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

***“Efeitos da inibição reversível por muscimol do núcleo dorsal da rafe,
da matéria cinzenta periaquedutal dorsal, e da amígdala basolateral
sobre diferentes medidas de ansiedade”***

Cíntia Heloína Bueno

*Pró-forma apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
– USP, para Análise da Dissertação de
Mestrado em Ciências Área de
Psicobiologia.*

*Ribeirão Preto – SP
2002*

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

**“EFEITOS DA INIBIÇÃO POR MUSCIMOL DO NÚCLEO DORSAL DA
RAFE, MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL E AMÍGDALA
BASOLATERAL SOBRE DIFERENTES MEDIDAS DE ANSIEDADE”**

Cíntia Heloína Bueno

*Pró-forma apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
– USP, para Análise da Dissertação de
Mestrado em Ciências Área de
Psicobiologia.*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Milena de Barros Viana

Ribeirão Preto - SP

2002

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ansiedade

"Quem teme o sofrimento, sofre já aquilo que teme".

Michel de Montaigne

A ansiedade pode ser caracterizada por sentimentos subjetivos de antecipação, temor ou apreensão, ou por um senso de desastre iminente ou morte, associados a vários graus de excitação autonômica e reatividade. No Dicionário da Psicologia Prática (Lima, 1970), a ansiedade é definida como “um mal-estar físico e psíquico, caracterizado por temor difuso, sentimento de insegurança, desgraça iminente”. A palavra, derivada do termo grego *Anshein*, que significa estrangular, oprimir, sufocar, refere-se às sensações vivenciadas pelo estado de ansiedade (Graeff & Brandão, 1999). Ainda do latim, duas palavras deram origem às palavras ansiedade e angústia: “*anxietas*” e “*angor*” (Gentil *et al.*, 1997). A palavra pânico deriva-se de Pan, Deus grego, conhecido por causar intenso temor por seu aspecto; e a palavra fobia, de Phobos, ser mitológico grego filho de Ares, considerado a personificação do medo (Grimal, 1993). Todos esses termos têm em comum a intenção de descrever algumas das sensações psicológicas e fisiológicas que acompanham um estado de ansiedade, ou seja, a inquietação, a sensação de falta de ar, perturbação e medo. Como se pode notar, a

ansiedade já tem repercussão na sociedade desde a Grécia antiga. No século XX, com o surgimento do existencialismo, passou a ser tratada como fonte de inspiração entre os filósofos. Para Kierkegaard (reeditado em 1984) “a angústia reforça o sentimento da existência, pois é no sofrimento, mais do que na alegria, que o homem percebe-se como consciência de si mesmo”. Para Heidegger, a angústia surge quando notamos além do cotidiano, a nossa existência ínfima no mundo (Frazão, 1999).

Apesar de ser difícil diferenciar conceitualmente angústia de ansiedade, Salim (1987) diferenciou a ansiedade como um predomínio de sintomas psíquicos e a angústia como mais demonstrativamente somática, não se encontrando importantes diferenças entre as etiologias, quanto à bioquímica ou à terapêutica.

Acredita-se que a existência de certo nível de ansiedade no ser humano pode ser considerado “normal”, ou seja, pode ser considerado como um fenômeno funcional e adaptativo. Sartre (reeditado em 1983), certa vez, disse: “Todos os homens têm medo. Quem não tem medo não é normal e isso nada tem a ver com a coragem”. Darwin, em sua obra *The Expression of the Emotions in Man and Animals* (reeditado em 1965), dizia ser a experiência subjetiva uma característica adaptativa do comportamento da espécie. De um ponto de vista evolucionário, a ansiedade e o medo têm suas raízes nas reações de defesa dos animais, em resposta a perigos iminentes ou potenciais encontrados no seu meio ambiente. Quando a integridade física de um animal é confrontada, ele apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação

do medo. Sabe-se, portanto, que um certo grau de ansiedade é necessário para motivar um bom desempenho otimizando recursos do indivíduo frente a exigências ambientais (Graeff, 1999), o que encontra-se ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Retirada de Graeff *et al.* 1999 – Relação entre ansiedade e desempenho

Se, por um lado, a ansiedade pode ser considerada uma característica adaptativa, com função essencial para a sobrevivência do ser humano, por outro, o excesso de ansiedade pode ser considerado patológico.

1.2. Distúrbios de Ansiedade

O diagnóstico de um fenômeno psicológico como normal ou patológico pode ser subjetivo. Foucault, em *Doença Mental e Psicologia* (reeditado em 2000), dizia que a dificuldade em classificar as doenças mentais devia-se ao fato de aplicar-se a estas as mesmas regras das orgânicas. Disse (figura 1 retirada de Graeff *et al.*, 1999 - Relação entre ansiedade e desempenho)

“gostaríamos de mostrar que a raiz da patologia mental não deve ser procurada em uma ‘metapatologia’ qualquer, mas numa certa relação, historicamente situada, entre o homem e o homem louco e o homem verdadeiro”. Assim sendo, no intuito de diferenciar a ansiedade “normal” e a patológica leva-se em conta o contexto e os possíveis desencadeantes e as características individuais do sujeito, para determinar se essas manifestações são desproporcionais em intensidade, duração, interferência com o desempenho, ou frequência com que ocorrem (Gentil *et al.*, 1997).

A ansiedade patológica pode ser tanto resultado de outras doenças, psiquiátricas ou não, sendo denominada secundária, ou pode ser a manifestação principal ou única do quadro clínico, sendo assim, denominada primária (Graeff, 1999). Muitas classificações e denominações foram utilizadas ao longo da história. Uma das primeiras, foi a de Cullen em 1772 (*apud* Laplanche, 1992), que dizia que “esse sentimento de angústia poderia ser causado por certo grupo de afecções, contrárias à natureza dos sentimentos e do movimento, as quais não dependem de lesão tópica dos órgãos e sim de alterações gerais de todo o sistema, com repercussões especialmente sobre a motilidade e o pensamento”. Beard, em 1869 (*apud* Laplanche, 1992), introduziu o conceito de “neurastenia”, incluindo graus menores de ansiedade e depressão leve. Hecker, em 1893 (Laplanche, 1992), incluiu a estes conceitos os ataques de ansiedade. Freud, dois anos depois, separou a “neurose de angústia” da neurastenia e Kraepelin, no ano seguinte, descreveu o que chamamos hoje de estresse pós-traumático. Em 1926, em sua obra *Inibição, Sintoma e Angústia*, Freud definiu angústia

“como um estado de desamparo psíquico do lactente que é contrapartida de seu estado de desamparo biológico” (Freud, reeditado em 1970). Na mesma obra, disse sobre a ansiedade: “o ato de nascer é a primeira experiência de ansiedade e, conseqüentemente, a fonte e o protótipo da emoção da ansiedade”. Para Freud, a ansiedade podia ainda ser classificada em três subtipos conforme sua origem: ansiedade moral, ansiedade real e ansiedade neurótica. A ansiedade moral decorreria da censura do superego em relação ao comportamento manifesto ou latente do indivíduo. A ansiedade real resultaria da percepção antecipada de um perigo real e a ansiedade neurótica expressaria o medo ou a angústia da impossibilidade de evitar a expressão dos instintos, expressão esta causada por um ego impotente. Após a 2ª Guerra Mundial, foram formuladas as classificações internacionais de doenças como a da Associação Psiquiátrica Americana (*Manuais de Estatística e Diagnóstico de Doenças Mentais – DSM*), hoje em sua 4ª edição, e a da Organização Mundial de Saúde (*Classificação Internacional de Doenças – CID*), hoje em sua 10ª edição (Gentil *et al.*, 1997).

Distúrbios de ansiedade são caracterizados, segundo a CID-10, “pela presença de manifestações ansiosas que não são desencadeadas exclusivamente pela exposição a uma situação determinada. Podem ser acompanhados de sintomas depressivos ou obsessivos, assim como de certas manifestações que traduzem uma ansiedade fóbica, desde que estas manifestações sejam claramente secundárias ou pouco graves”.

Na tabela 1, encontram-se esquematizadas as classificações da CID-10 para os distúrbios de ansiedade. Na tabela 2, encontram-se as classificações destes distúrbios segundo o DSM-IV.

Tabela 1 – Classificação dos transtornos ansiosos segundo a CID-10

Transtornos Fóbicos-ansiosos

Agorafobia (com e sem transtorno de pânico)

Fobias Sociais

Fobias Específicas (isoladas)

Outros Transtornos Fóbicos-ansiosos

Transtorno Fóbico-ansioso, não especificado

Outros Transtornos de Ansiedade

Transtorno de Pânico

Transtorno de Ansiedade Generalizada

Transtorno Misto de Ansiedade e Depressão

Outros Transtornos de ansiedade especificados

Transtorno de Ansiedade, não especificado

Transtorno Obsessivo-Compulsivo

Predominantemente pensamentos obsessivos e ruminações

Predominantemente atos compulsivos

Pensamentos e atos obsessivos mistos

Outros Transtornos obsessivos-compulsivos

Transtorno obsessivo-compulsivo não especificado

Reação a estresse grave

Reação aguda a estresse

Transtorno de estresse pós-traumático

Transtornos de ajustamento

(retirado de Gentil *et al.*, 1997)

Tabela 2 - Classificação dos transtornos ansiosos segundo o DSM-IV

Transtorno de Pânico sem Agorafobia

Transtorno de Pânico com Agorafobia

Agorafobia sem história de transtorno de pânico

Fobia específica

Fobia social

Transtorno obsessivo-compulsivo

Transtorno de estresse pós-traumático

Transtorno de estresse agudo

Transtorno ansioso generalizado

Transtorno ansioso devido a uma condição médica

Ansiedade devido ao uso de substância

Transtorno ansioso não especificado

(retirado de Gentil *et al.*, 1997)

Dentre os distúrbios de ansiedade, os de maior prevalência na população são o distúrbio de ansiedade generalizada e o distúrbio do pânico (que serão discutidos mais detalhadamente no próximo tópico), a fobia específica, a fobia social e o distúrbio obsessivo-compulsivo. Segundo o DSM-IV, as fobias específicas são caracterizadas pelo medo acentuado e persistente de objetos ou situações claramente discerníveis e circunscritos e a exposição ao estímulo fóbico provoca, quase que invariavelmente, imediata resposta de ansiedade. Sendo assim, este estímulo fóbico passa a ser evitado. O diagnóstico é apropriado apenas se a esquiva, o medo ou a

antecipação ansiosa do encontro com o estímulo fóbico interferem significativamente na rotina diária, funcionamento ocupacional ou vida social do indivíduo, ou se ele sofre acentuadamente por ter a fobia. Embora essas fobias tenham alta prevalência na população (até 9%), geralmente não atrapalham a vida social do indivíduo (APA, 1994).

