

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

**ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES 5-HT_{1A} NO
COMPORTAMENTO DEFENSIVO INDUZIDO POR ESTIMULAÇÃO
ELÉTRICA DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL
DORSAL DE RATOS COM EXPERIÊNCIA PRÉVIA A EVENTOS
ESTRESSANTES.**

ANA CAROLINA GARCIA BROIZ

Ribeirão Preto

2007

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

**ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES 5-HT_{1A} NO
COMPORTAMENTO DEFENSIVO INDUZIDO POR ESTIMULAÇÃO
ELÉTRICA DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL
DORSAL DE RATOS COM EXPERIÊNCIA PRÉVIA A EVENTOS
ESTRESSANTES.**

**Dissertação de Mestrado
apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título
de Mestre em Ciências.
Área de Concentração:
Psicobiologia.**

Aluna: Ana Carolina Garcia Broiz

Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão

Ribeirão Preto

2007

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

**5-HT_{1A} RECEPTOR MECHANISMS OF THE DORSAL
PERIAQUEDUCTAL GRAY IN THE CONDITIONED AND
UNCONDITIONED FEAR IN RATS.**

ANA CAROLINA GARCIA BROIZ

Ribeirão Preto

2007

Dedico esta conquista a minha querida família, meus pais Irene Garcia Broiz e Sinval Broiz e a meu irmão Gustavo Garcia Broiz, minha madrinha Maria Isabel P. Macedo e seus filhos Fábio R. Macedo e Lívia C. Macedo, por estarem sempre presentes em minha vida dando todo apoio e principalmente pelo incentivo dado a este novo projeto de minha vida.

À minha primeira orientadora, Professora Telma G. C. S. Andrade pela orientação na iniciação científica nesta área apaixonante e pelo constante incentivo que foi de grande ajuda nesta caminhada da pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcus Lira Brandão, primeiro por aceitar me orientar, segundo pela bela orientação nestes dois anos e finalmente pela sua paciência.

Aos professores do programa, os quais colaboraram para o aumento e fortalecimento dos meus conhecimentos na área, através de suas aulas, e também pela relação de amizade que construímos.

A minha amiga Viviane Avanzi pelo apoio e por me encaminhar para a pós-graduação aqui na USP.

À Sueli A. Masson, pela dedicação e grande ajuda no início do projeto, além da amizade e apoio pelo momento pessoal difícil que passei no primeiro ano.

Ao Manoel Jorge Nobre do Espírito Santo pela colaboração científica no início do projeto, além do seu bom humor que me proporcionou boas risadas!

Aos colegas de laboratório: Luciana C. Oliveira (pela grande ajuda nos experimentos), Raquel C. Ruiz-Martinez, Milene C. Carvalho, Marcos Galdiano Lopes, Carlos Eduardo Macedo, Maria Cecília Z. L. Vinhas e Julia M. Santos pelo companheirismo. Ao Guto por cuidar muito bem dos animais e pela amizade.

MUITO OBRIGADA A TODOS!

**“ É preciso amar as pessoas como se não houvesse amanhã
Porque se você parar para pensar, na verdade não há.
Me diz porque é que o céu é azul
Me explica a grande fúria do mundo.”
(Mais do Mesmo - Legião Urbana)**

SUMÁRIO

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	03
INTRODUÇÃO	
Medo e Reação de defesa.....	05
Medos Incondicionado e Condicionado.....	09
Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP).....	11
Mediação Serotoninérgica do Comportamento Defensivo.....	14
OBJETIVOS.....	19
MATERIAIS E MÉTODOS	
Animais.....	20
Cirurgia.....	20
Medida dos Limiares Aversivos.....	21
Microinjeção.....	22
Condicionamento Contextual de Medo.....	23
Tabela 1. Delineamento Experimental.....	25
Drogas.....	26
Histologia.....	26
Análise Estatística.....	27
RESULTADOS	

Efeitos de injeções de drogas na SCPD de animais sem Experiência	
Aversiva Prévia.....	28
Sítios de Estimulação e Microinjeção.....	29
Administração Intra-SCPD de 8-OH-DPAT 4 nmol.....	30
Administração Intra-SCPD de 8-OH-DPAT 8 nmol.....	32
Administração Intra-SCPD de WAY100635.....	34
Administração Intra-SCPD de WAY100635 + 8-OH-DPAT.....	36
Efeitos de injeções de drogas na SCPD de animais com Experiência	
Aversiva Prévia no mesmo contexto.....	38
Sítios de Estimulação e Microinjeção.....	39
Administração Intra-SCPD de 8-OH-DPAT.....	40
Administração Intra-SCPD de WAY100635.....	41
Congelamento Condicionado Contextual.....	42
Efeitos do 8-OH-DPAT.....	43
Efeitos do WAY100635.....	45
Efeitos de injeções de drogas na SCPD de animais com Experiência	
Aversiva Prévia no contexto diferente.....	47
Sítios de Estimulação e Microinjeção.....	48
Administração Intra-SCPD de 8-OH-DPAT.....	49
Administração Intra-SCPD de WAY100635.....	51
DISCUSSÃO.....	53

CONCLUSÕES.....62

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....63

RESUMO

O comportamento emocional tem sido considerado fundamental para a sobrevivência dos animais, sendo o medo uma de suas mais primitivas e importantes formas. A substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) tem-se destacado como uma estrutura importante na organização das respostas defensivas. Estudos usando estimulação elétrica e química da SCPD e microinjeções de drogas agonistas e antagonistas de receptores serotoninérgicos mostraram uma mediação serotoninérgica através dos subtipos de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} na regulação do comportamento defensivo organizado nesta estrutura. O objetivo deste trabalho foi examinar a mediação serotoninérgica na SCPD através de receptores 5-HT_{1A} nas respostas defensivas de animais sem e com experiência aversiva prévia. Para isto, os limiares de congelamento e fuga foram determinados em ratos implantados com uma cânula acoplada a um eletrodo na SCPD, antes e após microinjeção local do agonista 8-OH-DPAT (4 e 8 nmol) e do antagonista de receptores 5-HT_{1A} WAY100635 (10 nmol). Os efeitos destas drogas injetadas na SCPD foram avaliados também sobre o tempo de congelamento pós-estimulação em animais ingênuos e também em animais colocados em um contexto no qual receberam choques inescapáveis nas patas 24 h antes (medo condicionado contextual). O 8-OH-DPAT, de

maneira dose dependente, produziu um efeito antiaversivo sobre os limiares de congelamento e fuga em ratos sem experiência aversiva prévia, mas não nos animais com experiência aversiva prévia quando comparado com seus controles. Por outro lado, este agonista 5-HT_{1A} reduziu o tempo de congelamento contextual. Já o WAY100635 não produziu alterações significativas sobre os limiares aversivos em ratos ingênuos ou com experiência aversiva prévia, mas elevou o tempo de congelamento contextual nestes animais (efeito pró-aversivo). Estes resultados estão em concordância com a idéia de uma modulação fásica exercida pela 5-HT sobre os substratos neurais do medo organizado na SCPD. Por outro lado, mecanismos mediados pelos receptores 5-HT_{1A} não são alterados em animais com experiência aversiva prévia. Acreditamos que estes resultados trazem uma contribuição importante para a nossa compreensão sobre a integração de estados aversivos no SNC e, particularmente sobre o funcionamento destes substratos neurais de defesa na SCPD de animais com experiência aversiva prévia.

Palavras-chaves: 5-HT_{1A}, substância cinzenta periaquedutal dorsal, 8-OH-DPAT, WAY100635, medo incondicionado, medo contextual.

ABSTRACT

It is well established that 5-HT_{1A} mechanisms modulate the defensive behavior produced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray (dPAG). However, in spite of the notion that past stressful experiences play a role in certain types of anxiety only few studies with stimulation of the dPAG of rats without previous aversive experience have been conducted so far. In this study, we examined the mediation of 5-HT_{1A} receptors of the dPAG in rats naïve and in rats previously submitted to contextual fear conditioning (CFC). Defensive behaviors induced by activation of the dPAG were assessed by measuring the lowest intensity of electric current applied to this structure (threshold) able to produce freezing and escape responses during testing sessions of CFC, in which animals were placed in a context previously paired to footshocks. The persistence of the freezing behavior after the interruption of the dPAG electrical stimulation was also evaluated. The 5-HT_{1A} function of the dPAG in this condition was evaluated by local injections of 8-OH-DPAT (4 and 8 nmol/0.2 µl) and WAY100635 (10 nmol/0.2 µl), selective agonist and antagonist of 5-HT_{1A} receptors, respectively. In accordance with previous studies, 8-OH-DPAT increased the aversive thresholds (antiaversive effects) and injection of WAY100635 into the dPAG did not produce significant effects in naive rats. On the contrary, both serotonergic drugs 8-OH-DPAT and WAY 100635 did not produce any significant effects on the aversive thresholds. Post-

stimulation freezing was not affected by any treatment given to animals before or after CFC. However, the contextual conditioned freezing was attenuated or enhanced by intra-SCPD of 8-OH-DPAT and WAY100635, respectively. The present results suggest that 5-HT_{1A} receptor-mediated mechanisms exert a phasic inhibition on the neural substrates of fear in the dPAG in naïve rats whereas past stressful experience does not produce significant changes in the synaptic function of 5-HT₁ receptors within the dPAG.

Keywords: 5-HT_{1A} receptors, Dorsal periaqueductal gray, 8-OH-DPAT, WAY100635, Unconditioned fear, Contextual fear conditioning.

INTRODUÇÃO

1. Medo e Reação de Defesa

Dentre as respostas emocionais o medo e a raiva são os mais estudados. O medo é uma emoção crítica para a sobrevivência de muitos vertebrados superiores. Pode ser considerado como um sistema comportamental defensivo antipredador, ou seja, protege animais e seres humanos do encontro com as ameaças ambientais potencialmente perigosas sendo reconhecida de forma inata ou aprendida. As respostas de medo são hierarquicamente organizadas. Partindo deste princípio, temos três níveis de defesa, de acordo com que postulou Caroline e Robert Blanchard (1986), sendo determinados principalmente pela ausência ou presença do perigo real e pela distância entre o predador e a presa. São eles:

1º) Potencial: este nível de defesa pode ocorrer quando o animal encontra-se numa situação nova ou em um meio ambiente, onde no passado, entrou em contato com um perigo à sua sobrevivência. Como resposta a esta ameaça potencial, o animal explora cuidadosamente o local, com máxima atenção. O rato apresenta um comportamento bem característico nesta situação, a avaliação de risco (risk-assessment), o qual é caracterizado por cautela na exploração e esticamento do corpo e abdômen mantido rente ao chão, e cheira com o focinho os cantos e paredes.

2º) Distal: neste nível, o predador está presente e é detectado pela presa, porém o predador está posicionado a uma distância segura e não iniciará um ataque. O animal como resposta a esta ameaça distal, apresenta o comportamento de congelamento (inibição comportamental), assim diminuindo a probabilidade de ser detectado e também se preparar para uma defesa ativa.

3º) Proximal: este nível é chamado também de ameaça proximal, devido à aproximação do predador a uma distância crítica da presa, ou até em contato com seu corpo. Assim, o animal se defende com a fuga ou com a luta. Quando possível, a fuga é a resposta predominante, mas se existem condições para um ataque ao oponente, à agressão defensiva é a resposta prevalente.

O substrato neural destes níveis de defesa parece ser distinto. Em relação ao primeiro, Gray e McNaughton (2000) notaram semelhança entre o sistema de inibição comportamental (SInC), e o conceito de ameaça potencial elaborado por Blanchard e cols. (1986). Este sistema é composto pela via serotoninérgica ascendente que se projeta para o septo e o hipocampo e que pode estar implicada na gênese da inibição comportamental verificada em situações de perigo. O septo e o hipocampo também recebem aferências noradrenérgicas provenientes do *locus coeruleus* na ponte. O SInC responde a eventos punitivos, estímulos novos e frustração condicionada através supressão do comportamento operante mantido por recompensa ou, então, pela esquiva da punição (Brandão et al., 2003). A propósito, Gray e McNaughton (2000)

sugerem que a função principal do SInC é a de detector de conflito. Esta formulação é importante para se distinguir medo e ansiedade. No medo, não há tendência de aproximação da fonte de perigo, mas somente a de se afastar dela ou evitá-la. Acrescenta-se também a amígdala como estrutura responsável pelo componente afetivo do conflito, além do SInC, que se encarregaria do componente cognitivo (Graeff, 2002; Graeff, 2003).

O substrato neural do segundo nível de defesa foi bem estudado por Davis (1992). Eles analisaram a potencialização do sobressalto, cuja intensidade é proporcional ao grau do congelamento. A resposta ao sobressalto é eliciada por um estímulo acústico súbito, visual ou tátil. Uma típica resposta é composta de uma contração seqüencial rápida dos músculos, com mais reação proeminente dos músculos da face, pescoço e ombros. Nas últimas décadas, a resposta de sobressalto se tornou um modelo valioso para investigar respostas comportamentais tais como habituação, condicionamento Pavloviano, inibição pré-pulso e sensibilização. Além disso, certas emoções enfraquecem o sobressalto, enquanto outras tais como o medo e a ansiedade realçam-no (Fendt & Fanselow, 1999). A partir de estudos usando o modelo de sobressalto potencializado pelo medo, estes autores sugeriram que o núcleo central da amígdala e a parte ventral da substância cinzenta periaquedutal são cruciais para a expressão do congelamento produzido por estímulos ou contextos condicionados aversivos (Fendt & Fanselow, 1999; Graeff, 2003).

Para finalizar, o principal substrato neural do terceiro nível de defesa parece ser a substância cinzenta periaquedutal, pois a estimulação elétrica aplicada nesta região, elicia reações de defesa como a fuga ou luta (Graeff, 2003). Assim, surgiu a idéia de sistemas neurais de aversão no sistema nervoso central. O mecanismo associado à resposta incondicionada está associado ao chamado sistema fuga/ luta ou sistema cerebral aversivo (SCA), que é composto pelo hipotálamo medial, substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) e pela amígdala (Fanselow, 1991). A estimulação elétrica destas estruturas induz reações de defesa em diversos animais, inclusive no homem. Além destas estruturas, há evidências de que também o colículo superior (processador de informações visuais) assim como o colículo inferior (plataforma importante das vias auditivas que se projetam para o tálamo e córtex temporal) participe do SCA (Brandão et al., 2003).

Embora os três componentes deste sistema trabalhem juntos para gerar o comportamento defensivo, estas estruturas são prováveis de exercerem diferentes funções. Neste ponto, Fanselow (1991) tem sugerido que a amígdala sintetiza estímulos provenientes do meio ambiente e então sinaliza a substância cinzenta periaquedutal o grau de ameaça que ele representa ao organismo. Esta, por sua vez, selecionaria, organizaria e executaria o comportamento apropriado e as reações defensivas neurovegetativas (Graeff, 2002).

