

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento

GUSTAVO HENRIQUE DE MELLO ROSA

**Estudo da interação entre o sistema serotoninérgico e opioide nas reações defensivas
elaboradas pela substância cinzenta periaquedutal**

RIBEIRÃO PRETO

2019

GUSTAVO HENRIQUE DE MELLO ROSA

**Estudo da interação entre o sistema serotoninérgico e opioide nas reações defensivas
elaboradas pela substância cinzenta periaquedutal**

Versão Original

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

Área de Concentração: Neurologia

Subárea: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

RIBEIRÃO PRETO

2019

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Rosa, Gustavo Henrique de Mello

Estudo da interação entre o sistema serotoninérgico e opioide nas reações defensivas elaboradas pela substância cinzenta periaquedutal. Ribeirão Preto, 2019.

101 p.: il.; 30 cm

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

Orientador: Coimbra, Norberto Cysne

1. Imobilidade defensiva **2.** Antinocicepção induzida pelo medo instintivo **3.** Sistema serotoninérgico **4.** Sistema opioidérgico **5.** Ataques de pânico.

ROSA, G. H. de M. Estudo da interação entre o sistema serotoninérgico e opioide nas reações defensivas elaboradas pela substância cinzenta periaquedutal. 2019. 101 f. Dissertação (Mestrado em Neurologia e Neurociências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

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

Área de Concentração: Neurologia

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, pela sabedoria e ajuda em todos os momentos de minha vida,
pois sem Ele nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** em primeiro lugar, pela intercessão de **Maria de Nazaré** e a **São Bento**.

Ao **Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra**, pela dedicação, paciência e amizade em todo o processo de entendimento e execução do trabalho. Faltam-me palavras para descrever o quão importante o mesmo foi para mim em todo este percurso, tanto acadêmico quanto pessoal, meus agradecimentos sempre serão eternos.

À **Dra. Audrey Francheschi Biagioni**, pelas palavras amigas, por toda dedicação e auxílio. Reitero, aqui, minha eterna gratidão e carinho que tenho por você.

Aos membros da **Banca examinadora**, que aceitaram estar neste momento importante a mim, acrescentando, de forma muito profissional, críticas edificantes ao presente trabalho.

Ao técnico **Daoud Hibrahim Elias Filho** e aos colegas do laboratório de neuroanatomia e neuropsicobiologia, do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e, em especial, às **Mestras Yara Bezerra de Paiva** e **Rebeca Machado**, ao **Mestre Raimundo da Silva Soares Jr.**, e ao **Mestrando Guilherme Bazaglia de Sousa** pela amizade sincera ao longo de todo tempo e pelo suporte psicológico dado a mim por eles. Acredito que vocês têm parcela importante em toda minha construção pessoal e profissional. Às **Doutoras Priscila Medeiros** e **Juliana de Souza**, que se mostraram pacientes e amigas quando precisei de orientações acadêmicas, também deixo aqui meu agradecimento.

À secretaria do Departamento de Farmacologia e do Programa de Pós-graduação em Neurologia e Neurociências.

Aos animais utilizados neste trabalho, fornecidos pelo Biotério Central da FMRP-USP.

A meus pais, **Marli de Mello Rosa** e **Wilson Rosa**, pelo discernimento, amor e paciência que junto a mim tiveram, e a meus irmãos, **Gabriel Eduardo de Mello Rosa** e **Felipe Vinicius de Mello Rosa**; tenho por vocês um amor incondicional. Agradeço, também, com muito amor, aos meus avós, minha querida **Alice Fernandes Sardão** (*in memoriam*) e

meu querido **Orlando Rosa** (*in memoriam*), que não estão mais entre nós fisicamente, mas estão presentes todos os dias em meu coração e em minha memória.

A meu querido e amado **Henrique Vieira Cristino** que, ao longo deste tempo, consegui me apoiar e aconselhar de forma correta, cautelosa e sábia, tornando-me, assim, uma pessoa melhor. Meus sinceros agradecimentos, amor e eterna gratidão, pelos seus valores conquistados ao lado de sua mãe, minha sogra, madrinha e amiga, **Aparecida Adriana Vieira**, quem, ao longo do tempo, mostrou-me que tudo conseguimos aplicando amor e paciência.

A meus amigos, **Kelvis Alexandre da Gama, Joe Alcântara, Jéferson Menino e Leticia de Souza**, que cresceram comigo. Hoje, estão presentes em todas as minhas decisões com muito apoio e incentivo, ajudando-me a nunca desistir de minhas iniciativas. Tenho um grande carinho e amor por vocês.

Aos demais queridos amigos conquistados ao longo de minha existência, em especial a **Pedro Pastore, Mariana Gomes, Tamiris Gama, Jéssica Paiva, Sophia Rivoiro, Maristela Mereles e Marta Vieira** por todo amor, palavras e abraços dedicados a mim.

Agradeço, enfim, a toda minha família **Rosa e Vieira**, aos amigos e a todos os demais que contribuíram de alguma forma para meu crescimento científico, cujos nomes posso não ter citado. Tenho cada um de vocês em meu coração, mesmo que não tenham interferido nesse estágio de pós-graduação e sim nas etapas anteriores já conquistadas por mim.

Não posso deixar de manifestar minha satisfação e gratulação a todos os interessados a leitura do trabalho aqui realizado.

Por fim, agradeço ao **CNPq**, por todo apoio financeiro dado neste processo, que é de suma importância para todos os alunos de iniciação científica e de pós-graduação, visto que o presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

RESUMO

ROSA, G. H. de M. **Estudo da interação entre o sistema serotoninérgico e opioide nas reações defensivas elaboradas pela substância cinzenta periaquedutal.** 2019. 101 f. Dissertação (Mestrado em Neurologia e Neurociências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A substância cinzenta periaquedutal elabora respostas defensivas de fuga, imobilidade e antinocicepção em roedores. Essas respostas comportamentais podem ser desencadeadas pela ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Particularmente, a estimulação da coluna ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal evoca uma expressiva resposta de imobilidade defensiva em ratos, sendo aquela acompanhada por uma alteração no processo de percepção de estímulos nociceptivos, denominada antinocicepção induzida pelo medo. Recentemente, foi proposto que a interação entre o sistema opioide e serotoninérgico modula a expressão das respostas comportamentais de defesa elaborada pela SCPvl em um modelo animal de ataques de pânico. Com o objetivo de avaliar a interação entre o sistema serotoninérgico e o sistema opioidérgico nas respostas comportamentais defensivas de imobilidade e na antinocicepção elaboradas pela SCPvl, os animais foram tratados cronicamente com paroxetina (10 mg/kg), administrada por via intraperitoneal (i.p.), um inibidor seletivo da recaptção de serotonina, e, agudamente, com naltrexona (26 nmol), um antagonista não seletivo dos receptores opioides, administrado por meio de microinjeção na SCPvl. O naltrexone foi administrado trinta minutos antes da microinjecção de NMDA (0,6 nmol), um agonista de receptores glutamatérgico do tipo NMDA, diretamente na SCPvl. A estimulação química da SCPvl com NMDA evocou a resposta comportamental defensiva de imobilidade, seguida por alteração no limiar nociceptivo. O tratamento crônico com paroxetina não alterou a expressão da resposta de imobilidade defensiva, mas potencializou a antinocicepção induzida pela estimulação química da SCPvl. O pré-tratamento da SCPvl com naltrexona também não alterou a resposta de imobilidade defensiva; porém, impediu a elevação dos limiars nociceptivos induzidos pelo medo inato. Esses dados demonstram que nem a inibição de receptação de serotonina, causada pela administração crônica de paroxetina por via sistêmica, nem o bloqueio agudo de receptores opioides na SCPvl interfere com a elaboração da imobilidade defensiva elaborada por ativação da SCPvl, o que sugere que as

respostas de defesa organizadas por neurônios da SCPvl não devem ser interpretados como respostas similares a ataques de pânico. O sistema opioide, entretanto, parece organizar pelo menos parte do fenômeno de antinocicepção induzida pelo medo inato, elaborado por neurônios da SCPvl.

Palavras-chave: Imobilidade defensiva, antinocicepção induzida pelo medo instintivo, sistema serotoninérgico, sistema opioidérgico, ataques de pânico.

ABSTRACT

ROSA, G. H. de M. Study of the interaction between the serotonergic and opioid system in the defensive reactions elaborated by the periaqueductal gray matter. 2019. 101 f. Dissertation (Master in Neurology and Neurosciences) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

The periaqueductal grey matter organises defensive responses such as escape, defense immobility and antinociception in rodents. These behavioural responses may be triggered by the activation of NMDA glutamatergic receptors. Particularly, the stimulation of the ventrolateral column of the periaqueductal grey matter (vlPAG) elicits an expressive defensive immobility response in rats, accompanied by a change in the nociceptive stimuli perception process, known as fear-induced antinociception. Recently, it was proposed that the interaction between the opioid and serotonergic systems modulates the expression of the behavioural defensive responses elaborated by the vlPAG neurons in an animal model of panic attacks. In order to evaluate the interaction between the serotonergic and the opioid systems in the defensive behavioural reactions and antinociceptive responses organised by vlPAG, the animals were chronically treated with intraperitoneal (ip) injections of paroxetine (10 mg / kg) a selective serotonin reuptake inhibitor, followed by acute treatment with naltrexone (26 nmol), a non-selective opioid receptor antagonist, administered by microinjection into vlPAG. Naltrexone was administered thirty minutes prior to the microinjection of NMDA (0.6 nmol), a NMDA-type glutamatergic receptor agonist, directly into the vlPAG. The chemical stimulation of vlPAG with NMDA evoked the defensive behavioural response of immobility, followed by alteration in the nociceptive threshold. Chronic treatment with paroxetine did not alter the expression of the defensive immobility response, but potentiated the antinociception induced by the chemical stimulation of vlPAG. Pretreatment of vlPAG with naltrexone also did not alter the defensive immobility response; however, prevented the elevation of nociceptive thresholds induced by innate fear. These data demonstrate that neither the inhibition of serotonin uptake caused by chronic systemic administration of paroxetine nor the acute blockade of opioid receptors in vlPAG is interfere with the elaboration of defensive immobility elaborated by activation of vlPAG, suggesting that responses of defense organised by vlPAG neurons should not be interpreted as a panic

attack-related response. The opioid system, however, seems to organise at least part of the innate fear-induced antinociception phenomenon, elaborated by vIPAG neurons.

Key words: Defensive immobility, instinctive fear induced-antinociception, serotonergic system, opioid system, panic attacks.

LISTA FIGURAS

Figura 1	Postura de "Congelamento"	25
Figura 2	Representação de um modelo experimental de medo condicionado	27
Figura 3	Divisão da substância cinzenta periaqueductal em mamíferos	34
Figura 4	Projeção do sistema serotoninérgico, distribuídos por todo eixo mediano do tronco encefálico	39
Figura 5	Coordenadas da substância cinzenta periaqueductal	47
Figura 6	Arena de estimulação	49
Figura 7	Efeito da administração de NMDA na SCPvl nas doses de 0,1, 0,3 e 0,6 nmol ou salina frente as reações defensivas	55
Figura 8	Efeito da administração de NMDA na SCPvl nas doses de 0,1, 0,3 e 0,6 nmol ou salina frente as reações antinociceptivas	57
Figura 9	Efeito da administração de paroxetina (ISRS) nas doses de 10 e 20 mg ou salina frente as reações defensivas elaboradas pela administração de NMDA na SCPvl	59
Figura 10	Efeito da administração de paroxetina (ISRS) nas doses de 10 e 20 mg ou salina frente as reações antinociceptivas s elaboradas pela administração de NMDA na SCPvl	61
Figura 11	Efeito da administração de naltrexona na SCPvl na dose de 26 nmol ou salina frente as reações defensivas elaboradas pela administração de NMDA na SCPvl	63
Figura 12	Efeito da administração de naltrexona na SCPvl na dose de 26 nmol ou salina frente as reações antinociceptivas elaboradas pela administração de NMDA na SCPvl	65
Figura 13	Efeito da interação farmacológica entre a paroxetina e naltrexona frente às reações defensivas elaboradas pela administração de NMDA na SCPvl	67
Figura 14	Efeito da interação farmacológica entre a paroxetina e naltrexona frente as reações antinociceptivas elaboradas pela administração de NMDA na SCPvl	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais estruturas encefálicas que regulam diferentes aspectos do comportamento de defesa	29
Tabela 2	Anexo A	101

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5- Hidroxitriptamina (Serotonina)
AP	Anteroposterior
CA	Complexo Amigdalóide
CEA	Núcleo Central do Complexo Amigdalóide
CETEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP
CI	Colículo Inferior
CONCEA	Comissão Nacional de Ética em Experimentação Animal
CS	Colículo Superior
DV	Dorsoventral
EPM	Erro Padrão Médio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HE	Hematoxilina e Eosina
I.P.	Intraperitoneal
IASP	International Association for the Study of Pain
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
LB	Linha de Base
ML	Médio Lateral
NaCl	Cloreto de Sódio
NMDA	N-Metil D-Aspartato
Nmol	Nanomol
NMR	Núcleo Magno da Rafe
NTX	Naltrexona
PRX	Paroxetina
SCP	Substância Cinzenta Periaquedutal
SCPd	Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal
SCPdl	Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsolateral
SCPdm	Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsomedial

SCPI	Substância Cinzenta Periaquedutal Lateral
SCPvl	Substância Cinzenta Periaquedutal Ventrolateral
SNC	Sistema Nervoso Central
TAG	Transtorno de Ansiedade Generalizada
TOC	Transtorno Obsessivo Compulsivo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Medo e Ansiedade	20
1.1.1 Medo Condicionado e Medo Incondicionado	24
1.1.2 Modelos Animais de Ansiedade e Nocicepção	25
1.2 Comportamento Defensivo	28
1.3 Bases Neurais do Comportamento Defensivo	32
1.4 Organização Anatômica e Funcional da SCP	33
1.5 Antinocicepção Induzida Pelo Medo	35
1.5.1 Mediação Serotoninérgica	38
1.5.2 Mediação Opioidérgica	39
1.6 A ciência por trás do controle do medo e da ansiedade	41
2. OBJETIVOS	43
3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	45
3.1 Animais	46
3.2 Drogas	46
3.3 Procedimentos Cirúrgicos	46
3.4 Microinjeção Intramesencefálica de Drogas	48
3.5 Teste Nociceptivo	48
3.6 Experimentos	49
3.6.1 Estudo da curva dose-resposta de NMDA frente às respostas comportamentais e antinociceptivas	49
3.6.2 Estudo farmacológico do tratamento periférico com um inibidor seletivo da recaptação de serotonina sobre as respostas comportamentais defensivas de imobilidade e a antinocicepção para seleção da dose mais eficaz	50
3.6.3 Estudo farmacológico da interação de um antagonista opióide sobre as respostas comportamentais defensivas de imobilidade e a antinocicepção eliciadas com a microinjeção de NMDA na dose de 0,6 nmol	50
3.6.4 Estudo farmacológico do tratamento periférico com um inibidor da recaptação de serotonina e um antagonista opioide intra-SCPvl sobre as respostas comportamentais defensivas de imobilidade e a antinocicepção	51
3.7 Histologia	51

3.8 Análise Estatística	52
4. RESULTADOS	53
4.1 Análise da dose mais eficaz de NMDA para evocação de estímulos comportamentais defensivos e antinociceptivo elaborados pela SCPvl	54
4.2 Análise dose-efeito do tratamento crônico com paroxetina nos comportamentos defensivos relacionados à imobilidade e na antinocicepção induzida pelo medo	58
4.3 Efeito do pré-tratamento com naltrexona sobre as respostas comportamentais induzidas pela estimulação química na SCPvl	62
4.4 Efeito do pré-tratamento com naltrexona sobre a antinocicepção induzida pela estimulação química na SCPvl	64
4.5 Estudo da interação farmacológica entre a paroxetina e a naltrexona sobre as respostas comportamentais defensivas de imobilidade	66
4.6 Estudo da interação farmacológica entre a paroxetina e a naltrexona sobre o limiar nociceptivo	68
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	80
ANEXOS	101

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

O conhecimento atual em relação ao medo e à ansiedade baseia-se no estudo de estratégias comportamentais de sobrevivência, onde o animal se comporta de modo a ver-se em conflito entre a motivação de explorar o nicho ecológico em que se insere e o temor de ser predado, ou de comprometer sua integridade física, e alterações fisiológicas e neurovegetativas ocorrem em situações de perigo real ou potencial com o intuito de preservação do seu bem estar e da sua vida. Enquanto as espécies predadoras desenvolveram estruturas físicas e estratégias comportamentais para aumentar as chances de sucesso na busca por alimento, as presas também desenvolveram reações fisiológicas e comportamentais de defesa (APFELBACH et al, 2005). Assim, quando o animal se encontra em uma situação de perigo, ocorre a ativação dos circuitos encefálicos responsáveis por gerar e elaborar as reações defensivas (BLANCHARD e BLANCHARD, 1972; ADAMS, 1979; FANSELOW, 1979, 1980; BLANCHARD et al., 1991; FANSELOW e KIM, 1994) que, em animais, são interpretados como um estado motivacional do tipo medo.

Os comportamentos defensivos, dentre várias outras respostas comportamentais, podem ser expressos como uma inibição comportamental (COIMBRA e BRANDÃO 1993; NOBRE et al., 2001, 2004; GUIMARÃES-COSTA et al., 2005b), que inclui a imobilidade defensiva ou “congelamento” (FANSELOW 1980, COIMBRA et al., 1990, COIMBRA e BRANDÃO 1993, LOBÃO-SOARES et al., 2008, ALMADA et al., 2015b) e imobilidade tônica (MENESCAL-DE-OLIVEIRA e HOFFMANN, 1993; LEITE-PANISSI et al., 2003), respostas ativas de defesa, como a fuga (COIMBRA et al., 2017) ou, na impossibilidade de fuga, por um conjunto de posturas e vocalizações ameaçadoras (HESS e BRUGER 1943).

Em um ambiente selvagem, os animais se deparam com confrontos com predadores repetidamente, e constantemente necessitam criar e elaborar respostas comportamentais defensivas. Por esse motivo, é relevante estudar a neurobiologia que embasa tais reações de defesa, considerando indícios de que os transtornos de ansiedade em seres humanos estão diretamente relacionados com substratos neurais que elaboram os comportamentos de defesa de diferentes espécies de animais, sempre suscetíveis a situações que sinalizam um perigo iminente ou potencial a todo o momento (HETEM et al., 1996). É de suma importância, pois, estudos sobre os mecanismos neurobiológicos para detecção de uma resposta comportamental objetiva que leve a uma reação imediata e adequada a um dado estímulo aversivo, e muitos pesquisadores utilizam estímulos biológicos, como o confronto de presas com predadores

naturais (URIBE-MARIÑO et al., 2012; COIMBRA et al., 2017), químicos (ULLAH et al., 2017; DA SILVA SOARES Jr., et al., 2019) ou elétricos (COIMBRA e BRANDÃO, 1993) para induzir comportamentos defensivos em animais de laboratório, sendo aqueles específicos e adaptados para cada espécie.

É observado que a reação e a autoproteção contra o perigo a que o animal é exposto, organiza-se mediante estímulos que possam comprometer potencialmente a sobrevivência ou a integridade do organismo. Pode ser pressuposto que reações motoras como correr, nadar e voar constituem comportamentos diferentes, que envolvem músculos e estratégias fisiológicas diferentes, mas todas, quando os animais se deparam com estímulos aversivos, têm o mesmo resultado comportamental, que é a fuga. Isso ocorre porque os sistemas encefálicos envolvidos na mediação das funções defensivas são semelhantes nas diferentes espécies (LEDOUX, 1998).

Os estudos da neurobiologia do medo e da ansiedade foram bem descritos nos relatos de Darwin sobre o caráter evolutivo do comportamento emocional no Homem, a primeira tentativa importante nesse sentido foi no seu escrito “A expressão das emoções no Homem e nos animais”, em 1872. Seus trabalhos na segunda metade do século XIX indicavam que o estudo do comportamento de outros animais era o caminho para a compreensão das emoções no Homem, que até o presente momento leva o emprego de modelos animais pelos neurocientistas, devido à alta resposta comportamental observada pelos estudos já realizados.

Procurando desvendar o mecanismo desses distúrbios, estudos clínicos e experimentais vêm sendo realizados e amplamente demonstram ser favorecidos pelo uso de modelos animais de ansiedade, os quais permitem a investigação das bases neurobiológicas desses distúrbios, bem como a avaliação de novos agentes potencialmente terapêuticos (BLANCHAD e BLANCHARD, 1988, 1989).

1.1 Medo e Ansiedade

O comportamento dos seres humanos em relação à defesa parece remontar ao distante passado evolutivo que atualmente é estudado por muitos neurocientistas, evidenciando que as reações de medo em animais, podem esclarecer os mecanismos do medo nos seres humanos

(LEDOUX, 2001). No habitat natural, os animais são frequentemente expostos a condições de perigo e a situações que os fazem exibir padrões comportamentais fundamentais para a sobrevivência individual e para a manutenção de sua espécie (DARWIN, 1872). O medo pode originar-se pela exposição de um animal a estímulos naturalmente ameaçadores, que são reconhecidos de maneira inata, e estímulos de perigo condicionados; estes adquiridos através de processos de aprendizagem. O reconhecimento de um estímulo inato de perigo é independente de qualquer processo prévio de aprendizagem e está presente em todos os indivíduos de uma mesma espécie, devido suas bases neurobiológicas, além de estímulos aprendidos que podem passar a sinalizar perigo através de um processo de aprendizagem chamado medo condicionado. Por exemplo, a exposição de roedores a serpentes elicia nas presas um conjunto de respostas inatas de defesa (COIMBRA et al., 2017; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018) e a reexposição desses animais ao contexto experimental, sem o predador, gera medo condicionado (COIMBRA et al., 2017).

Frente a um perigo real ou potencial, são elaboradas distintas respostas comportamentais e emocionais a fim de gerir a defesa do animal. O medo e a ansiedade são estados emocionais que podem ser diferenciados segundo Blanchard & Blanchard (1988) através da direção defensiva, onde cada qual é eliciado através da presença real de um predador, levando a conotação de perigo real representando o medo, ou então pela possível presença do mesmo, levando o pressuposto de um perigo em potencial, gerando a ansiedade. Em resumo, o animal quando está frente a seu predador natural gera um estado de medo, sendo que quando o mesmo encontra-se frente a algum indício de que o seu predador possa estar presente nas vizinhanças da área que ele explora ou assoma-se à toca, gera sinais de ansiedade.

De acordo com Davis et al. (1997), o medo é provocado por um estímulo ameaçador que possa a ser claramente identificável, sendo que a resposta comportamental apresenta uma característica única de cessar logo após o término do estímulo eliciador. Buscando as bases da palavra “medo”, sua origem do grego *anshein*, que tem o significado de “estrangular, sufocar ou oprimir”, nos remete de forma alegórica, as experiências experimentadas pela ansiedade, a qual, por sua vez, não se encontra claramente associada a um único estímulo provocador, demonstrando que a ansiedade ocorre em circunstâncias onde o perigo é apenas potencial. A ansiedade ser definida como uma reação do sistema de defesa que gera um conjunto característico de alterações fisiológicas, perceptuais, cognitivas e comportamentais, variando de acordo com a relação e a situação ameaçadora do meio ambiente (BRANDÃO, 2004;

GROSS; HEN, 2004; INDOVINA et al., 2011). O animal irá se portar junto a um componente de incerteza, receio ou apreensão, aparentemente, sem causa evidente (GRAEFF, 1999).

