



Bruno de Oliveira Galvão

**Avaliação Comportamental e Farmacológica da Relação
entre Ansiedade e Pânico em Modelos Animais**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre pelo
programa de Pós-graduação em Psicologia
Clínica da PUC-Rio.

Orientador: J. Landeira-Fernandez

Rio de Janeiro
Novembro de 2007



Bruno de Oliveira Galvão

**Avaliação Comportamental e Farmacológica da Relação
entre Ansiedade e Pânico em Modelos Animais**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre pelo
programa de Pós-graduação em Psicologia
Clínica da PUC-Rio.

Prof. Jesus Landeira Fernandez

Orientador

Departamento de Psicologia – PUC-Rio

Prof. Guilherme Guttman

Departamento de Psicologia – PUC-Rio

Prof. Luiz de Gonzaga Gawryszewski

Departamento de Neurobiologia - UFF

Prof. Paulo Fernando Carneiro de Andrade

Coordenador Setorial do Centro de Teologia
e Ciências Humanas – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 23 de Novembro de 2007

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e do orientador.

Bruno de Oliveira Galvão

Graduou-se em Psicologia na USU (Universidade SantaÚrsula) em 2003. Fez estágios dentro da área de saúde mental e psicologia experimental. Atendeu em clínica particular, participou de congressos dentro da área de Psicologia e Neurociências.

Ficha catalográfica

Galvão, Bruno de Oliveira

Avaliação comportamental e farmacológica da relação entre ansiedade e pânico em modelos animais / Bruno de Oliveira Galvão ; orientador: J. Landeira-Fernandez. – 2007.

64 f. : il. (col.) ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Psicologia)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

Inclui bibliografia

1. Psicologia – Teses. 2. Ansiedade. 3. Medo ao contexto. 4. Comportamento defensivo. 5. NMDA. 6. Ataque de pânico. 7. MCPD. 8. PTZ. I. Landeira-Fernandez, J. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Psicologia. III. Título.

Para meu Tio Francisco Costa Accioly
pescador, pintor, carpinteiro e
por me mostrar a serra e o mar

In memoriam

Agradecimentos

Ao meu orientador professor J. Landeira-Fernandez, pelo rigor de seu trabalho, por suas críticas fundamentais ao longo desta caminhada, por confiar em mim e por me fazer pensar e sentir a ciência pela primeira vez.

Ao professor Marcus Lira Brandão, a todos em seu laboratório e aos meus novos amigos de Ribeirão Preto. A “Josi” pelo apoio no momento de “desespero”.

Ao professor Miguel Barbosa do Rosário do Departamento de Letras da UFRJ pelo auxílio na revisão ortográfica.

A todos os professores, funcionários e alunos do Departamento de Psicologia, especialmente a Marcelina Andrade pelo apoio, Vera Lúcia Lima pela disciplina, Chico pelo bom humor, Val pela alegria, Bruno Larrubia pela presteza e Alex pelo suporte logístico inestimável.

À CAPES e PUC-Rio, pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

À “Irmandade da Neurociência”, eternos amigos do mestrado: Ana Carolina Fioravanti com sua agitação contagiante, Fabiano por sua sutileza, Flavia Paes por sua força, Gisele Dias pelo apoio fundamental, Raquel Escocard pelo grande respeito, Renata por sua calma, Tânia Netto por seu companheirismo, Vitor de

Castro Gomes por sua ética e Woutter Hommes pela ajuda essencial. Obrigado a todos pela alegria, seriedade, discussão e trocas.

Aos meus grandes amigos aonde tudo se iniciou: Alexandre Rupert Skyrme, Daniel Mograbi , Fábio Pires Bento e Fábio Isaac Levi . Nunca irei esquecê-los.

A minha “irmã” companheira, compositora e pianista Clarice Assad e Família.

Ao meu grande “amor” por seu apoio fundamental, carinho, cuidado, paciência ao longo destes anos e a sua adorável família que me acolheu num momento decisivo.

Ao meu pai Délio Esteves Galvão, um exemplo a ser seguido. Uma admiração constante.

A minha mãe por participar da escolha que mudou a vida dela, e criou a minha.

Me gustaría agradecer al profesor Fernando Cardenas por su ayuda inestimable en el desarrollo y conceptualización de este trabajo.

Quisiera agradecer al profesor Silvio Morato por su gran hospitalidad al “adoptarme” en este momento crucial, por sus grandes ideas y por los buenos momentos en su laboratorio.

Adicionalmente, quisiera agradecer a todos los investigadores del laboratorio de Silvio por la gran ayuda que me brindaron, especialmente a Andrea Milena y Javier Rico por los consejos fundamentales y los debates teóricos.

Un gran abrazo para Andrés Uribe y Maria Angélica Castiblanco por el apoyo emocional. Nunca los olvidaré.

Resumo

Galvão, Bruno de Oliveira; Landeira-Fernandez, Jesus. **Avaliação Comportamental e Farmacológica da Relação entre Ansiedade e Pânico em Modelos Animais**. Rio de Janeiro, 2007, 64p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) é associada com comportamento defensivo e ataques de pânico em humanos. Estimulações elétricas ou farmacológicas da MCPD induzem a reações aversivas de corrida e pulo em ratos. Os resultados no experimento 1 indicaram que animais submetidos a um contexto previamente associado com choques nas patas, obtiveram um comportamento defensivo de congelamento robusto e tiveram menores reações defensivas de corridas e pulos através da microinjeção de de 0.3 µl N-metil-D-aspartato (NMDA; 15.0 mg/kg), quando comparado com o grupo controle que não foi exposto ao procedimento de medo ao contexto. No experimento 2, o efeito de injeções de pentilenotetrazol (PTZ; 15.0 mg/kg i.p.) em ratos microinjetados com NMDA nas reações de corridas e pulos foi investigado. Os resultados mostraram que o PTZ (1ml/100gr) foi capaz de minimizar as reações aversivas de corridas e pulos induzidas pela microinjeção de NMDA na MCPD. Esses resultados sugerem que a ativação de mecanismos cerebrais que permeiam a ansiedade produzem um efeito inibitório em ataques de pânico.

Palavras-Chave:

Ansiedade; Medo ao contexto; Comportamento Defensivo; NMDA; Ataque de Pânico; MCPD; PTZ

Abstract

Galvão, Bruno de Oliveira. Landeira-Fernandez. Jesus, **Behavioral and Pharmacological Evaluation Between Anxiety and Panic in Animals models**. Rio de Janeiro, 2007, 64p. MSc Dissertation – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The dorsal portion of the periaqueductal gray (DPAG) is notably associated with defensive behavior and panic attacks in humans. Electrical or pharmacological stimulation of the DPAG induces aversive reactions such as running and jumping in rats. Our results indicate that animals exposed to contextual cues, that were previously associated with electrical footshocks, engaged in robust defensive freezing behavior and were less likely to display running and jumping defensive reactions by microinjection of 0.3 μ l N-methyl-D-aspartate (NMDA; 15.0 mg/kg) into DPAG when compared with control animals that were not exposed to the context fear conditioning procedure. Furthermore the effect of pentylentetrazole injections (PTZ; 15.0 mg/kg i.p.) in microinjected NMDA rats in aversive reactions of running and jumping was investigated. The result showed that PTZ dose (1ml/100gr) was capable to minimize the aversive reactions of running and jumping induced by microinjection of NMDA into DPAG. These results suggest that activation of the brain mechanisms that underlie anxiety produces an inhibitory effect on panic attacks.

Keywords:

Anxiety; Context fear conditioning; Defensive behavior; NMDA; Panic attack; DPAG; PTZ

Sumário

1. Introdução	13
1.1. Sistema Motivacional de Defesa.....	13
1.2. Formas Clínicas de Manifestação da Ansiedade Patológica	15
1.3. Ansiedade e Modelos Animais	18
1.4. Modelo de Deakin e Graeff.....	21
2. Aspectos Históricos.....	23
2.1. Glutamato	23
2.2. GABA.....	24
2.3. Pentilenotetrazol.....	25
2.4. Benzodiazepínicos.....	28
3. Aspectos das Vias de Neurotransmissão.....	31
3.1. Vias Glutamatérgicas.....	31
3.2. Receptores Glutamatérgicos	33
3.3. Farmacologia dos Neurônios Glutamatérgicos	34
3.4. Vias Gabaérgicas	35
3.5. Receptores Gabaérgicos	38
3.6. Farmacologia dos Neurônios Gabaérgicos.....	39
3.7. Sistema GABA-Benzodiazepínico	40
4. Objetivos	42

5. Experimento 1	43
5.1. Materiais e Métodos	43
5.1.1. Animais	43
5.1.2. Equipamento.....	43
5.1.3. Drogas	44
5.1.4. Cirurgia	44
5.1. 5. Procedimento.....	44
5.2. Resultados Comportamentais	45
6. Experimento 2	47
6.1. Materiais e Métodos	47
6.1.1. Animais	47
6.1.2. Equipamento.....	47
6.1.3. Drogas	47
6.1.4. Cirurgia	47
6.1.5. Procedimento.....	48
6.2. Resultados Comportamentais	48
6.3. Análises Histológicas	50
6.4. Análises Estatísticas	51
7. Discussão.....	52
8. Referências Bibliográficas	56

Lista de Abreviaturas

BZD: benzodiazepínico

GABA: ácido aminobutírico

GAD: ácido glutâmico descarboxilase

MCP: matéria cinzenta periaquedutal

MCPD: matéria cinzenta periaquedutal dorsal

MCPV: matéria cinzenta periaquedutal ventral

NDR: núcleo dorsal da rafe

NMDA: N-metil-D-aspartato

PTZ: pentilenotetrazol

SNC: sistema nervoso central

SSDRs: species-specific defense reaction = reação de defesa específica da espécie

TAG: Transtorno de Ansiedade Generalizada

TBPS: t-butilbiciclofosforotionato

“I sit beside the fire and think
of all that I have seen,
of meadow-flowers and butterflies
in summers that have been;

Of yellow leaves and gossamer
in autumns that there were,
with morning mist and silver sun
and wind upon my hair.

