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

Envolvimento de mecanismos GABAérgicos da substância cinzenta periaquedutal dorsal e do colículo inferior no medo condicionado e incondicionado

Adriano Edgar Reimer

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letra de Ribeirão Preto – USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Psicobiologia.

RIBEIRÃO PRETO
-2008-

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

Envolvimento de mecanismos GABAérgicos da substância cinzenta periaquedutal dorsal e do colículo inferior no medo condicionado e incondicionado

Adriano Edgar Reimer

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letra de Ribeirão Preto – USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Psicobiologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão

RIBEIRÃO PRETO
-2008-

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL E PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Reimer, Adriano Edgar
Envolvimento de mecanismos GABAérgicos da substância cinzenta periaquedutal dorsal e do colículo inferior no medo condicionado e incondicionado, Ribeirão Preto, 2008.
71p. :il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP – Área de Concentração: Psicobiologia.
Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão.

1. Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal. 2. Colículo Inferior. 3. GABA. 4. Medo Incondicionado. 4. Medo condicionado. 5. Muscimol. 6. Semicarbazida.

A meus pais, Cristiano e Fatima,
pela confiança e apoio irrestritos.

Dedico.

Ao Prof. Dr. Marcus Lira Brandão, pela orientação, dedicação e exemplo.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura desta dissertação.

Aos amigos de laboratório, pelo convívio e apoio.

À minha irmã Cristiane e minha avó Isabel, pela torcida.

Aos amigos da Faruska, pelo companheirismo e momentos de descontração.

À Amanda Oliveira, pelo auxílio, paciência e por iluminar meu caminho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Agradeço.

RESUMO

A substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) e o colículo inferior (CI) são duas estruturas do teto mesencefálico que, juntamente com a amígdala, o hipotálamo dorsomedial e o colículo superior, estão envolvidas na modulação da expressão comportamental dos estados de medo. A estimulação química ou elétrica destas estruturas produz uma série de respostas comportamentais defensivas. Além disso, dados comportamentais com modelos animais de ansiedade têm fornecido evidências da existência de uma regulação inibitória tônica GABAérgica na SCPd e CI. Neste estudo investigamos o envolvimento da neurotransmissão GABAérgica na expressão do medo condicionado e do medo incondicionado. Para isso, os efeitos da administração de muscimol (agonista GABA-A) e semicarbazida (inibidor da descarboxilase do ácido glutâmico) na SCPd e CI foram analisados no teste do sobressalto potencializado pelo medo, na resposta de congelamento condicionada, nos limiares de congelamento e fuga determinados por estimulação elétrica dessas estruturas e no congelamento pós-estimulação. No modelo de medo incondicionado, microinjeções de muscimol intra-SCPd reduziram a aversividade da estimulação elétrica, mas não o congelamento pós-estimulação, ao passo que a semicarbazida produziu efeitos pró-aversivos em ambas as condições. O muscimol também causou redução significativa no sobressalto potencializado pelo medo e congelamento condicionado, enquanto que a semicarbazida não alterou essas respostas. Já a microinjeção de ambas as drogas no CI não produziu efeitos no modelo condicionado, mas no teste incondicionado, o muscimol reduziu a aversividade da estimulação elétrica. Esses dados mostram uma participação diferencial de mecanismos GABAérgicos no medo condicionado e incondicionado. Estes mecanismos na SCPd parecem estar envolvidos tanto no medo condicionado quanto no incondicionado, enquanto que no CI eles parecem participar somente do medo incondicionado.

ABSTRACT

The dorsal periqueductal gray (dPAG) and inferior colliculus (IC) are two structures of the midbrain tectum that, together with amygdala, dorsomedial hypothalamus and superior colliculus, are involved in the modulation of the expression of fear-related behaviors. The chemical or electrical stimulation of these structures produces a series of behavioral defensive responses. Moreover, behavioral data from animal models of anxiety have provided evidences of tonic inhibitory GABAergic regulation in dPAG and IC. This study investigated the involvement of GABAergic neurotransmission in the expression of unconditioned and conditioned fear. To this aim, the effects of intra-dPAG and IC administration of muscimol (GABA-A agonist) and semicarbazide (glutamic acid decarboxylase inhibitor) were examined in the fear potentiated startle test, in conditioned freezing, in the thresholds for freezing and escape determined by electrical stimulation of these structures, and in the post-stimulation freezing. In the unconditioned model, intra-dPAG injections of muscimol reduced the aversiveness of the electrical stimulation but had no effects on the post-stimulation freezing, while semicarbazide produced aversive-like effects in both conditions. Muscimol also caused significant reduction in fear potentiated startle and conditioned freezing, while semicarbazide had no effect in these responses. In contrast, intra-IC injections of both drugs were ineffective in the conditioned model. In the unconditioned model, however, muscimol reduced the aversiveness of the electrical stimulation. These data show a differential participation of GABAergic mechanisms on conditioned and unconditioned fear. These mechanisms in the dPAG seem to be involved in both conditioned and unconditioned fear, while in IC they seem to participate in unconditioned fear only.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **09**

1.1. MEDO INCONDICIONADO **11**

1.2. MEDO CONDICIONADO **13**

1.3. SUBSTRATO NEURAL DO MEDO NO TETO MESENCEFÁLICO **15**

A – SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL **15**

B – COLÍCULO INFERIOR **17**

1.4. MODULAÇÃO GABAÉRGICA DA REAÇÃO DE DEFESA **19**

2. OBJETIVOS **21**

3. MATERIAL E MÉTODOS **23**

3.1. ANIMAIS **24**

3.2. CIRURGIA **24**

3.3. DROGAS **25**

3.4. MICROINJEÇÕES **25**

3.5. MEDO CONDICIONADO **26**

3.6. MEDO INCONDICIONADO **29**

3.7. HISTOLOGIA **30**

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA **31**

4. RESULTADOS **32**

4.1. LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO **33**

4.2. SCPd **34**

4.3. CI **38**

5. DISCUSSÃO **43**

6. CONCLUSÕES **51**

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **53**

APÊNDICE **61**

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Diante de um estímulo ameaçador que possa comprometer sua integridade física, os animais manifestam um complexo conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de defesa e um estado emocional de medo. Dentre elas, destacam-se a interrupção do comportamento motor em curso, vocalização, midríase, hipersensibilidade a estímulos sensoriais, alterações na freqüência cardíaca, pressão sanguínea e freqüência respiratória, aumento da atenção, além de alterações nas expressões faciais em primatas (DAVIS et al., 1991). Tais respostas defensivas e seus circuitos neurais foram, ao longo do processo evolutivo, sendo selecionados e acabaram por contribuir para o sucesso evolutivo das espécies atualmente existentes.

O comportamento de defesa adotado em uma dada situação de perigo depende da espécie ou gênero do animal, e é determinado pela relação espacial e temporal existente entre o animal e o perigo (FANSELOW, 1996). Entretanto, apesar do comportamento defensivo e da natureza dos sinais de ameaça variarem entre as espécies animais, algumas estratégias comportamentais padronizadas são adotadas em função dos diferentes níveis de ameaça com os quais os animais defrontam-se no seu meio ambiente. Tais ameaças podem ser representadas por um estímulo inato, como um predador ou um agressor da mesma espécie, ou por estímulos aprendidos, que por associação repetida com estímulos dolorosos ou outras sensações igualmente desagradáveis adquirem propriedades aversivas condicionadas (DAVIS et al., 1991; GRAEFF, 1999)

Apesar de sua complexidade, o medo pode ser estudado em laboratório por meio da análise das respostas defensivas exibidas por animais expostos a diversas situações aversivas. Por exemplo, o medo incondicionado pode ser avaliado por meio da exposição do animal ao seu predador natural ou pela estimulação elétrica de estruturas encefálicas que regulam a

resposta defensiva. Por outro lado, o medo condicionado pode ser medido por meio do pareamento de estímulos inicialmente neutros com estímulos incondicionados aversivos (US).

1.1. Medo Incondicionado

A resposta incondicionada de defesa dos roedores pode manifestar-se de diversas maneiras: avaliação de risco, congelamento, ameaça defensiva, ataque defensivo e fuga (CANTERAS, 2003). Estes comportamentos parecem ser expressos de forma similar em várias espécies de mamíferos. O fato de serem incondicionados implica que cada uma destas respostas pode ser induzida sem experiência prévia. De fato, a exposição de ratos ao seu predador natural elicia congelamento motor pronunciado, comportamentos de esquiva e elementos de avaliação de risco, tais como orientação ao predador (CANTERAS, 2003).

Estudos clássicos de Delgado e colaboradores (1954) mostraram que a estimulação elétrica de determinadas regiões do encéfalo levava os animais a realizarem tarefas que interromperiam a mesma, demonstrando a natureza aversiva deste tipo de estimulação. Posteriormente, foi demonstrado que o aumento gradual da estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), hipotálamo medial, camadas profundas do colículo superior e colículo inferior (CI) de ratos induz de modo progressivo respostas de alerta, congelamento e fuga (para revisão ver BRANDÃO et al., 1999, 2003, 2005). No alerta, o animal interrompe qualquer atividade em curso, passando a dirigir sua atenção para o ambiente. O congelamento é caracterizado por uma imobilidade tensa acompanhada de algumas respostas autonômicas, como aumento das freqüências respiratória e cardíaca. Já na fuga, o animal interrompe a imobilidade e engaja-se em um comportamento caracterizado por saltos e corrida (BRANDÃO et al., 2003). Além disso, as respostas emitidas durante a

estimulação elétrica diferem de acordo com a região estimulada, sendo que a estimulação elétrica da SCPd leva a um comportamento de fuga explosiva e pouco coordenada, diferentemente da estimulação do CI, que é caracterizada por uma fuga mais coordenada e menos explosiva (BRANDÃO et al., 2003).

O congelamento, por sua vez, é considerado a reação de defesa mais comum em ratos e camundongos e consiste em uma imobilidade tensa que os animais apresentam em situações ameaçadoras tendo por finalidade impedir de serem vistos pelo predador quando a fuga não é possível. Este comportamento, complexo e coordenado, é definido como a ausência de todos os movimentos corporais, exceto os respiratórios (FANSELOW, 1991). Além disso, no congelamento observamos um alto nível de alerta e considerável tonicidade muscular (FENDT; FANSELOW, 1999). Este comportamento ocorre, na maioria das vezes, como uma postura de agachamento próximo a algum objeto disponível, como por exemplo, os cantos de uma câmara de observação (BANDLER; DEPAULIS, 1991).

A resposta de congelamento pode ser eliciada pela exposição do individuo ao seu predador natural (CANTERAS, 2003) ou pela apresentação de estímulos condicionados aversivos (FENDT; FANSELOW, 1999). Além disso, como visto, existe o congelamento que emerge da estimulação de estruturas relacionadas ao sistema cerebral aversivo, como SCPd, e também, aquele que persiste após a interrupção desta estimulação, denominado congelamento pós-estimulação (BRANDÃO et al., 2008; MARTINEZ et al., 2006).

O congelamento pós-estimulação é resistente a alteração de contexto e ocorre quando os animais são expostos a um ambiente diferente daquele onde ocorreu a estimulação. Isto indica que o medo condicionado contextual não é o responsável pelo congelamento que sucede a estimulação da SCPd (VIANNA et al., 2001). Além disso, acredita-se que apesar da similaridade, o congelamento gerado pela estimulação elétrica e o congelamento pós-estimulação estariam relacionados a diferentes sistemas comportamentais de defesa. O

primeiro estaria relacionado a um estado preparatório para a fuga, enquanto que o segundo permitiria ao animal avaliar as conseqüências desta estimulação aversiva por meio do processamento das informações aversivas em estruturas localizadas em posições mais rostrais (BRANDÃO et al., 2008; MARTINEZ et al., 2006). Dando suporte a essa idéia, alguns trabalhos mostram que durante a resposta de congelamento pós-fuga, ocorre a ativação da SCPd e do núcleo laterodorsal do tálamo, o que sugere que o congelamento pós-estimulação poderia, portanto, refletir o processo de transferência da informação aversiva da SCPd para estruturas encefálicas superiores (BRANDÃO et al., 2008; MARTINEZ et al., 2006).

1.2. Medo Condicionado

No paradigma do medo condicionado, o sujeito é treinado a associar um estímulo neutro a um estímulo aversivo incondicionado (US), como choques nas patas. Após alguns pareamentos, o estímulo neutro torna-se um estímulo condicionado (CS) e, por si só, é capaz de eliciar estados de medo. Sons, luzes, odores e estímulos táteis podem ser usados como estímulos condicionados nestes tipos de experimentos (FENDT; FANSELOW, 1999).

Nesse tipo de experimento, o congelamento condicionado é uma resposta muito comum. Estudos anteriores mostraram que a quantidade de congelamento segue uma razão monotônica com o estado de medo apresentado pelo indivíduo, de forma que a quantidade de congelamento varia linearmente com a intensidade e número de choques recebidos na sessão treino. Assim, enquanto que a apresentação de um único estímulo incondicionado durante o a sessão de condicionamento pode gerar congelamento condicionado, um treino mais robusto pode facilmente gerar a resposta condicionada mais intensa (FANSELOW; BOLLES, 1979)

Outra resposta defensiva importante é o reflexo do sobressalto, uma resposta rápida, que envolve a contração de músculos da face e do corpo, evocada por estímulos inesperados e intensos. A resposta de sobressalto é definida como uma ativação reflexa e estereotipada de músculos antagônicos do corpo, induzida pela aplicação súbita de um estímulo auditivo, visual ou somatossensorial de grande intensidade (FLESHLER, 1965; KOCH, 1999).

O sobressalto é considerado uma resposta defensiva de grande valor adaptativo. Nos vertebrados terrestres, o ponto mais vulnerável a ataques por predadores é a região dorsal do pescoço. Contraindo todos os músculos do corpo, mas especialmente os músculos dorsais do pescoço e, reduzindo a exposição desta área, o dano potencial resultante de um ataque pelas costas é reduzido (YEOMANS; FRANKLAND, 1996).

Estudos demonstraram que a amplitude da resposta de sobressalto para um estímulo acústico em ratos pode ser aumentada por meio da apresentação de um estímulo condicionado (ex. luz) que tenha sido previamente pareado com um estímulo aversivo como um choque nas patas (BROWN et al., 1951). Essa condição é denominada "resposta de sobressalto potencializada pelo medo" (Figura 1) e ocorre também quando se utiliza um estímulo condicionado auditivo, com o sobressalto sendo provocado tanto por um som intenso ou por um jato de ar (BROWN et al., 1951; HITCHCOCK; DAVIS, 1987; OLIVEIRA et al., 2006).

No modelo da potencialização do sobressalto pelo medo, o aumento da amplitude desse reflexo é considerado como sendo a resposta condicionada (DAVIS et al., 1993). Assim, a apresentação pareada do estímulo neutro e do choque nas patas leva ao desenvolvimento de um estado condicionado de medo que age facilitando a reação de sobressalto ao som (BROWN et al., 1951).