Tais estados de emoção em seres humanos são traçados como de grande valor adaptativo, sendo que, quando expressas tais emoções, elas permitem ao indivíduo evitar prejuízos a seu organismo, levando ao desempenho de respostas adequadas e necessárias à sobrevivência (PRATT, 1992; GRAEFF, 1994). Por ser considerada uma resposta adaptativa, muitos neurocientistas propõem que, em determinada intensidade, a ansiedade pode ser benéfica, podendo, assim, melhorar o desempenho do indivíduo, seja em tarefas do seu cotidiano ou específicas (DODSON, 1908; TALLMAN et al., 1980; BENNINGHOVEN et al., 2006; LEE; KUKOLJA et al., 2008).

Entretanto, quando a ansiedade é experimentada durante um longo período de tempo ou de forma excessiva em um pequeno espaço de tempo, os mecanismos ativadores podem levar ao desenvolvimento de patologias, como ocorre nos transtornos de ansiedade (BRANDÃO, 2004; GROSS; HEN, 2004). Quando identificada a ansiedade patológica, podemos diferenciá-la em diferentes tipos, como: transtorno obsessivo compulsivo (TOC), fobias, transtorno de pânico, transtorno de estresse pós-traumático e transtorno de ansiedade generalizada (TAG) entre outras. As expressões comportamentais desses distúrbios representam uma combinação de dimensões comportamentais influenciadas por fatores genéticos e ambientais. Altos níveis de ansiedade podem conduzir o indivíduo à exaustão e, posteriormente, à somatização de sintomas psicossomáticos. Diversos estudos sobre a neurobiologia do medo e da ansiedade demonstraram que a natureza das respostas de medo em animais expostos a situações ameaçadoras é dependente da intensidade e da distância do estímulo aversivo (DRACTU e LADER 1993).

Estímulos ameaçadores potenciais ou distantes induzem o aumento das respostas de avaliação de risco, onde se ressalta a postura de alerta e, quando o perigo é explícito, porém quando distante, o animal assume uma postura imóvel associada a uma inibição de sua atividade motora, além de reações autonômicas e neurovegetativas características da resposta de “congelamento”. Assumindo tal postura comportamental, o animal pode não ser percebido pelo seu predador potencial; porém, à medida que o mesmo se aproxima, ou aumenta a intensidade dos sinais que indicam sua presença, o comportamento de defesa se altera de “congelamento” intenso para um comportamento de luta ou fuga, quando possível (BRANDÃO et al., 2003).

Assim, quando um animal confronta-se com uma ameaça que possa afetar seu bem estar, sua integridade física ou a sua própria sobrevivência, ele apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de medo que, por sua vez, é despertado pela motivação para escapar ou evitar um dado estímulo aversivo, ao passo que pânico, é expresso por uma fuga vigorosa evocada por um perigo proximal, segundo Graeff (2007). Porém, existem circunstâncias nas quais esses padrões comportamentais emergem sem uma clara funcionalidade e impedem ao organismo se adaptar ao ambiente (GRAEFF; BRANDÃO, 1999).

Evidências sobre a neuroanatomia do medo e da ansiedade são provenientes de estudos realizados com seres humanos, através de recursos de imagem estática e funcional (ressonância magnética e tomografia por emissão de pósitrons ou ressonância nuclear magnética com fluxo), o que posteriormente fora adaptado em modelos animais, visto que as estruturas de ativação se corroboravam. Experimentos com neurotraçadores (RIBEIRO et al., 2005; CASTELLAN-BALDAN et al., 2006; COIMBRA et al., 2006) e imunoistoquímica para a proteína Fos (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018) realizados em animais de laboratório também vêm contribuindo sobremaneira para a elucidação das bases neurais do comportamento de defesa. Os modelos animais de ansiedade procuram reproduzir uma situação ambiental de provável ocorrência de diferentes formas de aversão ou desconforto, como, por exemplo, lugares novos ou intensamente iluminados, a presença de coespecíficos e o confronto com predadores (PELOW et al., 1985; LISTER, 1990; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018).

Os circuitos neurais envolvidos na organização das respostas defensivas vêm sendo investigados ao longo de todo o processo que é denominado como evolutivo (GRAY, 1982; GRAY e MCNAUGHTON, 2000). Através da seleção natural, indivíduos com respostas defensivas com maior valor adaptativo foram capazes de enfrentar as ameaças presentes no seu habitat natural e transmitir suas características adaptativas aos seus descendentes. Saindo do pressuposto de questões adaptativas e tendo em vista o ponto biológico, a ansiedade possui suas raízes nas reações de defesa dos animais, verificadas em resposta aos perigos comumente encontrados no ambiente em que vivem, e a utilização de modelos animais de ansiedade possibilita estudar em laboratório aspectos de sintomatologia, etiologia, e cogitar possíveis tratamentos, além de desvendar mecanismos pelos quais diferentes compostos produzem seus efeitos, e entendermos melhor a neurobiologia da ansiedade (TREIT, 1985; FILE, 1992).

1.1.1 Medo Incondicionado e Medo Condicionado

Dentro dos paradigmas estabelecidos na literatura, ratos apresentam respostas frente a perigos e predadores potenciais e suas respostas comportamentais são consideradas indicadoras de medo incondicionado, ou seja, quando um estímulo de natureza aversiva, como um predador, desencadeia no animal uma resposta inata considerada incondicionada, tendo como fato as respostas comportamentais eliciadas sem alguma experiência prévia. Estes comportamentos expressos pelos ratos parecem ser representativos em diversos mamíferos, além do que manifestam-se de diversas maneiras, tais como a avaliação do risco, imobilidade defensiva, ataques defensivos e fuga (CATTARELLI 1979; BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; BERTON et al., 1998; ROSEN, 2001; CANTERAS, 2003).

Quando posicionado frente a um perigo potencial, o animal adota a postura de “congelamento”, onde se observa a ausência total de movimentos aparentes, exceto os responsáveis pela respiração. Essa resposta é uma reação de defesa eficiente, uma vez que predadores têm dificuldade em detectar uma presa imóvel, e o movimento representa um estímulo que desencadeia a resposta de ataque por parte do predador. O “congelamento”, também conhecido como “*freezing*” (Figura 1) é apresentado junto um complexo padrão comportamental, com alterações autonômicas, como aumento da atividade respiratória, hipertensão, aumento da frequência cardíaca, aumento da defecação e micção (FANSELOW; BOLLES, 1980; FANSELOW; BAACKES, 1982; FANSELOW, 1984; AVANZI et al., 1998; ANTONIADIS; MCDONALD, 1999; CARRIVE et al., 2000; CARRIVE, 2002).

Frente a seu predador natural, as presas apresentam comportamento de “congelamento”, e dependendo da intensidade do estímulo, ou aproximação do predador, será provocada uma ação de fuga orientada ou não, onde o animal interrompe tal imobilidade e engaja em um comportamento caracterizado por saltos e corridas (BRANDÃO et al., 2003; COIMBRA et al., 2017).



Figura 1: Postura de “Congelamento”. Acervo pessoal.

Levando em consideração o medo condicionado, o animal apresenta um aprendizado quanto a seu estímulo eliciador neutro, gerando posteriormente um estímulo aversivo incondicionado, como, por exemplo, o choque nas patas. A literatura demonstra que, após o aprendizado do animal do pareamento entre estímulos neutros, como som e luz, com estímulos aversivos, os animais evocam medo condicionado (FANSELOW, 1999). Fanselow (1980) demonstrou que o tempo da resposta de “congelamento” é predominantemente determinado pelas características do choque e pela duração do mesmo.

Muitos estudos têm sido realizados no sentido de identificarem os circuitos neurais envolvidos na organização das respostas defensivas adotadas pelos animais. À medida que os estímulos ameaçadores, potenciais e distais são substituídos por estímulos proximais, ocorre uma comutação dos circuitos neurais usualmente responsáveis pela produção de respostas condicionadas de medo para reações defensivas incondicionadas caracterizadas por baixo nível de regulação e organização que se assemelham aos ataques de pânico (BRANDÃO et al., 2003).

1.1.2 Modelos Animais de Ansiedade e Nocicepção

Os modelos animais de ansiedade procuram reproduzir uma situação ambiental de provável ocorrência de diferentes formas de aversão ou desconforto. Geralmente, isso é feito

expondo-se animais a perigos que induzam medo ou ansiedade, como ambientes novos ou potencialmente ameaçadores, estímulos nociceptivos, sinalização de predadores naturais ou ao confronto com animais da mesma espécie ou com predadores. O principal objetivo dos testes consiste em avaliar as respostas fisiológicas e comportamentais frente ao estímulo aversivo, podendo, então, posteriormente ser comparado com medidas de ansiedade em seres humanos (CRUZ et al., 2012).

Os primeiros modelos animais de ansiedade surgiram a partir de pequenos ajustes de procedimentos de aprendizagem associativa consagrados pelo behaviorismo para avaliar o potencial terapêutico de drogas ansiolíticas. Sob égide da etologia, modelos animais de ansiedade e de medo inato, fundamentados em reações de defesa frente a estímulos ou situações naturalmente aversivas, passaram também a ocupar um lugar de destaque na Psicobiologia. Incorporando esse princípio às vantagens oferecidas pelo método experimental, essa abordagem passou a ser chamada análise etoexperimental e, posteriormente, análise etofarmacológica da ansiedade, uma vez que envolvia a manipulação de fármacos.

Os modelos animais de ansiedade são divididos em dois grupos principais: modelos baseados em medo inato ou etologicamente fundamentados e modelos baseados em aprendizagem associativa. Os modelos etologicamente fundamentados usam estímulos que desencadeiam respostas incondicionadas de medo em diferentes espécies animais, como lugares novos ou intensamente iluminados, a presença de coespecíficos e o confronto com predadores (PELOW et al., 1985; LISTER, 1990). Entre os modelos etologicamente fundamentados estão o teste claro-escuro, a interação social, o labirinto em cruz elevado, a interação presa-predador.

Muitos modelos animais de ansiedade envolvem processos de aprendizagem associativa e são baseados no condicionamento clássico ou operante do medo (Figura 2). Pelo condicionamento clássico, estímulos neutros, como sons de baixa intensidade ou luz, quando associados a estímulos aversivos incondicionados, como choques elétricos e sons intensos, tornam-se estímulos condicionados que podem desencadear respostas de medo ou ansiedade (resposta condicionada). Nesse sentido, esses estímulos neutros passariam a desencadear as respostas de medo e ansiedade em decorrência de anteciparem para o animal a apresentação de um estímulo aversivo.

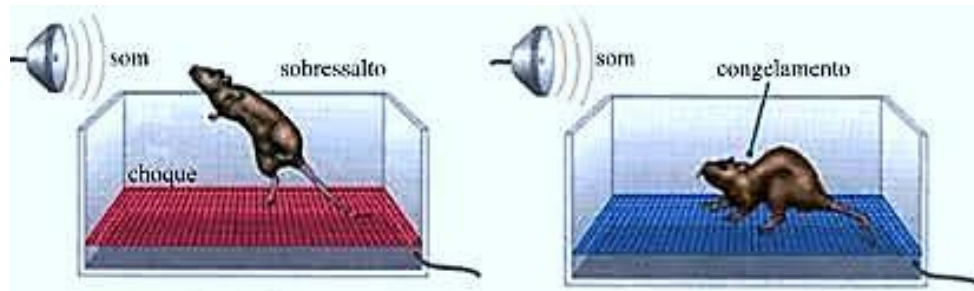


Figura 2: Representação de um modelo experimental de medo condicionado (FELIX at al, 2014).

O que torna a resposta de “congelamento” um índice comportamental muito atraente é o fato de que o estado emocional do animal pode ser avaliado diretamente, sem nenhuma forma de privação de alimento, água ou qualquer outra forma de aquisição de resposta operante. Ansiolíticos benzodiazepínicos, tais como o midazolam e o diazepam, assim como agonistas do receptor 5-HT_{1A}, como a ipsapirona, ou inibidores da recaptação da serotonina, como o citalopram e a fluoxetina, reduzem o “congelamento” condicionado frente a estímulos contextuais previamente associados a choques elétricos. Por outro lado, compostos ansiogênicos, tais como o agonista benzodiazepínico inverso dimetoxi-beta-carbolina, produzem comportamento semelhante ao “congelamento” provocado pelo condicionamento contextual aversivo.

Existem vários tipos de testes para se estudar a nocicepção nos animais, principalmente em mamíferos. Uma das formas de classificá-los é de acordo com o tipo de estímulo nocivo utilizado, que pode ser de natureza mecânica, química ou térmica. Embora os animais submetidos a um estímulo nocivo não tenham capacidade de se comunicar verbalmente quando da ocorrência da dor, são capazes de exibir respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em seres humanos. Por isso, utiliza-se o termo “resposta nociceptiva” em vez de dor. Essas respostas comportamentais são estudadas e comparadas na presença de drogas potencialmente analgésicas que interferem no processo fisiológico da dor, o que nos permite inferir que um animal de experimentação está experimentando uma resposta algica. Dentre os testes aplicados em modelos animais, está o teste da retirada da cauda. Neste modelo, um estímulo térmico acima de 40°C aplicado à cauda do animal desencadeia o reflexo da retirada da mesma por flexão predominantemente em direção rostral. A avaliação das respostas é feita por meio da medida do lapso de tempo

entre a aplicação do estímulo térmico e o momento de afastamento da cauda da fonte de calor. Calcula-se o índice do limiar nociceptivo por meio do tempo de latência do reflexo de retirada da cauda.

1.2 Comportamentos Defensivos

O estudo de processos emocionais do medo e da ansiedade vem ganhando atenção dos neurocientistas desde os trabalhos de Charles Darwin, publicados no livro *“The expression of emotions in Man and Animals 1872”*, demonstrando que o Homem, possuindo outros animais como ancestrais, segundo a ciência, compartilhariam com estes, suas emoções básicas e desta forma, a mente humana estaria embutida a uma herança de seu passado primitivo, permitindo que comparações entre o seu comportamento e o de outros animais pudessem ser realizadas.

Apesar de o comportamento defensivo variar de uma espécie para outra, algumas estratégias comportamentais são adotadas em função dos diferentes níveis de ameaça, com os quais os animais se deparam na natureza. Geralmente, estas respostas defensivas são acompanhadas de intensas alterações autonômicas, como dilatação da pupila, piloereção, micção, defecação, aumento da vigilância, alteração das frequências respiratória e cardíaca, alteração da pressão sanguínea, aumento da irrigação sanguínea dos músculos esqueléticos, que dão ao indivíduo o suporte fisiológico necessário ao desempenho motor na reação de defesa (GRAEFF; BRANDÃO, 1999). Analisando estas estratégias de defesa, os pesquisadores propuseram que o nível de ameaça que o estímulo representa é um dos fatores determinantes para a escolha do tipo de resposta comportamental defensiva. Assim, os estímulos de ameaça foram classificados em potencial, distal e proximal (Tabela 1) e, em uma situação de perigo, a escolha de uma resposta comportamental de defesa leva em consideração a distância entre a presa e o predador, bem como o grau de ameaça oferecido em cada situação (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988).

Tabela 1: Principais estruturas encefálicas que regulam diferentes aspectos do comportamento de defesa.

TIPO DE AMEAÇA	COMPORTAMENTO	SUBSTRATO NEURAL
Perigo Potencial relacionado à Aproximação	Avaliação ao risco e Inibição comportamental	Sistema Septo-hipocampal e córtex cingulado posterior
Perigo Potencial relacionado à Evitação	Esquiva	Complexo amigdalóide e parte anterior do giro do cíngulo
Perigo Distal	Fuga orientada e inibição da agressão	Hipotálamo Medial
Perigo Proximal	“Congelamento”, luta ou fuga desordenada	Substância Cinzenta Periaquedutal

Fonte: GRAY e MCNAUGHTON, 2000.

Fanselow (1994) propôs uma organização das respostas defensivas em três estágios, considerando o contexto de uma presa confrontada por um predador. No primeiro nível de defesa, quando a ameaça é potencial (incerta), o comportamento emitido é cauteloso, como as respostas de avaliação de risco e a esquiva inibitória. Nesse caso, alguns estudos revelam que estruturas, tais como o complexo amigdalóide e o sistema hipocampal, estariam envolvidas nesse tipo de comportamento (BLANCHARD et al., 1993, 2003; GRAEFF, 1994, 2004; GRAY MCNAUGHTON, 2000). No segundo nível, quando o perigo é real, ou seja, o predador está presente, mas se apresenta a certa distância, a resposta gerada é de fuga ou o “congelamento”, no caso da fuga não ser possível. O substrato neural envolvido nesse nível de defesa foi proposto por Davis e colaboradores (1992), a partir de estudos da resposta de sobressalto potencializada pelo medo, como parte do núcleo central do complexo amigdalóide e a parte ventral da substância cinzenta periaquedutal (SCPv), que seriam essenciais para a expressão de “congelamento” gerado por estímulos aversivos. O terceiro nível de defesa ocorre em situação de perigo proximal, quando o predador ou ameaça está muito próximo ou em contato direto com a presa, levando à emissão de respostas de imobilidade tônica, fuga explosiva ou agressão defensiva.

Com base em estudos pioneiros de Hess e Brüger (1943), foi proposto que o terceiro nível de defesa estaria associado ao hipotálamo e à substância cinzenta periaquedutal (SCP). Eles mostraram que a estimulação elétrica do hipotálamo de gatos provocava respostas de defesa como ataques defensivos e raiva. Há evidências de que o hipotálamo ventromedial conecta-se com a SCP (ULLAH et al., 2017), uma estrutura que elabora comportamentos explosivos de fuga (COIMBRA et al., 2006). Posteriormente, baseado em evidências experimentais associadas a achados clínicos, Graeff (1994, 2002, 2004) correlacionou os comportamentos observados no terceiro nível de defesa com o transtorno de pânico (HESS e BRUGGER, 1943; HUNSPERGER, 1956; FERNANDEZ DE MOLINA e HUNSPERGER, 1959).

Os primeiros trabalhos realizados com o objetivo de evidenciar quais as estruturas do sistema nervoso central (SNC) que modulam a resposta defensiva de imobilidade foram realizados por Klemm (1971) e Carli (1971), por meio da utilização de técnicas de transecção cerebral em vários níveis do SNC de coelhos. Desta maneira, Carli (1971) demonstrou que a integridade do tronco encefálico é necessária para a emissão do comportamento de imobilidade. Em adição, apesar da integridade do tronco encefálico ser crucial para emissão desta resposta defensiva, alguns trabalhos mostram que áreas diencefálicas (OLIVEIRA et al., 1997) e telencefálicas (LEITE-PANISSI et al., 1999) são importantes para a modulação deste comportamento.

O comportamento de orientação espacial pode ser considerado como fundamental para a elaboração de interações sociais, interespecíficas e de reações com o meio ambiente, além de permitir a identificação de presas e predadores. Em primatas e mesmo em roedores, a área pré-tecal, o colículo superior, o núcleo dorsal lateral e o *pulvinar* do complexo talâmico dorsal, além do córtex supraorbital frontal são estruturas relevantes para a organização de comportamentos de busca, fixação atenta e acompanhamento de presas e de potenciais predadores no campo visual. Em situações de risco iminente de vida, a capacidade dos animais em elaborar representações mentais da presença de oponentes identificados no campo visual tornar-se, pois, imprescindível para a elaboração do comportamento de alerta ou de imobilidade defensiva (COIMBRA E BRANDÃO 1993; Coimbra et al, 2017).

Em resumo, com relação ao substrato neural que participa da emissão e modulação do comportamento defensivo de imobilidade, vários trabalhos abordam esta questão, utilizando além das técnicas de transsecção cerebral (CARLI, 1971; KLEMM, 1971); administração

periférica de drogas ansiogênicas ou ansiolíticas (OLSEN et al., 2002) ou ativação central de diferentes sistemas de neurotransmissores (MENESCAL-DE-OLIVEIRA et al., 1990; LEITE-PANISSI et al., 1999; MONASSI e MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2004).

1.3 Bases Neurais do Comportamento defensivo

A literatura evidencia circuitos neuronais responsáveis pela gênese e elaboração de estados aversivos, desencadeados por estímulos ambientais inatos ou aprendidos que sinalizem perigo e dano corporal, que são interpretados em nossa espécie como estado motivacional do medo (PANKSEPP, 1990; FANSELOW, 1991; VIANNA et al, 2003; JOHNSON et al, 2010; MEZZASALMA et al, 2004; BRANDÃO et al, 2003 COLASANTI et al, 2010). Algumas estruturas encefálicas responsáveis pela elaboração de respostas defensivas atuam mais rapidamente, quase que de imediato, como por exemplo, a SCP, a qual responde quando a ameaça é proximal, entanto que, conforme a distância do estímulo potencialmente perigoso aumenta, são recrutados circuitos mais complexos para a elaboração de estratégias defensivas que envolvem estruturas encefálicas mais recentes na escala evolutiva, como as estruturas diencefálicas, que elaboram o comportamento de fuga orientada (ULLAH et al., 2017).

A elaboração de diversas reações emocionais que estão envolvidas na integração de diferentes comportamentos induzidos por estímulos aversivos, como o “congelamento”, a luta, as reações de esquiva, a imobilidade tônica e a fuga apresentam, pois, como base os efeitos associativos de estruturas como o complexo amigdalóide (CA), a SCP, o hipotálamo, o colículo inferior (CI) e as camadas profundas do colículo superior (CS) (MOTTA e BRANDÃO, 1993; COIMBRA e BRANDÃO, 1997; BRANDÃO et al, 1999).

A informação sensorial referente a estímulos condicionados passa através do tálamo anterior até o núcleo lateral do complexo amigdalóide, gerando uma rápida resposta para um estímulo com conotação de perigo potencial. Além disso, esse núcleo recebe aferências de regiões corticais responsáveis pelo processamento e avaliação da informação sensorial (DE OCA et al.,1998). O CA liga-se com muitas estruturas envolvidas no sistema límbico e paralímbico permeado por estímulos que evocam sensações de medo. Assim, a projeção eferente do núcleo central da amígdala tem diferentes destinos: o núcleo parabraquial,

responsável pelo aumento no ritmo respiratório; o núcleo hipotalâmico lateral, responsável pela ativação do sistema nervoso simpático; o *locus coeruleus*, que aumenta a liberação de noradrenalina, em núcleos que elaboram a resposta comportamental de defesa, modulando as sensações de medo, ou no corno posterior da medula espinal, modulando a via nociceptiva ascendente; o núcleo paraventricular do hipotálamo, que causa alta liberação de adenocorticoides; a SCP, responsável das respostas comportamentais explosivas que organizam os estados defensivos, como comportamentos de imobilidade defensiva e fuga explosiva (DE OCA et al, 1998; MISSLIN, 2003; MOTTA e BRANDÃO, 1993; COIMBRA e BRANDÃO, 1997).