De maneira simples, podemos dizer que substrato neural mais inferior como à substância cinzenta periaquedutal controla as respostas de forma simples e imediata, quando a ameaça é proximal. Quando a ameaça é distal, teríamos centros mais rostrais coordenando as respostas, como o córtex do cíngulo (estrutura superior do cérebro). Já quando há evitação ou esquiva defensiva (“medo”), o controle fica a cargo da amígdala e do cíngulo anterior e a aproximação defensiva (“ansiedade”) ocorre quando uma forte tendência de gratificação entra em conflito com a evitação (elevados índices de avaliação de risco) sendo regulada pelo sistema septo-hipocampal e cíngulo posterior (Mezzasalma et al., 2004).

Assim, de acordo com Graeff (2002), podemos associar os diferentes níveis de defesa a patologias humanas, sendo que o primeiro nível está relacionado ao Distúrbio de Ansiedade Generalizada, o segundo nível está implicado nas Fobias específicas e o terceiro nível com o Distúrbio do Pânico.

2. Medo Incondicionado e Condicionado

O medo incondicionado apresenta-se quando um estímulo aversivo torna-se capaz de eliciar respostas reflexas. Vários trabalhos mostram que a estimulação da substância cinzenta periaquedutal serve como um estímulo incondicionado aversivo, que elicia um estado de medo, bem caracterizado em ratos, com congelamento, esquiva e apresentação de respostas defensivas a

odores de predadores (Blanchard & Blanchard, 1989; Di Scala et al., 1987; Wallace & Rosen, 2001).

O medo condicionado apresenta-se quando o estímulo condicionado prediz um evento aversivo, tal como choque nas patas ou barulho. A expressão da resposta condicionada ao estímulo condicionado aparece da associação aprendida entre estímulos condicionado e incondicionado. Em ratos, a resposta de medo condicionado é caracterizada pelo congelamento, associada com um aumento na pressão sanguínea, um aumento no batimento cardíaco e vocalizações ultrassônicas (Baldi et al., 2004; Knight et al., 2005; Leman et al., 2003).

De acordo com Graeff (2004), existem diferentes tipos de imobilidade ou congelamento, quando falamos de medo incondicionado ou condicionado. O congelamento por estimulação elétrica da SCPD não se apresenta como contexto dependente, enquanto que o congelamento condicionado é uma associação temporal meio-estímulo incondicionado, ou seja, é contexto dependente. Assim, congelamento incondicionado e condicionado parece ter diferentes substratos neurais, e ainda parecem ter uma relação com pânico e ansiedade antecipatória, respectivamente.

O medo contextual é um dos tipos de medo condicionado mais estudado, e é evocado quando um meio ambiente específico (contexto) é repetidamente pareado com um estímulo aversivo, como choque nas patas. Ratos recebem

choque nas patas no interior de uma caixa experimental, e quando retornam mais tarde a este meio ambiente apresentam um intenso congelamento, a medida mais usada de medo condicionado. Este tipo de aprendizado tem sido chamado de condicionamento de medo contextual (Leman et al., 2003; Lorenzini et al., 1990; Vianna et al., 2001b).

3. Substância Cinzenta Periaquedutal

A substância cinzenta periaquedutal (SCP) é uma estrutura cerebral localizada no mesencéfalo, margeando o aqueduto cerebral. Rostralmente é contínua com a substância cinzenta periventricular ao redor do 3º ventrículo no Hipotálamo. Atualmente, quatro principais subdivisões são aceitas existir na SCP, e têm sido designadas de colunas: dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral (Bandler et al., 1991; Bandler & Shipley, 1994; Carrive, 1993).

A coluna dorsolateral medeia fuga, enquanto que a coluna dorsomedial da SCP é responsável pela resposta de congelamento incondicionado. Tem-se sugerido que a coluna ventrolateral medeia resposta de congelamento condicionado, além das repostas fisiológicas como bradicardia, hipotensão e ainda a analgesia opióide. A coluna lateral está relacionada ao comportamento de fuga vigorosa, a repostas autonômicas e a analgesia não opióide (Bandler & Shipley, 1994; Vargas et al., 2000).

Podemos notar que após as estimulações elétricas aplicadas na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD), os animais apresentam

fundamentalmente uma reação de alerta e comportamentos de congelamento e fuga. O congelamento e a fuga têm um valor visível para a sobrevivência das espécies, particularmente o congelamento, que é apresentado por roedores quando alarmados por uma ameaça distal ou quando em contato com predadores. Portanto, a SCP está criticamente envolvida na expressão das respostas de defesa evocadas pelo predador (Canteras, 2003; Vianna et al., 2003).

A estimulação da SCPD elicia resposta emocional intensa e também motora (Sudré et al., 1993; Jenck et al., 1995). Em humanos, produz intensa ansiedade, pânico, terror e sentimento de iminência de morte acompanhado por dor no peito, taquicardia, sufocamento, exoftalmia, tremor, calafrios e vertigem (Magierek et al., 2003; Mezzasalma, et al., 2004; Popova, 2004). Estas respostas são evocadas apenas pela estimulação da porção dorsal da SCP e não da ventral.

Em ratos, a estimulação elétrica da SCPD tem propriedades aversivas, dado que eles aprendem a evitar o estímulo (Brandão et al., 2003; Graeff, 2002; Graeff, 2004; Jenck et al., 1995; Popova, 2004). Estas estratégias são expressas em condições naturais quando o predador está muito próximo ou em contato direto com a presa. Assim, a estimulação elétrica da SCPD tem sido considerada indutora de ataque de pânico, sendo considerada um modelo experimental para se estudar o distúrbio de pânico (Brandão et al, 2003; Deakin

& Graeff, 1991; Graeff, 2002; Graeff, 2004; Magierek et al., 2003; Mongeau & Marsden, 1997; Popova, 2004).

Vários relatos na literatura indicam a importância do comportamento de congelamento além da fuga com o procedimento de estimulação da SCPD (Mongeau & Marsden, 1997). Tanto o congelamento quanto a fuga induzida por esta estimulação podem simular ataques de pânico (Jenck et al., 1995). Estudos apontam para uma organização hierárquica destas respostas, conforme se aumenta o estímulo aplicado na porção dorsal do mesencéfalo. Enquanto baixas intensidades de corrente elétrica produzem congelamento, altas intensidades eliciam comportamento de fuga (Farook et al., 2004; Schenberg et al., 2001).

O comportamento de congelamento induzido pela estimulação da SCPD é definido como uma imobilidade tensa acompanhada por exoftalmia e/ou defecação e micção (Brandão et al., 2003; Magierek et al., 2003; Van Erp et al., 1993). É, portanto, diferente do congelamento que se observa em testes de medo condicionado. Nestes testes, os animais recebem choques elétricos nas patas e apresentam congelamento quando mais tarde voltam ao local onde receberam previamente os choques. Este tipo de aprendizado Pavloviano tem sido chamado de medo condicionado contextual (Jenck et al., 1995; LeDoux, 2000; Magierek et al., 2003; Murison & Overmier, 1998; Vianna et al.,

2001a,b), um tipo de medo que é evocado quando um ambiente específico (ou contexto) é repetidamente pareado com um estímulo desagradável ou aversivo.

O comportamento de fuga é definido por corridas, galope e saltos. A estimulação da SCPD leva o animal a uma corrida intensa, alternada com períodos de imobilidade tensa ou congelamento (Graeff, 2004). A defecação e a micção raramente ocorrem durante a fuga, mas são freqüentemente vistas durante o congelamento pós-fuga (Van Erp et al., 1993).

Assim parece que a porção dorsal da SCP faz a mediação de ambos ativo e inibitório padrões comportamentais de respostas defensivas, pois lesões desta estrutura realçam o congelamento condicionado e reduzem as reações de fuga a choques elétricos nas patas aplicados previamente (Fanselow, 1991) e a estimulação elétrica da mesma porção mostra, com aumento gradual da corrente elétrica, respostas de congelamento e fuga vigorosa (Vianna et al., 2001a), ademais, experimentos de expressão c-Fos mostram aumento da expressão desta proteína na SCPD após estimulações elétricas ou químicas. (Vianna et al., 2003).

4. Mediação Serotoninérgica do Comportamento Defensivo.

A serotonina (5-hidroxitriptamina 5-HT) é um importante neurotransmissor do SNC, que está envolvido na modulação de várias funções fisiológicas e comportamentais, tais como termorregulação, funções

cardiovasculares, agressividade, comportamento sexual, medo, humor, apetite e ciclo sono-vigília (Passchier & Waarde, 2001).

Os receptores 5-HT_{1A} foram os primeiros subtipos de receptores 5-HT a serem seqüenciados. Eles funcionam como autoreceptores somatodendríticos nos núcleos da rafe e como receptores pós-sinápticos nos terminais nervosos. As mais altas densidades destes receptores são encontradas em estruturas límbicas como o hipocampo, córtex entorrinal e septo, além dos núcleos mediano e dorsal da rafe, e as mais baixas densidades são observadas em áreas extrapiramidais como o gânglio basal, substância negra e cerebelo. A localização dos receptores 5-HT_{1A} nas áreas que compõem o sistema límbico sugere que este subtipo de receptor está envolvido na modulação da emoção, assim como na patogênese da ansiedade, depressão, doenças que afetam o movimento e desordens alimentares, se tornando um alvo importante para ação terapêutica de drogas (Barnes & Sharp, 1999; De Vry, 1995; Inoue et al., 1996; Nogueira & Graeff, 1995; Popova, 2004).

As enzimas do metabolismo de serotonina e os receptores 5-HT_{1A} no cérebro estão envolvidos no controle das formas ativa e passiva de defesa. Têm sugerido que a expressão dos receptores cerebrais 5-HT_{1A} pode determinar os níveis de medo e ansiedade e, conseqüentemente, a predisposição ao comportamento defensivo, de forma que a estratégia preferida de resposta defensiva (ativa ou passiva) depende de características determinadas

geneticamente no metabolismo da serotonina em estruturas cerebrais (Passchier & Van Waarde, 2001).

Diversas evidências experimentais mostram a serotonina como inibidora da aversão na SCPD. Quanto aos receptores 5-HT que atuam aqui, as pesquisas apontam à participação do subtipo 5-HT_{1A}, assim como do subtipo 5-HT_{2A} (Behbehani et al., 1993; Jacob et al., 2002; Popova et al., 1998; Schenberg et al., 2001; Schutz et al., 1985). A injeção local de agonistas de receptores 5-HT_{1A} causa efeitos inibitórios sobre a fuga, estes efeitos são bloqueados pelo pré-tratamento local com quetanserina (antagonista de receptor 5-HT_{2A}), implicando a participação deste subtipo de receptor na regulação do comportamento defensivo. A administração intra-SCPD do agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT e BAY-R-1532, bem como de DOI (agonista preferencial 5-HT₂) diminuíram a aversão gerada por estimulação elétrica dessa estrutura. O efeito do 8-OH-DPAT e BAY-R-1532 foi bloqueado pelo pré-tratamento intra-SCPD com NAN-190 (antagonista preferencial 5-HT_{1A}). Por outro lado, o efeito do DOI foi bloqueado pela espiperona (antagonista preferencial 5-HT_{2A}). Baseados nestes resultados, os autores sugeriram que os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} atuam de forma cooperativa na regulação das respostas de fuga eliciadas por estimulação da SCPD. Uma complementação destes estudos mostrou que o efeito do 8-OH-DPAT foi também bloqueado pela espiperona, e o efeito do DOI foi bloqueado pelo NAN-190, levando a idéia de uma interação

funcional entre os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} na regulação do comportamento de fuga (Jacob et al., 2002; Popova et al., 1998; Schenberg et al., 2001).

O antagonista de receptores 5-HT_{1A} WAY100635, o qual seletivamente impede as respostas induzidas pela estimulação de ambos receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos e somatodendríticos, é muito utilizado em estudos de efeitos comportamental e fisiológico em roedores, possuindo propriedades ansiolíticas (Ahlenius et al., 1999; Fletcher et al., 1996; Forster et al., 1995). Acredita-se que os receptores 5-HT_{1A} estão envolvidos em várias doenças psiquiátricas e neurológicas, então é exequível que um potente e seletivo antagonista de receptores 5-HT_{1A}, tal como o WAY100635, possa ter uma utilidade terapêutica (Fletcher et al., 1996).

Dados obtidos de estudos clínicos e pré-clínicos sugerem que os mecanismos mediados por 5-HT que regulam a aversão na SCPD estão envolvidos no controle do distúrbio de pânico e no modo de ação das drogas antipânico. Além disso, os resultados indicam que ambos os subtipos de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} inibem a aversão na SCPD, sugerindo a participação destes receptores no efeito terapêutico das drogas antipânico (Jacob et al., 2002; Nogueira & Graeff, 1995).

Outro fato interessante é que a administração intra-SCPD de antagonistas 5-HT não alteraram os limiares aversivos determinados pela estimulação elétrica da SCPD. Estes achados contrastam com os efeitos aversivos causados

pelos compostos que bloqueiam os receptores GABA-A na SCPD. Conclui-se que enquanto os neurônios gabaérgicos inibem tonicamente os neurônios da SCPD que controlam o comportamento defensivo, as fibras serotoninérgicas parecem exercer uma inibição fásica.

Assim, o sistema 5-HT atuaria somente em presença do estímulo aversivo ou de um fator estressante, enquanto que a inibição tônica corresponde ao controle constante dos substratos neurais da aversão (Beckett & Marsden, 1997; Brandão et al., 2003; Graeff, 2004).

OBJETIVOS

- Examinar a mediação serotoninérgica através de receptores 5-HT_{1A} nas respostas defensivas induzidas pela estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal de ratos sem experiência aversiva prévia.
- Examinar a mediação serotoninérgica através de receptores 5-HT_{1A} nas respostas defensivas induzidas pela estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal de ratos com experiência prévia a eventos estressantes.
- Examinar a mediação serotoninérgica através de receptores 5-HT_{1A} da substância cinzenta periaquedutal dorsal no medo condicionado contextual.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados 92 ratos Wistar machos, pesando de 220 a 240 g provenientes do biotério central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e mantidos em um biotério com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e com ciclo de iluminação claro/escuro de 12/12 h (luz acesa de 7:00 – 19:00 h). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (5 animais por caixa), forradas com serragem, com livre acesso à comida e água durante todo o experimento. Os animais foram aleatoriamente separados em grupos experimentais de acordo com os tratamentos: Salina, 8-OH-DPAT e WAY100635. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas que regulam o uso de animais em laboratório estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC).

