Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

ALANA TERCINO FRIAS

Envolvimento dos sítios de ligação benzodiazepínicos localizados na substância cinzenta periaquedutal dorsal de ratos nos efeitos ansiolítico e panicolítico causados pelo alprazolam.

Ribeirão Preto

2018

ALANA TERCINO FRIAS

Envolvimento dos sítios de ligação benzodiazepínicos localizados na substância cinzenta periaquedutal dorsal de ratos nos efeitos ansiolítico e panicolítico causados pelo alprazolam.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Hélio Zangrossi Júnior.

Ribeirão Preto

2018

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 a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada para a Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto /
USP

Frias, Alana Tercino

Envolvimento dos sítios de ligação benzodiazepínicos localizados na substância cinzenta periaquedutal dorsal de ratos nos efeitos ansiolítico e panicolítico causados pelo alprazolam. Ribeirão Preto, 2017.

LXXXV f.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Zangrossi Júnior, Hélio.

1. Pânico 2. Ansiedade 3. Substância cinzenta periaquedutal dorsal 4. Benzodiazepínico 5. Receptor GABA_A

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alana Tercino Frias

Envolvimento dos sítios de ligação benzodiazepínicos localizados na substância cinzenta periaquedutal dorsal de ratos nos efeitos ansiolítico e panicolítico causados pelo alprazolam.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior

Instituição: FMRP - USP Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Alline Cristina de Campos

Instituição: FMRP - USP Assinatura: _____

Dr. Pedro Henrique Gobira Nunes

Instituição: FCFRP - USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Leandro José Bertoglio

Instituição: CCB - UFSC Assinatura: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Marcos e Jucélia, por não medirem esforços para me ajudarem a chegar onde estou. Este trabalho também é de vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Hélio Zangrossi Júnior pela oportunidade, apoio, confiança e ensinamentos desde a minha iniciação científica até o presente momento. Obrigada por ser um exemplo de pesquisador íntegro e por sempre se preocupar em nos ensinar.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Alline Cristina de Campos, Dr. Pedro Henrique Gobira Nunes, Prof. Dr. Leandro José Bertoglio, por aceitarem o convite, pela prontidão e disponibilidade. Agradeço desde já pelas enriquecedoras sugestões e discussões.

Aos demais professores do Departamento de Farmacologia e também de outros departamentos, que de alguma forma contribuíram para este trabalho e também para a minha formação acadêmica.

Aos funcionários da SPG, da FMRP e do Departamento de Farmacologia. Agradeço em especial aos amigos da secretaria: Gislaine Pedroso de Moraes Marques e José Waldick Ramon. Aos técnicos: Eleni Luiza Tamburus Gomes, Tadeu Franco Vieira, Diva Amábile Montanha de Souza, Marcos Antônio de Carvalho. Aos colegas do biotério: Eliana Beatriz Castrechini de Barros, Marco Antônio Ribeiro da Silva, Orlando Mesquita Júnior. Todos vocês fizeram este trabalho acontecer. Obrigada pela paciência e prontidão em sempre me ajudar no que fosse preciso.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível realizar este trabalho.

Ao técnico e amigo Afonso Paulo Padovan, que fez o possível e o impossível para me ajudar e ensinar tudo que foi preciso durante esses 4 anos não só no laboratório, mas também na vida. Obrigada por muitas vezes ser como um pai para mim, me ensinar a consertar as coisas quebradas em casa e me aguentar desabafando sobre os pequenos problemas da vida.

À todos os amigos do laboratório de Farmacologia do Comportamento, os que ainda fazem parte do grupo e os que já foram embora: Ailton Spiacci Júnior, Ana Beatriz Sant'Ana do Nascimento, Daiane dos Santos Rosa, Gabriel Gripp Fernandes, Heloisa Helena Vilela-Costa, Isabela Galante, Leonardo Daniel Mendes, Mariana Lanza, Melina Matthiesen, Paula Shimene de Melo Yamashita e Thathiane de Oliveira Sérgio. Todos vocês contribuíram para a formação da pessoa que sou hoje dentro e fora do laboratório. Muito obrigada.

Em especial à Heloísa, à Ana Beatriz e ao Leonardo. Obrigada por rirem comigo, me ajudarem, me aguentarem e serem como uma família em todos os momentos. Não tenho palavras para descrever o carinho que tenho por vocês. Vocês são pessoas maravilhosas e, com certeza, fizeram esses anos serem mais leves e suportáveis.

Aos amigos e colegas da FMRP, que compartilham comigo as angústias e as felicidades da pós-graduação. Seriam muitos nomes para colocar aqui, mas todos de algum maneira contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

Aos amigos e futuros companheiros de laboratório (assim espero!) Jhonathan, Matheus e Paloma. O pouco que convivemos trouxe muita alegria e companheirismo para minha vida. Espero que possamos compartilhar muitos momentos nos próximos anos.

Aos amigos de fora do meio acadêmico: Vivi, Camila, Heitor, Biro, Dalbert, Tets, Gigio, Murilo, Xexa e Mushu. Obrigada por sempre me deixarem ser suporte, por jogarem *ranked* comigo e por sempre tornarem minha semana mais alegre.

À todos da minha família, que mesmo distante, sempre me deram apoio e me ajudaram quando eu precisei. Ao meu avô Nelson, minha eterna saudade, e à minha avó Virgínia, que fizeram/fazem tudo para me ver feliz. Às minhas tias Dani, Vânia e

Silvia, que eu tenho como mães e me ajudam a resolver as coisas que a distância complica.

À Cindy, à Sofia e ao Tavares, por me mostrarem a leveza que é viver.

À Elisete, Marina, André e Daniel, por me aceitarem como parte da família e darem apoio em diversos momentos.

Aos meus pais, Jucélia e Marcos. Obrigada por tudo que vocês fizeram e fazem por mim, pela educação que me deram e pelo apoio incondicional. Espero um dia poder retribuir tudo isso a vocês. Vocês não tem ideia do orgulho e do amor que eu tenho por vocês.

Ao meu companheiro, namorado e melhor amigo, Vitor Eduardo Berardi. Sem você eu já teria desistido e surtado há muito tempo. Nada do que eu possa escrever está à altura da gratidão que eu tenho por tudo que você faz por mim. Muito obrigada, amo você!

E finalmente, à Deus por todas as bênçãos, energias boas e pessoas maravilhosas que tenho na minha vida.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

RESUMO

Frias, Alana Tercino. **Envolvimento dos sítios de ligação benzodiazepínicos localizados na substância cinzenta periaquedutal dorsal de ratos nos efeitos ansiolítico e panicolítico causado pelo alprazolam.** 2018. LXXXV f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O transtorno do pânico (TP) é um transtorno de ansiedade caracterizado por ataques de pânico recorrentes e inesperados, com um prognóstico crônico. Entre as drogas utilizadas no tratamento do TP, os benzodiazepínicos (BZs) de alta potência, como o alprazolam e o clonazepam, apresentam a vantagem de serem eficazes logo no início do tratamento. Assim como outras drogas BZs, tais como o diazepam e o flurazepam, estes compostos também são empregados como ansiolíticos no tratamento de pacientes com transtorno de ansiedade generalizada. O mecanismo da ação primária dessas drogas ocorre pela interação com os sítios de ligação BZs presentes nos receptores do ácido gama-aminobutírico do tipo A (GABA_A), facilitando a neurotransmissão GABAérgica. Entretanto, ainda permanecem desconhecidos os substratos neurais envolvidos no efeito panicolítico causado pelos BZs. Dentre os substratos em potencial, a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD), uma estrutura mesencefálica criticamente relacionada à fisiopatogênica do TP, apresenta alta densidade de receptores GABA_A e de sítios de ligação BZs. Neste trabalho avaliamos o envolvimento do complexo receptor GABA_A/BZ presente na SCPD no efeito panicolítico promovido pela administração sistêmica de alprazolam em ratos Wistar. Para isso, empregamos o labirinto em T elevado (LTE), que além da resposta de fuga, que é associada ao pânico, também permite avaliar a resposta de esquiva inibitória, associada à ansiedade. Neste modelo, o alprazolam inibe a expressão da resposta de fuga, indicando efeito panicolítico e inibe a aquisição da esquiva inibitória, sugestivo de efeito ansiolítico. Além do LTE, também empregamos os modelos experimentais da hipóxia e o de Vogel, associados ao pânico e a ansiedade, respectivamente. Os resultados obtidos mostraram que o efeito panicolítico promovido pela administração sistêmica de alprazolam, observado na resposta de fuga do LTE, foi bloqueado pela administração intra-SCPD de flumazenil, antagonista dos sítios de ligação BZs, ou de bicuculina, antagonista dos receptores

GABA_A. No teste da hipóxia, o efeito panicolítico causado pela administração sistêmica de alprazolam foi inibido, porém não significativamente bloqueado, pela administração intra-SCPD de bicuculina. Já o efeito ansiolítico, observado na resposta de esquiva do LTE e no teste do beber punido de Vogel, não foi bloqueado pela administração intra-SCPD de flumazenil ou de bicuculina. No conjunto, nossos resultados sugerem que o complexo receptor GABA_A/BZ da SCPD está envolvido no efeito panicolítico, mas não ansiolítico, promovido pela administração sistêmica de alprazolam.

Palavras-chave: pânico; ansiedade; substância cinzenta periaquedutal dorsal; benzodiazepínico; receptor GABA_A.

ABSTRACT

Frias, Alana Tercino. **Involvement of the benzodiazepine binding sites in the dorsal periaqueductal gray matter of rats in the anxiolytic- and panicolytic-like effects promoted by alprazolam.** 2018. LXXXV f. Dissertação (Mestrado) – School of Medicine of Ribeirão Preto – University of São Paulo – Ribeirão Preto.

Panic Disorder (PD) is an anxiety disorder characterized by recurrent and unexpected panic attacks with a chronic prognosis. Among the drugs used to treat PD, high-potency benzodiazepines (BZs), such as alprazolam and clonazepam, have the advantage of causing significant effects early in the treatment. Like others BZs, such as diazepam and flurazepam, these compounds are also used as anxiolytics in the treatment of patients with generalized anxiety disorder. The primary mechanism of action of these drugs is the interaction with BZs binding sites present at gamma-aminobutyric acid type A receptors (GABA_A), facilitating GABAergic neurotransmission. However, it remains yet unknown the neural substrates involved in the panicolytic-like action caused by BZs. Among the potential substrates, the dorsal periaqueductal gray matter (DPAG), a mesencephalic structure critically associated with the physiopathology of PD, presents a high density of GABA_A receptors and of BZs binding sites. In this work, we evaluated the participation of the GABA_A/BZ receptor complex present in the DPAG in the panicolytic-like effect caused by systemic administration of alprazolam in *Wistar* rats. For this, we use the elevated T-maze (ETM), that besides the escape response which is associated with panic, also allows the measurement of inhibitory avoidance acquisition, which has been related to anxiety. In this model, alprazolam inhibits the expression of escape, indicating a panicolytic-like effect and inhibits the acquisition of inhibitory avoidance, suggestive of an anxiolytic effect. In addition to the ETM, animals were also tested in the hypoxia and Vogel's conflict tests, which have been associated with panic and anxiety, respectively. The results showed that the panicolytic-like effect caused by alprazolam in ETM's escape response was blocked by intra-DPAG injection of flumazenil, a BZs binding site antagonist, or bicuculline, a GABA_A receptor antagonist. In the hypoxia test, the panicolytic-like effect caused by alprazolam was inhibited, but not significantly blocked, by intra-DPAG injection of bicuculline. The anxiolytic effect observed in the

ETM's avoidance task or in the Vogel's conflict test was not blocked by intra-DPAG injection of flumazenil or bicuculline. Taken together, our results suggest that the GABA_A/BZ receptor complex located in the DPAG is involved in the panicolytic, but not anxiolytic, effect caused by systemic administration of alprazolam.

Keywords: panic; anxiety; periaqueductal gray matter; benzodiazepine; GABA_A receptor.

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1. Transtornos de Ansiedade	15
1.2. Tratamento farmacológico do TP.....	16
1.3. Fisiopatologia do TP.....	18
1.4. Neurotransmissão serotoninérgica e GABAérgica na SCPD e o TP.	21
2. Objetivos.....	27
2.1. Objetivo Geral.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. Material e Métodos.....	29
3.1. Animais	29
3.2. Drogas	29
3.3. Aparatos Experimentais	29
3.3.1. Labirinto em T Elevado	29
3.3.2. Campo Aberto	30
3.3.3. Teste do beber punido de Vogel	31
3.3.4. Teste de hipóxia.....	31
3.4. Procedimentos	32
3.4.1. Cirurgia estereotáxica	32
3.4.2. Habituação	33
3.4.3. Injeções de drogas na SCPD.....	33
3.5. Análises comportamentais	34
3.6. Perfusão e análise do sítio de injeção.....	37
3.7. Análises Estatísticas	38
4. Resultados	40
5. Discussão.....	57
7. Referências Bibliográficas.....	68

Introdução

1. Introdução

1.1. Transtornos de Ansiedade

A ansiedade é um estado emocional de antecipação de uma ameaça futura. Ela se difere do medo por ser frequentemente associada a tensão muscular, vigilância e comportamentos de cautela ou esquiva, enquanto que o medo é mais frequentemente associado a períodos de excitabilidade autonômica aumentada, necessária para luta ou fuga, e pensamentos de perigo imediato (APA, 2013). Ambas emoções apresentam um valor adaptativo, uma vez que preparam o indivíduo para uma situação futura. Porém, a persistência e a expressão exacerbada da ansiedade e do medo prejudicam a performance do indivíduo, tornando-se uma ansiedade patológica (CRASKE; STEIN, 2016; GRAEFF, 1999)

A classificação dos diferentes transtornos de ansiedade sofreu muitas modificações ao longo do século XX. Inicialmente, os critérios de classificação empregados eram muito subjetivos, o que levava a acentuadas discordâncias entre diferentes observadores (GRAEFF, 1999). A Associação Americana de Psiquiatria (APA), com o objetivo de tornar mais clara a classificação e auxiliar no diagnóstico dos transtornos de ansiedade, elaborou alguns critérios operacionais baseados nos sintomas. A quinta edição do Manual de Diagnóstico e Estatísticas das Doenças Mentais (DSM-V), publicado em 2013, classifica os transtornos de ansiedade em: transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobia social, transtorno do pânico (TP), transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade induzido por substâncias ou medicamentos, transtornos de ansiedade devido à condição médica, transtorno de ansiedade com outras especificações e transtorno de ansiedade não especificado (APA, 2013).