Muitas estruturas encefálicas que organizam o comportamento defensivo e representam um substrato neural de medo ou ansiedade têm sido aventadas através de abordagens neuroanatômicas e neurofisiológicas. Entre as estruturas envolvidas, encontram-se regiões rostrais do córtex do lobo frontal, o complexo amigdalóide, o hipocampo, a área parahipocampal, o hipotálamo, o tálamo e a substância cinzenta periaqueductal (DEL-BEN e GRAEFF, 2009). O comportamento defensivo tem sido descrito em decorrência de microinjeções de agentes antagonistas de receptores GABAérgicos a ou de inibidores da enzima ácido glutâmico descarboxilase em sítios mesencefálicos, cuja estimulação induz reações de vigilância e de imobilidade defensiva, caracterizadas por um alto grau de atenção, e fuga (BRANDÃO et al 1986, COIMBRA E BRANDÃO 1993, BORELLI et al 2005). Partindo deste pressuposto, o estudo de vias GABAérgicas e de projeção peptidérgicas opioides deve ser incluído na busca do substrato neural do medo, pânico e da ansiedade, ressaltando-se mecanismos neuroquímicos que integram as reações de defesa desencadeadas por estímulos ambientais inatos ou aprendidos que sinalizem perigo: ambientes desconhecidos, a silhueta de predadores, expressões emocionais que indiquem raiva e ameaça de ataque, o odor ou ruídos de um predador, vocalização ameaçadores de animais de uma mesma espécie na ocorrência de conflitos sociais ou de qualquer outro fator que tenha adquirido significado de advertências por precederem consistentemente a ocorrência de estímulos nocivos ou dolorosos.

Apesar do grande número de estruturas encefálicas envolvidas com o comportamento emocional, poucas são as que participam de forma tão evidente na integração dos aspectos sensoriais e motores do medo como a SCP. Existem pelo menos duas vias que regulam os comportamentos defensivos mediados por tal estrutura, onde a primeira envolve o hipotálamo e o núcleo cuneiforme, o qual medeia respostas de defesa em situações de perigo imediato e a

outra envolve o complexo amigdalóide e a parte ventrolateral da SCP, a qual medeia respostas relacionadas ao medo contextual (VIANNA et al, 2003).

Dentro deste contexto, Leite-Panissi e cols. (1999) demonstraram que a estimulação colinérgica de diferentes núcleos amigdalóides promovia reduções significativas da duração do comportamento de imobilidade em cobaias. Ainda, estudos subsequentes mostraram (LEITE-PANISSI et al., 2003) que a integridade da conexão anatômica e funcional entre o núcleo central do complexo amigdalóide (CEA) e a substância cinzenta periaquedutal ventrolateral (SCPvl) é essencial para esta modulação, desde que a exclusão reversível da SCPvl bloqueia a redução da imobilidade, obtida com estimulação colinérgica do CEA. Por sua vez, a SCP é intimamente relacionada também com a modulação da resposta de imobilidade tônica em cobaias (MONASSI et al, 1997 e 1999; MONASSI e MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2004).

1.4 Organizações Anatômica e Funcional da SCP

Um dos primeiros trabalhos que demonstraram o envolvimento da SCP na modulação de respostas defensivas foi realizado por Fernandez-de-Molina e Hunsperger em 1959. Nesta investigação, a lesão eletrolítica da SCP bloqueou os efeitos comportamentais obtidos por estimulação elétrica do complexo amigdalóide ou do hipotálamo. No entanto, a lesão destas duas últimas estruturas não alterou a resposta defensiva comportamental eliciada pela estimulação elétrica da SCP em gatos. A SCP é uma estrutura mesencefálica que contorna o aqueduto cerebral desde a porção dorsolateral do tronco encefálico até a comissura posterior onde margeia o terceiro ventrículo, no diencéfalo, e de acordo com alguns autores, a SCP apresenta quatro principais subdivisões designadas como colunas. São elas: coluna dorsomedial (SCPdm), dorsolateral (SCPdl), lateral (SCPl) e ventrolateral (SCPvl) (BANDLER et al., 1991; CARRIVE, 1993) (Figura 3). Basicamente falando, a SCP controla uma grande gama de funções e respostas comportamentais, incluindo a modulação da dor (BASBAUM e FIELDS, 1984; BEHBEHANI et al, 1990; Coimbra et al., 2006), respostas autonômicas (LOVICK, 1991), vocalização (JÜRGENS e PRATT, 1979) e diferentes padrões de comportamentos, tais como “congelamento”, fuga e luta (BANDLER e DEPAULIS, 1988), bem como a resposta de imobilidade tônica em cobaias (MONASSI et al., 1997, 1999),

levando à conclusão de diversos neurocientistas de que a SCP tem importante envolvimento na integração somática e autonômica das respostas características de reações defensivas.

Embora possam ser identificadas distintas colunas funcionais na SCP, as mesmas são interconectadas e, além dos neurônios de projeção, há uma rede intrínseca de conexões envolvidas na ativação e inibição de cada coluna. Vários estudos demonstraram que a SCP também possui conexões recíprocas com as demais estruturas do sistema encefálico de aversão, como o colículo inferior, o colículo superior (BEITZ et al., 1986; SCHENBERG et al, 2002), o hipotálamo (SHIPHEY et al, 1991) e o complexo amigdalóide (RIZVI et al., 1991; SHIPLEY et al., 1991; LEITE-PANISSI et al., 2003)

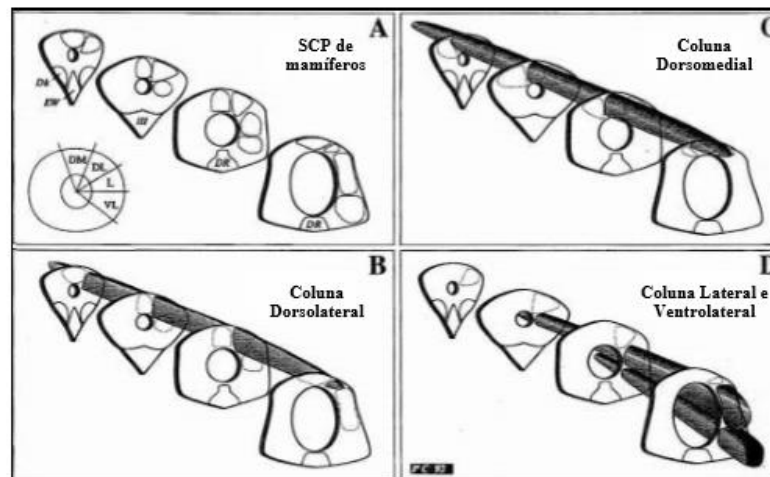


Figura 3: Divisão da substância cinzenta periaquedutal em mamíferos. DM: coluna dorsomedial, DL: coluna dorsolateral, L: coluna lateral, VL: coluna ventrolateral. (Modificado de CARRIVE, 1993.)

De acordo com Bandler e Carrive (1988), a reação de defesa é geralmente referida ao padrão comportamental e às mudanças autonômicas que ocorrem nos animais frente à situação de medo/ansiedade e a estímulos de estresse. Ainda, cada padrão comportamental pode ser eliciado em regiões específicas da SCP por meio de estimulação elétrica ou por estimulação química com aminoácidos excitatórios (BANDLER e CARRIVE, 1988; BANDLER e DEPAULIS, 1991; ZHANG et al, 1990; SCHENBERG et al, 2002). Sob um aspecto funcional, a SCP apresenta-se de maneira bem heterogênea. A coluna dorsomedial

possui neurônios que projetam seus axônios extensivamente para o tronco cerebral caudal, como o bulbo ventromedial e ventrolateral, e também para o núcleo pontino da micção (núcleo de Barrington) (BANDLER et al, 1991). Já a coluna lateral, projeta-se para o bulbo e recebe densas aferências do núcleo espinhal do nervo trigêmeo, bem como do hipotálamo anterior, do núcleo pré-óptico medial e do núcleo central do complexo amigdalóide (BANDLER & TORK, 1987; BANDLER et al, 1991). Enquanto nas situações de caça predatória ocorre um aumento da expressão de proteína Fos (COMOLI et al, 2003), a estimulação da SCPI também produz aumento da atividade somatomotora e autonômica simpática característica do comportamento de defesa (BANDLER & DEPAULIS, 1991). Com relação à coluna ventrolateral da SCP, a estimulação desta região, através da microinjeção de aminoácidos excitatórios, causa um efeito oposto àquele observado na SCPI, ou seja, hipotensão, bradicardia e cessação das atividades em curso, diminuindo a reatividade do animal a estímulos ambientais. Em adição, a SCPvl seria responsável, ainda, pela analgesia mediada por opioides endógenos, conhecida como antinocicepção induzida pelo medo.

1.5 Antinocicepção induzida pelo medo

A dor é uma experiência sensorial de aspecto particular para cada indivíduo, podendo ser influenciada por fatores afetivos, emocionais, sensoriais, interpretativos e comportamentais (CALVINO e GRILO, 2006). Dentre os diversos sistemas neurais ascendentes, o sensorial geral tem a função de informar o cérebro sobre o estado do ambiente externo e interno do corpo, e informar com uma resposta de dor, quando alguma estrutura apresentar dano real ou potencial. Enquanto na modalidade de percepção o sistema sensorial constitui um sistema de alarme que tem o papel de proteger o organismo de uma lesão tecidual, através da ativação de mecanismos que envolvem vias reflexas espinhais e supra-espinhais (DRAY, 1995; JULIUS e BASBAUM, 2001; LE BARS et al., 2001). Logo, temos como principal função fisiológica da dor, a proteção do organismo, sinalizando aos centros nervosos superiores as lesões ao organismo inflingidas. A este sinal, o organismo responde de modo a preservar sua integridade física. Alterações nos níveis de integração da resposta a um estímulo nociceptivo podem aumentar a duração e a intensidade da dor e, nesse caso, a dor deixa de exercer sua função protetora e passa a ser a própria patologia, representando severa

agressão e influenciando o comportamento e comprometendo a qualidade de vida do indivíduo.

O controle da dor persistente é ainda sério problema para uma parcela importante da população, podendo provocar no indivíduo prejuízo cognitivo, incapacidade de raciocínio lógico e de tomada de decisões (NEUGEBAUER et al., 2009). Em 1979, Merskey definiu a dor como sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial”. Esta definição foi então adotada pela “International Association for the Study of Pain” (IASP) e permanece até os dias atuais. No contexto da dor, algumas modalidades são direcionadas, estas dependendo da origem do estímulo que causa a sensação e dos mecanismos relacionados à sua percepção pelo organismo, podendo ser classificada como funcional (COSTIGAN; SCHOLZ 2009), neuropática, inflamatória e nociceptiva.

A dor funcional ocorre devido a uma disfunção do sistema somatossensorial e pode se manifestar mesmo quando não há um motivo aparente (COSTIGAN; SCHOLZ 2009). A dor neuropática se manifesta a partir de patologias oriundas de danos ou disfunções no sistema nervoso central (SNC) ou periférico (SCHOLZ, 2002). A dor inflamatória ocorre em função da ação de mediadores que atuam diretamente na atividade de nociceptores, como a bradicinina, histamina e serotonina, ou que influenciam indiretamente na sensibilização do sistema nervoso somatossensorial. Por sua vez, a dor nociceptiva é um produto da estimulação nociva de terminais periféricos de fibras nociceptivas, com consequente atuação de receptores e canais iônicos específicos e sensíveis ao calor, frio, perturbação mecânica ou prótons. Essas fibras transmitem a informação nociceptiva através de sinais elétricos ao longo da medula espinal até o córtex cerebral, onde a sensação dolorosa é processada e experimentada.

Com relação à duração da dor, são muito utilizados pela literatura os termos transitórios, agudos ou crônicos. Tanto na dor transitória como na dor aguda, a causa é bem definida e o curso temporal de ambas é muito bem delimitado, podendo desaparecer antes mesmo da remoção da causa ou reparo do dano tecidual. Entretanto, a dor crônica é geralmente causada por lesões ou doenças que superam a capacidade do organismo de reverter o quadro, podendo persistir até mesmo após o desaparecimento do trauma inicial, estendendo-se por meses ou anos e comprometendo a qualidade de vida do indivíduo (ASHBURN e STAATS, 1999). Podemos destacar, ainda, alterações adaptativas, como neuroplasticidade, em diferentes níveis do sistema nervoso, tais como sensibilização, perda do

controle inibitório da dor, reorganização do circuito neuronal do corno dorsal da medula espinal e alterações na facilitação e na inibição descendente da dor. Tendo em vista que estes eventos são dependentes da intensidade e duração do estímulo doloroso, quanto mais persistente, mais difícil se torna o tratamento do quadro patológico (BESSON, 1999).

Tanto a dor aguda, quanto a dor crônica estão frequentemente associadas a processos inflamatórios, como resultado da lesão tecidual, reatividade imunológica anormal ou lesão nervosa (STEIN et al., 2003). Na dor crônica, em particular, muitas alterações ocorrem em associação com os eventos básicos da nocicepção, que modificam a relação entre o estímulo e a resposta nociceptiva, afetando a modulação do estado doloroso resultante. Além disso, alterações centrais crônicas na neuroquímica da sinalização da dor produzem hipersensibilidade, aumentando a frequência e a duração dos impulsos aferentes. Contudo, mudanças estruturais secundárias à lesão nervosa periférica incluem a perda de interneurônios espinais, rearranjos não apropriados de processos neurais aferentes à medula espinal e a proliferação de fibras simpáticas no gânglio sensorial. Essas mudanças não são uniformes e dependem do tipo de lesão tecidual, do envolvimento de tipos específicos de fibras e da participação do sistema imunológico (DRAY et al., 1994; WATKINS e MAIER, 2002; DOGRUL et al., 2003). Outro aspecto que dificulta o desenvolvimento de terapias racionais e efetivas para o tratamento de processos dolorosos crônicos é a falta de conhecimento do quanto os mecanismos envolvidos diferem daqueles implicados na dor aguda (ALEY et al., 2000).

Apesar de a dor ser uma das sensações mais importantes para a manutenção da vida de muitos animais, quando esses são confrontados com ameaças ao seu bem estar, à integridade física ou à sobrevivência, além de exibirem respostas comportamentais (fuga, luta, “congelamento”, vocalização) e neurovegetativas (taquicardia, hipertensão e defecação), normalmente apresentam diminuição da sensibilidade dolorosa ou antinocicepção (KELLY, 1986; RODGERS, 1995). Uma vez que os estímulos nociceptivo normalmente promovem um conjunto de reflexos de retirada, fuga, repouso e outros comportamentos recuperativos, mediante situações aversivas, a antinocicepção apresenta claro valor adaptativo, pois permite ao animal exibir reações defensivas tais como “congelamento”, luta e fuga, mesmo que uma injúria tenha ocorrido, aumentando, assim, suas chances de sobrevivência (BOLLES; FANSELOW, 1980).

1.5.1 Mediação Serotoninérgica

Em 1948, um estudo realizado para identificar uma substância vasoconstritora presente no soro do boi, feito por Rapport e colaboradores, tiveram como resultado a serotonina (5-HT), onde quatro anos depois, um estudo realizado pelo grupo de Espamer & Asero (1952) veio a caracterizar tal substância, através de observações de que a mesma estava presente em diversos tecidos. Contudo, sua conotação com distúrbios mentais foi identificada apenas nos anos seguintes por Gaddum, em 1953, e a identificação de neurônios serotoninérgicos apenas foi realizada anos depois, através da técnica de fluorescência histoquímica de Falck-Hillarp. Desde tal identificação, este neurotransmissor tem sido relacionado com várias funções, como a percepção da dor, a regulação visceral, os distúrbios psiquiátricos e com o controle motor (GRAEFF, 1997).

Vários estudos apontam que o sistema serotoninérgico apresenta controle em diversas funções orgânicas, como na regulação cardiovascular, na termorregulação, no ciclo sono-vigília, no comportamento sexual e reprodução, bem como outras funções, como a dor (ALBINSSON et al, 1996). Algumas estruturas do SNC, como a SCP, o hipotálamo, o complexo amigdalóide e os colículos superior e inferior, medeiam os estados aversivos no cérebro e foram relacionadas com a modulação da dor e, atualmente, vem sendo dada atenção especial ao estudo dessas áreas encefálicas e ao envolvimento de mecanismos serotoninérgicos dessas estruturas com o medo e a antinocicepção.

Os neurônios serotoninérgicos são encontrados em grande quantidade no mesencéfalo (COIMBRA et al., 2006), ponte e bulbo, e apresentam-se em maior profusão na zona paramediana dos núcleos da rafe (Figura 4) (BEAR et al., 2001). De forma interessante, muitas evidências referentes ao efeito analgésico da serotonina são derivadas de estudos sobre a analgesia induzida pela morfina, os quais determinaram a existência de uma consistente ligação entre serotonina e opioides. Sabe-se que a serotonina está envolvida em ambos os sistemas analgésicos, o dorsal e o ventral da SCP (NICHOLS et al., 1989). A destruição do NMgR ou das vias descendentes para a medula espinhal bloqueia os efeitos da estimulação da SCP. Como o NMgR é rico em neurônios serotoninérgicos, drogas que bloqueiam os receptores 5-HT ou diminuem sua síntese inibem a analgesia induzida pela estimulação elétrica ou química da SCP (DE OLIVEIRA et al., 2017).

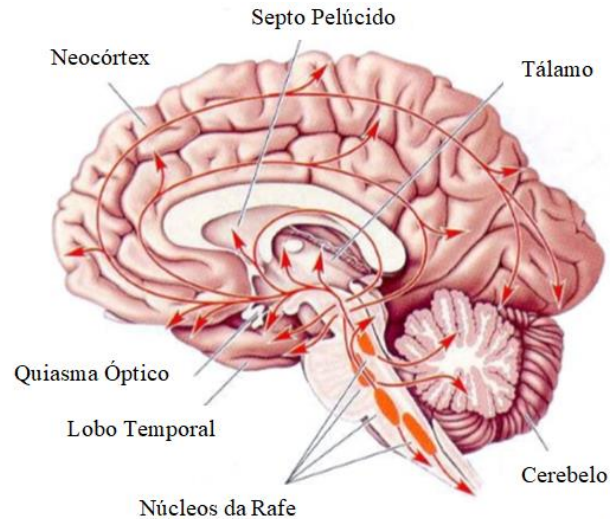


Figura 4: Sistema Serotoninérgico com projeção difusa, originados dos núcleos da rafe, distribuídos em todo o eixo mediano do tronco encefálico.

Vários trabalhos têm demonstrado a participação dos receptores do tipo 5HT_{2A} no comportamento defensivo de animais. Schütz, Aguiar e Graeff (1985) verificaram que, na SCPd, a microinjeção de serotonina, aumentava o limiar de resposta a um estímulo aversivo que induzia comportamento de fuga em ratos. Essas evidências sugerem fortemente que os diferentes efeitos antiaversivos ou aversivos podem ser mais bem explicados não pela quantidade, mas sim pela interação da serotonina com os seus receptores. É importante lembrar que existem pelo menos sete famílias de receptores de 5-HT, que apresentam funções diferentes dependendo da sua expressão e localização. Os receptores mais estudados na fisiopatologia dos transtornos de ansiedade são o 5-HT_{1A} e o 5HT_{2A}.

1.5.2 Mediação Opioidérgica

O sistema opioide é constituído por três tipos de receptores, denominados como mu-opioide (μ -OR), kappa-opioide (κ -OR) e delta-opioide (δ -OR). Essas proteínas de membrana operam no SNC, controlando funções autonômicas, neuroendócrinas, emocionais, a resposta imunológica, e atuam no controle da nocicepção (BODNAR, 2007; COIMBRA et al., 2017). Além da ação no SNC, esses receptores integram um sistema de controle endógeno da dor no

nível periférico e podem, assim, ser encontrados em distintos estratos do sistema nervoso (STEIN; SCHAFER; MASHELSKA, 2003; OSAKI et al., 2003). Os receptores opioides estão amplamente localizados no córtex frontal e parietal, no complexo amigdalóide, hipocampo, corpo estriado, tálamo, SCP, núcleo dorsal da rafe, substância gelatinosa e lâminas I e II da medula espinal, e no núcleo espinal do nervo trigêmeo, áreas envolvidas de alguma forma com a dor e o medo (MILLAN, 2002; DA SILVA et al., 2018; DA SILVA SOARES Jr. et al., 2019). Vários trabalhos confirmaram a participação dos opioides endógenos na modulação da antinocicepção. Um exemplo clássico é que a antinocicepção produzida pela administração de morfina na SCP pode ser parcialmente bloqueada pela naloxona (antagonista opioide) (WATKINS, 1982; KIYATKIN, 1989; NICHOLS; THORN; BERNTSON, 1989).

Efetivamente, o sistema de inibição da dor parece depender, pelo menos em parte, dos opioides endógenos. Evidências que apoiam essa ideia derivam de estudos demonstrando que a SCPvl é especialmente sensível aos efeitos analgésicos da microinjeção da morfina, a analgesia produzida pela estimulação elétrica da SCPvl é atenuada pela administração de um antagonista opioide, como a naloxona, e o desenvolvimento de tolerância à analgesia pode ser decorrente da estimulação elétrica e da administração da morfina na SCPvl (MORGAN; LIEBESKIND, 1987; BUDAI; FIELDS, 1998). Assim, as substâncias endógenas com propriedades analgésicas, que atuam no SNC, ativam os sistemas descendentes que, por sua vez, suprimem as respostas ao estímulo nocivo nos neurônios da medula espinal.

As substâncias analgésicas ativam esse sistema por se ligarem aos receptores opioides na SCP. Em 1982, Abbott e colaboradores observaram que lesões na SCP, no NMgR ou no funículo dorsolateral atenuavam os efeitos analgésicos da administração sistêmica da morfina. Morgan; DePaulis; Liebeskind (1985) confirmaram que a antinocicepção produzida pela estimulação elétrica da SCP tanto nos sítios onde não se observava alteração comportamental, como nos sítios onde o efeito antinociceptivo seguia a eliciação de reações comportamentais. Esses estudos demonstraram que a antinocicepção era produzida em toda extensão da SCP ventral e que a antinocicepção acompanhada de aversão era produzida nas colunas dorsal e dorsolateral da SCP, como também já foi demonstrado por nossa equipe (COIMBRA et al., 1992, 2006).

1.6 A ciência por trás do controle do medo e da ansiedade

Atualmente, as investigações direcionadas ao controle central do medo é o objeto de estudo da maioria das pesquisas que investigam a neurobiologia dos distúrbios de ansiedade (CRIPPA et al., 2004; KARTALCI et al., 2001; WILENT et al., 2010; BIAGIONI et al., 2012; CANTERAS et al., 2012 (REVISÃO); EICHENBERGER et al., 2002; et al., 2000; COIMBRA E BRANDÃO, 1993; GRAEFF E DEL-BEN, 2008 (REVISÃO); RESSTEL E COLS., 2009; ZANOVELI et al., 2010). Além disso, há pesquisas que visam investigar a respeito da integração entre os sistemas que elaboram as respostas de medo e os processos antinociceptivos, onde é sugerido que há uma sobreposição entre as estruturas encefálicas que elaboram essas reações (CASTILHO et al., 1999; CASTILHO E BRANDÃO, 2001), onde a SCP, uma das estruturas mais importantes para a elaboração dos processos antinociceptivos e das respostas comportamentais defensivas relacionadas ao medo apresentam-se intimamente envolvidas (COIMBRA et al., 1992, 2006). A percepção da dor pode ter seu limiar elevado, quando as respostas de pânico são induzidas no animal (BIAGIONI et al, 2012).