2. Cirurgia

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg, i.p.), e fixados a um aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, CA). Cada animal foi implantado com um eletrodo bipolar unilateral na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) (ângulo de 16° , 1,9 mm lateral ao λ e 5,1 mm de profundidade, a partir da superfície craniana). O eletrodo foi feito com fio de aço inoxidável, com 160 μm de diâmetro, isolado, exceto no corte transversal. O fio do eletrodo foi conectado a um pino macho ligado a um cabo

elétrico flexível, usado para a estimulação encefálica. Tomando lâmbda como referência as coordenadas foram: antero-posterior (AP) = 0,0 mm, médio-lateral (ML) = + 1,9 mm e dorso-ventral (DV) = - 5,1 mm. O eletrodo e a cânula-guia foram fixados ao crânio com resina acrílica e dois parafusos de aço inoxidável. No final de cada cirurgia, cada cânula-guia recebeu um fio de aço inoxidável (mandril) para evitar entupimento.

3. Medida dos Limiares Aversivos

No primeiro dia de experimento os limiares aversivos (congelamento e fuga) e o tempo de congelamento após a interrupção da estimulação elétrica da SCPD foram determinados. Os animais foram colocados na caixa experimental (25x 25x 15 cm), onde foi feito o condicionamento (mesmo contexto) ou numa arena circular (60 cm de diâmetro e 50 cm de altura) (contexto diferente). Ambos os contextos experimentais foram iluminados por uma lâmpada fluorescente de 40 W (80 lux no nível do piso). Cada animal passou por um período de 5 minutos de habituação antes do início da sessão. Em seguida, a SCPD foi estimulada eletricamente por meio de um estimulador de onda senoidal (DeVecchio, Brasil). A corrente de estimulação foi monitorada a partir da medida da queda de tensão em um resistor de 1 K Ω com o auxílio de um osciloscópio (Philips-EUA). A estimulação elétrica era apresentada com intervalos de 1 min com intensidade de corrente aumentando em passos de 5 μ A para a determinação dos limiares aversivos.

O limiar de congelamento foi operacionalmente definido como a menor intensidade de corrente capaz de produzir imobilidade durante a estimulação elétrica. A intensidade de corrente que produziu corridas (galopes) ou saltos em duas tentativas consecutivas foi considerada como limiar de fuga. Os animais com limiar de fuga acima de 120 μ A (pico a pico) foram descartados do estudo. Para investigar os efeitos comportamentais da última estimulação elétrica que disparou o comportamento de fuga, os animais permaneceram na caixa experimental por 8 minutos, sem estimulação, durante os quais o comportamento de congelamento foi anotado. Este comportamento é referido como congelamento pós-estimulação (Vianna et al., 2001a, b).

Logo após as medidas dos valores de linha de base, os ratos receberam salina, 8-OH-DPAT ou WAY100635 na SCPD. Dez minutos após as microinjeções, os limiares dos comportamentos defensivos (congelamento e fuga) foram re-determinados através do procedimento de estimulação elétrica da SCPD e anotado o tempo de congelamento pós-estimulação da SCPD após a fuga.

4. Microinjeção de Drogas

Um volume total de 0,2 μ l foi usado para injeções das drogas na SCPD. Os animais controle receberam o mesmo volume de salina. A agulha de injeção usada era uma fina agulha dental (0,3 mm, d.e.) conectada a uma seringa Hamilton de 10 μ l através de um tubo de polietileno. A agulha de injeção foi

introduzida através da cânula-guia, e a ultrapassava em 1 mm. As soluções foram injetadas na SCPD (0,2 μ l/min), através de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, South Natick, MA, E.U.A). O deslocamento de uma bolha de ar dentro do tubo de polietileno (PE-10; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, E.U.A) conectando a seringa à agulha intracerebral foi usado para monitorar a microinjeção. A agulha foi mantida no local por 1 minuto após a microinjeção, para evitar o refluxo da droga.

5. Medo Condicionado Contextual

Treino: um dia após a estimulação elétrica para a determinação dos limiares aversivos, os animais foram submetidos ao condicionamento de medo contextual. Este procedimento tem sido rotineiramente usado neste laboratório (Vianna et al., 2001a, b). O congelamento é consistentemente produzido apenas em animais colocados no mesmo contexto onde receberam previamente choque nas patas. O condicionamento foi realizado em uma caixa experimental (25 x 25 x 15 cm) feita com paredes de acrílico opaco, exceto o teto e parede frontal, os quais foram feitos com acrílico translúcido. O piso foi feito com 18 barras de aço inoxidável de 2 mm de diâmetro espaçadas por 12 mm umas das outras nas quais os choques elétricos nas patas eram aplicados através de uma fonte de choque AC (Albarsh Instrumentos, Brasil). Cada animal foi colocado na caixa experimental e depois de 5 minutos de habituação, receberam 10 choques nas patas (0,6 mA, 1s) na caixa experimental (mesmo contexto). Cada animal foi

removido da caixa dois minutos após o último choque. A sessão treino durava 15 minutos.

Teste: os limiares aversivos foram determinados como descrito anteriormente. Os animais foram colocados no mesmo contexto (caixa que receberam choques) ou no contexto diferente (arena circular). As sessões teste foram conduzidas sem apresentação de choques nas patas. Cada grupo recebeu salina, 8-OH-DPAT ou WAY100635. Dez minutos após as injeções os animais foram colocados na caixa experimental ou na arena para as sessões teste. A medida usada para avaliar o medo contextual foi o tempo que os ratos passaram em congelamento durante a sessão de 3 minutos. O congelamento foi definido como a ausência total de movimento do corpo, exceto pela respiração. Em seguida, os limiares aversivos foram re-determinados para avaliação da reatividade da SCPD à estimulação elétrica.

A tabela 1 apresenta uma síntese do delineamento experimental deste estudo (página 72).

6. Drogas

As drogas utilizadas foram o agonista de receptor 5-HT_{1A}: (±) -8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina (8-OH-DPAT, RBI, E.U.A), o antagonista de receptores 5-HT_{1A}: maleato de N-[2-[4-(2-Metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-N-2-piridinilciclohexanecarboxamida (WAY100635, RBI, E.U.A).

As drogas foram diluídas em salina (0,9%). As doses utilizadas foram de 4 e 8 nmoles/0,2 µl de 8-OH-DPAT e de 10 nmoles/0,2 µl de WAY100635. Além disso, foram realizadas microinjeções de WAY100635 + 8-OH-DPAT, nas doses de 10 nmoles e 8 nmoles/ 0,2 µl, respectivamente. As doses das drogas, assim como o tempo de espera após as microinjeções foram baseados em estudos anteriores deste e de outros laboratórios (Ahlenius et al., 1999; Avanzi & Brandão, 2001; Beckett & Marsden, 1997; Borelli et al., 2005; Fletcher et al., 1996; Forster et al., 1995; Nogueira & Graeff, 1995).

7. Histologia

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com uma sobredose de uretana (25%; 0,5 ml /100g) e perfundidos intracardialmente com solução salina (0,9%) seguida de solução de formalina (4%). Os cérebros foram removidos e mantidos em sacarose (30%) por, pelo menos, três dias. Com o auxílio de um micrótomo foram feitos os cortes seriados do encéfalo (60 µm). A seguir, foram montados em lâminas gelatinizadas e corados com o corante vermelho neutro a fim de localizar os pontos de microinjeção de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1997).

8. Análise Estatística

Os dados são apresentados como médias + EPM. Os limiares de congelamento e fuga são expressos como diferenças (Δ) entre os valores determinados depois das injeções intra-SCPD e os valores de linha de base.

Estas diferenças de limiares, os tempos de congelamento pós-estimulação da SCPD e os tempos de congelamento contextual dos grupos salina e drogas foram submetidos ao teste t de Student. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

**EFEITOS DO 8-OH-DPAT E DO WAY100635 SOBRE O
COMPORTAMENTO DEFENSIVO INDUZIDO PELA
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA SCPD**

A figura 1 ilustra os sítios de estimulação e microinjeção de drogas na SCPD de animais sem experiência aversiva prévia, sendo identificados e assinalados em diagramas do atlas de Paxinos e Watson (1997).

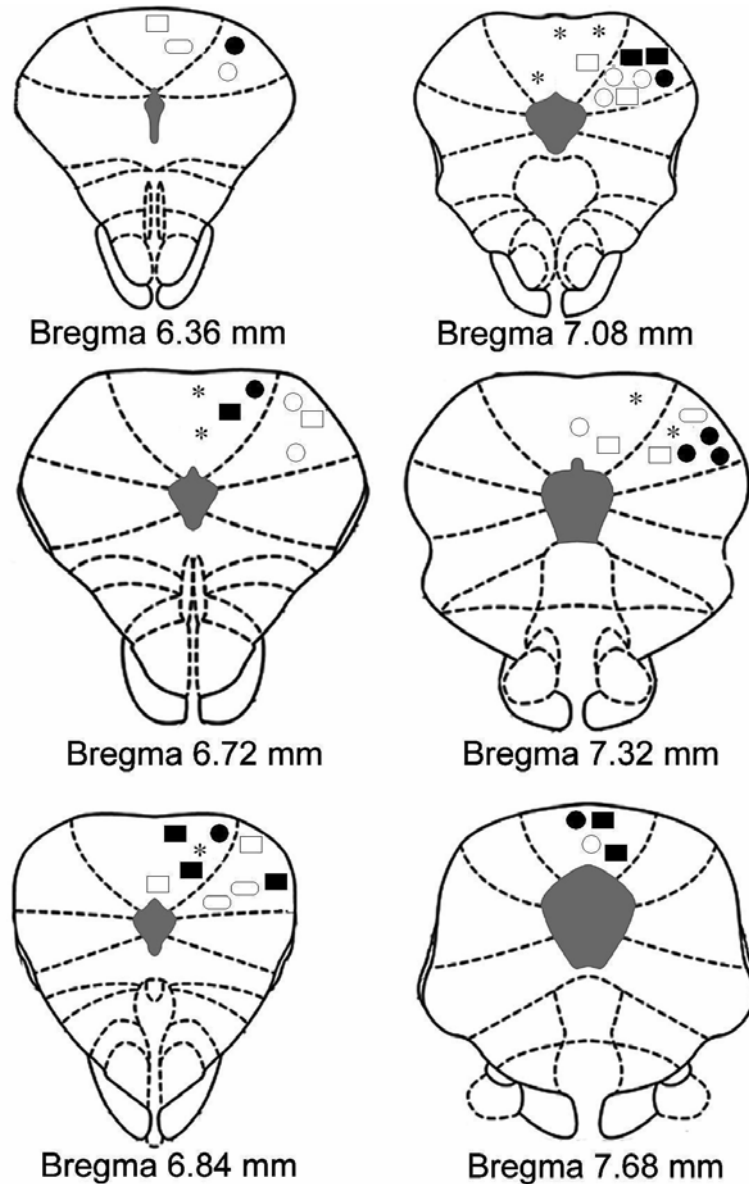


Figura 1: Representação esquemática dos pontos de estimulação tendo como referência o atlas de Paxinos e Watson, 1997. Os símbolos indicam os animais que receberam microinjeção de (○) Salina, (■) 8-OH-DPAT (4 nmol), (□) 8-OH-DPAT (8 nmol), (●) WAY100635, (◐) Salina + 8-OH-DPAT e (*) WAY100635 + 8-OH-DPAT.

RESULTADOS

A Figura 2 apresenta os efeitos do 8-OH-DPAT (4 nmoles) sobre os limiares aversivos e o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPD de ratos sem experiência aversiva prévia.

O teste t não mostrou efeitos significativos dos tratamentos sobre o limiar de congelamento [$t_{(1,14)} = 3,09$; $p = 0,10$] e sobre o limiar de fuga [$t_{(1,14)} = 1,08$; $p = 0,31$].

Quanto ao tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPD não houve alteração significativa entre os grupos 8-OH-DPAT e salina [$t_{(1,14)} = 0,47$; $p = 0,81$].

Efeitos do 8-OH-DPAT sobre o comportamento defensivo induzido pela estimulação elétrica da SCPD

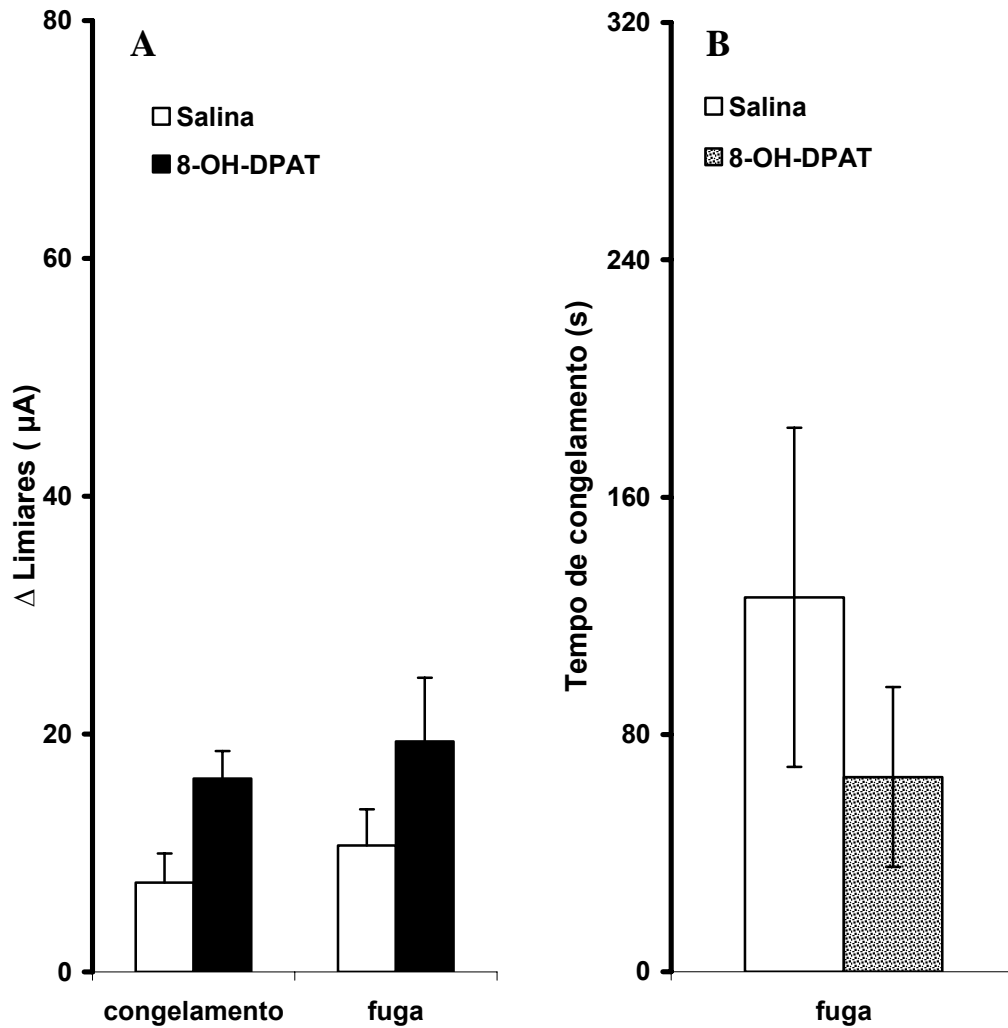


Figura 2: Efeitos do 8-OH-DPAT (4 nmoles/0,2 μ l) sobre os limiares de congelamento e fuga e o tempo de congelamento pós- estimulação elétrica aversiva da SCPD de ratos sem experiência aversiva prévia. **A.** Diferença (Δ) de limiares antes e depois das injeções de salina (coluna aberta) e 8-OH-DPAT (coluna fechada). **B.** Tempo de congelamento pós-estimulação da SCPD no limiar de fuga determinado depois das injeções de salina (coluna aberta) e 8-OH-DPAT (coluna hachurada). N = 8 para os grupos salina e 8-OH-DPAT.

