*. **Nature** 267: 495–499, 1977

MALICK A, STRASSMAN RM, BURSTEIN R. *Trigeminothalamic and reticulohypothalamic tract neurons in the upper cervical spinal cord and caudal medulla of the rat*. **J Neurophysiol** 84: 2078-2112, 2000.

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

MANSOUR A, WATSON SJ. *Anatomical distribution of opioid receptors in mammals: an overview*. In: Handbook of experimental pharmacology, Opioids I (Herz A, ed), pp 79-102. Berlin: Springer, 1993

MARINELLI PW, FUNK D, JUZYTSCH W, LE AD: *Opioid receptors in the basolateral amygdala but not dorsal hippocampus mediate context-induced alcohol seeking*. **Behav Brain Res** 211: 58-63, 2010.

MANTYH, P. W. *The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat, and monkey: A Nissl, Weil, and Golgi analysis*. **J. Comp. Neurol.** 204, 349–363, 1982.

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

MELLER, S. T., AND DENNIS, B. J. *Quantitative nissl study of the neuronal types, and recognition of cytoarchitectural subdivisions, within the rabbit periaqueductal gray*. **J. Comp. Neurol.** 302, 87–99, 1990

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

MEZZASALMA MA, VALENCA AM, LOPES FL, NASCIMENTO I, ZIN WA, NARDI AE. *Neuroanatomy of panic disorder*. **Rev Bras Psiquiatr** 26: 202-206, 2004.

MICZEK, K. A & THOMPSON, M. L. *Analgesia resulting from defeat in a social confrontation: the role of endogenous opioids in brain*. *Em: Modulation of Sensorimotor Activity During Alteration in Behavioral States*, R. Bandler (ed.), Liss, New York pp. 431-456, 1984

MISSLIN R. *The defense system of fear: behavior and neurocircuitry*. **Neurophysiol. Clin.**, 33: 55-66, 2003

MONGEAU R, MILLER GA, CHIANG E, ANDERSON DJ: *Neural correlates of competing fear behaviors evoked by an innately aversive stimulus*. **J Neurosci** 23: 3855-3868, 2003.

MOGIL JS AND PASTERNAK GW .*The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family*. **Pharmacol Rev** 53: 381–415, 2001

MOTTA V, BRANDAO ML: *Aversive and antiaversive effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test*. **Pharmacol Biochem Behav** 44: 119-125, 1993.

MOTTA V, PENHA K, BRANDAO ML. *Effects of microinjections of mu and kappa receptor agonists into the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the plus maze test*. **Psychopharmacology**; 120: 470-4, 1995

NISHI M, TAKESHIMA H, FUKUDA K, KATO S, MORI K. *cDNA cloning and pharmacological characterization of an opioid receptor with high affinities for kappa-subtype-selective ligands*. **FEBS Lett** 330:77-80, 1993

NOBRE MJ, RIBEIRO DOS SN, AGUIAR MS, BRANDAO ML. *Blockade of mu- and activation of kappa-opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray matter produce defensive behavior in rats tested in the elevated plus-maze*. **Eur J Pharmacol** 404: 145-151, 2000.

NUTT DJ (2001) *The Pharmacology of Human Anxiety*. In: Griez E, JF, C, Nutt D and Zohar J (eds) *Anxiety Disorders An Introduction to Clinical Management and Research*. Chichester: Wiley, 310.

OGAWA S, KOW LM, PFAFF DW. *In vitro electrophysiological characterization of midbrain periaqueductal gray neurons in female rats: responses to*. **Brain Res** 666: 239-249, 1994.

OSAKI MY, CASTELLAN-BALDAN L, CALVO F, CARVALHO AD, FELIPPOTTI TT, DE OR, UBIALI WA, PASCHOALIN-MAURIN T, ELIAS-FILHO DH, MOTTA V, DA SILVA LA, COIMBRA NC: *Neuroanatomical and neuropharmacological study of opioid pathways in the mesencephalic tectum: effect of mu(1)- and kappa-opioid receptor blockade on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus*. **Brain Res** 992: 179-192, 2003.

PADEN CM, KRALL S AND LYNCH WC. *Heterogeneous distribution and upregulation of mu, delta and kappa opioid receptors in the amygdala*. **Brain Res** 418: 349–355, 1987

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

Pasternak GW (1988) The opiate receptors. New Jersey: Humana, 1990

PAXINOS, G. & WATSON, C. *The Rat Brain: In Estereotaxic Coordinates*, 2005.