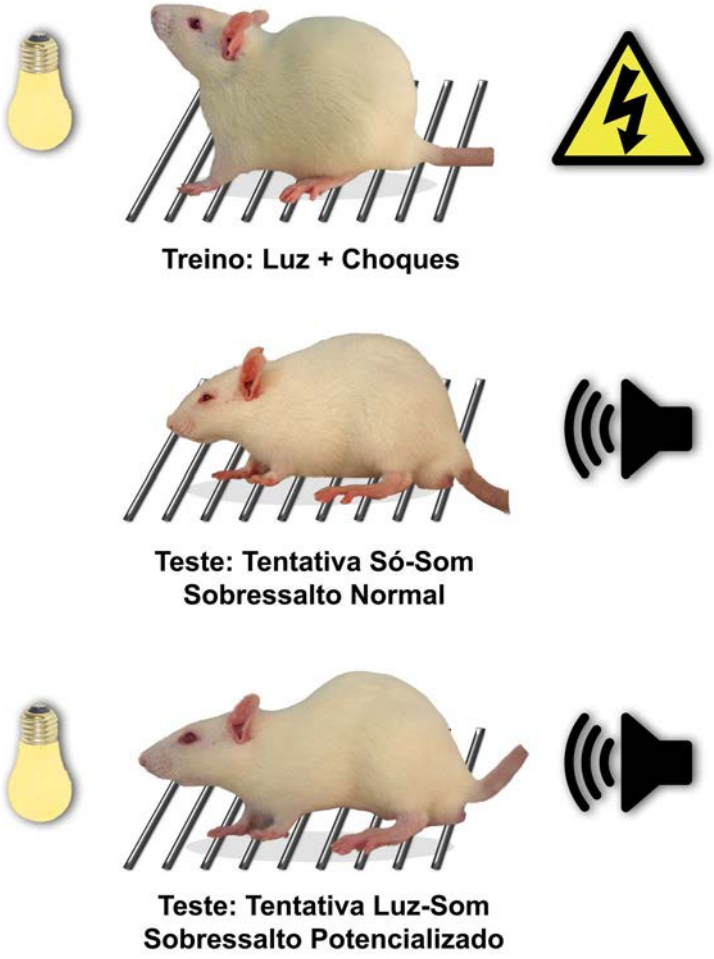

Figura 1. Desenho esquemático do paradigma da potencialização do sobressalto pelo medo.

1.3 Substrato Neural do Medo no Teto Mesencefálico

A – Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal

A substância cinzenta periaquedutal (SCP) constitui uma região densa em corpos celulares, localizada no mesencéfalo, circundando o aqueduto cerebral desde a porção dorsolateral do tronco encefálico até a comissura posterior, onde margeia o terceiro ventrículo no diencéfalo. Apresenta conexões recíprocas com sistemas ascendentes e descendentes e pode influenciar e ser influenciada por estruturas relacionadas ao controle das respostas

sensoriais, motoras, autonômicas e límbicas (BANDLER; DEPAULIS, 1991; BANDLER; KEAY, 1996).

A SCP pode ser dividida, devido a sua heterogeneidade funcional, em quatro pares de colunas neurais longitudinais orientadas no eixo rostro-caudal: colunas dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral (BANDLER; CARRIVE, 1991; BANDLER; DEPAULIS, 1991). Seguindo as considerações de Lovick (1991), a SCP dorsal compreenderia as colunas dorsomedial, dorsolateral e lateral da SCP, ao passo que as áreas ventrais ao aqueduto cerebral e laterais ao núcleo dorsal da rafe constituiriam a SCP ventral.

A SCP possui uma intrincada rede de conexões que se torna ainda mais complicada se levarmos em conta a presença de diversos sistemas neurotransmissores atuando nessa região. Glutamato, aspartato, GABA, acetilcolina, serotonina, histamina, noradrenalina, encefalinas, neurotensina e substância P já foram descritos como transmissores nesta estrutura (BEITZ, 1990; LOVICK, 1991; MONASSI et al., 1994; SILVEIRA et al., 1993).

Tanto a estimulação química quanto a elétrica de regiões específicas da SCP evidenciaram que este substrato neural controla uma grande variedade de funções, incluindo a modulação da dor (BASBAUM; FIELDS, 1984) e analgesia (REYNOLDS, 1969), respostas autonômicas (LOVICK, 1991), vocalização (JÜRGENS; LU, 1993), comportamentos sexuais (OGAWA et al., 1992), controle respiratório (DAVIS et al., 1991) e diferentes padrões de comportamento defensivo, como congelamento, luta, fuga e imobilidade tônica (BANDLER; DEPAULIS, 1991; MONASSI et al., 1994). Tem-se demonstrado, ainda, que as diferentes colunas da SCP coordenam padrões distintos de reações fisiológicas e comportamentais críticas para a sobrevivência do animal (BANDLER; KEAY, 1996).

A SCPd (Figura 2A) tem importante papel na elaboração de estados aversivos. A estimulação elétrica dessa estrutura, em ratos, elicia comportamentos defensivos como alerta, congelamento e fuga explosiva (BRANDÃO et al., 1982). Tais reações defensivas são

acompanhadas por alterações autonômicas como aumento na freqüência cardíaca e na pressão arterial, piloereção, midríase, micção e defecação (BRANDÃO et al., 1993). Já a lesão da SCPd, diminui a explosão incondicionada de atividade que segue o choque nas patas (KIM et al., 1993).

A estimulação química ou elétrica de outras estruturas encefálicas localizadas em posições mais rostrais, como amígdala e hipotálamo medial, também pode induzir reações defensivas. Entretanto, tais reações são permanentemente abolidas após a lesão da SCPd (HUNSPERGER, 1963). O contrário, no entanto, não é verdadeiro, uma vez que a ablação do telencéfalo ou lesões do hipotálamo medial não abolem as reações de defesa induzidas pela estimulação da SCPd (TOMAZ et al.,1988).

B – Colículo Inferior

O colículo inferior (Figura 2B) é uma estrutura mesencefálica disposta bilateralmente, consistindo em uma massa central de corpos celulares circundada pelo córtex pericentral. É uma estrutura de fundamental importância na via auditiva, sendo local de convergência para a maioria das fibras ascendentes às estruturas auditivas superiores (AITKIN; PHILLIPS, 1984).

O CI pode ser dividido utilizando-se critérios citoarquitetônicos, em um núcleo central e os córtices externo e dorsal (HUFFMAN; HENSON JR, 1990). Devido às diferentes projeções entre essas divisões do CI, foi proposta uma dualidade funcional desta estrutura: o núcleo central seria primordialmente uma estação relé das vias auditivas, enquanto que os córtices dorsal e externo, recebendo informações não só auditivas, mas também visuais e somáticas, seriam áreas participantes da integração acústico-motora (TOKUNAGA et al., 1984). Assim sendo, temos que na literatura a maioria dos trabalhos sobre o CI versa a

respeito do papel desta estrutura na transmissão e modulação da informação auditiva para estruturas superiores.

Entretanto, alguns trabalhos que utilizaram técnicas comportamentais e imunohistoquímicas demonstraram o envolvimento do núcleo central do CI também na elaboração de estados aversivos (BRANDÃO et al., 1988, 1994; SILVEIRA et al., 1993). Realmente, o CI envia fibras principalmente para o núcleo geniculado medial do tálamo, mas além dessa estrutura, o CI também mantém projeções com a SCPd, hipotálamo, amígdala e colículo superior, estruturas que compõe o chamado sistema cerebral aversivo (BEITZ, 1990; LEDOUX et al., 1985, 1990).

Estudos comportamentais de nosso laboratório têm revelado que a estimulação elétrica ou química do CI produz respostas defensivas características de medo, tais como alerta, congelamento e fuga (BRANDÃO et al., 1993, 1994, 1999), acompanhadas de analgesia e uma série de alterações autonômicas, como aumento da pressão arterial, freqüência cardíaca e respiratória (BRANDÃO et al., 1993).

Como vimos, a SCPd tem sido tradicionalmente associada como uma possível via de saída para o comportamento defensivo. Entretanto, experimentos mostram que CI e SCPd não compartilham as mesmas vias de saída para a expressão das respostas defensivas. Foi observado que a resposta obtida com a estimulação elétrica do CI não é alterada pela lesão da SCPd sendo o inverso também verdadeiro, já que lesões no CI também não alteram os limiares aversivos provocados pela estimulação elétrica da SCPd (MAISONNETTE et al., 1996).

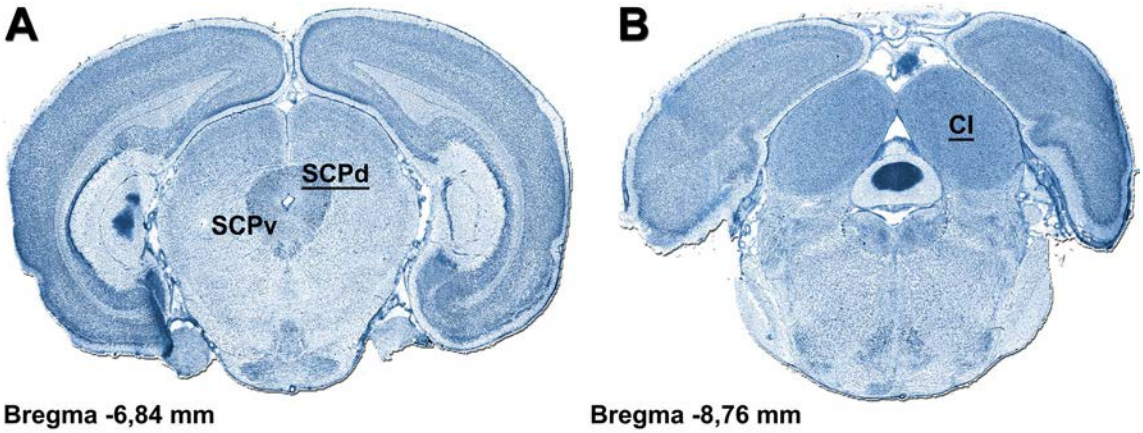

Figura 2. Fotomicrografia de cortes transversais de mesencéfalo de *Rattus norvergicus*, mostrando a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) e ventral (SCPv) e o colículo inferior (CI). Modificado do Atlas de Paxinos e Watson, 2007.

1.4. Modulação GABAérgica da Reação de Defesa

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, existindo em quantidades apreciáveis no teto mesencefálico (LEBEAU et al., 1996; ROBERTS; RIBAK, 1987; THOMPSON et al., 1985). Estudos demonstraram que a SCPd e o CI possuem altas concentrações de GABA e sua enzima sintetizante, a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) (THOMPSON et al., 1985).

Estados aversivos são produzidos por bloqueadores GABA e inibidos por agonistas GABA-A localmente injetados na SCPd e CI. Assim, foi proposto que estas estruturas possuem uma rede GABAérgica tonicamente ativa que regula esses estados por meio de receptores GABA-A (AUDI; GRAEFF, 1984; BEHBEHANI et al., 1990; BRANDÃO et al., 1988, 1999; COIMBRA; BRANDÃO, 1993).

Microinjeções de bicuculina (antagonista GABAérgico) no teto mesencefálico produzem comportamentos defensivos que se assemelham aos efeitos da estimulação elétrica dessa região, predominantemente fuga. Microinjeções de semicarbazida (droga que inibe a síntese de GABA e, assim, diminui o nível desse neurotransmissor) também produzem

comportamentos defensivos, principalmente congelamento (BRANDÃO et al., 1982, 1986, 1988; DI SCALA; SANDNER, 1989). Microinjeções de muscimol (agonista GABA-A) no CI e SCPd atenuam os efeitos aversivos da estimulação elétrica destas estruturas (BRANDÃO et al., 1988, 1999). Além disso, a microinjeção de benzodiazepínicos no teto mesencefálico deprime o comportamento defensivo induzido por estimulação dessa região (AUDI; GRAEFF, 1984; BRANDÃO et al., 1988; MELO et al., 1992; PANDOSSIO; BRANDÃO, 1999).

Paralelamente, estudos demonstraram que drogas que aumentam a neurotransmissão GABAérgica atenuam a resposta de sobressalto potencializada pelo medo. A administração de agonistas GABA ou benzodiazepínicos diminui ou mesmo bloqueia a potencialização do sobressalto, sem alterar os níveis basais dessa resposta (DAVIS et al., 1993). De maneira oposta, o agonista inverso de receptores benzodiazepínicos, B-carboline, aumenta a resposta de sobressalto potencializado pelo medo (DAVIS et al., 1993).

Vários agentes farmacológicos utilizados no tratamento de distúrbios da ansiedade, como o pânico e a ansiedade generalizada, têm como alvo o sistema GABAérgico e agem modulando o efeito global do GABA (LYDIARD, 2003). Os diferentes distúrbios de ansiedade parecem estar relacionados a sistemas defensivos distintos, que por sua vez envolveriam mecanismos neurais específicos. Por exemplo, hipocampo, amígdala e a substância cinzenta periaquedutal ventrolateral estariam relacionados com o medo condicionado. Desordens nesse sistema parecem estar relacionadas com o distúrbio de ansiedade generalizada. Por outro lado, outro sistema, formado pelo CI, SCPd, hipotálamo dorsomedial e amígdala estaria associado com o medo incondicionado. A perturbação desse sistema, por sua vez, estaria relacionada com ataques de pânico. Assim é de grande interesse investigar mecanismos que estariam atuando em estruturas específicas, envolvidas na expressão de respostas a diferentes tipos de medo.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Neste estudo investigamos o envolvimento da neurotransmissão GABAérgica da SCPd e CI na expressão do medo condicionado e do medo incondicionado. Para isso, os efeitos da administração de muscimol (agonista GABA-A) e semicarbazida (inibidor da GAD) na SCPd e CI foram analisados no teste do sobressalto potencializado pelo medo, na resposta de congelamento condicionada, nos limiares de congelamento e fuga induzidos pela estimulação elétrica da SCPd ou CI e no congelamento pós-fuga.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (*Rattus norvegicus*), com peso entre 250 e 300 g, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto. Os animais foram agrupados (cinco animais por caixa) em gaiolas de polipropileno medindo 33 x 40 x 17 cm, forradas com maravalha, tendo livre acesso à água e alimento. Foram mantidos em um biotério setorial com temperatura controlada a 23º C $\pm$ 1º C e um programa de iluminação artificial com ciclo claro-escuro de 12 x 12 h, com início do período claro às 7:00 h. Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo. Este trabalho faz parte de um projeto temático aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, CEUA (protocolo 06.1.123.8.53.9).

3.2. Cirurgia

Os animais foram anestesiados intraperitonialmente com tribromoetanol (*Aldrich*) na dose de 250 mg/Kg, volume de 1 mL/Kg, sendo levados a um aparelho estereotáxico (*David-Kopf*) onde tiveram o crânio fixado pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Após tricotomia, uma injeção subcutânea de 0,2 mL de lidocaína 2% (Harvey) foi aplicada sob a epiderme craniana. Após a incisão, o tecido subcutâneo foi removido, assim como o periósteo (por raspagem, com auxílio de pinça e algodão). Já com a superfície craniana exposta e ajustada em posição horizontal, entre *bregma* e *lambda*, dois orifícios foram feitos nos ossos parietais com o uso de uma broca elétrica (*Foredom*) para fixação de parafusos destinados a ancorar a prótese ao crânio do animal. Em seguida, tomando-se o *lambda* como referência e

seguindo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (2007), um orifício foi feito para implante de um quimitrodo, composto pela união de uma cânula-guia (construída a partir de uma agulha de aço inoxidável, com 14 mm de comprimento e 0,4 mm de diâmetro interno) e um eletrodo (construído a partir de um fio de aço inoxidável de 160 µm de diâmetro isolado em toda sua extensão, exceto na ponta, e excedendo em 1 mm o comprimento da cânula-guia). Este quimitrodo foi direcionado à SCPd (ântero-posterior = +0,1 mm; médio-lateral = +1,9 mm; dorso-ventral = -5,1 mm, angulação de 16º) ou ao CI (ântero-posterior = -0,9 mm; médio-lateral = +1,7 mm; dorso-ventral = -4,5 mm). Em seguida, o crânio foi revestido com acrílico dental (JET) para fixação do quimitrodo e um mandril foi introduzido na cânula-guia para evitar entupimentos. Ao término da cirurgia cada animal recebeu, por via intramuscular, uma injeção de 60.000 UI de Pentabiótico (*Fort Dodge*) e uma injeção do analgésico Banamine (0,02 mL / 0,3 mL) por via subcutânea.