I sit beside the fire and think
of how the world will be
when winter comes without a spring
that I shall never see.

For still there are so many things
that I have never seen:
in every wood in every spring
there is a different green.

I sit beside the fire and think
of people long ago,
and people who will see a world
that I shall never know.

But all the while I sit and think
of times there were before,
I listen for returning feet
and voices at the door.”

JRR Tolkien

1.

Introdução

1.1.

Sistema Motivacional de Defesa

Medo e ansiedade formam a primeira linha de defesa sendo ambos partes de um mecanismo de sobrevivência, fruto de todo um processo evolutivo, como se verificará a seguir, no andamento deste trabalho. O sistema tem as suas origens no mecanismo primordial de luta ou fuga localizado nas regiões mais primitivas do cérebro de animais (Kim e Gorman, 2005). Segundo Charles Darwin (1809-1882), dado o caráter evolutivo do comportamento emocional, a compreensão deste fenômeno no homem depende, em grande parte, do estudo do comportamento de outros animais.

Todas essas emoções são mediadas por reações comandadas pelo sistema nervoso autônomo, como sudorese emocional, palpitações, náuseas e sensação de vazio no estômago. Estas alterações fisiológicas preparam o sujeito para enfrentar a fonte de perigo de forma mais eficaz. Como veremos mais adiante, o estudo sobre as estruturas cerebrais responsáveis por tais respostas autonômicas são aspectos extremamente importantes para a compreensão dos transtornos de ansiedade.

Em seres humanos, a complexidade do fenômeno e a ambigüidade das descrições teóricas sobre a ansiedade justificam a carência de avaliações mais precisas sobre a circuitaria neural envolvida nestes processos. Numerosos esforços têm sido feitos na tentativa de definir operacionalmente e avaliar este constructo. A ansiedade é um estado emocional que faz parte do espectro normal das experiências humanas, sendo, em determinados níveis, propulsora do desempenho.

A lei de Yerkes-Dodson (Dractu e Lader, 1993) sugere que toda tarefa possui um ponto ótimo de ansiedade para que ela possa ser executada da melhor forma possível. Todavia, níveis exageradamente elevados de ansiedade

prejudicam a execução da tarefa, caracterizando-se assim o seu aspecto patológico.

A ansiedade passa então a ser patológica, quando seus níveis estão desproporcionais à situação que a desencadeia, ou quando não existe um objeto específico ao qual se direcione. Dentre os distúrbios emocionais conhecidos, os transtornos de ansiedade vêm afetando, em diferentes níveis, um grande número de indivíduos, fazendo da compreensão deste quadro um dos maiores desafios nos dias atuais.

Como característica mais marcante da ansiedade enquanto transtorno, apresenta-se a distorção da percepção, que ocasiona alterações do significado dos acontecimentos na vida do sujeito. Pode-se constatar, também, como sintoma de ansiedade o déficit de atenção, que acarreta prejuízos em relação à memória e ao aprendizado. Dentre a constelação de sintomas que compõe os transtornos de ansiedade, destaca-se o fato de que a ansiedade pode provocar confusões ou distorções da percepção, alterando o significado de acontecimentos registrados por uma pessoa. Os transtornos de ansiedade podem também interferir em processos de atenção, causando assim prejuízos de aprendizado e memória. Os sintomas característicos do transtorno de ansiedade podem ocorrer em três níveis: conscientes, comportamentais e fisiológicos. Dentre os sintomas conscientes, destacam-se o sentimento de ansiedade propriamente dito, sensações de apreensão, atenção constante, insônia e perda de concentração. A inquietação, caracterizada pela movimentação das mãos, pés ou qualquer outra parte do corpo, bem como andar de um lado para o outro, são características comportamentais da ansiedade. A emoção altera o foco da atenção para estímulos mais importantes do meio ambiente e evoca informações armazenadas na memória emocional. Dentre os sintomas comportamentais, estão também os tremores musculares e a reação de forma assustada (resposta de sobressalto). As emoções também produzem comportamentos expressivos, veiculando informações às outras pessoas e interpretações ocasionais sobre os mesmos. Finalmente, os sintomas fisiológicos podem-se apresentar através de intensa sudorese, palpitações e ou náuseas.

A ansiedade gerada prepara o sujeito, criando um meio ótimo para uma resposta efetiva e condizente com a demanda ambiental. Essa preparação envolve a organização da expressão facial, tonalidade da voz, tônus muscular, bem como um conjunto de outras respostas mediadas pelo nosso corpo. Outro distúrbio

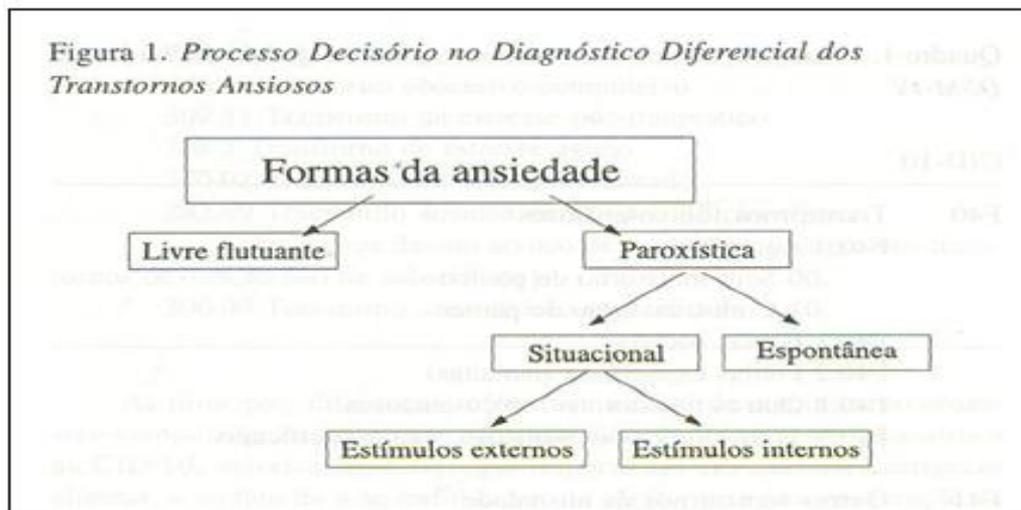
emocional de grande importância hoje é o transtorno do pânico. Ele se caracteriza por ataques recorrentes, que podem ocorrer espontaneamente ou associados a uma situação particular. Os ataques de pânico são definidos como episódios intensos de medo ou terror acompanhado por aceleração dos batimentos cardíacos, dores no peito, tonturas ou vertigens, náuseas, respiração curta, tremor, medo de morrer, suores frios, sentimentos de não-realidade, dormência, sensação de frio e calor, um sentimento de estar perdendo o controle, ou medo de enlouquecer (DSMIV, 1995). Este transtorno tem mostrado uma relação ambígua com a ansiedade.

1.2.

Formas Clínicas de Manifestação da Ansiedade Patológica

A ansiedade pode manifesta-se de duas formas: Episódica ou Tônica. Exemplos de estados tônicos é a chamada ansiedade generalizada e um exemplo mais típico dos episódicos é o transtorno de pânico. A ansiedade por sua vez pode estar associada a determinados eventos, situações ou objetos (chamada de situacional) ou podendo ocorrer de forma aparentemente imotivada (chamada espontânea).

A ansiedade patológica existe em várias condições, estando presente em momentos variados como doenças médicas, medicação ou drogas (psicoestimulantes), síndrome de abstinência (depressores do SNC como o álcool) e nos transtornos de ansiedade. Salienta-se que os transtornos de ansiedade não são os únicos quadros psiquiátricos que têm níveis patológicos de ansiedade. De um modo geral, esse quadro ansiogênico se manifesta em quase todas as formas de transtornos mentais. Hoje em dia, é classificado como transtorno de ansiedade aquele transtorno no qual a ansiedade diretamente observada ou manifesta é a principal manifestação sintomatológica. A figura 1 exemplifica o processo de decisão no diagnóstico diferencial dos transtornos de ansiedade.



Com relação aos quadros nos quais os sintomas ansiogênicos manifestam-se de modo paroxístico, se denomina ataque de pânico quando uma série de sintomas característicos (já citados anteriormente) surgem de forma súbita em menos de 10 minutos. O transtorno de pânico, por sua vez, nada mais é, do que uma forma de transtorno ansiogênico no qual aleatoriamente se repetem crises de pânico.

Ataques de pânico ou outras formas mais brandas de ansiedade paroxística podem se manifestar nas fobias (caracterizada por medo irracional de um objeto específico, de uma atividade ou situação que leva a um comportamento de esquiva ou evitação); contudo, de modo em geral, a ansiedade nesta condição é relacionada a um estímulo específico, sob a forma de ansiedade situacional.

No transtorno obsessivo compulsivo (TOC), a ansiedade surge de acordo com a exposição a estímulos internos específicos, denominados obsessões. Os pensamentos obsessivos são idéias e imagens que invadem a consciência do indivíduo de maneira repetida e estereotipada, causando um teor de sofrimento e mal estar. Em contrapartida, as compulsões são comportamentos voluntários, estereotipados, repetidos com a função de neutralização da ansiedade associada às obsessões. Em adição, a ansiedade manifestada de forma tônica, ou constante caracteriza-se como transtorno de ansiedade generalizada (TAG).