A fobia social, ao contrário das fobias específicas, geralmente causa grande prejuízo à vida social do indivíduo. Sua prevalência na população, no entanto, é menor, cerca de 3%. De acordo com o DSM-IV, a principal característica é um medo acentuado e persistente de situações sociais ou de desempenho nas quais o indivíduo poderia sentir embaraço e sua exposição a tais situações provoca quase que imediatamente uma resposta de ansiedade (APA, 1994).

O distúrbio obsessivo-compulsivo tem uma prevalência de aproximadamente 2,5% na população mundial. Pelo critério de classificação do DSM-IV, esse distúrbio se manifesta na forma de obsessões ou compulsões recorrentes que, em geral, consomem tempo, causando prejuízo ou sofrimento ao indivíduo. As obsessões são idéias, pensamentos, impulsos ou imagens persistentes, que são vivenciados como intrusivos e inadequados, causando acentuada ansiedade ou sofrimento e cujo objetivo é prevenir ou reduzir a ansiedade ou sofrimento. Compulsões, por sua vez, são comportamentos repetitivos que usualmente não oferecem prazer ou gratificações (APA, 1994).

O distúrbio de estresse pós-traumático tem como principal característica recordações recorrentes de uma experiência traumatizante

sendo revivida como se o evento estivesse novamente ocorrendo. Essas experiências traumatizantes são sempre situações de estresse intenso como estupros, assaltos, acidentes, guerras ou catástrofes naturais. Essas recordações devem persistir por mais de um mês para que seja diagnosticado como estresse traumático (APA, 1994).

1.2.1 Ansiedade Generalizada e Pânico

O distúrbio de ansiedade generalizada é um dos mais comumente diagnosticados, com uma prevalência média de 4,1% a 6,6% na população geral (Blazer *et al.*, 1991; Kessler *et al.*, 1994, *apud* Dugas, 2000).

A ansiedade generalizada é atualmente definida pelo DSM-IV (APA, 1994) como um quadro clínico constituído por ansiedade e preocupação difíceis de serem controladas e que ocorrem por mais de seis meses. Essa ansiedade ou preocupação é acompanhada de no mínimo três sintomas adicionais que podem ser fadiga, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular e distúrbios do sono. A intensidade, duração ou frequência da ansiedade ou preocupação é desproporcional ao evento ocorrido. O diagnóstico deve excluir distúrbio de pânico, fobia social, distúrbio obsessivo-compulsivo, distúrbios alimentares, hipocondria e estresse pós-traumático. Embora os indivíduos com distúrbio de ansiedade generalizada nem sempre sejam capazes de identificar suas preocupações como "excessivas", eles relatam sofrimento subjetivo devido à constante preocupação, têm dificuldade em controlar a preocupação, ou experimentam prejuízo no funcionamento social ou ocupacional ou em outras áreas importantes. A intensidade, duração ou frequência da ansiedade ou

preocupação são claramente desproporcionais à real probabilidade ou impacto do evento temido.

O distúrbio do pânico tem prevalência na população menor que o distúrbio de ansiedade generalizada, ficando em torno de 0,5% a 3%, segundo a literatura (Regier *et al.*, 1988; Angst *et al.*, 1985, *apud* Gentil *et al.*, 1997). A principal característica do distúrbio de pânico é o surgimento inesperado de ataques de pânico seguido de preocupação de um novo ataque por pelo menos um mês. O ataque de pânico não pode ser causado pelo uso de substâncias, condições médicas gerais, como hipertireoidismo, nem por outros distúrbios mentais, como fobia social, distúrbio obsessivo-compulsivo, distúrbio do estresse pós-traumático, entre outros. Para o diagnóstico de distúrbio de pânico é necessário que o indivíduo tenha experimentado pelo menos quatro ataques em quatro semanas.

Um ataque de pânico é descrito como não tendo uma causa aparente, não estando associado a um ativador situacional, necessitando de dois ataques para o diagnóstico. Sujeitos que têm ataques de pânico geralmente apresentam predisposição ao distúrbio de pânico.

Apesar do diagnóstico do distúrbio do pânico incluir a condição básica de que pelo menos alguns dos ataques sejam inesperados, indivíduos portadores do pânico freqüentemente relatam a ocorrência de ataques relacionados a uma situação desencadeadora. O distúrbio do pânico pode ou não ser acompanhado de agorafobia.

1.3. Modelos Experimentais de Ansiedade

Por meio de modelos animais, tenta-se reproduzir, em laboratório, determinados aspectos da ansiedade. Na maioria dos modelos animais existentes, a ansiedade é inferida a partir das respostas comportamentais de defesa dos animais frente a estímulos aversivos. Nos atuais modelos de ansiedade, o nível de ameaça pode ser classificado como potencial, distal e proximal e as medidas são feitas através das estratégias comportamentais dos animais frente a estes estímulos. O perigo potencial leva a uma estratégia de exploração e avaliação de risco. Já o perigo distal induz ou fuga ou imobilidade. Finalmente, o perigo proximal pode levar a comportamentos de fuga ou luta defensiva (Graeff & Zangrossi, 2002).

As primeiras investigações sobre o tema ansiedade utilizavam os modelos de resposta emocional condicionada ou modelo de supressão condicionada, proposto por Estes e Skinner (Graeff e Guimarães, 1999). Este modelo consiste na apresentação de um estímulo aversivo (choque elétrico) quando o animal emite o comportamento de pressionar a barra concomitante à apresentação de alimento. Apesar de ter sido muito utilizado, este modelo apresenta problemas na validação farmacológica, uma vez que drogas não ansiolíticas podem reverter à supressão condicionada. Posteriormente, outros modelos foram desenvolvidos, como o modelo de conflito de Geller e Blum (1970). A não resposta destes modelos a ansiolíticos não-benzodiazepínicos, somada à interferência de aspectos motivacionais, como privação de água e alimento, às medidas de ansiedade, levaram ao desenvolvimento de modelos etologicamente fundamentados, como o labirinto em cruz elevado.

O labirinto em cruz elevado baseia-se na premissa de que roedores evitam locais abertos, demonstrando sinais de medo, como congelamento e fuga (Handley & Mithani, 1984). Neste modelo, que se constitui de dois braços circundados por paredes dispostos perpendicularmente a dois braços abertos, verificou-se que ratos exibiam maior atividade exploratória nos braços fechados do que nos braços abertos. As medidas consideradas como evidências de ansiedade neste modelo são em geral, o número de entrada e o tempo de permanência nos braços abertos (Rodgers *et al.*, 1997). Apesar de drogas benzodiazepínicas aumentarem o número de entrada e permanência nos braços abertos, o modelo parece não responder previsivelmente a drogas ansiolíticas de ação serotoninérgica (Handley e McBlane, 1993). Tem sido proposto que esse modelo seria um modelo misto de ansiedade que não separaria os dois tipos de respostas condicionadas e incondicionadas. Essa seria uma possível explicação para os resultados inconsistentes de drogas não-benzodiazepínicas (Handley e McBlane, 1993).

1.4. Ansiedade e Farmacoterapia

A ansiedade provoca uma sensação de desconforto, muitas vezes, impedindo ou interferindo acentuadamente com a continuidade das atividades rotineiras de um indivíduo. Assim, muitos medicamentos para o seu tratamento vêm sendo testados e desenvolvidos. Os ansiolíticos, palavra que significa figuradamente 'o que decompõe a ansiedade' (Graeff e Guimarães, 1999), surgiram já no começo do século XX, quando ainda eram utilizados os barbitúricos para o tratamento destes distúrbios ansiosos. O

excesso de contra-indicações dos barbitúricos, como alta sonolência, baixo índice terapêutico (dose terapêutica próxima da dose letal), depressão respiratória, levou à procura de outras drogas com menos efeitos colaterais e mais eficientes para o tratamento destes distúrbios. Na década de 60, foram introduzidos na terapêutica os benzodiazepínicos (Milani & Graeff, 1987), mas sua ineficácia em certos subtipos de ansiedade (Nutt, 1991), e seus efeitos colaterais, como sedação e incoordenação motora, proporcionaram a busca por medicamentos mais específicos e eficazes para o tratamento dos diversos tipos de distúrbios de ansiedade. Atualmente, o agonista do receptor serotoninérgico do tipo 1A, buspirona, vem sendo prescrito para o tratamento de ansiedade generalizada, e compostos inibidores da recaptação serotoninérgica, como os antidepressivos tricíclicos, vêm sendo utilizados para o tratamento do distúrbio do pânico.

1.5. Ansiedade e 5-HT

5-hidroxitriptamina ou 5-HT (5-HT) é uma indolamina produto da hidroxilação e carboxilação do aminoácido triptofano na seguinte seqüência bioquímica ilustrada na figura 2:

Depois de produzir seus efeitos, a 5-HT é desaminada pela monoamina oxidase (MAO). O produto desta reação pode ser subsequenteemente oxidado no fígado para ácido 5-hidroindolacético (5-HIAA). Este último é excretado pela urina.

Figura 2 - Síntese e degradação da 5-HT (retirado de Donaldson, 1998)

Os primeiros resultados implicando a 5-HT na ansiedade foram obtidos utilizando-se modelos baseados na aprendizagem associativa. Através de um destes modelos, o modelo de Geller e Blum (1970), o animal era condicionado a pressionar uma alavanca para receber um alimento e, após o condicionamento, o animal recebia o alimento. Na presença de um som, o animal recebia tanto o alimento quanto um choque nas patas. Esses pesquisadores mostraram que o precursor da síntese serotoninérgica o 5-hidroxitriptofano (5-HTP) revertia o efeito anticonflito do inibidor serotoninérgico paraclorofenilalanina (PCPA). Corroborando esta hipótese, Wise, Berger e Stein (1972) demonstraram que o benzodiazepínico oxazepam reduzia a taxa de renovação da 5-HT no cérebro de ratos, nas

mesmas doses em que liberava o comportamento punido em modelos de condicionamento aversivo.

Analisando as evidências acima em conjunto, Stein *et al.* (1973) elaboraram o primeiro modelo teórico sobre o possível funcionamento da 5-HT na ansiedade (1973). Segundo os autores, a 5-HT estaria mediando os efeitos da punição através da estimulação de regiões prosencefálicas, como a amígdala e a formação hipocampal, ou seja, a estimulação das vias serotoninérgicas induziria a ansiedade.

Contrários à teoria clássica serotoninérgica da ansiedade proposta por Stein *et al.* (1973), resultados decorrentes de experimentos utilizando-se a estimulação elétrica aversiva da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MPCD) de ratos começaram a surgir nos anos 70.

Schenberg & Graeff (1978) demonstraram, por exemplo, que antagonistas serotoninérgicos, injetados intraperitonealmente, diminuía a latência do comportamento de pressionar a barra, responsável pela redução da estimulação elétrica aversiva, na MCPD. Por outro lado, a estimulação elétrica do núcleo dorsal da rafe (NDR) mostrou efeito antiaversivo (Kiser *et al.*, 1980). Como a inervação serotoninérgica da MCPD provém principalmente do NDR, uma possibilidade é que a estimulação elétrica do núcleo estivesse liberando 5-HT na MCPD e, dessa forma, exercendo efeito antiaversivo.