3.3. Drogas

O agonista GABAérgico muscimol (1,0 ou 2,0 nmol) e o inibidor da síntese de GAD semicarbazida (5,0 ou 7,5 µg) foram microinjetados na SCPd ou CI, em volume constante de 0,2 µL. Os animais controles receberam o mesmo volume de salina. As doses das drogas e os tempos de espera foram selecionados com base em estudos deste laboratório (CASTILHO; BRANDÃO, 2001; MARTINEZ et al., 2006; REIMER et al., 2008).

3.4. Microinjeções

Uma agulha dental foi utilizada para a injeção das drogas. A agulha foi conectada a um tubo de polietileno PE-10 e a uma microseringa *Hamilton* graduada de 5 µL. A droga foi

injetada na SCPd ou CI (0,2 µL/1 min), com a ajuda de uma bomba de infusão (*Harvard Apparatus*). O deslocamento de uma bolha de ar no tubo de polipropileno foi utilizado para monitorar a microinjeção. Após o término da infusão, a agulha foi mantida por mais 1 min para evitar refluxo da droga pela cânula-guia.

3.5. Medo Condicionado

Equipamentos

Condicionamento: Durante o procedimento de condicionamento foram utilizadas duas caixas idênticas medindo 20 x 20 x 25 cm (caixa A – Figura 3). A parede do fundo, assim como as duas paredes laterais, são de alumínio, e o teto e a portinhola, de acrílico transparente. O assoalho das caixas é constituído por barras de metal de 5 mm de diâmetro, distando 1,5 cm entre si. Estas caixas encontravam-se encerradas em duas câmaras de atenuação acústica (45 x 45 x 45 cm) feitas de compensado de madeira e revestidas por Eucatex. Os choques elétricos, de intensidade de 0,6 mA e duração de 1 s, foram administrados por meio de um gerador de choques (*Albarsh*). Uma lâmpada vermelha de 6 W e uma câmera de vídeo (*Everfocus*), instaladas no interior de cada câmara de isolamento acústico, permitiram a observação do animal durante o condicionamento. Uma luz proveniente de uma lâmpada branca de 6 W, localizada no teto de cada caixa, serviu como estímulo condicionado.

Sobressalto Potencializado pelo Medo: Durante as sessões de balanceamento e teste foram utilizadas duas caixas experimentais idênticas, construídas em aço inoxidável e suspensas em uma armação de PVC, medindo internamente 16,5 x 7,5 x 7,5 cm (caixa B – Figura 3). Estas caixas encontravam-se abrigadas em duas câmaras de atenuação sonora (64 x 60 x 40 cm), fabricadas em madeira, possuindo um revestimento acústico de espuma (ENV-

018S, *Med Associates*). A resposta de sobressalto foi registrada por meio de uma plataforma sensível à pressão (estabilímetro, PHM250-60, *Med Associates*). O sobressalto do animal gera movimentos nesta plataforma que foram captados por sensores como deslocamento de corrente e então amplificados, gerando um sinal analógico que foi digitalizado e analisado por um programa computacional (*Startle Reflex*, versão 4.10, *Med Associates*). A apresentação dos estímulos, o tipo, a duração, a intensidade e a amplitude dos mesmos também foram computadorizados por meio de uma interface (Dig 729, *Med Associates*). A resposta de sobressalto foi medida durante os primeiros 100 ms após a apresentação do estímulo sonoro, que consistiu em um ruído branco de intensidade de 100 dB e duração de 50 ms, com *rise-decay* de 5 ms, sendo liberado por um alto-falante localizado a 10 cm de distância da caixa contendo o animal. O ruído de fundo foi apresentado pelo mesmo alto-falante e consistiu em um ruído branco de 55 dB. Uma lâmpada vermelha de 6 W e uma câmera de vídeo, instaladas no interior das câmaras de isolamento acústico, permitiram a observação do animal durante as sessões de balanceamento e teste. Uma lâmpada branca de 6 W, localizada no teto de cada caixa, serviu como estímulo condicionado. As plataformas foram calibradas no início de cada sessão para garantir igual nível de sensibilidade ao longo dos experimentos.

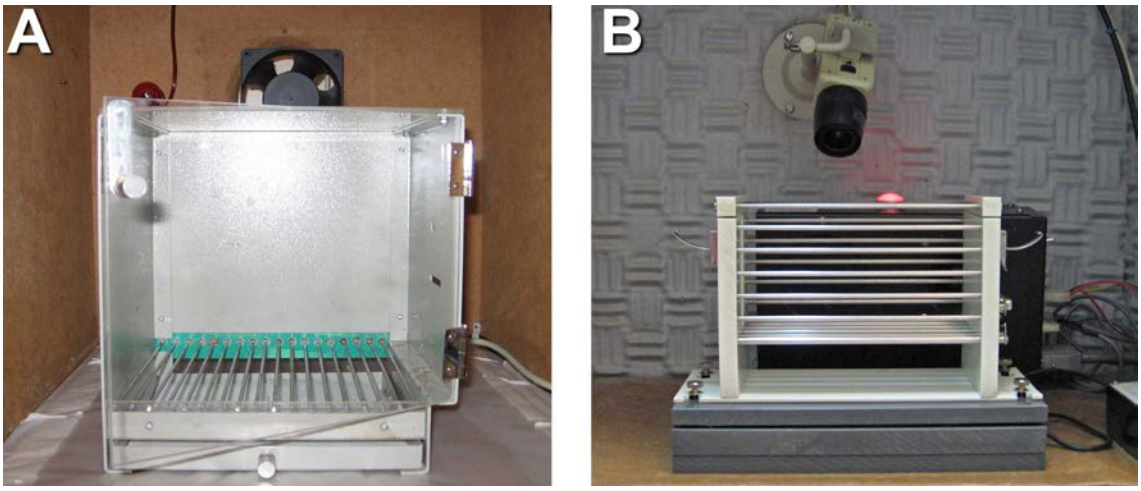

Figura 3. Fotografias das caixas experimentais referentes ao experimento de medo condicionado. **A –** Caixa de condicionamento. **B –** Caixa de sobressalto.

Procedimento

Sessões de Balanceamento: Foram realizadas duas sessões de balanceamento nas quais os animais foram colocados na caixa experimental B e, 5 minutos após, receberam 30 estímulos sonoros de intensidade de 100 dB com um intervalo fixo de 30 s entre cada estímulo. A amplitude média do sobressalto ao longo das 30 tentativas de estímulos sonoros da última sessão de balanceamento foi utilizada para alocar homogeneamente os animais aos diversos grupos dos experimentos.

Sessão de Condicionamento: Após o período de recuperação da cirurgia, foi dado início ao condicionamento aversivo. Os animais foram colocados na caixa A e, após 5 minutos de adaptação, foram submetidos a 10 associações de luz (CS) e choque nas patas (US). Cada tentativa consistiu em 4 segundos de luz e o choque foi apresentado no último segundo de cada apresentação do CS. O choque de intensidade de 0,6 mA, teve duração de 1 s e o intervalo entre os pareamentos foi variável em 2 min (faixa de 1-3 min). Os choques e os estímulos condicionados foram liberados através de uma interface controlada por um *software* instalado em um computador em uma sala adjacente.

Sessão Teste: No dia seguinte à sessão de condicionamento, os animais foram avaliados no teste do sobressalto potencializado pelo medo. Cada animal foi então colocado na caixa B sobre a plataforma e, após 5 minutos de adaptação, recebeu um total de 60 estímulos sonoros na intensidade de 100 dB, sendo que 30 apresentações consistiam apenas no estímulo sonoro (tentativas só-som) e foram intercaladas aleatoriamente com 30 apresentações de som precedido por luz (tentativas luz-som). As amplitudes das respostas de sobressalto de cada animal foram registradas e armazenadas no disco rígido do computador e, posteriormente, transferidas para planilhas do Excel para análise dos dados. A resposta de congelamento foi registrada por câmeras de vídeo, permitindo assim a discriminação de todos os comportamentos emitidos pelos animais, com os sinais enviados a um monitor em uma

sala adjacente através de um circuito interno de TV. O congelamento foi operacionalmente definido neste trabalho como a ausência total de movimentos do corpo e das vibrissas por um período mínimo de 6 segundos.

3.6. Medo Incondicionado

Equipamentos

O experimento de medo incondicionado foi realizado em uma arena circular de acrílico transparente, medindo 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura, possuindo o assoalho subdividido em 12 quadrantes (Figura 4). Para a estimulação elétrica foi utilizado um estimulador de corrente contínua (*DV&M*) e a corrente elétrica foi monitorada através do resistor de 1KΩ, ligado em paralelo a um osciloscópio (*Minipa*).

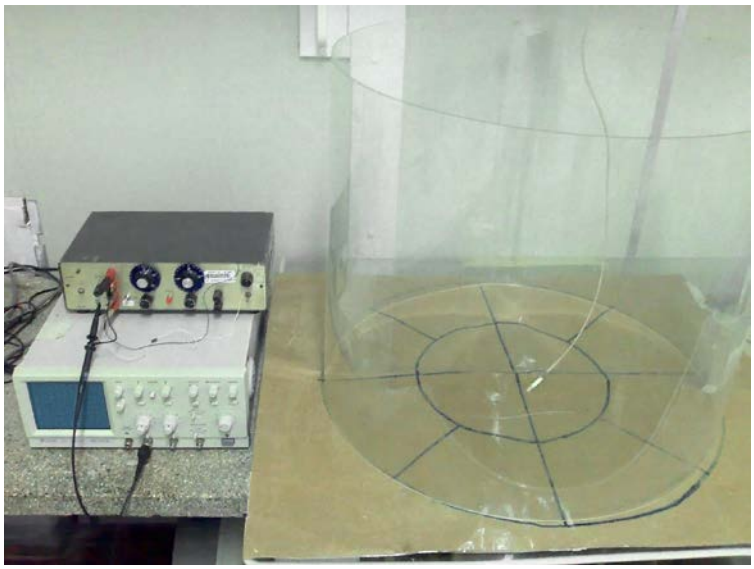

Figura 4. Fotografia da arena e estimulador elétrico utilizados nos experimentos de medo incondicionado.

Procedimento

Os animais foram colocados na arena onde permaneceram por 5 minutos para adaptação. Após esse período foi iniciado o procedimento de estimulação elétrica na SCPd ou CI. A intensidade inicial de corrente elétrica foi de 20 µA, a partir da qual foram feitos incrementos sucessivos de 5 µA. Os limiares aversivos efetivos foram considerados como a menor intensidade de corrente elétrica, capaz de induzir comportamentos de congelamento e fuga. Os animais com limiares acima de 200 µA para a resposta de congelamento foram descartados do experimento. Posteriormente a interrupção da estimulação da SCPd ou CI, os animais permaneceram na arena por um período adicional de 5 minutos, nos quais não houve estimulação e foi analisado o tempo de congelamento pós-fuga. Após microinjeção de droga, o animal foi então recolocado na arena e os valores de corrente elétrica necessária para obtenção dos comportamentos de congelamento e fuga e o tempo de congelamento pós-estimulação da SCPd ou CI foram novamente determinados.

3.7. Histologia

Ao fim dos experimentos, os animais foram anestesiados profundamente com 1 mL de hidrato de cloral (0,54 g / mL). A seguir, o corante Azul de Evans (2 %) foi microinjetado na SCPd ou CI no mesmo volume da droga anteriormente utilizada. A seguir, os animais foram perfundidos com salina 0,9% seguida de formalina. O rompimento do diafragma durante a perfusão causou a morte dos animais. Os encéfalos foram removidos, mantidos na solução de formalina por 3 horas e, posteriormente, transferidos para uma solução de sacarose 30 %. Os encéfalos seguiram para um criostato onde foram congelados e cortados em secções de 60 µm. Posteriormente foram montadas lâminas que receberam a coloração de Nissl, com a aplicação do corante violeta de cresila, para que os sítios das microinjeções pudessem ser localizados, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007).

3.8. Análise Estatística

Os dados são apresentados como média + EPM, sendo analisados pelo programa computacional SigmaStat 3.11 (*Systat*). Para análise dos dados do teste de sobressalto potencializado pelo medo foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas. O fator 1 referiu-se ao *tratamento* e o fator 2 à *condição* (só-som x luz-som). Para análise do tempo de congelamento condicionado foi utilizada a ANOVA de uma via ou o teste *t de Student*. Para análise dos limiares de congelamento e fuga foi utilizada uma ANOVA de duas vias com medidas repetidas. O fator 1 referiu-se ao *tratamento* e o fator 2 à *condição* (congelamento × fuga). Para análise do congelamento pós-estimulação também foi utilizada uma ANOVA de duas vias com medidas repetidas. O fator 1 referiu-se ao *tratamento* e o fator 2 à *condição* (antes × depois). Após a análise de variância seguiu-se, no caso de significância estatística, o teste de *Newman-Keuls*. Um valor de p igual ou inferior a 0,05 foi considerado significativo.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Localização dos Sítios de Microinjeção

Os dados apresentados referem-se aos animais cujo exame histológico mostrou que o quimitrodo atingiu a SCPd ou o CI. As figuras 5A e 5B mostram cortes histológicos representativos dos pontos de microinjeção na SCPd e CI, respectivamente. A figura 5C e 5D indicam os reais pontos de estimulação nestas estruturas.

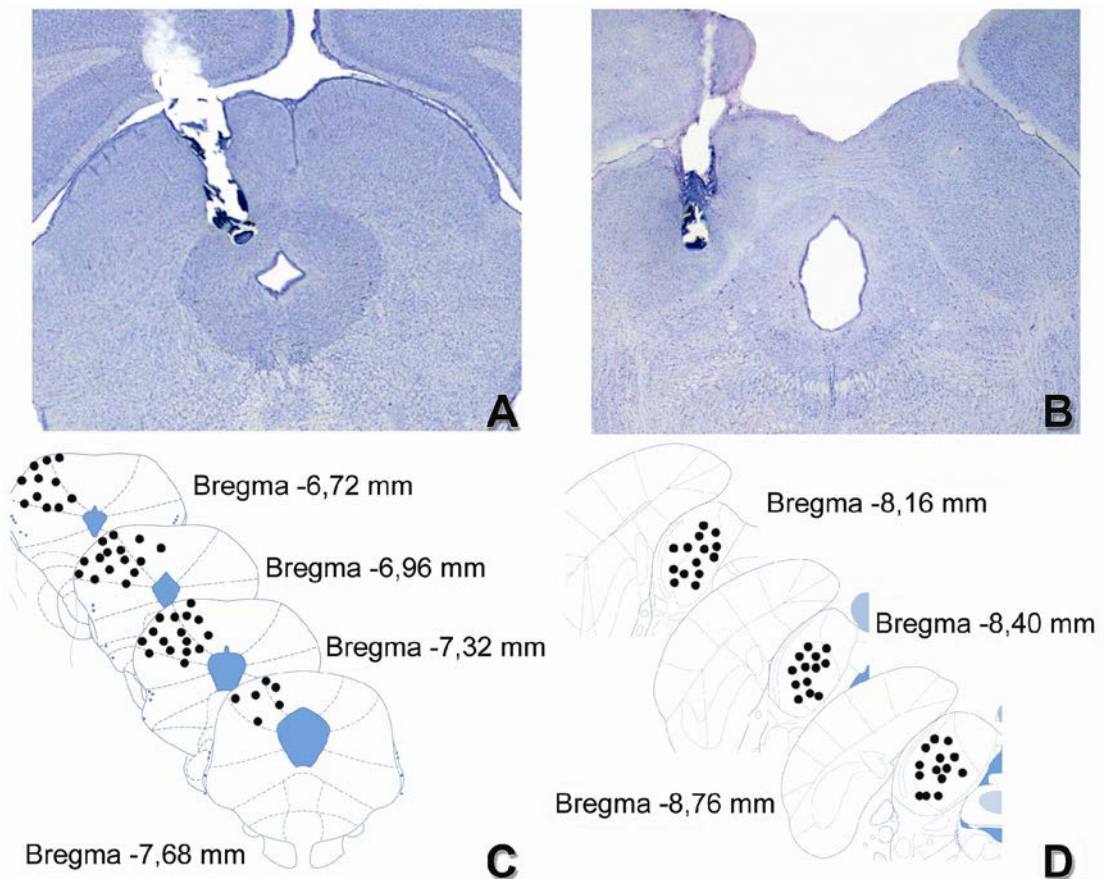

Figura 5. Fotomicrografias com sítios representativos da localização dos quimitrodos na SCPd e no CI (A e B, respectivamente) de ratos. Em C e D estão indicados os sítios de estimulação na SCPd e no CI, respectivamente. O número de pontos indicados é menor que o número de animais utilizados devido a várias sobreposições.