O quadro 1 lista as principais categorias diagnósticas das classificações atuais (DSMIV e CID-10), nas quais a ansiedade é a principal manifestação psicopatológica. Percebe-se que as diferenças principais referem-se ao fato do TOC estar num item separado dos demais transtornos de ansiedade no CID-10, e o fato de a agorafobia ter um caráter primário em relação ao transtorno de pânico.

Quadro 1. *Classificação dos Transtornos Ansiosos segundo a CID-10 e o DSM-IV*

CID-10

- F40 Transtornos fóbico-ansiosos
 F40.0 Agorafobia
 .00 Sem transtorno de pânico
 .01 Com transtorno de pânico
 F40.1 Fobias sociais
 F40.2 Fobias específicas (isoladas)
 F40.8 Outros transtornos fóbico-ansiosos
 F40.9 Transtorno fóbico-ansioso, não especificado
- F41 Outros transtornos de ansiedade
 F41.0 Transtorno de pânico (ansiedade paroxística episódica)
 F41.1 Transtorno de ansiedade generalizada
 F41.2 Transtorno misto de ansiedade e depressão
 F41.3 Outros transtornos mistos de ansiedade
 F41.8 Outros transtornos de ansiedade especificados
 F41.9 Transtorno de ansiedade, não especificado
- F42 Transtorno obsessivo-compulsivo
 F42.0 Predominantemente pensamentos obsessivos e rumações
 F42.1 Predominantemente atos compulsivos (rituais obsessivos)
 F42.2 Pensamentos e atos obsessivos mistos
 F42.8 Outros transtornos obsessivo-compulsivos
 F42.9 Transtorno obsessivo-compulsivo, não especificado
- F43 Reação a estresse grave
 F43.0 Reação aguda a estresse
 F43.1 Transtorno de estresse pós-traumático
 F43.2 Transtornos de ajustamento
 F43.22 Reação mista depressiva e ansiosa

DSM-IV

- 300.01 Transtorno de pânico sem agorafobia
 300.21 Transtorno de pânico com agorafobia
 300.22 Agorafobia sem histórico de transtorno de pânico
 300.29 Fobia específica

300.23 Fobia social
300.3 Transtorno obsessivo-compulsivo
309.81 Transtorno de estresse pós-traumático
308.3 Transtorno de estresse agudo
300.02 Transtorno ansioso generalizado
293.89 Transtorno ansioso devido a condição clínica
___ Ansiedade devido ao uso de substância [código dos transtornos devido ao uso de substâncias]
300.00 Transtorno ansioso não especificado

1.3.

Ansiedade e Modelos Animais

Apesar de a ansiedade constituir-se em um fenômeno tipicamente humano, é possível encontrar correlações entre essa emoção e respostas de defesa que os animais exibem frente a estímulos ou situações de perigo. Os animais, assim como os seres humanos, expressam o significado de suas emoções frente a situações de perigo através do comportamento que exibem (Sudre, Barros, Sudre e Schenberg, 1993; Schenberg *et al.*, 2000,2001; Vargas e Schenberg, 2000,2001) como *freezing*(congelamento), *activity burst*(corrida e salto), *galloping*, *trotting* são verificadas e expressam diretamente níveis de ansiedade frente a uma situação de perigo específico. Com os progressos recentes da neurociência, tem-se mostrado que a ansiedade e o medo têm suas raízes em sistemas neurais específicos e podem ser quantificados através de reações de defesa que animais apresentam frente a estímulos de perigo inato ou aprendido. Esses modelos animais podem ser utilizados para buscar compreender a relação entre os diferentes transtornos de ansiedade.

Conseqüentemente, diferentes modelos de animais têm sido empregados como poderosas ferramentas, com o objetivo de investigar e compreender os mecanismos envolvidos nos transtornos de ansiedade e transtorno do pânico. Através de comportamentos específicos de defesa animal, tem sido possível determinar circuitos neurais envolvidos nos diversos transtornos de ansiedade. Em particular, dois comportamentos de defesa com circuitos neurais específicos, podem ser utilizados como modelos para diferentes transtornos de ansiedade e em particular o transtorno de pânico (Graeff, 2003).

O primeiro, no qual o animal apresenta uma pronunciada postura de imobilidade, denominada congelamento, envolve a ativação da amígdala e da matéria cinzenta periaquedutal ventral (MCPV). O mau funcionamento deste sistema defensivo parece estar relacionado ao Transtorno de Ansiedade Generalizada. A MCPV está envolvida na resposta de congelamento que gradualmente aparece quando o animal é exposto a um estímulo aversivo condicionado (Landeira, Fanselow e Deoca, 1992). De acordo também com estes autores, a matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) está claramente associada com a resposta de defesa ativa estereotipada, e sua hiperativação parece esta relacionada com o transtorno do pânico.

A estimulação elétrica da MCPD em animais tem sido empregada há bastante tempo para um melhor entendimento do fenômeno do pânico. Verificou-se que, ao se fazer um aumento gradual da corrente elétrica para estimular a MCPD, produzia-se um comportamento de alerta, congelamento, e, num dado momento, resposta de corrida e salto. De fato, as estimulações elétricas da MCPD, que ocasionam respostas de fuga (Landeira, Fanselow e Deoca, 1992), proporcionam um dos modelos animais para o estudo do pânico. Este sistema está relacionado com formas vigorosas de comportamento ativo, como reações de fuga ou luta. Em humanos, a estimulação elétrica da MCPD também produz sintomas do pânico. Por outro lado, a resposta de congelamento ao contexto previamente associada com choques elétricos nas patas tem sido amplamente utilizada como um modelo animal de ansiedade (Conti, Maciver, Ferkany, e Abreu, 1990).

Bolles (1970), através da sua teoria Species-Specific Defense Reaction (SSDR), demonstra que o rato, de forma inata, determina comportamentos de defesa, como a resposta de congelamento ou luta, por exemplo. Quando o mesmo é confrontado com uma ameaça ambiental natural (um predador) ou uma ameaça ambiental artificial (choque nas patas), os seus comportamentos acabam por se delimitar somente aos SSDRs. Nestas situações é quase impossível o rato manifestar comportamentos que não se adequam aos esquemas da SSDRs. Contudo, o próprio animal teria uma flexibilidade de escolha comportamental dentro da SSDR a escolher. Parte-se do princípio de que o animal, através de uma abordagem adaptativa, irá selecionar, dentro de um seletivo repertório de ações, a melhor reação comportamental que confronte de forma adequada a ameaça em questão, e que tenha maior chance de sobrevivência. Este sistema de defesa tem

regras específicas que governam as reações comportamentais; essas regras autorizam mudanças de comportamentos de forma abrupta ou crescente, a partir do momento em que ocorram mudanças relevantes nas condições ambientais.

Panksepp (1982) propôs a circuitaria do medo cujo mecanismo evolutivo mais provável seria a redução da dor, autopreservação e sobrevivência. Sendo assim, a ansiedade é um produto de um sistema motivacional responsável pela organização de respostas específicas com objetivo de lidar de forma adequada às ameaças do meio externo. A partir dessa perspectiva, vários estudos têm definido a ansiedade, inclusive a ansiedade patológica, como componente essencial de um sistema neural que teve origem nos mamíferos, e desde então vem-se mantendo ao longo da evolução das espécies. Esse sistema é responsável pela detecção de estímulos de perigo no meio ambiente, bem como pela reação de forma adequada a esses estímulos que ameaçam a integridade do organismo (Fanselow, 1986 e 1994).

Fanselow e Lester (1988) propuseram, depois de observações laboratoriais, que o nível de medo teria uma importância maior na determinação de dado comportamento do que o próprio ambiente envolvido. Os mesmos sugeriram a existência de uma série de respostas comportamentais dadas pela presa diante de um perigo. Blanchard, Blanchard e Hori (1989) e Blanchard, Blanchard e Rogers (1990), por sua vez, fizeram um estudo etológico do comportamento do rato diante de situações com diferentes níveis de ameaça. De acordo com os estudos destes autores, sugeriu-se que as principais variáveis relevantes na magnitude da resposta comportamental de defesa seria a distância da presa com relação ao predador, alternativas de fuga-esquiva e a discriminação da fonte de perigo.

Adam (1979), Graeff (1981, 1991 e 1994), Fanselow (1991), Behbehani (1995) e Bittencourt, Carobrez, Zamprogno, Tufik e Schenberg (2004) sugerem que a matéria cinzenta periaquedutal (MCP), que se localiza ao longo do mesencéfalo, tem-se mostrado como uma área relevante no controle dos comportamentos de defesa. Graeff (1994) inclusive fez a relação do comportamento de luta-fuga com as emoções humanas de pânico e raiva pelo fato de estimulações elétricas desta estrutura em humanos provocarem comportamento de agressividade, relatos de total desconforto, hipertensão, medo, alterações endócrinas típicas de estresse (Sano *et al.*, 1970) e taquicardia. Como mencionado antes, e segundo Behbehani (1995), a estimulação da MCP produz reações de

defesa em humanos, tendo-se observado que a estimulação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal e dorsolateral produz comportamento aversivo em animais, enquanto em humanos produziu especificamente medo e ansiedade. Isto indica que esta região cerebral faz uma importante conexão com a circuitaria cerebral envolvida no processo de ansiedade e medo. Projeções sistemáticas da amígdala para a matéria cinzenta periaquedutal sugere que um estímulo relacionado ao perigo ativa um circuito específico na amígdala que se projeta para a MCP, ativando assim mecanismos da MCP que lidam com reações de defesa, analgesia e respostas autonômicas (Fanselow, 1991). De acordo com este modelo, avisos de perigo (presa avista o predador) ativam regiões da amígdala que se projetam para a matéria cinzenta periaquedutal ventral (MCPV) responsável pela resposta de congelamento (neurônios intrínsecos às porções caudais da MCPV são cruciais para o congelamento, a destruição química destas áreas atenua o congelamento segundo Kiernan e Cranney, 1992; Ledoux, Iwata, Chichetti e Reis, 1988), provando-se crucial também para a analgesia opiácea (Helmstetter e Landeira-Fernandez, 1990). Contudo, quando o animal encontra o perigo (predador pega a presa), uma circuitaria na amígdala que se projeta para a matéria cinzenta lateral é ativada. A ativação desta rede produz respostas de fuga associadas com vocalizações e respostas autonômicas (Behbehani, 1995). De acordo com este modelo, existe uma interação inibitória entre MCP ventral e lateral. Os resultados sugeriram então que a estimulação da MCP dorsal produziu fuga e respostas de defesa, e a estimulação da MCP ventral produziu congelamento.