Temos como verdade que várias substâncias neurotransmissoras têm sido implicadas na mediação ou na modulação da expressão do comportamento defensivo, como por exemplo, a serotonina (5-HT) (DE BORTOLI et al, 2006) e os peptídeos opióides endógenos (EICHENBERGER et al., 2002; OSAKI et al., 2003). Drogas da classe dos inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRS) que aumentam os níveis extracelulares de 5-HT, inibem comportamentos defensivos relacionados ao pânico, ou seja, a fuga ou “congelamento”. Porém, não levam a alterações no sistema opioidérgico, que é o responsável para modulação e recepção da dor (DE BORTOLI et al, 2006; POLTRONIERI et al, 2003; ZANOVELI et al., 2005; 2010). Este sistema também é responsável pela modulação de respostas defensivas (COIMBRA et al., 2000, 2017) antinociceptiva (COIMBRA e al., 2017), pois a administração de naloxona ou de naltrexona, antagonistas não seletivos de receptores opioides, é capaz de reverter a resposta antinociceptiva induzida pelo medo inato (COIMBRA et al., 2017), e aumentar os limiares da resposta defensiva frente a predadores (COIMBRA et al., 2017; CALVO et al., 2018). Além disso, levando em consideração que, em modelos animais de ataque do pânico, o animal apresenta uma exuberante resposta de fuga e de “congelamento”, o tratamento crônico com ISRS, como a paroxetina, pode diminuir as

respostas defensivas, como recentemente demonstrado (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018) sem alterar a resposta nociceptiva.

Tendo em vista que o tratamento crônico com uma droga ISRS, como a fluoxetina, elevou o limiar de imobilidade defensiva, mas não o de fuga, eliciados por estimulação elétrica da SCP (BORELLI et al., 2004), a resposta de imobilidade defensiva pode ser considerada um modelo de ataques de pânico, sendo essa resposta mais semelhante às reações comportamentais que seres humanos evocam na síndrome do pânico. Interação entre os sistemas opioide e serotoninérgico da SCP também parece exercer um papel relevante na modulação do comportamento de defesa, como já foi relatado na literatura (RONCON et al., 2015), e tendo como evidências as informações descritas acima, a hipótese do presente projeto foi de que os sinergismos entre os inibidores seletivos da receptação de serotonina e os antagonistas de receptores opioides poderiam reduzir tanto a resposta comportamental defensiva quanto a antinocicepção induzida pelo medo.

2. OBJETIVO

2. Objetivo Geral

Estudar o sinergismo entre um inibidor da recepção de serotonina e um antagonista opioide nas respostas comportamentais defensivas e na antinocicepção induzida pelo medo, elaboradas pela substância cinzenta periaquedutal ventrolateral.

2.1 Objetivos Específicos

Avaliar a resposta comportamental de imobilidade defensiva e do efeito antinociceptivo após a microinjeção de três diferentes doses, (0,1 nmol, 0,3 nmol e 0,6 nmol) de NMDA na coluna ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal de ratos;

Estudar o efeito do tratamento crônico, por via intraperitoneal (i.p.), com paroxetina em diferentes doses (10 mg/kg ou 20 mg/kg e 40 mg/kg) na resposta comportamental defensiva de imobilidade e na antinocicepção induzida pela estimulação química da coluna ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal de ratos;

Estudar os efeitos do tratamento com um antagonista opioide na SCPvl sobre as respostas comportamentais defensivas de imobilidade e antinocicepção induzida pelo medo;

Estudar o efeito da microinjeção de naltrexona (26 nmol; SCPvl) nas respostas comportamentais defensivas e na antinocicepção induzidas pela estimulação química da SCPvl utilizando NMDA em ratos pré-tratados cronicamente com paroxetina na dose mais eficaz.

3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3. Procedimentos Experimentais

3.1 Animais

Foram utilizados 344 ratos, Wistar (*Rattus norvegicus*, *Rodentia*, *Muridae*), machos, pesando entre 150-350g, provenientes do Biotério Central do Campus Ribeirão Preto/USP. Esses animais foram colocados em a cada quatro caixas, e ficaram acondicionados sob ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes ligadas às 7h), e com temperatura entre 22-23°C, sendo-lhes permitido livre acesso à comida e água, durante todo o experimento. Os experimentos foram realizados segundo os princípios éticos elaborados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (CETEA), que estão em conformidade com os princípios éticos Comissão Nacional de Ética em Experimentação Animal (CONCEA) protocolo sobre registro 242/2017.

3.2 Drogas

Os animais foram gentilmente envolvidos em uma flanela, facilitando a administração das drogas. Foram utilizados nos experimentos, antagonistas opióides (Naltrexona, 26 nmol, ANSELONI et al, 1999), inibidores seletivos da recaptção de serotonina (Paroxetina, 10, 20 e 40 mg, ANNERBRINK et al 2010), e para estimulação central, foi utilizado NMDA (N-metil-D-aspartato), nas doses de 0,1, 0,3 e 0,6 nmol (curva dose-efeito) na SCPvl. As drogas naltrexona e NMDA, foram dissolvidas em salina fisiológica, utilizando-se um volume de 2 mL para administração por via i.p. e de 0,2µL para microinjeção na SCPvl, respectivamente. A paroxetina foi dissolvida em salina contendo 2% de *TWEEN* 80.

3.3 Procedimento cirúrgico

Os animais (N=8/ grupo) foram anestesiados, por via intramuscular com uma solução anestésica contendo cetamina na dose de 100mg/kg (Ketamina®) e xilasina na

dose de 10mg/kg (Dopaser®) e posicionados no aparelho estereotaxica (David Kopf, EUA), fixados pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Posteriormente foi realizada a tricotomia da região superior da calota craniana. Após, foi administrado antes da exposição da calota craniana a solução de lidocaína a 2% (0,1mL, s.c.), anestesiando a pele e tecido subcutâneo para remoção. Posteriormente projeção da calota craniana, foi realizada assepsia local para obter a visualização do bregma e lambda, possibilitando assim o posicionamento do aparelho estereotaxica para obtenção das coordenadas para alocação da cânula-guia, esta confeccionada a partir de agulhas de injeção hipodérmica (diâmetro externo = 0,6mm; diâmetro interno = 0,4mm; tamanho = 14 mm).

A incisão da calota foi realizada com broca odontológica acoplada a um motor elétrico, permitindo assim o acoplamento de dois parafusos, que serviram de apoio para o capacete de acrílico, e uma incisão completa onde foi implantada, no mesencéfalo e direcionada para a SCPvl, segundo coordenadas AP = -7,8 mm, ML = 0,8 mm, e DV= 6,4 mm de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2007) a cânula guia, esta novamente posicionada 1 mm antes de atingir a estrutura de estudo (Figura 5).

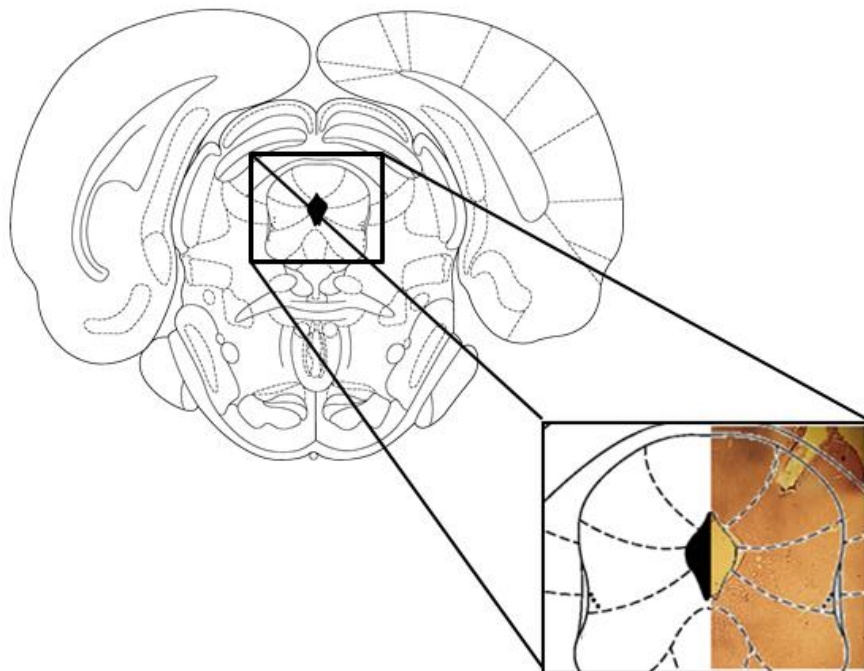


Figura 5: Figura nas coordenadas AP = -7,8 mm, ML = 0,8 mm, e DV= 6,4, do atlas Paxinos e Watson, junto à lâmina.

Depois de implantada, a cânula-guia e os parafusos de apoio, foram fixados na calota craniana uma prótese de acrílico autopolimerizável. Após a cirurgia, 60.000U.I. de penicilina G benzatina foram injetados, por via intramuscular, em cada animal (BIAGIONI et al, 2013) e 2,5m/kg do analgésico e anti-inflamatório não esteroidal flunixin meglumine (banamine®).

3.4 Microinjeção das Drogas intramesencefálicas

A aplicação das drogas Naltrexona e NMDA, foi realizada com o auxílio de uma seringa Hamilton (10.0µl), esta conectada a uma agulha dental (Mizzi, USA) de 15 mm de comprimento e 0,3 mm de diâmetro externo por meio de um segmento de polietileno (PE 10) de média de 30 cm. Por ser 1 mm maior que a cânula guia, permitiu a administração da droga na estrutura de estudo. Todas as soluções foram injetadas em um volume de 0,2 µl.

Para a realização da microinjeção na SCPvl, a agulha de injeção e parte do polietileno foram preenchidos com a droga utilizada no momento, NMDA ou Naltrexona, e a outra parte do polietileno, juntamente com a microseringa, com água destilada tendo uma pequena bolha de ar separando os dois líquidos, A microinjeção foi efetuada durante um período de 1 minuto, onde a agulha permanece no local de administração por este período, para evitar refluxo das soluções injetadas durante sua retirada.

3.5 Teste Nociceptivo

Todos os animais tiveram seus limiares nociceptivos aferidos, utilizando-se para o isso o teste de retirada de cauda (tail-flick), que visa avaliar a nocicepção térmica através de uma fonte de calor como uma resistência elétrica, esta com regulagem de velocidade de aquecimento, bem como com desarme aos 6 segundos de aquecimento, permitindo assim um respaldo para não gerar lesões na cauda dos animais. O propósito junto ao tail-flick é de se obterem três latências consecutivas de retirada de cauda entre 2,5 s e 3,5 s de estímulo, formando assim pela média dos valores encontrados, em um intervalos de 5 min. O limiar nociceptivo foi igualmente aferido, de 5-5 min, iniciando-se 5 minutos após a microinjeção de NMDA ou salina na SCPvl, durante de 30 minutos.

3.6 Experimentos

3.6.1 Estudo da curva dose resposta de NMDA frente às respostas comportamentais e antinociceptivas

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica descrita no item 3.3 para implante da cânula-guia na SCPvl. Seguido o procedimento cirúrgico, os animais foram resguardados com livre acesso a água e comida, associados a um período de repouso por 5 dias, considerado pós operatório. Seguindo este tempo os animais foram submetidos à análise do comportamento de defesa (número e duração da imobilidade defensiva) e resposta antinociceptiva, tal análise constou com a estimulação química da SCPvl com a microinjeção de NMDA (0,1 nmol, 0,3 nmol ou 0,6 nmol) ou salina (NaCl a 0,9%).

Durante a análise comportamental, os animais foram alocados em uma arena constituída de base vidro temperado, sobre qual estavam delimitados dois círculos concêntricos, bem como também estava delimitado 12 divisões semelhantes (Figura 6) local o qual foi observado suas reações defensivas. Ao término da expressão das respostas comportamentais os animais foram submetidos à avaliação do limiar nociceptivo, como descrito no item 3.5.

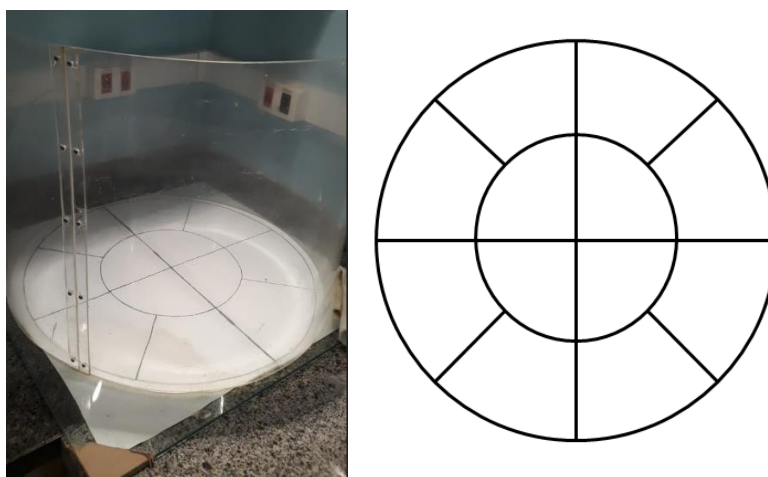


Figura 6: Arena de estimulação e sua respectiva esquematização, utilizada para observação das reações defensivas.

3.6.2 Estudo farmacológico do tratamento com um inibidor seletivo da recaptação de serotonina sobre as respostas comportamentais defensivas de imobilidade e a antinociceção para seleção da dose mais eficaz

Os animais foram submetidos a cirurgia estereotaxica descrita no item 3.3 para implante da cânula-guia na SCPvl. Seguido o procedimento cirúrgico, os animais foram resguardados com livre acesso a agua e comida, associados a um período de repouso por 5 dias, considerado pós operatório. Tal procedimento foi realizado associado o tratamento crônico (administração por 21 dias) de paroxetina nas doses de 10, 20 e 40 mg ou salina (NaCl a 0,9%) intraperitoneal (I.P.). Seguindo estes processos, os animais foram submetidos à análise do comportamento de defesa (número e duração da imobilidade defensiva) e antinociceptivo, tal analise constou com a estimulação química da SCPvl com a microinjeção de NMDA, na dose de 0,6 nmol ou salina. Durante a analise comportamental, os animais foram alocados em uma arena como já descrita no item anterior. Ao término da expressão das respostas comportamentais os animais foram submetidos à avaliação do limiar nociceptivo, como descrito no item 3.5.

3.6.3 Estudo farmacológico da interação de um antagonista opióide sobre as respostas comportamentais defensivas de imobilidade e a antinociceção eliciadas com a microinjeção de NMDA na dose de 0,6 nmol

Os animais foram submetidos a cirurgia estereotaxica descrita no item 3.3 para implante da cânula-guia na SCPvl. Seguido o procedimento cirúrgico, os animais foram resguardados com livre acesso a agua e comida, associados a um período de repouso por 5 dias, considerado pós operatório. Seguindo estes processos, os animais foram submetidos à análise do comportamento de defesa (número e duração da imobilidade defensiva) e antinociceptivo, tal analise constou com a estimulação química da SCPvl com a microinjeção de NMDA, na dose de 0,6 nmol ou salina posteriormente da administração de naltrexona na dose de 26 nmol centralmente (SCPvl) ou salina, todas na concentração de 0,2µL. Durante a analise comportamental, os animais foram alocados em uma arena como já descrita no item anterior. Ao término da expressão das respostas comportamentais os animais foram submetidos à avaliação do limiar nociceptivo, como descrito no item 3.5.

3.6.4 Estudo farmacológico do tratamento com um inibidor da recaptação de serotonina e um antagonista opióide sobre as respostas comportamentais defensivas de imobilidade e a antinociceção para seleção da dose mais eficaz

Os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica descrita no item 3.3 para implante da cânula-guia na SCPvl. Seguido o procedimento cirúrgico, os animais foram resguardados com livre acesso a água e comida, associados a um período de repouso por 5 dias, considerado pós operatório. Tal procedimento foi realizado associado o tratamento crônico (administração por 21 dias) de paroxetina nas doses de 10 mg ou salina (NaCl a 0,9%) intraperitoneal (I.P.). Seguindo estes processos, os animais foram submetidos à análise do comportamento de defesa (número e duração da imobilidade defensiva) e antinociceptivo. Neste momento, 30 minutos antes da estimulação química da SCPvl com a microinjeção de NMDA, na dose de 0,6 nmol ou salina, foi administrado Naltrexona na dose de 26 nmol na SCPvl, este um antagonista opióide. Durante a análise comportamental, os animais foram alocados em uma arena como já descrita no item anterior. Ao término da expressão das respostas comportamentais os animais foram submetidos à avaliação do limiar nociceptivo, como descrito no item 3.5.

3.7 Histologia

Ao término dos experimentos os animais foram anestesiados com uma solução de uretana (1,2 mg/kg) e perfundidos através do cardíaco ventrículo esquerdo com solução de NaCl a 0,9%, em volume suficiente para retirar todo o sangue do animal, seguida de solução tamponada de paraformaldeído a 4%, em volume suficiente para fixar os tecidos. Os encéfalos foram retirados e mantidos no fixador por no mínimo 4 horas, após o que foram congelados e cortados com o auxílio de um criostato (HM 505 E – MICROM, ZEISS) em fatias de 40 µm de espessura.

Os cortes foram montados em lâminas de vidro, gelatinizadas, secos ao ar e corados com hematoxilina-eosina (HE) por meio de um sistema robotizado de coloração de lâminas (AUTOSTAINER LX, Leica, Alemanha). Posteriormente, os cortes foram analisados com o auxílio de microscopia de luz e a posição das pontas das agulhas de microinjeção do

neuroeixo foi assinalada em anagramas do atlas de Paxinos e Watson (2007). Somente animais com a presença de sinais de microinjeções dentro da SCPvl foram incluídos na análise estatística.

3.8 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística pelo programa GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software Inc., California, USA). Os resultados foram expressos como média +/- erro padrão da média e submetidos à análise de variância de uma via e o teste *post hoc* de Newman-Keuls nos experimentos de análise da dose mais eficaz de NMDA para evocação dos estímulos comportamentais. A avaliação dos resultados antinociceptivos foi realizada com o teste de *post hoc* de Duncan. Os demais experimentos replicados com os testes citados acima teve objetivo de avaliar a análise da melhor dose efeito do tratamento crônico com paroxetina nos comportamentos defensivos relacionados à imobilidade e antinocicepção. A análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*), seguida, quando apropriado, pelo teste de *post-hoc* de Bonferroni e pelo teste *post hoc* de Newman-Keul para avaliação das respostas comportamentais e antinociceptivas nos demais experimentos.

4. RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Análise da dose mais eficaz de NMDA para evocação de estímulos comportamentais defensivos e antinociceptivo elaborados pela SCPvl.

Comportamentos Defensivos:

A ativação dos receptores de NMDA está predominantemente associada às ativações prolongadas, e exercem o desenvolvimento da hipersensibilidade central, devido ao influxo de cálcio nos neurônios, onde é possível identificar nas análises e experimentos a efetivação e ativação das estruturas avaliadas.

A análise estatística do presente experimento, realizado de uma via ANOVA mostrou que a estimulação química realizada com a microinjeção de NMDA na SCPvl induziu a resposta comportamental defensiva de imobilidade e alteração do limiar nociceptivo. O teste post hoc de Newman-Keuls mostrou um aumento na frequência ($F_{(3,28)} = 61,45$; $p < 0,001$) e na duração ($F_{(3,28)} = 98,24$; $p < 0,001$) da imobilidade defensiva nos grupos tratados com 0,3 nmol e 0,6 nmol de NMDA quando comparados com os grupos tratados com salina e NMDA (0,1 nmol), como mostrado na figura 7.

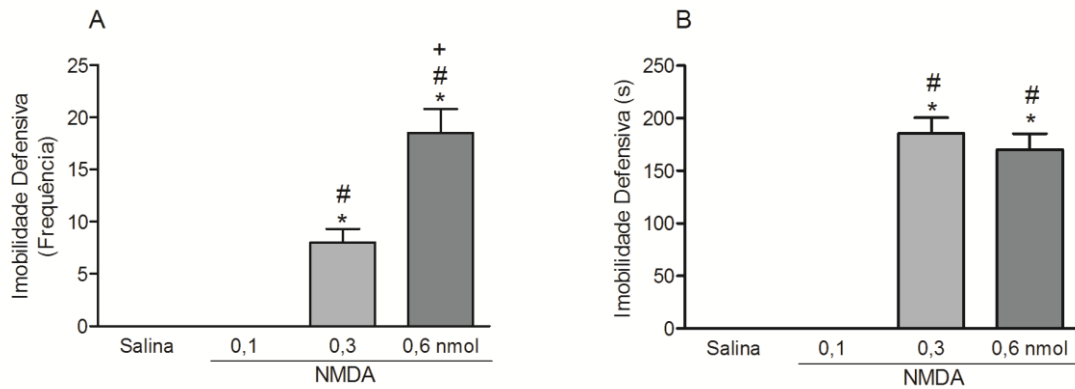


Figura 7: Efeito da estimulação química da SCPvl com a microinjeção de NMDA, nas doses de 0,1, 0,3 e 0,6 nmol, ou salina fisiológica na resposta comportamental de imobilidade defensiva. * $P < 0,001$, comparado com o grupo controle (salina); # $P < 0,001$, quando comparado com o grupo tratado com 0,1 nmol de NMDA de acordo com a análise de variância de uma via (one-way ANOVA), seguida pelo teste post hoc de Newman-Keuls. As colunas representam a média \pm o erro padrão da média. $N=8$.

Resposta Antinociceptiva:

A análise de variância de medidas repetidas mostrou um efeito estatisticamente significativo no tratamento com NMDA na SCPvl sob o limiar nociceptivo até 5 minutos após o término da expressão da resposta defensiva.

Houve um efeito estatisticamente significativo no tratamento ($F_{(3,28)} = 5,6$; $p < 0,01$), do tempo ($F_{(7,22)} = 9,34$; $p < 0,001$) e da interação tratamento versus tempo ($F_{(21,62)} = 7,21$; $p < 0,001$). O teste post hoc de Duncan mostrou que a estimulação química da SCPvl com NMDA nas doses de 0,3 nmol e 0,6 nmol aumentou o limiar nociceptivo ($F_{(3,28)} = 12,75$; $p < 0,001$) com relação ao grupo controle e o grupo tratado com NMDA na dose de 0,1 nmol (Figura 8).