4.2. SCPd

Medo Incondicionado

Conforme a intensidade de corrente elétrica aplicada à SCPd aumentava, os animais repentinamente paravam, tornavam-se imóveis e geralmente urinavam e defecavam. Com intensidades maiores, a resposta de congelamento foi seguida por corridas e saltos vigorosos. Os limiares de congelamento e fuga de todos os grupos registrados antes das microinjeções na SCPd, foram comparados pelo teste *t de Student* pareado. Esta análise confirmou achados anteriores mostrando diferenças significativas, $t = 10,67$, $p < 0,01$, na intensidade da corrente elétrica aplicada à SCPd para produção das respostas de congelamento (72,69 ± 3,38) e fuga (85,96 ± 3,77) (MARTINEZ et al., 2006; VIANNA et al., 2001).

A figura 6A mostra a alteração média nos limiares de congelamento e fuga, determinados pela estimulação elétrica da SCPd, antes (linha de base) e depois (teste) da microinjeção de salina, muscimol 1,0 ou 2,0 nmol nessa estrutura. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Esta análise mostrou alteração significativa nos limiares aversivos no fator *tratamento*, $F_{(2,39)} = 10,27$; $p < 0,05$. A mesma análise também mostrou alterações significativas na *condição*, $F_{(1,39)} = 3,06$; $p < 0,05$. A interação *tratamento* × *condição*, no entanto, não foi estatisticamente significativa, $F_{(2,83)} = 0,83$; $p > 0,05$. A análise *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou um aumento significativo nos limiares após a microinjeção de muscimol na dose de 2,0 nmol em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

A figura 6B mostra o tempo de congelamento pós-estimulação. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou diferença no tempo de congelamento pós-fuga para a *condição*, $F_{(1,39)} = 5,48$; $p < 0,05$. Não houve diferença, no entanto, para *tratamento*, $F_{(2,39)} = 0,07$; $p > 0,05$ ou interação *tratamento* × *condição* $F_{(2,83)} = 1,13$; $p > 0,05$. A análise *post-hoc*

de *Newman-Keuls* indicou uma diminuição significativa no tempo de congelamento pós-fuga no teste em relação à linha de base.

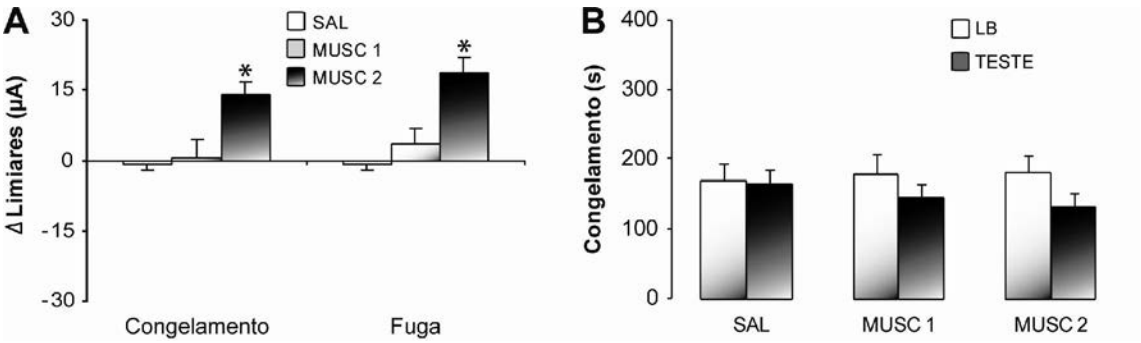

Figura 6. A - Diferenças (Δ) + EPM nos limiares de congelamento e fuga determinados antes e depois da microinjeção de salina, muscimol 1,0 e 2,0 nmol na SCPd. **B -** Média + EPM do tempo de congelamento pós-estimulação durante sessão de 5 minutos, em animais que receberam microinjeções de salina ou muscimol nas doses 1,0 e 2,0 nmol. N = 12 para o grupo salina, N = 15 para os grupos muscimol 1,0 e 2,0 nmol. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

A figura 7A mostra a alteração média nos limiares de congelamento e fuga, determinados pela estimulação elétrica da SCPd entre as fases de linha de base e teste nos animais que receberam microinjeção de salina, semicarbazida 5,0 ou 7,5 µg também na SCPd. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Esta análise mostrou alteração significativa nos limiares aversivos para o fator *tratamento*, $F_{(2,33)} = 7,07$; $p < 0,05$. A mesma análise mostrou não haver alterações significativas para a *condição*, $F_{(1,33)} = 2,45$; $p > 0,05$. A interação *tratamento* × *condição* não foi estatisticamente significativa, $F_{(2,71)} = 2,50$; $p > 0,05$. A análise *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou uma redução significativa nos limiares após a microinjeção de semicarbazida na dose de 7,5 µg em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

A figura 7B mostra o tempo de congelamento pós-estimulação. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou diferença no tempo de congelamento pós-fuga para *condição*, $F_{(1,33)} = 28,6$; $p < 0,05$, para *tratamento*, $F_{(2,33)} = 4,87$; $p < 0,05$, e interação entre os dois fatores $F_{(2,71)} = 6,92$; $p < 0,05$. A análise *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou um aumento

significativo no tempo de congelamento pós-fuga após a microinjeção de semicarbazida nas doses 5,0 e 7,5 µg em relação ao grupo controle e à linha de base ($p < 0,05$).

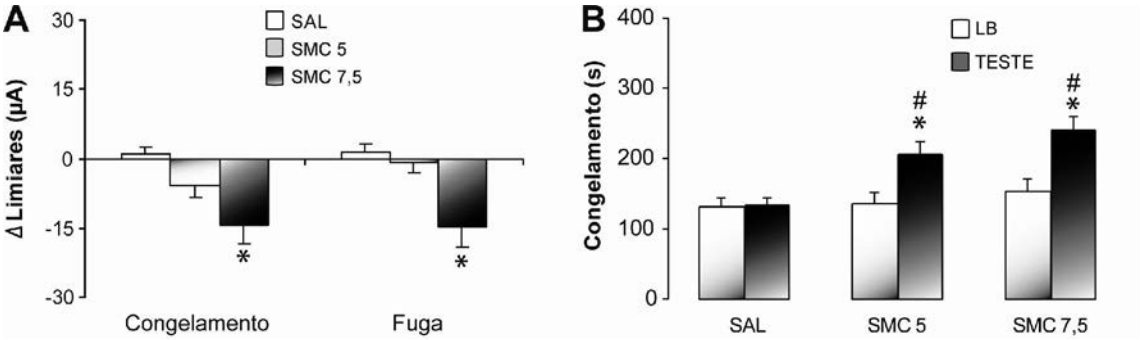

Figura 7. A - Diferenças (Δ) + EPM nos limiares de congelamento e fuga determinados antes e depois da microinjeção de salina, semicarbazida 5,0 ou 7,5 µg na SCPd. **B -** Média + EPM do tempo de congelamento pós-estimulação durante a sessão de 5 minutos, em animais que receberam microinjeções de salina ou semicarbazida 5,0 ou 7,5 µg. N = 12 para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina; # $p < 0,05$ em relação à linha de base da respectiva condição.

Medo Condicionado

A figura 8 apresenta os resultados referentes ao teste do sobressalto potencializado pelo medo e também a medida de congelamento de animais que receberam microinjeção de muscimol na SCPd dez minutos antes da sessão teste. A figura 8A apresenta a média da amplitude de sobressalto dos animais que receberam microinjeção de salina, muscimol 1,0 nmol ou muscimol 2,0 nmol. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *tratamento*, $F_{(2,42)} = 1,70$; $p > 0,05$. A mesma análise revelou efeito significativo no fator *condição* (só-som × luz-som), $F_{(1,42)} = 60,04$; $p < 0,05$, indicando uma resposta mais intensa nas tentativas luz-som em comparação a só-som. Além disso, houve interação significativa entre os dois fatores (*tratamento* × *condição*), $F_{(2,89)} = 3,86$; $p < 0,05$. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a luz potencializou a resposta de sobressalto ao som nos grupos controle e muscimol (1,0 e 2,0 nmol), entretanto a potencialização nos grupos tratados com muscimol foi menor do que a observada no grupo

controle ($p < 0,05$). A figura 8B mostra a média do tempo total de congelamento condicionado de animais que receberam microinjeções de muscimol na SCPd. A ANOVA de uma via revelou diferenças significativas entre os grupos $F_{(2,42)} = 9,40$, $p < 0,05$. O teste *post hoc* de *Newman-Keuls* revelou uma diminuição significativa na resposta de congelamento dos grupos tratados com muscimol 1,0 e 2,0 nmol em relação ao grupo tratado com salina.

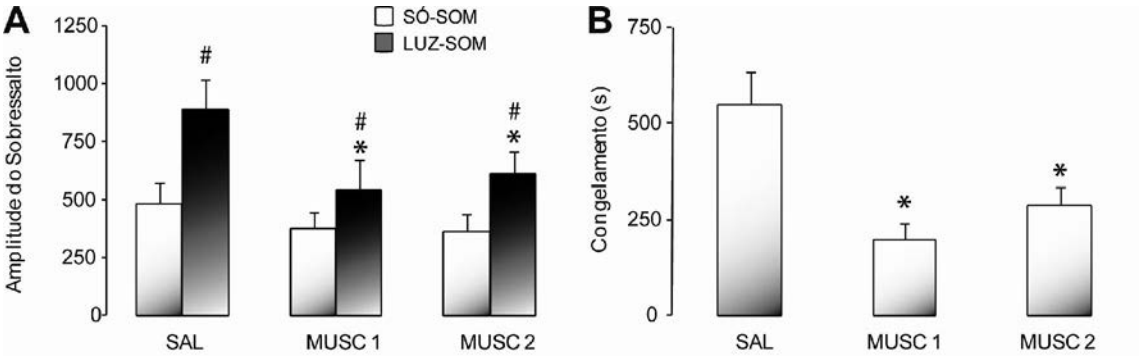

Figura 8. A - Efeitos da microinjeção intra-SCPd de salina ou muscimol nas doses de 1,0 ou 2,0 nmol sobre a amplitude do sobressalto nas condições só-som e luz-som. **B -** Efeitos do muscimol intra-SCPd sobre o tempo de congelamento. N = 14 para salina, 15 para muscimol 1,0 e 16 para muscimol 2,0 nmol. * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com salina; # $p < 0,05$ em relação à condição só-som. Média + EPM.

A figura 9 apresenta os resultados referentes ao teste do sobressalto potencializado pelo medo e também a medida de congelamento de animais que receberam microinjeção de semicarbazida na SCPd dez minutos antes da sessão teste. A figura 9A apresenta a média da amplitude de sobressalto dos animais que receberam salina ou semicarbazida nas doses de 5,0 ou 7,5 µg. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *tratamento*, $F_{(2,38)} = 0,53$; $p > 0,05$. A mesma análise revelou efeito significativo no fator *condição* (só-som × luz-som), $F_{(1,38)} = 57,95$; $p < 0,05$, indicando uma resposta mais intensa nas tentativas luz-som em comparação a só-som. Não houve interação significativa entre os dois fatores (*tratamento* × *condição*), $F_{(2,81)} = 0,31$; $p > 0,05$. A análise *post-hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a luz potencializou a resposta de sobressalto ao som em todos os grupos. A figura 9B mostra a média do tempo total de congelamento condicionado de

animais que receberam micronjeção local de semicarbazida na SCPd. A ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas entre os grupos $F_{(2,38)} = 1,83$, $p > 0,05$.

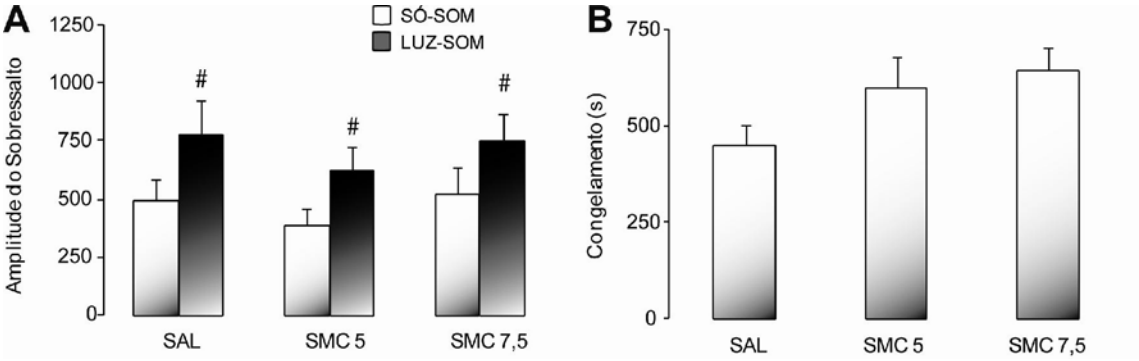

Figura 9. A - Efeitos da microinjeção intra-SCPd de salina ou semicarbazida nas dose de 5,0 ou 7,5 µg sobre a amplitude do sobressalto nas condições só-som e luz-som. **B -** Efeitos da semicarbazida intra-SCPd sobre o tempo de congelamento. N = 14, 16 e 11 para salina, semicarbazida 5,0 e 7,5 µg respectivamente. # $p < 0,05$ em relação à condição só-som. Média + EPM.

4.3. CI

Medo Incondicionado

Da mesma forma que ocorreu na SCPd, o aumento gradual da estimulação elétrica no CI provocou uma série de comportamentos: os animais repentinamente paravam, tornavam-se imóveis e geralmente urinavam e defecavam. Com o aumentando da intensidade da estimulação, o comportamento de congelamento foi seguido por corridas e saltos. Os limiares aversivos registrados antes das microinjeções no CI foram colocados juntos e submetidos ao teste *t de Student* pareado. Esta análise mostrou diferenças significativas, $t = 8,50$, $p < 0,05$, na intensidade da corrente elétrica aplicada ao CI para produção das respostas de congelamento (91,01 ± 6,74) e fuga (102,88 ± 6,99).