1.4.

Modelo de Deakin e Graeff

Deakin e Graeff (1991) propuseram um modelo que formula a teoria do papel dual da 5-HT, postulando a existência de dois sistemas serotoninérgicos independentes que modulariam respostas comportamentais a estímulos aversivos agudos condicionados e incondicionados. Neste modelo, a amígdala, encarregada da avaliação do grau de perigo representado por estímulos e situações externas, seria responsável pela investigação cautelosa (Fanselow, 1991). O resultado desta interpretação seria, então, transmitido a MCPD, que, por sua vez, se encarregaria de programar e selecionar diferentes padrões comportamentais de defesa. A

inervação serotoninérgica chegaria até a amígdala e MCPD através de duas vias distintas provenientes do núcleo dorsal da rafe (NDR), respectivamente o trato prosencefálico medial e o trato periventricular.

Na MCPD, a 5-HT parece desempenhar uma função inibitória, impedindo a manifestação de padrões fixos de defesa ativa a estímulos aversivos inatos (luta e fuga), em situações onde o perigo é apenas potencial ou distal. Neste caso, a movimentação brusca do animal é indesejável, fazendo com que este fosse mais facilmente percebido pelo predador. Paralelamente, a 5-HT promove estratégias de defesa elaboradas, tais como a investigação cautelosa e o congelamento, mais adequadas a tais situações. Apenas quando o perigo se torna iminente, a estimulação da MCPD sobrepuja a inibição serotoninérgica, liberando comportamentos de fuga, já mais apropriados.

Para Deakin e Graeff (1991), estando o trato NDR-Amígdala relacionado à ansiedade condicionada e o NDR-MCPD à incondicionada, disfunções nestes dois sistemas resultariam naqueles quadros psicopatológicos já apresentados anteriormente: transtorno de ansiedade generalizada e transtorno do pânico. Este mecanismo explicaria, pelo menos em parte, evidências obtidas com a 5-HT no século passado. Contudo, a circuitaria neural que governa todas as funções da MCP não é de todo ainda entendida; de acordo com Behbehani (1995), um modelo baseado no entendimento já adquirido desta estrutura pode ser esboçado. De acordo com este modelo, existem cinco componentes que interagem dentro da MCP, que seriam: ansiedade-medo, vocalização, analgesia-dor, regulações autonômicas e comportamento sexual. Um componente de importância maior dentro deste modelo seria o de ansiedade-medo com uma influência na modulação da atividade dos demais componentes e tendo sua atividade modulada, por sua vez, pela circuitaria de analgesia-dor. A circuitaria de dor teria também uma importância na modulação de alguns componentes, como: ansiedade-medo, regulação autonômica e vocalização, que receberiam aferências de outros componentes. O mais importante dentro deste processo é que a interação entre o sistema da MCP não funciona de forma rígida, pois, dependendo de uma circunstância, um episódio de dor poderia ou não causar vocalização, medo ou ansiedade. Mais estudos devem ser feitos para elucidar ainda mais a circuitaria deste sistema.

2.

Aspectos Históricos

2.1.

Glutamato

Altas concentrações de glutamato no cérebro foram observadas na década de 30 gerando especulações sobre a importância do papel neurofisiológico deste aminoácido, e acabando por gerar uma série de pesquisas ao longo da década de 40.

A ação do glutamato no cérebro, nesta época foi considerada em termos metabólicos dada a associação do aminoácido com o ciclo de Krebs.

Há 56 anos (Weil-Malherbe, 1950), levantou-se a suspeita sobre a importância do glutamato nas funções cerebrais. Em adição, foi considerado naquela época a possibilidade do glutamato ser capaz de debelar com a coma hipoglicêmica, de ter efeitos anticonvulsivantes contra a epilepsia de *petit mal* além de ter a capacidade de desenvolver a cognição em caso de déficits mentais. Entretanto, tais considerações foram refutadas por estudos envolvendo mecanismos adrenérgicos (Weil-Malherbe, 1950; Waelsch, 1962).

A sugestão que o glutamato poderia ser de fato um transmissor sináptico no cérebro foi feita primeiramente por Hayashi, que se baseou na sua descoberta de 1954 (Hayashi, 1954 e 1956), para levantar esta hipótese. Com o desenvolvimento de novas técnicas começou a se investigar melhor a função de substâncias no sistema nervoso central (SNC) chegando-se a conclusão que dois neurotransmissores principais do sistema nervoso periférico, acetilcolina e noradrenalina, deveriam ter um papel menor de ação no SNC (Crossland, 1957).

No final da década de 50 (Curtis, Phillis e Watkins, 1959 e 1960), verificou-se que o glutamato tinha a capacidade de despolarizar e excitar neurônios individuais na medula espinhal de gatos, conseqüentemente, levantou-se a hipótese do mesmo ser de fato o principal neurotransmissor excitatório no SNC. Contudo, esta hipótese acabou sendo negada em alguns aspectos e por

vários argumentos teóricos (Curtis, Phillis e Watkins, 1960; Curtis, 1965), sendo a ação do glutamato como transmissor excitatório aceita apenas 20 anos depois.

Os principais avanços no entendimento do glutamato e suas funções ocorreu ao longo da década de 80 (Watkins, 1988), sendo que as conclusões mais importantes sobre os mecanismos de ação deste neurotransmissor foram postulados exatamente nesta época e divididos em três afirmativas: 1) O glutamato é predominantemente o neurotransmissor excitatório principal do SNC dos mamíferos; 2) medeia suas ações através de múltiplos receptores; 3) O mal funcionamento do glutamato na mediação da sinapse excitatória está provavelmente envolvido em certas desordens. Por conseqüência, os receptores de glutamato são alvos apropriados para intervenções terapêuticas em certas desordens (Watkins, 1988; Krogsgaard-Larsen, Hansen, 1992). Ainda na década de 80 verificou-se também que certos receptores de glutamato no cérebro mediavam mudanças bioquímicas que não foram susceptíveis a antagonistas de receptores NMDA e não-NMDA. Entretanto, essa dicotomia foi resolvida no início da década de 90 através de técnicas de biologia molecular que acabou por identificar duas famílias de receptores de glutamato: os ionotrópicos (iGLU) e os metabotrópicos (mGLU).

Devemos salientar que o desenvolvimento rápido de um aparato farmacológico assim como o avanço em técnicas de biologia molecular possibilitou o entendimento funcional de vários subtipos de receptores de glutamato e seus diferentes papéis na atividade sináptica(Collingridge e Watkins, 1994; Schoepp e Monn, 1999). Estudos mais recentes viabilizaram inclusive a identificação de subtipos iGLU e mGLU que participam numa gama de processos sinápticos incluindo a plasticidade sináptica (Jeffrey, Watkins e David E. Jane, 2006).

2.2.

GABA

Sintetizado em 1883, por muito tempo se achou que o GABA era produto do metabolismo de micróbios e plantas. Contudo, não antes de 1950, os investigadores identificaram o GABA como um constituinte normal do SNC de mamíferos. Leva-se em consideração o fato de que nenhum tecido dos mamíferos,

com exceção da retina, contenha mais do que um mero traço deste neurotransmissor.

O GABA foi identificado primeiramente como transmissor para a inibição de uma junção neuromuscular da perna de uma lagosta e desde a sua descoberta há 57 anos, diversas observações bioquímicas e neurofisiológicas foram feitas sobre o GABA no cérebro e suas vias de ação. Por se tratar de uma substância com uma presença rica no cérebro, levantou-se logo a hipótese de a mesma ter algum efeito fisiológico específico importante nas funções do SNC. Muita evidência acumulou-se ao longo dos anos, fundamentando que a função do GABA como principal neurotransmissor inibitório do cérebro também teria implicações na etiologia de transtornos neurológicos e psiquiátricos.

Como outros neurotransmissores, tanto o GABA quanto a sua enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD) têm uma distribuição não uniforme no cérebro. O GABA, por sua vez, foi descrito por Roberts e Awpara no início da década de 50 através de estudos eletrofisiológicos em neurônios que continham a enzima GAD, e somente depois de duas décadas que o mesmo foi classificado como neurotransmissor, por possuir os cinco critérios clássicos para se considerar uma substância, como neurotransmissor. Deve-se ressaltar que existem outras substâncias envolvidas na transmissão neuronal que seriam os neuromoduladores com a capacidade de influenciar a excitabilidade das células nervosas, apesar dos mesmos serem produzidos em locais não sinápticos. Os neuromoduladores foram descobertos por Florey em 1967. Florey acabou por identificar tanto o dióxido de carbono quanto a amônia como tendo proveniência de neurônios ativos ou da glia. Já os neuromediadores tinham, por sua vez, a função de ajudar na obtenção da resposta pós-sináptica ao transmissor.

2.3.