A Figura 3 ilustra os efeitos do 8-OH-DPAT (8 nmoles) sobre os limiares aversivos e o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPD de ratos sem experiência aversiva prévia.

O teste t mostrou efeitos significativos dos tratamentos sobre o limiar de congelamento [$t_{(1,14)} = 0,37$; $p = 0,01$] e sobre o limiar de fuga [$t_{(1,14)} = 8,25$; $p = 0,01$].

Quanto ao tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPD não houve diferença significativa entre os grupos 8-OH-DPAT e salina [$t_{(1,14)} = 0,91$; $p = 0,61$].

Efeitos do 8-OH-DPAT sobre o comportamento defensivo induzido pela estimulação elétrica da SCPD

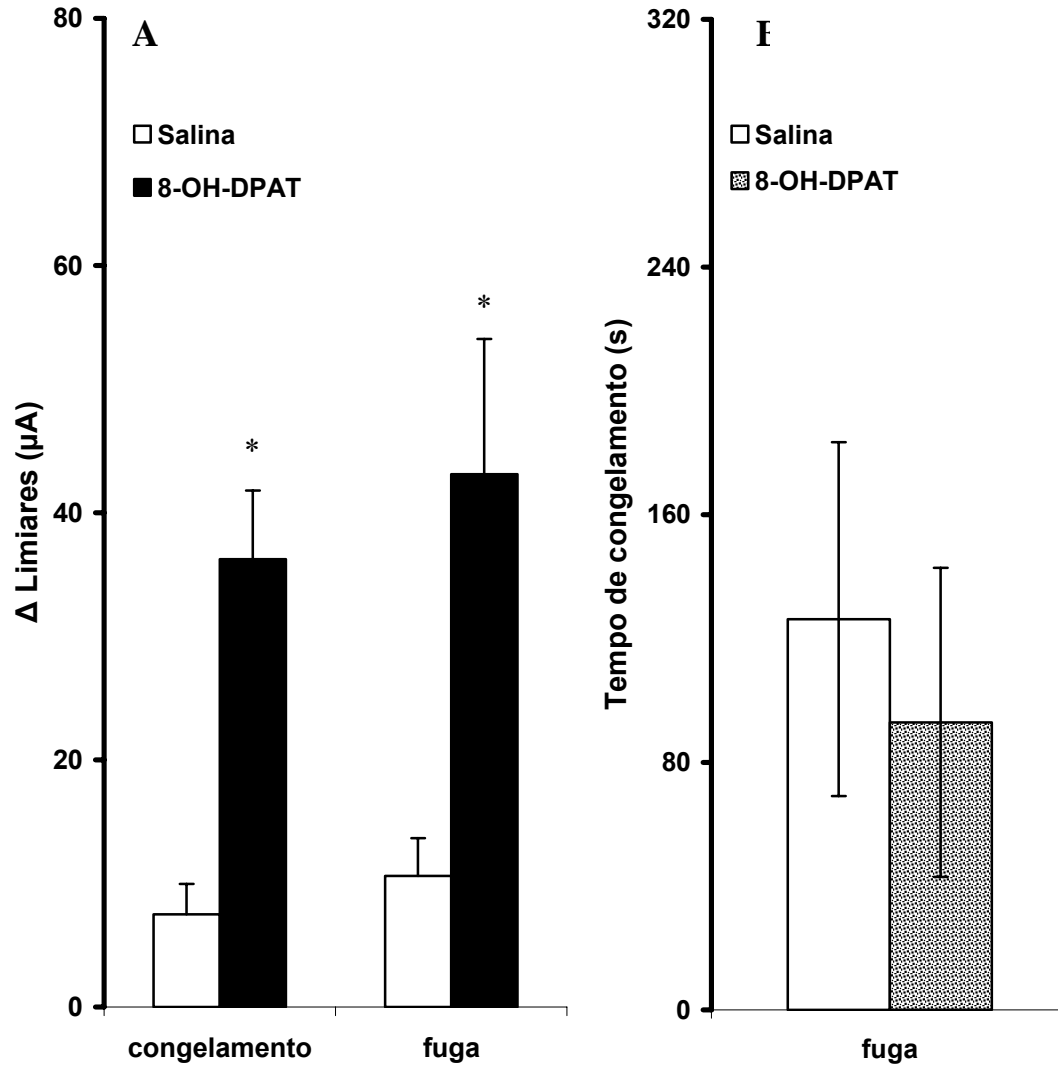


Figura 3: Efeitos do 8-OH-DPAT (8 nmoles/0,2 μ l) sobre os limiares de congelamento e fuga e o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica aversiva da SCPD de ratos sem experiência aversiva prévia. **A.** Diferença (Δ) de limiares antes e depois das injeções de salina (coluna aberta) e 8-OH-DPAT (coluna fechada). **B.** Tempo de congelamento pós-estimulação da SCPD no limiar de fuga determinado depois das injeções de salina (coluna aberta) e 8-OH-DPAT (coluna hachurada). N = 8 para os grupos salina e 8-OH-DPAT. *P < 0,05, teste *t*-Student.

A Figura 4 apresenta os efeitos do WAY100635 sobre os limiares aversivos e o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPD de ratos.

O teste t não mostrou efeitos significativos dos tratamentos sobre o limiar de congelamento [$t_{(1,14)} = 0,19$; $p = 0,66$] e sobre o limiar de fuga [$t_{(1,14)} = 0,31$; $p = 0,58$].

Não houve alteração significativa entre os grupos WAY100635 e salina sobre o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPD [$t_{(1,14)} = 1,71$; $p = 0,42$].

Efeitos do WAY100635 sobre o comportamento defensivo induzido pela estimulação elétrica da SCPD

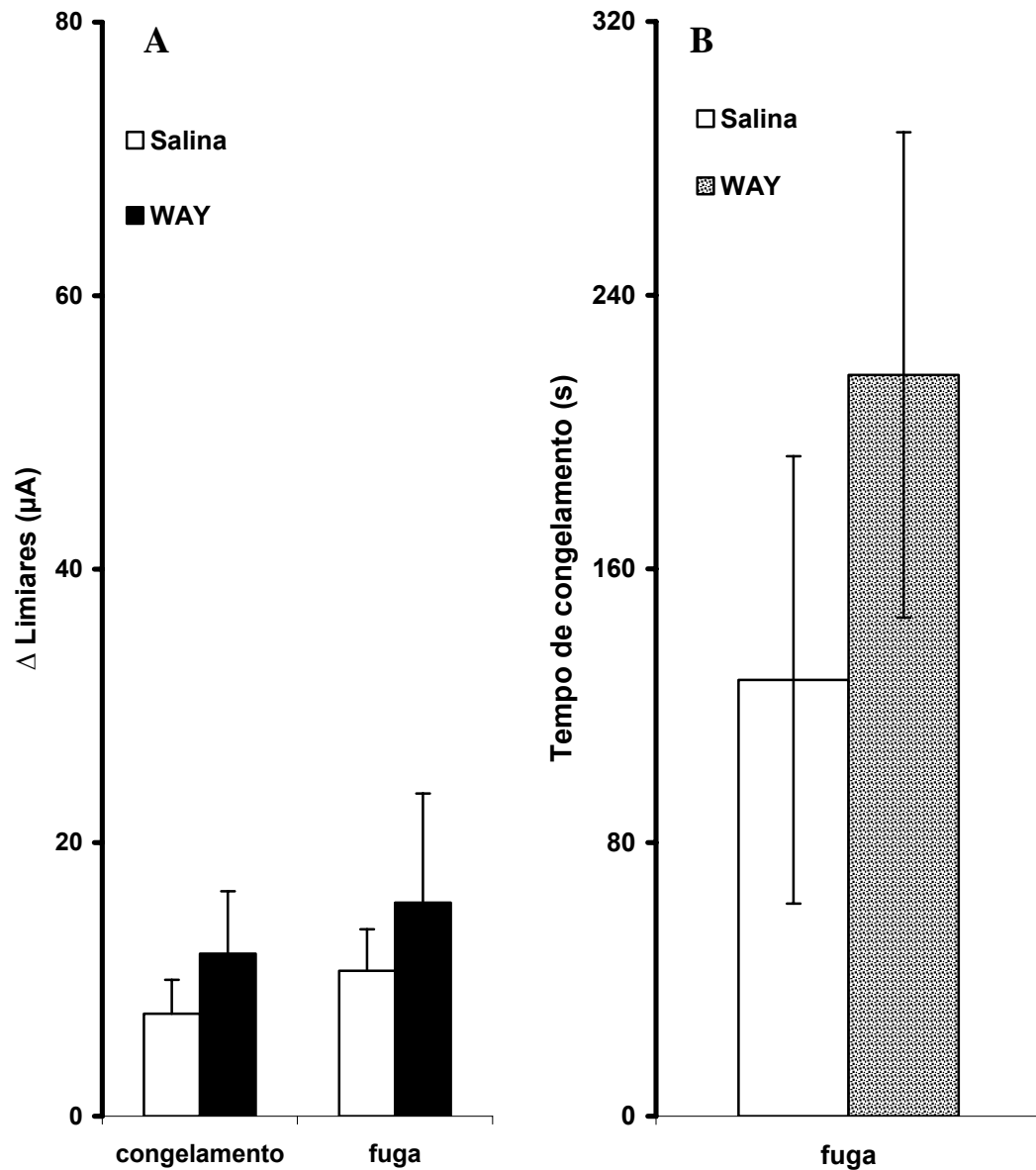


Figura 4: Efeitos do WAY100635 (10 nmoles/0,2 μ l) sobre os limiares aversivos e o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica aversiva da SCPD de ratos sem experiência aversiva prévia. **A.** Diferença (Δ) de limiares antes e depois das injeções de salina (coluna aberta) e WAY100635 (coluna fechada). **B.** Tempo de congelamento pós-estimulação da SCPD no limiar de fuga determinado depois das injeções de salina (coluna aberta) e WAY100635 (coluna hachurada). N = 8 para os grupos salina e WAY100635.

A Figura 5 apresenta os efeitos do WAY100635 + 8-OH-DPAT (8 nmoles) sobre os limiares aversivos e o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPD de ratos.

O teste t mostrou efeitos significativos dos tratamentos sobre o limiar de congelamento [$t_{(1,10)} = 9,53$; $p = 0,01$] e sobre o limiar de fuga [$t_{(1,10)} = 9,23$; $p = 0,01$].

Quanto ao tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPD não houve diferença significativa entre os grupos WAY100635 + 8-OH-DPAT e salina+ 8-OH-DPAT [$t_{(1,10)} = 2,84$; $p = 0,43$].

Efeitos do WAY100635 + 8-OH-DPAT sobre o comportamento defensivo induzido pela estimulação elétrica da SCPD

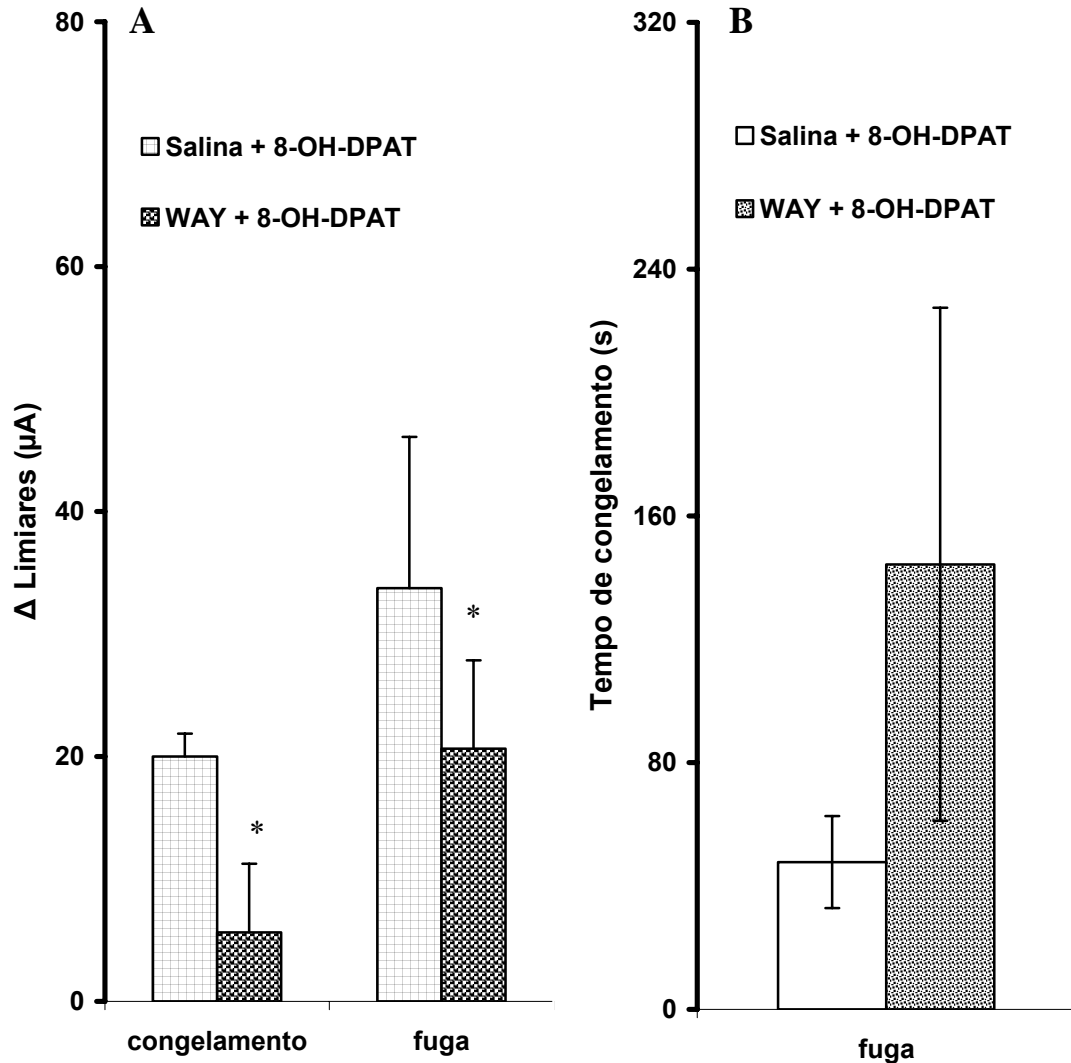


Figura 5: Efeitos do WAY100635 (10 nmoles/0,2 μ l) + 8-OH-DPAT (8 nmoles/0,2 μ l) sobre os limiares aversivos e o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica aversiva da SCPD de ratos sem experiência aversiva prévia. **A.** Diferença (Δ) de limiares antes e depois das injeções de salina + 8-OH-DPAT (coluna listrada) e WAY100635 + 8-OH-DPAT (coluna hachurada). **B.** Tempo de congelamento pós-estimulação da SCPD no limiar de fuga determinado depois das injeções de salina + 8-OH-DPAT (coluna aberta) e WAY100635 + 8-OH-DPAT (coluna hachurada). salina + 8-OH-DPAT n=4 e WAY100635 + 8-OH-DPAT n=8. * $p < 0,05$, teste *t*-Student.