Dentre os transtornos de ansiedade, o TP é o de maior relevância para o presente trabalho. Ele é caracterizado pela ocorrência de ataques de pânico inesperados e recorrentes, que podem levar a preocupações acerca da ocorrência de novos ataques. Durante um ataque de pânico, o indivíduo vivencia sensações de intenso medo e desconforto, que atingem seu pico em poucos minutos e são acompanhadas de quatro ou mais sintomas físicos e cognitivos, entre eles: taquicardia, medo de morrer, tonturas e falta de ar (APA, 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2015, cerca de 264 milhões de pessoas apresentavam algum transtorno de ansiedade ao redor do mundo, o que representa um aumento de 14,9% comparado a 2005 (OMS, 2017). Mais especificamente, em relação ao TP, diversos estudos demonstram que, na população mundial, a prevalência varia entre 1,7% e 5,6% ao longo da vida (DE JONGE et al., 2016; KESSLER et al., 2006; MONDIN et al., 2013; PIRES et al., 2014). Trata-se de uma doença crônica, que exerce um impacto negativo na vida social, familiar e ocupacional dos pacientes (MARCHESI, 2008; SALUM et al., 2009).

1.2. Tratamento farmacológico do TP

O tratamento do TP pode ser realizado através de terapias cognitivo-comportamentais e/ou com o uso de fármacos. O tratamento farmacológico é realizado com drogas antidepressivas, principalmente os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), e benzodiazepínicos (BZs) de alta potência, como o alprazolam e o clonazepam (BALDWIN et al., 2014).

Os ISRS foram desenvolvidos na década de 1970 em um contexto de síntese racional, uma vez que o papel da serotonina (5-HT) na depressão começava a ser demonstrado (LÓPEZ-MUÑOZ; ALAMO, 2009). Ensaios clínicos da época relatavam que pacientes depressivos apresentavam menores níveis de 5-HT e de seu metabólito em diversas áreas cerebrais, suportando o que eles chamavam de a “hipótese serotoninérgica da depressão” (COPPEN, 1967). Apesar de desenvolvidos para tratar a depressão, estes fármacos se mostraram efetivos também para tratar os transtornos de ansiedade (LÓPEZ-MUÑOZ; ALAMO, 2009)

O mecanismo primário de ação dos ISRS consiste em bloquear o transportador de 5-HT, impedindo a sua recaptação e consequentemente aumentando a disponibilidade desse neurotransmissor na fenda sináptica. Esse aumento de 5-HT disponível é observado logo após uma única administração (BYMASTER et al., 2002; FULLER, 1994; KOCH et al., 2002). No entanto, o efeito terapêutico é visto apenas com o tratamento contínuo e prolongando, sugerindo que alterações plásticas decorrentes do aumento da 5-HT sejam necessárias para que o efeito terapêutico ocorra (para uma revisão do tema ver Miller e Hen, 2015).

Devido à baixa capacidade de causar tolerância e dependência, os ISRS são considerados a primeira linha de tratamento para o TP (BALDWIN et al., 2014). No entanto, esses fármacos podem apresentar alguns efeitos adversos relevantes, como diarreia, sudorese, náusea e disfunção sexual (KASPER; RESINGER, 2001). Ademais, a demora para que se observe a melhora clínica pode ser acompanhada de uma piora inicial do quadro do paciente, o que faz com que diversos pacientes abandonem o tratamento antes de se estabelecer o efeito terapêutico (GRIEBEL; HOLMES, 2013; JOHNSON, 2005).

Os BZs de alta potência apresentam a vantagem sobre os ISRS de terem efeito agudo (HOFFMAN; MATHEW, 2008) e são indicados principalmente no início do tratamento (CHOUINARD, 2006). Diversos estudos demonstram que não existe diferença entre os BZs e os ISRS quanto à eficácia (KASPER; RESINGER, 2001). No entanto, o uso prolongado de BZs é desencorajado, uma vez que eles apresentam o risco de dependência, elevado potencial de abuso, risco de *overdose* quando associado a outros depressores do sistema nervoso central e desencadeamento de tolerância se administrados continuamente (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2011).

A principal diferença entre o alprazolam e o clonazepam para os demais BZs é que eles possuem uma maior afinidade pelo sítio de ligação BZ no receptor GABAérgico (KASPER; RESINGER, 2001; SODERPALM, 1987). Para o tratamento do TP, as doses requeridas de BZ são maiores do que as necessárias para tratar o transtornos de ansiedade generalizada (GRIFFIN et al., 2013) e, apesar de alguns estudos demonstrarem a eficácia de outros BZs, como o diazepam no tratamento do TP (NOYES et al., 1996; DUNNER et al., 1986), as doses necessárias de alprazolam e clonazepam são menores, o que faz com que as manifestações dos efeitos adversos sejam também menores (para mais detalhes ver Kasper e Resinger, 2001).

O mecanismo de ação primário dos BZs ocorre pela ligação destes compostos com um sítio alostérico presente no receptor ionotrópico GABA_A, que culmina em um aumento na frequência de abertura dos canais de cloreto, mediante a facilitação da ligação do agonista endógeno GABA (ácido γ -aminobutírico; SAMARDZIC; SVOB, 2016). Assim, de maneira sucinta, a ativação do sítio de ligação BZ potencializa a hiperpolarização da membrana, que é decorrente do aumento da condutância dos canais de cloreto promovido pelo GABA (ZORUNSKI et al., 1991). O receptor GABA_A

é um receptor ionotrópico com diferentes isoformas, formado pela combinação de 5 subunidades (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, π , θ , δ), que diferem quanto a localização e a responsividade (MÖHLER, 2011; NUSS, 2015; SAMARDZIC; SVOB, 2016). A ligação dos BZs depende da presença das subunidades α 1,2,3 ou 5 e γ 2 (BARNARD et al., 1998), sendo que cada uma está relacionada com algum efeito clínico específico dos BZs (GRIFFIN et al., 2013; MÖHLER, 2011; NUSS, 2015). Por exemplo, a subunidade α 1, que está presente em 60% dos receptores GABA_A responsivos aos BZs, está amplamente distribuída em todo o encéfalo (PIRKER et al., 2000) e é relacionada aos efeitos sedativos dessas drogas (MCKERNAN et al., 2000; RUDOLPH et al., 1999). Já as subunidades α 2 e α 3, que estão mais localizadas em estruturas implicadas na regulação do comportamento (PICKER et al., 2000), são relacionadas ao efeito ansiolítico dos BZs (para mais detalhes ver Möhler, 2011).

1.3. Fisiopatologia do TP

Os estudos das regiões encefálicas reguladoras do comportamento são de extrema importância para o entendimento dos transtornos psiquiátricos e das drogas utilizadas na clínica, bem como para o desenvolvimento de novos fármacos mais efetivos e com menos efeitos adversos. Algumas estruturas, como o complexo amigdalóide e a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) são cruciais na regulação das respostas relacionadas à ansiedade e ao TP. Estudos comportamentais utilizando animais de laboratórios, principalmente roedores, contribuíram muito para o que se sabe sobre a importância e o papel dessas estruturas na fisiopatologia dos transtornos de ansiedade (CARVALHO-NETO, 2009). Eles são baseados em diferentes reações de defesa expressas por animais frente a uma ameaça e serão descritos resumidamente neste tópico.

O estudo do comportamento animal frente às situações aversivas visando entender os diferentes transtornos psiquiátricos é baseado na perspectiva evolutiva proposta por Charles Darwin em seu livro “A expressão das emoções nos homens e nos animais” (1872). Ele propôs que assim como as características físicas, as estratégias comportamentais e a expressão das emoções teriam uma característica hereditária.

As diferentes estratégias de defesa expressas por roedores foram extensamente estudadas pelo casal Caroline e Robert Blanchard, na Universidade do Havaí. Eles realizaram diversos estudos comportamentais, utilizando ratos selvagens e de laboratório, e propuseram que as estratégias de defesa poderiam ser classificadas em diferentes níveis, de acordo com a proximidade da ameaça. No primeiro nível, a ameaça (no caso, um predador) é dita como potencial, ou seja, a ameaça não está presente no ambiente em que se encontra o rato, mas existem pistas de que o predador já esteve ali, como cheiro, pistas visuais e/ou sons indicativos, fazendo com que o animal expresse comportamentos de avaliação de risco. Esses comportamentos também podem ser observados quando o animal é exposto a um ambiente novo, onde ele não sabe o que vai encontrar. No segundo nível, a ameaça está presente, mas a uma distância segura do rato, sendo o comportamento de fuga orientada ou de imobilidade adotados, dependendo da existência ou não de uma rota de fuga viável. Já quando a ameaça está próxima, o animal adota um comportamento de fuga explosiva e desorientada ou ataques defensivos (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988, 2008; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001).

Em humanos, a expressão das emoções é mais variada e complexa, devido à influência cultural. Entretanto, estudos têm identificado semelhanças nas estratégias de defesa adotadas por humanos quando comparados com roedores (SHUHAMA et al., 2007). Blanchard e colaboradores (2001) no Havaí e Shuhama e colaboradores (2008) no Brasil realizaram estudos utilizando cenários imaginários contendo diferentes situações ameaçadoras, onde os voluntários foram orientados a escolher qual resposta defensiva seria mais adequada para a situação. Assim como nos estudos envolvendo roedores, a resposta escolhida correspondeu ao nível da ameaça; por exemplo, em uma situação onde a ameaça era real e intensa, os voluntários escolhiam uma reação de fuga (BLANCHARD et al., 2001; SHUHAMA et al., 2008).

As diferentes estratégias de defesa tem sido associadas à diferentes substratos neurais tanto em humanos quanto em animais. Brevemente, quando uma ameaça é potencial e/ou distal e o animal expressa comportamentos de avaliação de risco e/ou congelamento (BLANCHARD et al., 1986; 1993), ocorre a ativação de estruturas como o complexo amigdalóide, o sistema septo-hipocampal e o córtex pré-frontal, os quais estão relacionados à ansiedade (GRAY; MCNAUGHTON, 2000; MCNAUGHTON;

CORR, 2004). Por outro lado, quando a ameaça é proximal, ocorre uma resposta de fuga explosiva (BLANCHARD et al., 1986; 1993), que leva à ativação de estruturas como a SCPD, relacionada por sua vez, com a resposta de pânico, como descrito logo abaixo (GRAEFF, 2002; NASHOLD et al., 1969).

De interesse para este trabalho, a substância cinzenta periaquedutal é uma estrutura mesencefálica localizada ao redor do aqueduto, dividida em quatro colunas: dorsomedial, dorsolateral, ventrolateral e lateral (BANDLER et al., 2000). Evidências obtidas nos últimos 60 anos associam as duas primeiras colunas, comumente denominadas de SCPD, à fisiopatologia do TP (GRAEFF 2002; 2003). Por exemplo, Nashold e colaboradores (1969) observaram que pacientes acordados submetidos à neurocirurgia para alívio da dor, quando tinham uma região encefálica que compreende a SCPD estimulada, relatavam sensações de intenso medo e terror, além de apresentarem alterações autonômicas como taquicardia e sudorese (NASHOLD et al., 1969). Em animais, a estimulação da SCPD promove um aumento da vocalização e/ou uma resposta de fuga intensa, enquanto que a estimulação da porção ventrolateral promove apenas imobilidade (BANDLER; CARRIVE, 1988; BANDLER; DEPAULIS, 1988). Essas respostas observadas em humanos e em animais, pela estimulação da SCPD, têm sido associadas com os sintomas de um paciente durante um ataque de pânico (JENCK; MOREAU; MARTIN, 1995; SCHENBERG, 2001; 2011; SCHENBERG et al., 2014).

Em consonância, estudos utilizando técnicas de neuroimagem em humanos demonstraram que pacientes com TP apresentam anormalidades estruturais e funcionais da SCPD (DEL-BEN; GRAEFF, 2009; PROTOPOPESCU et al., 2006; UCHIDA et al., 2008). Além disso, essas alterações possuem uma relação direta com o número de ataques de pânico vivenciados pelo paciente (DEL-BEN; GRAEFF, 2009). Mais especificamente, Sakai e colaboradores (2005; 2006) demonstraram, utilizando a técnica de tomografia por emissão de pósitrons (PET), que pacientes com TP apresentam um aumento no consumo de glicose em diferentes regiões, inclusive na SCPD (SAKAI et al., 2005a; 2005b). Após o tratamento com a terapia cognitivo comportamental, onde se observa uma diminuição considerável dos ataques de pânico, eles encontraram uma correlação positiva entre a porcentagem de mudança na utilização de glicose pela região “ao redor da SCPD” e a frequência de ataques de pânico (SAKAI et al., 2006).

A SCPD é inervada por redes complexas de vias aferentes e eferentes, relacionadas a diferentes funções desempenhadas por essa estrutura (BEHBEHANI, 1995). Dentre elas, as vias serotoninérgicas e GABAérgicas têm sido amplamente estudadas quanto a suas participações na fisiopatologia do TP.

1.4. Neurotransmissão serotoninérgica e GABAérgica na SCPD e o TP.

Ao longo da história, diversos trabalhos se dedicaram a estudar o papel da 5-HT na ansiedade, devido ao fato de que o mecanismo de ação de fármacos antidepressivos envolve a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica (GRAEFF, 2002; GRIEBEL, 1995; GUIMARÃES et al. 2010). Por muito tempo, o seu papel na ansiedade foi visto como um paradoxo. Resumidamente, estudos utilizando testes de conflito, que são testes de ansiedade baseados na recompensa e punição, ou seja, um determinado comportamento é ao mesmo tempo recompensado e punido, o que gera um conflito do tipo esquiva-aproximação (GELLER; SEFTER, 1960), demonstravam que a 5-HT exercia um papel de aumentar a ansiedade. No entanto, o mesmo não era observado em testes que utilizavam o modelo da estimulação elétrica da SCPD. Nesse modelo, a 5-HT apresentou um papel de inibir a resposta de fuga, caracterizado como uma diminuição da ansiedade (para revisão ver GRAEFF, 2003).

Na tentativa de explicar esse paradoxo, em 1991, os pesquisadores Bill Deakin e Frederico Graeff propuseram uma teoria para explicar o papel dual da 5-HT. Eles se basearam nos estudos das diferentes estratégias de defesa realizados pelo casal Blanchard, descritos anteriormente, que fundamentaram a relação entre a ameaça potencial, as respostas que envolvem conflito e a ansiedade e entre a ameaça proximal, a resposta de fuga e o pânico. (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988, 1989; BLANCHARD; FLANNELLY; BLANCHARD, 1986; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003; BLANCHARD et al., 1993). Deakin e Graeff propuseram o papel crítico de três estruturas na regulação da ansiedade pela neurotransmissão serotoninérgica: o núcleo dorsal da rafe (NDR), o complexo amigdalóide e a SCPD.

O NDR é a principal fonte de inervação serotoninérgica tanto para o complexo amigdalóide quanto para a SCPD (AZMITIA; SEGAL, 1978). De acordo com a proposta de Deakin e Graeff, em uma situação de ameaça potencial, o NDR é ativado, resultando na liberação de 5-HT para essas estruturas. No complexo amigdalóide, a

ativação da neurotransmissão serotoninérgica desencadearia estratégias de defesa cautelosas, como a avaliação de risco, enquanto na SCPD, inibiria as reações de fuga, evitando que comportamentos extremos sejam adotados quando a ameaça é incerta ou distante (DEAKIN; GRAEFF, 1991).