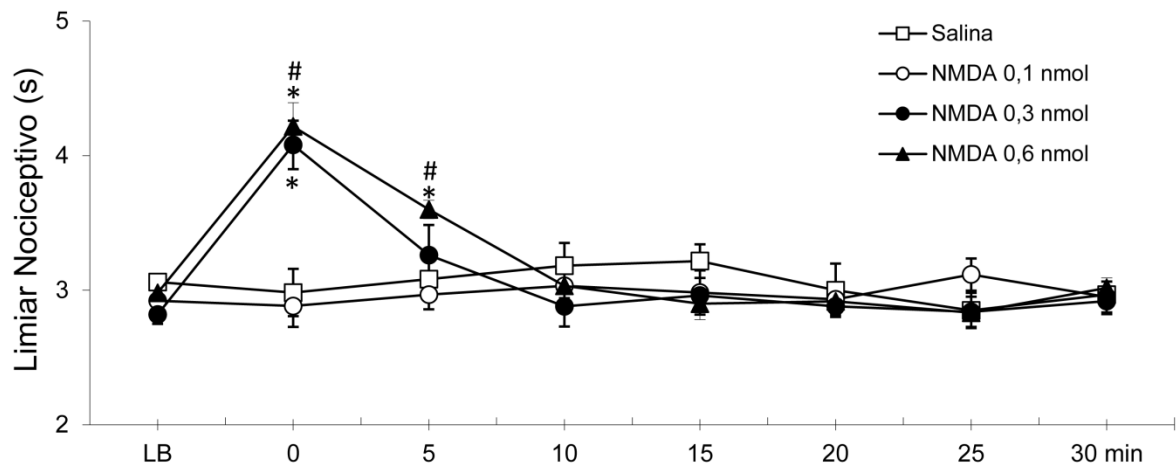


Figura 8: Efeito da estimulação química da SCPvl com a microinjeção de NMDA, nas doses de 0,1, 0,3 e 0,6 nmol, ou de salina fisiológica sobre o limiar nociceptivo. N= 8; * P < 0,001 quando comparado com o grupo controle (salina); # P < 0,001 comparado com NMDA na dose de 0,1 nmol, segundo a análise de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste post hoc de Duncan. LB: Linha de base do teste de retirada de cauda, medida antes do procedimento experimental. Eixo x: tempo (em minutos) em que medidas consecutivas da latência de retirada de cauda foram tomadas. Eixo y: Limiar Nociceptivo (aferido em segundos). Elevações nos limiares nociceptivos foram representados como médias \pm EPM.

4.2 Análise da melhor dose-efeito do tratamento crônico com paroxetina nos comportamentos defensivos relacionados à imobilidade e na antinocicepção induzida pelo medo

Comportamento Defensivo:

A estimulação química da SCPvl com NMDA na dose mais efetiva de 0,6 nmol foi capaz de eliciar as respostas comportamentais defensivas de imobilidade e antinocicepção, tais resultados observados pela análise estatística de uma via.

Quando associado o uso do ISRS, o teste post hoc de Newman-Keuls mostrou um aumento na frequência ($F_{(3,27)} = 14,25$; $p < 0,001$) e na duração ($F_{(3,27)} = 20,39$; $p < 0,001$) da imobilidade defensiva nos grupos tratados com veículo (i.p.) + NMDA (SCPvl), com PRX 10 mg/kg (i.p.) + NMDA (SCPvl) e com PRX 20 mg/kg (i.p.) + NMDA (SCPvl) quando comparados com o grupo controle, veículo (i.p.) + salina (SCPvl). O tratamento crônico com PRX nas doses de 10 mg/kg e 20 mg/kg seguido pela microinjeção de NMDA (SCPvl) não alterou nem a frequência ($F_{(3,27)} = 14,25$; $p > 0,05$), nem a duração ($F_{(3,27)} = 20,39$; $p > 0,05$) da imobilidade defensiva, como mostrado na figura 9.

Dentre os animais tratados nos grupos experimentais, os que receberam a dose de 40 mg/kg não obtiveram resultado devido sua amostra ser relativamente pequena, devido ao sofrimento por desnutrição devido o aumento da motilidade intestinal.

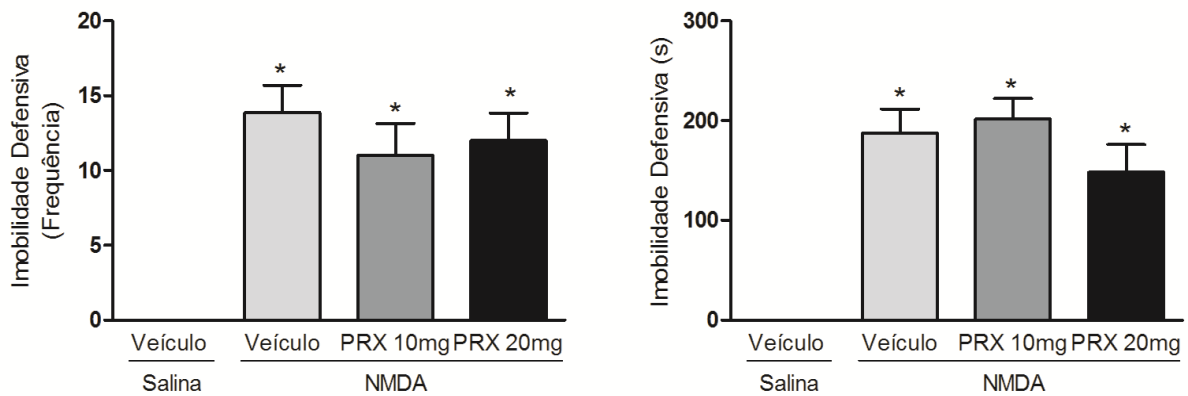


Figura 9: Ausência de efeito do tratamento crônico com paroxetina (PRX, 10 mg/kg e 20 mg/kg; i.p.) ou veículo na resposta comportamental de imobilidade defensiva induzida pela estimulação química da SCPvl com a microinjeção de NMDA (0,6 nmol) ou salina fisiológica. * $P < 0,001$, comparado com o grupo controle [veículo (i.p.) + salina (SCPvl)], de acordo com a análise de variância de uma via (one-way ANOVA), seguida pelo teste post hoc de Newman-Keuls. As colunas representam a média \pm EPM. $N=7-8$.

Resposta Antinociceptiva:

A análise de variância de medidas repetidas mostrou um efeito estatisticamente significativo no tratamento com NMDA na SCPvl sob o limiar nociceptivo até 5 minutos após o término da expressão da resposta defensiva.

Houve um efeito estatisticamente significativo no tratamento ($F_{(3,27)} = 9,06$; $p < 0,001$), no tempo ($F_{(7,21)} = 33,41$; $p < 0,001$) e na interação do tratamento versus tempo ($F_{(21,59)} = 12,58$; $p < 0,001$). O teste post hoc de Duncan mostrou que a estimulação química da SCPvl com NMDA (0,6 nmol) aumentou o limiar nociceptivo ($F_{(3,27)} = 48,41$; $p < 0,001$) dos grupos tratados com veículo (i.p.) + NMDA (SCPvl), com PRX 10 mg/kg (i.p.) + NMDA (SCPvl) e com PRX 20 mg/kg (i.p.) + NMDA (SCPvl) quando comparados com o grupo controle, veículo (i.p.) + salina (SCPvl), como mostrado na figura 10. Além disso, a análise estatística mostrou um aumento no limiar nociceptivo nos grupos tratamentos com PRX 10 mg/kg (i.p.) + NMDA (SCPvl) e com PRX 20 mg/kg (i.p.) + NMDA (SCPvl) quando comparados respectivamente com o grupo veículo (i.p.) + NMDA (SCPvl) e com os grupos PRX 10 mg/kg (i.p.) + NMDA (SCPvl) e PRX 20 mg/kg (i.p.) + NMDA (SCPvl).

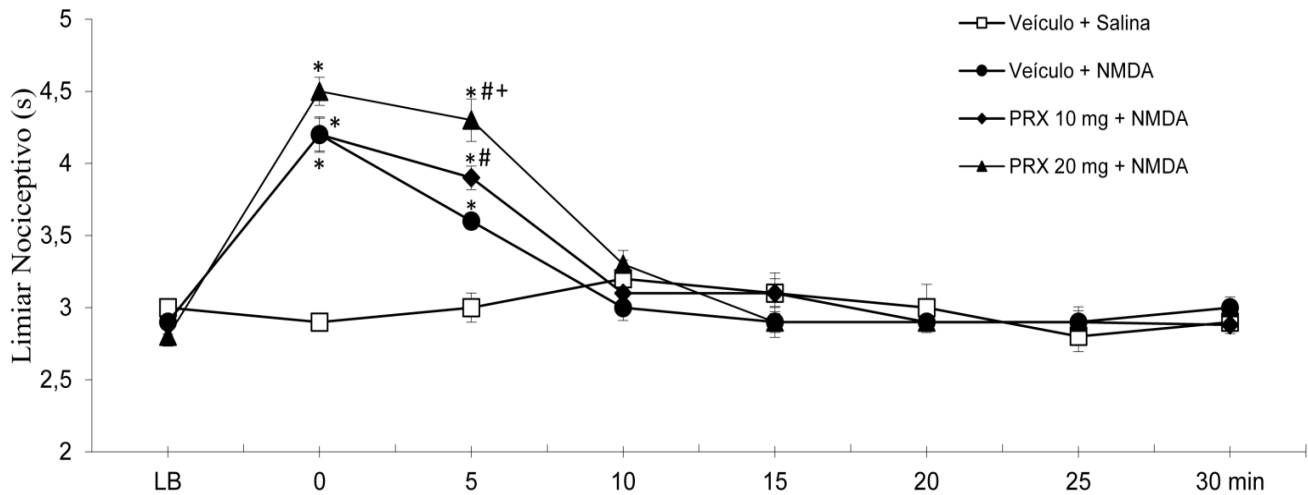


Figura 10: Efeito do tratamento crônico com paroxetina (PRX, 10 mg/kg ou 20 mg/kg) ou veículo sobre o limiar nociceptivo induzido pela estimulação química da SCPvl com a microinjeção de NMDA (0,6 nmol) ou salina fisiológica. * $P < 0,001$, comparado com o grupo controle, tratado com veículo (i.p.) + salina (SCPvl); # $P < 0,001$, comparado com o grupo tratado com veículo (i.p.) + NMDA (SCPvl); + $P < 0,001$, comparado com o grupo tratado com PRX 10 mg/kg (i.p.) + NMDA (SCPvl), segundo a análise de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste post hoc de Duncan. LB: Linha de base, medida antes do procedimento experimental. Eixo x: tempo (em minutos) em que medidas consecutivas da latência de retirada de cauda foram tomadas. Eixo y: Limiar Nociceptivo (aferido em segundos). Elevação do limiar nociceptivo foi representado como média \pm EPM. N=8.

4.3 Efeito do pré-tratamento com naltrexona sobre as respostas comportamentais induzidas pela estimulação química na SCPvl

A microinjeção de um agonista de receptores glutamatérgico, a NMDA, na SCPvl induziu respostas comportamentais de imobilidade defensiva e aumento do número de cruzamento.

A análise estatística de análise de variância (ANOVA) de duas vias mostrou significativo efeito da estimulação química [$F_{(1,28)} = 121,4$; $P < 0,001$; $F_{(1,28)} = 183,9$; $P < 0,001$], mas nenhum efeito do pré-tratamento [$F_{(1,28)} = 0,49$; $P > 0,05$; $F_{(1,28)} = 0,36$; $P > 0,05$] e da interação entre o pré-tratamento e a estimulação química [$F_{(1,28)} = 0,49$; $P > 0,05$; $F_{(1,28)} = 0,36$; $P > 0,05$] respectivamente na frequência e duração de imobilidade defensiva (Figura 11a e b). O teste de post hoc de Bonferroni mostrou um aumento no número de imobilidade defensiva no grupo tratado com salina + NMDA quando comparado com os grupos salina + salina e salina + NTX ($p < 0,001$). Além disso, a análise de duas vias mostrou efeito significativo da estimulação química [$F_{(1,28)} = 49,42$; $P < 0,001$] e não efeito do pré-tratamento [$F_{(1,28)} = 0,47$; $P > 0,05$], ou da interação entre o pré-tratamento e a estimulação química [$F_{(1,28)} = 0,6$; $P > 0,05$] na frequência de cruzamentos (Figura 11c). O teste de post hoc de Bonferroni mostrou uma diminuição do número de cruzamentos no grupo tratado com salina + NMDA quando comparado com os grupos salina + salina e salina + NTX ($p > 0,05$).

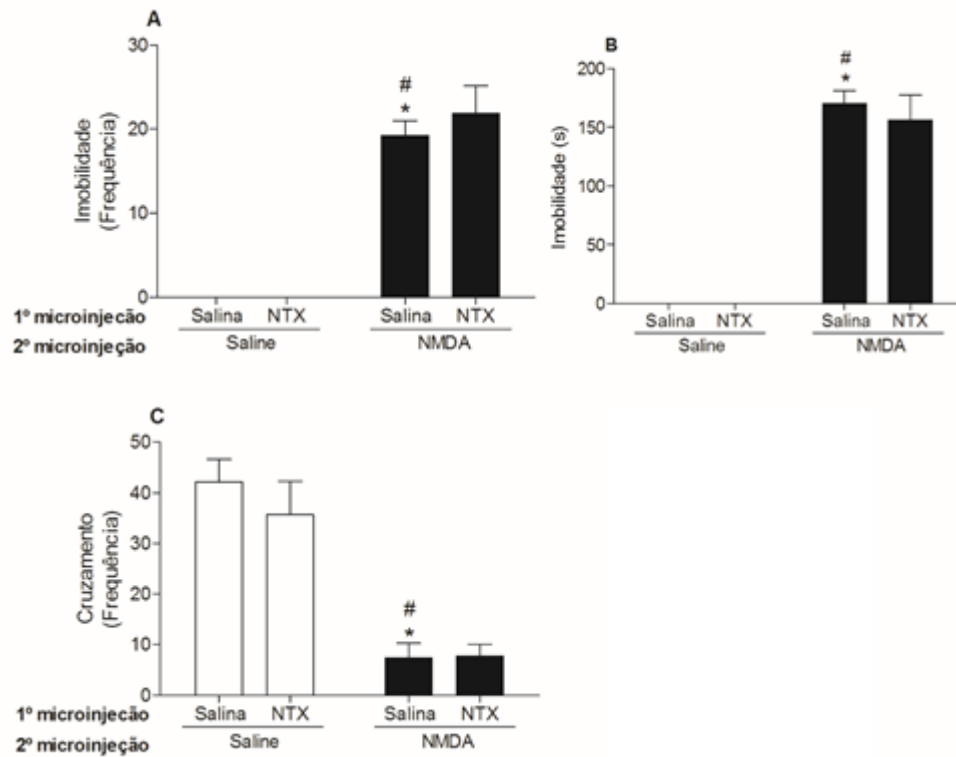


Figura 11: Efeitos do pré-tratamento da substância cinzenta periaqueductal ventrolateral (SCPvl) com naltrexona (NTX) na dose de 26 nmol ou salina nas respostas comportamentais de imobilidade [frequência (A) e duração (B)] e cruzamento [frequência (C)] induzidas pela microinjeção de NMDA na SCPvl. [#] $P < 0,001$; ^{*} comparado com o grupo salina + salina; [#] comparado com o grupo NTX + salina) de acordo com a análise de variância de duas via (two-way ANOVA), seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. As colunas representam a média \pm o erro padrão da média. N=8.

4.4 Efeito do pré-tratamento com naltrexona sobre a antinocicepção induzida pela estimulação química na SCPvl

A análise de variância para medidas repetidas (split-plot ANOVA) mostrou que a ativação dos receptores NMDA na SCPvl aumentou os limiares nociceptivos após a elaboração do comportamento de imobilidade, quando comparado com o grupo controle (salina + salina intra-SCPvl).

Houve um efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(3,15) = 23,28$; $P < 0,001$], do tempo [$F(7,17) = 14,30$; $P < 0,001$] e interação do tratamento versus tempo [$F(21,25) = 6,99$; $P < 0,001$]. A análise estatística mostrou efeito significativo no tratamento com NMDA sobre o limiar nociceptivo de 0 até 10min ($F(3,15) 1,43$; $P < 0,001$). O teste post hoc de Bonferroni mostrou que o pré-tratamento da SCPvl com naltrexona (26 nmol) bloqueou o efeito de elevação do limiar nociceptivo causado pela administração de NMDA na SCPvl, ou seja, bloqueou a antinocicepção induzida pelo medo ($P < 0,001$), como representado na figura 12.

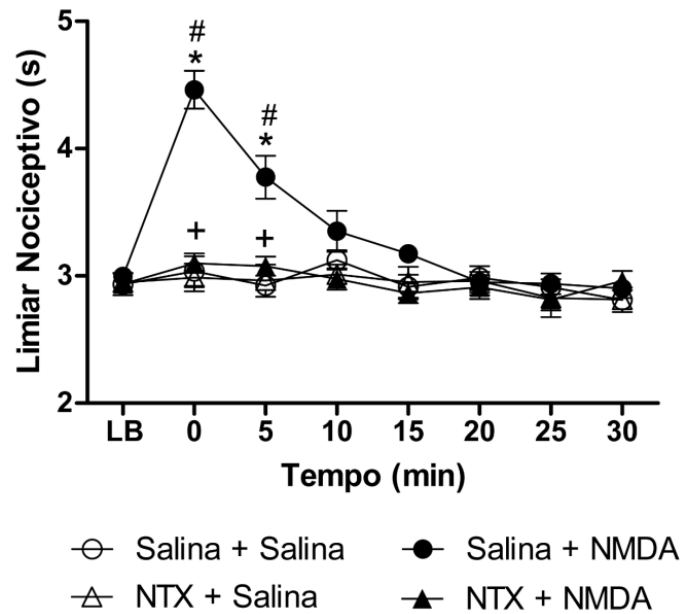


Figura 12: Efeito do pré-tratamento da substância cinzenta periaqueductal ventrolateral (SCPvl) com naltrexona na dose de 26 nmol ou salina fisiológica, seguido pela microinjeção de NMDA ou de salina fisiológica no SCPvl, sobre os limiares nociceptivos. N= 8; *# + P < 0,001; * comparado com o grupo salina + salina; # comparado com o grupo NTX + salina; + comparado com o grupo salina + NMDA, segundo a análise de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. LB: Linha de base, medida antes do procedimento experimental. Eixo x: tempo (em minutos) em que medidas consecutivas da latência de retirada de cauda foram tomadas. Eixo y: Limiar Nociceptivo (aferido em segundos) medido pelo teste de latência de retirada da cauda. Elevação no limiar nociceptivo foi representado como média \pm EPM.

4.5 Estudo da interação farmacológica entre a paroxetina e a naltrexona sobre as respostas comportamentais defensivas de imobilidade

A estimulação química realizada com a microinjeção de NMDA na SCPvl induziu resposta comportamental defensiva de imobilidade e alterações no limiar nociceptivo.

A análise de uma via ANOVA seguida pelo teste post hoc de Newman-Keuls mostrou um aumento na frequência [$F_{(7,56)} = 46,16$; $p < 0,001$] e na duração [$F_{(7,56)} = 48,09$; $p < 0,001$] da imobilidade defensiva nos grupos estimulados quimicamente e tratados com veículo (i.p.) + salina (SCPvl) + NMDA (SCPvl), com PRX 10 mg/kg (i.p.) + salina (SCPvl) + NMDA (SCPvl), com veículo (i.p.) + NTX (SCPvl) + NMDA (SCPvl) e com PRX (i.p.) + NTX (SCPvl) + NMDA (SCPvl) quando comparados com os grupos controles, tratados com veículo (i.p.) + salina (SCPvl) + salina (SCPvl); com PRX (i.p.) + salina (SCPvl) + salina (SCPvl), com veículo (i.p.) + NTX (SCPvl) + salina (SCPvl), ou com PRX (i.p.) + NTX (SCPvl) + salina (SCPvl). A análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) mostrou ausência de efeito do tratamento crônico (10 mg/kg de PRX, i.p., por 21 dias) [$F_{(1,56)} = 2,99$; $p > 0,05$; $F_{(1,56)} = 0,0$; $p > 0,05$], do tratamento agudo (26 nmol NTX, SCPvl, em dose única) [$F_{(3,56)} = 0,01$; $p > 0,05$; $F_{(3,56)} = 1,17$; $p > 0,05$] e da interação entre o tratamento crônico e o agudo [$F_{(3,56)} = 0,04$; $p > 0,05$; $F_{(3,56)} = 0,03$; $p > 0,05$], considerando, respectivamente, a frequência e a duração da imobilidade defensiva induzida pela micro-injeção de NMDA (SCPvl) (N=8), como mostrado na figura 13.

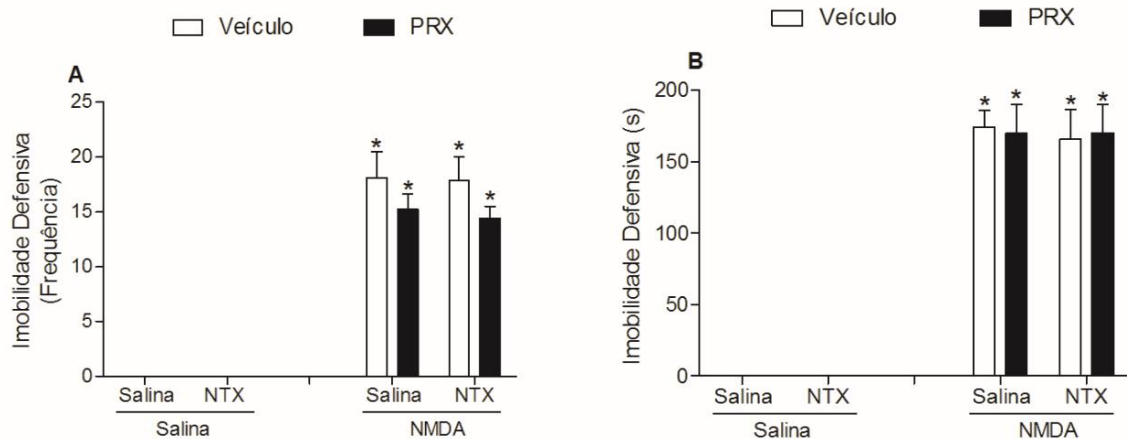


Figura 13: Ausência de efeito do tratamento central com 26 nmol de naltrexona (NTX; SCPvl) ou salina fisiológica em animais tratados cronicamente com paroxetina (PRX, 10 mg/kg, i.p.) ou veículo (Tween 80 + salina) na resposta comportamental de imobilidade defensiva induzida pela estimulação química da SCPvl com a micro-injeção intramesencefálica de NMDA (0,6 nmol) ou salina. * $P < 0,001$, comparado com os grupos controles, tratados com veículo (i.p.) + salina (SCPvl) + salina (SCPvl), com PRX (i.p.) + salina (SCPvl) + salina (SCPvl), com veículo (i.p.) + NTX (SCPvl) + salina (SCPvl), ou com PRX (i.p.) + NTX (SCPvl) + salina (SCPvl), de acordo com a análise de variância de duas vias (two-way ANOVA), seguida pelo teste post hoc de Newman-Keuls. As colunas representam a média \pm EPM. N=8.

4.6 Estudo da interação farmacológica entre a paroxetina e a naltrexona sobre o limiar nociceptivo

A análise de medidas repetidas mostrou um efeito estatisticamente significativo do tratamento com NMDA na SCPvl no limiar nociceptivo até 5 minutos após o término da expressão da resposta defensiva.

Houve um efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(7,55) = 11,27$; $p < 0,001$], do tempo [$F(7,49) = 16,47$; $p < 0,001$] e da interação tratamento versus tempo [$F(49,331) = 4,08$; $p < 0,001$]. O teste post hoc de Duncan mostrou diferença significativa no limiar nociceptivo [$F(7,55) > 15,69$; $p < 0,001$] até 5 minutos após o término da expressão da resposta comportamental de imobilidade defensiva (N=8), como mostrado na Figura 14.