A figura 10A mostra a alteração média nos limiares de congelamento e fuga, determinados pela estimulação elétrica do CI, entre as fases de linha de base e teste nos animais que receberam microinjeção de salina, muscimol 1,0 ou 2,0 nmol também no CI. Os

dados obtidos foram submetidos à ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Esta análise mostrou alteração significativa nos limiares aversivos para o fator *tratamento*, $F_{(2,24)} = 17,80$; $p < 0,05$. A mesma análise também mostrou alterações significativas para os *condição*, $F_{(1,24)} = 22,77$; $p < 0,05$. Da mesma forma, a interação *tratamento* x *condição*, foi estatisticamente significativa, $F_{(2,53)} = 10,18$; $p < 0,05$. A análise *post-hoc* de *Newman-Keuls* indicou um aumento significativo nos limiares de congelamento e fuga após a microinjeção de muscimol nas doses 1,0 e 2,0 nmol em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

A figura 10B mostra o tempo de congelamento pós-estimulação. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não mostrou diferença no tempo de congelamento pós-fuga para as *condição*, $F_{(1,24)} = 0,22$; $p > 0,05$, *tratamento*, $F_{(2,24)} = 0,80$; $p > 0,05$ ou interação *tratamento* x *condição* $F_{(2,53)} = 0,18$; $p > 0,05$.

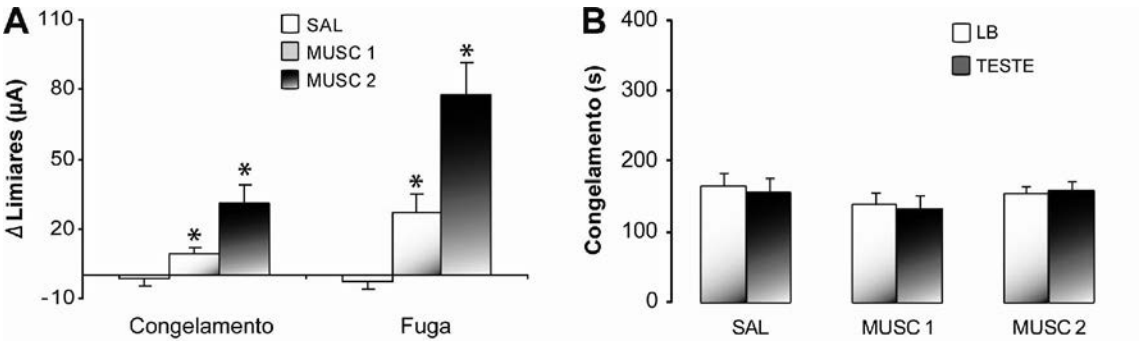

Figura 10. A - Diferenças (Δ) + EPM nos limiares de congelamento e fuga determinados antes e depois da microinjeção de salina, muscimol 1,0 e 2,0 nmol no CI. **B -** Média + EPM do tempo de congelamento pós-estimulação durante sessão de 5 minutos, em animais que receberam microinjeções de salina ou muscimol nas doses 1,0 e 2,0 nmol. N = 9 para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

A figura 11A mostra a alteração média nos limiares de congelamento e fuga, determinados pela estimulação elétrica do CI entre as fases de linha de base e teste do experimento nos animais que receberam microinjeção de salina ou semicarbazida 5,0 ou 7,5 µg também no CI. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA de duas vias com medidas

repetidas. Esta análise não mostrou alteração significativa nos limiares aversivos para o fator *tratamento*, $F_{(2,27)} = 0,26$; $p > 0,05$. A mesma análise mostrou não haver alterações significativas para os *condição*, $F_{(1,27)} = 0,10$; $p > 0,05$. A interação *tratamento* x *condição* também não foi estatisticamente significativa, $F_{(2,59)} = 0,74$; $p > 0,05$.

A figura 11B mostra o tempo de congelamento pós-estimulação. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não indicou diferença no tempo de congelamento pós-fuga para *condição*, $F_{(1,25)} = 4,11$; $p > 0,05$, para *tratamento*, $F_{(2,25)} = 0,06$; $p > 0,05$, e interação $F_{(2,55)} = 0,87$; $p > 0,05$.

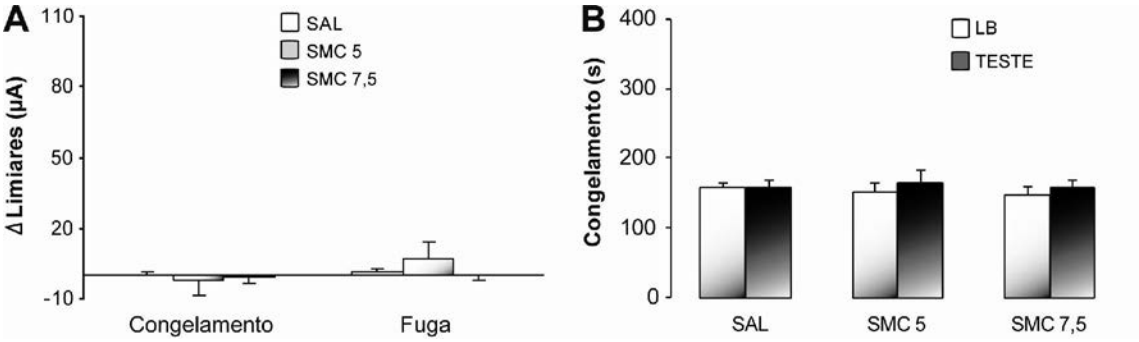

Figura 11. A - Diferenças (Δ) + EPM nos limiares de congelamento e fuga determinados antes e depois da microinjeção de salina, semicarbazida 5,0 ou 7,5 µg no CI. N= 10 para todos os grupos. **B -** Média + EPM do tempo de congelamento pós-estimulação durante a sessão de 5 minutos, em animais que receberam microinjeções de salina, semicarbazida 5,0 ou 7,5 µg . N = 10 para o grupo salina, 8 para o grupo semicarbazida 5,0 µg e 10 para o grupo semicarbazida 7,5 µg.

Medo Condicionado

A figura 12 apresenta os resultados referentes ao teste do sobressalto potencializado pelo medo e à medida de congelamento de animais que receberam microinjeção de muscimol no CI dez minutos antes da sessão teste. A figura 12A apresenta a média da amplitude de sobressalto dos animais que receberam microinjeção de salina, muscimol 1,0 nmol e muscimol 2,0 nmol. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *tratamento*, $F_{(2,47)} = 0,98$; $p > 0,05$. A mesma análise revelou efeito significativo no fator *condição* (só-som × luz-som), $F_{(1,47)} = 67,06$; $p < 0,05$, indicando uma

resposta mais intensa nas tentativas luz-som em comparação a só-som. Não houve interação significativa entre os dois fatores (*tratamento* × *condição*), $F_{(2,99)} = 0,18$; $p > 0,05$. A análise *post-hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a luz potencializou a resposta de sobressalto ao som nos grupos controle e muscimol (1,0 e 2,0 nmol). A figura 12B mostra a média do tempo total de congelamento condicionado de animais que receberam administração local de muscimol no CI. A ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas entre os grupos $F_{(2,49)} = 2,91$ $p > 0,05$.

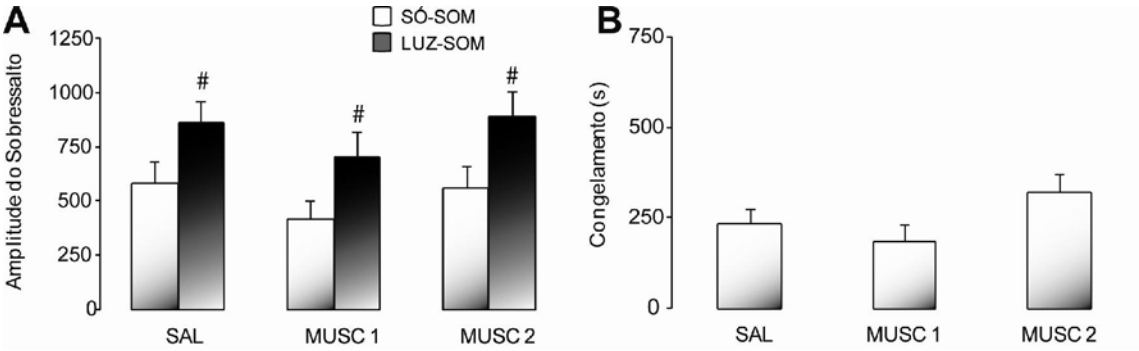

Figura 12. A - Efeitos da microinjeção intra-CI de salina ou muscimol nas doses de 1,0 ou 2,0 nmol sobre a amplitude do sobressalto nas condições só-som e luz-som. **B -** Efeitos do muscimol intra-CI sobre o tempo de congelamento. N = 19 para salina, 16 para muscimol 1,0 e 15 para muscimol 2,0 nmol. # $p < 0,05$ em relação à condição só-som. Média + EPM.

A figura 13 apresenta os resultados referentes ao teste do sobressalto potencializado pelo medo e também a medida de congelamento de animais que receberam microinjeção de semicarbazida no CI dez minutos antes da sessão teste. A figura 13A apresenta a média da amplitude de sobressalto dos animais que receberam salina ou semicarbazida na dose de 5,0 µg. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *tratamento*, $F_{(1,28)} = 0,29$; $p > 0,05$. A mesma análise revelou efeito significativo no fator *condição* (só-som × luz-som), $F_{(1,28)} = 44,61$; $p < 0,05$, indicando uma resposta mais intensa nas tentativas luz-som em comparação a só-som. Não houve interação significativa entre os dois fatores (*tratamento* × *condição*), $F_{(1,59)} = 0,36$; $p > 0,05$. A análise *post-hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a luz potencializou a resposta de sobressalto ao som nos

grupos controle e semicarbazida. A figura 13B mostra a média do tempo total de congelamento condicionado de animais que receberam micronjeção local de semicarbazida na SCPd. O teste t de *Student* não revelou diferenças significativas entre os grupos, t = 0,32 p > 0,05.

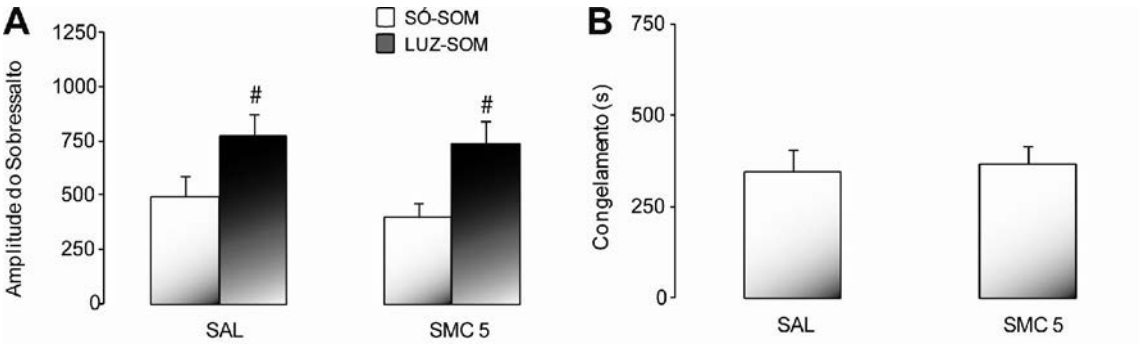

Figura 13. A - Efeitos da microinjeção intra-CI de salina ou semicarbazida na dose de 5,0 µg sobre a amplitude do sobressalto nas condições só-som e luz-som. **B -** Efeitos da semicarbazida intra-CI sobre o tempo de congelamento. N = 15 para salina e semicarbazida 5 µg. # p < 0,05 em relação à condição só-som. Média + EPM.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Encontra-se atualmente estabelecido que a SCPd e o CI são estruturas mesencefálicas envolvidas no processamento de informações de natureza aversiva (BRANDÃO et al., 1988, 1999, 2005). Diversos estudos têm demonstrado que aumentos graduais na intensidade da estimulação elétrica dessas estruturas eliciam inicialmente resposta de alerta, seguida por congelamento e finalmente por fuga (BRANDÃO et al., 1988, 2005; VIANNA et al., 2001). A SCPd e o CI, em conjunto com colículo superior, amígdala e hipotálamo medial constituem o sistema encefálico aversivo (GRAEFF, 1999; BRANDÃO et al., 1999, 2005).

Processos mediados por GABA parecem ter grande importância na SCPd e no CI, uma vez que estudos imunohistoquímicos demonstraram que essas estruturas contêm altas concentrações de GABA e sua enzima sintetizante, GAD (THOMPSON et al., 1985). Microinjeções na SCPd e CI de drogas que bloqueiam receptores GABA como bicuculina e picrotoxina, ou que inibem a GAD como a semicarbazida, produzem reações defensivas (BRANDÃO et al., 1982, 1988; MILLAN et al., 1987). Em contraste, injeções do agonista GABA-A, muscimol, produzem efeitos antiaversivos da mesma forma que os benzodiazepínicos (AUDI; GRAEFF, 1984; BOVIER et al., 1982; BRANDÃO et al., 1982; MELO et al., 1992). Assim, como a injeção de antagonistas de receptores GABA nessas estruturas mimetizam os efeitos da estimulação elétrica, tem sido sugerido que mecanismos GABAérgicos exercem um controle inibitório tônico sob os substratos neurais da aversão no teto mesencefálico (BRANDÃO et al., 2005).

Apesar dessas estruturas mesencefálicas estarem relacionadas com a geração e expressão do medo incondicionado, seus substratos neurais da aversão parecem exercer diferentes funções. Por exemplo, a fuga gerada pela estimulação da SCPd é explosiva e pouco coordenada, ao passo que aquela gerada em resposta à estimulação do CI é coordenada e

menos intensa (BRANDÃO et al., 1988). Podemos também observar que enquanto a fuga explosiva eliciada pela estimulação da SCPd cessa tão logo a estimulação é interrompida (COIMBRA; BRANDÃO, 1993; COIMBRA et al., 1996), no CI o comportamento de fuga permanece por alguns segundos após a estimulação elétrica (BRANDÃO et al., 2001; COIMBRA et al., 2000). Isto ocorre, entretanto, quando a estimulação é feita nos aspectos dorsais do CI.

Por outro lado, existem algumas evidências do envolvimento da SCPd no medo condicionado, mas a participação do CI ainda não está totalmente esclarecida (BRANDÃO et al., 1988, 1993, 1999, 2005) O entendimento de como a SCPd e o CI participam em diferentes tipos de medo é relevante para um melhor entendimento dos transtornos de ansiedade, como a ansiedade generalizada e o pânico (BRANDÃO et al., 2005). Para contribuir para este campo de pesquisa, investigamos neste trabalho os efeitos da microinjeção local de muscimol e semicarbazida na SCPd e CI em modelos animais de medo condicionado e incondicionado.

Observamos que a estimulação elétrica da SCPd produziu respostas defensivas caracterizadas por congelamento seguido de fuga explosiva. Além disso, após o término da estimulação, observou-se a ocorrência de respostas de congelamento pós-fuga. A microinjeção de muscimol na dose de 2,0 nmol nesta mesma estrutura aumentou o limiar de estimulação necessário para a expressão de ambos os comportamentos citados, porém não alterou o congelamento pós-fuga. Tais resultados estão de acordo com diversos dados da literatura que mostram efeitos antiaversivos, no medo incondicionado, do aumento da neurotransmissão GABAérgica na SCPd. Da mesma forma, a ativação de receptores benzodiazepínicos também causa efeitos antiaversivos. Assim, a microinjeção de benzodiazepínicos na SCPd aumenta o tempo de permanência dos animais nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (MOTTA; BRANDÃO, 1993) e diminui a aversividade da estimulação elétrica dessa mesma estrutura (BRANDÃO et al., 1982).