Pentilenotetrazol

O termo analéptico tem a sua origem no grego analeptikos significando a palavra “restaurativo”. Este termo, por sua vez, pode ser encontrado até hoje em dicionários atuais. Contudo, Wax (1997) relata que a literatura caracteriza os analépticos como convulsivantes. De fato, dando uma dose suficiente, os analépticos acabam por precipitar convulsões generalizadas. Os analépticos

trabalham através de uma série de mecanismos, incluindo o bloqueio de neurotransmissores inibitórios (picrotoxina, estriçnina) e aumentando a excitação (cocaína). O primeiro analéptico sintético criado foi o pentilenotetrazol (cardiazol, metrazol) em 1924. Historicamente, o pentilenotetrazol (PTZ) teve algumas utilizações terapêuticas; foi utilizado inicialmente como estimulante cardíaco e empregado como estimulante do SNC, no tratamento de overdose depressiva (sendo considerado menos efetivo que a picrotoxina e a estriçnina).

Especulações sobre a relação entre esquizofrenia e epilepsia permearam as pesquisas científicas ao longo da história por muito tempo. McCrae (2006) relata que o psiquiatra Gyula Nyiro observou em 1929 que epiléticos com traços psicóticos tornavam-se lúcidos em períodos de freqüentes espasmos; em 1930 Max Muller relatou dois casos de melhora na esquizofrenia após espasmos epiléticos.

McCrae (2006) relata que o polonês neurofisiologista e neuropsiquiatra Manfred Sakel utilizava a insulina para o tratamento de adictos de morfina. Sakel ficou intrigado ao observar pacientes que entravam em coma hipoglicêmica (excesso natural ou artificial de insulina), que anteriormente tinham alguma perturbação mental e ao final da sua recuperação tornavam-se tranqüilos. Sakel considerou que, induzindo a pessoa ao coma por meio da insulina, poderia ser um tratamento eficaz para pacientes com vários tipos de psicoses, particularmente a esquizofrenia. O mesmo obteve resultados surpreendentes e apoio para propagar a sua técnica. Em pouco tempo, ele criou aquilo que seria conhecido como a "Técnica de Sakel". A descoberta de Sakel foi um método fisiológico prático e efetivo para combater a mais debilitante e cruel das desordens psiquiátricas. A comunicação oficial desta técnica foi feita em setembro de 1933, e foi entusiasticamente recebida. Até então, nenhum tratamento biológico para esquizofrenia estava disponível. Este achado tornou-se uma das contribuições mais importantes feitas pela psiquiatria desde então.

Em 1933, no mesmo ano em que Sakel anunciou oficialmente seus resultados com a terapia por coma insulínico, o jovem psiquiatra Húngaro Ladislaus Von Meduna do Instituto de Pesquisa do Cérebro em Budapeste, após observar em autopsias diferenças neurológicas entre epiléticos e esquizofrênicos, postulou a teoria do antagonismo biológico destas condições. Em 1934, Meduna teve a idéia de induzir espasmos, utilizando um agente analéptico. Ele tinha a

proposta de que um espasmo epilético induzido artificialmente poderia curar a esquizofrenia. Meduna, então, acabou escolhendo a cânfora, um dos maiores agentes terapêuticos do séc. XIX, que, além de ter funções analgésicas, era um estimulante também. Contudo, tanto a composição quanto a velocidade de ação do óleo canforado foram inconsistentes, não atingindo os resultados esperados. O mesmo utilizou-se de outras drogas, injetando-as também intramuscularmente e continuando a obter resultados insatisfatórios. Dentre as drogas utilizadas, Meduna procurou na época uma que era produzida pela Knoll, com o nome comercial de cardiazol. O objetivo de Meduna se concretizou quando o mesmo utilizou injeções intravenosas de cardiazol em pacientes esquizofrênicos, obtendo resultados satisfatórios no tratamento deste tipo de desordem psiquiátrica. O mesmo comunicou seus dados à comunidade psiquiátrica em 1937 em Münsingen na Suíça, para discutir a terapia por choque pioneiramente iniciada por Sakel.

Conseqüentemente, dois terrenos sólidos para o tratamento da esquizofrenia foram criados em relação à terapia por choque fisiológico: o daqueles que defendiam a terapia insulínica e o daqueles que eram a favor das convulsões induzidas por cardiazol. O cardiazol era mais barato, mais fácil de usar e mais propenso a induzir convulsões. O coma por insulina requeria cinco a nove horas de hospitalização e um seguimento mais trabalhoso. Contudo, ela era facilmente controlada e terminada com injeções de adrenalina e glicose, se necessário. Por sua vez, o cardiazol era mais forte e mais difícil de controlar. A terapia por insulina causava poucos efeitos colaterais, enquanto que as convulsões por cardiazol eram às vezes tão severas que causavam fraturas espinhais. Contudo, em testes controlados, o cardiazol pareceu ser menos eficiente do que a insulina no tratamento da esquizofrenia, particularmente na doença crônica. Ele foi mais efetivo em tratar as psicoses afetivas, tais como o transtorno bipolar e depressão psicótica.

Meduna imigrou para Chicago(EUA) em 1939, e de lá ele continuou suas pesquisas sobre convulsões por cardiazol. Com o passar do tempo, a comunidade científica reconheceu que a teoria da incompatibilidade biológica entre convulsões e esquizofrenia não era verdadeira, mas que as convulsões provocadas artificialmente tiveram o seu valor para a psiquiatria. Devido à aparência de muitos métodos para tratar doenças mentais, incluindo neurolépticos e terapia

eletroconvulsiva (criada pelo neurologista italiano Ugo Cerletti), o cardiazol foi gradualmente descontinuado no final dos anos 40 e não mais utilizado. Atualmente, o mesmo é utilizado em estudos com animais de laboratório, envolvendo modelos de ansiedade.

Deve-se levar em consideração que os mecanismos moleculares por onde o pentilenotetrazol produz atividade convulsivante ainda não foram definidos (Ramanjaneyulu e Ticku, 1984). Em adição, as convulsões eliciadas pelo PTZ são diferentes das ocasionadas pela estricnina, mas similares às produzidas pela picrotoxina (Woodbury, 1980). Sabe-se, entretanto, que os receptores GABA-A possuem uma variedade de sítios de ação alostéricos (Huang, Bell-Horner, Dibas, Covey, Drewe e Dillon, 2001) por onde diferentes tipos de drogas podem atuar. Estudos anteriores mostraram que o PTZ inibe canais ativados pelo GABA (Macdonald e Barker, 1978) e sugeriu-se, no início, que o mesmo atuaria no sítio de ação dos benzodiazepínicos dos receptores GABA-A. Entretanto, estudos posteriores sobre os possíveis sítios de ações do PTZ sugeriram que o mesmo atue no sítio de ação da picrotoxina, um convulsivante que impede a abertura do canal de cloreto ao se combinar com ele, diminuindo a inibição promovida pelo GABA e ocorrendo assim um aumento na excitabilidade no SNC.

2.4.

Benzodiazepínicos

O descobridor dos benzodiazepínicos (BZDs) foi o químico Leo Henryk Sternbach que trabalhava para a empresa farmacêutica Hoffmann-La Roche. Sternbach obteve o seu diploma pela universidade de Krakow e trabalhou para La Roche na Basileia, localizada na Suíça.

Com o advento da segunda grande guerra, Sternbach acabou fugindo em 1941 para os EUA, escapando dos nazistas. O mesmo prosseguiu o seu trabalho com drogas, continuando a trabalhar para a La Roche em Nutley, Nova Jersey. Sternbach por sua vez sintetizou os primeiros BZDs em meados da década de 50. A denominação que estas drogas receberam foi pelo fato de sua estrutura consistir de um anel de benzeno fundido com um de sete membros de 1,4-diazepina.

Como ocorre com muitas descobertas científicas relevantes, no desenvolvimento do primeiro BZD houve a criação acidental de um elemento, o

clordiazepóxido, sintetizado por acaso, quando se percebeu que a estrutura originalmente atribuída à molécula havia mudado de maneira inesperada durante o processo de sintetização (Sternbach, 1979).

No final da década de 50, uma série de estudos com animais de laboratório foi realizado. O farmacologista norte-americano L. Randall, baseando-se nos estudos de Leo Henryk Sternbach, mostrou que o clordiazepóxido, um derivado dos compostos 1,4-benzodiazepínicos, apresentava nos animais um padrão de ação comportamental distinto da clorpromazina, podendo, em algumas situações, ser distinguido até de seus análogos (fenobarbital e meprobamato).

O clordiazepóxido tinha a capacidade de amansar animais bravios (ex: macacos extremamente agressivos), aliado a outros efeitos (anticolúlsivo além de baixa toxicidade) que o mesmo tinha no comportamento animal (Randall *et al.*, 1960).

L. Randall em virtude dos resultados obtidos na fase de experimentação pré-clínica em animais acabou sugerindo que o clordiazepóxido começasse a ser testado em humanos. O pesquisador alegava que essa droga tinha o potencial para servir como tratamento farmacológico em humanos, o que logo se confirmou nos numerosos ensaios clínicos.

As primeiras experiências clínicas que foram realizadas com pacientes esquizofrênicos acabaram por demonstrar que embora o clordiazepóxido não tivesse uma função antipsicótica, o mesmo acabou por reduzir de maneira significativa a ansiedade.

Em um estudo posterior com pacientes na época diagnosticados com neurose de angústia, e que hoje seriam diagnosticados como portadores do transtorno de ansiedade generalizada, obteve-se a comprovação que o clordiazepóxido era eficaz e que ele “possibilita o tratamento bem-sucedido de pacientes (com estados de ansiedade e tensão), muitos dos quais, até então, tinham-se mostrado refratários a todas as outras modalidades de tratamento” (Tobin *et al.*, 1960).