Além das inconsistências demonstradas em trabalhos pré-clínicos, evidências obtidas a partir de estudos clínicos quanto ao papel desempenhado pela 5-HT na ansiedade também são contraditórias.

Enquanto o efeito ansiolítico de benzodiazepínicos sobre a ansiedade generalizada pode estar relacionado com a inibição da neurotransmissão serotoninérgica (Blümler et. al., 1987), drogas que facilitam a neurotransmissão de 5-HT, como os inibidores de recaptação de 5-HT, são prescritos na clínica para o tratamento de alguns distúrbios de ansiedade, como por exemplo o pânico. Além disso, tem sido demonstrado que o antagonista serotoninérgico ritanserina é prescrito para os casos de ansiedade generalizada mas ainda tem efeitos inconsistentes no pânico (Ceulemans et. al., 1985).

1.6. Papel Dual da 5-HT na Ansiedade

Numa tentativa de solucionar esta aparente contradição, Deakin e Graeff (1991) propuseram uma nova teoria que tem sido chamada de teoria do papel dual da 5-HT na ansiedade. Essa teoria leva em consideração as diferenças anatômicas e funcionais das vias serotoninérgicas e os diferentes subtipos de receptores envolvidos na ação destas vias. Segundo esta teoria, a via serotoninérgica ascendente que parte do NDR, e que inerva a amígdala e o córtex frontal facilitaria comportamentos defensivos aprendidos em resposta a perigo potencial ou distal. Por outro lado, a via periventricular que parte do NDR e inerva a MCPD inibiria reações inatas de fuga ou luta em resposta a perigo proximal (que pode ser melhor visualizado na figura 3). Segundo os autores, o mal-funcionamento da via periventricular desencadearia mecanismos de defesa inatos em humanos e, em termos clínicos estaria relacionado ao pânico. Por outro lado, a amígdala comandaria reações de defesa mais refinadas e discretas, desencadeadas

por estímulos condicionados de medo. Estas reações corresponderiam à ansiedade antecipatória e teriam função adaptativa. Em termos clínicos, o mal-funcionamento desta via estaria relacionado com a ansiedade generalizada.

Deakin e Graeff (1991) propõem ainda que diante de um estímulo aversivo condicionado potencial ou distal, as projeções serotoninérgicas provenientes do NDR seriam ativadas e a 5-HT seria liberada na MCPD e amígdala. Na amígdala, a 5-HT facilitaria a esquia comportamental, enquanto na MCPD inibiria o comportamento de luta e fuga. O papel da 5-HT seria, portanto, integrar estes diferentes tipos de reações de defesa.

Figura 3 – Vias serotoninérgicas ascendentes provindas do Núcleo Dorsal da Rafe – retirado de Graeff, 1999.

1.6.1.Labirinto em T Elevado

Para testar esta hipótese, um novo modelo animal, o labirinto em T elevado (Graeff, et. al., 1993; Viana, et. al., 1994) foi desenvolvido. O modelo, derivado do labirinto em cruz elevado (Handley & Mithani, 1984, Pellow *et al.* 1985; Pellow & File, 1986), constitui-se de um braço fechado localizado perpendicularmente a dois braços abertos e foi criado na tentativa de permitir a medida de dois comportamentos negativamente motivados: a esquia inibitória e a fuga. Durante o experimento, os animais são colocados na parte distal do braço fechado para a medida de esquia inibitória. Esta medida é tomada por três vezes consecutivas. Após 30 segundos, os ratos são colocados no final do braço aberto, também por três vezes consecutivas, para as medidas de fuga. Estudos com três classes de ansiolíticos – o agonista de receptores benzodiazepínicos diazepam, o agonista 5-HT_{1A} buspirona, e o antagonista não seletivo de receptor 5-HT₂ ritanserina, demonstraram que estas drogas prejudicam a esquia inibitória sem alterar as medidas de fuga do braço aberto do labirinto em T elevado (Graeff, et. al., 1998). Evidências clínicas mostram que o distúrbio de ansiedade generalizada é sensível a estas classes de ansiolíticos (Nutt, 1991; Davidson, 2001), o que corrobora o pressuposto de que a esquia inibitória estaria relacionada com o distúrbio de ansiedade generalizada. Por outro lado, a administração crônica em ratos de compostos utilizados na clínica no tratamento do distúrbio do pânico, como a imipramina (Custódio Teixeira et. al. 2000) e a fluoxetina (Poltronieri, S.C., Zangrossi Jr, H. Viana, M.B. – dados não publicados) apresenta efeito ansiolítico sobre a medida de fuga

do braço aberto, o que corrobora a hipótese de que esta tarefa pode ser utilizada como um possível modelo experimental de pânico. Entretanto, estes últimos resultados foram obtidos somente após a inclusão de um novo parâmetro no procedimento do teste: a pré-exposição dos animais ao braço aberto do labirinto em T elevado, um dia antes dos testes. Esta modificação resultou numa diminuição na latência de saída do braço aberto, sugerindo que com a pré-exposição, o caráter exploratório é diminuído, ou seja, os animais fogem do perigo e não apenas caminham em direção ao braço fechado.

Comparado aos testes de conflito ou punição tradicionais, o labirinto em T elevado possui a vantagem de não sofrer a interferência de outros processos psicobiológicos como fome, sede ou dor.

Um estudo realizado por Zangrossi Jr. e Graeff (1997) demonstrou que a fuga do braço aberto não sofre habituação mesmo após 5 tentativas seguidas, o que comprova o caráter aversivo do estímulo. Ainda, no mesmo estudo, foi demonstrado que o animal não foge da mão do experimentador na primeira medida de esquiva (linha de base), dado esse obtido por meio do confinamento do animal por 30 segundos na extremidade distal do braço fechado. Foi verificado que a latência da linha de base não diferia da latência obtida com o protocolo padrão.

Outros estudos utilizaram a microinjeção de diferentes compostos intra-NDR, para verificar os efeitos do aumento ou diminuição da neurotransmissão de 5-HT sobre as medidas da esquiva e fuga do labirinto em T elevado. Inicialmente, Graeff *et al.* (1997) optaram pela administração

intra-NDR de duas drogas: FG 7142 (um agonista inverso benzodiazepínico) e ácido caínico (droga que estimula diretamente a liberação neuronal de 5-HT em terminais). No labirinto em T elevado, a administração intra-NDR de FG 7142 facilitou a esquiva inibitória, efeito ansiogênico, embora não tenha afetado a fuga dos braços abertos do modelo. Por sua vez, a microinjeção intra-NDR de ácido caínico também facilitou a esquiva, efeito ansiogênico, prejudicando adicionalmente a fuga, efeito ansiolítico (Graeff *et al.*, 1996, 1997).

Para verificar os efeitos da inibição dos terminais de 5-HT provenientes do NDR, Graeff *et al.* (1997) utilizaram a microinjeção de 8-OH-DPAT (agonista 5-HT_{1A}) intra-NDR. O composto diminuiu a latência de esquiva inibitória dos braços abertos, efeito ansiolítico. No entanto, a fuga permaneceu inalterada.

Em estudos posteriores, utilizando-se a inclusão da pré-exposição do animal ao braço aberto do labirinto em T elevado, Sena (2002) reavaliou os efeitos da administração intra-NDR do agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT e do agonista inverso benzodiazepínico FG 7142. De maneira semelhante aos resultados anteriores obtidos por Graeff *et al.* (1996, 1997), a microinjeção intra-NDR de 8-OH-DPAT diminuiu a latência da esquiva inibitória do braço aberto do labirinto em T elevado, efeito ansiolítico, mas ao contrário dos resultados anteriores, neste estudo, houve também diminuição da latência de fuga do braço aberto, efeito ansiogênico. De maneira oposta, a administração do FG 7142 aumentou tanto a latência de esquiva inibitória, efeito ansiogênico, quanto a de fuga do braço aberto do modelo, efeito

ansiolítico. Este trabalho veio confirmar a importância do procedimento de pré-exposição para a avaliação do efeito de diferentes drogas sobre as medidas de fuga do labirinto em T elevado.

Tabela 3 – Efeito de drogas nas tarefas do labirinto em T elevado

Drogas	Esquiva	Fuga
FG-7142 intra-NDR	↑	0
FG-7142* intra-NDR	↑	↓
Ácido caínico intra-NDR	↑	↓
8-OH-DPAT intra-NDR	↓	0
8-OH-DPAT* intra-NDR	↓	↑

(↑ - facilitação; ↓ - prejuízo; 0 – sem alteração; *experimento com pré-exposição)

1.6.2. Modelo da Transição Claro-Escuro

Outro modelo de ansiedade que vem sendo utilizado por ter validade farmacológica e não envolver processos de privação é o modelo da transição claro-escuro. Este modelo foi desenvolvido por Crawley & Goodwin (1980) e é baseado na aversão natural de roedores a lugares iluminados. A medida de ansiedade no modelo da transição claro-escuro (Crawley & Goodwin, 1980; Chaouloff *et al.*, 1997) é inferida pelo número de transições entre os dois compartimentos e o tempo gasto no compartimento claro. A situação de conflito é gerada pela tendência do animal em explorar e, ao

mesmo tempo, evitar lugares iluminados. Tem sido demonstrado que drogas benzodiazepínicas alteram as medidas de número de transições e tempo gasto pelos animais no compartimento claro do modelo (Chaouloff *et al.*, 1997). Uma vez que drogas benzodiazepínicas são preferencialmente utilizadas para o tratamento do distúrbio da ansiedade generalizada (Nutt, 1991), os resultados obtidos com esta classe de drogas no modelo sugerem sua relação com este subtipo de ansiedade.

Vários trabalhos têm também demonstrado efeitos ansiolíticos no modelo de um outro composto utilizado terapeuticamente para o tratamento da ansiedade generalizada (Nutt, 1991), o agonista 5-HT_{1A} buspirona. Nestes estudos, a droga parece aumentar principalmente o tempo gasto no compartimento claro do modelo sem alterar o número de transições entre compartimentos (Sanchez, 1995; 1996; Costall *et al.*, 1988; 1989; 1992; Carli *et al.*, 1989; Onaivi *et al.*, 1989; Artaiz *et al.*, 1998).

Com base nestas evidências farmacológicas, o modelo da transição claro-escuro tem sido proposto como relacionado à ansiedade generalizada (Graeff e Zangrossi Jr, 2002).

2. OBJETIVOS

Segundo a teoria do papel dual da 5-HT na ansiedade proposta por Deakin e Graeff (1991), a via prosencefálica medial originária do NDR e que inerva a amígdala e o córtex frontal, deveria relacionar-se à ansiedade condicionada e, em termos psicopatológicos, à ansiedade generalizada; enquanto a via periventricular, provinda do NDR e que inerva a MCPD, deveria relacionar-se à ansiedade incondicionada e, em termos clínicos, ao distúrbio do pânico.