Por outro lado, semicarbazida na dose de 7,5 µg reduziu os limiares de congelamento e fuga da estimulação elétrica da SCPd, além de aumentar o tempo de congelamento pós-fuga em ambas as doses utilizadas (5,0 e 7,5 µg). Trabalhos deste e de outros laboratórios dão suporte a este resultado, indicando que a diminuição da mediação GABAérgica na SCPd promove efeitos aversivos uma vez que reduz o tempo de permanência do animal nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (AGUIAR; BRANDÃO, 1994) e serve como estímulo incondicionado no modelo de aversão condicionada ao lugar (DI SCALA; SANDNER, 1989).

Com relação ao medo condicionado, os dados aqui obtidos mostram que a microinjeção intra-SCPd de muscimol (1,0 e 2,0 nmol) foi capaz de diminuir a potencialização da resposta de sobressalto, ao mesmo tempo em que reduziu o congelamento condicionado. Outros estudos deste laboratório confirmam a ação antiaversiva no medo condicionado do aumento da neurotransmissão GABAérgica na SCPd. Dentre eles, destacamos que a administração de benzodiazepínico nesta estrutura causa redução do congelamento e antinocicepção condicionados (CASTILHO et al., 2001) e que o muscimol diminuiu tanto a potencialização do sobressalto quanto o congelamento condicionado ao contexto (REIMER et al., 2008).

Por outro lado, a microinjeção de semicarbazida na SCPd não foi capaz de alterar a resposta de sobressalto ou o congelamento condicionado. Estudo de outro laboratório confirma a ausência de efeito de bloqueadores GABA no modelo do sobressalto potencializado pelo medo, uma vez que a microinjeção intra-SCPd de picrotoxina, droga que bloqueia canais de cloro do complexo GABA-benzodiazepínico, não afeta a expressão da resposta de sobressalto (FENDT, 2000).

Quanto ao estudo do envolvimento do CI no medo incondicionado, a estimulação elétrica desta estrutura provocou reações de congelamento e fuga, esta última seguida por resposta de congelamento após o término da estimulação. Este dado sugere que o

congelamento pós-fuga poderia também ocorrer após estimulação do CI, não sendo, portanto, exclusivo da fase pós-estimulação da SCPd. No entanto, estudos mais detalhados acerca das características desse congelamento gerado ao nível do CI, tais quais aqueles existentes para a SCPd (MARTINEZ et al., 2006; VIANNA et al., 2003), fazem-se necessários para seu melhor entendimento. Ao lado disso, observamos que a microinjeção de muscimol no CI, nas duas doses utilizadas, provocou um aumento expressivo nos limiares de congelamento e fuga determinados pela estimulação dessa estrutura, mesmo efeito observado anteriormente com a administração local de midazolam (PANDÓSSIO; BRANDÃO, 1999). No entanto, o muscimol não alterou a resposta de congelamento pós-estimulação, resultado similar àquele obtido no estudo da SCPd. Isto pode ser devido ao fato de que a estimulação elétrica já promova uma redução da transmissão GABAérgica importante, além da qual a semicarbazida não mais atua.

A diminuição da neurotransmissão GABAérgica no CI causada pela administração de semicarbazida, nas doses de 5 e 7,5 µg, não provocou alterações nos limiares de congelamento e fuga, ou no tempo de congelamento pós-estimulação. Apesar de trabalhos anteriores mostrarem que a administração de antagonistas GABAérgicos no CI leva à produção de comportamentos defensivos (BRANDÃO et al., 1988, 2005), a diminuição da mediação GABAérgica não foi capaz de alterar a aversividade da estimulação elétrica desta estrutura em nosso estudo. Isto pode ser devido ao fato de que a estimulação elétrica já promove uma redução importante da transmissão GABAérgica, além da qual a semicarbazida não mais atua.

No medo condicionado, a microinjeção de muscimol intra-CI não causou alteração significativa na resposta de congelamento condicionado ou no sobressalto potencializado pelo medo. Estes dados corroboram estudos anteriores deste laboratório, nos quais o aumento da neurotransmissão GABAérgica, com a microinjeção de muscimol no CI, não alterou a

resposta de congelamento condicionado, tampouco a resposta de sobressalto a estímulos condicionados contextuais (REIMER et al., 2008). Em conformidade com esses dados, a diminuição da neurotransmissão GABAérgica, com a administração de semicarbazida, também não alterou a resposta de sobressalto e o congelamento.

De maneira geral, os resultados do presente estudo corroboram dados previamente obtidos neste e em outros laboratórios, que mostram a modulação por mecanismos GABAérgicos em estruturas do teto mesencefálico tanto no medo incondicionado quanto no condicionado (BOVIER et al., 1982; BRANDÃO et al., 2005; REIMER et al., 2008). Os resultados obtidos neste trabalho avançam um pouco mais nossa compreensão da modulação GABAérgica da SCPd e do CI na expressão do medo condicionado e incondicionado.

A SCPd tem sido considerada uma estrutura chave do sistema cerebral aversivo, sendo que inúmeros trabalhos destacam sua participação no medo incondicionado (BRANDÃO et al., 1982, 1986, 1994, 2005) enquanto que seu envolvimento no medo condicionado tem sido relativamente menos estudado (CASTILHO et al., 2001; FENDT, 2000; REIMER et al., 2008). Em nossos experimentos, o tratamento com muscimol mostrou claro efeito antiaversivo no modelo de medo incondicionado e também no paradigma de medo condicionado. Por outro lado, o tratamento com semicarbazida produziu efeitos pró-aversivos apenas no medo incondicionado. Assim, a SCPd parece atuar na expressão de comportamentos defensivos tanto em situações de medo inato quanto aprendido. Entretanto, neste último a mediação GABAérgica parece não ser exercida de forma tônica.

De maneira distinta, a regulação GABAérgica no CI parece ocorrer unicamente no medo incondicionado. No presente estudo, foi observado que o muscimol ou a semicarbazida não alteraram as respostas de medo condicionado. Esses dados encontram suporte em um outro estudo recente desse laboratório, no qual microinjeções de muscimol no CI não alteraram a resposta de congelamento ou a potencialização da resposta de sobressalto a

estímulos condicionados contextuais (REIMER et al., 2008). Portanto, enquanto no modelo de medo incondicionado o muscimol diminuiu a aversividade da estimulação elétrica do CI, esta droga não alterou as respostas condicionadas de medo quando injetada no CI. Assim, enquanto mecanismos GABAérgicos possuem um papel regulador do comportamento de defesa incondicionado no CI, eles parecem não estar envolvidos no medo condicionado organizado nessa estrutura.

Os dados aqui obtidos mostram uma participação diferencial de mecanismos GABAérgicos no medo condicionado e incondicionado. Trabalhos recentes também indicam uma participação diferencial da SCPd e do CI na expressão de respostas de medo (CASTILHO et al., 2001; CUADRA et al., 2000; REIMER et al., 2008). Nesse sentido, lesões eletrolíticas ou neurotóxicas da amígdala – uma estrutura crucial na regulação das respostas de medo – aumentam a aversividade da estimulação do CI, mas não produzem efeitos sobre a estimulação elétrica da SCPd (MAISONNETTE et al., 1996). Da mesma forma, a estimulação elétrica do CI produz um aumento pronunciado nos níveis de dopamina no córtex pré-frontal, efeito não observado com a estimulação da SCPd (CUADRA et al., 2000). Além disso, a estimulação elétrica da SCPd é capaz de produzir antinocicepção condicionada, efeito não observado com a estimulação do CI (CASTILHO et al., 2001).

Outro dado interessante observado em nosso estudo foi a resposta de congelamento pós-fuga que ocorre após a estimulação elétrica da SCPd. Estudos anteriores sugerem que durante este comportamento, estruturas encefálicas mais rostrais seriam ativadas (BRANDÃO et al., 2008; MARTINEZ et al., 2006; VIANNA et al., 2003). De fato, além da participação de regiões envolvidas no processamento de informação aversiva, como a amígdala (MARTINEZ et al., 2006), outras estruturas relacionadas com o processamento mnemônico, como os córtices pré-frontal medial e cingulado anterior, também seriam ativadas durante a resposta de congelamento pós-estimulação (VIANNA et al., 2003). Em nosso estudo, observamos que

apesar dessa resposta também ocorrer após a estimulação do CI, ela não foi alterada por mecanismos GABAérgicos, diferentemente do que ocorreu quando tal manipulação foi feita na SCPd. Nesse sentido, ainda faltam evidências sobre como se daria a modulação da resposta observada pelo término da estimulação do CI por estruturas mais rostrais e se esse comportamento teria o mesmo significado funcional da resposta observada após estimulação da SCPd (BRANDÃO et al., 2008)

Em conjunto estes dados sugerem que o substrato neural do medo na SCPd e no CI serve a diferentes facetas da reação de defesa. Enquanto que os mecanismos GABAérgicos exercem uma inibição tônica sobre os substratos neurais do medo incondicionado tanto na SCPd quanto no CI, eles não atuam nestas estruturas da mesma forma quando se trata do medo condicionado. É provável que os circuitos neurais responsáveis pela organização e elaboração do medo condicionado tenham uma menor representação no CI. Em outras palavras, pode ser que a organização neural do medo condicionado no sentido rostro-caudal não se estenda muito além da SCPd. Por outro lado, a organização do medo incondicionado pode ter uma representação neural invertida com estruturas mais caudais como o CI tendo, eventualmente, um papel mais importante que outras situadas rostralmente. Essa dualidade na representação neural do medo condicionado e incondicionado em forma de duas pirâmides invertidas – uma com sua base no córtex (medo condicionado) e a outra com sua base no tronco encefálico caudal (medo incondicionado) – já havia sido proposta em revisão recente publicada pelo grupo do pesquisador neozelandês Neil McNaughton (MCNAUGHTON; CORR, 2004).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Nossos resultados mostram uma participação diferencial da modulação GABAérgica da SCPd e do CI no medo incondicionado e condicionado.

- A SCPd parece atuar na expressão de comportamentos defensivos tanto em situações de medo inato quanto aprendido. Entretanto, neste último a mediação GABAérgica parece não ser exercida de forma tônica.

- Mecanismos GABAérgicos possuem um papel regulador do comportamento de medo incondicionado organizado no CI, mas parecem não estar envolvidos no medo condicionado.

- A organização neural do medo condicionado no sentido rostro-caudal parece não se estender muito além da SCPd. Por outro lado, os substratos neurais do medo incondicionado parecem se localizar em estruturas mais caudais como o CI, que parece ter um papel mais importante que outras situadas mais rostralmente.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGUIAR, M. S.; BRANDÃO, M. L. Conditioned place aversion produced by microinjections of substance P into the periaqueductal gray of rats. v.5, p. 369-373, 1994.

AITKIN, L. M.; PHILLIPS, S. C. The interconnections of the inferior colliculus through their commissure. **Journal of Comparative Neurology**, v. 228, p. 210-216, 1984.

AUDI, E. A.; GRAEFF, F. G. Benzodiazepine receptors in the periaqueductal grey mediate anti-aversive drug action. **European Journal of Pharmacology**, v. 103, p. 279-285, 1984.

BANDLER, R.; CARRIVE, P.; ZHANG, S. P. Viscerotopic organization of neurons subserving hypotensive reactions within the midbrain periaqueductal grey: a correlative functional and anatomical study. **Brain Research**, v. 541, p. 206-215, 1991.

BANDLER, R.; DEPAULIS, P. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and rat: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization. In A. Depaulis and R. Bandler (eds): **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter,** London: Plenum Publishing, p. 175-198, 1991.

BANDLER, R.; KEAY, K. A. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. **Progress in Brain Research**, v. 107, p. 285-300, 1996.

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annual Reviews in Neuroscience**, v. 7, p. 309-338, 1984.

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. Relationship of glutamate and aspartate to the periaqueductal gray-raphe magnus projection: analysis using immunocytochemistry and microdialysis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 38, p. 1755-1765, 1990.

BOVIER, P; BROEKKAMP, C. L.; LLOYD, K. G. Enhancing GABAergic transmission reverses the aversive state in rats induced by electrical stimulation of the periaqueductal grey region. **Brain Research**, v. 248, p. 313-320, 1982.

BRANDÃO, M. L.; ANSELONI, V. Z.; PANDOSSIO, J. E.; DE ARAUJO, J. E.; CASTILHO, V. M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 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 and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1299-1311, 2005.

BRANDÃO, M. L.; CARDOSO, S. H.; MELO, L. L.; MOTTA, V. A.; COIMBRA, N. C. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v. 18, p. 339-346, 1994.

BRANDÃO, M. L.; COIMBRA, N. C.; OSAKI, M. Y. Changes in the auditory-evoked potentials induced by fear-evoking stimulations. **Physiology & Behavior**, v. 72, p. 365-372, 2001.

BRANDÃO, M. L.; DE AGUIAR, J. C.; GRAEFF, F. G. GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 16, p. 397-402, 1982.

BRANDÃO, M. L.; DI SCALA, G.; BOUCHET, M. J.; SCHMITT, P. Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 24, p. 497-501, 1986.

BRANDÃO, M. L.; MELO, L. L.; CARDOSO, S. H. Mechanisms of defense in the inferior colliculus. **Behavioral Brain Research**, v. 58, p. 49-55, 1993.

BRANDÃO, M. L.; TOMAZ, C.; BORGES, P. C.; COIMBRA, N. C.; BAGRI, A. Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. **Physiology & Behavior**, v. 44, p. 361-365, 1988.

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. **Behavioural Brain Research**, v. 188, p 1-13, 2008.

BROWN, J. S.; KALISH, H. I.; FARBER, I. E. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. **Journal of Experimental Psychology**, v. 41, p. 317-328, 1951.

CANTERAS, N. S. Critical analysis of the neural systems organizing innate fear responses. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.25, p. 21-24, 2003.

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-HT2A receptors in rats. **Psychopharmacology,** v. 155, p. 154-62, 2001.

COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. GABAergic nigrocollicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. **Behavioral Brain Research**, v. 59, p. 131-139, 1993.

COIMBRA, N. C.; EICHENBERGER, G. C.; GORCHINSKI, R. T.; MAISONNETTE, S. Effects of the blockade of opioid receptor on defensive reactions elicited by electrical stimulation within the deep layers of the superior colliculus and DPAG. **Brain Research**, v. 736, p. 348-352, 1996.

COIMBRA, N. C.; OSAKI, M. Y.; EICHENBERGER, G. C.; CISCATO, J. G.; 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, p. 422-430, 2000.

CUADRA, G; ZURITA, A; MACEDO, C. E.; MOLINA, V. A.; BRANDÃO, M. L. Electrical stimulation of the midbrain tectum enhances dopamine release in the frontal cortex. **Brain Research Bulletin**, v. 52, p. 413-418, 2000.

DAVIS, M.; FALLS, W. A.; CAMPEAU, S.; KIM, M. Fear-potentiated startle: a neural and a pharmacological analysis. **Behavioral Brain Research**, v. 58, p. 175-198, 1993.

DAVIS, M.; HITCHCOCK, J. M.; ROSEN, J. B. Neural mechanisms of fear conditioning measured with the acoustic startle reflex. In: J. Madden (ed.) **Neurobiology of Learning, Emotion and Affect**. Raven Press, New York, cap. 3, p. 67-95, 1991.