**EFEITOS DO 8-OH-DPAT E DO WAY100635 SOBRE O
CONGELAMENTO CONDICIONADO CONTEXTUAL**

A figura 6 ilustra os sítios de estimulação e microinjeção de drogas na SCPD de animais com experiência aversiva prévia, sendo identificados e assinalados em diagramas do atlas de Paxinos e Watson (1997).

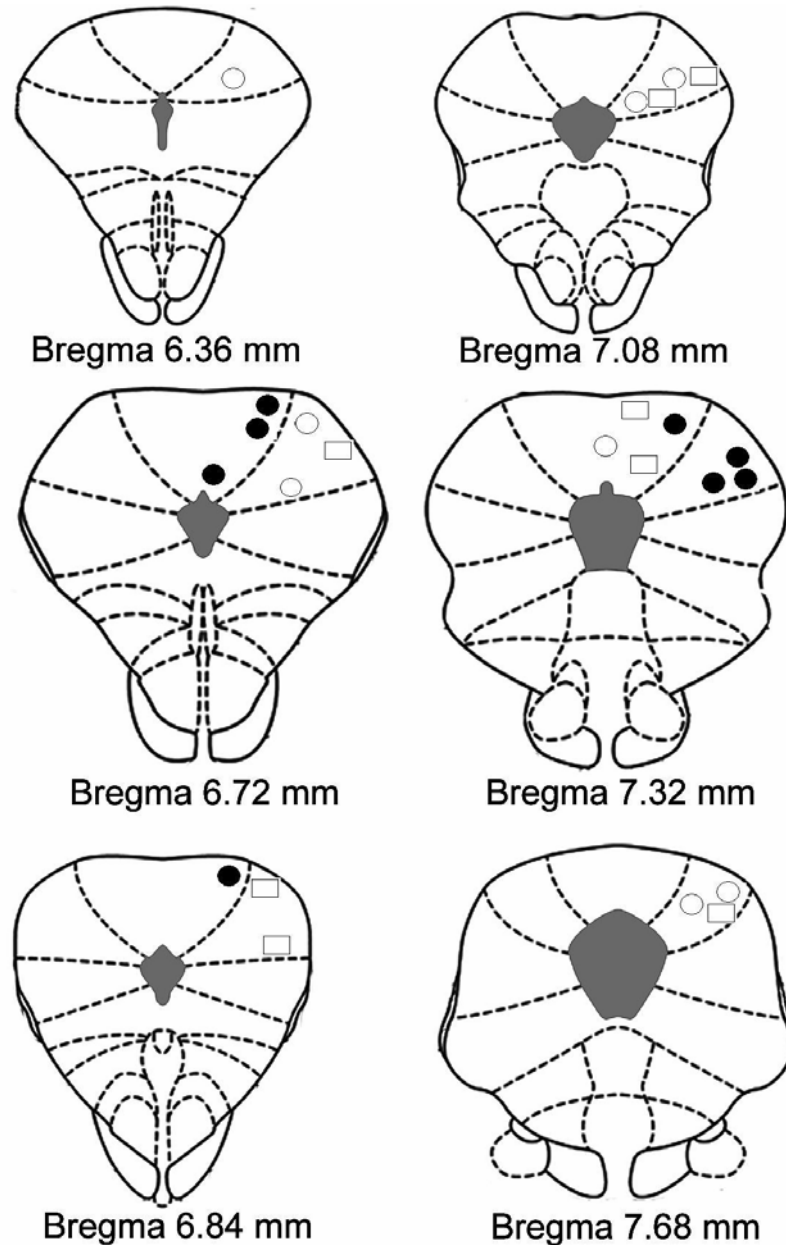


Figura 6: Representação esquemática dos pontos de estimulação tendo como referência o Atlas de Paxinos e Watson, 1997. Os símbolos indicam os animais que receberam microinjeção de (○) Salina, (□) 8-OH-DPAT e (●) WAY100635.

A figura 7 apresenta o tempo (segundos) de congelamento induzido pelo contexto aversivo para os grupos salina e 8-OH-DPAT.

O teste *t*- Student mostrou que há uma diminuição significativa do tempo de congelamento contextual no grupo tratado com 8-OH-DPAT em relação ao grupo salina [$t_{(1,14)} = 9,56$; $p = 0,01$], indicando assim um efeito anti-aversivo do agonista de receptores $5HT_{1A}$ sobre o congelamento contextual.

Efeitos do 8-OH-DPAT sobre o congelamento condicionado contextual

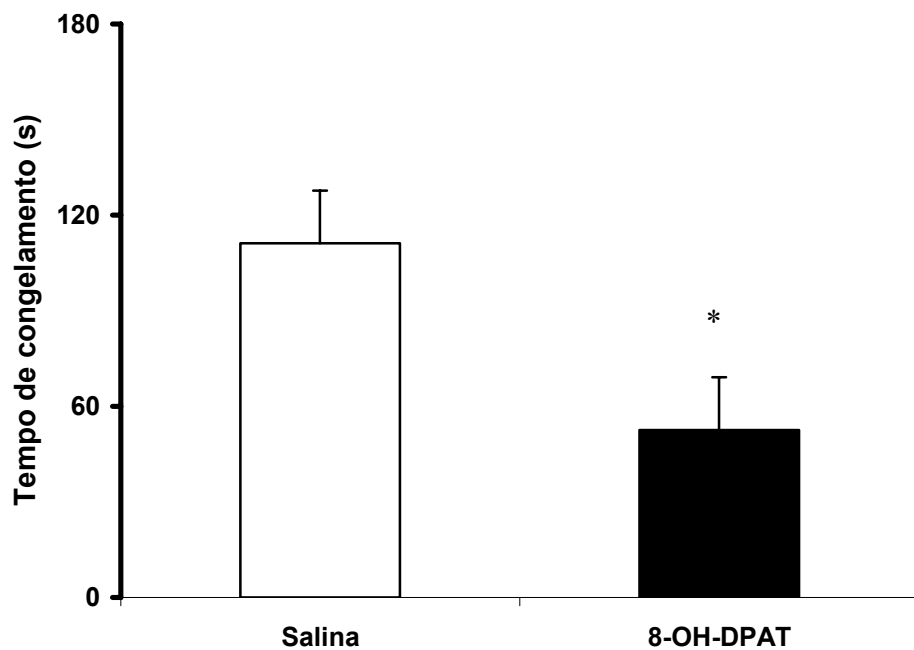


Figura 7: Efeitos da salina e do 8-OH-DPAT (8 nmoles/0,2 μ l) sobre o tempo de congelamento condicionado contextual. Média (+ E.P.M.) medido na sessão teste 24h após condicionamento com choques nas patas (10 choques de 0,6 mA, 1s). N= 8 para os grupos salina e 8-OH-DPAT. * $P < 0,05$, teste *t*-Student.

A figura 8 apresenta o tempo (segundos) de congelamento induzido pelo contexto aversivo para os grupos salina e WAY100635.

O teste t-Student mostrou que há um aumento significativo do tempo de congelamento contextual no grupo tratado com WAY100635 em relação ao grupo salina [$t_{(1,14)} = 5,43$; $p = 0,03$], indicando um efeito pró-aversivo do antagonista de receptores $5HT_{1A}$ sobre o congelamento contextual.

Efeitos do WAY100635 sobre o congelamento condicionado contextual

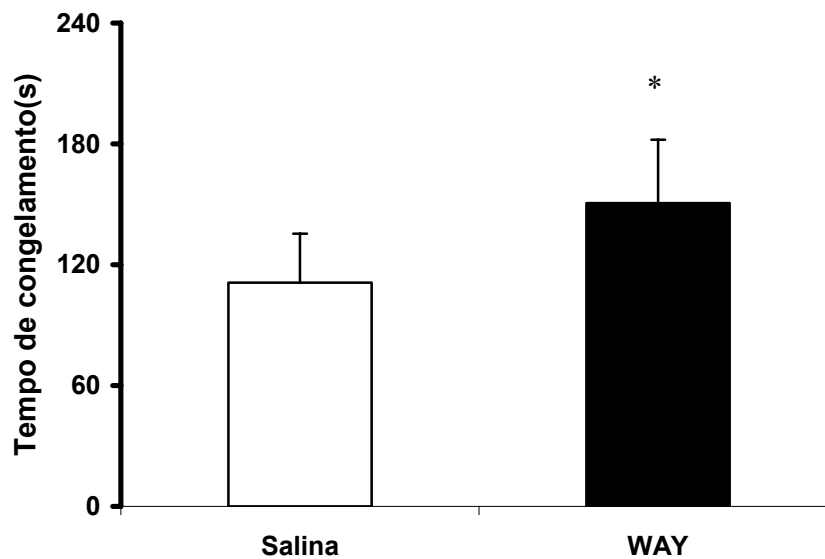


Figura 8: Efeitos da salina e do WAY100635 (10 nmoles/0,2 μ l) sobre o tempo de congelamento condicionado contextual. Média (+E.P.M.) medido na sessão teste 24h após condicionamento com choques nas patas (10 choques de 0,6 mA, 1s). N= 8 para os grupos salina e WAY100635. * $P < 0,05$, teste *t*-Student.

**INFLUÊNCIA DO CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL
SOBRE OS EFEITOS DO 8-OH-DPAT E DO WAY100635
SOBRE O COMPORTAMENTO DEFENSIVO INDUZIDO
PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA SCPD**

A figura 9 apresenta os efeitos do 8-OH-DPAT sobre os limiares de congelamento e fuga e o tempo de congelamento pós-fuga após estimulação elétrica da SCPD de ratos que passaram pelo condicionamento aversivo contextual.

O teste t não mostrou efeitos significativos dos tratamentos sobre o limiar de congelamento [$t_{(1,14)} = 2,20$; $p = 0,14$] e nem sobre o limiar de fuga [$t_{(1,14)} = 2,28$; $p = 0,14$].

Não houve alteração significativa entre os grupos 8-OH-DPAT e salina sobre o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPD [$t_{(1,14)} = 0,70$; $p = 0,75$].

Influência do medo condicionado sobre os efeitos do 8-OH-DPAT sobre o comportamento defensivo induzido pela estimulação elétrica da SCPD

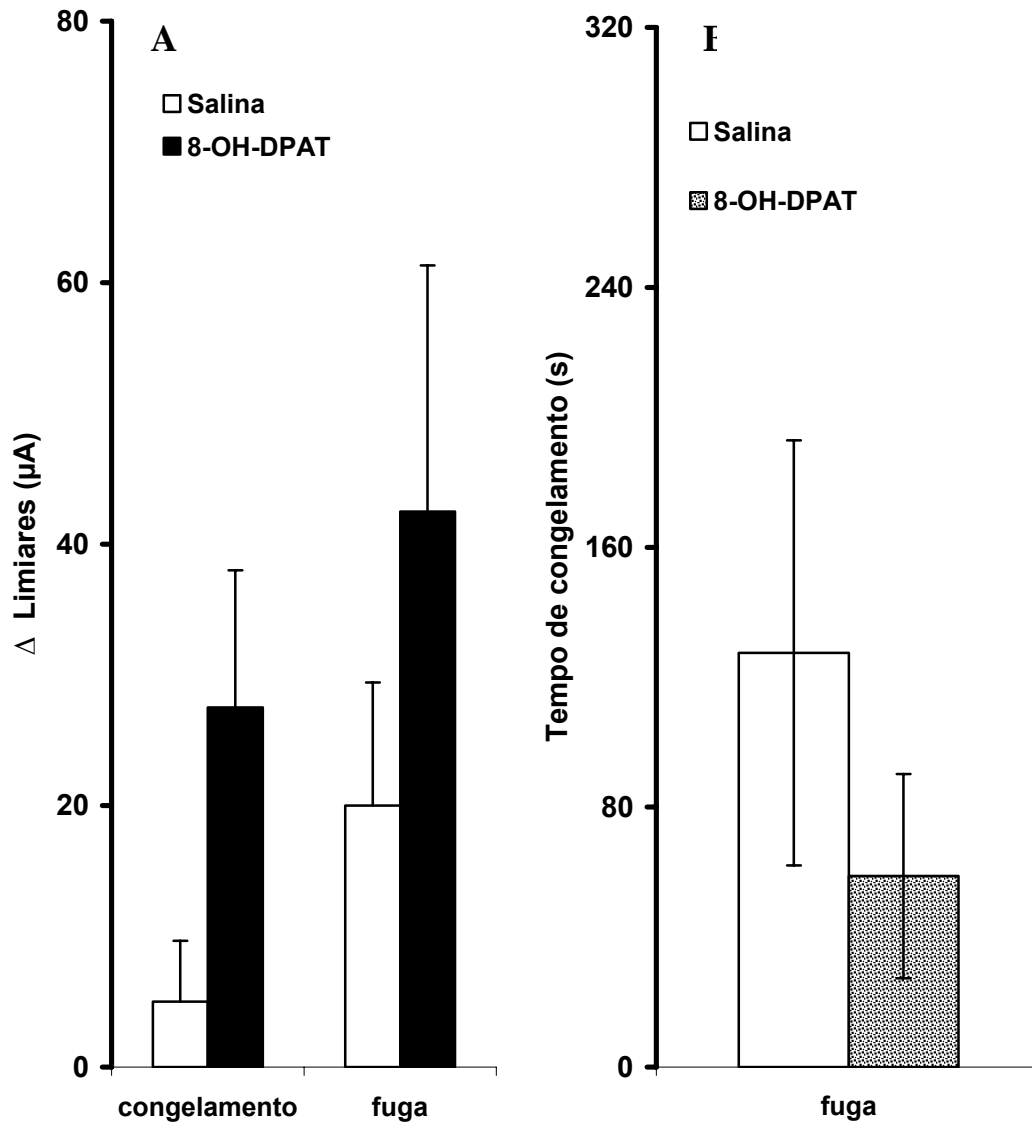


Figura 9: Efeitos do 8-OH-DPAT (8 nmoles/0.2 μl) sobre os limiares de congelamento e fuga e o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica aversiva da SCPD de ratos com experiência aversiva prévia. **A.** Diferença (Δ) de limiares antes e depois das injeções de salina (coluna aberta) e 8-OH-DPAT (coluna fechada). **B.** Tempo de congelamento pós-estimulação da SCPD no limiar de fuga determinado depois das injeções de salina (coluna aberta) e 8-OH-DPAT (coluna hachurada). N= 8 para os grupos salina e 8-OH-DPAT.