Para a verificação desta hipótese, este trabalho optou pela inativação reversível do NDR (experimento 1 e 2), da MCPD (experimento 3) e do núcleo basolateral da amígdala (experimento 4), através da microinjeção do agonista gabaérgico, muscimol. O termo inativação reversível foi aqui utilizado pois trata-se de um método farmacológico para inibir determinadas estruturas através da ativação dos neurônios gabaérgicos, atingindo seu pico de ação após 10 minutos e durando aproximadamente 5 horas; passado o efeito do agonista gabaérgico, a inativação cessa (Majchrzak, 2000). No experimento 1, após a microinjeção do muscimol no NDR, os ratos foram expostos ao labirinto em T elevado para a verificação dos efeitos da inibição pela ativação do sistema gabaérgico destas estruturas sobre as tarefas de esquiva inibitória e fuga dos braços abertos do modelo. Subseqüentemente, os mesmos animais foram expostos a um segundo modelo animal de ansiedade, o modelo da transição claro-escuro. Este

modelo foi utilizado com o intuito de estender a verificação dos efeitos da inibição do muscimol sobre a esquia inibitória do labirinto em T elevado, uma vez que tanto as medidas da transição claro-escuro quanto a esquia do labirinto em T elevado respondem positivamente ao tratamento com benzodiazepínicos e buspirona e, portanto, têm sido correlacionadas em termos clínicos à ansiedade generalizada. Foi demonstrado em nosso laboratório que a exposição prévia dos animais ao labirinto em T elevado e arena não interferem com o comportamento no modelo da transição claro-escuro (Sena, 2002).

É importante que seja enfatizado que, nos experimentos 1, 3 e 4 os animais foram expostos, por 30 minutos, a um dos braços abertos do labirinto em T elevado, 24 horas antes do teste. Este procedimento teve por finalidade diminuir o tempo gasto na atividade exploratória, assegurando que, durante as medidas de fuga, os animais estavam realmente fugindo do estímulo aversivo.

Finalmente, para verificar se uma possível desinibição comportamental estaria relacionada aos resultados encontrados com o labirinto em T elevado no experimento 1 (diminuição de todas as latências de esquia e fuga nos animais tratados com muscimol, inclusive da latência basal), testou-se um segundo grupo de animais em um labirinto em T inteiramente fechado (experimento 2).

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados 72 ratos Wistar, machos, pesando entre 250 a 280 g no dia da cirurgia, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, *Campus* de Ribeirão Preto. Os animais foram alojados em gaiolas com, no máximo, 5 animais cada no biotério do laboratório de Psicofarmacologia da Ansiedade, com ciclo de claro-escuro de 12 horas (claro, das 7:00 às 19:00) e temperatura de 22° C ($\pm$ 1°C). Durante todo o experimento, os animais tinham livre acesso à água e comida. Após a cirurgia, foram alojados em gaiolas de acrílico, aos pares, onde permaneciam por mais cinco dias quando eram iniciados os experimentos.

3.2. Cirurgia

Cinco a dez minutos antes da cirurgia estereotáxica, cada animal foi anestesiado intraperitonealmente (IP) com tribromoetanol (2,5 g/100 ml, 10 ml/kg, Aldrich, EUA). Em seguida, os animais foram afixados ao aparelho estereotáxico (Stoelting, EUA), com a barra dos incisivos 2,5 mm abaixo da linha interaural. Imediatamente após, recebiam subcutaneamente o anestésico local, cloridrato de lidocaína (Lidocaína 3%, PROBEM, Brasil), assim como pentabiótico veterinário (0,2 ml, Fort Dodge, Brasil) intramuscularmente.

Após a exposição do crânio e da devida assepsia do local, dois pequenos orifícios foram abertos: um para o parafuso, com o intuito de

auxiliar a fixação de uma prótese de acrílico, e o segundo para a inserção da cânula-guia. Para os experimentos 1 e 2, foi utilizada cânula-guia de 13 mm de comprimento e 0,3 mm de diâmetro externo, inserida a 2 mm do NDR seguindo as seguintes coordenadas: ângulo de 27°, +3,2 mm lateral ao lambda e -4,9 mm ventral à superfície do crânio. Para o experimento 3, foi utilizada cânula-guia de 12 mm de comprimento e 0,3 mm de diâmetro externo, inserida à 2 mm da MCPD, segundo as seguintes coordenadas: ângulo de 22°, +1,9 mm lateral ao lambda e -3,2 mm ventral à superfície do crânio; Para o experimento 4, foram utilizadas cânulas-guia de 13 mm de comprimento e 0,3 mm de diâmetro externo, inseridas à 2 mm das amígdalas basolateral direita e esquerda, segundo as seguintes coordenadas: $\pm 4,8$ mm lateral ao lambda e -6,0 mm ventral à superfície do crânio (Paxinos e Watson, 1986). Um mandril foi introduzido nas cânulas, após sua fixação ao crânio através da prótese de acrílico.

3.3. Microinjeção

Agulhas dentais de 15 mm (experimento 1, 2 e 4) e de 14 mm (experimento 3) com 0,2 mm de diâmetro externo, conectadas a uma seringa Hamilton de 10 μ l através de um tubo de polietileno, foram introduzidas pela cânula-guia, após a remoção do mandril. Um minuto depois da introdução da agulha dental, iniciou-se a administração da droga ou veículo. Em todos os experimentos, um volume de 0,2 μ l foi administrado por um minuto. Após a administração, a agulha permaneceu por 60 segundos adicionais no interior da cânula para evitar refluxos.

3.4. Drogas

O muscimol ($1\text{ }\mu\text{g}/0,2\text{ }\mu\text{l}$, Sigma, EUA) foi diluído em salina (cloreto de sódio 0,9%) e conservado no *freezer*, em *eppendorfs*, contendo $10\text{ }\mu\text{l}$ cada, até o dia dos experimentos.

3.5. Modelos Experimentais

3.5.1. Labirinto em T elevado (Figura 4)

O aparelho foi confeccionado em madeira, com 3 braços de iguais dimensões ($50\times 12\text{ cm}$). Um braço fechado, por paredes com 40 cm de altura, localizava-se perpendicularmente aos braços abertos opostos, os quais foram circundados por acrílico transparente de 1 cm de altura, para evitar a queda dos animais. Todo o aparelho encontrava-se elevado a 50 cm do solo.

FIGURA 4: Foto do labirinto em T elevado.

3.5.2. Arena (Figura 5)

Foi utilizada uma arena quadrada de madeira (60x60 cm), circundada por paredes de 40 cm e com o assoalho dividido em 9 partes de 20 cm.

FIGURA 5: Foto da arena utilizada para as medidas da atividade locomotora dos animais.

3.5.3. Modelo da transição Claro-escuro (Figura 6)

O aparelho utilizado neste teste consistiu de uma caixa construída em madeira (45x22x22 cm), com o piso constituído por barras paralelas de aço, espaçadas em 5 cm. A caixa foi dividida por meio de uma porta central em dois compartimentos, um claro (60 Lux) e um escuro, de iguais dimensões.

FIGURA 6: Foto do modelo de transição claro/escuro

3.5.4. Labirinto Fechado (Figura 7)

O aparelho foi confeccionado em madeira, com 3 braços de iguais dimensões (50x12 cm), circundados por paredes com 40 cm de altura, e mantinha-se elevado a 50 cm do chão.

3.6. Procedimento

3.6.1. Experimento 1: Inibição do NDR por muscimol

LABIRINTO EM T ELEVADO: No dia seguinte à sua chegada ao biotério, os animais foram submetidos à cirurgia estereotática para implantação da cânula-guia no NDR. Cinco dias depois, estes animais foram

pré-expostos a um dos braços abertos do modelo labirinto em T elevado, por um período de 30 min. Após 24 horas, cada animal recebeu uma microinjeção de muscimol ($1 \mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$) ou veículo ($0,2 \mu\text{l}$) e, após dez minutos, foi colocado na extremidade distal do braço fechado do labirinto em T elevado, com a cabeça voltada para o centro do aparelho. Cronometrava-se a latência de saída, com as quatro patas, do braço fechado em direção ao aberto (latência basal). O animal foi, então, retirado do labirinto e colocado em uma caixa, por trinta segundos. Em seguida, a mesma medida foi tomada por mais duas vezes consecutivas (latências de Esquiva Inibitória 1 e 2), com intervalo de 30 segundos entre elas. O animal foi então colocado na extremidade do braço aberto para registro do tempo de saída deste braço com as quatro patas (Fuga 1). Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes consecutivas, com intervalos de trinta segundos entre elas, para a aquisição das medidas de Fuga 2 e Fuga 3.

ARENA: Após a última medida de fuga, o animal foi colocado na arena e filmado por cinco minutos para posterior registro de número de cruzamentos e levantamentos.

MODELO DA TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO: Após os cinco minutos de exposição à arena, o animal foi colocado no compartimento claro do modelo da transição claro-escuro e filmado por um período de cinco minutos a partir do momento em que cruzasse do compartimento claro para o escuro pela primeira vez. Posteriormente, foram registrados o tempo de permanência no compartimento claro e o número de cruzamentos entre os 2 compartimentos.

3.6.2. Experimento 2: Inibição do NDR por muscimol no Labirinto em T fechado.

LABIRINTO FECHADO: No dia seguinte à sua chegada ao biotério, os animais foram submetidos à cirurgia estereotóxica para implantação da cânula-guia no NDR. Após cinco dias, cada animal recebeu uma microinjeção de muscimol ($1 \mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$) ou veículo ($0,2 \mu\text{l}$) e, após dez minutos, foi colocado na extremidade do braço longitudinal do labirinto fechado. A latência basal para saída do braço longitudinal para o transversal era considerada após o animal cruzar com as quatro patas. Após essa primeira medida, o rato era colocado em uma caixa por 30 segundos, antes das medidas da segunda e terceira latência de saída do braço longitudinal. Então o animal era colocado na extremidade do braço transversal para as medidas das latências por mais 3 vezes. Após a utilização do Labirinto Fechado, os animais eram expostos à arena

ARENA: Após a última medida do labirinto em T fechado, o animal era colocado na arena e filmado por cinco minutos para posterior registro de número de cruzamentos e levantamentos.

3.6.3. Experimento 3: Inibição da MCPD por muscimol

No dia seguinte da chegada ao biotério, os animais foram submetidos à cirurgia estereotóxica para implantação da cânula-guia na MCPD. Após cinco dias foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentos descritos no item 3.6.1.

3.6.4. Experimento 4: Inibição da amígdala basolateral por muscimol

No dia seguinte da chegada ao biotério, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral das cânulas-guia na amígdala basolateral. Após cinco dias foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentos descritos no item 3.6.1.