DELGADO J. M.; ROBERTS W. W.; MILLER N. E. Learning motivated by electrical stimulation of the brain. **The American Journal of Physiology,** v. 179, p. 587-593, 1954.

DI SCALA, G; SANDNER, G. Conditioned place aversion produced by microinjections of semicarbazide into the periaqueductal gray of the rat. **Brain Research**, v. 483, p. 91-97, 1989.

FANSELOW, M. S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: A. Depaulis & R. Bandler (eds.) **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**. Plenum Press, New York, p. 151-173, 1991.

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, 1996.

FANSELOW, M. S.; BOLLES, R. C. Triggering of the endorphin analgesic reaction by a cue previously associated with shock: reversal by naloxone. **Bulletion of Psychonomic Society**, v. 14, p. 88-90, 1979.

FENDT, M. Expression and conditioned inhibition of fear-potentiated startle after stimulation and blockade of AMPA/Kainate and GABA(A) receptors in the dorsal periaqueductal gray. **Brain Research**, v. 880, p. 1-10, 2000.

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

FLESHLER, M. Adequate acoustic stimulus for startle reaction in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 60, p. 200-207, 1965.

GRAEFF, F. G. Neurotransmitters in the dorsal periaqueductal gray and animal models of panic and anxiety. In: M. Briley and S.E. File, Editors, **New Concepts in Anxiety**, Macmillan Press, London, p. 288–312, 1999.

HITCHCOCK, J. M.; DAVIS, M. Fear-potentiated startle using an auditory conditioned stimulus: effect of lesions of the amygdale. **Physiology & Behavior**, v. 39, p. 403-408, 1987.

HUFFMAN, R. F.; HENSON JR, O. W. The descending auditory pathway acousticmotor system: connections with the inferior colliculus. **Brain Research Review**, v. 15, p. 295-323, 1990.

HUNSPERGER, R. W. Comportements affectifs provoqués par la stimulation électrique du tronc cérébral et du cerveau antérieur. **Journal de Physiologie**, v. 55, p. 45-97, 1963

JÜRGENS, U.; LU, C. L. The effects of periaqueductally injected transmitter antagonists on forebrain-elicited vocalization in the squirrel monkey. **European Journal of Neuroscience**, v. 5, p. 735-741, 1993.

KIM, J. J.; RISON, R. A.; FANSELOW, M. S. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. **Behavioral Neuroscience,** v. 107, p. 1093-1098, 1993.

KOCH, M. The neurobiology of startle. **Progress in Neurobiology**, v. 59, p. 107-128, 1999.

LEBEAU, F. E. N.; REES, A.; MALMIERCA, M. S. Contribution of GABA and glycine-mediated inhibition to the monoaural temporal response properties of neurons in the inferior colliculus. **Neurophysiology**, v. 75, p. 902–919, 1996.

LEDOUX, J. E.; FARB, C.; RUGGIERO, D. A. Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. **The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 10, p. 1043-54, 1990.

LEDOUX, J. E.; SAKAGUCHI, A.; IWATA, J.; REIS, D. J. Auditory emotional memories: establishment by projections from the medial geniculate nucleus to the posterior neostriatum and/or dorsal amygdala. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 444 , p. 463-464, 1985.

LOVICK, T. A. Interations between descending pathways from dorsal and ventrolateral periaqueductal gray matter in the Rat. In A. Depaulis & R. Bandler (eds.), **The midbrain periaqueductal gray matter functional, anatomical and neurochemical organization**. Plenum Press, p. 101-120, 1991.

LYDIARD, R. B. The role of GABA in anxiety disorders. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 64, p. 21-27, 2003.

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

MARTINEZ, R. C.; OLIVEIRA, A. R.; BRANDÃO, M. L. Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of

muscimol into amygdaloid nuclei. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 85, p. 58-65, 2006.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 285-305 , 2004.

MELO, L. L.; CARDOSO, S. H.; BRANDÃO, M. L. Antiaversive action of benzodiazepines on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Physiology & Behavior**, v. 51, p. 557–562, 1992.

MILLAN, M. J.; CZLONKOWSKI, A.; MILLAN, M. H.; HERZ, A. Activation of periaqueductal grey pools of beta-endorphin by analgetic electrical stimulation in freely moving rats. **Brain Research**, v. 407, p. 199-203, 1987.

MONASSI, C. R.; HOFFMANN, A.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Participation of the periaqueductal gray matter in the modulation of tonic immobility in the guinea pig. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p. 1243-1248, 1994.

MOTTA, V.; BRANDÃO, M. L. Aversive and antiaversive effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 44, p. 119-25, 1993.

OGAWA, S.; KOW, L. M.; PFAFF, D. W. Effects of lordosis-relevant neuropeptides on midbrain periaqueductal gray neuronal activity *in vitro*. **Peptides**, v. 13, p. 965–975, 1992.

OLIVEIRA, A. R.; REIMER, A. E.; BRANDÃO, M. L. Dopamine D2 receptor mechanisms in the expression of conditioned fear. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior,** v. 84, p. 102-111, 2006.

PANDOSSIO, J. E.; BRANDÃO, M. L. Defensive reactions are counteracted by midazolam and muscimol and elicited by activation of glutamate receptors in the inferior colliculus of rats. **Psychopharmacology**, v. 142, p. 360-368, 1999.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. New York: Academic Press, 2007.

REIMER, A. E.; OLIVEIRA, A. R.; BRANDÃO, M. L. Selective involvement of GABAergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray and inferior colliculus on the memory of the contextual fear as assessed by the fear potentiated startle test. **Brain Research Bulletin,** v. 76, p. 545-550, 2008.

REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v. 164, p. 444-445, 1969.

ROBERTS, R. C.; RIBAK, C. E. GABAergic neurons and axon terminals in the brainstem auditory nuclei of the gerbil. **Journal of Comparative Neurology**, v. 258, p. 267-280, 1987.

SILVEIRA, M. C. L.; SANDER, G.; GRAEFF, F. G. Induction of FOS immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behavioral Brain Research**, v. 56, p. 115-118, 1993.

THOMPSON, G. C.; CORTEZ, A. M.; LAM, D. M. Localization of GABA immunoreactivity in the auditory brainstem of the guinea pigs. **Brain Research**, v. 339, p. 119-122, 1985.

TOKUNAGA, A.; SUGITA, S.; OTANI, K. Auditory and non-auditory subcortical afferents to the inferior colliculus in the rat. **Journal fur Hirnforschung**, v. 25 p. 461-72, 1984.

TOMAZ, C.; BRANDÃO, M.; BAGRI, A.; CARRIVE, P.; SCHMITT, P. Flight behavior induced by microinjection of GABA antagonists into periventricular structures in detelencephalated rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 30, p. 337-342, 1988.

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, p. 557-566, 2003.

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.

YEOMANS, J. S.; FRANKLAND, P. W. The acoustic startle reflex: neurons and connections. **Brain Research Reviews**, v. 21, p. 301-314, 1996.

* De acordo com:

Manual de Referências e Citações Bibliográficas do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, baseado nas normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

Apêndice

Tabela 1. Resultados individuais da estimulação elétrica (Medo Incondicionado - SCPd). Valores dos limiares de estimulação elétrica (µA) da SCPd antes (LB) e depois (TESTE) da administração de salina (CONTROLE), muscimol 1 nmol (MUS 1) ou 2 nmol (MUS 2) e a diferença entre os limiares (Delta), necessários para a exibição dos comportamentos de congelamento e fuga.

CONTROLE	Congelamento			Fuga		
	LB	TESTE	Delta	LB	TESTE	Delta
R1	50	50	0	60	60	0
R2	40	45	5	50	50	0
R3	65	65	0	75	80	5
R4	60	60	0	65	60	-5
R5	55	50	-5	65	65	0
R6	65	60	-5	80	75	-5
R7	80	85	5	135	125	-10
R8	80	80	0	135	140	5
R9	60	60	0	90	95	5
R10	130	120	-10	135	130	-5
R11	40	40	0	45	45	0
R12	70	70	0	80	80	0
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
N	12	12	12	12	12	12
Média	66.25	65.42	-0.83	84.58	83.75	-0.83
Desvio	23.94	21.79	4.17	32.92	32.13	4.69
EPM	6.91	6.29	1.20	9.50	9.28	1.35

MUS 1	Congelamento			Fuga		
	LB	TESTE	Delta	LB	TESTE	Delta
R1	40	40	0	45	45	0
R2	40	60	20	50	75	25
R3	65	45	-20	75	90	15
R4	100	100	0	105	110	5
R5	80	75	-5	100	85	-15
R6	40	45	5	45	50	5
R7	75	70	-5	80	85	5
R8	140	140	0	150	150	0
R9	90	130	40	105	140	35
R10	110	100	-10	115	115	0
R11	150	120	-30	160	140	-20
R12	70	80	10	120	120	0
R13	130	130	0	140	135	-5
R14	85	80	-5	90	85	-5
R15	70	75	5	80	85	5
N	15	15	15	15	15	15
Média	85.67	86.00	0.33	97.33	100.67	3.33
Desvio	35.04	32.80	16.09	36.20	32.51	13.84
EPM	9.05	8.47	4.15	9.35	8.39	3.57

MUS 2	Congelamento			Fuga		
	LB	TESTE	Delta	LB	TESTE	Delta
R1	40	50	10	45	55	10
R2	75	95	20	85	110	25
R3	40	45	5	45	65	20
R4	60	90	30	90	115	25
R5	50	45	-5	65	65	0
R6	50	50	0	55	80	25
R7	85	95	10	90	110	20
R8	50	60	10	60	70	10
R9	50	80	30	70	110	40
R10	120	150	30	160	210	50
R11	35	40	5	40	45	5
R12	75	90	15	80	100	20
R13	55	75	20	70	80	10
R14	80	100	20	90	105	15
R15	65	75	10	75	80	5
N	15	15	15	15	15	15
Média	62.00	76.00	14.00	74.67	93.33	18.67
Desvio	22.18	29.29	10.89	29.06	39.26	13.43
EPM	5.73	7.56	2.81	7.50	10.14	3.47

Tabela 2. Resultados individuais da estimulação elétrica (Medo Incondicionado - SCPd). Valores dos limiares de estimulação elétrica (µA) da SCPd antes (LB) e depois (TESTE) da administração de salina (CONTROLE), semicarbazida 5 µg (SMC 5) ou 7,5 µg (SMC 7,5) e a diferença entre os limiares (Delta), necessários para a exibição dos comportamentos de congelamento e fuga.

CONTROLE	Congelamento			Fuga		
	LB	TESTE	Delta	LB	TESTE	Delta
R1	100	100	0	105	105	0
R2	120	115	-5	130	135	5
R3	70	70	0	85	80	-5
R4	85	95	10	95	100	5
R5	105	105	0	110	110	0
R6	70	75	5	85	85	0
R7	90	95	5	105	110	5
R8	60	65	5	85	85	0
R9	75	75	0	85	95	10
R10	120	110	-10	130	115	-15
R11	85	80	-5	100	100	0
R12	65	70	5	90	100	10
N	12	12	12	12	12	12
Média	87.08	87.92	0.83	100.42	101.67	1.25
Desvio	20.50	17.38	5.57	16.44	15.13	6.78
EPM	5.92	5.02	1.61	4.75	4.37	1.96

SMC 5	Congelamento			Fuga		
	LB	TESTE	Delta	LB	TESTE	Delta
R1	40	25	-15	45	40	-5
R2	80	75	-5	90	80	-10
R3	45	45	0	60	70	10
R4	45	40	-5	55	50	-5
R5	90	95	5	100	120	20
R6	140	130	-10	170	160	-10
R7	50	40	-10	60	60	0
R8	85	65	-20	110	105	-5
R9	55	55	0	75	75	0
R10	50	45	-5	55	55	0
R11	50	60	10	75	75	0
R12	65	50	-15	75	70	-5
N	12	12	12	12	12	12
Média	66.25	60.42	-5.83	80.83	80.00	-0.83
Desvio	28.69	28.56	8.75	34.17	33.57	8.48
EPM	8.28	8.24	2.53	9.86	9.69	2.45

SMC 7,5	Congelamento			Fuga		
	LB	TESTE	Delta	LB	TESTE	Delta
R1	50	60	10	55	65	10.00
R2	35	30	-5	40	35	-5.00
R3	75	60	-15	100	95	-5.00
R4	50	45	-5	60	55	-5.00
R5	170	130	-40	190	140	-50.00
R6	35	25	-10	40	30	-10.00
R7	60	35	-25	65	40	-25.00
R8	55	40	-15	65	50	-15.00
R9	60	40	-20	65	50	-15.00
R10	35	35	0	45	40	-5.00
R11	85	75	-10	90	80	-10.00
R12	110	75	-35	120	80	-40.00
N	12	12	12	12	12	12
Média	68.33	54.17	-14.17	77.92	63.33	-14.58
Desvio	38.98	29.14	14.28	42.93	31.43	16.58
EPM	11.25	8.41	4.12	12.39	9.07	4.79

Tabela 3. Resultados individuais para o tempo de congelamento pós-estimulação, em segundos (Medo Incondicionado - SCPd), antes (LB) e após a administração (TESTE) de salina (CONTROLE), muscimol 1 nmol (MUS 1) ou 2 nmol (MUS 2), semicarbazida 5 µg (SMC 5) ou 7,5 µg (SMC 7,5) intra-SCPd.

CONTROLE	Congelamento	
	LB	TESTE
R1	102	206
R2	71	75
R3	74	58
R4	270	242
R5	99	108
R6	170	179
R7	290	133
R8	245	230
R9	212	230
R10	61	101
R11	197	207
R12	230	210
-	-	-
-	-	-
-	-	-
N	12	12
Média	168.42	164.92
Desvio	83.48	66.03
EPM	24.10	19.06

MUS 1	Congelamento	
	LB	TESTE
R1	296	107
R2	231	118
R3	299	281
R4	297	28
R5	103	238
R6	109	65
R7	69	100
R8	298	298
R9	298	187
R10	40	150
R11	111	199
R12	279	168
R13	47	50
R14	78	66
R15	96	113
N	15	15
Média	176.73	144.53
Desvio	108.30	82.96
EPM	27.96	21.42

MUS 2	Congelamento	
	LB	TESTE
R1	277	241
R2	254	266
R3	166	118
R4	61	18
R5	18	15
R6	231	154
R7	224	148
R8	277	223
R9	109	87
R10	256	131
R11	215	135
R12	287	205
R13	85	57
R14	103	76
R15	124	97
N	15	15
Média	179.13	131.40
Desvio	89.04	77.04
EPM	22.99	19.89

CONTROLE	Congelamento	
	LB	TESTE
R1	132	154
R2	57	48
R3	232	192
R4	113	137
R5	99	137
R6	125	159
R7	114	99
R8	120	103
R9	135	128
R10	154	142
R11	178	191
R12	100	90
N	12	12
Média	129.92	131.67
Desvio	43.87	41.79
EPM	12.66	12.06

SMC 5	Congelamento	
	LB	TESTE
R1	233	290
R2	61	116
R3	103	226
R4	213	263
R5	118	278
R6	191	170
R7	170	223
R8	197	248
R9	64	219
R10	63	165
R11	138	59
R12	75	204
N	12	12
Média	135.50	205.08
Desvio	63.61	67.95
EPM	18.36	19.62

SMC 7,5	Congelamento	
	LB	TESTE
R1	50	125
R2	290	300
R3	137	292
R4	104	289
R5	160	292
R6	168	274
R7	80	161
R8	130	238
R9	248	274
R10	138	262
R11	220	148
R12	108	214
N	12	12
Média	152.75	239.08
Desvio	70.02	62.38
EPM	20.21	18.01

Tabela 4. Resultados individuais para o teste do sobressalto potencializado pelo medo e congelamento condicionado (Medo Condicionado - SCPd), referentes aos animais que receberam microinjeção de salina (CONTROLE), muscimol 1 nmol (MUS 1) ou 2 nmol (MUS 2) intra-SCPd antes da sessão teste.