A fim de comprovar essa teoria em laboratório, foi desenvolvido o modelo do labirinto em T elevado (LTE). Este modelo é baseado no medo inato que roedores possuem de locais elevados e desprotegidos e possibilita avaliar em um mesmo animal dois comportamentos distintos: a esquiva inibitória e a fuga (GRAEFF, 1999; 2004; PINHEIRO et al., 2008). Drogas utilizadas na clínica para tratar o transtorno de ansiedade generalizada inibem a resposta de esquiva inibitória, enquanto que as drogas usadas para o tratar o TP inibem a resposta de fuga (para revisão ver Zangrossi e Graeff, 2010; 2014).

Utilizando esse modelo, diversos trabalhos reforçam o papel da neurotransmissão serotoninérgica da SCPD na fisiopatologia do TP e do complexo amigdalóide na fisiopatologia do transtorno de ansiedade generalizada, bem como no efeito dos fármacos utilizados na clínica para tratar esses transtornos (para revisão ver Graeff e Zangrossi, 2010). Brevemente, a administração intra-SCPD de 5-HT, bem como de agonistas dos receptores serotoninérgicos do tipo 1A (5-HT_{1A}) e 2A (5-HT_{2A}), 8-OHDPAT e DOI, respectivamente, prejudicam a resposta de fuga de animais submetidos ao LTE (DE PAULA SOARES; ZANGROSSI, 2004; ZANOVELI; NOGUEIRA; ZANGROSSI, 2003). Já no núcleo basolateral do complexo amigdalóide (BLA), a administração de 5-HT e do agonista de receptores serotoninérgicos do tipo 2C (5-HT_{2C}), o MK212, promove uma facilitação da aquisição da esquiva inibitória (VICENTE; ZANGROSSI, 2012). Esses achados sugerem que diferentes receptores estão envolvidos nas respostas eliciadas pelo BLA e pela SCPD, mas que enquanto na primeira região a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica promove um efeito do tipo ansiogênico, na última ocasiona efeito panicolítico, como proposto pela teoria de Deakin e Graeff (1991).

A neurotransmissão serotoninérgica da SCPD tem sido implicada no efeito panicolítico causado pela administração de antidepressivos. A administração crônica e sistêmica de fluoxetina e sertralina, antidepressivos ISRS, e de imipramina, um antidepressivo tricíclico, potencializa o efeito panicolítico promovido pela administração intra-SCPD de 8-OHDPAT e DOI no LTE (ZANOVELI; NOGUEIRA;

ZANGROSSI, 2007) e no modelo de estimulação elétrica da SCPD (DE BORTOLI; NORGUEIRA; ZANGROSSI, 2006; JACOB et al., 2002;). Além disso, Zanoveli e colaboradores (2010) demonstraram, utilizando a técnica de microdiálise, que a administração crônica de fluoxetina aumenta os níveis extracelulares de serotonina na SCPD, sugerindo que o efeito antipânico da fluoxetina seja decorrente da facilitação da neurotransmissão serotoninérgica nessa estrutura (ZANOVELI et al., 2010).

Além de neurônios serotoninérgicos, a SCPD também é rica em interneurônios GABAérgicos, responsáveis pela regulação de outras neurotransmissões, e apresenta alta densidade de isoformas dos receptores GABA_A responsivos aos BZs (complexo receptor GABA_A/BZ; BARBARESI, 2005; GRIFFITHS; LOVICK, 2005; LOVICK; PAUL, 1999). De maneira similar ao observado com a neurotransmissão serotoninérgica, drogas que facilitam a neurotransmissão GABAérgica, como o midazolam (agonista dos sítios BZ), o muscimol (agonista dos receptores GABA_A) e o bacofleno (agonista dos receptores GABA_B), quando administrados intra-SCPD, também promovem um efeito do tipo panicolítico no LTE, sem alterar a resposta de esquiva inibitória neste teste (BUENO et al., 2005), sugerindo o envolvimento da neurotransmissão GABAérgica na regulação do comportamento relacionado ao pânico.

Diferente do que se observa com a administração intra-SCPD de antagonistas dos receptores serotoninérgicos, a administração intra-SCPD de antagonistas GABAérgicos por si só promove um efeito contrário daquele relatado com os agonistas, ou seja, facilita a expressão do comportamento de fuga (BRANDÃO et al., 2005; CASAROTO et al., 2010; DE OLIVEIRA SERGIO; DE BORTOLI; ZANGROSSI, 2011), o que sugere que os receptores GABAérgicos nessa estrutura são estimulados de maneira tônica. De Oliveira Sergio (2011) demonstrou, por sua vez, que as duas neurotransmissões podem interagir entre si. Estes pesquisadores observaram que a administração prévia intra-SCPD de bicuculina, antagonista dos receptores GABA_A, bloqueou o efeito panicolítico desencadeado pela ativação dos receptores 5-HT_{2A} no modelo de estimulação elétrica da SCPD. Os autores atribuem este resultado ao fato de que os receptores 5-HT_{2A} estejam localizados em interneurônios GABAérgicos, e ao serem ativados inibem o comportamento de fuga desencadeado pela ativação da SCPD (DE OLIVEIRA SERGIO; DE BORTOLI; ZANGROSSI, 2011). Ademais, a administração crônica e sistêmica de alprazolam potencializa o efeito panicolítico

decorrente da administração intra-SCPD de doses subeficazes dos agonistas serotoninérgicos 8-OHDPAT e DOI, no modelo de estimulação elétrica da SCPD (DE BORTOLI; NOGUEIRA; ZANGROSSI, 2008).

Diferente do que já foi demonstrado quanto ao envolvimento da SCPD no efeito antipânico dos antidepressivos, não se sabe se esta estrutura está envolvida também no efeito antipânico promovido pela administração sistêmica de BZs de alta potência, como o alprazolam.

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar a participação do complexo receptor GABA_A/BZ localizado na SCPD no efeito panicolítico causado pela administração sistêmica de alprazolam, utilizando-se o teste do LTE. O emprego deste teste permite ainda avaliar se ocorre o envolvimento diferencial desse complexo receptor no efeito ansiolítico do alprazolam. A hipótese é que o efeito panicolítico, mas não o ansiolítico, observado após o tratamento sistêmico com o alprazolam seja decorrente da ativação do complexo receptor GABA_A/BZ presente na SCPD.

De acordo com os resultados obtidos, também foi utilizado o teste do beber punido de Vogel, a fim de avaliar generalidade da resposta encontrada no LTE quanto à ansiedade. Este modelo evoca um conflito do tipo aproximação-esquiva nos animais. Brevemente, o animal é privado de água e submetido a uma caixa onde se encontra um bebedouro de água. No entanto, a cada 20 lambidas, o animal é punido com um choque na língua, causando o conflito entre a motivação para beber água e a punição pelos choques. Testes de conflito são extensamente utilizados como modelos de ansiedade (MILLAN; BROCCO, 2003).

Já o modelo de hipóxia foi utilizado para avaliar a generalidade dos nossos achados com a resposta de fuga no LTE. Este modelo, desenvolvido recentemente em nosso laboratório de pesquisa, consiste em submeter os animais à uma condição aversiva de hipóxia severa (7% de O₂), que leva o animal a expressar uma resposta de fuga. Spiacci e colaboradores (2015) demonstraram que a administração de drogas utilizadas na clínica para tratar o TP, como a fluoxetina e o alprazolam, diminuem a resposta de fuga desencadeada nesses animais (SPIACCI et al., 2015).

Nos estudos com o LTE, após a realização do teste, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto para avaliar a influência do tratamento farmacológico sobre a atividade locomotora.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o envolvimento do complexo receptor GABA_A/BZ localizado na SCPD no efeito panicolítico e ansiolítico promovido pela administração sistêmica de alprazolam.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar se o antagonismo farmacológico dos sítios de ligação BZs ou dos receptores GABA_A presentes na SCPD, através da injeção de flumazenil ou de bicuculina nesta estrutura, interfere com os efeitos ansiolítico e panicolítico causado pela administração intraperitoneal de alprazolam em ratos submetidos ao LTE;

- Verificar se o antagonismo dos receptores GABA_A presentes na SCPD, através da injeção de bicuculina, interfere com o efeito ansiolítico causado pela administração intraperitoneal de alprazolam no teste de beber punido de Vogel;

- Verificar se o antagonismo dos sítios de ligação BZs ou dos receptores GABA_A presentes na SCPD, através da injeção de flumazenil ou de bicuculina, interfere com o efeito panicolítico causado pela administração intraperitoneal de alprazolam no teste de hipóxia (Experimento 2).

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* (270 – 300 gramas, no início dos procedimentos experimentais) provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto. Os animais permaneceram no biotério do Laboratório de Farmacologia do Comportamento, onde ficaram alojados em caixas de polipropileno (38 x 32x 18 cm) forradas com serragem, tendo livre acesso à água e comida durante todo o procedimento (máximo de 5 animais por caixa). O biotério foi mantido com temperatura de $22\pm1^{\circ}\text{C}$ e com ciclos de claro-escuro de 12 horas, sendo o período iluminado das 7:00 às 19:00 horas com intensidade de 60 lux. Todos os procedimentos experimentais realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade de São Paulo (protocolo nº 114/2016).

3.2. Drogas

Alprazolam (EMS, Brasil), flumazenil (Tocris, EUA) e bicuculina (Sigma-Aldrich, EUA). O alprazolam e o flumazenil foram solubilizados em salina estéril 0,9% com 2% de Tween 80. Já a bicuculina foi solubilizada apenas em salina estéril 0,9%.

3.3. Aparatos Experimentais

3.3.1. Labirinto em T Elevado

O LTE é feito de madeira e consiste em três braços de dimensões iguais (50 x 12 cm), elevados a 50 cm do chão (Figura 1). Um dos braços é perpendicular aos outros dois e cercado por 40 cm de paredes altas, enquanto os outros dois são cercados por barreiras de acrílico de 1 cm de altura.

Figura 1: Labirinto em T elevado.

3.3.2. Campo Aberto

O campo aberto consiste em uma caixa quadrada (60 x 60 cm) com paredes de 30 cm de altura (Figura 2).

Figura 2: Teste do campo aberto

3.3.3. Teste do beber punido de Vogel

O aparato empregado no teste fica dentro de uma caixa acústica e é composto por uma caixa de acrílico transparente (42 x 25 x 20 cm), que possui uma grade metálica no assoalho e um bebedouro de água acoplado que projeta um bico também metálico em seu interior (Figura 3).

O contato do animal com o bico e o assoalho fecha um circuito elétrico controlado por um sensor (Insight, Brasil) que produz 7 pulsos/s quando o animal está em contato com os dois componentes. Cada pulso é considerado uma lambida e a cada 20 lambidas o animal recebe, do bico, um choque elétrico de 0,5 mA, durante dois segundos. O sensor registra o número de lambidas e choques durante o período do teste.

Figura 3: Teste do beber punido de Vogel

3.3.4. Teste de hipóxia

A câmara de hipóxia é constituída por uma arena cilíndrica (25 cm de diâmetro) com paredes de acrílico transparente (35 cm de altura), vedada hermeticamente (Figura 4), contendo 2 válvulas localizadas na parte superior, sendo uma das válvulas conectada à uma fonte de gás nitrogênio (N_2), acionada para reduzir a concentração de oxigênio (O_2) dentro da câmara. Na outra válvula está acoplado um analisador de gás (Gas Analyzer ML206, Ad Instruments, Australia), que monitora continuamente as concentrações O_2 e dióxido de carbono (CO_2) dentro da câmara de hipóxia.

Figura 4: Câmara de Hipóxia

3.4. Procedimentos

3.4.1. Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol 2,5% (10ml/kg, i.p.; Sigma-Aldrich, EUA) associado com anestesia local de lidocaína 2% (Novocol 100, S.S. White-Brasil). Após indução anestésica, os animais foram fixados no estereotáxico para implante de cânulas-guia de aço inoxidável (12 mm de

comprimento, 0,6 mm de diâmetro) objetivando a SCPD, de acordo com as coordenadas (PAXINO; WATSON, 2007): barra do incisivo fixa em -2,5 mm, ângulo de 22°, lateral +1,9 mm tendo o lambda como referência e dorsoventral -3,2 mm. Em seguida, as cânulas foram fixadas à calota craniana por meio de resina acrílica e parafusos de aço inoxidável. Mandris de aço inoxidável foram introduzidos nas cânulas para evitar entupimento até a realização do experimentos. Por fim, os animais receberam uma associação antibiótica de amplo espectro (0,2ml/animal, i.m; Pentabiótico, Fontoura-Wyeth-Brasil), a fim de prevenir possíveis infecções. Além disto, foi administrado um agente analgésico com atividade anti-inflamatória e antipirética, fluxinina meglumina (2,5 mg/kg/ml, s.c.; 3 doses, uma a cada 12 horas).

3.4.2. Habituação

Dois dias antes da sessão de teste no LTE, cada animal foi levado a sala de teste e manuseado pelo experimentador durante 5 minutos e, em seguida, foi colocado em uma caixa de acrílico forrada com serragem, também durante 5 minutos. Esta mesma caixa foi utilizada no dia do teste como coadjuvante na execução do experimento.

A luminosidade da sala foi mantida com intensidade de 60 lux e um ruído constante foi fornecido pelo exaustor de ar e pelo ar condicionado.

3.4.3. Injeções de drogas na SCPD

No dia do teste, a injeção intra-SCPD foi realizada pela inserção de uma agulha odontológica (0,6mm de diâmetro externo; 14 mm de comprimento) na cânula-guia. A agulha odontológica foi conectada a uma seringa (Hamilton 7000/701) através de um tubo de polietileno (PE-10), preenchido com água destilada. O controle do volume e do tempo de injeção (0,2µl ou 0,5µl/2min) foi realizado por uma bomba microinjetora digital (modelo 55-2222, Harvard Apparatus). Para verificar se a droga foi realmente injetada foi utilizado, como referência, o deslocamento de uma bolha de ar no polietileno.

3.5. Análises comportamentais

3.5.1. Experimento 1: envolvimento do complexo receptor GABA_A/BZ presente na SPCD no efeito promovido pela administração intraperitoneal de alprazolam no LTE, no campo aberto e no teste do beber punido de Vogel

Após a última sessão de habituação, os braços abertos do LTE foram separados por uma parede de maneira posicionada no centro do labirinto. Cada animal foi exposto individualmente, por trinta minutos, à um dos braços abertos do LTE, a fim de reduzir reações comportamentais neofóbicas e potencializar a expressão do comportamento de fuga (para mais detalhes ver Teixeira, Zangrossi e Graeff, 2000).