PECKYS D AND LANDWEHRMEYER GB. *Expression of mu, kappa, and delta opioid receptor messenger RNA in the human CNS: a 33P in situ hybridization study*. **Neuroscience** 88: 1093–1135, 1999

PICHON S, DE GB, GREZES J: *Emotional modulation of visual and motor areas by dynamic body expressions of anger*. **Soc Neurosci** 3: 199-212, 2008.

PILAPIL C, WELNER S, MAGNAN J, GAUTHIER S AND QUIRION R. *Autoradiographic distribution of multiple classes of opioid receptor binding sites in human forebrain*. **Brain Res Bull** 19: 611– 15, 1987

PURVES D., AUGUSTINE, J. G., FITZPATRICK, D., KATZ, C., LAMANTIA, A.S., MNAMARA, J.O. *Invitación a la Neurociencia..* Editorial medica panamericana cap 27, 1997

RAINEY JM, JR., NESSE RM: *Psychobiology of anxiety and anxiety disorders*. **Psychiatr Clin North Am** 8: 133-144, 1985.

RAY LA, CHIN PF, MIOTTO K: *Naltrexone for the treatment of alcoholism: clinical findings, mechanisms of action, and pharmacogenetics*. **CNS Neurol Disord Drug Targets** 9: 13-22, 2010.

RIBEIRO SJ, CISCATO JG, JR., DE OR, DE OLIVEIRA RC, NGELO-DIAS R, CARVALHO AD, FELIPPOTTI TT, REBOUCAS EC, CASTELLAN-BALDAN L, HOFFMANN A, CORREA SA, MOREIRA JE, COIMBRA NC: *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: 184-200, 2005.

SAKAI Y, KUMANO H, NISHIKAWA M, SAKANO Y, KAIYA H, IMABAYASHI E, OHNISHI T, MATSUDA H, YASUDA A, SATO A, DIKSIC M, KUBOKI T: *Changes in cerebral glucose utilization in patients with panic disorder treated with cognitive-behavioral therapy.* **Neuroimage** 33: 218-226, 2006.

SANTE AB, NOBRE MJ, BRANDAO ML. *Place aversion induced by blockade of mu or activation of kappa opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray matter.* **Behav. Pharmacol.** 11: 583-9, 2000

SCHENBERG LC, DOS REIS AM, FERREIRA POVOA RM, TUFIK S, SILVA SR: *A panic attack-like unusual stress reaction.* **Horm Behav** 54: 584-591, 2008.

SCHENBERG LC, POVOA RM, COSTA AL, CALDELLAS AV, TUFIK S, BITTENCOURT AS: *Functional specializations within the tectum defense systems of the rat.* **Neurosci Biobehav Rev** 29: 1279-1298, 2005.

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

SHEKHAR A, DIMICCO JA: *Defense reaction elicited by injection of GABA antagonists and synthesis inhibitors into the posterior hypothalamus in rats.* **Neuropharmacology** 26: 407-417, 1987.

SHEKHAR A: *Effects of treatment with imipramine and clonazepam on an animal model of panic disorder.* **Biol Psychiatry** 36: 748-758, 1994.

SHEKHAR A, KATNER JS: *Dorsomedial hypothalamic GABA regulates anxiety in the social interaction test.* **Pharmacol Biochem Behav** 50: 253-258, 1995.

SHEKHAR A, KEIM SR, SIMON JR, MCBRIDE WJ: *Dorsomedial hypothalamic GABA dysfunction produces physiological arousal following sodium lactate infusions.* **Pharmacol Biochem Behav** 55: 249-256, 1996.

SHEKHAR A, KEIM SR: *The circumventricular organs form a potential neural pathway for lactate sensitivity: implications for panic disorder.* **J Neurosci** 17: 9726-9735, 1997.

SHEKHAR A, JOHNSON PL, SAJDYK TJ, FITZ SD, KEIM SR, KELLEY PE, GEHLERT DR, DIMICCO JA: *Angiotensin-II is a putative neurotransmitter in lactate-induced panic-like responses in rats with disruption of GABAergic inhibition in the dorsomedial hypothalamus.* **J Neurosci** 26: 9205-9215, 2006.

SILVEIRA MC, GRAEFF FG: *Defense reaction elicited by microinjection of kainic acid into the medial hypothalamus of the rat: antagonism by a GABAA receptor agonist.* **Behav Neural Biol** 57: 226-232, 1992.