Após exaustivas avaliações clínicas o clordiazepóxido foi lançado em 1960 na clínica, apenas trinta meses depois de terem sido feitas as primeiras observações dos efeitos farmacológicos (relativa seletividade de efeitos, baixa toxicidade e menor capacidade para gerar dependência), os mesmos representaram um avanço considerável no tratamento farmacológico dos transtornos de

ansiedade, recebendo, conseqüentemente, a denominação de drogas ansiolíticas, nome adotado atualmente para a designação dos tranqüilizantes menores. Era o início do que foi chamado naquela década de “a revolução dos benzodiazepínicos”.

Ao logo dos primeiros quinze anos que se seguiram ao lançamento dos BZDs, ninguém sabia realmente como os mesmos funcionavam. Evidências indiretas da época relatavam por exemplo a interação dos BZDs com neurotransmissões colinérgicas, dopaminérgicas e serotoninérgicas. “Essas noções conflitantes de pouco serviram para estabelecer uma teoria simples, ampla e não-ambígua sobre os mecanismos de ação dessas drogas” (Doble, 1998).

Contudo, apesar de sua ampla difusão, apenas na década de 70 surgiu uma melhor compreensão do mecanismo de ação dos benzodiazepínicos. Em uma série de experiências sofisticadas conduzida por pesquisadores da Hoffman-La Roche na Basileia, eles conseguiram por suas vez demonstrar que os BZDs atuam para ampliar a transmissão gabaérgica (Polc *et al.*, 1974). Nos anos seguintes através de um esforço considerável nas pesquisas demonstrou-se que a potencialização das respostas do GABA pelo benzodiazepínico podia ser observada em todo o SNC (Haefely, 1978).

Através de uma série de estudos realizados com animais acabou-se por identificar um papel para o sistema gabaérgico, tanto na expressão quanto no aprendizado da ansiedade (Kalueff, 1997).

Hoje em dia continua a ser desenvolvido um volume considerável de atividades de pesquisa na área de atuação dos BZDs, nos seus mecanismos de ação, na forma e função do sistema gabaérgico. Esperamos que estes estudos resultem em novas descobertas de drogas que atuem no tratamento da ansiedade e de distúrbios relacionados, através da modulação do sistema gabaérgico tanto pelo receptor do BZD quanto por alguma outra parte do complexo receptor de GABA.

3.

Aspectos das Vias de Neurotransmissão

3.1.

Vias Glutamatérgicas

A Figura 2 mostra as vias glutamatérgicas no cérebro de forma clara. O glutamato é o principal neurotransmissor com atividade excitatória no SNC (Watkins, 2000) dos mamíferos, e, mesmo em quantidades pequenas, pode desencadear potenciais de ação. Uma das rotas glutamatérgicas mais longa tem a sua origem no córtex, e os seus axônios descem até fazerem ramificações na ponte e tronco cerebral, excitando assim neurônios motores atuantes numa variedade de músculos.

No tronco cerebral, esses axônios, por sua vez, seguem em direção à medula espinhal, podendo excitar neurônios motores ao longo de cada nível da espinhal dorsal, gerando, conseqüentemente, contração muscular. Outra rota é igualmente importante no controle do comportamento motor, tendo os seus corpos celulares origem também no córtex e projetando-se para o neocórtex.

Uma rota excitatória importante também se localiza entre o córtex e o tálamo. Nela, os neurônios excitam-se uns aos outros, ficando este circuito ativo enquanto uma atividade motora contínua estiver sendo executada. A excitação neuronal em questão deve parar para que a atividade pare e seja iniciada uma nova ação. De grande relevância é o fato de o hipocampo utilizar uma rota de glutamato, no qual os axônios projetam-se através do fórnix para chegar ao corpo mamilar. Um grande número de neurônios de glutamato têm corpos celulares no tronco cerebral (já mencionado acima) com projeções indo em direção ao cerebelo e envolvidos na coordenação motora, sendo que os axônios mais longos trocam informações entre os hemisférios (atravessam o corpo caloso) e entre os vários lobos de cada hemisfério.

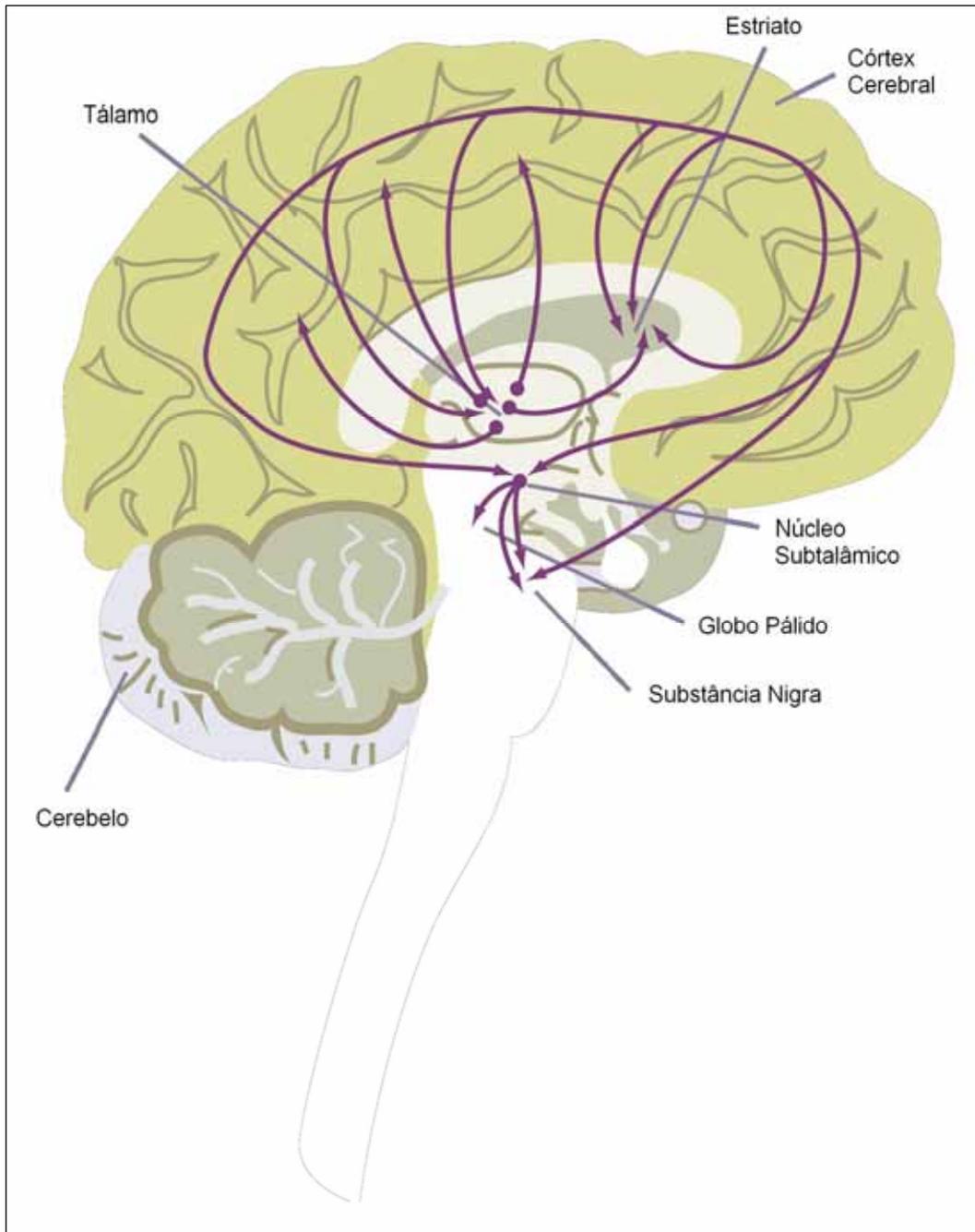


Figura 2. Vias Glutamatérgicas no cérebro

3.2.

Receptores Glutamatérgicos

Os receptores de glutamato participam de forma vital na mediação da sinapse excitatória. Este processo é a forma pela qual as células neuronais (neurônios) se comunicam entre si. Um pulso elétrico em uma célula causa um influxo de cálcio e, conseqüentemente, a saída de neurotransmissores (ex: glutamato). O neurotransmissor se difunde na fenda sináptica e estimula (ou inibe) a próxima célula que interage com as proteínas receptoras. A estrutura especializada que faz esta função vital é a sinapse; e de fato é dentro da sinapse que os receptores glutamatérgicos são geralmente encontrados. Segundo Bittencourt, Carobrez, Zamprogno, Tufik e Schenberg (2004), a MCP, por sua vez, é rica em glutamato, aspartato e receptores específicos. Leva-se em consideração que a matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPDL) apresenta a maior densidade destes receptores incluindo o ácido N-metil-D-Aspartato (NMDA).

Entre os receptores glutamatérgicos existem representantes tanto da superfamília de receptores iGLU quanto de receptores mGLU. Existem três classes ionotrópicas subdivididas em três grupos baseados na farmacologia e estrutura similar (NMDA, Cainato e AMPA) e os receptores metabotrópicos (ACPD e L-AP4).

O receptor NMDA é um importante receptor ionotrópico. No caso o cálcio flui através do canal e, conseqüentemente, ativa uma série de enzimas neuronais. Contudo, uma série de ações deve ser estabelecida antes que o canal abra e permita o cálcio de entrar: 1) Ligação do neurotransmissor glutamato; 2) Ligação de glicina; 3) Despolarização da membrana pós-sináptica. Leva-se em consideração que tanto o neurotransmissor de NMDA quanto a glicina devem se ligar simultaneamente aos receptores de NMDA. Os três fatores acima citados provocam então uma mudança na conformação alostérica do receptor, diminuindo a afinidade pelo magnésio que é deslocado, permitindo o fluxo de íons através do canal iônico. Leva-se em consideração que a ativação dos receptores NMDA é voltagem dependente e desencadeia influxo de Cálcio que aumenta a intensidade e prolonga a duração da despolarização neuronal pós-sináptica.