Vinte e quatro horas após a pré-exposição e após sorteio prévio, os animais receberam, no experimento 1A, injeção intra-SCPD de flumazenil (80nmol/0,5µl) ou de veículo e, dez minutos após, injeção intraperitoneal de alprazolam (4 mg/kg/ml) ou veículo. Desta maneira, os seguintes grupos experimentais foram formados: veículo/veículo (n=15), veículo/alprazolam (n=15), flumazenil/veículo (n=8) e flumazenil/alprazolam (n=10).

Trinta minutos após o tratamento periférico, os animais foram colocados na extremidade distal do braço fechado e a latência de saída deste braço, com as quatro patas, foi cronometrada por três vezes consecutivas (LB, E1 e E2). Posteriormente, foi verificada a latência de fuga dos animais de um dos braços abertos do labirinto (o mesmo ao qual ele foi pré-exposto no dia anterior). O tempo de saída deste braço, com as quatro patas, também foi cronometrado por três vezes consecutivas (F1, F2 e F3). Entre cada uma das tentativas (esquiva e fuga) foram respeitados intervalos de 30 segundos, durante os quais os animais foram mantidos na caixa utilizada no procedimento de habituação. O tempo máximo para a realização de cada tarefa foi de 5 minutos.

As doses utilizadas de alprazolam e flumazenil foram escolhidas com base em estudos prévios realizados por Sant'Ana et al, 2016 e Lopes, 2010.

No experimento 1B, um grupo distinto de animais recebeu o mesmo tratamento descrito acima, formando os seguintes grupos: veículo/veículo (n=9),

veículo/alprazolam (n=10), flumazenil/veículo (n=9) e flumazenil/alprazolam (n=7). A diferença neste experimento foi que, após trinta minutos da injeção periférica, os animais foram submetidos apenas a tarefa de fuga, a fim de avaliar somente a resposta relacionada ao comportamento de pânico nesses animais. Para tal, os animais foram colocados diretamente na extremidade distal do braço aberto ao qual eles foram pré-expostos no dia anterior e a latência de fuga desse braço foi cronometrada por seis vezes consecutivas (F1, F2, F3, F4, F5 e F6). Também foi respeitado um intervalo de 30 segundos entre cada tarefa e o tempo máximo foi de 5 minutos.

No experimento 1C, os animais receberam, após sorteio prévio, a injeção intra-SCPD de bicuculina (5 pmol/0,2µl) e, dez minutos após, a injeção intraperitoneal de alprazolam (4 mg/kg/ml), formando os grupos: veículo/veículo (n=10), veículo/alprazolam (n=7), bicuculina/veículo (n=9) e bicuculina/aprazolam (n=7). Passado 30 minutos, os animais foram primeiramente colocados na extremidade distal do braço fechado e a latência de saída deste braço, com as quatro patas, foi cronometrada por três vezes consecutivas (LB, E1 e E2). Em seguida, os animais foram colocados na extremidade distal do braço aberto (o mesmo a qual ele foi pré-exposto no dia anterior) e a latência de saída deste braço foi cronometrada por 6 vezes consecutivas (F1, F2, F3, F4, F5 e F6). Novamente, o tempo máximo de realização de cada tarefa foi de 5 minutos e se respeitou um intervalo de 30 segundos entre cada tarefa.

A dose utilizada de bicuculina foi baseada no estudo realizado por Sergio et al., 2011.

Imediatamente após o teste no LTE, em todos os protocolos de execução, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto, com a finalidade de verificar a atividade locomotora dos mesmos. Para tal, os animais foram colocados no centro da arena quadrada e a distância total percorrida durante 5 minutos foi analisada com o auxílio de uma câmera posicionada em cima da aparato e do software de imagem ANYmaze (versão 4.96).

Ainda no experimento 1C, com o intuito de avaliar a generalidade da resposta quanto à ansiedade, os animais foram submetidos ao teste do beber punido de Vogel. Dois dias após a realização do LTE e do campo aberto, foi retirado o acesso à água

dos animais. Após as primeiras 24 horas, na sessão treino, cada animal foi colocado individualmente dentro da caixa-teste, onde lhe foi permitido beber água livremente por três minutos. Esse procedimento foi realizado para que o animal encontrasse o bico do bebedouro e se habituasse ao aparato experimental.

Vinte e quatro horas após a sessão treino, os animais receberam, após sorteio prévio, uma injeção intra-SCPD de bicuculina (5 pmol/0,2µl) e, dez minutos após, a injeção intraperitoneal de alprazolam (4 mg/kg/ml). Os grupos formados, então, foram: veículo/veículo (n=8), veículo/alprazolam (n=6), bicuculina/veículo (n=8) e bicuculina/alprazolam (n=6). Passados trinta minutos, os animais foram colocados na caixa-teste por três minutos, contados a partir do momento em que o bico do bebedouro era encontrado. Durante este período, a cada 20 lambidas os animais recebiam, através do bico do bebedouro, um choque de 0,5 mA durante dois segundos.

3.5.2. Experimento 2: envolvimento do complexo receptor GABA_A/BZ presente na SCPD no efeito promovido pela administração intraperitoneal de alprazolam no modelo de hipóxia

Para avaliar o envolvimento dos sítios de ligação BZs localizados na SCPD no efeito antifuga do alprazolam em um outro modelo relacionado ao pânico, foi realizado o experimento 2. Vinte e quatro horas após a última sessão de habituação ao experimentador, os animais foram expostos, por 15 minutos, sob condição de normóxia (21% de O₂) à câmara de acrílico utilizada no teste de hipóxia. No dia seguinte, no experimento 2A, os animais receberam injeção intra-SCPD de flumazenil na mesma dose utilizada no LTE (80 nmol/0,5µl) e, passados 10 minutos, injeção intraperitoneal de alprazolam (2 mg/kg/ml), sendo formados os seguintes grupos: veículo/veículo (n=6), veículo/alprazolam (n=6), flumazenil/veículo (n=6) e flumazenil/alprazolam (n=7). Trinta minutos após a administração periférica, os animais foram submetidos ao teste comportamental. Par tal, os animais foram colocados na câmara de hipóxia e mantidos sob condições de normóxia por um período de 5 minutos (período utilizado para avaliar a atividade locomotora), seguidos por 4 minutos em que se ocorre a transição de 21% de O₂ para 7% e 6 minutos de

condição hipóxia (7% de O₂), no qual foi analisado o número de saltos em direção a borda superior da câmara.

As doses de alprazolam e flumazenil empregadas neste estudo foram baseadas nos resultados obtidos por Spiacci et al., 2015 e Lopes, 2010.

Como a administração por si só de flumazenil apresentou efeito panicolítico no experimento 2A, no experimento 2B verificamos se o mesmo ocorreria com a microinjeção de bicuculina. Para tal, os animais receberam apenas injeção intra-SCPD de bicuculina (2,5 e 5 pmol/0,2µl) e dez minutos após foram submetidos ao mesmo protocolo experimental descrito para o experimento 2A. Os grupos formados foram: veículo (n=5), bicuculina 2,5pmol/0,2µl (n=4) e bicuculina 5 pmol/0,2µL (n=5). As doses de bicuculina utilizadas neste experimento foram baseadas em estudos prévios realizados por Casaroto et al., 2010; Sergio et al., 2011.

Com base nos resultados do experimento 2B, no experimento 2C, os animais receberam injeção intra-SCPD de bicuculina (5 pmol/0,2µl) e dez minutos após, injeção intraperitoneal de alprazolam (2 mg/kg/ml), sendo submetidos ao protocolo experimental 30 minutos após a injeção sistêmica. Os grupos deste experimento foram: veículo/veículo (n=7), veículo/alprazolam (n=8), bicuculina/veículo (n=6) e bicuculina/alprazolam (n=7).

3.6. Perfusão e análise do sítio de injeção

Após o término dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com uretana a 25% (10 ml/kg, i.p.; Sigma, EUA) e, da mesma maneira realizada nos teste descritos acima, foi realizado uma microinjeção de azul de Evans, com intuito de visualizar o sítio de injeção. Os animais foram, então, submetidos a perfusão intracardiaca com solução salina 0,9%, seguida de solução de formalina 10%. Os encéfalos foram removidos e fixados também em solução de formalina 10%. Cortes histológicos de 40 µm foram seccionados com o auxílio de um criostato. O sítio de injeção foi identificado de acordo com o Atlas Paxino de Watson (2007).

3.7. Análises Estatísticas

Os dados obtidos no LTE (Experimento 1) foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas, tendo os tratamentos central e sistêmico, como fatores independentes e as latências de esquiva e fuga, como medidas repetidas. Os dados obtidos no campo aberto, na hipóxia e no teste do beber punido de Vogel foram avaliados por uma ANOVA de duas vias também tendo como fatores independentes os tratamentos central e sistêmico. Para o experimento 3B, foi utilizada uma ANOVA de uma via, tendo como fator independente o tratamento central. Quando apropriado, foi utilizado o teste de *post-hoc* de Duncan.

Resultados

4. Resultados

Análise histológica

A Figura 4 (A-D) mostra os sítios de injeção dentro e fora da SCPD realizados neste estudo. Somente os animais que apresentaram sítios de injeção dentro da SCPD foram considerados.

Figura 5: Representação dos sítios de injeção dentro (●) e fora (○) da SCPD observados em todos os experimentos, através do plano ântero-posterior conforme o Atlas Paxinos e Watson (2007). O número total de pontos é menor do que o número total de animais devido a sobreposições dos sítios de injeção.

Experimento 1A: Envolvimento dos sítios de ligação BZs presentes na SPCD no efeito promovido pela administração intraperitoneal de alprazolam no LTE.

A Figura 6 mostra o efeito da administração sistêmica de alprazolam sobre as latências de esquiva inibitória e de fuga em animais que receberam previamente a injeção intra-SCPD de flumazenil.

Para a tarefa de esquiva inibitória (Figura 6A), a ANOVA de medidas repetidas mostrou que houve aquisição da esquiva inibitória [fator tentativa: $F(2,88) = 10,919$; $p = 0,001$], que o tratamento intra-SCPD com o flumazenil não alterou o comportamento [tratamento central: $F(1,44) = 0,070$; $p = 0,792$] e que o tratamento com o alprazolam promoveu uma alteração significativa [tratamento sistêmico: $F(1,44) = 12,308$; $p = 0,001$]. Além disso, não houve interação entre os tratamentos [tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,44) = 0,014$; $p = 0,908$]. A análise de *post-hoc* mostrou que o tratamento sistêmico com o alprazolam diminuiu a latência de saída do braço fechado quando comparado aos grupos salina/salina e flumazenil/salina, indicando um efeito do tipo ansiolítico, na terceira tentativa de esquiva inibitória (E2).

Já na tarefa de fuga, apesar de ser possível observar na Figura 6B que o tratamento sistêmico com o alprazolam aumentou a latência de saída dos braços abertos, a ANOVA de medidas repetidas mostrou que o flumazenil e o alprazolam não tiveram efeito significativo [tratamento central: $F(1,44) = 2,296$; $p = 0,137$; tratamento sistêmico: $F(1,44) = 2,894$; $p = 0,096$]. Além disso, não houve interação entre os dois tratamentos [tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,44) = 1,948$; $p = 0,170$].

Quando realizada a média das fugas de cada animal (Fuga Colabada – Figura 6C), a ANOVA de duas vias mostrou que o flumazenil não alterou a resposta [tratamento central: $F(1,44) = 2,583$; $p = 0,115$], mas o alprazolam promoveu uma alteração significativa [tratamento sistêmico: $F(1,44) = 3,220$; $p = 0,050$]. Entretanto, não houve interação entre os dois tratamentos [tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,44) = 2,210$; $p = 0,144$]. A análise de *post-hoc* mostrou que o grupo salina/alprazolam teve um aumento da latência de saída do braço aberto quando comparado ao grupo salina/salina, indicando um efeito do tipo panicolítico.

Figura 6: Efeito (média + EPM) da injeção intra-SCPD de flumazenil (80 nmol/0,5ul) ou salina 10 minutos antes da administração intraperitoneal de alprazolam (4 mg/kg/ml) ou salina sobre as latências de **[A]** esquiva inibitória e de **[B]** fuga medidas no labirinto em T elevado. **[C]** Média das três tentativas de fuga de cada animal. LB: linha de base; E: esquiva; F: fuga. * $p < 0.05$ comparado aos grupos controle. N= 8-15.

Quanto à atividade locomotora, podemos observar na Tabela 1, que não houve diferença significativa quanto à distância total percorrida no teste do campo aberto em nenhum dos grupos experimentais [tratamento central: $F(1,44) = 0,145$; $p = 0,705$; tratamento sistêmico: $F(1,44) = 2,001$, $p = 0,164$; tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,44) = 0,480$, $p = 0,496$].

Tabela 1: Média $\pm$ EPM da distância percorrida (em metros) dos animais submetidos ao teste de campo aberto imediatamente após a realização do LTE no experimento 1A.

Tratamento	Distância (m)
Veículo – Veículo	10,61 $\pm$ 1,11
Veículo – Alprazolam	9,22 $\pm$ 2,43
Flumazenil – Veículo	11,22 $\pm$ 1,34
Flumazenil – Alprazolam	7,14 $\pm$ 1,66

Experimento 1B: Envolvimento dos sítios de ligação BZs presentes na SPCD no efeito promovido pela administração intraperitoneal de alprazolam na tarefa de fuga do LTE.

A Figura 7A mostra o efeito da administração sistêmica de alprazolam após a injeção intra-SCPD de flumazenil em animais submetidos a seis tentativas de fuga no LTE.

Como pode ser visto, a administração intra-SCPD de flumazenil não promoveu alteração no comportamento [tratamento central: $F(1,31) = 3,761$; $p = 0,062$], enquanto que o tratamento com o alprazolam promoveu uma alteração significativa [tratamento sistêmico: $F(1,31) = 6,170$; $p = 0,019$]. Além disso, houve interação entre os tratamentos [tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,31) = 5,278$; $p = 0,029$]. A análise de *post-hoc* mostrou que o grupo salina/alprazolam teve um aumento da latência de saída do braço aberto quando comparado aos demais grupos, indicando um efeito do tipo panicolítico, na terceira e quarta tentativa de fuga (F3 e F4). Ademais, o tratamento prévio intra-SCPD com flumazenil foi capaz de bloquear esse efeito.

A Figura 7B ilustra a média das 6 tentativas para cada animal. A ANOVA de duas vias mostrou que o tratamento intra-SCPD com o flumazenil não alterou o comportamento [tratamento central: $F(1,31) = 3,761$; $p = 0,062$], mas o tratamento com o alprazolam promoveu uma alteração significativa [tratamento sistêmico: $F(1,31) = 6,170$; $p = 0,019$]. Além disso, houve interação entre os tratamentos [tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,31) = 5,278$; $p = 0,029$]. Novamente, a análise de *post-hoc* mostrou que o grupo salina/alprazolam teve um aumento da latência de saída do braço aberto quando comparado aos demais grupos, indicando um efeito do tipo panicolítico, e que o tratamento prévio intra-SCPD com flumazenil foi capaz de bloquear esse efeito.