A Figura 10 apresenta os efeitos do WAY100635 sobre os limiares de congelamento e de fuga e sobre o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPD de ratos que passaram pelo condicionamento aversivo contextual.

O teste t mostrou que não houve alteração significativa sobre os limiares de congelamento [$t_{(1,14)} = 0,27$; $p = 0,60$] e de fuga [$t_{(1,14)} = 2,28$; $p = 0,14$].

Não houve alteração significativa entre os grupos WAY100635 e salina sobre o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPD [$t_{(1,14)} = 1,08$; $p = 0,46$].

**Influência do condicionamento contextual sobre os efeitos do
WAY100635 sobre o comportamento defensivo induzido pela estimulação
elétrica da SCPD**

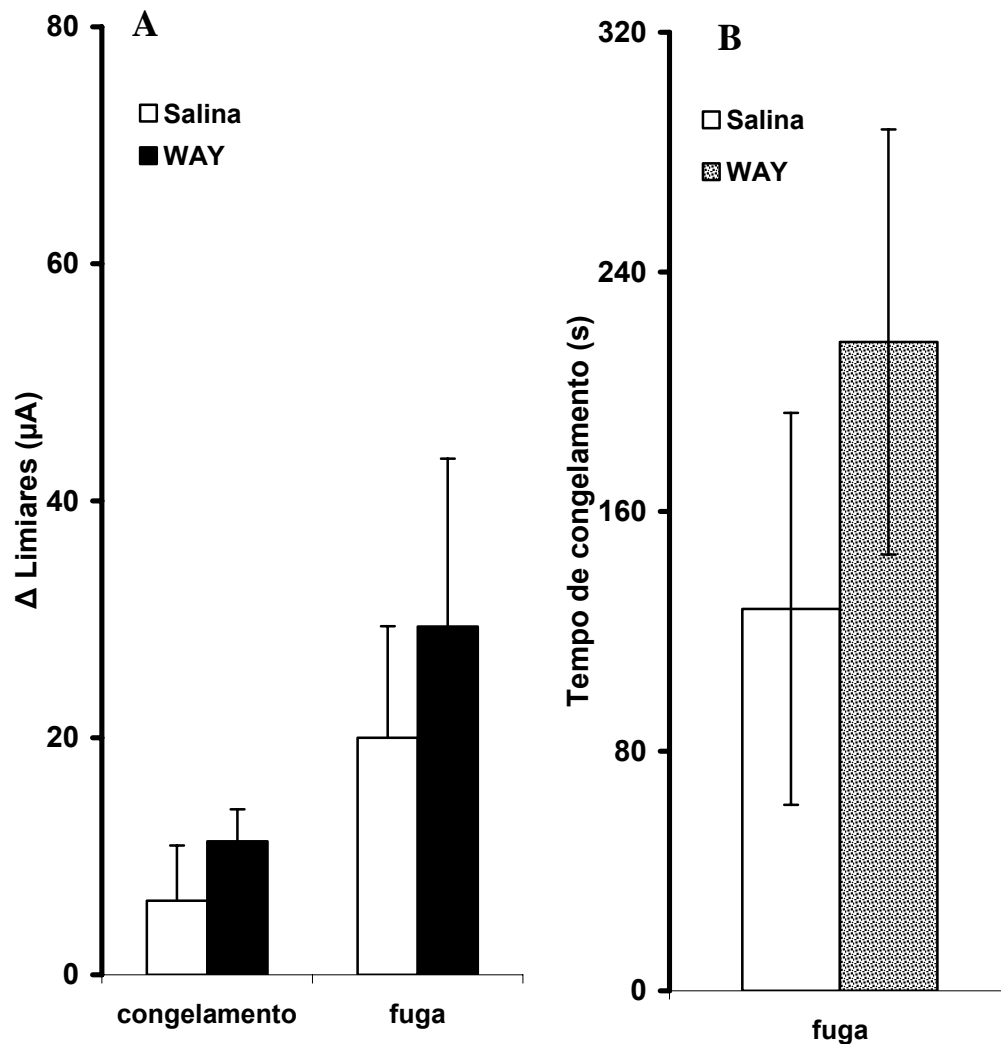


Figura 10: Efeitos do WAY100635 (10 nmoles/0.2 μl) sobre os limiares de congelamento e fuga e o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica aversiva da SCPD de ratos sob condicionamento contextual aversivo. **A.** Diferença (Δ) de limiares antes e depois das injeções de salina (coluna aberta) e WAY100635 (coluna fechada). **B.** Tempo de congelamento pós-estimulação da SCPD no limiar de fuga determinado depois das injeções de salina (coluna aberta) e WAY100635 (coluna. hachurada). N= 8 para os grupos salina e WAY100635.

**INFLUÊNCIA DA EXPERIÊNCIA COM CHOQUES SOBRE
OS EFEITOS DO 8-OH-DPAT E DO WAY100635 SOBRE O
COMPORTAMENTO DEFENSIVO INDUZIDO PELA
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA SCPD**

A figura 11 ilustra os sítios de estimulação e microinjeção de drogas na SCPD de animais com experiência aversiva prévia no contexto diferente, sendo identificados e assinalados em diagramas do atlas de Paxinos e Watson (1997).

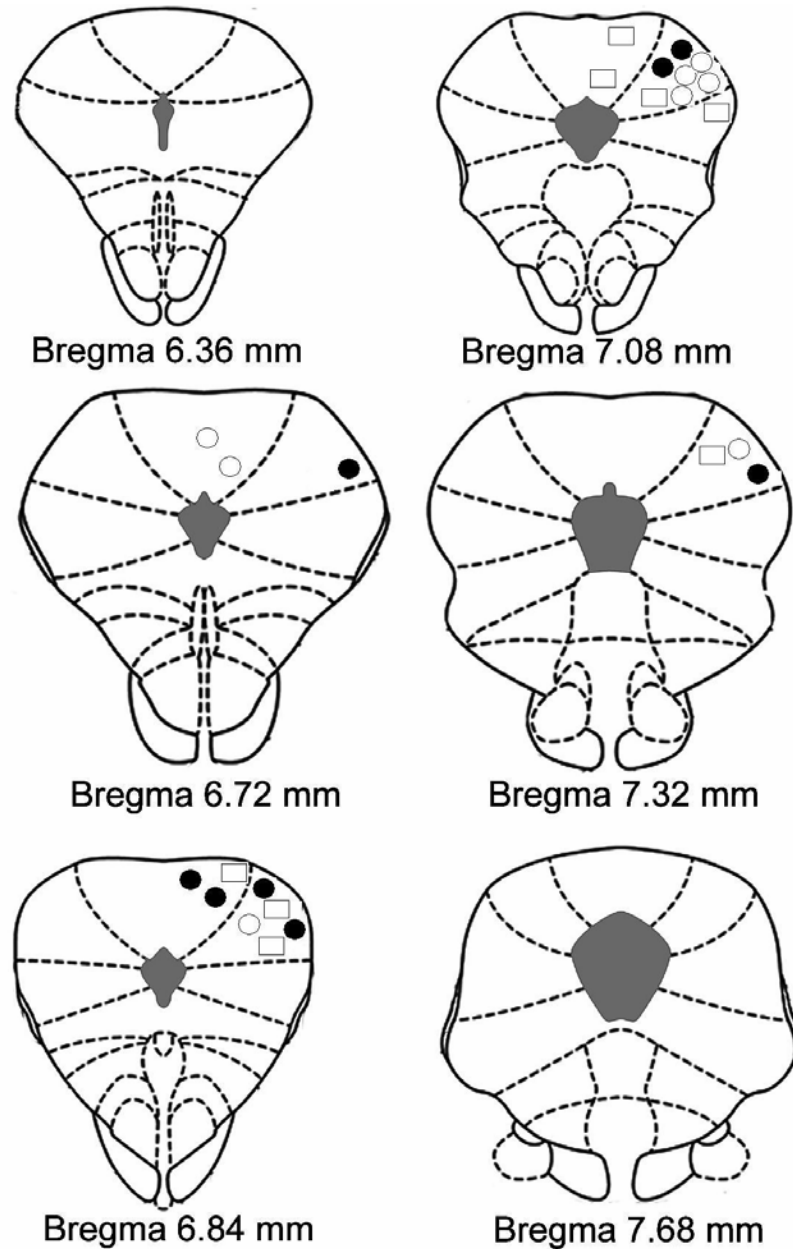


Figura 11: Representação esquemática dos pontos de estimulação tendo como referência o Atlas de Paxinos e Watson, 1997. Os símbolos indicam os animais que receberam microinjeção de (○) Salina, (□) 8-OH-DPAT e (●) WAY-100635.

A Figura 12 apresenta os efeitos do 8-OH-DAPT (8 nmoles) sobre os limiares aversivos e o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPD de ratos testados em um contexto diferente do que receberam choque nas patas.

O teste t mostrou efeitos significativos dos tratamentos sobre o limiar de congelamento [$t_{(1,14)} = 6,24$; $p = 0,01$] e sobre o limiar de fuga [$t_{(1,14)} = 4,21$; $p = 0,03$].

Quanto ao tempo de congelamento pós-estimulação elétrica não houve efeitos significativos entre os grupos 8-OH-DPAT e salina [$t_{(1,14)} = 0,33$; $p = 0,96$].

Influência de choques nas patas sobre os efeitos do 8-OH-DPAT sobre o comportamento defensivo induzido pela estimulação elétrica da SCPD

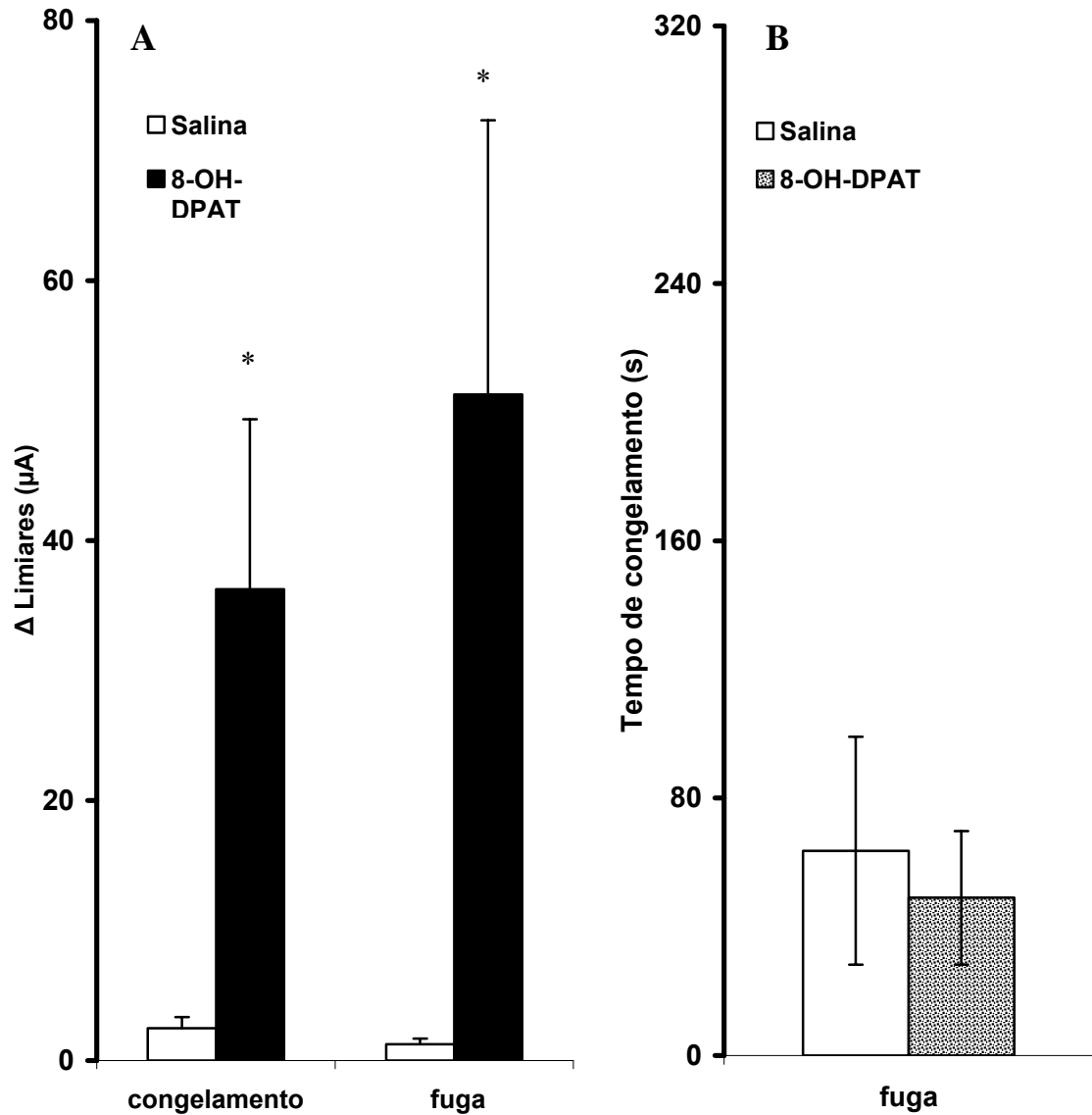


Figura 12: Efeitos do 8-OH-DPAT (8 nmoles/0.2 μl) sobre os limiares de congelamento e fuga e o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica aversiva da SCPD de ratos sob condicionamento contextual aversivo testados em um contexto diferente. **A.** Diferença (Δ) de limiares antes e depois das injeções de salina (coluna aberta) e 8-OH-DPAT (coluna fechada). **B.** Tempo de congelamento pós-estimulação da SCPD no limiar de fuga determinado depois das injeções de salina (coluna aberta) e 8-OH-DPAT (coluna hachurada). N= 8 para os grupos salina e 8-OH-DPAT. *P < 0,05, teste *t*-Student.

A Figura 13 apresenta os efeitos do WAY100635 sobre os limiares aversivos e o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPD de ratos testados em um contexto diferente do que receberam choque nas patas.

O teste t não mostrou efeitos significativos dos tratamentos sobre limiares de congelamento [$t_{(1,14)} = 0,06$; $p = 0,80$] e sobre o limiar de fuga [$t_{(1,14)} = 1,55$; $p = 0,23$].