Clements (1987) mostrou que a MCP contém neurônios glutamatérgicos distribuídos heterogeneamente e que a maioria de suas células estão localizadas na MCPV e MCPD. De grande importância também foram os estudos topográficos do NMDA na MCP indicando que áreas como a matéria cinzenta periaquedutal ventro lateral (MCPVL), por exemplo, tem menores níveis deste neurotransmissor (Albin *et al.*, 1990., Gundlach 1991) se comparado com outras áreas, como, por exemplo, a MCPD, área de estudo de nosso presente trabalho.

A distinção entre os receptores ionotrópicos AMPA e Cainato é difícil e ainda não muito bem elucidada; os mesmos se localizam em regiões telencefálicas, mas verificou-se que ambos estão envolvidos na neurotransmissão excitatória rápida. Quando ativados, estes receptores induzem a uma despolarização rápida do neurônio pós-sináptico que tem a duração somente de alguns milissegundos.

O glutamato também se liga a receptores de natureza metabotrópica como já mencionado. Os receptores metabotrópicos têm a sua ação mediada por proteína G e como consequência acabam por inibir a adenil ciclase. Os receptores metabotrópicos ativam também certas enzimas que acabam por desativar os canais de cálcio ativados por voltagem no neurônio, desativando-os. Conseqüentemente, a liberação de neurotransmissores glutamatérgicos cessa e, conseqüentemente, ocorre uma diminuição na excitabilidade neuronal. Sendo assim, os receptores metabotrópicos realizam o oposto dos receptores de AMPA e Cainato. Pode-se encontrar também receptores metabotrópicos na pré-sinapse onde também têm o papel de diminuir a liberação de glutamato e com isso regular a excitabilidade.

3.3.

Farmacologia dos Neurônios Glutamatérgicos

De fato as ações excitatórias do glutamato são conhecidas desde os anos 50 (Hayashi , 1952; Curtis, Phillis e Watkins, 1959); experimentos que foram realizados ao longo dos anos têm comprovado o envolvimento com o desenvolvimento neural. Os neurônios glutamatérgicos de fato estão espalhados por todo o SNC e já demonstraram estar envolvidos em vários processos cerebrais, incluindo, por exemplo, aprendizagem, neurodegeneração aguda (Swan e Meldrum, 1990), neurodegeneração crônica (Hndy, Scott e Dodd, 2004),

transtornos de ansiedade (Meldrum, 2000) e depressão (Meldrum, 2000; Ottersen, Storm-Mathisen, 2000).

O glutamato atua no cérebro influenciando também na liberação de outros neurotransmissores, como, por exemplo, as monoaminas e o GABA. Evidências do envolvimento da MCPD no efeito de determinados compostos foram obtidas em um estudo no qual ocorreram microinjeções de um antagonista do sítio receptor de glicina na MCPD. Este antagonista, por sua vez, aboliu os efeitos ansiogênicos do pentilenotetrazol injetado intraperitonealmente. Contudo, as microinjeções de glicina na MCPD acabaram por reduzir os efeitos ansiolíticos do diazepam injetado via sistêmica, mostrando assim que a atividade excitatória do receptor glutamatérgico na MCPD poderia influenciar no efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos.

Existem vários agonistas e antagonistas para os diferentes sítios de ligação no receptor NMDA. Alguns sítios são de fato importantes para entendimento tanto da esquizofrenia em humanos quanto dos comportamentos defensivos em ratos.

3.4.

Vias Gabaérgicas

A Figura 3. mostra as vias gabaérgicas no cérebro de forma clara. O ácido aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor com atividade inibitória no SNC em vertebrados. O sistema gabaérgico está envolto em várias funções fisiológicas, alterações neurológicas e psiquiátricas.

As rotas do GABA são de fato longas e complexas, dentro do cérebro. Algo importante a se mencionar é que o hipocampo é uma estrutura rica em neurônios gabaérgicos (Kalluef e Nutt, 2006; Banks, White e Pearce, 2000). Sendo assim, devemos mencionar que a atuação já consagrada do hipocampo, no processo da memória, e da mesma, na ansiedade e depressão, faz com que pensemos em uma correlação entre a patogenia da ansiedade e depressão com o funcionamento gabaérgico ligado à memória no hipocampo (Kalluef e Nutt,2006). Devemos mencionar também que as mudanças cerebrais modificam o metabolismo e a morfologia associados à depressão maior encontrada na amígdala, estrutura rica em conexões gabaérgicas e associada à ansiedade. A

amígdala, por sua vez, está envolvida também no armazenamento das memórias aversivas (Kalluef e Nutt, 2006; Drevets, 1999; Sheline, 2003).

De fato, existe uma quantidade enorme de pequenos neurônios (interneurônios) espalhados ao longo do córtex com a função de inibição neuronal, mantendo assim um controle melhor do nível de excitação neuronal. O córtex pré-frontal, tradicionalmente ligado à memória e funções cognitivas superiores, também está envolvido no circuito de ansiedade, e, através de certos testes que simulavam várias desordens ansiogênicas, verificou-se a excitação desta área cerebral (Davidson, 2002).

Uma via gabaérgica importante começa no neocórtex, terminando no globo pálido interno. Os axônios desta área fazem sinapses com outros corpos celulares gabaérgicos no próprio globo pálido interno que se projetam para o tálamo. Temos também projeções gabaérgicas que saem do neocórtex indo em direção ao globo pálido externo, núcleo subtalâmico e substância negra reticulada. Da substância negra reticulada, as vias gabaérgicas vão para três áreas principais que seriam o colículo superior (importantes para movimentos oculares), núcleo pedunculopontino (ajuda no controle parcial dos músculos do tronco) e tálamo (ligado à circuitaria motora). Leva-se em consideração que a substância negra reticulada tem a função de liberar neurotransmissores GABA para as áreas citadas acima, inibindo seus neurônios.

Uma área de extrema importância também e rica em conexões gabaérgicas (Kalluef e Nutt, 2006; Bueno *et al.*, 2005) é o mesencéfalo medial. Sugere-se que o mesmo esteja envolvido na patogênese dos transtornos de ansiedade e depressão (Kalluef e Nutt, 2006; Brandão *et al.*, 2003; Graeff *et al.*, 1993).

De fato, é relevante mencionar que a MCP é também rica em conexões que envolvem neurônios gabaérgicos (Reichling e Basbaum, 1990; Reichling, 1991; Williams e Beitz 1990). Em adição, podemos dizer também que a própria MCP contém receptores de GABA e BZD (Mennini e Gobbi, 1990) e que o envolvimento das vias gabaérgicas na MCP com relação à ansiedade e ao comportamento de fuga já foi demonstrado em estudos comportamentais com animais em laboratório (Gomita *et al.*, 1991).

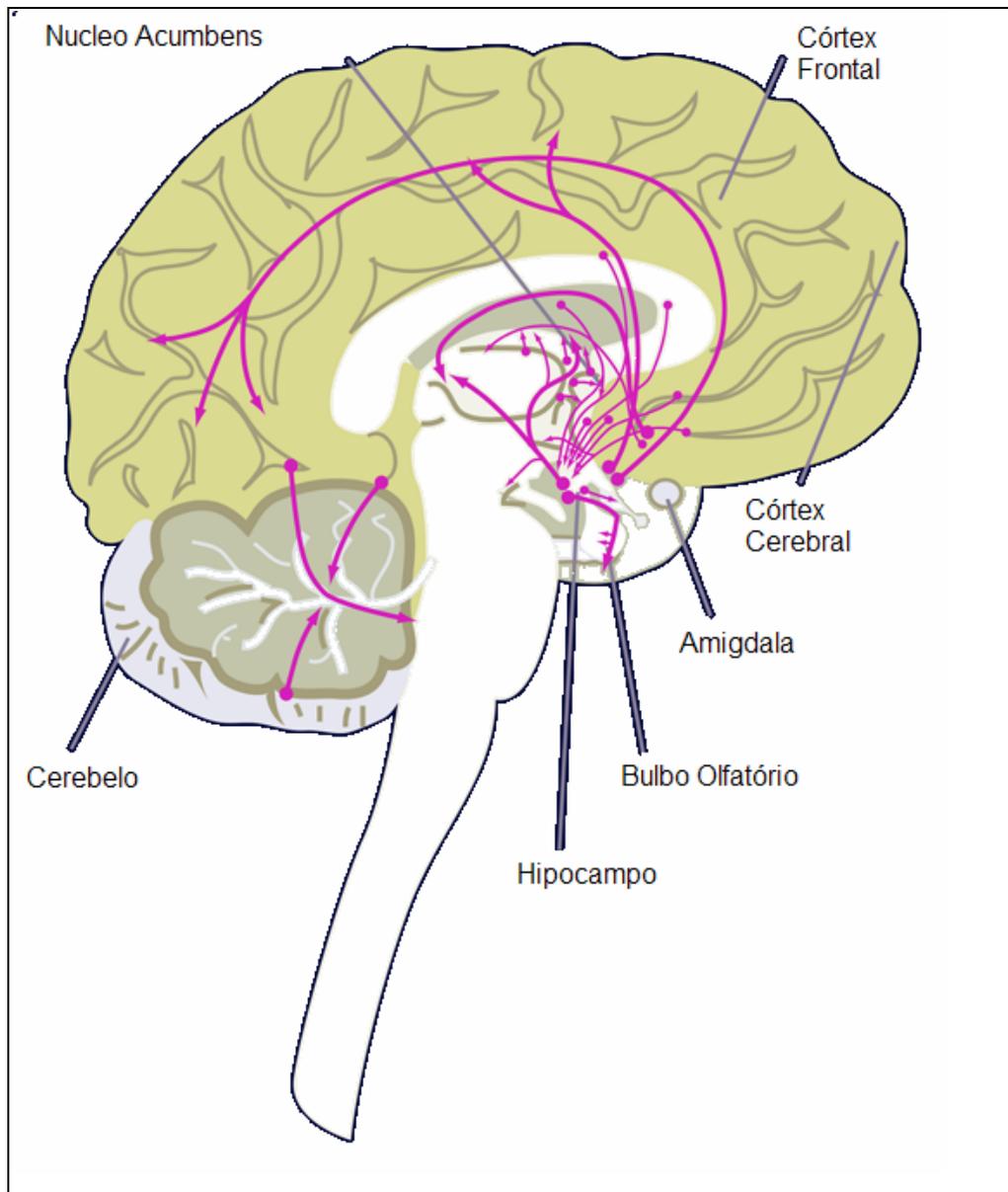


Figura 3. Vias Gabaérgicas no cérebro

3.5.