Figura 7: Efeito (média + EPM) da injeção intra-SCPD de flumazenil (80 nmol/0,5ul) ou salina 10 minutos antes da administração intraperitoneal de alprazolam (4 mg/kg/ml) ou salina sobre as latências de **[A]** fuga medidas no labirinto em T elevado. **[B]** Média das seis tentativas de fuga de cada animal. F: fuga. * $p < 0.05$ comparado aos demais grupos. N=7-10.

Quanto à atividade locomotora (Tabela 2), a ANOVA de duas vias mostrou que a administração intra-SCPD de flumazenil não alterou a distância total percorrida no teste do campo aberto [tratamento central: $F(1,31)= 0,039$; $p= 0,845$], mas o tratamento sistêmico com o alprazolam diminui esta medida [tratamento sistêmico: $F(1,31)=7,625$; $p= 0,010$]. Não houve interação entre os dois tratamentos realizados [tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,31)= 0,002$, $p= 0,964$].

Uma análise de covariância mostrou que o efeito do tratamento com o alprazolam permaneceu significativo quando a distância percorrida no teste do campo aberto foi covariada com as latências de fuga no LTE [valores covariados - tratamento central $[F(1,30)= 3,647$; $p=0,066$]; tratamento sistêmico: $F(1,30)= 4,946$; $p= 0,034$; tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,30)= 5,112$; $p=0,031$], sugerindo que a alteração observada sobre esta última medida foi independente do efeito observado no teste do campo aberto.

Tabela 2: Média $\pm$ EPM da distância percorrida (em metros) dos animais submetidos ao teste de campo aberto imediatamente após a realização do LTE no experimento 1B.

Tratamento	Distância (m)
Veículo – Veículo	$9,43 \pm 1,30$
Veículo – Alprazolam	$6,76 \pm 1,24^*$
Flumazenil – Veículo	$9,62 \pm 0,72$
Flumazenil - Alprazolam	$6,07 \pm 1,94^*$

Experimento 1C: Envolvimento dos receptores GABA_A presentes na SPCD no efeito promovido pela administração intraperitoneal de alprazolam no LTE e no teste do beber punido de Vogel

A Figura 8 mostra o efeito da administração sistêmica de alprazolam após a administração intra-SCPD de bicuculina em animais submetidos ao LTE.

Para a tarefa de esquiva inibitória (Figura 8A), a ANOVA de medidas repetidas mostrou que houve aquisição da esquiva inibitória [fator tentativa: $F(2,56) = 14,469$; $p = 0,001$], que o tratamento com a bicuculina não alterou o comportamento [tratamento central: $F(1,28) = 0,094$; $p = 0,762$] e que o tratamento com o alprazolam promoveu uma alteração significativa [tratamento sistêmico: $F(1,28) = 13,693$; $p = 0,001$]. Além disso, não houve interação entre os tratamentos [tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,28) = 0,213$; $p = 0,648$]. A análise de *post-hoc* mostrou que o tratamento intraperitoneal com o alprazolam diminuiu a latência de saída do braço fechado quando comparado aos grupos salina/salina e bicuculina/salina, indicando um efeito do tipo ansiolítico na terceira tentativa (Esquiva 2).

Quanto à tarefa de fuga (Figura 8B), a ANOVA de medidas repetidas mostrou que o tratamento intra-SCPD com a bicuculina não alterou o comportamento [tratamento central: $F(1,28) = 3,489$; $p = 0,073$], enquanto que o tratamento com o alprazolam promoveu uma alteração significativa [tratamento sistêmico: $F(1,28) = 9,394$; $p = 0,005$]. Ademais, houve interação entre os tratamentos [tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,28) = 9,435$; $p = 0,005$]. O mesmo pode ser observado na Figura 8C, que ilustra a média das 6 tentativas de fuga de cada animal [tratamento central: $F(1,28) = 5,392$; $p = 0,073$; tratamento sistêmico: $F(1,28) = 9,402$; $p = 0,005$; interação tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,28) = 9,443$; $p = 0,005$]. A análise de *post-hoc* mostrou que o grupo salina/alprazolam teve um aumento da latência de saída do braço aberto quando comparado aos demais grupos, indicando um efeito do tipo panicolítico em todas as tentativas de fuga, com exceção da quinta tentativa (Fuga 5). Além disso, a administração prévia intra-SCPD de bicuculina foi capaz de bloquear o efeito promovido pelo alprazolam.

Figura 8: Efeito (média + EPM) da injeção intra-SCPD de bicuculina (5 pmol/0,2ul) ou salina 10 minutos antes da administração intraperitoneal de alprazolam (4 mg/kg/ml) ou salina sobre as latências de [A] esquiva inibitória e [B] fuga medidas no labirinto em T elevado. [C] Média das seis tentativas de fuga de cada animal. LB: linha de base; E: esquiva; F: fuga. * $p < 0.05$ comparado aos demais grupos. N=7-10

Para a atividade locomotora (Tabela 3), a ANOVA de duas vias mostrou que não houve diferença significativa para nenhum dos tratamentos quanto a distância total percorrida no teste de campo aberto [tratamento central: $F(1,28)= 1,531$; $p= 0,226$; tratamento sistêmico: $F(1,28)= 2,767$, $p= 0,107$], porém houve efeito significativo da interação entre os tratamentos com a bicuculina e com o alprazolam [tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,28)= 11,875$; $p= 0,002$].

Uma análise de covariância mostrou que o efeito do tratamento com o alprazolam permaneceu significativo quando a distância percorrida no teste do campo aberto foi covariada com as latências de fuga no LTE [valores após covariação – tratamento central: $F(1,27)= 3,462$; $p=0,082$; tratamento sistêmico: $F(1,27)= 7,247$; $p=0,012$; tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,27) = 4,743$; $p=0,038$] sugerindo que a alteração observada sobre esta última medida foi independente do efeito observado no teste do campo aberto.

Tabela 3: Média $\pm$ EPM da distância percorrida (em metros) dos animais submetidos ao teste de campo aberto imediatamente após a realização do LTE no experimento 1C.

Tratamento	Distância (m)
Veículo – Veículo	$11,38 \pm 1,28$
Veículo – Alprazolam	$4,38 \pm 1,10^*$
Bicuculina – Veículo	$8,38 \pm 0,85$
Bicuculina - Alprazolam	$10,85 \pm 1,30$

A Figura 9 mostra o efeito da administração sistêmica de alprazolam após a injeção intra-SCPD de bicuculina sobre o número de lambidas punidas expressas por ratos submetidos ao teste de beber punido de Vogel. A ANOVA de duas vias mostrou que a bicuculina não alterou o comportamento [tratamento central: $F(1,24)= 0,097$; $p= 0,758$], enquanto que o alprazolam promoveu uma alteração significativa [tratamento sistêmico: $F(1,24)= 24,699$; $p= 0,001$]. Além disso, não houve interação entre os tratamentos [tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,24)= 0,079$; $p= 0,781$]. A análise de *post-hoc* mostrou que o tratamento com o alprazolam aumentou o número

de lambidas punidas quando comparado aos grupos salina/salina e bicuculina/salina, indicando um efeito do tipo ansiolítico.

Figura 9: Efeito da injeção intra-SCPD de bicuculina (5 pmol/0,2ul) ou salina 10 minutos após a administração intraperitoneal de alprazolam (4 mg/kg/ml) ou salina sobre o número de lambidas punidas medidas no teste do beber punido de Vogel. * $p < 0,05$ comparado aos grupos controle. N=6-8.

Experimento 2A: Envolvimento dos sítios de ligação BZs presentes na SCPD no efeito promovido pela administração intraperitoneal de alprazolam no modelo de hipóxia

A Figura 10 mostra o efeito da administração sistêmica de alprazolam após injeção intra-SCPD de flumazenil sobre o número de saltos de animais submetidos ao teste de hipóxia.

A ANOVA de duas vias mostrou que o tratamento intra-SCPD com o flumazenil promoveu diferença significativa [tratamento central: $F(1,21)= 5,596$; $p= 0,028$], enquanto que o tratamento com o alprazolam não alterou o comportamento [tratamento sistêmico: $F(1,21)= 0,276$; $p= 0,605$]. Além disso, não ocorreu interação entre os tratamentos [tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,21)= 3,886$; $p= 0,062$]. A análise de *post-hoc* mostrou que o tratamento com flumazenil/salina diminuiu o número de saltos quando comparado ao grupo salina/salina, indicando um efeito do tipo panicolítico.

Figura 10: Efeito (média + EPM) da injeção intra-SCPD de flumazenil ou salina 10 minutos antes da administração intraperitoneal de alprazolam (4 mg/kg/ml) ou salina sobre o número de saltos medidos no teste de hipóxia. * $p<0.05$ comparado ao grupo salina/salina. N=6-7.

Quanto à atividade locomotora, podemos observar na Tabela 4 que não houve diferença significativa em nenhum dos grupos experimentais quanto a distância percorrida durante o período de normóxia [tratamento central: $F(1,21)= 0,966$; $p= 0,337$; tratamento sistêmico: $F(1,21)= 0,000$, $p= 0,998$; tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,21)= 0,113$, $p= 0,740$].

Tabela 4: Média $\pm$ EPM da distância percorrida (em metros) durante o período de normóxia (21% de O_2) pelos animais que receberam injeção intra-SCPD de flumazenil (80 nmol/0,5ul) ou salina 10 minutos antes da administração intraperitoneal de alprazolam (4 mg/kg/ml) ou salina.

Tratamento	Distância (m)
Veículo – Veículo	1,64 $\pm$ 0,32
Veículo – Alprazolam	1,42 $\pm$ 0,18
Flumazenil – Veículo	2,06 $\pm$ 0,38
Flumazenil - Alprazolam	2,28 $\pm$ 1,07

Experimento 2B: Efeito da administração intra-SCPD de bicuculina no modelo de hipóxia.

A Figura 11 mostra o efeito de diferentes doses de bicuculina, administradas intra-SCPD, sobre o número de saltos de animais submetidos ao teste de hipóxia. A ANOVA de uma via mostrou que nenhuma das doses testadas de bicuculina alterou o número de saltos dos animais [$F(2,13)= 0,041$; $p= 0,960$].

Figura 11: Efeito (média + EPM) da injeção intra-SCPD de bicuculina (2,5 e 5 pmol/0,2ul) ou salina sobre o número de saltos medidos no teste de hipóxia. N=4-5.

O mesmo foi observado quanto à distância percorrida pelos animais no período de normóxia (Tabela 5), onde nenhuma das doses testadas promoveu alteração na distância total [tratamento: $F(2,13)= 0,832$; $p= 0,461$].

Tabela 5: Média $\pm$ EPM da distância percorrida (em metros) durante o período de normóxia (21% de O₂) pelos animais que receberam injeção intra-SCPD de bicuculina (2,5 e 5 pmol/0,2ul) ou salina.

Tratamento	Distância (m)
Veículo	2,28 $\pm$ 0,48
Bicuculina 2,5pmol	2,39 $\pm$ 0,70
Bicuculina 5pmol	1,65 $\pm$ 0,34

Experimento 2C: Envolvimento dos receptores GABA_A presentes na SCPD no efeito promovido pela administração intraperitoneal de alprazolam no modelo de hipóxia

A Figura 12 mostra o efeito da administração sistêmica de alprazolam após a injeção intra-SCPD de bicuculina sobre o número de saltos de animais submetidos ao teste de hipóxia.

A ANOVA de duas vias mostrou que o tratamento intra-SCPD com a bicuculina não promoveu alteração no comportamento [tratamento central: $F(1,29) = 0,012$; $p = 0,915$], enquanto que o tratamento com o alprazolam promoveu uma alteração significativa [tratamento sistêmico: $F(1,29) = 16,238$; $p = 0,001$]. Além disso, houve um efeito marginal na significância estatística na interação entre os tratamentos [tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,29) = 3,479$; $p = 0,072$]. A análise de *post-hoc* mostrou que o tratamento com o alprazolam diminui o número de saltos quando comparado ao grupos salina/salina e bicuculina/salina, indicando um efeito do tipo panicolítico.

Figura 12: Efeito (média + EPM) da injeção intra-SCPD de bicuculina (5 pmol/0,2ul) ou salina 10 minutos antes da administração intraperitoneal de alprazolam (4 mg/kg/ml) ou salina sobre o número de saltos medidos no teste de hipóxia. * $p < 0.05$ comparado ao grupo salina/salina. N=7-9.

Quanto à atividade locomotora, podemos observar na Tabela 6 que nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar a distância percorrida pelos animais no período de normóxia [tratamento central: $F(1,29) = 0,006$; $p = 0,941$; tratamento sistêmico: $F(1,29) = 0,769$, $p = 0,388$; tratamento central x tratamento sistêmico: $F(1,29) = 0,583$, $p = 0,451$].

Tabela 6: Média $\pm$ EPM da distância percorrida (em metros) durante o período de normóxia (21% de O₂) pelos animais que receberam injeção intra-SCPD de bicuculina (5 pmol/0,2ul) ou salina 10 minutos antes da administração intraperitoneal de alprazolam (4 mg/kg/ml) ou salina.

Tratamento	Distância (m)
Veículo – Veículo	1,82 $\pm$ 0,28
Veículo – Alprazolam	1,88 $\pm$ 0,65
Bicuculina – Veículo	1,38 $\pm$ 0,25
Bicuculina - Alprazolam	2,25 $\pm$ 0,69

Discussão

5. Discussão

O presente trabalho teve por objetivo investigar se o complexo receptor GABA_A/BZ presente na SCPD está envolvido no efeito panicolítico causado pela administração sistêmica de alprazolam. A partir do emprego do LTE e dos testes do beber punido de Vogel e da hipóxia foi possível também avaliar se esse complexo receptor localizado na SCPD também está implicado no efeito ansiolítico causado por este BZs.

Os resultados obtidos no experimento 1A mostraram que a administração sistêmica de alprazolam (4 mg/kg/ml) promoveu um efeito do tipo ansiolítico, inibindo a aquisição da esQUIVA inibitória. Este efeito não foi bloqueado pela administração prévia intra-SCPD de flumazenil (80nmol/0,5ul), sugerindo que os sítios de ligação BZs da SCPD não estão envolvidos no efeito ansiolítico causado pelo alprazolam (Figura 6A). O mesmo foi encontrado no experimento 1C, onde a administração prévia de bicuculina também não foi capaz de bloquear o efeito ansiolítico causado pelo alprazolam na tarefa de esQUIVA inibitória do LTE (Figura 8A) e no teste do beber punido de Vogel (Figura 9)

Quanto ao efeito panicolítico, os resultados obtidos no experimento 1A demonstraram que o alprazolam (4 mg/kg/ml) inibiu a expressão da resposta de fuga no LTE, caracterizando um efeito panicolítico e a administração prévia intra-SCPD de flumazenil (80 nmol/0,5ul) inibiu este efeito, ainda que não significativamente do ponto de vista estatístico (Figura 6B e 6C). Como este resultado nos pareceu inconclusivo, no experimento 1B, a questão do efeito do flumazenil sobre a resposta de fuga foi reavaliada, agora em ratos submetidos somente a esta tarefa defensiva no LTE.