3.7. Histologia

No dia seguinte aos experimentos, os animais foram sacrificados com uretana 25%, perfundidos intracardiacamente com salina e formol 10% e seus cérebros removidos e mantidos por 5 dias no formol. Após esse período, os cérebros foram cortados com o auxílio de um criostato em seções coronais de 60 μm . Com o auxílio de um microscópio, foram localizados os sítios de microinjeção de acordo com diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (1986).

3.8. Análise estatística

Os dados da esquiva e da fuga coletados no labirinto em T elevado, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) do tipo *split-plot*, com o tratamento como o fator independente e as tentativas, como o fator dependente. Os dados comportamentais do labirinto T elevado, da arena e do modelo da transição claro-escuro foram submetidos ao teste *t* não-pareado. O resultado foi considerado significativo para valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1

4.1.1. Efeito da administração de muscimol intra-NDR no labirinto em T elevado

A Figura 4A demonstra os efeitos do tratamento com muscimol sobre a esquiva inibitória dos braços abertos do labirinto em T elevado. A ANOVA do tipo *split-plot* indicou efeitos significativos do tratamento [$F(1,15)=28,58;p<0,001$], das tentativas [$F(2,30)=74,09;p<0,001$] e da interação tratamento *versus* tentativas [$F(2,32)=12,98;p<0,001$]. O teste *t* não-pareado indicou diferença significativa entre o grupo tratado com muscimol e o grupo controle, nas três tentativas de esquiva, basal [$T(15)=3,42;p=0,04$], esquiva 1 [$T(15)=4,93;p<0,001$] e esquiva 2 [$T(15)=4,51;p<0,001$].

A Figura 4B demonstra os efeitos dos tratamentos com muscimol sobre a fuga do braço aberto do modelo. A ANOVA do tipo *split-plot* indicou efeitos significativos do tratamento [$F(1,15)=47,59;p<0,001$], das tentativas [$F(2,32)=29,95;p<0,001$] mas não demonstrou efeito da interação tratamento *versus* tentativas [$F(2,32)=0,78;p=0,469$]. O teste *t* não-pareado indicou diferença significativa entre o grupo tratado com muscimol e o grupo controle, nas três tentativas de fuga, fuga 1 [$T(15)=5,42;p<0,001$], fuga 2 [$T(15)=4,89;p<0,001$] e fuga 3 [$T(8,26)=3,97;p=0,004$].

4.1.2. Efeito da administração de muscimol intra-NDR sobre o comportamento locomotor de ratos na arena

A Figura 5 demonstra os efeitos dos tratamentos sobre a atividade locomotora dos animais testados na arena. O teste *t* não-pareado não indicou diferenças significativas em nenhuma das duas medidas: número de cruzamentos [$T(15)=0,40;p=0,694$] e número de levantamentos [$T(15)=0,72;p=0,484$].

4.1.3. Efeito da administração de muscimol intra-NDR no modelo da transição claro-escuro

A Figura 6 demonstra o efeito dos tratamentos sobre o comportamento dos animais expostos ao modelo da transição claro-escuro, nas medidas tempo gasto no compartimento claro (6A) e número de cruzamentos entre os dois compartimentos (6B). O teste *t* não-pareado indicou diferenças significativas na medida tempo gasto no compartimento claro [$T(15)= -3,61;p=0,003$], mas não indicou diferença significativa no número de transições entre os dois compartimentos [$T(15)= 1,18;p=0,614$].

4.2. Experimento 2

4.2.1. Efeito da administração de muscimol intra-NDR no labirinto em T fechado

A figura 7A demonstra os efeitos do tratamento com muscimol sobre a saída do braço longitudinal para o braço transversal do labirinto em T fechado. A ANOVA do tipo *split-plot* indicou efeito significativo das tentativas [$F(2,32)=802,72;p<0,001$], mas não indicou efeito significativo do tratamento

[F(1,16)=3,69;p=0,073] e nem da interação tratamento *versus* tentativas [F(2,32)=1,11;p=0,341].

A figura 7B demonstra os efeitos do tratamento com muscimol sobre a saída do braço transversal para o braço longitudinal do labirinto em T fechado. A ANOVA do tipo *split-plot* indicou efeito significativo das tentativas [F(2,32)=2391,73;p<0,001], mas não indicou efeitos significativos do tratamento [F(1,16)=1,25;p=0,280], ou da interação tratamento *versus* tentativas [F(2,32)=0,20;p=0,817].

4.2.2. Efeito da administração de muscimol intra-NDR sobre o comportamento locomotor de ratos na Arena

A Figura 8 demonstra os efeitos dos tratamentos sobre a atividade locomotora dos animais testados na arena. O teste *t* não-pareado não indicou diferenças significativas em nenhuma das duas medidas: número de cruzamentos [T(16)=1,20;p=0,246] e número de levantamentos [T(16)=1,23;p=0,237].

4.3. Experimento 3

4.3.1. Efeito da administração de muscimol intra-MCPD no labirinto em T elevado

A Figura 9A demonstra os efeitos do tratamento com muscimol sobre a esquia inibitória dos braços abertos do labirinto em T elevado. A ANOVA do tipo *split-plot* indicou efeito significativos das tentativas [F(2,34)=47,10; p<0,001], mas não indicou efeito significativo do tratamento [F(1,17)=0,00; p=0,988] e nem da interação tratamento *versus* tentativas [F(2,34)=0,01; p=0,987].

A figura 9B demonstra os efeitos dos tratamentos com muscimol sobre a fuga do braço aberto do modelo. A ANOVA do tipo *split-plot* indicou efeitos significativos do tratamento [$F(1,17)=15,43$; $p<0,001$], das tentativas [$F(2,34)=84,57$; $p<0,001$] e da interação tratamento *versus* tentativas [$F(2,34)=14,07$; $p<0,000$]. O teste *t* não-pareado indicou diferença significativa na fuga 2 [$T(17)=-3,86$; $p=0,001$] e fuga 3 [$T(17)=-5,66$; $p<0,000$], mas não indicou diferença significativa entre o grupo tratado com muscimol e o grupo controle na primeira tentativa de fuga, fuga 1 [$T(17)=-1,16$; $p=0,763$].

4.3.2. Efeito da administração de muscimol intra-MCPD sobre o comportamento locomotor de ratos na arena

A Figura 10 demonstra os efeitos dos tratamentos sobre a atividade locomotora dos animais testados na arena. O teste *t* não-pareado não indicou diferenças significativas em nenhuma das duas medidas: número de cruzamentos [$T(17)=0,55$; $p=0,588$] e número de levantamentos [$T(17)=0,93$; $p=0,364$].

4.3.3. Efeito da administração de muscimol intra-MCPD no modelo da transição caixa claro-escuro.

A Figura 11 demonstra o efeito dos tratamentos sobre o comportamento dos animais expostos ao modelo da transição claro-escuro, nas medidas de número de cruzamentos entre os dois compartimentos (11A) e tempo gasto no compartimento claro (11B). O teste *t* não-pareado não indicou diferenças significativas em nenhuma das duas medidas: número de

transições entre os dois compartimentos [$T(17)=0,30$; $p=0,894$] e tempo gasto no compartimento claro [$T(17)=0,25$; $p=0,806$].

4.4. Experimento 4

4.4.1. Efeito da administração bilateral de muscimol intra-amígdala basolateral no labirinto em T elevado

A Figura 12A demonstra os efeitos do tratamento com muscimol sobre a esquivas inibitória dos braços abertos do labirinto em T elevado. A ANOVA do tipo *split-plot* indicou efeitos significativos do tratamento [$F(1,18)=156,61$; $p<0,001$], das tentativas [$F(2,36)=111,55$; $p<0,001$] e da interação tratamento *versus* tentativas [$F(2,36)=65,73$; $p<0,001$]. O teste *t* não-pareado indicou diferença significativa entre o grupo tratado com muscimol e o grupo controle na esquiva 1 [$T(10,11)=7,90$; $p<0,001$] e esquiva 2 [$T(18)=10,36$; $p<0,001$], mas não indicou diferença significativa entre o grupo tratado com muscimol e o grupo controle na primeira tentativa de esquiva, basal [$T(18)=0,20$; $p=0,845$].

A Figura 12B demonstra os efeitos dos tratamentos com muscimol sobre a fuga do braço aberto do modelo. A ANOVA do tipo *split-plot* indicou efeito significativo das tentativas [$F(2,36)=45,69$; $p<0,001$], mas não indicou efeito significativo do tratamento [$F(1,18)=0,05$; $p=0,825$] e nem da interação tratamento *versus* tentativas [$F(2,36)=0,49$; $p=0,615$].

4.4.2. Efeito da microinjeção bilateral de muscimol intra-amígdala basolateral sobre o comportamento locomotor de ratos na arena

A Figura 13 demonstra os efeitos dos tratamentos sobre a atividade locomotora dos animais testados na arena. O teste *t* não-pareado não

indicou diferenças significativas em nenhuma das duas medidas: número de cruzamentos [$T(18)=0,43$; $p=0,669$] e número de levantamentos [$T(18)=-0,03$; $p=0,975$].

4.4.3. Efeito da administração bilateral de muscimol intra-amígdala basolateral no modelo da transição caixa claro-escuro.

A Figura 14 demonstra o efeito do tratamento sobre o comportamento dos animais expostos ao modelo da transição claro-escuro, nas medidas de número de cruzamentos entre os dois compartimentos (14A) e tempo gasto no compartimento claro (14B). O teste t não-pareado indicou diferenças significativas na medida de tempo gasto no compartimento claro [$T(18)=-5,14$; $p<0,001$], mas não indicou diferença significativa no número de transições entre os dois compartimentos [$T(18)=0,37$; $p=0,719$]

Figura 4 – Efeito do muscimol intra-NDR sobre as medidas de esquiva inibitória e fuga dos braços abertos do labirinto em T elevado. Barras representam média $\pm$ EPM para 8 ratos para o grupo controle e 9 ratos para o grupo tratado com muscimol. As medidas de Latência Basal (BL), Esquiva 1, Esquiva 2, Fuga 1, Fuga 2 e Fuga 3 foram realizadas com 30 segundos de intervalo entre cada, começando 10 minutos após a microinjeção de droga ou veículo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao controle (ANOVA do tipo *split-plot* seguida de teste *t* de Student não-pareado).

Figura 5 – Efeito do muscimol intra-NDR sobre o comportamento locomotor na Arena. Barras representam média $\pm$ EPM para 8 ratos para o grupo controle e 9 ratos para o grupo tratado com muscimol. Os animais foram expostos por 5 minutos à arena imediatamente após serem testados no labirinto em T elevado.

Figura 6 – Efeito do muscimol intra-NDR sobre o tempo de permanência no compartimento claro e número de cruzamentos entre os dois compartimentos. Barras representam média $\pm$ EPM para 8 ratos para o grupo controle e 9 ratos para o grupo tratado com muscimol. Os animais foram por 5 minutos ao modelo de transição claro-escuro, a partir de sua primeira entrada no compartimento claro, imediatamente após serem testados na arena. ** $p < 0,01$ em relação ao controle (teste *t* de *Student* não-pareado).