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

SIEGEL, G.J., ALBERS, R.W., BRADY, S.T., PRICE, D.L., *Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects.* Elsevier., cap 55, 2006

SILVEIRA MC, GRAEFF FG, SANDNER G. *Regional distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain after exposure to fear-inducing stimuli.* **Braz. J. Med. Biol. Res.** 27: 1077-81, 1994

SNELL, R.S., *Neuroanatomia clinica.* Editorial medica Panamericana. 1999. Cap25.

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

SOYKA M, ROSNER S: *Opioid antagonists for pharmacological treatment of alcohol dependence - a critical review.* **Curr Drug Abuse Rev** 1: 280-291, 2008.

TEJEDA HA, CHEFER VI, ZAPATA A, SHIPPENBERG TS: *The effects of kappa-opioid receptor ligands on prepulse inhibition and CRF-induced prepulse inhibition deficits in the rat.* **Psychopharmacology (Berl)** 210: 231-240, 2010.

TRZESNIAK C, UCHIDA RR, ARAUJO D, GUIMARAES FS, FREITAS-FERRARI MC, FILHO AS, SANTOS AC, BUSATTO GF, ZUARDI AW, DEL-BEN CM, GRAEFF FG, CRIPPA JA: *(1)H magnetic resonance spectroscopy imaging of the hippocampus in patients with panic disorder.* **Psychiatry Res** 182: 261-265, 2010.

UCHIDA RR, DEL-BEN CM, BUSATTO GF, DURAN FL, GUIMARAES FS, CRIPPA JA, ARAUJO D, SANTOS AC, GRAEFF FG: *Regional gray matter abnormalities in panic disorder: a voxel-based morphometry study.* **Psychiatry Res** 163: 21-29, 2008.

UCHIDA RR, DEL-BEN CM, ARAUJO D, BUSATTO-FILHO G, DURAN FL, CRIPPA JA, GRAEFF FG: *Correlation between voxel based morphometry and manual volumetry in magnetic resonance images of the human brain.* **An Acad Bras Cienc** 80: 149-156, 2008.

VEINANTE P, STOECKEL ME AND FREUND-MERCIER MJ. *GABA- and peptide-immunoreactivities co-localize in the rat central extended amygdala.* **Neuroreport** 8: 2985–2989, 1997

VIANNA DM, BORELLI KG, FERREIRA-NETTO C, MACEDO CE, BRANDAO ML: *Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds.* **Brain Res Bull** 62: 179-189, 2003.

VIVIAN JA, MICZEK KA: *Interactions between social stress and morphine in the periaqueductal gray: effects on affective vocal and reflexive pain responses in rats.* **Psychopharmacology (Berl)** 146: 153-161, 1999.

VREEBURG SA, ZITMAN FG, VAN PJ, DERIJK RH, VERHAGEN JC, VAN DR, HOOGENDIJK WJ, SMIT JH, PENNINX BW: *Salivary cortisol levels in persons with and without different anxiety disorders.* **Psychosom Med** 72: 340-347, 2010.

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

WILENT WB, OH MY, BUETEFISCH CM, BAILES JE, CANTELLA D, ANGLE C, WHITING DM: *Induction of panic attack by stimulation of the ventromedial hypothalamus.* **J Neurosurg** 112: 1295-1298, 2010.

YASUDA K, RAYNOR K, KONG H, BREDER CD, TAKEDA J, REISINE T, BELL GI. *Cloning and functional comparison of K and 6 opioid receptors from mouse brain.* **Proc Natl Acad Sci USA** 90:6736-6740, 1993

ZADINA JE, HACKLER L, GE LJ AND KASTINAJ. *A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor.* **Nature** 386: 499–502, 1997

ZACHARKO RM, KOSZYCKI D, MENDELLA PD, BRADWEJN J. *Behavioral, neurochemical, anatomical and electrophysiological correlates of panic disorder: multiple transmitter interaction and neuropeptide colocalization.* **Prog Neurobiol** 47: 371-423, 1995.

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

ZARETSKAIA MV, ZARETSKY DV, SARKAR S, SHEKHAR A, DIMICCO JA. *Induction of Fos-immunoreactivity in the rat brain following disinhibition of the dorsomedial hypothalamus.* **Brain Res** 1200: 39-50, 2008.



# 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](#)