Os resultados obtidos neste experimento mostraram, de maneira clara, que a administração de alprazolam (4 mg/kg/ml) prejudicou a resposta de fuga e que a injeção prévia na SCPD de flumazenil bloqueou este efeito (Figura 7A e 7B), sugerindo o envolvimento dos sítios de ligação BZs da SCPD no efeito panicolítico causado por essa droga. Dando maior suporte a este achado, o mesmo foi encontrado no experimento 1C, onde a administração prévia de bicuculina também foi capaz de bloquear o efeito panicolítico causado pelo alprazolam na tarefa de fuga do LTE (Figura 8B e 8C).

Como dito anteriormente, o LTE foi desenvolvido a fim de estudar em laboratório a teoria proposta por Deakin e Graeff. Segundo essa teoria, projeções serotoninérgicas distintas originadas no NDR inervam a amígdala, regulando as respostas relacionadas à ansiedade, e a SCPD, regulando as respostas relacionadas ao pânico (DEAKIN; GRAEFF, 1991). No caso dos antidepressivos, já foi demonstrado que o efeito ansiolítico decorrente da administração crônica de imipramina, um antidepressivo tricíclico, parece ser de fato mediado pelo BLA, uma vez que a administração intra-BLA de antagonista dos receptores 5-HT_{1A} bloqueia o efeito ansiolítico, mas não o panicolítico no LTE (VICENTE et al., 2014). Desta maneira, é possível que o efeito ansiolítico do alprazolam observado no LTE e no teste do beber punido de Vogel seja regulado também pelo BLA e não pela SCPD.

Sustentando essa hipótese, diversos estudos demonstram o envolvimento da amígdala, mais especificamente do núcleo BLA, no efeito ansiolítico dos BZs. Brevemente, a administração intra-amígdala de midazolam promove um efeito ansiolítico no teste do campo aberto (HEDT; RESSLER, 2006) e no LTE, sem alterar a resposta de fuga neste modelo (ZANGROSSI et al., 1999). Além disso, utilizando o labirinto em cruz elevado, Pesold e Triet (1995) demonstraram que a administração de midazolam no núcleo BLA promove um efeito ansiolítico, enquanto que no núcleo central da amígdala não promove qualquer alteração na resposta, sugerindo que o efeito ansiolítico seja mediado especificamente pelo BLA. De maneira interessante, o bloqueio dos sítios de ligação BZs e dos receptores GABA_A no BLA bloqueia o efeito ansiolítico causado pela administração sistêmica de clordiazepóxido no modelo de interação social (SANDERS; SHEKHAR, 1995).

A fim de avaliar a generalidade da resposta observada na tarefa de esquiva inibitória do LTE em um outro modelo de ansiedade, os animais do experimento 1C também foram submetidos ao teste do beber punido de Vogel.

O teste do beber punido de Vogel é um teste de conflito que envolve o comportamento de recompensa *versus* punição. Drogas BZs como diazepam, clordiazepóxido e alprazolam aumentam o número de lambidas punidas, indicando um efeito do tipo ansiolítico (BARRETT; GLEESON, 1991; FLORES; PÉLLON, 2000; SÖDERPALM; ENGEL, 1989). No entanto, este teste envolve outros parâmetros como, por exemplo, a atividade locomotora, a nocicepção, o aprendizado e a sede,

todos possíveis de serem influenciados pelo tratamento com BZs. Diversos trabalhos foram realizados com intuito de investigar o efeito do tratamento com drogas BZs no teste do beber punido de Vogel (para mais detalhes ver Millan e Brocco, 2002). Por exemplo, o composto SL651498, que possui alta afinidade para as subunidades $\alpha 2$ e $\alpha 3$ do receptor $GABA_A$, relacionadas com o efeito ansiolítico dos BZs, e baixa afinidade para as subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 5$, relacionadas, respectivamente, com os efeitos sedativos e cognitivos dos BZs, promove um efeito ansiolítico parecido com o diazepam, tanto no teste do beber punido de Vogel, como em outros modelos animais de ansiedade (GRIEBEL et al., 2001). Isso sugere o efeito ansiolítico observado com os BZs no teste do beber punido de Vogel é decorrente da sua influência no comportamento relacionado à ansiedade.

Assim como em outros modelos animais de ansiedade descritos anteriormente, que demonstram o papel da amígdala no efeito ansiolítico dos BZs, um trabalho realizado por Shibata e colaboradores em 1989 mostrou que a administração intra-amígdala de BZs promove um efeito ansiolítico no teste do beber punido de Vogel. Ademais, a administração prévia de flumazenil intra-amígdala é capaz de bloquear o efeito tanto da administração sistêmica de diazepam, quanto da administração intra-amígdala (Shibata et al., 1989).

Somados, os resultados encontrados na tarefa de esquivas inibitória do LTE e no teste do beber punido de Vogel sugerem que o complexo receptor $GABA_A$ /BZ presente na SCPD não está envolvido no efeito ansiolítico causado pelo alprazolam.

No entanto, diferente do observado no LTE e no teste do beber punido de Vogel, no labirinto em cruz elevado, a administração prévia intra-SCPD de flumazenil foi capaz de bloquear o efeito ansiolítico decorrente da administração intra-SCPD de midazolam (Russo et al., 1993), sugerindo o envolvimento da SCPD também no efeito ansiolítico desta droga. O labirinto em cruz elevado é um modelo preditivo de ansiedade, constituído de dois braços fechados e dois braços abertos dispostos em forma de cruz. O animal é colocado no centro e pode explorar livremente o labirinto por 5 minutos, sendo que as drogas ansiolíticas aumentam o tempo de exploração do braço aberto (Campos et al., 2013). No entanto, ele pode ser considerado um modelo misto, uma vez que a exploração do braço aberto pode englobar respostas relacionadas tanto com a ansiedade quanto com o pânico (HANDLEY; MCBLANE, 1993), o que explicaria o efeito observado com a administração intra-SCPD de

midazolam. Ademais, Russo e colaboradores (1993) demonstraram que a administração intra-SCPD de flumazenil não foi capaz de bloquear o efeito ansiolítico causado pela administração sistêmica de diazepam no labirinto em cruz elevado, sugerindo que o efeito ansiolítico decorrente da administração sistêmica não é regulado pela SCPD.

Quanto ao efeito panicolítico promovido pelo alprazolam no LTE, diversos trabalhos utilizando modelos animais corroboram com o resultado encontrado, demonstrando a eficácia do alprazolam em diminuir respostas aversivas relacionadas ao pânico (SPIACCI et al., 2015; 2018; BATISTA et al., 2017; JOHNSON; SHEKAR, 2012; SANT'ANA et al., 2016; POBBE et al., 2014). Por exemplo, utilizando também o modelo do LTE, Sant'Ana e colaboradores (2016) demonstraram que tanto a administração sistêmica aguda, quanto a crônica (14 dias) desta droga foi capaz de causar efeitos ansiolítico e panicolítico em ratos. O mesmo já foi demonstrado para o clonazepam, um outro BZ de alta potência, onde tanto a administração aguda como a crônica foi capaz de alterar as respostas relacionadas à ansiedade e ao pânico de ratos submetidos ao LTE (POBBE et al., 2014).

A participação da SCPD no efeito panicolítico do alprazolam foi sugerida devido a importância dessa estrutura na fisiopatologia do TP, bem como do seu envolvimento no efeito panicolítico causado pelos antidepressivos. Zanoveli e colaboradores (2010) demonstraram que o efeito panicolítico causado pela administração crônica e sistêmica de fluoxetina em ratos submetidos ao LTE é bloqueado pela administração de um antagonista dos receptores 5-HT_{1A} na SCPD. Ademais, a administração crônica tanto de antidepressivos, como a imipramina, a fluoxetina e a sertralina, como de alprazolam potencializa o efeito antipânico decorrente da administração intra-SCPD de doses subeficazes de agonistas dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} no LTE e na estimulação elétrica da SCPD (JACOB et al., 2002; ZANOVELI; NOGUEIRA; ZANGROSSI, 2005; 2007; DE BORTOLI; NOGUEIRA; ZANGROSSI, 2006; 2008), sugerindo o envolvimento da neurotransmissão serotoninérgica dessa estrutura no efeito panicolítico dessas drogas.

Quanto a neurotransmissão GABAérgica, a administração intra-SCPD de drogas que facilitam esta neurotransmissão é capaz de alterar o comportamento de animais em testes relacionados com o pânico. Utilizando o modelo de estimulação

elétrica da SCPD, Audi e Graeff (1984) demonstraram que a administração intra-SCPD de clordiazepóxido e de midazolam aumentam o limiar necessário para que o animal expresse o comportamento de fuga. Além disso, este efeito foi bloqueado pela administração prévia intra-SCPD de flumazenil (AUDI; GRAEFF, 1984). No LTE, a administração intra-SCPD de midazolam e de muscimol também afetou a resposta de fuga, causando um efeito do tipo panicolítico, sem alterar a resposta de esquia inibitória (BUENO; ZANGROSSI; VIANA, 2005). Vale ressaltar, que os BZs utilizados por esses estudos não são BZs de alta potência e, portanto, não promovem efeito panicolítico quando administrados perifericamente.

Os resultados obtidos no presente projeto corroboram com os achados descritos acima, uma vez que demonstra o envolvimento do complexo receptor GABA_A/BZ da SCPD apenas no efeito panicolítico causado pela administração sistêmica de alprazolam.

Imediatamente após a realização do LTE, os animais foram colocados no teste de campo aberto para avaliar o impacto dos tratamentos sobre a atividade locomotora. O teste de campo aberto empregado não envolveu a análise do comportamento de ansiedade, comumente avaliada neste teste (PRUT; BELZUNG, 2003). Ademais, a avaliação da atividade locomotora foi de extrema importância para elucidar os efeitos relacionados à ansiedade e ao pânico, visto que um dos efeitos adversos dos BZs é a sedação e o LTE envolve a capacidade do animal se locomover adequadamente. Os resultados encontrados demonstram que o tratamento sistêmico com alprazolam (4 mg/kg/ml) diminuiu a distância total percorrida pelos animais no experimento 1B (Tabela 2). No entanto, o grupo flumazenil/alprazolam, que apresentou uma diminuição da atividade locomotora, apresentou uma resposta de fuga semelhante ao grupo veículo, demonstrando que o tratamento com o alprazolam não influenciou na resposta observada no LTE. Ademais, a análise estatística de covariância mostrou que o efeito panicolítico do alprazolam é independente da alteração causada por esta droga no teste do campo aberto.

Como o complexo receptor GABA_A/BZ da SCPD parece estar envolvido somente na tarefa de fuga do LTE, no experimento 2 avaliamos a participação desse complexo em um outro modelo animal usado para o estudo de respostas defensivas associadas ao pânico, o modelo de hipóxia. Spiacci e colaboradores (2015) realizaram

uma validação farmacológica deste modelo e mostraram que drogas efetivas para o tratar o TP, como a fluoxetina e o alprazolam, são capazes de diminuir o número de saltos expressos por ratos quando em condição de hipóxia, efeito caracterizado como panicolítico.

Os resultados obtidos no experimento 2A mostraram que a administração intra-SCPD de flumazenil, na mesma dose utilizada nos experimentos com o LTE (80 nmol/0,5ul), promoveu um efeito do tipo panicolítico (Figura 10). Este resultado é curioso, uma vez que o uso de antagonistas, quando promove alguma resposta, geralmente é contrária à observada com os agonistas. Resultados divergentes quanto ao efeito do flumazenil na ansiedade têm sido descritos na literatura tanto em ratos como em humanos (UHLIROV; SUSTKOVÁ-FISEROVÁ; KRSIAK, 2004). Por exemplo, no labirinto em cruz elevado, o flumazenil administrado sistematicamente promoveu efeito ansiolítico (BELZUNG; LE GUIQUET; CRESTANI, 2000), ansiogênico (LEE; RODGERS, 1991) ou até mesmo nenhum efeito (DALVI; RODGERS, 1999).

Diante desse cenário, no experimento 2B, optamos por utilizar a bicuculina. Baseando-se em estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa em outros modelos animais (SERGIO; DE BORTOLI; ZANGROSSI, 2011; CASAROTO et al., 2010), avaliamos o efeito das doses de 2,5 e 5 pmol/0,2ul desta droga, a fim de encontrar doses subeficazes no modelo de hipóxia. Como mostrado na figura 11, nenhuma das duas doses promoveu alteração no número de saltos, sendo a dose de 5 pmol/0,2ul escolhida para a realização do experimento 2C.

Os resultados obtidos no experimento 2C mostraram que a administração sistêmica de alprazolam (2 mg/kg/ml) promoveu um efeito do tipo panicolítico no modelo de hipóxia. No entanto, a administração prévia de bicuculina na SCPD inibiu, mas bloqueou de maneira significativa este efeito (Figura 12).

Estudos prévios realizados em nosso laboratório de pesquisa demonstraram que administração intra-SCPD de bicuculina em doses superiores a 5 pmol/0,2ul causa uma resposta de fuga imediata a administração (SERGIO; DE BORTOLI; ZANGROSSI, 2011; CASAROTO et al., 2010). Dessa maneira, é difícil determinar se para este modelo não seria necessário uma dose maior desse antagonista para promover o bloqueio do efeito panicolítico do alprazolam. Além disso, visto que o

modelo de hipóxia envolve uma resposta relacionada ao ataque de pânico do subtipo respiratório, o efeito do alprazolam neste modelo pode ser decorrente de sua ação em outros substratos neurais, além da SCPD, envolvidos nessa condição.

A distinção do TP em respiratório e não respiratório têm sido sugerida nos últimos anos e se baseia na presença ou não de sintomas respiratórios (BRIGGS; STRETCH; BRANDON, 1993; NARDI et al., 2003), sendo que os pacientes acometidos pelo TP do tipo respiratório apresentam prominência de sintomas respiratórios como dispnéia, dor torácica e sensação de sufocamento (BRIGGS; STRETCH; BRANDON, 1993).

Uma das teorias proposta para explicar esse subtipo de pânico é a teoria do falso alarme de sufocamento, descrita por Donald Klein em 1993. A partir de diversas evidências, Klein propôs que os pacientes com TP apresentariam uma hipersensibilidade em centros encefálicos envolvidos no monitoramento de estímulos relacionados com a sufocação. Dessa maneira, estímulos inofensivos, como um aumento pequeno da pressão parcial de CO₂, passaria a ser interpretado erroneamente, desencadeando um ataque de pânico (KLEIN, 1993). No entanto, esta teoria não deixa evidente qual estrutura encefálica desempenharia a função principal no falso alarme de sufocamento.