Figura 7 – Efeito do muscimol intra-NDR as medidas de saída do braço longitudinal para o transversal e do transversal para o longitudinal. Barras representam média $\pm$ EPM para 8 ratos para o grupo controle e 9 ratos para o grupo tratado com muscimol. As medidas de saída do braço longitudinal 1 (Long1), Longitudinal 2 (Long 2), Longitudinal 3 (Long 3), Transversal 1 (Transv1), Transversal 2 (Transv2) e Transversal 3 (Transv 3) foram realizadas com 30 segundos de intervalo entre cada, começando 10 minutos após a microinjeção de droga ou veículo.

Figura 8 – Efeito do muscimol intra-NDR sobre o comportamento locomotor na Arena. Barras representam média $\pm$ EPM para 8 ratos para o grupo controle e 9 ratos para o grupo tratado com muscimol. Os animais foram expostos por 5 minutos à arena imediatamente após serem testados no labirinto em T fechado.

Figura 9 – Efeito do muscimol intra-MCPD sobre esquiva inibitória e fuga dos braços abertos do labirinto em T elevado. Barras representam média $\pm$ EPM para 9 ratos para o grupo controle e 10 ratos para o grupo tratado com muscimol. As medidas de Latência Basal (LB), Esquiva 1, Esquiva 2, Fuga 1, Fuga 2 e Fuga 3 foram realizadas com 30 segundos de intervalo entre cada, começando 10 minutos após a microinjeção de droga ou veículo. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (ANOVA do tipo *split-plot* seguida de teste *t* de *Student* não-pareado).

Figura 10 – Efeito do muscimol intra-MCPD sobre o comportamento locomotor na Arena. Barras representam média $\pm$ EPM para 9 ratos para o grupo controle e 10 ratos para o grupo tratado com muscimol. Os animais foram expostos por 5 minutos à arena imediatamente após serem testados no labirinto em T elevado.

Figura 11 – Efeito do muscimol intra-MCPD sobre o tempo de permanência no compartimento claro e número de cruzamentos entre os dois compartimentos. Barras representam média $\pm$ EPM para 9 ratos para o grupo controle e 10 ratos para o grupo tratado com muscimol. Os animais foram por 5 minutos ao modelo de transição claro-escuro, a partir de sua primeira entrada no compartimento claro, imediatamente após serem testados na arena.

Figura 12 – Efeito do muscimol intra-amígdala basolateral sobre esquiva inibitória e fuga dos braços abertos do labirinto em T elevado. Barras representam média $\pm$ EPM para 9 ratos para o grupo controle e 10 ratos para o grupo tratado com muscimol. As medidas de Latência Basal (LB), Esquiva 1, Esquiva 2, Fuga 1, Fuga 2 e Fuga 3 foram realizadas com 30 segundos de intervalo entre cada, começando 10 minutos após a microinjeção de droga ou veículo. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (ANOVA do tipo *split-plot* seguida de teste *t* de Student não-pareado).

Figura 13 – Efeito do muscimol intra-amígdala basolateral sobre o comportamento locomotor na Arena. Barras representam média $\pm$ EPM para 9 ratos para o grupo controle e 10 ratos para o grupo tratado com muscimol. Os animais foram expostos por 5 minutos à arena imediatamente após serem testados no labirinto em T elevado.

Figura 14 – Efeito do muscimol intra-amígdala basolateral sobre o tempo de permanência no compartimento claro e número de cruzamentos entre os dois compartimentos. Barras representam média $\pm$ EPM para 8 ratos para o grupo controle e 9 ratos para o grupo tratado com muscimol. Os animais foram por 5 minutos ao modelo de transição claro-escuro, a partir de sua primeira entrada no compartimento claro, imediatamente após serem testados na arena. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (teste t de Student não-pareado).

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Segundo Deakin e Graeff (1991), a via serotonérgica ascendente que parte do NDR, e que inerva a amígdala e o córtex frontal facilitaria comportamentos defensivos aprendidos em resposta a perigo potencial ou distal. Por outro lado, a via periventricular que parte do NDR e inerva a MCPD inibiria reações inatas de fuga ou luta em resposta a perigo proximal. Segundo os autores, o mal-funcionamento da via periventricular desencadearia mecanismos de defesa inatos em humanos e em termos clínicos estaria relacionado ao pânico. Por outro lado, a amígdala comandaria reações de defesa mais refinadas e discretas, desencadeadas por estímulos condicionados de medo. Estas reações corresponderiam à ansiedade antecipatória e teriam função adaptativa. Em termos clínicos, o mal-funcionamento da via serotonérgica ascendente que inerva a amígdala estaria relacionado com a ansiedade generalizada.

Os resultados do presente trabalho parecem corroborar alguns dos pressupostos teóricos formulados por Deakin e Graeff (1991). A administração intra-NDR de muscimol levou a uma diminuição da latência de saída tanto da esQUIVA inibitória quanto da fuga do labirinto em T elevado. Por outro lado, o muscimol intra-NDR levou a um aumento no tempo de permanência gasto no compartimento claro do modelo da transição claro-escuro, confirmando os resultados obtidos com a esQUIVA inibitória no labirinto em T elevado. Ainda, a administração do agonista gabaérgico intra-

NDR não apresentou efeito significativo no modelo do labirinto em T fechado, o que sugere, portanto, que os efeitos da droga no labirinto em T elevado estão relacionados com a ansiedade e não com uma possível excitação locomotora. Já a administração do muscimol intra-MCPD prejudicou a latência de fuga do braço aberto, não alterando as medidas de esquiva inibitória do labirinto em T elevado e nem as medidas do modelo da transição claro-escuro. Por fim, a microinjeção do muscimol intra-amígdala basolateral levou a um prejuízo da latência de esquiva inibitória e a um aumento no tempo de permanência gasto no compartimento claro do modelo da transição claro-escuro, não alterando as medidas de fuga do braço aberto do labirinto em T elevado. A atividade locomotora não foi afetada pela droga em nenhum dos grupos experimentais.

De acordo com a teoria proposta por Deakin e Graeff (1991), compostos que inibem a neurotransmissão serotoninérgica proveniente do NDR deveriam atuar como ansiolíticos na esquiva inibitória e, ao mesmo tempo, como ansiogênicos na fuga. De fato, a inibição do NDR por muscimol alterou significativamente o desempenho dos animais na medida de esquiva inibitória dos braços abertos do labirinto em T elevado. A diminuição das latências de esquiva indica um efeito ansiolítico da droga nesta tarefa. Este efeito foi similar aos obtidos com o agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT (Graeff *et al.*, 1996; 1997, Sena, 2002). De maneira semelhante ao demonstrado no presente trabalho, os autores constataram que a microinjeção intra-NDR de 8-OH-DPAT promoveu um prejuízo da esquiva inibitória dos braços abertos do modelo. Resultados semelhantes foram obtidos com o 8-OH-DPAT em

outros modelos animais de ansiedade. A administração intra-NDR da droga demonstrou efeito ansiolítico no teste de interação social (Hogg *et al.*, 1994). A inibição neuronal do NDR decorrente da administração de 5-HT também levou a um efeito ansiolítico no teste da interação social e no modelo do labirinto em cruz elevado (Thiébot *et al.*, 1980; Higgins *et al.*, 1992).

Trabalhos realizados anteriormente com o modelo da transição claro-escuro (Crawley & Goodwing, 1980; Young & Johnson, 1991), mostraram que o diazepam e outros benzodiazepínicos aumentam o número de transições e o tempo de permanência no compartimento iluminado. No presente trabalho, a microinjeção do muscimol intra-NDR levou a um aumento no tempo de permanência no compartimento claro, sugerindo efeito ansiolítico da droga. Resultados similares foram obtidos com a microinjeção de 8-OH-DPAT intra-NDR (Romaniuk, 2001; Sena, 2002). Adicionalmente, Costall *et al.* (1988) demonstraram que a microinjeção intra-NDR de buspirona também aumentou o tempo de permanência no compartimento claro.

Segundo Graeff *et al.* (1997), a diminuição da neurotransmissão serotoninérgica proveniente do NDR deveria facilitar a fuga do braço aberto do labirinto em T elevado, efeito, portanto ansiogênico. Novamente, os resultados do presente trabalho corroboram este pressuposto, indicando que a microinjeção intra-NDR de muscimol, facilitou a fuga do braço aberto do modelo. Estes resultados diferem de resultados prévios obtidos com o 8-OH-DPAT por Graeff *et al.* (1996; 1997). No referido estudo, a droga não apresentou efeito sobre a fuga do labirinto em T elevado. Essa diferença

entre os dois experimentos provavelmente se deve à introdução, no presente trabalho, do procedimento de pré-exposição dos animais a um dos braços abertos do modelo, um dia antes do experimento. Este procedimento teve como objetivo diminuir a atividade exploratória no braço aberto do labirinto em T elevado, assegurando que as latências de saída do braço aberto para o fechado seriam de fato uma medida de fuga e não uma medida da atividade exploratória do animal (Custódio Teixeira *et al.*, 2000). Corroborando esta teoria, resultados recentes de um estudo realizado em nosso laboratório (Sena, 2002) com a administração de 8-OH-DPAT intra-NDR em ratos pré-expostos, também relatam uma diminuição das latências de fuga do braço aberto do labirinto em T elevado.

A inibição da MCPD por muscimol alterou significativamente o desempenho dos animais na medida de fuga dos braços abertos do labirinto em T, não alterando a resposta de esquiva inibitória do modelo. O aumento das latências de fuga indica um efeito ansiolítico da droga nesta tarefa. Em estudos anteriores, Beckett *et al.* (1992) relataram que a administração intra-MCPD de 8-OH-DPAT inibe o efeito aversivo provocado pela administração local do aminoácido excitatório DLH (D,L-homocistéico). Corroborando estes resultados, Russo *et al.* (1991; 1993) demonstraram que a administração intra-MCPD do agonista benzodiazepínico midazolam aumentou o número de entradas dos ratos no braço aberto do labirinto em cruz elevado. De maneira semelhante, o efeito de fuga desabalada provocada pela estimulação elétrica da MCPD foi revertido pela microinjeção local do

agonista gabaérgico progabida, e pelos agonistas benzodiazepínicos midazolam e clordiazepóxido (Bouvier, 1982; Audi, 1984; Graeff, 1986).