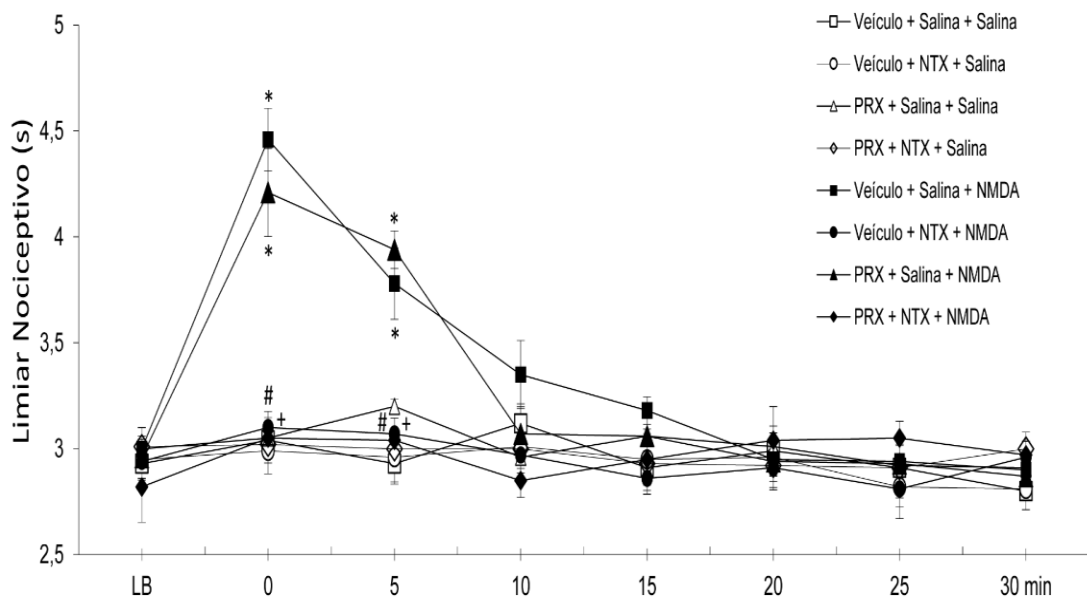
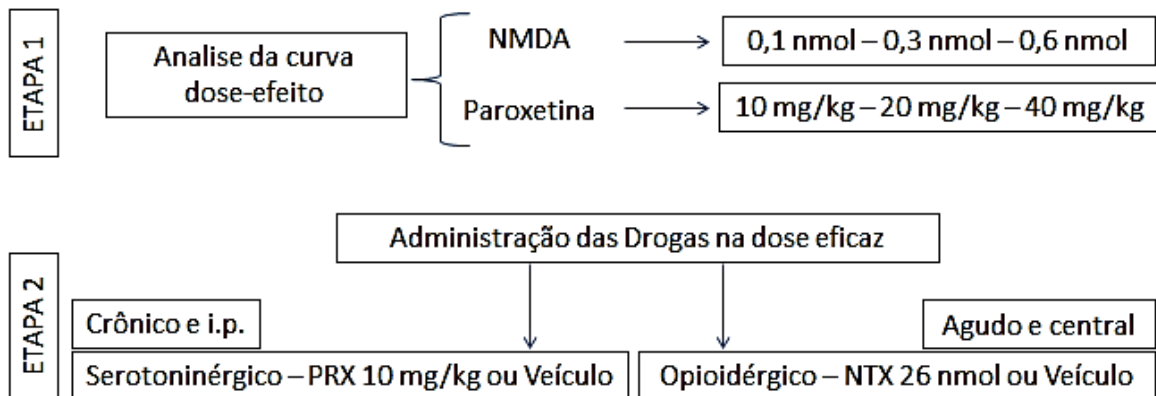


Figura 14: Efeito do tratamento central com 26 nmol de naltrexona (NTX; SCPvl) ou salina em animais tratados cronicamente com paroxetina (PRX, 10 mg/kg, i.p.) ou veículo sobre o limiar nociceptivo induzido pela estimulação química da SCPvl com a microinjeção intramesencefálica de NMDA (0,6 nmol) ou salina. * $P < 0,001$, comparado com os grupos controles, tratados com veículo (i.p.) + salina (SCPvl) + salina (SCPvl), com PRX (i.p.) + (SCPvl) + salina (SCPvl), com veículo (i.p.) + NTX (SCPvl) + salina (SCPvl), ou com PRX (i.p.) + NTX (SCPvl) + salina (SCPvl); # $P < 0,001$, comparado com o grupo tratado com veículo (i.p.) + salina (SCPvl) + NMDA (SCPvl); + $P < 0,001$, comparado com o grupo tratado com PRX (i.p.) + salina (SCPvl) + NMDA (SCPvl), segundo a análise de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste post hoc de Duncan. LB: Linha de base, medida antes do procedimento experimental. Eixo x: tempo (em minutos) em que medidas consecutivas da latência de retirada de cauda foram tomadas. Eixo y: Limiar Nociceptivo (aferido em segundos). Elevação do limiar nociceptivo foi representado como média \pm EPM. $N=8$.

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

O presente trabalho foi conduzido com o intuito de investigar a interação entre o sistema serotoninérgico e opioidérgico nas reações defensivas elaboradas pela SCP em sua porção ventrolateral, em *Rattus norvegicus* adultos. O processo de investigação se dividiu em duas etapas básicas, a primeira, contendo a análise da curva dose efeito da paroxetina e da NMDA, com objetivo de avaliar qual não traria danos ao animal bem como a menor dose com efeito satisfatório, como demonstra o esquema a seguir.



Ao término das etapas executadas no presente estudo, foi possível observar que a expressão da resposta comportamental induzida pela estimulação química da SCPvl é caracterizada pela imobilidade defensiva, e que trabalhos prévios sugerem que as diferentes colunas da SCP, a coluna dorsolateral, a dorsomedial, a lateral e a ventrolateral elaboram diferentes respostas comportamentais (CARRIVE, 1993; VIANNA E BRANDÃO, 2003). Recentes evidências sugerem que as respostas comportamentais menos explosivas, denominadas como o congelamento, se enquadrem no perfil comportamental de um paciente em crise de pânico.

Muitas dúvidas ainda existem com relação às bases neurais e neuroquímicas de grandes desordens psiquiátricas, como por exemplo, a síndrome do pânico. Muitos estudos são realizados por vários grupos de estudo em neuroanatomia e neuropsicofarmacologia, contendo técnicas invasivas e não invasivas, a fim de estudar as funções do sistema límbico e suas implicações no comportamento, bem como suas desordens mais comuns (BLANCHARD et al, 1988, 1989, 2005; CANTERAS & GOTO, 1999; COMOLI et al, 2003; COIMBRA et

al 2006; GUIMARÃES-COSTA et al 2007). O estudo dos substratos neurais envolvidos com a geração e elaboração dos estados aversivos que seguem essas reações podem nos possibilitar a compreender melhor as bases neuroanatômicas das patologias de ordem neurológica e psiquiátrica.

Tendo como referência, a base da neuroanatomia, em meados da década de 70 se deu início a inúmeras investigações, de forma desenfreada, sobre o envolvimento de toda citoarquitetura da SCP, sendo então proposto que esta estrutura poderia ser subdividida em regiões e funções distintas (HAMILTON, 1973; BEITZ AND SHEPARD, 1985; MANTYH, 1982, 1982A; CONTI et al., 1988). Historicamente, a SCP vem sendo considerada como a via final comum do repertório comportamental de defesa (BANDLER, 1988; GRAEFF, 1993), e vários outros achados reforçam os resultados de Blander, bem como inclui o envolvimento da SCP na emissão e na modulação das respostas de defesa (CANTERAS e GOTO, 1999; BITTENCOURT et al, 2004).

A estimulação química das colunas dorsais e laterais da SCP promovem alterações locomotoras definidas como fuga intercaladas por saltos e imobilidade (BORELLI et al, 2004; VIANNA et al, 2003). No entanto, a estimulação química da coluna ventrolateral induz apenas a resposta de imobilidade (BITTENCOURT et al, 2004). O comportamento de imobilidade induzido pela estimulação da SCPvl é relacionado ao medo condicionado, pois a lesão eletrolítica da SCPvl reduz a imobilidade associada ao choque nas patas em um aparato experimental de medo condicionado ao contexto (VIANNA et al, 2001). Por outro lado, a lesão eletrolítica da SCPvl não prejudica a expressão das respostas comportamentais de fuga e imobilidade induzidas pela estimulação química da porção dorsal da SCP, a qual está relacionada ao medo incondicionado (VIANNA et al, 2001). Além disso, o grupo de Carrive (1997) mostraram que a imobilidade relacionada à reexposição ao contexto aumenta a expressão da proteína Fos na SCPvl, reforçando a hipótese de que as redes neurais da SCPvl são recrutadas para a elaboração do medo condicionado.

Nossos dados corroboram os dados acima citados, pois o “congelamento” eliciado pela estimulação da SCPvl com NMDA na dose de 0,6 nmol de mostra coerente a literatura, que salienta a relação de tal comportamento com crises de pânico, relacionado com o medo condicionado. Muitos trabalhos descrevem a substância cinzenta periaquedutal como uma estrutura de função heterogênea (CARRIVE, 1993), cuja estimulação de distintas colunas resulta em alterações fisiológicas e comportamentais diversificadas. A estimulação da coluna ventrolateral da SCP resulta em antinocicepção opióide, hipotensão e comportamento defensivo como o de “congelamento”, enquanto a estimulação das colunas dorsomedial e

dorsolateral resulta em hipoalgesia não opióide, hipertensão e esquivas, fuga ou ataques defensivos (BANDLER; SHIPLEY, 1994). Ainda, dando suporte aos nossos achados, Bittencourt e cols. (2004) mostraram que a estimulação das colunas lateral e dorsal da SCP produz um conjunto complexo de comportamentos incondicionados denominados pelos autores de “reação de defesa”. Este conjunto de respostas defensivas é descrito como: imobilidade tensa, trote, galope, saltos, micção e defecação. Com relação à coluna ventrolateral da SCP, é reportado que esta região está associada à analgesia opióide (BASBUM e FIELDS, 1984), hipotensão e imobilidade, sendo estas respostas associadas à fase de recuperação pós-defesa.

Vários laboratórios têm se dedicado ao estudo dos diversos componentes da reação de defesa, incluindo a antinocicepção. O “congelamento” e a analgesia produzidos pelo encontro de um rato com um gato são reduzidos após a lesão da amígdala (BLANCHARD; BLANCHARD, 1972) ou da SCP (FANSELOW, 1991). Há várias evidências de que há uma projeção importante da amígdala para a SCP (SHIPLEY et al., 1991) e Fanselow (1991) sustenta que os estímulos aversivos ativam vias específicas na amígdala que se projetam para a SCP, têm como resultado os comportamentos defensivos, analgesia e respostas autonômicas.

Inúmeros estímulos levam informações ameaçadoras, que por sua vez ativam as regiões da amígdala que se projetam para a SCPvl. Dessa ativação, resulta o “congelamento” e a analgesia (BEHBEHANI, 1995). Quando o animal entra em contato com o perigo, as vias neuronais da amígdala que se projetam para a SCPd são ativadas, resultando em resposta de fuga associada com vocalização e respostas autonômicas intensas. É possível que a estimulação da SCPd iniba os neurônios da SCPvl gerando então a partir desta interação, uma inibição seja em partes, mediada pela ativação dos receptores opióides, da SCPvl (FANSELOW; CALCAGNETTI; HELMSTETTER, 1989; BEHBEHANI, 1995). Dando suporte a esta hipótese, estudos anatômicos de Mouton e Holstege (1994) evidenciam uma via de projeção direta da SCPvl para neurônios localizados no corno ventral da medula espinhal de gatos. Em adição, é possível que as demais subdivisões da SCP enviem projeções indiretas para o corno ventral da medula espinhal, via estação sináptica em núcleos da rafe, principalmente no núcleo caudal da rafe. Considerando as projeções descendentes da SCP, trabalhos demonstraram que há conexões recíprocas entre o núcleo mediano da rafe e a SCPvl, sendo que foi demonstrado a participação do núcleo mediano da rafe no condicionamento contextual (AVANZI e BRANDÃO, 2001).

Apesar destas evidências, outro estudo realizado em modelo animal de medo inato mostrou que a exposição do rato ao odor de predador promove aumento da expressão da proteína Fos na porção caudal da SCPvl, apesar de ser ativada em menor intensidade do que nas colunas dorsal e lateral (CANTERAS e GOTO, 1999). Baseado nestas observações foi sugerido que os neurônios da coluna ventrolateral da SCP são recrutados para elaboração da resposta de imobilidade relacionada ao medo incondicionado, mas também podem ser recrutados durante o medo inato através de conexões com a coluna dorsolateral da SCP (VIANNA e BRANDÃO, 2003).

Os resultados do presente estudo também mostraram que a estimulação química da SCPvl aumenta o limiar nociceptivo promovendo a antinocicepção. Em 1969, David Reynolds já havia sugerido um potente efeito analgésico devido à estimulação elétrica da SCP. Reynolds observou que era possível realizar um procedimento cirúrgico em ratos, sem a administração de agentes analgésicos, desde que o animal fosse submetido à prévia estimulação da SCP. O termo “analgesia induzida por estimulação” foi utilizado para descrever o efeito analgésico causado pela estimulação da SCP, o qual foi replicado em diferentes espécies animais, como coelhos e ratos (NICHOLS et al, 1989) e também no ser humano (NASHOLD, 1969). O termo antinocicepção induzida pelo medo refere-se à ativação dos mecanismos endógenos nociceptivos observados após as reações de defesa. Nesse sentido, trabalhos posteriores mostraram que a antinocicepção induzida pelo medo poderia ser produzida pela estimulação SCP (FARDIN et al, 1984; LOVICK, 1990) e de outros núcleos encefálicos que elaboram os comportamentos de defesa como os núcleos hipotalâmicos (BIAGIONI et al., 2012, 2013), o colículo superior (COIMBRA e BRANDÃO, 1997; DA SILVA et al, 2015) e o colículo inferior (CASTILHO et al, 1999), a qual era seguida das reações motoras de fuga intercaladas ou não por imobilidade defensiva.

Nossos resultados mostram que a microinjeção de NMDA na SCPvl induz resposta comportamental de imobilidade defensiva seguida por uma alteração no limiar nociceptivo, caracterizando a antinocicepção induzida pelo medo. Esses dados estão em harmonia com resultados prévios obtidos em modelos animais de medo (MENDES-GOMES et al, 2011; SCHENBERG et al, 2005; VIANNA et al, 2001).

O teste da retirada da cauda foi utilizado para avaliar o limiar nociceptivo após as reações defensivas de pânico e medo. Animais tratados com salina (grupo controle) e induzidos ao medo com a microinjeção de NMDA na SCPvl responderam com aumento do limiar de dor, mostrando que durante o ataque de pânico ocorre alterações no limiar nociceptivo resultando em antinocicepção. Porém, os limiares nociceptivos dos animais pré-

tratados com naltrexona foram semelhantes aos dos animais tratados com salina, sugerindo que a naltrexona é capaz de diminuir a antinocicepção induzida pelo medo.

A antinocicepção que se segue às reações defensivas desencadeadas pela estimulação de substratos neurais capazes de eliciar o medo em estruturas mesencefálicas foi muito discutida por décadas, e enormes avanços foram alcançados na compreensão da neurobiologia do medo e da analgesia induzida pelo estresse.

Com relação ao tratamento farmacológico crônico realizado no presente trabalho com animais de laboratório, a paroxetina, na dose utilizada no presente trabalho não mostrou efeito sobre a resposta comportamental de imobilidade defensiva, mas tendeu a potencializar a antinocicepção induzida pela estimulação química da SCPvl, e frente a resposta comportamental defensiva, em outros modelos animais de medo (labirinto em T-elevado ou a estimulação aversiva da SCPd) o tratamento crônico com paroxetina reduziu as respostas comportamentais defensivas de fuga e “congelamento” (HOGG et al, 2006; SELA et al, 2010), sugerindo um efeito antipânico desse inibidor de captação de serotonina. Salienta-se que, a paroxetina em doses altas além de gerar um efeito neurológico, também alicia o peristaltismo, bem como foi visto na tabela em anexo ao trabalho, onde os animais que receberam a dose de 40 mg/kg, apresentaram grande desnutrição, e durante seu tratamento crônico, os mesmos apresentavam as fezes fétidas e em bastante quantidade. Portanto, a ausência de efeito da paroxetina nas doses de 10 mg/kg, 20mg/kg foram levadas em consideração para elaboração do trabalho, porém demonstraram que a imobilidade defensiva, esta observada no presente trabalho, corrobora a hipótese de que a SCPvl não elabora as respostas comportamentais de medo inatas relacionadas ao ataque de pânico (BRANDÃO et al, 2008).

Com relação à antinocicepção, o efeito da paroxetina em potencializar a antinocicepção sugere o recrutamento das vias serotoninérgicas na elaboração do processo antinociceptivo organizado pelos neurônios da SCPvl. Com efeito, o bloqueio dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} da SCPvl é capaz de bloquear o processo antinociceptivo induzido pela estimulação elétrica do mesmo núcleo mesencefálico (DE LUCA et al, 2003). De maneira semelhante, o sistema serotoninérgico modula o processo nociceptivo associado às reações de defesa organizadas pela coluna dorsal da SCP (CASTILHO e BRANDÃO, 2001; COIMBRA e BRANDÃO, 1997; COIMBRA et al, 1992). Portanto, o sistema serotoninérgico das colunas dorsal e ventrolateral da SCP parece contribuir para modular o processo antinociceptivo relacionado ao medo.

O papel da serotonina nas funções da SCP é muito complexo, principalmente porque a SCP contém vários subtipos de receptores serotoninérgicos (PALÁCIOS, 1990). Anatomicamente, a SCP contém corpos celulares e prolongamentos de axônios que contêm serotonina distribuídos por toda a sua extensão (BEITZ, 1982; BEITZ; WEINER, 1983). Neste trabalho, verificamos que a estimulação química da SCPvl promoveu antinocicepção no teste da retirada da cauda, que foi reduzida por microinjeção de antagonistas de receptores tanto opióides, no caso a naltrexona. Essas observações apoiam a hipótese de que ambos os mecanismos opióides e serotoninérgicos participam da mediação desta resposta.

Apoiando nossos achados, há evidências na literatura mostrando que os agentes analgésicos opióides produzem antinocicepção pela ativação do sistema inibitório descendente que suprime as respostas neuronais do corno dorsal da medula espinal aos estímulos nocivos. Os analgésicos opióides ativam este sistema analgésico descendente primariamente por se ligarem aos receptores opióides na SCP. Lesões na SCP, NMR ou no funículo dorsolateral interrompem a atividade deste sistema e atenuam o efeito analgésico da administração sistêmica da morfina (BASBAUM et al., 1977; CHANCE; KRYNOCK; ROSCRANS, 1978; PROUDFIT; ANDERSON, 1975; YAKSH; PLANT; RUDY, 1977; MELZACK; SAMUEL, 1982).

Em estudos anteriores, foram determinados os efeitos da administração central de bloqueadores opióides, como a Naltrexona (NTX), frente ao comportamento de defesa eliciado pela estimulação química de diversas estruturas como do Colículo Superior e das colunas dorsomedial e dorsolateral da SCP (COIMBRA et al, 1996; EICHENCERGER et al, 2002). Microinjeções centrais de NTX no teto mesencefálico causaram um claro efeito antipânico, na medida em que induziram ao aumento no limiars de “congelamento” e fuga eliciado por estimulação química dos substratos neurais responsáveis pela elaboração das respostas defensivas. Esses achados sugerem que uma modulação opióide esta no controle das respostas comportamentais evocadas durante o ataque de pânico.

Os resultados do presente trabalho também mostraram que o tratamento agudo com naltrexona não alterou a resposta comportamental defensiva organizada pela SCPvl. Essa ausência de efeito do naltrexona também foi observada após o tratamento crônico com a paroxetina. De Lucas-Vinhas e cols. (2006) já haviam sugerido que o tratamento agudo com naltrexona não altera a resposta de imobilidade induzida pela estimulação elétrica da SCPvl. Contudo, é sabido que o bloqueio de receptores opióides no tectum eleva os limiars de imobilidade defensiva e de fuga evocados por estimulação elétrica da SCP (COIMBRA et al, 1996). A ausência de efeito antiaversivo do naltrexona microinjetado na SCPvl não afasta a

possibilidade do bloqueio de receptores opióides causar algum efeito na imobilidade defensiva pós-fuga, uma resposta de defesa proposta como modelo psicobiológico de ataques de pânico (BRANDÃO et al, 2008).

Por outro lado, a analgesia induzida pela estimulação de sítios ventrais da SCP parece recrutar não somente mecanismos não opióides, mas também opióides (NICHOLS et al, 1989). Com efeito, está bem estabelecido que os neurônios opióides da SCPvl sejam recrutados para a modulação da dor (FIELDS e BASBAUM, 2000). Por conseguinte, a microinjeção de morfina diretamente na SCPvl diminui a sensibilidade a dor em ratos submetidos ao teste de retirada da cauda (YAKSH et al, 1976; SCHUL e FRENK, 1991). Nesse sentido, nossos resultados mostraram que o tratamento agudo com naltrexona bloqueia totalmente a antinocicepção induzida pela estimulação química da SCPvl. Curiosamente, observamos que o tratamento com naltrexona também bloqueia a tendência de potencialização da antinocicepção causada pelo tratamento crônico com paroxetina, o que sugere uma interação entre vias opióides e serotoninérgicas na elaboração de processos defensivos, como já sugerido na literatura (RONCON et al, 2012, 2015; RANGEL et al, 2014).

Em resumo, os resultados do presente trabalho sugerem que o tratamento crônico com paroxetina em nenhuma dose utilizada neste estudo foi capaz de alterar a resposta de imobilidade induzida pela estimulação da SCPvl. No caso da antinocicepção, a administração de paroxetina tendeu a potencializar o efeito antinociceptivo da estimulação química da SCPvl. O tratamento agudo com naltrexona também não alterou a resposta de imobilidade defensiva, mas bloqueou totalmente a antinocicepção evocada por estimulação química da SCPvl. Contudo, o tratamento periférico com naltrexona bloqueou a tendência à potencialização da antinocicepção induzida pelo medo inato causado pelo tratamento crônico com paroxetina.

6. CONCLUSÃO

6. Conclusões

Conclui-se que, os resultados do presente trabalho sugerem que o tratamento crônico com paroxetina potencializam a antinocicepção induzida pelo medo após estimulação da SCPvl, bem como frente a resposta de antinocicepção induzida pelo medo é revertida pelo tratamento agudo e central com naltrexona na SCPvl, evidenciando um bloqueio a tendência à potencialização da antinocicepção induzida pelo medo inato causada pelo tratamento crônico com paroxetina, onde corrobora com a literatura descrita por Roncon et al em 2012, 2015 e por Rangel et al em 2014, que existe um bloqueio da potencialização e da antinocicepção causada pelo tratamento crônico com paroxetina e do efeito de pânico gerado pela estimulação química da SCPvl com NMDA, o que sugere uma interação entre vias opióides e serotoninérgicas para a elaboração de tal resposta.