Estudos pré-clínicos sugerem que a SCPD possa ser uma das estruturas críticas nesta teoria (KRAMER et al., 1999; SCHIMITEL et al., 2012; CASANOVA et al., 2013). Nesse sentido, a fim de avaliar o papel desta estrutura em um modelo animal de ataque de pânico do tipo respiratório, um trabalho recente do nosso grupo de pesquisa investigou a capacidade da SCPD por si só evocar respostas de fuga em ratos submetidos ao teste de hipóxia. Neste trabalho, foi realizada a administração intra-SCPD de CoCl₂, uma droga que inibe a transmissão sináptica aferente, previamente a realização do teste. O que foi observado é que a inibição da transmissão sináptica aferente da SCPD reduz o número de saltos dos animais, mas não os bloqueia completamente, indicando que outras estruturas encefálicas são recrutadas e suas aferências para a SCPD são relevantes para a elaboração do comportamento defensivo evocado pela hipóxia (GRIPP-FERNANDES, 2017).

Neste sentido, a exposição de roedores a situação de hipóxia além de recrutar neurônios presentes SCPD (CASANOVA et al., 2013), também recruta regiões como o hipotálamo dorsomedial (HDM), envolvido com a elaboração de comportamentos

defensivos (BERQUIN et al., 2000; CANTERAS; GRAEFF, 2014). Além disso, dados na literatura sugerem que o hipotálamo medial seja uma estrutura relevante para a gênese de ataques de pânico (CANTERAS, 2002; JOHNSON; SHEKHAR, 2012).

Assim como a administração intra-SCPD de drogas que facilitam a neurotransmissão GABAérgica e serotonérgica promovem efeito panicolítico na estimulação elétrica da SCPD e no LTE, a administração intra-HDM dessas drogas também desencadeia um efeito panicolítico (NASCIMENTO; ZANGROSSI; VIANA, 2010; DE BORTOLI; YAMASHITA; ZANGROSSI, 2013; NACIMENTO et al., 2014). Dessa forma, é possível que o efeito panicolítico causado pelo alprazolam no teste de hipóxia, seja dependente do complexo receptor GABA_A/BZ presente também no HDM.

Em resumo, os resultados do presente trabalho mostram que o complexo receptor GABA_A/BZ presente na SCPD está envolvido no efeito panicolítico, mas não no ansiolítico decorrente da administração sistêmica de alprazolam. No entanto, outras estruturas também podem estar envolvidas no efeito panicolítico do alprazolam, principalmente quando o comportamento é avaliado em um teste comportamental relacionado ao pânico do subtipo respiratório.

Conclusão

7. Conclusão

Com base nos resultados obtidos com a administração intra-SCPD de antagonistas dos sítios de ligação BZs e dos receptores GABA_A previamente a administração sistêmica de alprazolam, podemos concluir que:

- O complexo receptor GABA_A/BZ localizado na SCPD está envolvido no efeito panicolítico, mas não ansiolítico, promovido pela administração sistêmica de alprazolam

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 5th edition, text revision. Washington, DC, 2013.

AUDI, E.A.; GRAEFF, F.G. Benzodiazepine receptors in the periaqueductal grey mediate anti-aversive drug action. *Eur J Pharmacol*. v. 103, n. 3-4, p. 279-85, 1984.

AZMITIA, E.C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *Journal Comparison Neurology*, v. 179, n. 3, p. 641-67, 1978.

BALDWIN, D.S.; ANDERSON, I.M.; NUTT, D.J. et al. Evidence-based pharmacological treatment of anxiety disorders, post-traumatic stress disorder and obsessive-compulsive disorder: A revision of the 2005 guidelines from the British Association for Psychopharmacology. *Journal of Psychopharmacology*, v. 28, n. 5, p. 403-439, 2014.

BANDLER, R.; CARRIVE, P. Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain Research*, v. 439, n.1-2, p. 95-106, 1988.

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*. v. 88, n. 3, p. 291-6, 1988.

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*. v. 88, n. 3, p. 291-6, 1988.

BANDLER, R.; KEAY, K.A.; FLOYD, N.; PRICE, J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Research Bulletin*, v. 53, n. 1, p. 95-104, 2000.

BARBARESI, P. GABA-immunoreactive neurons and terminals in the cat periaqueductal gray matter: a light and electron microscopic study. *J Neurocytol.* v. 34, n. 6, p. 471-487, 2006.

BARNARD, E.A.; SKOLNICK, P.; OLSEN, R.W.; MOHLER, H.; SIEGHART, W.; BIGGIO, G.; BRAESTRUP, C.; BATESON, A.N.; LANGER, S.Z. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.*, v. 50, p. 291–313, 1998.

BARRETT, J.E.; GLEESON, S. Anxiolytic effects of 5-HT_{1A} agonists, 5-HT₃ antagonists and benzodiazepines: conflict and drug discrimination studies. In: Rodgers, R.J., Cooper, S.J. (Eds.), *5-HT_{1A} Agonists, 5-HT₃ Antagonists and Benzodiazepines: Their Comparative*

BATISTA, L.A.; HAIBARA, A.S.; SCHENBERG, L.C.; MOREIRA, F.A. Effects of alprazolam and cannabinoid-related compounds in an animal model of panic attack. *Behav Brain Res.* v. 317, p. 508-514, 2017.

BEHBEHANI, M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Progress in Neurobiology*, v. 46, p. 575-605, 1995.

BELZUNG, C.; LE GUIQUET, A.M.; CRESTANI, F. Flumazenil induces benzodiazepine partial agonist-like effects in BALB/c but not C57BL/6 mice. *Psychopharmacology (Berl)*. v. 148, n. 1, p. 24-32, 2000.

BERQUIN, P.; BODINEAU, L. GROS, F. LARNICOL, N. Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflex: a Fos study in adult rats. *Brain Research*, v. 857, n 1-2, p. 30-40, 2000.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol*, v. 39, p. 43-68, 1988.

BLANCHARD, R.J.; FLANELLY, K.J.; BLANCHARD, D.C. Defensive behaviors of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *J Comp Psychol* v. 100, p. 101– 107, 1986.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev* v. 25, p. 205– 218, 2001.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Eur J Pharmacol*, v. 463, p. 97-116, 2003.

BLANCHARD, D.C.; HYND, A.L.; MINKE, K.A.; MINEMOTO, T.; BLANCHARD, R.J. Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 25, p. 761-770, 2001.

BLANCHARD, D.C.; SAKAI, R.R.; MCEWEN, B.; WEISS, S.M.; BLANCHARD, R.J. Subordination stress: behavioral, brain, and neuroendocrine correlates. *Behav Brain Res*. v. 58, n. 1-2, p. 113-21, 1993.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol*, v. 103, p. 70-82, 1989.

BLANCHARD, R.J.; FLANNELLY, K.J.; BLANCHARD, D.C. Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *J Comp Psychol*. v. 100, n. 2, p. 101-7, 1986.

BLANCHARD, R.J.; YUDKO, E.B.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, D.C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav Brain Res*. v. 58, n. 1-2, p. 155-65, 1993.

BRANDÃO, M.L.; BORELLI, K.G.; NOBRE, M.J.; et al. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav Rev*. v. 29, n. 8, p. 1299-311, 2005.

BRIGGS, A.C.; STRETCH, D.D.; BRANDON, S. Subtyping of panic disorder by symptom profile. *The British Journal of Psychiatry*, v. 163, p. 201-209, 1993.

BUENO, C.H.; ZANGROSSI, H. JR.; VIANA, M.B. The inactivation of the basolateral nucleus of the rat amygdala has an anxiolytic effect in the elevated T-maze and light/dark transition tests. *Braz J Med Biol Res*. v. 38, n. 11, p. 1697-701, 2005.

BYMASTER, F.P.; ZHANG, W.; CARTER, P.A.; SHAW, J.; CHERNET, E.; PHEBUS, L.; WONG, D.T.; PERRY, K.W. Fluoxetine, but not other selective serotonin uptake inhibitors, increases norepinephrine and dopamine extracellular levels in prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)*. v. 160, n. 4, p. 353-61, 2002.

CAMPOS, A.C.; FOGAÇA, M.V.; AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES, F.S. Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev Bras Psiquiatr*. v. 35, n. 2, p. 101-111, 2013.

CANTERAS, N.S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 71, n. 3, p. 481-491, 2002.

CANTERAS , N.S.; GRAEFF, F.G. Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: Implications for panic disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 46, n. 3, p. 352-364, 2014.

CARVALHO-NETO, E.F. Medo e ansiedade: Aspectos comportamentais e neuroanatômicos *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo*, v. 54, n.2, p. 62-5, 2009.

CASANOVA, J. P.; CONTERAS, M.; MOYA, E. A.; TORREALBA, F.; ITURRIAGA, R. Effect of insular cortex inactivation on autonomic and behavioral responses to acute hypoxia in conscious rats. *Behavioral Brain Research*, v. 253, p. 60-67, 2013.

CASAROTTO, P.C.; DE BORTOLI, V.C.; CORRÊA, F.M.; et al. Panicolytic-like effect of BDNF in the rat dorsal periaqueductal grey matter: the role of 5-HT and GABA. *Int J Neuropsychopharmacol.* v. 13, n. 5, p. 573-82, 2010.

Chouinard G. The search for new off-label indications for antidepressant, antianxiety, antipsychotic and anticonvulsant drugs. *J Psychiatry Neurosci.* v. 31, n. 3, p. 168-76, 2006.

COPPEN, A. The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry.* v. 113, n. 504, p. 1237-64, 1967.

CRASKE, M.G.; STEIN, M.B. Anxiety. *Lancet.*, v. 388, n. 10063, p. 3048-3059, 2016.

DALVI, A.; RODGERS, R.J. Behavioral effects of diazepam in the murine plus-maze: flumazenil antagonism of enhanced head dipping but not the disinhibition of open-arm avoidance. *Pharmacol Biochem Behav.* v. 62, n. 4, p. 727-34, 1999.

DARWIN, C. The expression of emotions in man and animals. New York: *Philosophical Library*; 1872

DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defense. *J Psychopharmacol*, v. 5, p. 305-315, 1991.

DE BORTOLI, V.C.; NOGUEIRA, R.L.; ZANGROSSI, H. JR. Effects of fluoxetine and buspirone on the panicolytic-like response induced by the activation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology (Berl)*. v. 183, n. 4, p. 422-8, 2006.

DE BORTOLI, V.C.; NOGUEIRA, R.L.; ZANGROSSI, H. JR. Alprazolam potentiates the antiaversive effect induced by the activation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008 Jun;v. 198, n. 3, p. 341-9, 2008.

DE BORTOLI, V.C.; YAMASHITA, P.S.; ZANGROSSI, H. JR. 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor control of a panic-like defensive response in the rat dorsomedial hypothalamic nucleus. *J Psychopharmacol*. v. 27, n. 12, p. 1116-23, 2013.

DE JONGE, P.; ROEST, A.M.; LIM, C.C. et al. Cross-national epidemiology of panic disorder and panic attacks in the world mental health survey. *Depression and Anxiety*, v. 33, n. 12, p. 1155–1177, 2016.

DE OLIVEIRA SERGIO, T.; DE BORTOLI, V.C.; ZANGROSSI, H. JR. Serotonin-2A receptor regulation of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray matter: the role of GABA. *Psychopharmacology (Berl)*. v. 218, n. 4, p. 725-32, 2011.

DE PAULA SOARES, V.; ZANGROSSI, H. JR. Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Res Bull*. v. 64, n. 2, p. 181-8, 2004.

DEL-BEN, C.M.; GRAEFF, F.G. Panic Disorder: Is the PAG Involved? *Neural Plasticity*. 2009.

DUNNER, D.L.; ISHIKI, D.; AVERY, D.H.; WILSON, L.G.; HYDE, T.S. Effect of alprazolam and diazepam on anxiety and panic attacks in panic disorder: a controlled study. *J Clin Psychiatry*. v. 4, n. 9, p. 458-60, 1996.

FLORES, P.; PELLÓN, R. Antipunishment effects of diazepam on two levels of suppression of schedule-induced drinking in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* v. 67, p. 207–214, 2000.

FULLER, R.W. Uptake inhibitors increase extracellular serotonin concentration measured by brain microdialysis. *Life Sci.* v. 55, n. 3, p. 163-7, 1994.

GELLER, I.; SEIFTER, J. The effects of meprobamate, barbiturates, D-amphetamine, and promazine on experimentally induced conflict in the rat, *Psychopharmacologia*, p. 482-492, 1960.

GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L. (Ed). *Neurobiologia das doenças mentais*. 5.ed. São Paulo: Lemos, p.135-178, 1999.

GRAEFF, F.G. On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology*, v. 163, n. 3-4, p. 467-476, 2002.

GRAEFF, F.G. Serotonin, periaqueductal gray matter and panic disorder. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 25, p. 239-259, 2003.

GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 28, n. 3, p. 239-59, 2004.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI, H JR. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, v. 10, n. 3, p. 207-217, 2010.

GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hipocampal system. 2nd ed. Oxford: *Oxford University Press*, 2000.

GRIPP-FERNANDES, G. Envolvimento da neurotransmissão nitrérgica da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral na mediação de comportamentos defensivos expressos por ratos sob condição de hipóxia. Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, *Universidade de São Paulo*, 2017.

GRIEBEL, G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol Ther*, v. 65, n. 3, p. 319-395, 1995.

GRIEBEL, G.; PERRAULT, G.; SIMIAND, J.; et al. SL651498: an anxiolytic compound with functional selectivity for α_2 - and α_3 - containing γ -aminobutyric acid (GABA) receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v. 298, p. 753– 768, 2001.

GRIFFITHS, J.L.; LOVICK, T.A. GABAergic neurones in the rat periaqueductal grey matter express α_4 , β_1 and δ GABA receptor subunits: plasticity of expression during the estrous cycle. *Neuroscience*. v. 136, n. 2, p. 457-466, 2005.

GRIEBEL, G.; HOLMES, A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* v. 2, n. 9, p. 667-87, 2013.

GRIFFIN, C.E.; KAYE, A.M.; BUENO, F.R.; KAYE, A.D. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *Ochsner J.* v. 13, n. 2, p. 214-23, 2013.

GUIMARÃES, F.S.; ZANGROSSI, H. JR.; DEL BEN C.M.; CAPÍTULO 4.9 - Serotonin in Panic and Anxiety Disorders. In: Christian Müller & Barry Jacobs (Eds.): MULLER, C.P.; JACOBS, B.L. (Ed.), *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin*, San Diego: Elsevier, p. 667–685, 2010.

HANDLEY, S.L.; MCBLANE, J.W. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods*. v. 29, n. 3, p. 129-38, 1993.

HELDT, S.A.; RESSLER, K.J. Localized injections of midazolam into the amygdala and hippocampus induce differential changes in anxiolytic-like motor activity in mice. *Behav Pharmacol*. v. 17, n. 4, p. 349-356, 2006.

HOFFMAN, E.J.; MATHEW, S.J. Anxiety disorders: a comprehensive review of pharmacotherapies. *Mt Sinai J Med*. v. 75, n. 3, p. 248-62, 2008.