A microinjeção do agonista gabaérgico muscimol intra-amígdala basolateral levou a uma diminuição da latência de esquiva dos braços abertos, efeito ansiolítico, sem alterar a tarefa de fuga. Resultados semelhantes foram obtidos no mesmo modelo com o agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT e com o benzodiazepínico midazolam administrado intra-amígdala basolateral (Zangrossi Jr. *et al.*, 1999). Em um outro modelo animal de ansiedade, o teste do beber punido, a administração de benzodiazepínicos intra-amígdala liberou o comportamento de pressão à barra para obtenção de água, efeito, portanto, anti-conflito (Shibata *et al.*, 1989). Kopchia *et al.* (1992), Yadin *et al.* (1992), Moller *et al.* (1997), Oakes e Coover (1997) e Sommer *et al.* (2001) obtiveram efeito ansiolítico através da lesão do complexo amigdalóide no mesmo modelo. Adicionalmente, a lesão do complexo amigdalóide parece prejudicar a esquiva inibitória motivada pelo choque nas patas (Ambrogi *et al.*, 1991; Treiti, 1997; Maier, 1993). Ainda, em estudos realizados com o teste de ocultação defensiva, Grijalva *et al.* (1990) mostraram que a lesão do complexo amigdalóide aumentou o número de contatos dos animais com o bastão eletrificado.

No modelo da transição claro-escuro, a administração intra-amígdala basolateral de muscimol levou a um aumento no tempo gasto no compartimento claro. Resultados semelhantes foram obtidos por Dringenberg *et al.* (1998) através da lesão do complexo amigdalóide. Costall

et al. (1989) também relataram aumento no tempo gasto no compartimento claro a partir da administração de diazepam intra-amígdala.

De acordo com a hipótese do papel dual da 5-HT sobre a ansiedade, proposta por Deakin e Graeff em 1991, compostos que diminuem a neurotransmissão serotoninérgica advinda do NDR deveriam atuar como ansiolíticos sobre respostas comportamentais de esquiva e como ansiogênicos em respostas comportamentais de fuga. A administração do agonista gabaérgico muscimol intra-NDR provocou exatamente este efeito no modelo do labirinto em T elevado (atuando como ansiolítico na esquiva e ansiogênico na fuga do braço aberto). Os resultados obtidos com o modelo da transição claro-escuro (que mostram que o muscimol intra-NDR atuou como ansiolítico na medida de tempo gasto no compartimento claro), confirmaram os obtidos com a esquiva inibitória do labirinto em T elevado. Ainda segundo os pressupostos da teoria do papel dual da 5-HT na ansiedade (Deakin e Graeff, 1991), uma inibição da neurotransmissão serotoninérgica na amígdala inibiria comportamentos defensivos aprendidos em resposta a perigo potencial ou distal. A administração intra-amígdala de muscimol, inibindo a atividade da estrutura, provocou um efeito ansiolítico nas medidas de esquiva inibitória dos braços abertos do labirinto em T elevado e no tempo gasto no compartimento claro no modelo da transição claro-escuro, efeitos estes que novamente corroboram pressupostos da teoria de Deakin e Graeff (1991). Já a MCPD comandaria reações inatas de fuga ou luta em resposta a perigo proximal. Neste caso, segundo os autores (Deakin e Graeff, 1991), a 5-HT funcionaria inibindo a estrutura e

conseqüentemente prejudicando reações inatas de fuga e luta. Mais um vez corroborando os pressupostos da teoria, a microinjeção intra-MCPD do agonista gabaérgico, através de uma inibição da atividade da estrutura, promoveu efeito ansiolítico na medida de fuga do braço aberto do labirinto em T elevado.

Neste sentido, analisando os resultados obtidos no presente trabalho, em conjunto, pode-se dizer que, de maneira geral, estão de acordo com alguns dos pressupostos da teoria do papel dual da 5-HT na ansiedade proposta por Deakin e Graeff (1991). Finalmente, salienta-se a importância da pré-exposição como um procedimento capaz de tornar mais precisa as medidas de fuga do braço aberto do labirinto em T elevado, por diminuir o tempo gasto pelos animais em atividade exploratória, como proposto por Custódio Teixeira *et al.* (2000).

Tem sido proposto que vias serotoninérgicas distintas originárias do núcleo dorsal da rafe (NDR) modulariam diferentes tipos de reações de defesa a estímulos aversivos. Deakin e Graeff (1991) propuseram que a ativação da via ascendente do NDR, que inerva a amígdala e o córtex frontal, facilitaria comportamentos defensivos aprendidos em resposta a perigo potencial ou distal, enquanto que a ativação da via periventricular, também originária no NDR e que inerva a matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) inibiria reações de fuga e luta inatas em resposta a perigo proximal. No presente trabalho pretendeu-se explorar esta hipótese investigando o efeito da inibição do NDR, da MCPD e do núcleo amigdalóide basolateral, em ratos submetidos a dois modelos animais de ansiedade: o labirinto em T elevado (LTE) e o modelo de transição claro-escuro (MTCE). Os testes com o LTE incluíram uma variação metodológica: um dia antes do experimento, os animais foram pré-expostos por 30 minutos a um dos braços abertos do modelo. Tem sido demonstrado que a pré-exposição leva a uma diminuição do tempo gasto em atividade exploratória no braço aberto, assegurando que durante as medidas de fuga, os animais estão realmente fugindo do estímulo aversivo. No presente trabalho, a administração intra-NDR do agonista gabaérgico muscimol diminuiu as latências da esquia inibitória (EI), efeito ansiolítico, e da fuga dos braços abertos do LTE, efeito ansiogênico. Além disso, o muscimol intra-NDR aumentou o tempo gasto no compartimento claro (TGCC) do MTCE, efeito ansiolítico. Por outro lado, a droga não apresentou efeito no modelo do labirinto em T fechado. Já a microinjeção de muscimol intra-MCPD aumentou a latência de fuga do braço

aberto do LTE, efeito ansiolítico, não apresentando qualquer efeito na EI do labirinto em T elevado ou no MTCE. Finalmente, a administração de muscimol intra-amígdala basolateral prejudicou a esquia inibitória do LTE e aumentou o TGCC do MTCE, efeitos ansiolíticos, sem alterar a fuga dos braços abertos. Em conjunto, os dados do presente trabalho corroboram alguns dos pressupostos da teoria do papel dual da 5-HT na ansiedade proposta por Deakin e Graeff (1991). É interessante salientar, ainda, a importância da pré-exposição sobre as medidas de fuga do braço aberto do LTE.

It has been proposed that distinct 5-HT pathways modulate different types of anxiety reaction to aversive stimuli. Deakin and Graeff (1991) proposed that the activation of the ascending dorsal raphe (DR)-5-HT pathways innervating the amygdala and frontal cortex would facilitate learned defensive behaviors in response to distal or potential threat, while activation of the DR-periventricular 5-HT pathways, which innervates the dorsal periaqueductal gray matter (DPAG) would inhibit innate flight or fight reactions in response to proximal threat. In an attempt to explore this hypothesis, we investigated the effects of reversible inhibition of the DRN, the DPAG and of the basolateral amygdala nucleus in rats exposed to 2 animal models of anxiety: the elevated T maze (ETM) and the light-dark model (LDM). An important methodological difference was included to the ETM tests. The animals were exposed for 30 minutes to one of the ETM open arms, 24 h before the tests. Pre-exposure seems to improve escape measurements in the ETM, assuring that during escape, animals are really escaping from the aversive threat and not simply ambling. In the present study, muscimol administered intra-DRN impaired both the avoidance, anxiolytic effect, and the escape task, anxiogenic effect, of the ETM and increased the time spent in the light compartment (TSLC) in the LDM, an anxiolytic effect. On the other hand, muscimol microinjected intra-DPAG enhanced escape latencies in the ETM, an anxiolytic effect, without altering inhibitory avoidance or LDM measurements. Finally, muscimol administered intra-basolateral amygdala impaired avoidance in the ETM and increased the TSLC in the LDM, revealing an anxiolytic effect in both tests, without altering

the escape task. Taken together the obtained data seem to corroborate the dual role of 5-HT in anxiety, proposed by Deakin and Graeff (1991). At last, the importance of pre-exposure to the open arms of the LTE should be emphasized as a procedure capable of improving escape measurement.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, C.L.V. **Efeitos da lesão do complexo amigdalóide sobre as respostas comportamentais de defesa medidas nos testes do labirinto em T elevado e da exposição ao odor de gato.** 2001. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

AMBROGI LORENZINI, C.; *et al.* Effects of nucleus basolateralis amygdalae neurotoxic lesions on aversive conditioning in the rat. **Physiology & Behavior.** 49:765-770. 1991.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Dignostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV - 4th.** Ed. Washington, DC, American Psychiatric Association. 1994.

ARTALZ I.; *et al.* Characterization of serotonergic mechanisms involved in the behavioural inhibition induced by 5-hydroxytryptophan in a modified light-dark test in mice. **Behavioural Pharmacology.** 9(2):103-12. 1998.

AUDI E.A. & GRAEFF F.G. Benzodiazepine receptors in the periaqueductal grey mediate anti-aversive drug action. **European Journal of Pharmacology.** 103(3-4):279-285. 1984.

BECKETT S.R.; *et al.* Attenuation of chemically induced defence response by 5-HT₁ receptor agonists administered into the periaqueductal gray.

Psychopharmacology. 108(1-2):110-114. 1992.

BLIER, P.; *et al.* Modification of the serotonin system by the antidepressant treatments: implication for the therapeutic response in major depression.

Journal Clinical Psychopharmacology, 7:24-35. 1987.

BOVIER P.; *et al.* Enhancing GABAergic transmission reverses the aversive state in rats induced by electrical stimulation of the periaqueductal grey region. **Brain Research**. 248(2):313-20. 1982.

CARLI M.; *et al.* Evidence that central 5-hydroxytryptaminergic neurones are involved in the anxiolytic activity of buspirone. **Brazilian Journal of Pharmacology**. 96(4):829-836. 1989.

CEULEMANS, D. L. S. *et al.* The influence of ritanserin, a serotonin antagonist in anxiety disorders: a double-blind placebo-controlled study versus lorazepam. **Pharmacopsychiatry**. 18:303-305. 1985.

CHAOULOFF, F. *et al.* Anxiety and activity related effect of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. **Behavioral Brain Research**, 85:27-35. 1997.

COSTALL, B. *et al.* ONAVI, E.S. Actions of Buspirone in a Putative Model of Anxiety in the Mouse. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 40:494-494. 1988.

COSTALL B. *et al.* Neuroanatomical sites of action of 5-HT₃ receptor agonist and antagonists for alteration of aversive behaviour in the mouse. **Brazilian Journal of Pharmacology**. 96(2): 325-332. 1989a.

COSTALL B. *et al.* Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**. 32(3):777-785. 1989b.

COSTALL B. *et al.* Profile of action of a novel 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor ligand E-4424 to inhibit aversive behavior in the mouse, rat and marmoset. **Pharmacology Experimental Theraphy**. 262(1):90-98. 1992.

CRAWLEY, J.N. & GOODWIN, F.K. Preliminary report of a simple animal behavior for the anxiolytics effects of benzodiazepines. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**. 13: 167-170. 1980

CUSTÓDIO TEIXEIRA, R. *et al.* Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T maze model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**. 65(4): 571-576. 2000.