Não houve alteração significativa entre os grupos WAY100635 e salina sobre o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPD [$t_{(1,14)} = 1,17$; $p = 0,38$].

Influência de choques nas patas sobre os efeitos do WAY100635 sobre o comportamento defensivo induzido pela estimulação elétrica da SCPD

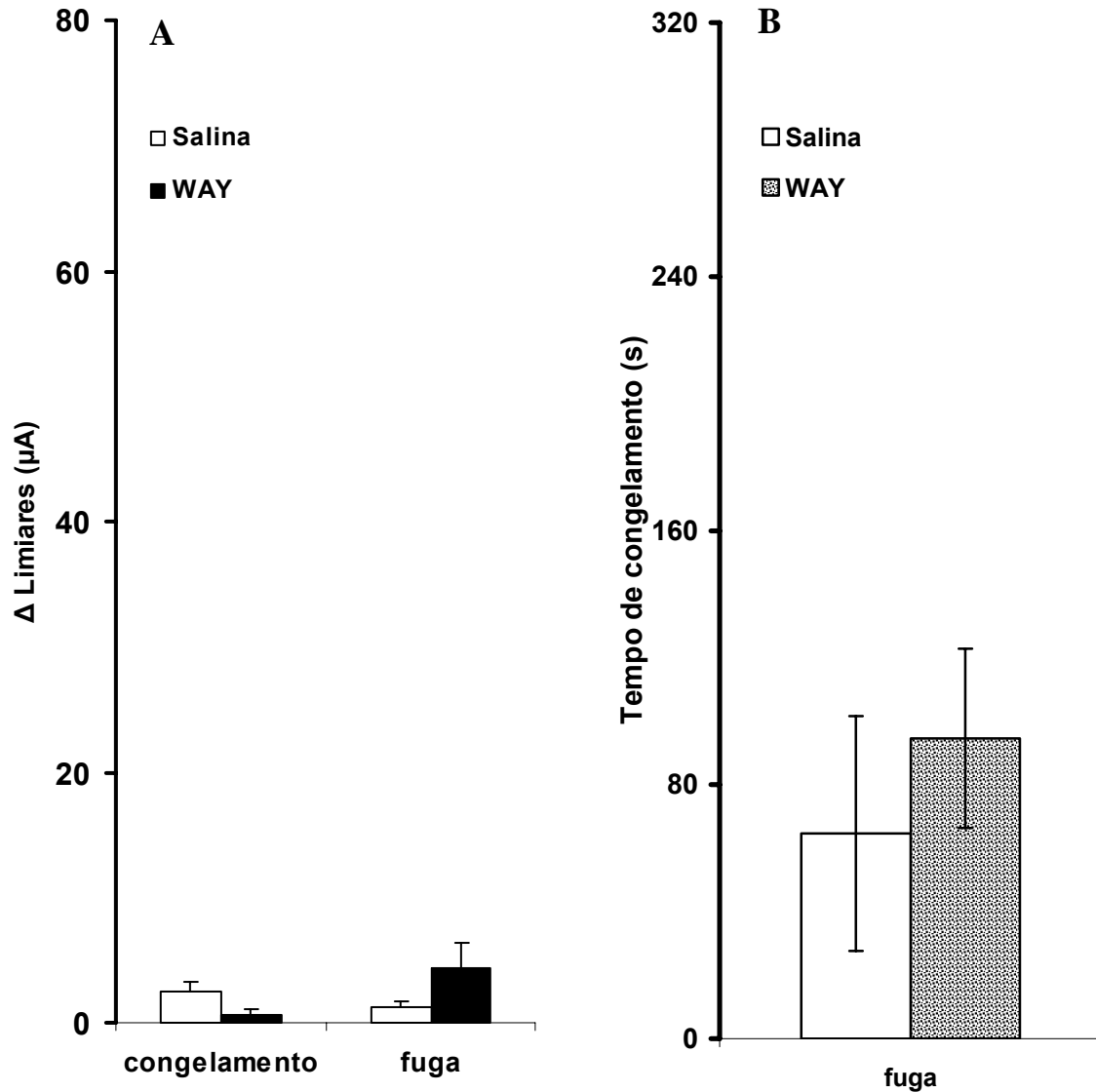


Figura 13: Efeitos do WAY100635 (10 nmoles/0,2 μl) sobre os limiares de congelamento e fuga e o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica aversiva da SCPD de ratos sob condicionamento contextual aversivo, testados em um contexto diferente. **A.** Diferença (Δ) de limiares antes e depois das injeções de salina (coluna aberta) e WAY100635 (coluna fechada). **B.** Tempo de congelamento pós-estimulação da SCPD no limiar de fuga determinado depois das injeções de salina (coluna aberta) e WAY100635 (coluna hachurada). N= 8 para os grupos salina e WAY100635.

DISCUSSÃO

A substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) apresenta um papel fundamental na mediação do comportamento defensivo e no sistema motivacional do medo, integrando respostas ativas a estímulos incondicionados. Diversos relatos apontam a SCPD como reguladora das reações inatas a estímulo de perigo iminente. Estudos com estimulação elétrica da SCPD mostram quatro reações aversivas claras, alerta, congelamento, fuga e congelamento pós-estimulação elétrica da SCPD (Magierek, et al., 2003; Vianna et al., 2001b).

O congelamento é uma das respostas a estímulos aversivos inatos ou aprendidos, além de ser o principal comportamento defensivo usado como índice de medo em modelos animais de ansiedade. Por exemplo, quando o animal é estimulado elétrica ou quimicamente na SCPD apresenta um congelamento que não é contexto-dependente (incondicionado), diferente de quando é exposto a um contexto no qual recebe choques nas patas. Quando este retorna ao mesmo local apresenta intenso congelamento contexto-dependente (condicionado), permanecendo nessa condição por alguns minutos (congelamento contextual). A fuga também é eliciada pela estimulação elétrica da SCPD. Ela é caracterizada por vigorosa corrida e saltos (Brandão et al., 2003; Graeff, 2004; Magierek et al., 2003; Vianna et al., 2001b; Vianna et al., 2003). Neste estudo, a estimulação elétrica foi aplicada em passos de 5 μ A e

com o aumento progressivo de intensidade, os animais subitamente paravam, tornavam-se imóveis e freqüentemente apresentavam reações autonômicas clássicas como defecação e micção. Com intensidade de corrente elétrica mais elevada, os animais apresentavam corrida. Portanto, o comportamento de congelamento sempre precedeu a ocorrência do comportamento de fuga.

A serotonina desempenha um papel inibitório no sistema cerebral aversivo. Vários estudos têm apontado para um papel antiaversivo da 5-HT na SCPD, através de estudos dos efeitos de microinjeções de agonistas e antagonistas sobre os limiares aversivos determinados por estimulação elétrica desta área (Beckett et al., 1992; Schutz et al., 1985). Sabe-se que esta modulação exercida pela serotonina sobre o comportamento defensivo induzido por estimulação elétrica da SCPD acontece de forma fásica, o que implica em um controle inibitório somente em presença do estímulo aversivo ou do estímulo estressante, enquanto que o controle inibitório tônico se faz através do sistema Gabaérgico (Brandão et al., 2003; Graeff et al., 1993; Graeff, 2002; Graeff, 2004). De fato, a injeção de agonistas 5-HT₁ e 5-HT₂ nesta estrutura aumentam os limiares aversivos de congelamento e fuga, enquanto a injeção local de antagonistas não produzem efeitos significativos (Graeff, 2004; Nogueira & Graeff, 1995; Soares & Zangrossi Jr, 2004). A facilitação da atividade destes receptores na SCPD mediando a inibição da atividade neuronal pode estar envolvida nos mecanismos de ação das drogas antipânico (Bortoli et

al., 2006). Em vista disso, tem sido proposto que mecanismos serotoninérgicos mediados por receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ exercem uma ação cooperativa inibindo os substratos neurais da aversão na SCPD (Graeff, 2002; Graeff, 2004; Nogueira & Graeff, 1995).

Em relação ao tempo de congelamento contextual, temos que ambos os tratamentos modificaram o medo condicionado contextual, sendo que a injeção intra-SCPD do agonista provocou uma diminuição do tempo de congelamento contextual (efeito antiaversivo), enquanto que a injeção do antagonista elevou este tempo (efeito pró-aversivo). Os resultados indicam claramente que o contexto previamente associado com choque nas patas induziu comportamento de congelamento defensivo. Ao lado disso, os resultados mostram o envolvimento da serotonina através de receptores 5-HT_{1A} na SCPD na mediação do congelamento contextual. Trabalhos usando esta metodologia também sugerem que a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica promove redução do medo condicionado (Inoue et al., 1996). Os nossos resultados também revelaram que os mecanismos mediados por receptores 5-HT_{1A} têm papéis distintos na regulação do medo condicionado e do medo incondicionado.

No presente trabalho os resultados obtidos mostram que a injeção na SCPD do agonista de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT, de maneira dose dependente, elevou os limiares de congelamento e fuga (ação antiaversiva) e a

injeção do antagonista de receptores 5-HT_{1A} WAY100635 não alterou os limiares aversivos determinados pela estimulação elétrica da SCPD. Estes resultados estão de acordo com as evidências do envolvimento de receptores 5-HT_{1A} na modulação do medo incondicionado na SCPD e corroboram a idéia de uma ação antiaversiva exercida pela serotonina nessa estrutura. Estes dados apóiam ainda os estudos da literatura que indicam uma modulação fásica da serotonina sobre os substratos do medo organizado na SCPD dado que a administração do antagonista de receptores 5-HT_{1A} sozinho não produziu qualquer efeito sobre os limiares aversivos. Esta modulação serotoninérgica da aversão elaborada na SCPD envolve receptores 5-HT_{1A}, pois antagonistas destes receptores, como WAY100635 E NAN-190, foram capazes de antagonizar a ação antiaversiva dos agonistas, como 8-OH-DPAT (Beckett et al., 1992; Behbehani et al., 1993; Nogueira & Graeff, 1995). Nossos resultados estão de acordo com estes resultados, pois o WAY100635 inibiu os efeitos do agonista de receptores 5-HT_{1A}, o 8-OH-DPAT, sobre os limiares aversivos.

O estudo da interação entre medo condicionado e medo incondicionado em animais de laboratório, tem-se mostrado muito útil na compreensão da neurobiologia da ansiedade tendo em vista que mostra um paralelismo com o que se tem discutido em termos de conseqüências afetivas e comportamentais da interação desses dois tipos de medo. Estudos usando choques nas patas associado a um estímulo neutro (som ou luz) ou a um ambiente em particular

(contexto) têm mostrado que a amplitude da resposta do sobressalto ao som é marcadamente acentuada pelo medo moderado (Davis & Astrachan, 1978; Santos et al., 2005). Outros estudos mostram a influência da intensidade do estímulo estressor nas respostas defensivas e apontam que a associação de eventos estressores diferentes pode causar aumento do medo (Maisonnette et al., 1993; Maritjena et al., 1997).

Neste trabalho, os resultados obtidos com a injeção de drogas que atuam em receptores 5-HT_{1A} na SCPD sobre o comportamento defensivo de animais que passaram pelo condicionamento de medo contextual não diferiram dos efeitos obtidos em animais injetados com salina intra-SCPD. Como o congelamento condicionado contextual influencia os limiares aversivos determinados durante o teste de medo condicionado contextual é possível que os efeitos do 8-OH-DPAT sobre o medo condicionado contextual tenham atenuado seus efeitos antiaversivos nos limiares aversivos.

O congelamento pós-estimulação da SCPD não é considerado uma resposta condicionada ao contexto no qual ocorreu a estimulação. De acordo com estudos recentes deste laboratório, este congelamento persiste quando o animal é colocado em um contexto diferente logo após a estimulação da SCPD (Vianna et al., 2001a,b). No presente estudo o congelamento pós-estimulação de ratos que foram injetados com salina não foi potencializado no contexto aversivo. Esta descoberta indica que o congelamento pós-estimulação, não é

influenciado pelo contexto que foi previamente pareado com choques nas patas.

A participação de receptores 5-HT_{1A} na SCPD parece não estar envolvida na modulação do congelamento pós-estimulação, uma vez que após a injeção de 8-OH-DPAT não houve diminuição significativa do tempo de congelamento pós-estimulação de animais com experiência aversiva prévia. O congelamento pós-estimulação é regulado diferentemente do medo evocado pela estimulação elétrica direta da SCPD, uma vez que lesões eletrolíticas ou a inativação com muscimol do complexo amigdalóide reduziram o congelamento pós-estimulação, mas não afetaram o comportamento de congelamento e fuga induzidos pela estimulação da SCPD (Oliveira et al., 2004; Ruiz-Martinez et al., 2006). Assim, é possível que os comportamentos de congelamento e fuga consistem de vias de saída para o medo incondicionado e o congelamento pós-estimulação elétrica da SCPD consiste de um processo de aquisição de informações que ascendem a estruturas localizadas em um nível mais rostral em relação à SCPD.

É provável que a SCPD integre as informações sensoriais, retransmitindo estas informações para a amígdala, a qual permite o reconhecimento do estímulo ameaçador. A amígdala avalia estímulos perigosos ou contextos aversivos, em termos do grau de ameaça que estes representam ao organismo, enquanto a SCP realiza respostas de seleção e coordenação (Graeff et al., 1993). Tem-se sugerido que a conexão entre SCPD e o complexo amigdalóide

deve modular de fato a ocorrência do comportamento de congelamento (Farook, et al., 2004; Graeff et al., 1993).

Também poderíamos pensar numa segunda hipótese, a qual propõe que a SCPD estaria mais relacionada ao medo incondicionado e a substância cinzenta periaquedutal ventral (SCPV) com o medo condicionado, visto que estudos com lesões da SCPV não alteraram o congelamento induzido pela estimulação elétrica da SCPD, mas reduziram o congelamento condicionado (Farook, et al., 2004; Fendt & Fanselow, 1999; Magierek, et al., 2003; Vianna, et al., 2001a,b). Há ainda uma terceira hipótese que defende que a ansiedade inibe o pânico (Graeff, et al., 1993; Magierek, et al., 2004). Assim, os animais quando re-expostos ao contexto aversivo apresentariam intenso congelamento que interferiria na expressão das respostas defensivas eliciadas pela estimulação elétrica da SCPD. Já no contexto diferente, os animais não apresentariam congelamento de forma que as respostas incondicionadas induzidas pela estimulação elétrica da SCPD não sofreriam influência da experiência aversiva prévia (choques nas patas).