CONTROLE	CONG (s)	SÓ-SOM	LUZ-SOM	MUS 1	CONG (s)	SÓ-SOM	LUZ-SOM	MUS 2	CONG (s)	SÓ-SOM	LUZ-SOM
R1	748	957	1547	R1	188	240	334	R1	311	158	196
R2	284	854	1464	R2	140	179	319	R2	572	883	1083
R3	473	463	1176	R3	370	58	154	R3	180	285	565
R4	1130	1241	1283	R4	133	95	205	R4	299	367	823
R5	164	320	894	R5	38	778	1134	R5	606	759	1141
R6	236	169	179	R6	0	1202	1840	R6	446	738	681
R7	894	364	1299	R7	323	407	547	R7	507	185	226
R8	611	60	206	R8	297	197	205	R8	124	57	361
R9	323	398	612	R9	25	241	176	R9	118	221	214
R10	1060	338	1127	R10	184	379	660	R10	50	68	58
R11	702	306	475	R11	553	747	843	R11	28	162	172
R12	253	132	215	R12	275	34	37	R12	186	566	1108
R13	340	620	985	R13	158	355	494	R13	116	231	869
R14	422	463	961	R14	0	399	502	R14	271	744	1199
-	-	-	-	R15	229	219	610	R15	283	109	424
-	-	-	-	-	-	-	-	R16	441	213	573
N	14	14	14	**N**	15	15	15	**N**	16	16	16
Média	545.71	477.5	887.35	**Média**	194.20	368.67	537.33	**Média**	283.63	359.13	605.81
Desvio	316.84	334.78	473.39	**Desvio**	153.79	317.57	463.50	**Desvio**	184.47	280.41	390.73
EPM	84.68	89.47	126.51	**EPM**	39.71	82.00	119.68	**EPM**	46.12	70.10	97.68

Tabela 5. Resultados individuais para o teste do sobressalto potencializado pelo medo e congelamento condicionado (Medo Condicionado - SCPd), referentes aos animais que receberam microinjeção de salina (CONTROLE), semicarbazida 5µg (SMC 5) ou 7,5 µg (SMC 7,5) intra-SCPd antes da sessão teste.

CONTROLE	CONG	SÓ-SOM	LUZ-SOM	SMC 5	CONG	SÓ-SOM	LUZ-SOM	SMC 7,5	CONG	SÓ-SOM	LUZ-SOM
R1	579	508	858	R1	674	185	288	R1	407	350	471
R2	250	81	154	R2	618	92	117	R2	670	454	805
R3	526	238	501	R3	416	1068	1382	R3	1160	597	548
R4	358	486	1096	R4	1692	29	46	R4	554	100	560
R5	393	849	1366	R5	408	444	547	R5	709	183	320
R6	717	69	104	R6	761	596	978	R6	467	280	663
R7	346	826	1563	R7	464	181	311	R7	580	175	246
R8	502	104	145	R8	658	626	1239	R8	900	231	297
R9	314	768	958	R9	673	125	153	R9	571	672	1,188
R10	504	537	669	R10	327	680	945	R10	476	1,091	1,377
R11	383	1056	1746	R11	615	222	620	R11	541	1,557	1,708
R12	699	524	645	R12	562	585	933	-	-	-	-
R13	693	600	724	R13	254	212	601	-	-	-	-
R14	0	222	313	R14	377	85	274	-	-	-	-
-	-	-	-	R15	826	747	820	-	-	-	-
-	-	-	-	R16	197	260	602	-	-	-	-
N	14	14	14	**N**	16	16	16	**N**	11	11	11
Média	447.43	490.57	774.43	**Média**	595.13	383.56	616.00	**Média**	639.55	517.27	743.91
Desvio	197.74	314.28	526.86	**Desvio**	344.56	300.50	405.57	**Desvio**	219.16	448.75	480.81
EPM	52.85	84.00	140.81	**EPM**	86.14	75.13	101.39	**EPM**	66.08	135.30	144.97

Tabela 6. Resultados individuais da estimulação elétrica (Medo Incondicionado - CI). Valores dos limiares de estimulação elétrica (µA) do CI antes (LB) e depois (TESTE) da administração de salina (CONTROLE), muscimol 1 nmol (MUS 1) ou 2 nmol (MUS 2) e a diferença entre os limiares (Delta), necessários para a exibição dos comportamentos de congelamento e fuga.

CONTROLE	Congelamento			Fuga		
	LB	TESTE	Delta	LB	TESTE	Delta
R1	140	120	-20	145	130	-15
R2	60	65	5	70	75	5
R3	110	115	5	140	135	-5
R4	175	180	5	190	190	0
R5	140	125	-15	150	130	-20
R6	130	135	5	135	140	5
R7	120	115	-5	130	125	-5
R8	85	90	5	95	100	5
R9	55	60	5	60	65	5
N	9	9	9	9	9	9
Média	112.78	111.67	-1.11	123.89	121.11	-2.78
Desvio	39.70	36.74	9.93	41.44	37.40	9.39
EPM	13.23	12.25	3.31	13.81	12.47	3.13

MUS 1	Congelamento			Fuga		
	LB	TESTE	Delta	LB	TESTE	Delta
R1	60	60	0	65	75	10
R2	30	35	5	40	50	10
R3	110	130	20	120	200	80
R4	50	70	20	60	105	45
R5	60	75	15	65	95	30
R6	35	45	10	40	60	20
R7	70	80	10	85	115	30
R8	55	55	0	65	75	10
R9	20	25	5	25	35	10
N	9	9	9	9	9	9
Média	54.44	63.89	9.44	62.78	90.00	27.22
Desvio	26.39	30.80	7.68	27.96	48.67	23.33
EPM	8.80	10.27	2.56	9.32	16.22	7.78

MUS 2	Congelamento			Fuga		
	LB	TESTE	Delta	LB	TESTE	Delta
R1	105	135	30	110	230	120
R2	150	170	20	175	275	100
R3	100	120	20	110	220	110
R4	45	55	10	50	70	20
R5	165	200	35	170	260	90
R6	70	140	70	75	195	120
R7	75	145	70	80	170	90
R8	30	50	20	35	60	25
R9	55	60	5	60	80	20
N	9	9	9	9	9	9
Média	88.33	119.44	31.11	96.11	173.33	77.22
Desvio	46.10	53.47	23.82	49.92	83.63	43.09
EPM	15.37	17.82	7.94	16.64	27.88	14.36

Tabela 7. Resultados individuais da estimulação elétrica (Medo Incondicionado - CI). Valores dos limiares de estimulação elétrica (µA) do CI antes (LB) e depois (TESTE) da administração de salina (CONTROLE), semicarbazida 5 µg (SMC 5) ou 7,5 µg (SMC 7,5) e a diferença entre os limiares (Delta), necessários para a exibição dos comportamentos de congelamento e fuga.

CONTROLE	Congelamento			Fuga		
	LB	TESTE	Delta	LB	TESTE	Delta
R1	80	80	0	85	85	0
R2	110	105	-5	125	120	-5
R3	75	80	5	90	100	10
R4	55	50	-5	70	75	5
R5	80	85	5	90	95	5
R6	30	30	0	40	40	0
R7	30	30	0	35	35	0
R8	70	75	5	80	85	5
R9	45	40	-5	55	55	0
R10	70	70	0	85	80	-5
N	10	10	10	10	10	10
Média	64.50	64.50	0.00	75.50	77.00	1.50
Desvio	24.88	25.54	4.08	26.71	26.79	4.74
EPM	7.87	8.08	1.29	8.45	8.47	1.50

SMC 5	Congelamento			Fuga		
	LB	TESTE	Delta	LB	TESTE	Delta
R1	85	60	-25	110	70	-40
R2	60	60	0	90	85	-5
R3	120	120	0	140	140	0
R4	65	50	-15	85	75	-10
R5	135	180	45	140	185	45
R6	95	95	0	100	100	0
R7	85	85	0	110	110	0
R8	40	40	0	45	50	5
R9	40	25	-15	55	30	-25
R10	40	25	-15	45	35	-10
N	10	10	10	10	10	10
Média	76.50	74.00	-2.50	92.00	88.00	-4.00
Desvio	33.67	48.12	19.04	35.21	48.14	21.96
EPM	10.65	15.22	6.02	11.14	15.22	6.94

SMC 7,5	Congelamento			Fuga		
	LB	TESTE	Delta	LB	TESTE	Delta
R1	55	60	5	60	65	5.00
R2	35	40	5	45	45	0.00
R3	70	70	0	75	75	0.00
R4	35	25	-10	40	35	-5.00
R5	55	55	0	60	60	0.00
R6	30	20	-10	30	35	5.00
R7	60	70	10	70	80	10.00
R8	70	50	-20	75	60	-15.00
R9	25	30	5	30	25	-5.00
R10	25	30	5	35	40	5.00
N	10	10	10	10	10	10
Média	46.00	45.00	-1.00	52.00	52.00	0.00
Desvio	17.92	18.56	9.37	18.14	18.59	7.07
EPM	5.67	5.87	2.96	5.73	5.88	2.24

Tabela 8. Resultados individuais para o tempo de congelamento pós-estimulação, em segundos (Medo Incondicionado - CI), antes (LB) e após a administração (TESTE) de salina (CONTROLE), muscimol 1 nmol (MUS 1) ou 2 nmol (MUS 2), semicarbazida 5 µg (SMC 5) ou 7,5 µg (SMC 7,5) intra-CI.

CONTROLE	Congelamento	
	LB	TESTE
R1	47	29
R2	217	198
R3	170	143
R4	209	179
R5	179	200
R6	178	189
R7	150	139
R8	168	147
R9	153	171
N	9	9
Média	163.44	155.00
Desvio	49.13	52.68
EPM	16.38	17.56

MUS 1	Congelamento	
	LB	TESTE
R1	146	139
R2	135	209
R3	171	48
R4	127	87
R5	50	69
R6	249	202
R7	121	178
R8	88	138
R9	158	117
N	9	9
Média	138.33	131.89
Desvio	55.38	57.34
EPM	18.46	19.11

MUS 2	Congelamento	
	LB	TESTE
R1	123	107
R2	154	168
R3	89	117
R4	138	124
R5	133	194
R6	179	186
R7	198	139
R8	200	177
R9	169	199
N	9	9
Média	153.67	156.78
Desvio	36.72	35.37
EPM	12.24	11.79

CONTROLE	Congelamento	
	LB	TESTE
R1	162	192
R2	174	202
R3	152	128
R4	135	158
R5	181	168
R6	114	103
R7	164	173
R8	177	185
R9	147	128
R10	162	140
N	10	10
Média	156.80	157.70
Desvio	20.61	32.14
EPM	6.52	10.16

SMC 5	Congelamento	
	LB	TESTE
R1	178	198
R2	146	195
R3	216	229
R4	77	90
R5	139	124
R6	154	138
R7	163	192
R8	128	139
-	-	-
-	-	-
N	8	8
Média	150.13	163.13
Desvio	40.13	47.05
EPM	14.19	16.64

SMC 7,5	Congelamento	
	LB	TESTE
R1	138	157
R2	195	185
R3	111	130
R4	155	169
R5	133	162
R6	224	202
R7	63	92
R8	154	138
R9	137	158
R10	163	177
N	10	10
Média	147.30	157.00
Desvio	43.88	31.08
EPM	13.88	9.83

Tabela 9. Resultados individuais para o teste do sobressalto potencializado pelo medo e congelamento condicionado (Medo Condicionado - CI), referentes aos animais que receberam microinjeção de salina (CONTROLE), muscimol 1 nmol (MUS 1) ou 2 nmol (MUS 2) intra-CI antes da sessão teste.

CONTROLE	CONG	SÓ-SOM	LUZ-SOM	MUSC 1	CONG	SÓ-SOM	LUZ-SOM	MUSC 2	CONG	SÓ-SOM	LUZ-SOM
R1	380	746	790	R1	75	110	79	R1	196	398	1032
R2	152	162	168	R2	397	202	568	R2	368	666	1071
R3	404	912	1102	R3	38	188	251	R3	306	1091	1241
R4	389	524	956	R4	112	482	1020	R4	186	449	793
R5	161	774	902	R5	427	971	1771	R5	53	116	446
R6	99	323	556	R6	103	138	202	R6	101	248	342
R7	210	1669	1539	R7	346	514	923	R7	483	392	575
R8	81	541	567	R8	129	473	823	R8	214	1,025	1,573
R9	78	422	1121	R9	213	115	463	R9	663	469	684
R10	75	381	561	R10	0	139	358	R10	488	1,143	1,160
R11	424	605	868	R11	209	264	766	R11	338	784	1,095
R12	243	434	864	R12	446	1235	984	R12	438	329	912
R13	168	625	1201	R13	302	234	464	R13	297	214	460
R14	30	143	121	R14	9	224	551	R14	523	160	580
R15	210	163	579	R15	50	410	443	R15	85	89	106
R16	354	621	862	R16	73	266	471	-	-	-	-
R17	177	123	115	-	-	-	-	-	-	-	-
R18	352	324	819	-	-	-	-	-	-	-	-
R19	401	450	1,082	-	-	-	-	-	-	-	-
N	19	19	19	N	16	16	16	N	15	15	15
MÉDIA	230.95	523.26	777.53	MÉDIA	183.06	372.81	633.56	MÉDIA	315.93	504.87	804.67
DP	133.36	356.83	377.74	DP	154.36	318.10	412.38	DP	179.23	356.41	395.78
EPM	30.60	81.86	86.66	EPM	38.59	79.52	103.10	EPM	46.28	92.02	102.19

Tabela 10. Resultados individuais para o teste do sobressalto potencializado pelo medo e congelamento condicionado (Medo Condicionado - CI), referentes aos animais que receberam microinjeção de salina (CONTROLE) ou semicarbazida 5µg (SMC 5) intra-CI antes da sessão teste.

CONTROLE	CONG	SÓ-SOM	LUZ-SOM
R1	32	541	486
R2	560	808	1,513
R3	516	344	605
R4	149	378	669
R5	40	365	516
R6	576	771	1,151
R7	760	1,475	1,393
R8	463	450	830
R9	242	193	362
R10	536	791	895
R11	333	309	668
R12	343	190	600
R13	106	418.07	1079.7
R14	154	134	312
R15	319	151	461
N	15	15	15
MÉDIA	341.93	487.87	769.38
DP	221.32	353.79	367.82
EPM	57.14	91.35	94.97

SMC 5	CONG	SÓ-SOM	LUZ-SOM
R1	733	373	564
R2	336	903	743
R3	312	151	268
R4	486	160	348
R5	522	399	613
R6	619	462	1,228
R7	136	95	175
R8	183	660	1,413
R9	483	545	689
R10	253	711	1,341
R11	261	169	333
R12	295	432.7	1096.67
R13	259	272	843
R14	360	420	888
R15	236	209	470
N	15	15	15
MÉDIA	364.93	397.45	734.18
DP	168.72	233.48	396.00
EPM	43.56	60.28	102.25