É evidenciado com os resultados do presente estudo que a interação entre os sistemas para elaboração das respostas comportamentais são de baixo valor quando administrado o inibidor seletivo da recaptação de serotonina e com o antagonista opióide, evidenciando a atuação no sitio mesencefálico da SCPvl.

Foi possível observar que a dose de 40 mg/kg de paroxetina perpetua o animal de estudo a vários fatores neurofisiológicos, como o aumento do peristaltismo intestinal, demonstrando assim que poderia ser prejudicial ao animal seguir com um tratamento contínuo e crônico.

7. REFERÊNCIAS

7. Referências

- ABBOTT F. V.; MELZACK R.; LEBER B.F. Morphine analgesia and tolerance in the tail-flick and formalin tests: dose-response relationships. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 17, n. 6, p. 1213-1219, 1982.
- ABBOTT, F. V.; MELZACK, R.; LEBER, B. F. Morphine analgesia and tolerance in the tail-flick and formalin tests: dose-response relationships. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 17, p. 1213-1219, 1982.
- ABBOTT, F. V.; MELZACK, R.; SAMUEL, C. Morphine analgesia in tail-flick and formalin pain tests is mediated by different neural systems. **Experimental Neurology**, v. 75, p. 644-651, 1982.
- ADAMS, R. M. Medication and Hyperkinesia: A New Concept. **Journal of School Health**, v. 49, p. 226-226, 1979.
- ALBINSSON, A.; ANDERSSON, G.; ANDERSSON, K.; VEGA-MATUSZCZYK, J.; LARSSON, K. The effects of lesions in the mesencephalic raphe systems on male rat sexual behavior and locomotor activity. **Behavior Brain Research**, v. 80, p. 57-63, 1996.
- ALEY, O.; ROBERT O.; MESSING, D.; MOCHLY-ROSEN, J. D. L. Chronic Hypersensitivity For Inflammatory Nociceptor Sensitization Mediated by the ϵ sozyme of Protein Kinase CK. **Journal of Neuroscience**, v. 20 n. 12, p. 4680-4685, 2000.
- ALMADA, R. C., COIMBRA, N.C., AND BRANDÃO, M. L. Medial prefrontal cortex serotonergic and GABAergic mechanisms modulate the expression of contextual fear: intratelencephalic pathways and differential involvement of cortical subregions. **Neuroscience**, v. 284, p. 988-997, 2015.
- ANNERBRINK, K.; JÖNSSON, E.; OLSSON, M.; NILSSON, S. C.; SEDVALL, G.; ANCKARSÄTER, M. D. H.; ERIKSSON, E. Associations between the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and monoamine metabolite concentrations in cerebrospinal fluid. **Psychiatry Research**, v. 179, p. 231-234, 2010.
- ANSELONI V. C. Z.; BRANDÃO M. L. Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. **Behavior Pharmacologic**, v. 8, p. 533-540, 1997.
- ANTONIADIS E. A.; MCDONALD R. J. Amygdala, hippocampus, and unconditioned fear. **Experimental Brain Research**, v. 138, n. 2, p. 200-209, 2001.

- ANTONIADIS, E. A.; MCDONALD, R. J. Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. **Behavior Brain Research**, v. 101, n. 1, p. 1–13. 1999.
- APFELBACH R.; BLANCHARD C. D.; BLANCHARD R. J.; HAYES R. A.; MCGREGOR, I. S. The effects of predator odors in mammalian prey species: A review of field and laboratory studies. **Neuroscience Biobehavior Revisit**, v. 29, p. 1123–1144, 2005.
- ASHBURN, M. A. AND STAATS, P. S. Management of Chronic Pain. **Lancet**, v. 353, p. 1865-1869. 1999.
- AVANZI, V.; BRANDÃO, M. L. Activation of 5-HT_{1A} autoreceptors of the median raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 126, p. 175-184, 2001.
- AVANZI, V.; CASTILHO, V. M.; ANDRADE, T. G. C. S.; BRANDÃO, M. L. Regulation of contextual condition by the median raphe nucleus. **Brain Research**, v. 790, p. 178-184, 1998.
- BALDWIN, D. S.; ANDERSON, I. M.; NUTT, D. J.; BANDELOW, B.; BOND, A.; DAVIDSON, J. R.; DEN BOER J. A.; FINEBERG, N. A.; KNAPP, M.; SCOTT, J.; WITTCHEN, H. U. British Association for Psychopharmacology. Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, p. 19 n. 6, p. 567-596, 2005.
- BANDELOW, B. Assessing the efficacy of treatments for panic disorder and agoraphobia. II. The Panic and Agoraphobia Scale. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 10, n. 2, p. 73-81, 1995.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P. Integrated defense reaction elicited by excitatory amino acid micro injection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. **Brain Research**, v. 439, p. 95–106, 1988.
- BANDLER, R.; TORR, I. Midbrain periaqueductal grey region in the cat has afferent and efferent connections with solitary tract nuclei. **Neuroscience Letter**, v. 74, p. 1–6, 1987.
- BARRERA, T. L.; NORTON, P. J. Quality of life impairment in generalized anxiety disorder, social phobia, and panic disorder. **Journal Anxiety Disorders**, v. 23, n. 8, p. 1086-1090, 2009.
- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. **Annals of Neurology**, v. 4, p. 451-462, 1977.

- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annual Review Neuroscience**, v. 7, p. 309-338, 1984.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 2 ed. Porto Alegre: **Artmed**. 2002
- BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Progress in Neurobiology**, v. 46, p. 575-605, 1995.
- BEHBEHANI, M. M.; JIANG, M. R.; CHANDLER, S. D.; ENNIS, M. The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in the rat. *Pain*, v. 40, p. 195-204, 1990.
- BEITZ, A. J. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. **Neuroscience**, v. 7, p. 133-159, 1982.
- BEITZ, A. J.; CLEMENTS, J. R.; ECKLUND, L. J.; MULLET, M. M. The nuclei of origin of brainstem enkephalin and cholecystokinin projections to the spinal trigeminal nucleus of the rat. **Neuroscience**, v. 20, p. 409-425, 1985.
- BEITZ, A. J.; CLEMENTS, J. R.; MULLET, M. A.; ECKLUND, L. J. Differential origin of brainstem serotonergic projections to the midbrain periaqueductal gray and superior colliculus of the rat. **Journal Comparative Neurology**, v. 250, p. 498-509, 1986.
- BEITZ, A. J.; MULLETT, M. A.; WEINER, L. L. The periaqueductal gray projections to the rat spinal trigeminal, raphe magnus, gigantocellular pars alpha and paragigantocellular nuclei arise from separate neurons. **Brain Research**, v. 288, p. 307-314, 1983.
- BERTON, F.; VOGEL, E.; BELZUNG, C. Modulation of mice anxiety in response to cat odor as a consequence of predators diet. **Physiology & Behavior**, v. 65, n. 2, p. 247-254, 1998.
- BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610 – 1615, 1999.
- BIAGIONI, A. F.; DE FREITAS, R. L.; DA SILVA, J. A.; DE OLIVEIRA, R. C.; DE OLIVEIRA, R.; ALVES, V. M.; COIMBRA, N. C. Serotonergic neural links from the dorsal raphe nucleus modulate defensive behaviours organised by the dorsomedial hypothalamus and the elaboration of fear-induced antinociception via *locus coeruleus* pathways. **Neuropharmacology**, v. 67, p. 379-394, 2013
- BIAGIONI, A. F.; SILVA, J. A.; COIMBRA, N. C. Panic-like defensive behavior but not fear-induced antinociception is differently organized by dorsomedial and posterior hypothalamic nuclei of *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 328-336, 2012.

- BITTENCOURT, A. S.; CAROBREZ, A.P.; ZAMPROGNO, L. P.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L. C. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. **Neuroscience**, v. 125, n. 1, p. 71-89, 2004.
- BLANCHARD, D. C., BLANCHARD, R. J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **Journal of Comportamental Physiological and Psychological**, v. 81, p. 281-290, 1972.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches of the biology of emotion. **Annual Review of Psychology**, v. 39, p. 43-68, 1988.
- BLANCHARD, D. C.; LI, C. I.; HUBBARD, D.; MARKHAM C. M.; YANG M.; TAKAHASHI L. K.; BLANCHARD R. J. Dorsal premammillary nucleus differentially modulates defensive behaviors induced by different threat stimuli in rats. **Neuroscience Letter**, v. 345, p. 145-148, 2003.
- 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. **Behavioral Brain Research**, v. 58 n. 1-2, p. 155-165, 1993.
- BODNAR, R. J. Endogenous opiates and behavior: 2006. **Peptides**, v. 28, n. 12, p. 2435–2513, 2007.
- BORELLI, K. G.; GARGARO, A. C.; DOS SANTOS, J. M.; BRANDÃO, J. M. Effects of inactivation of serotonergic neurons of the median raphe nucleus on learning and performance of contextual fear conditioning. **Neuroscience Letter**, v. 387, p. 105-110, 2005.
- BORELLI, K. G.; NOBRE, M. J.; BRANDÃO, M. L.; COIMBRA, N. C. Effects of acute and chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter. **Pharmacological Biochemical Behavior**, v. 77, n. 3, p. 557-566, 2004.
- BRANDÃO, M. L.; ANSELONI, V. Z.; PANDÓSSIO, J. E.; DE ARAÚJO, J. E.; CASTILHO, V. M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience Behavior Revised**, v. 23, p. 863-875, 1999.
- BRANDÃO, M. L.; BORELLI, K. G.; NOBRE, M. J.; SANTOS, J. M.; ALBRECHET-SOUZA, L.; OLIVEIRA, A. R.; MARTINEZ, R.C. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. **Neuroscience Biobehavior Revised**, v. 29, n. 8, p. 1299-1311, 2004.

- BRANDÃO, M. L.; CARDOSO, S. H.; MELO, L. L.; MOTTA, V.; COIMBRA, N. C. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 18n. 3, p 339-346, 1994.
- BRANDÃO, M. L.; DI SCALA, G. M.; BOUCHET, J.; SCHMITT, P. Escape Behavior Produced by the Blockade of Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) in Mesencephalic Central Gray or Medial Hypothalamus. **Pharmacological and Biochemical Behavior**, v. 24, p. 497-501, 1986
- BRANDÃO, M. L.; TRONCOSO, A. C.; DE SOUZA SILVA, M. A.; HUSTON, J. P. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: Empirical and conceptual considerations. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 225-233, 2003.
- BRANDÃO, M. L.; ZANOVELI, J. M.; RUIZ-MARTINEZ, R. C.; OLIVEIRA, L. C.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. **Behavioral Brain Research**, v. 188, n. 1, p. 1-13, 2008.
- CALCAGNETTI D. J.; ROBIN L. C.; MICHAEL S. F. Centrally administered opioid antagonists, nor-binaltorphimine, 16-methyl cyprenorphine and MR2266, suppress intake of a sweet solution. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 35, p. 69-73, 1989.
- CALVINO, B.; GRILO, R. M. Central pain control, **Joint Bone Spine**, v. 73, n. 1, p. 10-16, 2006.
- CALVO, F.; LOBÃO-SOARES, B.; DE FREITAS, R. L.; PASCHOALIN-MAURIN, T.; DOS ANJOS-GARCIA, T.; MEDEIROS, P.; DA SILVA, J. A.; LOVICK, T. A.; COIMBRA, N. C. The endogenous opioid system modulates defensive behavior evoked by *Crotalus durissus terrificus*: Panicolytic-like effect of intracollicular non-selective opioid receptors blockade. *J Psychopharmacol*. 2018
- CANTERAS, N. S. Critical analysis of the neural systems organizing innate fear responses. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo , v. 25, n. 2, p. 21-24, 2003.
- CANTERAS, N. S.; GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. **Neuroreport**, v. 10, n. 2, p. 413-418, 1999.
- CANTERAS, N. S.; MOTA-ORTIZ, S. R.; MOTTA, S. C. What ethologically based models have taught us about the neural systems underlying fear and anxiety. **Brazilian Journal of Medicine Biological**, v. 45, n. 4, p. 321-327, 2012.

- CARLI, G. Sub-cortical mechanisms of rabbit hypnosis. **Archives Italiennes de Biologie**, v. 109, p. 15-26, 1971.
- CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. **Behavioral Brain Research**, v. 58, n. 1-2, p. 27-47, 1993.
- CASTILHO, V. M.; AVANZI, V.; BRANDÃO, M. L. Antinociception elicited by aversive stimulation of the inferior colliculus. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 62, n. 3, p. 425-431, 1999.
- CASTILHO, V. M.; AVANZI, V.; BRANDÃO, M. L. Antinociception elicited by aversive stimulation of the inferior colliculus. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 62, n. 3, p. 425-431, 1999.
- CASTILHO, V. M.; BRANDÃO, M. L. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT_{2A} receptors in rats. **Psychopharmacology**, v. 155, p. 154-162, 2001.
- CHANCE, W. T.; KRYNOCK, G. M.; ROSECRANS, J. A. Effects of medial raphe and raphe magnus lesions on the analgesic activity of morphine and methadone. **Psychopharmacology**, v. 56, n. 2, p. 133-137, 1978.
- COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. Effects of 5-HT₂ receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. **Behavioural Brain Research**, v. 87, p. 97-103, 1997.
- COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. **Behavioural Brain Research**, v. 59, n. 1-2, p.131-139, 1993.
- COIMBRA, N. C.; CALVO, F.; ALMADA, R. C.; FREITAS, R. L.; PASCHOALIN-MAURIN, T.; DOS ANJOS-GARCIA, T. ELIAS-FILHO, D. H.; UBIALI, W. A.; LOBÃO-SOARES, B.; TRACEY, I. Opioid neurotransmission modulates defensive behavior and fear-induced antinociception in dangerous environments. *Neuroscience*, v. 354, p. 178-195, 2017.
- COIMBRA, N. C.; DE OLIVEIRA, R.; FREITAS, R. L.; RIBEIRO, S. J.; BORELLI, K. G.; PACAGNELLA, R. C.; MOREIRA, J. E.; DA SILVA, L. A.; MELO, L. L.; LUNARDI, L. O.; BRANDÃO, M. L. Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray

- matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. **Experimental Neurology**, v. 197, p. 93–112, 2006.
- COIMBRA, N. C.; OSAKI, M. Y.; EICHENBERGER, G. C.; CISCATO, J. G. JR.; JUCÁ, C. E.; BIOJONE, C. R. Effects of opioid receptor blockade on defensive behavior elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior colliculus in *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). **Psychopharmacology**, v. 152, n. 4, p. 22-30. 2000.
- COIMBRA, N. C.; TOMAZ, C.; BRANDÃO, M. L. Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum. **Behavioural Brain Research**, v. 50, p. 77-83. 1992.
- COLASANTI A.; RABINER E. A.; LINGFORD-HUGHES A.; NUTT D. J. Opioids and Anxiety. **Psychopharmacology**, 2010.
- COLLIER, A. C.; BOLLES, R. C. The ontogenesis of defensive reactions to shock in preweanling rats. **Developmental Psychobiology**, v. 13, p. 141-150, 1980.
- COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, N. S. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. **Behavioural Brain Research**, v. 138, p. 17-28, 2003.
- CONTI, F.; FABRI, M.; MANZONI, T. Immunocytochemical evidence for glutamatergic cortico-cortical connections in monkeys, **Brain Research**, v. 462, n. 1, p. 148-153, 1988.
- COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, n. 1, p. 1-32. 2009.
- CRIPPA, J. A. S.; UCHIDA, R.; BUSATTO, G. F.; GUIMARÃES, F. S.; DEL-BEN, C. M.; ZUARDI, A. W. SANTOS, A. C.; ARAÚJO, D.; MCGUIRE, P. K.; GRAEFF, F. G. The size and prevalence of the cavum septum pellucidum are normal in subjects with panic disorder. **Brazilian Journal of Medicine Biological**, v. 37, n. 3, p. 371-374, 2004.
- DA SILVA, J. A.; ALMADA, R. C.; DE FIGUEIREDO, R. M.; COIMBRA, N. C. Blockade of synaptic activity in the neostriatum and activation of striatal efferent pathways produce opposite effects on panic attack-like defensive behaviours evoked by GABAergic disinhibition in the deep layers of the superior colliculus. *Physiol Behav*, v. 196, p. 104-111, 2018.

- DA SILVA, J. A.; BIAGIONI, A. F.; ALMADA, R. C.; DE SOUZA CRIPPA, J. A.; HALLAK, C. J. E.; ZUARDI, A. W.; COIMBRA, N. C. Dissociation between the panicolytic effect of cannabidiol microinjected into the substantia nigra, pars reticulata, and fear-induced antinociception elicited by bicuculline administration in deep layers of the superior colliculus: The role of CB1-cannabinoid receptor in the ventral mesencephalon. **European Journal of Pharmacology**, v. 758, p. 153-163, 2015.
- DA SILVA SOARES, J. R.; FALCONI-SOBRINHO, L. L.; DOS ANJOS-GARCIA, T.; COIMBRA, N. C. 5-Hydroxytryptamine 2A receptors of the dorsal raphe nucleus modulate panic-like behaviours and mediate fear-induced antinociception elicited by neuronal activation in the central nucleus of the inferior colliculus. **Behavioural Brain Research**, v. 357-358, p. 71-81, 2019.
- DARWIN, C. R. The expression of the emotions in man and animals. **London: John Murra**, v. 1, 1872.
- 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**, v. 183, n. 4, p. 422-428, 2006.
- DE GRAAF, L.; VAN PUIJENBROEK, E. P. Serotonin reuptake inhibitors and shocklike paresthesia. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 64, n. 8, p. 969-971, 2003.
- DE LUCA, M. C.; BRANDÃO, M. L.; MOTTA, V. A.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Antinociception induced by stimulation of ventrolateral periaqueductal gray at the freezing threshold is regulated by opioid and 5-HT_{2A} receptors as assessed by the tail-flick and formalin tests. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 2, p. 459-466, 2003.
- DE OCA, B. M.; DE COLA, J. P.; MAREN, S.; FANSELOW, M. S. Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. **Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 3426-3432, 1998.
- DE OLIVEIRA, R.; DE OLIVEIRA, R. C.; FALCONI-SOBRINHO, L. L.; DA SILVA SOARES JR, R.; COIMBRA, N. C. 5-Hydroxytryptamine_{2A/2C} receptors of nucleus raphe magnus and gigantocellularis/paragigantocellularis pars α reticular nuclei modulate the unconditioned fear-induced antinociception evoked by electrical stimulation of deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal grey matter. **Behavioural Brain Research**, v. 316, p. 294-304, 2017.

- DE RIDDER, D.; VANNESTE, S.; PLAZIER, M.; VANDERLOO, E.; MENOVSKY, T. Burst spinal cord stimulation: toward paresthesia-free pain suppression. **Neurosurgery**, v. 66, n. 5, p. 986-990, 2010.
- DEAN, J. B.; PUTNAM, R. W. The caudal solitary complex is a site of central CO(2) chemoreception and integration of multiple systems that regulate expired CO(2). **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 173, n. 3, p. 274-287, 2010.
- DEL-BEN, C. M, GRAEFF, F. G. Panic disorder: is the PAG involved? **Neural Plasticity**, p. 108-135, 2009.
- DEPAULIS, A.; VERGNES, M. Elicitation of conspecific attack or defense in the male rat by intraventricular injection of a GABA agonist or antagonist. **Physiology & Behavior**, v. 35, n. 3, p. 447-453, 1985.
- DOGRUL, A.; GUL, H.; AKAR, A.; YILDIZ, O.; BILGIN, F.; GUZELDEMIR, E. Topical cannabinoid antinociception: Synergy with spinal sites. **Pain**, v. 105, p. 11-16, 2003.
- DRATCU, L.; LADER, M. Ansiedade: conceito, classificação e biologia: uma interpretação contemporânea da literatura. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria.**, v. 42, n. 1, p. 19-32, 1993.
- DRAY, A. L.; URBAN, A. D. Pharmacology of chronic pain. **Trends Pharmacological**, v. 15, p. 190-197, 1994.
- EICHENBERGER, G. C. D.; RIBEIRO, S. J.; OSAKI, M. Y.; MARUOKA, R. Y.; RESENDE, G. C. C.; CASTELLAN-BALDAN, L.; CORRÊA, S. A L.; DA SILVA, L. A; COIMBRA, N. C. 2002 - Neuroanatomical and psychopharmacological evidences for interactions between opioid and GABAergic neural pathways in the modulation of the defensive behavior elicited by electrical and chemical stimulation of the dorsal mesencephalon. **Neuropharmacology**, v. 42, p. 48-59, 2002.
- ERSPAMER, V.; ASERO, B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. **Nature**, 1952.
- FANSELOW, M. S. Conditioned and unconditioned components of post-shock freezing. **Pavlovian Journal of Biological Sciences**, v. 15, p. 177-182, 1980.
- FANSELOW, M. S. Conditioned fear-induced opiate analgesia. A competing motivational state theory of stress-analgesia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 467, p. 40-54, 1986.
- FANSELOW, M. S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In **A. Despaulis & R. Bandler (Eds.)**, The midbrain periaqueductal gray matter, p. 151-173, 1991.

- FANSELOW, M. S. The postshock activity burst. **Animal Learning & Behavior**, v. 10, p. 448-454, 1982.
- FANSELOW, M. S., KIM, J. J. The benzodiazepine inverse agonist DMCM as an unconditional stimulus for fear-induced analgesia: implications for the role of GABA_A receptors in fear-related. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, n. 2, p. 336-344, 1992.
- FANSELOW, M. S.; & HELMSTETTER, F. J. Conditional analgesia, defensive freezing, and benzodiazepines. **Behavioral Neuroscience**, v. 102, p. 233-243, 1988.
- FANSELOW, M. S.; BAACKES, M. P. Conditioned fear-induced opiate analgesia in the formalin test: Evidence for two aversive motivational systems. **Learning & Motivation**, v. 13, p. 200-221, 1980.
- FANSELOW, M. S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; DECOLA, J. P.; KIM, J. J. The immediate-shock deficit and postshock analgesia: Implications for the relationship between the analgesic CR and UR. **Animal Learning & Behavior**, v. 22, p. 72-76, 1994.
- FARDIN, V.; OLIVEIRAS, J. L.; BESSON, J. M. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat I. The production of behavioral side effects together with analgesia. **Brain Research**, v. 306, p. 105-123, 1984.
- FELIX DOS SANTOS, D.; KIHARA, A.; PASCHON, V. MEMÓRIA: Por que não nos recordamos de nossa primeira infância? **Nanocell News**, v. 1, n. 15, p. 10 - 15.
- FERNANDEZ-DE-MOLINA, A.; HUNSPERGER, R. W. Central representation of affective reaction in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis and adjacent structures. **The Journal of Physiology**, v. 145, p. 251-265, 1959.
- FERREIRA-NETTO, C.; BORELLI, K. G.; BRANDÃO, M. L. Neural segregation of Fos-protein distribution in the brain following freezing and escape behaviors induced by injections of either glutamate or NMDA into the dorsal periaqueductal gray of rats. **Brain Research**, v. 1031, n. 2, p. 151-163, 2005.
- FIELDS H. L.; BUDAI, I. D.; HARASAWA D. Midbrain Periaqueductal Gray (PAG) Inhibits Nociceptive Inputs to Sacral Dorsal Horn Nociceptive Neurons Through α 2-Adrenergic Receptors. **Journal of Neurophysiology**, v. 80, n. 5, p. 2244-2254, 1998.
- FIELDS H.; BASBAUM, A. J.; MITCHELL, J. M. A locus and mechanism of action for associative morphine tolerance. **Natural Neuroscience**, v. 3, p. 47-53, 2000.

- FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I.; CLANTON, C. H. Nucleus raphe magnus inhibition of spinal cord dorsal horn neurons. **Brain Research**, v. 126, p. 441-453, 1977.
- GRAEFF, F. G., DEL-BEN, C. M. Neurobiology of panic disorder: from animal models to brain neuroimaging. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 7, p. 1326-35 2005.
- GRAEFF, F. G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacol**, v. 163, p. 467-476, 2002.
- GRAEFF, F. G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 239-259, 2004.
- GRAEFF, F. G.; AUDI, E. A.; ALMEIDA, S. S.; GRAEFF, E. O.; HUNZIKER, M. H. Behavioral effects of 5-HT receptor ligands in the aversive brain stimulation, elevated plus-maze and learned helplessness tests. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 14, p. 501-506, 1990.
- GRAEFF, F. G.; NETTO, C. F.; ZANGROSSI JR, H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 237-246, 1998.
- GRAEFF, F. G.; PARENTE, A. DEL-BEN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Pharmacology of human experimental anxiety. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 421-432, 2003.
- GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. **Oxford University Press**, 2000.
- GROSS, J. J.; JOHN, O. P. Healthy and Unhealthy Emotion Regulation: Personality Processes, Individual Differences, and Life Span Development. **Journal of Personality**, v. 72, p. 1301-1334, 2004.
- GUIMARÃES-COSTA, R.; GUIMARÃESCOSTA, M.B.; PIPPA-GADIOLI, L. Innate defensive behaviour and panic-like reactions evoked by rodents during aggressive encounters with Brazilian constrictor snakes in a complex labyrinth: Behavioural validation of a new model to study affective and agonistic reactions in a prey versus predator paradigm. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 165, p. 25-37, 2007.
- HAMILTON, B.L. Citoarchitectural subdivisions of the periaqueductal gray matter in the cat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 149, p. 1-128, 1973.
- HELMSTETTER, F. J.; FANSELOW, M. S.; CALCAGNETTI, D. J. Modulation of appetitively and aversively motivated behavior by the kappa opioid antagonist MR2266. **Behavioral Neuroscience**, v. 103, p. 3, p. 663-672, 1989.

- HEN, R.; GROSS, C. Genetic and environmental factors Interact to influence anxiety. **Neurotoxicity Research**, v. 6, n. 1-2, p. 493-501, 2004.
- HESS, W.; BRUGER, M. As subkortikale zentrum der affektiven abwereaktion. **Helvetica Physiol Pharmacol Acta**, v. 1, p. 33-52, 1943.
- HETEM, L. A.; DE SOUZA, C. J.; GUIMARÃES, F. S.; ZUARDI, A. W.; GRAEFF, F. G. Effect of d-fenfluramine on human experimental anxiety. **Psychopharmacology**, v. 127, p. 276-282, 1996.
- HOGG, S.; MICHAN, L.; JESSA, M. Prediction of anti-panic properties of escitalopram in the dorsal periaqueductal grey model of panic anxiety. **Neuropharmacology**, v. 51, n. 1, p. 141-145, 2006.
- HOSOBUCHI, Y.; ADAMS, J. E.; LINCHITZ, R. Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone. **Science**, v. 197, n. 4299, p. 183-186, 1977.
- HUNSPERGER, R. W. Affektreaktionen auf elektrische Reizung in Hirnstamm der Katze **Helvetica Physiol Pharmacol Acta**, v. 14, p. 70-92, 1956.
- JOHNSON, P. L.; FITZ, S. D.; HOLLIS, J. H.; MORATALLA, R.; LIGHTMAN, S. L.; SHEKHAR, A.; LOWRY, C. A. Induction of c-Fos in 'panic/defence'-related brain circuits following brief hypercarbic gas exposure. **Journal of Psychopharmacology**, 2010.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. L. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.
- JÜRGENS, U.; PRATT, R. Role of the periaqueductal grey in vocal expression of emotion. **Brain Research**, v. 167, p. 367-378, 1979.
- KARTALCI, S.; DOGAN, M.; UNAL, S.; OZCAN, A.C.; OZDEMIR, S.; ATMACA, M. Pituitary volume in patients with panic disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 35: 203-207, 2001.
- KELLY, D. D. Stress induced analgesia. **NY Academy of Sciences**, New York, 1986
- KIYATKIN, E. A. Nociceptive sensitivity behavioral reactivity regulation in rats during aversive states of different nature: its mediation by opioid peptides. **International Journal of Neuroscience**, v. 44, p. 91-110, 1989.
- KRYNOCK, G. M.; CHANCE, W. T.; WHITE, A. C.; ROSECRANS, J. A. Investigation of pituitary influences on auto analgesia. **Psychoneuroendocrinology**, v. 4, p. 199-205, 1978.

- KUKOLJA, J.; THIEL, C. M.; WOLF, O. T. e FINK, G. R. Increased cortisol levels in cognitively challenging situations are beneficial in young but not older subjects. **Psychopharmacology**, 2008.
- LE BARS, C.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597 – 652, 2001.
- LEDOUX, J. E. **O cérebro emocional: os misteriosos alicerces da vida emocional**. Rio de Janeiro: Objetiva, p. 94-125, 2001.
- LEE, H. S.; KIM, M. A., WATERHOUSE, B. D. Retrograde double-labeling study of common afferent projections to the dorsal raphe nucleus and the nuclear core of the *locus coeruleus* in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 481, p. 179-193, 2006.
- LEITE, J. R.; SEABRA, M. L.; SARTORI, V. A.; ANDREATINI R. The video-recorded Stroop Color-Word Test as a new model of experimentally-induced anxiety. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.23, p. 809-822, 1999.
- LEITE-PANISSI, C. R. A; COIMBRA, N. C.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. The cholinergic stimulation of the central amygdala modifying the tonic immobility response and antinociception in guinea pigs depends on the ventrolateral periaqueductal gray. **Brain Research Bulletin**, v. 60, p. 167-178, 2003.
- LIEBESKIND, J. C.; GUILBAL, G.; BESSON, J. M.; OLIVERAS, J. L. Analgesia from electrical stimulation of the periaqueductal gray matter in the cat: Behavioral observations and inhibitory effects on spinal cord interneurons. **Brain Research**, v. 50, p. 441-446, 1973.
- LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 46, n. 3, p. 321-340, 1990.
- LOBÃO-SOARES, B.; WALZ, R.; PREDIGER, R. D. S.; FREITAS, R. L.; CALVO, F.; BIANCHIN, M. M.; LEITE, J. P.; LANDEMBERGER, M. C.; COIMBRA, N. C. Cellular prion protein modulates defensive attention and innate fear-induced behaviour evoked in transgenic mice submitted to an agonistic encounter with the tropical coral snake *Oxyrhopus guibei*. **Behavioural Brain Research**, v. 194, p. 129-137, 2008.
- LOVICK, T. A. Interactions between descending pathways from the dorsal and ventrolateral periaqueductal gray matter in the rat. eds. **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Immunohistochemical Organization**. Plenum Publishing Corporation. New York, 1991. In: Depaulis, A.; Bandler, R.,

- LOVICK, T. A. Selective modulation of the cardiovascular response but not the antinociception evoked from the dorsal PAG, by 5-HT in the ventrolateral medulla. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, n. 1-2, p. 222-224, 1990.
- 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. **NeuroReport**, v. 14, n. 12, p. 1641-1644, 2003.
- MANTYH, P. W. Forebrain projections to the periaqueductal gray in the monkey, with observation in the cat and rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 206, p. 146-158, 1982b.
- MANTYH, P. W. The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat, and monkey: a Nissi, Meil, and Golgi analysis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 204, p. 349-263, 1982a.
- MARTINE, C.; JACQUES, C. Influence of some biologically meaningful odorants on the vigilance states of the rat. **Physiology & Behavior**, v. 23, n. 5, p. 831-838, 1979.
- MELZACK, R.; WALL, P. D.; TY, T. C. Acute pain an emergency clinic latency of onset and descriptor pattenus related to diferente injuriez. **Pain**, v. 14, p. 33-43, 1982.
- MENDES-GOMES, J.; AMARAL, V. C.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Ventrolateral periaqueductal gray lesion attenuates nociception but does not change anxiety-like indices or fear-induced antinociception in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 219, n. 2, p. 248-253, 2011.
- MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L.; HOFFMANN, A. The parabrachial region as a possible region modulating simultaneously pain and tonic immobility. **Behavioural Brain Research**, v. 56, p. 127-132, 1993.
- MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 355-474, 2002.
- MOLCHANOV, M. L.; GUIMARÃES, F. S. Defense reaction induced by a metabotropic glutamate receptor agonist microinjected into the dorsal periaqueductal gray of rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 12, p. 1533-1537, 1999.
- MONASSI, C. R.; LEITE-PANISSI, C. R. A.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Role of amygdaloid nuclei in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. **Physiology & Behavior**, v. 67, p. 717-724, 1999.

- MORGAN, M. M.; LIEBESKIND, J. C. Site specificity in the development of tolerance to stimulation-produced analgesia from the periaqueductal gray matter of the rat. **Brain Research**, v. 425, p. 356-359, 1987.
- NASHOLD JR, B. S.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **Journal of Neurosurgery**, v. 30, n. 1, p. 14-24, 1969.
- NEUGEBAUER, V.; GALHARDO, V.; MAIONE, S.; MACKEY, S.C. Forebrain pain mechanisms. **Brain Research**, v. 60, n. 1, p. 226–242, 2009.
- NICHOLS, D. S.; THORN, B. E.; BERSTSON, G. G. Opiate and serotonergic mechanisms of stimulation-produced analgesia within the periaqueductal gray. **Brain Research Bulletin**, v. 22, p. 717-724, 1989.
- NISHIMURA, Y.; TANII, H.; HARA, N.; INOUE, K.; NISHIDA, A.; OKADA, M.; KAIYA, H.; OKAZAKI, Y. Specific panic attack symptoms in panic disorder patients with putative genetic factor. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 63, p. 251-252, 2009.
- NOBRE, M. J.; LOPES, M. G.; BRANDÃO, M. L. Defense reaction mediated by NMDA mechanisms in the inferior colliculus is modulated by GABAergic nigro-collicular pathways. **Brain Research**, v. 999, n. 1, p. 124-31, 2004.
- NUNES-DE-SOUZA, R. L.; MIGUEL, T. T.; GOMES, K. S.; FUGIMOTO, J. S.; MENDES-GOMES, J.; AMARAL, V. C. S.; DE CARVALHO-NETTO, E. F. 2010 - Role of nitric oxide in the periaqueductal gray in defensive behavior in mice: influence of prior local N-methyl-D-aspartate receptor activation and aversive condition. **Psychology & Neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 2010.
- OSAKI M. Y.; CASTELLAN-BALDAN, L.; CALVO, F.; CARVALHO, A. D.; FELIPPOTTI, T. T.; DE OLIVEIRA, R.; UBIALI, W. A.; PASCHOALIN-MAURIN, T.; ELIAS-FILHO, D. H.; MOTTA, V.; DA SILVA, L. A.; COIMBRA, N. C. Neuroanatomical and neuropharmacological study of opioid pathways in the mesencephalic tectum: effect of μ_1 - and κ -opioid receptor blockade on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Brain Research**, v. 992, n. 2, p. 179-192, 2003.
- PALÁCIOS, J. M. Distribution of serotonin receptor. **Annual New York Academic Science**, v. 600, p. 63-152, 1990.
- PANKSEPP, J. Toward a general psychobiology theory of emotions. **Behavioral Brain Science**, v. 5p. 407-467, 1982.

- PAPP, L. A.; KLEIN, D. F.; GORMAN, J. M. Carbon dioxide hypersensitivity, hyperventilation, and panic disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 150, n. 8, p. 1149-57, 1993.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain: In Estereotaxic Coordinates**. Academic Press, Sidney. 2007
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.
- PEREIRA, E. A.; LU, G.; WANG, S.; SCHWEDER, P. M.; HYAM, J. A.; STEIN, J. F.; PATERSON, D. J.; AZIZ, T. Z.; GREEN, A. L. Ventral periaqueductal grey stimulation alters heart rate variability in humans with chronic pain. **Experimental Neurology**, v. 223, n. 2, p. 574-81, 2010.
- PEREIRA, E. A.; WANG, S.; PEACHEY, T.; LU, G.; SHLUGMAN, D.; STEIN, J. F.; AZIZ, T. Z.; GREEN, A. L. Elevated gamma band power in humans receiving naloxone suggests dorsal periaqueductal and periventricular gray deep brain stimulation produced analgesia is opioid mediated. **Experimental Neurology**, v. 239, p. 248-255, 2013.
- POLTRONIERI, S. C.; ZANGROSSI JR, H.; DE BARROS VIANA, M. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 147, n. 1-2, p. 185-192, 2003.
- PRAHARAJ, S. K.; ARORA, M. Sertraline-induced facial paresthesia. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 27, n. 6, p. 725, 2007.
- PRETER, M.; LEE, S. H.; PETKOVA, E.; VANNUCCI, M.; KIM, S.; KLEIN, D. F. Controlled cross-over study in normal subjects of naloxone-preceding-lactate infusions; respiratory and subjective responses: relationship to endogenous opioid system, suffocation false alarm theory and childhood parental loss. **Psychological Medicine**, v. 41, n. 2, p. 385-393, 2011.
- PRICE, J. S.; WALLER, P. C.; WOOD, S. M.; MACKAY, A. V. A comparison of the post-marketing safety of four selective serotonin re-uptake inhibitors including the investigation of symptoms occurring on withdrawal. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, n. 6, p. 757-763, 1996.
- RANGEL, M.P.; ZANGROSSI JR, H.; RONCON, C. M.; GRAEFF, F. G.; AUDI, E. A. Interaction between μ -opioid and 5-HT_{1A} receptors in the regulation of panic-related

- defensive responses in the rat dorsal periaqueductal grey. **Journal of Psychopharmacology**, v. 28, n. 12, p. 1155-1160, 2014.
- REIMER, A. E.; DE OLIVEIRA, A. R.; BRANDÃO, M. L. Glutamatergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray matter modulate the expression of conditioned freezing and fear-potentiated startle. **Neuroscience**, v. 219, p. 72–81, 2012.
- RESSTEL, L. B.; MOREIRA, F. A.; GUIMARÃES, F. S. Endocannabinoid system and fear conditioning. **Vitamins and Hormones**, v. 81, p. 421-440, 2009.
- REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v. 25, n. 164, p. 444-445, 1969.
- RIBEIRO, L.; BUSNELLO, J. V.; KAUER-SANT'ANNA, M.; MADRUGA, M.; QUEVEDO, J.; BUSNELLO, E. A.; KAPCZINSKI, F. Mirtazapine versus fluoxetine in the treatment of panic disorder. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 10, p. 1303-1307, 2001.
- RIBEIRO, S. J.; CISCATO, J. G. Jr.; DE OLIVEIRA, R.; DE OLIVEIRA, R. C.; D'ANGELO-DIAS, R.; CARVALHO, A. D.; FELIPPOTTI, T. T.; REBOUÇAS, E. C.; CASTELLAN-BALDAN, L.; HOFFMANN, A.; CORRÊA, S. A.; MOREIRA, J. E.; COIMBRA, N. C. Functional and ultrastructural neuroanatomy of interactive intratectal/tectonigral mesencephalic opioid inhibitory links and nigrotectal GABAergic pathways: involvement of GABAA and mu1-opioid receptors in the modulation of panic-like reactions elicited by electrical stimulation of the dorsal midbrain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 30, n. 4, p. 184-200, 2005.
- RIZVI, T. A.; ENNIS, M.; BEHBEHANI, M. M.; SHIPLEY, M. T. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 303, n. 1, p. 121-131, 1991.
- RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. **Ethology and Psychopharmacology**, Wiley, Chichester, p. 9-44, 1994.
- RONCON, C. M.; ALMADA, R.C.; MARASCHIN, J.C.; AUDI, E. A.; ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F. G.; COIMBRA, N. C. Pharmacological evidence for the mediation of the panicolytic effect of fluoxetine by dorsal periaqueductal gray matter μ -opioid receptors. **Neuropharmacology**, v. 99, p. 620-626, 2015.
- RONCON, C.M.; BIESDORF, C.; SANTANA, R. G.; ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F. G.; AUDI, E. A. The panicolytic-like effect of fluoxetine in the elevated T-maze is mediated by serotonin-induced activation of endogenous opioids in the dorsal periaqueductal grey. **Journal of Psychopharmacology**, v. 26, n. 4, p. 525-531, 2012.

- ROSEN, J. B. The neurobiology of conditioned and unconditioned fear: a neurobehavioral system analysis of the amygdala. **Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews**, v. 3, n. 1, p. 23-41, 2004.
- ROY-BYRNE, P.; STEIN, M.; BYSTRISKY, A.; KATON, W. Pharmacotherapy of panic disorder: proposed guidelines for the family physician. **The Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 11, n. 4, p. 282-290, 1998.
- SANTOS, Y. F. **Papel do complexo receptor glutamato/NMDA e óxido nítrico no corno dorsal da medula espinal da antinocicepção induzida pelo medo**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. Brasil. 2010.
- SCHENBERG, L. C.; PÓVOA, R. M. F.; COSTA, A. L.; CALDELLAS, A. V.; TUFIK, S.; BITTENCOURT, A. S. Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1279-1298, 2005.
- SELA, V. R.; RONCON, C. M. Pindolol potentiates the panicolytic effect of paroxetine in the elevated T-maze. **Life Science**, v. 87, n. 13-14, p. 445-50, 2010.
- SHIPLEY, M. T.; ENNIS, M.; RIZVI, T. A.; BEHBEHANI, M. M. Topographical specificity of forebrain inputs to the midbrain periaqueductal gray: evidence for discrete longitudinally organized input columns. In: **The midbrain Periaqueductal Gray Matter: functional, Anatomical and Immunohistochemical Organization**. New York, 1991. p. 417-448.
- STEIN, D. J.; DAVIDOWA, A.; ALBRECHT, D. 5-HT(1A) receptor-mediated inhibition and 5HT(2) as well as 5-HT(3) receptor-mediated excitation in different subdivisions of the amygdala. **Synapse**, v. 38, p. 328-337, 2000.
- TALLMAN, J. F.; PAUL, S. M.; SKOLNICK, P.; GALLAGER, D. Receptors for the age of anxiety: Pharmacology of the benzodiazepines. **Science**, v. 207, n. 4428, p. 274-281, 1980.
- TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 9, n. 2, p. 203-222, 1985.
- ULLAH, F.; DOS ANJOS-GARCIA, T.; DOS SANTOS, I. R.; BIAGIONI, A. F.; COIMBRA, N. C. Relevance of dorsomedial hypothalamus, dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal gray matter in the organization of freezing or oriented and non-oriented escape emotional behaviors. **Behavioural Brain Research**, v. 293, p. 143-52, 2015.

- ULLAH, F.; DOS ANJOS-GARCIA, T.; MENDES-GOMES, J.; ELIAS-FILHO, D. H.; FALCONI-SOBRINHO, L. L.; FREITAS, R. L.; KHAN, A. U.; OLIVEIRA, R.; COIMBRA, N. C. Connexions between the dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal grey matter are critical in the elaboration of hypothalamically mediated panic-like behaviour. **Behavioural Brain Research**, v. 319, p. 135-147, 2017.
- URIBE-MARIÑO, A.; FRANCISCO, A.; CASTIBLANCO-URBINA, M. A.; TWARDOWSCHY, A.; SALGADO-ROHNER, C. J.; CRIPPA, J. A. S.; HALLAK, J. E. C.; ZUARDI, A. W.; COIMBRA, N. C. Anti-aversive effects of cannabidiol on innate fear-induced behaviors evoked by an ethological model of panic attacks based on a prey vs the wild snake *Epicrates cenchria crassus* confrontation paradigm. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 2, p. 412-421, 2012.
- VIANNA, D. M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M. L. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 711–719, 2001.
- VIANNA, D. M.; BORELLI, K. G.; FERREIRA-NETTO, 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**, v. 62, n. 3, p. 179-189, 2003.
- VIANNA, D. M.; BRANDÃO, M. L. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 5, p. 557-566, 2003.
- WANG, S. M.; YEON, B.; HWANG, S.; LEE, H. K.; KWEON, Y. S.; LEE, C. T.; CHAE, J. H.; LEE, K. U. Threat-induced autonomic dysregulation in panic disorder evidenced by heart rate variability measures. **General Hospital Psychiatry**, v. 35, n. 5, p. 497-501, 2013.
- WATKINS, L. R.; MAYER, D. J. Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems. **Science**, v. 216, p. 1185-1192, 1982.
- WILENT, W. B.; OH, M. Y.; BUETEFISCH, C. M.; BAILES, J. E.; CANTELLA, D.; ANGLE, C.; WHITING, D. M. Induction of panic attack by stimulation of the ventromedial Hypothalamus. **Journal of Neurosurgery**, v. 112, p. 1295–1298, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The ICD-10 classification of mental and behavioral disorders. Clinical descriptions and diagnostic guidelines** World Health Organization, Geneva, 1992.

- YAKSH, T. L.; YEUNG, J. C.; RUDY, T. A. Systematic examination in the rat of brain sites sensitive to the direct application of morphine: observation of differential effects within the periaqueductal gray. **Brain Research**, v. 10, p. 83–103, 1976.
- ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, JR, H. 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. **Behavioural Pharmacology**, v. 16, n. 7, p. 543-552, 2005.
- ZANOVELI, J. M.; POBBE, R. L.; DE BORTOLI, V. C.; CARVALHO, M. C.; BRANDÃO, M. L.; ZANGROSSI JR, H. Facilitation of 5-HT_{1A}-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 8, p. 1079-1088, 2010.
- ZHANG, W.; HAYWARD, L. F.; DAVENPORT, P. W. Respiratory responses elicited by rostral versus caudal dorsal periaqueductal gray stimulation in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 134, p. 45-54, 2007.

Anexo 1

Tabela representativa da media do peso dos animais (N= 8 por grupo) durante tratamento crônico (21 dias) com paroxetina nas doses de 10 mg/kg, 20 mg/ kg ou 40 mg/kg.

Dia	Droga			
	Salina	Paroxetina 10 mg	Paroxetina 20 mg	Paroxetina 40 mg
1	150	150	150	150
2	152	152	152	152
3	154	152	152	152
4	159	155	155	155
5	162	163	157	159
6	166	167	157	160
7	179	179	159	171
8	191	185	163	172
9	208	198	168	175
10	218	203	171	179
11	231	201	180	181
12	245	211	189	181
13	241	216	185	179
14	271	221	198	191
15	290	229	203	208
16	312	251	215	218
17	315	267	231	216
18	323	284	265	219
19	341	291	286	224
20	360	313	291	227
21	369	348	319	231
22	351	318	297	209