DAVIDSON J.R. Pharmacotherapy of generalized anxiety disorder. **J Clin Psychiatry**. 62 Suppl 11:46-50. 2001.

DEAKIN, J. F. W. & GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. **Journal of Psychopharmacology**. 5(4): 305-315, 1991.

DEN BOER, J. A. & WESTENBERG, H. G. M. Serotonin function in panic disorder: a double blind placebo controlled study with fluvoxamine and ritanserin. **Psychopharmacology**. 102:85-94, 1990.

DONALDSON, D. Neurotransmitters, neuronal systems and subcortical nuclei. In: _____. **Psychiatric Disorders with Biochemicals Basis.**

New York: The Parthenon Publishing Group Inc., 1998.

DRINGENBERG H. C. *et. al.* Effects of amygdaloid lesions, hippocampal lesions, and buspirone on black-white exploration and food carrying in rats.

Behavioral Brain Research. 96(1-2):161-72. 1998.

DUGAS, M. J. Generalized anxiety disorder publications: so where do we stand? **Journal Anxiety Disorder.** 14(1): 31-40. 2000.

FOUCAULT, M. **Doença Mental e Psicologia.** Editora Tempo Brasileiro Ltda. Rio de Janeiro. 6^a. ed. 2000.

FRAZÃO, J. R. & BATISTA, J.B. A Perpectiva Antropológica do Existencialismo. **Metanóia.** 1: 65-68, 1998/1999.

FREUD, S. Inibição, Sintoma e Angústia. In: _____. **Obras Completas Vol. XX.** Editora Estandart Brasileira, Rio de Janeiro. 2^a. ed. 1970.

GELLER, I. & BLUM, K. ; The effects of 5HTP on para-chlorophenylalanine (PCPA) attenuation of "conflict" behavior. **European Journal of Pharmacology.** 9:319-324. 1970.

GENTIL, V. *et al.* **Pânico, Fobias e Obsessões.** 3ed. São Paulo. Editora USP. 1997.

GORMAN J. M. Treatment of generalized anxiety disorder. **J. Clin Psychiatry.** 63 Suppl 8:17-23. 2002.

GRAEFF F.G. *et al.* Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. **Behavioral Brain Research**. 21(1):65-72. 1986.

GRAEFF, F.G. **Drogas psicotrópicas e seu modo de ação**. 2ª ed. São Paulo. Edit. EPU. 1989.

GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: GRAEFF, F.G. & BRANDÃO, M.L. eds., **Neurobiologia das Doenças Mentais**. Lemos Editorial e Gráficos Ltda., São Paulo, 5ª. Ed. p. 135-178. 1999.

GRAEFF, F.G. *et al.* The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 26:67-70, 1993.

GRAEFF, F.G. *et al.* Regulation by Dorsal Raphe Nucleus 5-HT Pathways of Two Types of Fear in the Elevated T-maze. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**. v.53, n.1, p.171-177, 1996.

GRAEFF, F. G. *et al.* Dual Role of 5-HT in Defense and Anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 21(6): 791-799. 1997

GRAEFF, F.G. *et al.* The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**. 23: 237-246. 1998

GRAEFF, F. G. Ansiedade. In: _____ & GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo. Edit. Ateneu. 1999. p. 123-160.

GRAEFF, F.G. & ZANGROSSI JR, H. Animal models of anxiety. *In*: D'HAENEN, H.; DEN BOER, J.A.; WILLNER, P. Eds. **Biological Psychiatry**. John Wiley & Sons Ltd. 2002. p. 1-15.

GRIEBEL, G. 5-hydroxytryptamine-interacting drugs in animals models of anxiety disorders: more than 30 years of research. **Pharmacology & Therapeutics** . 65:319-395. 1995

GRIJALVA, C. V. *et al.* Contrasting effects of centromedial and basolateral amygdaloid lesions on stress-related responses in the rat. **Physiology & Behavior**. 48(4):495-500. 1990.

GRIMAL, P. **Dicionário da mitologia grega e romana**. Rio de Janeiro. Editora Bertrand Brasil. 2. Ed. 1993.

HANDLEY, S.L.. & MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.**, v.327, p.1-5, 1984.

HANDLEY, S.L. & M^C BLANE, J.W. 5-HT drugs in animal models of anxiety. **Psychopharmacology**. 112: 13-20. 1993

HASCOËT, M. & BOURIN, M. A new approach to the light/dark test procedure in mice. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**. 60(3): 645-653. 1998.

HIGGINS, S. *et al.* Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists in two models of anxiety after dorsal raphe injection. **Psychopharmacology**. 106: 261-267. 1992

HOGGS, S. A review of the validity and variability of the elevated plus maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**. 54:21-30. 1996.

HOGGS, S. *et al.* Contrasting behavioral effects of 8-OH-DPAT in the dorsal raphe nucleus and ventral hippocampus. **Neuropharmacology**. 33:865-868. 1994.

KIERKEGAARD, S. **O desespero humano**. Abril Cultural. São Paulo. 1984.

KOPCHIA, K. L. *et al.* Effects of lesions of the central nucleus of the amygdala on anxiety-like behaviors in the rat. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**. 43(2):453-61. 1992.

LAPLANCHE, J. **Novos Fundamentos para a Psicanálise**. São Paulo. Editora Martins Fontes. 1992.

LIMA, L. P. **Dicionário da Psicologia Prática**. 2^a. ed. Editora Honor. São Paulo. 1970.

MAIER S. F. *et al.* The role of the amygdala and dorsal raphe nucleus in mediating the behavioral consequences of inescapable shock. **Behavioural Neuroscience**. 107(2):377-88. 1993.

MAJCHRZAK M. & DI SCALA G. GABA and muscimol as reversible inactivation tools in learning and memory. **Neural Plast**. 7(1-2):19-29. 2000.

MILANI, H. & GRAEFF, F.G. GABA-benzodiazepine modulation of aversion in the medial hypothalamus of the rat. **Pharmacol Biochem Behav**. 28(1):21-7. 1987.

- MOLLER C. *et al.* Decreased experimental anxiety and voluntary ethanol consumption in rats following central but not basolateral amygdala lesions. **Behavioral Brain Research**. 760(1-2):94-101. 1997.
- NUTT, D. J. Anxiety and its therapy: today and tomorrow. *In*: BRILEY, M. & FILE, S.E. editors. **New concepts in anxiety**. London: Macmillan, p.1-12. 1991.
- OAKES, M. E. & COOVER, G.D. Effects of small amygdala lesions on fear, but not aggression, in the rat. **Physiology & Behavior**. 61:45-55. 1997.
- ONAIVI E. S. & MARTIN B. R. Neuropharmacological and physiological validation of a computer-controlled two-compartment black and white box for the assessment of anxiety. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**. 13(6):963-976. 1989.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde – 10ª revisão**. 7ª ed. São Paulo: EDUSP, 1999.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2ª ed. Academic Press Inc., Australia. 1986.
- PELLOW, S. *et al.* Validation of open-closed arm entries in the elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Meth.** 14:149-167. 1985.

PELLOW, S. & FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry Behavioral**. 24:525-529. 1986.

RODGERS, R. J. *et al.* Animal models of anxiety: na ethological persperctive. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 30:289-304. 1997.

ROMANIUK A. *et al.* Effects of 8-OHDPAT administration into the dorsal raphe nucleus and dorsal hippocampus on fear behavior and regional brain monoamines distribution in rats. **Behavioral Brain Research**. 120(1):47-57. 2001.

RUSSO A. S. *et al.* Anxiolytic effect of midazolam microinjected into the dorsal periaqueductal grey area of rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 24(6):607-609. 1991

RUSSO A. S. *et al.* Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal grey of rats in anxiety. **Psychopharmacology**. 110(1-2):198-202. 1993.

SALIM, J. Os ansiolíticos. In: SALIM, J. **Noções de Psicofarmacoterapia**. Editora da Universidade Católica. São Paulo. p. 65-76. 1987.

SÀNCHEZ, C. C. Serotonergic mechanisms involved in the exploratory behaviour of mice in a fully automated two-compartment black and white box. **Pharmacology Toxicology**. 77(1): 71-78. 1995.

SÀNCHEZ, C. C. 5-HT(1A) receptors play an important role in modulation of behavior of rats in a two-compartment black and white test box. **Behaviour Pharmacology**. 7(8): 788-797. 1996.

SARTRE, J. P. **Com a Morte na Alma**. Ed. Nova Fronteira, Rio de Janeiro. 4^a. ed. 1983.

SCHENBERG, L. C. & GRAEFF, F.G. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 9(3):287-295. 1978.

SENA, L. M. **Efeitos da inibição e da estimulação do núcleo dorsal da rafe sobre respostas comportamentais de defesa a estímulos aversivos condicionados e incondicionados**. 2002. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SHIBATA S. *et al.* Effects of benzodiazepine and GABA antagonists on anticonflict effects of antianxiety drugs injected into the rat amygdala in a water-lick suppression test. **Psychopharmacology**. 98(1):38-44. 1989.

SOMMER W. *et al.* Local 5,7-dihydroxytryptamine lesions of rat amygdala: release of punished drinking, unaffected plus-maze behavior and ethanol consumption. **Neuropsychopharmacology**. 24(4):430-40. 2001.

STEIN, L. *et al.* Antianxiety action of Benzodiazepines : decrease in activity of serotonin neurons in the punishment system. In: Garattini, S, Mussin, E. Randal, L. O. **Benzodiazepines**. 299-326. Raven Press, NY. 1973

THIEBOT, M. H. *et al.* Conditioned suppression of behavior. Its reversal by intra raphe microinjection of chlordiazepoxide and GABA. **Neuroscience Letters**. 16(2): 213-217. 1980.

TREIT D. & MENARD J. Dissociations among the anxiolytic effects of septal, hippocampal, and amygdaloid lesions. **Behavioural Neuroscience**. 11(3):653-658. 1997.

VIANA, M.B. *et al.* The elevated T-maze: a new model of anxiety and memory. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 49: 549-554. 1994.

WISE C. D. *et al.* Benzodiazepines: Anxiety – Reduces activity by reduction of serotonin turnover in the brain. **Science**. 117: 180-183. 1972.

YADIN E. *et al.* Anxiolytic effects of benzodiazepines in amygdala-lesioned rats. **Psychopharmacology**. 103(4):473-479. 1991.

YOUNG, R. & JOHNSON, D. N. A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 40(4):739-743. 1991.

ZANGROSSI JR. H.; Modelos animais de ansiedade. *In: Ansiedade e transtornos de ansiedade*. HETEM, A.B. & GRAEFF, F.G. 85-120. Edit. Científica Nacional, Rio de Janeiro, 1997.

ZANGROSSI JR., H. *et al.* Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 25:637-645. 2001.

ZANGROSSI JR. H. & GRAEFF, F.G. A behavioral validation of the elevated T-maze: A new model of anxiety. **Brain Research Bulletin**. 44:1-5. 1997.

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