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que existem circuitos neurais distintos além de diferentes receptores envolvidos na regulação dos comportamentos incondicionados e condicionados. Esta proposição está de acordo com a teoria de Deakin & Graeff (1991), que sugere que a mediação química dos diferentes tipos de medo pode ser diferente. Além

disso, trabalhos recentes propõem que os circuitos neurais da substância cinzenta periaquetudal dorsolateral são ativados preferencialmente por estímulos estressores psicológicos escapáveis, que levam às respostas emocionais primárias, como fuga ou luta (reações emocionais ativas) e que os circuitos envolvidos com as respostas emocionais a estressores psicológicos, seria representado pela substância cinzenta periaquetudal ventrolateral (Canteras, 2003; Keay & Bandler, 2001). Assim, existe uma dissociação na expressão das respostas a estímulos incondicionados e condicionados de medo na SCPD. De fato, lesões da SCPD reduzem o medo incondicionado, mas não reduzem o medo condicionado, enquanto que na SCP ventrolateral essas lesões têm efeitos opostos (Fendt, 1997; Fendt & Fanselow, 1999).

Acreditamos que a identificação da ação do agonista e do antagonista de receptores 5-HT_{1A} na SCPD sobre o medo condicionado e incondicionado, aí organizados, traz uma contribuição importante para a nossa compreensão da integração de estados aversivos no SNC e, sobretudo do funcionamento destes substratos neurais de defesa em animais com experiência aversiva prévia. O estudo do sistema serotoninérgico tem sido implicado como alvo da ação de diversas drogas ansiolíticas e antidepressivas (De Vry, 1995). Estudos de sua atuação na regulação da aversão na SCPD têm sido importantes no aprofundamento da neurobiologia do distúrbio de pânico e no modo de ação das drogas antipânico (Jacob et al., 2002; Jenck et al., 1995; Nogueira &

Graeff, 1995). Assim, estudos que venham esclarecer o envolvimento de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} da SCPD na modulação da reação de defesa organizada nesta região mesencefálica podem ter uma importante implicação clínica.

CONCLUSÕES

- Mecanismos serotoninérgicos podem atuar na SCPD regulando a expressão de comportamentos defensivos. Isto se torna evidente com os resultados obtidos com a administração intra-SCPD do agonista 8-OH-DPAT, em animais sem experiência aversiva prévia, a qual produziu um efeito antiaversivo. O antagonista WAY100635 não produziu nenhum efeito, indicando um controle regulatório fásico da 5-HT sobre os neurônios da SCPD.
- A mediação dos comportamentos aversivos de congelamento e fuga gerados em animais submetidos à estimulação elétrica da SCPD e com experiência aversiva prévia não depende dos receptores 5-HT_{1A}, pois o agonista 8-OH-DPAT não produziu efeitos significativos no contexto aversivo. No contexto diferente esta droga elevou os limiares aversivos.
- Os receptores 5-HT_{1A} da SCPD têm participação no medo contextual, pois o agonista desses receptores foi capaz de diminuir o tempo de congelamento condicionado (efeito antiaversivo), enquanto que o antagonista causou efeito oposto (efeito pró-aversivo).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLENIUS, S.; HENRIKSSON, I.; MAGNUSSON, O.; SALMI, P. In vivo intrinsic efficacy of the 5-HT_{1A} receptor antagonist NAD-299, WAY-100635 and (s)- (-) – UH-301 at rat brain monoamine receptors. *European Neuropsychopharmacology*, 9: 15-19, 1999.

AVANZI, V.; BRANDÃO, M.L. Activation of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in the median raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. *Behavioural Brain Research*, 126: 175-184, 2001.

BALDI, E.; LORENZINI, C.A.; BUCHERELLI, C. Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 81: 162-166, 2004.

BANDLER, R.; CARRIVE, P.; DEPAULIS, A. Emerging principles of organization of the midbrain periaqueductal gray matter. Plenum Press, New York, 1-8, 1991.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M.T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression?. *Trends Neuroscience*, 17(9): 379-389, 1994.

BARNES, N.M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38: 1083-1152, 1999.

BECKETT, S.; MARSDEN, C.A. The effect of central and systemic injection of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT and the 5-HT_{1A} receptor

antagonist WAY-100635 on periaqueductal grey-induced defence behaviour. *Journal Psychopharmacology*, 11(1): 35-40, 1997.

BEHBEHANI, M.M., LIU, H., JIANG, M., PUN, R.Y.K., SHIPLEY, M.T. Activation of serotonin_{1A} receptors inhibits midbrain periaqueductal gray neurons of the rat. *Brain Research*, 612: 56-60, 1993.

BLANCHARD, R.J. & BLANCHARD, D.C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 103: 70-82, 1989.

BLANCHARD, R.J.; FLANNELLY, K.J.; BLANCHARD, D.C. Defensive reactions of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *Journal Comp. Physiol. Psychol.*, 100: 101-107, 1986.

BORELLI, K.G.; GARGARO, A.C.; DOS SANTOS, J.M.; BRANDÃO, M.L. Effects of inactivation of serotonergic neurons of the median raphe nucleus on learning and performance of contextual fear conditioning. *Neuroscience Letters*, 387 (2): 105-10, 2005.

BORTOLI, V.C.; NOGUEIRA, R.L.; JR ZANGROSSI, H. 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*, 183: 422-428, 2006.

BRANDÃO, M. L.; VIANNA, D.M.; MASSON, S.; SANTOS, J. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. *Revista Brasileira Psiquiatria*, 25 (2): 36-41, 2003.

CANTERAS, N.S. Análise crítica dos sistemas neurais envolvidos nas respostas de medo inato. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 25 (II): 21-24, 2003.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: Functional representation and neural organization. *Behavioural Brain Research*, 58 (1-2): 27-47, 1993.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual Rev. Neuroscience*, 15: 353-375, 1992.

DAVIS, M.; ASTRACHAN, D.I. Conditioned fear and startle magnitude: Effects of different footshock and backshock intensities used in training. *J Exp Psychol Anim Behav Proc*, 4: 95-103, 1978.

DEAKIN, J.W.F.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. *Journal Psychopharmacology*, 5: 305-315, 1991.

DE VRY, J. 5-HT_{1A} receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology*, 121: 1-26, 1995.

DI SCALA, G.; MANA, M.J.; JACOBS, W.J.; PHILLIPS, A.G. Evidence of Pavlovian Conditioned Fear following electrical stimulation of the periaqueductal grey in the rat. *Physiology & Behavior*, 40: 55-63, 1987.

FANSELOW, M.S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of olfaction in response to fear and anxiety. In: Depaulis, A.; Bandler, R. (eds) The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and immunohistochemical organization. Plenum, New York, 151-173, 1991.

FAROOK, J.M. et al. Distinct regions of periaqueductal gray (PAG) are involved in freezing behavior in hooded PVG rats on the cat-freezing test apparatus. *Neuroscience Letters*, 354: 139-142, 2004.

FENDT, M. Stimulation of startle modulation midbrain areas has different effects on the acoustic startle response. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 23: 627-644, 1997.

FENDT, M.; FANSELOW, M.S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23: 743-760, 1999.

FLETCHER, A.; et al. Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT_{1A} receptor antagonist. *Behavioural Brain Research*, 73: 337-353, 1996.

FORSTER, E.A.; et al. A pharmacological profile of the selective silent 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635. *European Journal of Pharmacology*, 81: 81-88, 1995.

GRAEFF, F.G. On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology*, 163: 467-476, 2002.

GRAEFF, F.G. Serotonina, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. *Revista Brasileira Psiquiatria*, 25(2): 41-45, 2003.

GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28: 239-259, 2004.

GRAEFF, F.G.; SILVEIRA, M.C.L.; NOGUEIRA, R.L.; AUDI, E.A.; OLIVEIRA, R.M.W. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behavioural Brain Research*, 58: 123-131, 1993.

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

INOUE, T.; TSUCHIYA, K.; KOYAMA, T. Serotonergic activation reduces defensive freezing in the conditioned fear paradigm. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 53: 825-831, 1996.

JACOB, C.A. et al. Chronic imipramine enhances 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors-mediated inhibition of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 72: 761-766, 2002.

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

KEAY, K.A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25: 669-678, 2001.

KNIGHT, D.C.; NGUYEN, H.T.; BANDETTINI, P.A. The role of the human amygdala in the production of conditioned fear responses. *NeuroImage*, 26: 1193-1200, 2005.

LEDOUX, J.F. Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neuroscience*, 23: 155-184, 2000.

LEMAN, S.; DIELENBERG, R.A.; CARRIVE, P. Effect of dorsal periaqueductal gray lesion on cardiovascular and behavioural responses to contextual conditioned fear in rats. *Behavioural Brain Research*, 143: 169-176, 2003.

LORENZINI, C.A.; BUCHERELLI, C.; GIACHETTI, A.; TASSONI, G. Conditioned freezing (generalized motor inhibition) in several rat strains: its usefulness in assessing somato-vegetative responses to nociceptive stress. *Funct. Neurol*, 5: 267-271, 1990.

MAISONNETTE, S.S.; KAWASAKI, M.C.; COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, ML. Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Research Bulletins*, 40: 93-98, 1996.

MAGIEREK, V.; RAMOS, P.L.; SILVEIRA-FILHO, N.G.; NOGUEIRA, R. L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Context fear conditioning inhibits panic-like behavior elicited by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray. *Neuro Report*, 14 (12): 1641-1644, 2003.

MARITJENA, I.D.; CALVO, N.; VOLOSIN, M.; MOLINA, V.A. Prior exposure to a brief restraint session facilitates the occurrence of fear in response to a conflict situation: behavioral and neurochemical correlates. *Brain Research* 752: 136-142, 1997.

MEZZASALMA, M.A. et al. Neuroanatomia do transtorno de pânico. *Revista Brasileira Psiquiatria*, 26 (3): 202-206, 2004.

MONGEAU, R.; MARSDEN, C.A. Effect of imipramine treatments on the 5-HT_{1A}- receptor-mediated inhibition of panic-like behaviours in rats. *Psychopharmacology*, 131: 321-328, 1997.

MURISON, R.; OVERMIER, B.J. Comparison of different animal models of stress reveals a non-momotonic effect. *Stress*, 2 (3): 227-230, 1998.

NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G. Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 52 (1): 1-6, 1995.

OLIVEIRA, L.C.; NOBRE, M.J.; BRANDÃO, M.L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Role of amygdala in conditioned and unconditioned fear generated in the periaqueductal gray. *NeuroReport*, (15): 2281-2285, 2004.

PASSCHIER, J.; VAN WAARDE, A. Visualisation of serotonin-1A (5-HT_{1A}) receptors in the central nervous system. *European Journal of Nuclear Medicine*, 28 (1): 113-129, 2001.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic systems*. 3^a edição. New York, Academic Press, 1997.

POPOVA, N.K. The role of brain serotonin in the expression of genetically determined defensive behavior. *Genetika*, 40 (6): 770-778, 2004.

POPOVA, N.K.; AVGUSTINOVICH, D.F.; KOLPAKOIV, V.G; PLYUSNINA, I.Z. Specific [³H]-8-OH-DPAT binding in brain regions of rats genetically predisposed to various defense behavior strategies. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59 (4): 793-797, 1998.

RUIZ-MARTINEZ, R.C.; OLIVEIRA, A.R.; BRANDÃO, M.L. Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. *Neurobiology of Learning and Memory*, 85 (1): 58-65, 2006.

SANTOS, J.M.; et al. Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing behavior and fear-potentiated startle. *Eur J Neuropsychopharmacol*, 15: 239-246, 2005.

SCHENBERG, L.C.; BITTENCOURT, A.S.; SUDRÉ, E.C.M.; VARGAS, L.C. Modeling panic attacks. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, 25: 647-659, 2001.

SCHUTZ, M.T.B.; AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. *Psychopharmacology*, 85: 340-345, 1985.

SOARES, V.P.; ZANGROSSI JR, H. Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors of dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Research Bulletin*, 64: 181-188, 2004.

SUDRÉ, E.C.M.; BARROS, M.R.; SUDRÉ, G.N. SCHENBERG, L.C. Thresholds of electrically induced defence reaction of the rat: short- and long-term adaptation mechanisms. *Behavioural Brain Research*, 58: 141-154, 1993.

VAN ERP, A.M.; KRUK, M.R.; MEELIS, W.; VEENING, J.G. Periaqueductal gray lesions do not affect grooming, induced electrically in the hypothalamic paraventricular area in the rat. *Behavior Brain Research*, 59 (1-2): 95-101, 1993.

VARGAS, L.C.; MARQUES, T.A.; SCHENBERG, L.C. Micturition and defensive behaviors are controlled by distinct neural networks within the dorsal periaqueductal gray and deep gray layers of the superior colliculus of the rat. *Neuroscience Letters*, 280: 45-48, 2000.

VIANNA, D.M.L.; BORELLI, K.G.; FERREIRA-NETO, C.; MACEDO, C.E.; BRANDÃO, M.L. Fos-like immunoreactive neurons following electrical

stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds.

Brain Research Bulletin, 62: 179-189, 2003.

VIANNA, D.M.L.; BRANDÃO, M.L. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 36: 557-566, 2003.

VIANNA, D.M.L.; GRAEFF, F.G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.;

BRANDÃO, M.L. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not enhance freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. Learning & Memory, 8: 164-169, 2001 a.

VIANNA, D.M.L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M.L.

Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 25: 711-719, 2001 b.

WALLACE, K.J. & ROSEN, J.B. Neurotoxic lesions of the lateral nucleus of the amygdala decrease conditioned fear of a Predator odor. Comparison with electrolytic lesions. Journal of Neuroscience, 21: 3619-3627, 2001

TABELA 1. EFEITOS DA FACILITAÇÃO E BLOQUEIO DA NEUROTRANSMISSÃO 5-HT NA SCPD SOBRE OS LIMIARES DE ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E MEDO CONTEXTUAL INDUZIDO POR CHOQUES NAS PATAS.

Grupos	Tratamento	Linha de Base			Condicionamento (Choque nas patas)	Tempo	Tratamento	Teste		
		Limiares		Tempo de Congelamento *				Limiar		Tempo de Congelamento *#
		Congelamento	Fuga					Congelamento	Fuga	
A	Salina	μA	μA	seg	Contexto A	24 hs	Salina	μA	μA	seg
B	8-OH-DPAT	μA	μA	seg	Contexto A	24 hs	8-OH-DPAT	μA	μA	seg
C	WAY100635	μA	μA	seg	Contexto A	24 hs	WAY100635	μA	μA	seg
D	Salina	μA	μA	seg	Contexto B	24 hs	Salina	μA	μA	seg
E	8-OH-DPAT	μA	μA	seg	Contexto B	24 hs	8-OH-DPAT	μA	μA	seg
F	WAY100635	μA	μA	seg	Contexto B	24 hs	WAY100635	μA	μA	seg

• Contexto A: Com choques nas patas.

• Contexto B: Sem choques nas patas.

• TESTE: Contexto A e Contexto B.

• 8-OH-DPAT: Agonista 5-HT_{1A}

• WAY100635: Antagonista 5-HT_{1A}

* Tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPD (8 minutos)

Tempo de congelamento induzido pelo contexto (3 minutos) foi medido antes da estimulação elétrica da SCPD.