JACOB, C.A.; CABRAL, A.H.; ALMEIDA, L.P.; et al. Chronic imipramine enhances 5-HT(1A) and 5-HT(2) receptors-mediated inhibition of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray. *Pharmacol Biochem Behav*. v. 72, n. 4, p. 761-766, 212.

JENCK, F.; MOREAU, J.; MARTIN, J.R. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a stimulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Research*, v. 57, p. 181-191, 1995.

JOHNSON, P.L.; HOLLIS, J.H.; MORATALLA, R., et al. Acute hypercarbic gas exposure reveals functionally distinct subpopulations of serotonergic neurons in rats. *Journal of Psychopharmacology*, v. 19, n. 4, p. 327-41., 2005.

JOHNSON, P.L.; SHEKHAR, A. An animal model of panic vulnerability with chronic disinhibition of the dorsomedial/perifornical hypothalamus. *Physiol Behav*. v. 107, n. 5, p. 686-98, 2012.

KASPER, S.; RESINGER, E. Panic disorder: the place of benzodiazepines and selective serotonin reuptake inhibitors. *Eur Neuropsychopharmacol.* v. 11, n. 4, p. 307-21, 2001.

KESSLER, R.C.; CHIU, W.T.; JIN, R.; RUSCIO, A.M.; SHEAR, K.; WALTERS, E.E. The Epidemiology of Panic Attacks, Panic Disorder, and Agoraphobia in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of General Psychiatry*, v. 63, n. 4, p. 415, 2006.

KLEIN, D.F. False suffocation alarms, spontaneous conditions and related disorders. *Archives of General Psychiatry*, v. 50, n. 4, p. 306-317, 1993.

KOCH, S.; PERRY, K.W.; NELSON, D.L.; CONWAY, R.G.; THRELKELD, P.G.; BYMASTER, F.P. R-fluoxetine increases extracellular DA, NE, as well as 5-HT in rat prefrontal cortex and hypothalamus: an in vivo microdialysis and receptor binding study. *Neuropsychopharmacology*. v. 27, n. 6, p. 949-59, 2002.

KRAMER, M.K.; NOLAN, P.C.; WALDROP, T.G. In vitro response of neurons in the periaqueductal gray to hypoxia and hypercapnia. *Brain Research*, v. 885, n. 2, p. 197-203, 1999.

LEE, C.; RODGERS, R.J. Effects of benzodiazepine receptor antagonist, flumazenil, on antinociceptive and behavioural responses to the elevated plus-maze in mice. *Neuropharmacology*. v. 30, n. 12A, p. 1263-7, 1991.

LOPES, M.A. Efeito do clonazepam sobre as respostas defensivas medidas em ratos submetidos ao labirinto em T elevado. Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, *Universidade de São Paulo*, 2010.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. *Curr Pharm Des.* v. 15, n. 14, p. 1563-86, 2009.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ÁLAMO, C.; GARCÍA-GARCÍA, P. The discovery of chlordiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: Half a century of anxiolytic drugs. *Journal of Anxiety Disorders.* v. 25, p. 554–562, 2011.

LOVICK, T.A.; PAUL, N.L. Co-localization of GABA with nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent diaphorase in neurones in the dorsolateral periaqueductal grey matter of the rat. *Neurosci Lett.* v. 272, n. 3, p. 167-70, 1999.

MARCHESI, C. Pharmacological management of panic disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat.* v. 4, n. 1, p. 93-106, 2008.

MCKERNAN, R.M.; ROSAHL, T.W.; REYNOLDS, D.S., et al. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA_A receptor A subtype. *Nat. Neurosci.* v. 3, n. 7, p. 587- 592, 2010.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 28, n. 3, p. 285-305, 2004.

MILLAN, M.J.; BROCCO, M. The Vogel conflict test: procedural aspects, gamma-aminobutyric acid, glutamate and monoamines. *Eur J Pharmacol*, v. 463, p. 67-96, 2003.

MÖHLER, H. The rise of a new GABA pharmacology. *Neuropharmacology*. v. 6, n. 7-8, p.1042-1049, 2013.

MONDIN, T.C.; KONRADT, C.E.; CARDOSO, T. DE A.; QUEVEDO, L. DE A.; JANSEN, K.; MATTOS, L.D. DE; PINHEIRO, R.T.; SILVA, R.A.DA. Anxiety disorders in young people: a population-based study. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 35, n. 4, p. 347–52, 2013.

NARDI, A.; NASCIMENTO, I.; VALENÇA, A.M.; et al. Respiratory panic disorder subtype: acute and long-term response to nortriptyline, a noradrenergic tricyclic antidepressant. *Psychiatry research*, v. 120, n. 3, p. 283-293, 2003.

NASCIMENTO, J.O.; KIKUCHI, L.S.; DE BORTOLI, V.C.; ET AL. Dorsomedial hypothalamus serotonin 1A receptors mediate a panic-related response in the elevated T-maze. *Brain Res Bull*. v. 109, p. 39-45, 2014.

NASCIMENTO, J.O.; ZANGROSSI, H. JR.; VIANA, M.B. Effects of reversible inactivation of the dorsomedial hypothalamus on panic- and anxiety-related responses in rats. *Braz J Med Biol Res*. v. 43, n. 9, p. 869-73, 2010.

NASHOLD, B.S. JR; WILSON, W.P.; SLAUGHTER, D.C. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg*, v. 30, n. 1, p. 14-24, 1969.

NOYES, R.JR.; BURROWS, G.D.; REICH, J.H.; JUDD, F.K.; GARVEY, M.J.; NORMAN, T.R.; COOK, B.L.; MARRIOTT, P. Diazepam versus alprazolam for the treatment of panic disorder. *J Clin Psychiatry*. v. 5, n. 8, p. 349-55, 1996.

NUSS, P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatr Dis Treat*. v. 11, p. 165-75, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Depression and other common mental disorders. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254610/1/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf?ua=1>, 2017.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed., San Diego: *Elsevier Academic Press*, 2007.

PESOLD, C.; TREIT, D. The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Res.* v. 671, n. 2, p. 213-221, 1995.

PINHEIRO, S.N., DEL-BEN, C.N.; ZANGROSSI JR., H.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic and pan-icolytic effects of escitalopram in the elevated T-maze. *J. Psychopharmacol.* v. 22, p. 132-137, 2008.

PIRES, A.J.; CASANOVA, C.C.; QUEVEDO, L. DE A.; JANSEN, K.; SILVA, R.A. DA. Panic disorder and psychoactive substance use in primary care. *Trends in Psychiatry and Psychotherapy*, v. 36, n. 2, p. 113–118, 2014.

PIRKER, S.; SCHWARZER, C.; WIESELTHALER, A.; SIEGHART, W.; SPERK, G. GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience.* v. 101, n. 4, p. 815-50, 2000.

POBBE, R.L.; LOPES, M.A.; VASCONCELOS, A.T.; et al. Influence of procedural variables on rat inhibitory avoidance and escape behaviors generated by the elevated T-maze. *Behav Brain Res.* v. 273, p. 45-51, 2014.

PROTOPOPESCU, X.; PAN, H.; TUESCHER, O.; et al. Increased brainstem volume in panic disorder: a voxel-based morphometric study. *Neuroreport.* v. 17, n. 4, p. 361-3, 2006.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

RUDOLPH, U.; CRESTANI, F.; BENKE, D.; BRÜNIG, I.; BENSON, J.; FRITSCHY, J.M.; MARTIN, J.R.; BLUETHMANN, H.; MÖHLER, H. Benzodiazepine actions mediated by specific g-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Nature*, v. 401, n. 6755, p. 796-800, 1999.

SALUM, G.A.; BLAYA, C.; MANFRO, G.G. Transtorno do pânico. *Rev Psiquiatr RS*. v. 31. n. 2, p. 86-94, 2009.

SAMARDZIC, J.; STRAC, D.S. Benzodiazepines and Anxiety Disorders: From Laboratory to Clinic, *New Developments in Anxiety Disorders*, doi: 10.5772/64959, 2016.

SANDERS, S.K.; SHEKHAR, A. Anxiolytic effects of chlordiazepoxide blocked by injection of GABAA and benzodiazepine receptor antagonists in the region of the anterior basolateral amygdala of rats. *Biol Psychiatry*. v. 37, n. 7, p. 473-6, 1995.

SANT'ANA AB, WEFFORT LF, DE OLIVEIRA SERGIO T.; et al. Panic-modulating effects of alprazolam, moclobemide and sumatriptan in the rat elevated T-maze. *Behav Brain Res*. v. 315, p. 115-122, 2016.

SAKAI, Y.; KUMANO, H.; NISHIKAWA, M. et al. Cerebral glucose metabolism associated with a fear network in panic disorder. *NeuroReport*, v. 16, n. 9, p. 927–931, 2005a.

SAKAI, Y.; KUMANO, H.; NISHIKAWA, M. et al. Erratum: cerebral glucose metabolism associated with a fear network in panic disorder. *NeuroReport*, v. 16, n. 11, p. 1251, 2005b.

SAKAI, Y.; KUMANO, H.; NISHIKAWA, M. et al. Changes in cerebral glucose utilization in patients with panic disorder treated with cognitive-behavioral therapy. *NeuroImage*, v. 33, n. 1, p. 218–226, 2006.

SCHENBERG, L.C. Towards a translational model of panic attack. *Psychology and Neuroscience*, v. 3, n. 1, p. 9-37, 2011.

SCHENBERG, L.C.; BITTENCOURT, A.S.; SUDRÉ, E.C.; VARGAS, L.C. Modeling panic attacks. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 25, n. 7-8, p. 647-659, 2001.

SCHENBERG, L.C.; SCHIMITEL, F.G.; ARMINI, R.DE S.; BERNABÉ, C.S.; ROSA, C.A.; TUFIK, S.; MÜLLER, C.J.; QUINTINO-DOS-SANTOS, J.W. Translational approach to studying panic disorder in rats: hits and misses. *Neurosci Biobehav Rev*. v. 3, p. 472-96, 2014.

SCHIMITEL, F.G.; ALMEID, G.M.; PITOL, D.N.; ARMINI, R.S.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L.C. Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience*, v. 200, p. 59-73, 2012.

SHIBATA, S.; YAMASHITA, K.; YAMAMOTO, E.; et al. Effects of benzodiazepine and GABA antagonists on anticonflict effects of antianxiety drugs injected into the rat amygdala in a water-lick suppression test. *Psychopharmacology* v. 98, p. 38–44, 1989.

SHUHAMA, R.; DEL-BEM, C.M.; LOUREIRO, S.R.; GRAEFF, F.G. Animal defense strategies and anxiety disorders. *An Acad Bras Cienc*. v. 79, n. 1, p. 97-109, 2007.

SHUHAMA, R.; DEL-BEM, C.M.; LOUREIRO, S.R.; GRAEFF, F.G. Defensive responses to threat scenarios in Brazilians reproduce the pattern of Hawaiian

Americans and non-human mammals. *Braz J Med Biol Res.* v. 41, n. 4, p. 324-32, 2008.

SÖDERPALM, B. Pharmacology of the benzodiazepines; with special emphasis on alprazolam. *Acta Psychiatr Scand Suppl.* v. 335, p. 39-46, 1987.

SÖDERPALM, B.; ENGEL, J.A. α 2-Adrenoceptor antagonists potentiate the anticonflict and the rotarod impairing effects of benzodiazepines. *J. Neural Transm.* v. 76, p. 191– 204, 1989.

SPIACCI, A. JR; SERGIO, T. DE O.; DA SILVA, G.S.; et al. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray inhibits panic-like defensive behaviors in rats exposed to acute hypoxia. *Neuroscience.* v. 307, p. 191-198, 2015.

SPIACCI, A. JR.; VILELA-COSTA, H.H.; SANT'ANA, A.B.; et al. Panic-like escape response elicited in mice by exposure to CO₂, but not hypoxia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* v. 81, p. 178-186, 2018.

TEIXEIRA, R.C.; ZANGROSSI, H. JR; GRAEFF, F.G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav,* v. 65, p. 571-576, 2000.

UCHIDA, R.R; DEL-BEN, C.M.; BUSATTO, G.F. et al. Regional gray matter abnormalities in panic disorder: a voxel-based morphometry study. *Psychiatry Research: Neuroimaging,* v. 163, n. 1, p. 21–29, 2008.

UHLÍROVÁ, L.; SUSTKOVÁ-FISEROVÁ, M.; KRSIAK, M. Behavioral effects of flumazenil in the social conflict test in mice. *Psychopharmacology (Berl).* v. 171, n. 3, p. 259-69, 2004.

VICENTE, M.A.; ZANGROSSI, H. Serotonin-2C receptors in the basolateral nucleus of the amygdala mediate the anxiogenic effect of acute imipramine and fluoxetine administration. *Int J Neuropsychopharmacol.* v. 15, n. 3, p. 389-400, 2012.

VICENTE, M.A.; ZANGROSSI, H. JR. Involvement of 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A} receptors of the basolateral nucleus of the amygdala in the anxiolytic effect of chronic antidepressant treatment. *Neuropharmacology.* v. 79, p. 127-135, 2014.

ZANGROSSI, H. JR.; GRAEFF, F.G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. *Neurosci Biobehav Rev.*, v. 46, n. 3, p. 397-406, 2014.

ZANGROSSI, H. JR.; VIANA, M.B.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic effect of intra-amygdala injection of midazolam and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in the elevated T-maze. *Eur J Pharmacol.* v. 369, n. 3, p. 267-270, 1999.

ZANOVELI, J.M.; NOGUEIRA, R.L.; ZANGROSSI, H. JR. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. *Eur J Pharmacol.* v. 473, n. 2-3, p. 153-61, 2003.

ZANOVELI, J.M.; NOGUEIRA, R.L.; ZANGROSSI, H. JR. Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: evidence from the elevated T-maze test of anxiety. *Behav Pharmacol.* v. 16, n. 7, p. 543-52, 2005.

ZANOVELI, J.M.; NOGUEIRA, R.L.; ZANGROSSI JR., H. Enhanced reactivity of 5-HT_{1A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray matter after chronic treatment with fluoxetine and sertraline: evidence from the elevated T-maze. *Neuropharmacology* v. 52, p. 1188-1195, 2007.

ZANOVELI, J.M.; POBBE, R.L.; DE BORTOLI, V.C.; CARVALHO, M.C.; BRANDÃO, M.L.; ZANGROSSI, H. JR. Facilitation of 5-HT_{1A}-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 13, n. 8, p. 1079-88, 2010.

RUSO, A.S.; GUIMARÃES, F.S.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal grey of rats in anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 110, n. 1-2, p. 198-202, 1993.

ZORUNSKI, C.F. Insights into the structure and function of GABA-benzodiazepine receptors: ion channels and psychiatry. *American Journal of Psychiatry*, v. 148, p. 162-173, 1991.