Receptores Gabaérgicos

Nos vertebrados, os receptores GABA são encontrados primeiramente nas membranas de células nervosas e, de forma eficaz, estão praticamente espalhados por todos os neurônios do SNC. Contudo, os receptores gabaérgicos não estão exclusivamente associados com neurônios. Eles se expressam também nos astrócitos. Por sua vez, os receptores gabaérgicos aparentam estar envolvidos na regulação dos canais de cloro. Leva-se em consideração que os receptores de GABA também são encontrados fora do SNC em neurônios relacionados ao sistema nervoso autônomo.

Nos vertebrados existem dois tipos de receptores de GABA: receptores ionotrópicos GABA-A (canal permeável de íon cloro Cl^-) e receptores metabotrópicos GABA-B (acoplado a proteína G que regula a atividade dos canais de potássio e cálcio).

No início, esses receptores foram subdivididos nesses dois grupos tendo por base evidências farmacológicas. Entretanto, a separação funcional se estendeu para os mecanismos de segundo mensageiro, diferença na localização destes subtipos de receptores no SNC dos mamíferos e sua composição molecular. Soma-se o fato de que ambos os subtipos de receptores têm localizações pré e pós-sinápticas e participam de forma independente na transmissão sináptica.

Acredita-se que este mesmo neurotransmissor esteja envolvido na mediação ansiolítica, sedativa, anticonvulsivante e de relaxamento muscular. O receptor GABA-A pertence a uma grande família de canais iônicos ativados por neurotransmissor que apresenta uma similaridade estrutural com outras proteínas receptoras, como o receptor colinérgico nicotínico. Esses mesmos receptores ionotrópicos são complexos protéicos formados por 5 unidades que podem pertencer a 8 subclasses diferentes. Sua ativação resulta em um aumento do tempo médio de abertura do canal de cloro. A entrada desse ânion através do canal leva a uma hiperpolarização do neurônio pós-sináptico diminuindo a possibilidade de disparo.

Na estrutura do receptor GABA-A identificam-se também vários sítios de união para diferentes compostos que podem modular sua atividade. A picrotoxina e o t-butilbiciclofosforotionato (TBPS) são agentes convulsivantes que

compartilham um sítio de ação em um canal do receptor GABA-A. São antagonistas não competitivos que atuam bloqueando o canal de cloro, provocando uma diminuição do tempo de abertura.

Os receptores GABA-B metabotrópicos, como mencionado acima, estão presentes em quantidades pequenas no SNC; e de forma diferente dos receptores GABA-A ionotrópicos que estão associados a um canal de cloro, os receptores GABA-B estão ligados aos canais de cálcio (diminuição de sua condutância) e potássio (abertura destes canais) via segundo mensageiro além de inibir a adenil ciclase. A ação inibitória (hiperpolarização) dos receptores GABA-B parece estar mediada pelo aumento na condutância do potássio ou no decréscimo da condutância do cálcio. De fato, é importante ressaltar que os mesmos não são modulados por barbitúricos e nem por benzodiazepínicos. Estudos farmacológicos demonstraram que o bloqueio dos receptores GABA-B não produziram mudanças comportamentais relevantes como as observadas com a administração de antagonistas do receptor GABA-A. Acrescenta-se o fato de que o receptor GABA-B tem a função de atenuar a liberação da acetilcolina, amina biogênica, aminoácidos excitatórios, o próprio GABA, além de outras substâncias. Leva-se em conta que tanto os receptores GABA-B quanto o GABA-A demonstraram que estão envolvidos na regulação de vários mecanismos normais e patológicos do cérebro, que incluem sono, memória, epilepsia, além de outras funções (Kalueff e Nutt, 2006; Kalueff e Nutt, 1996; Kalueff., 2007; Leung e Xue, 2003; Vaiva *et al.*, 2004).

3.6.

Farmacologia dos Neurônios Gabaérgicos

De fato, as drogas podem influenciar as funções gabaérgicas interagindo de forma diferente, tanto em sítios pré como pós-sinápticos.

As drogas podem influenciar eventos pré-sinápticos que ocorrem assim como a quantidade de GABA que faz interação com os receptores pós-sinápticos gabaérgicos. Na maioria dos casos, os efeitos das drogas pré-sinápticas não envolvem interação com receptores gabaérgicos.

Estudos sobre a ação das drogas nos sítios pré-sinápticos envolvem o efeito inibitório sobre as enzimas envolvidas na síntese do GABA, em sua degradação e na recaptação neuronal do próprio GABA.

Uma ênfase é dada nos estudos da interação das drogas com os receptores gabaérgicos. Este tipo de droga pode ser classificada em duas categorias gerais: Antagonistas de GABA e Agonistas de GABA.

A ação do GABA em seu complexo pode ser feita por antagonistas de GABA de maneira direta através da competição com o GABA pelos seus receptores ou de forma indireta através da modificação do seu receptor. Os dois antagonistas clássicos são a bicuculina e a picrotoxina que atua por meios diferentes. A bicuculina por exemplo, atua como uma antagonista direto de GABA direto no receptor, enquanto a picrotoxina atua como um antagonista não competitivo de GABA junto com o pentilenotetrazol pelo fato de ambos bloquearem os canais de cloreto.

Estudos neuroquímicos indicaram que os BZDs acentuam a ação do GABA em nível pós-sináptico. Como sabemos, o receptor de GABA está acoplado a um canal de cloreto associado a um receptor benzodiazepínico.

Num estado conformacional de baixa afinidade, o receptor de GABA está liberado e o canal de cloreto fechado. A membrana celular é normalmente impermeável aos íons de cloreto. Quando os canais de cloreto se abrem, os íons de cloreto flutuam para dentro da célula. A combinação do GABA com o seu receptor acaba por resultar na abertura dos canais de cloreto e, conseqüentemente, a entrada dos íons, tendo assim uma hiperpolarização da membrana pós-sináptica. A ação farmacológica do BZDs seria exatamente de induzir uma alteração na macromolécula receptora, fazendo um aumento na afinidade dos receptores do tipo GABA-A pelo neurotransmissor e, conseqüentemente, facilitando a ação gabaérgica.

3.7.

Sistema GABA-Benzodiazepínico

A importância do papel do GABA na ansiedade é sustentado fortemente pelo fato da eficácia dos benzodiazepínicos na diminuição da ansiedade, inclusive no TAG.

De fato, estudos anteriores demonstraram a presença de receptores BZDs no SNC corroborando com a hipótese de que existiriam substâncias endógenas que atuariam diretamente sobre eles, fazendo uma regulação nos estados de ansiedade normais e patológicos. Pesquisas feitas sugeriram também candidatos a ligantes naturais dos receptores BZDs isolando-os nos cérebros de mamíferos, inclusive no de humanos (Graeff, 1997b).

Os receptores BZDs e o GABA estão distribuídos de forma ampla pelo SNC exercendo influência em vários sistemas neuronais diferentes. Torna-se relevante então delimitar-se quais sistemas neuronais GABA-BZD participariam na regulação da ansiedade. Por exemplo, no caso de um efeito ansiolítico, as evidências apontam para a amígdala. Sugere-se que o sistema GABA-BZD da amígdala regule a ansiedade e a memória emocional (Graeff, 1997a ; Davis, 1997; Tomaz *et al.*, 1993).

A amígdala por sua vez parece estar relacionada com o medo condicionado e, na patologia, com o TAG, que é por sua vez suscetível aos medicamentos BZDs (Davis, 1997; Viana *et al.*, 1997). Enquanto que a MCPD estaria envolvida no medo incondicionado e no transtorno de pânico. Essa região possui um número bem menor de receptores BZDs quando comparada a amígdala. Sugere-se então que a MCPD possa ser uma área de ação de compostos BZDs potentes e eficazes no transtorno de pânico quando aplicado em doses elevadas e por períodos prolongados (Graeff, 1997a ; Graeff *et al.*, 1993; Russo *et al.*, 1993).

Em razão da observação dos dados de resposta clínica medicamentosa aos BZDs, vários grupos de pesquisa estudam de forma cuidadosa, anormalidades nos receptores BZDs em sujeitos com diagnóstico de transtorno de pânico (Goddard e Charney, 1997). Dados complementares de alguns pesquisadores levaram os mesmos a formular hipóteses de que haja uma disfunção dos receptores GABA em pacientes com transtorno de ansiedade, embora não exista nenhuma prova direta desta correlação. De fato o antagonista BZD, flumazenil, causa ataques de pânico severos em pacientes com transtorno de pânico mostrando um exemplo de como poderia ser dar esta disfunção (Kaplan *et al.*, 1994).

Outras evidências sugerem que os receptores BZDs periféricos também estejam implicados nos demais transtornos de ansiedade podendo ter grande chance de envolvimento na regulação da resposta de estresse.

4.

Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi o de investigar a relação entre a ansiedade e a ocorrência de ataques do pânico. Evidências clínico-farmacológicas mostram um grande isoformismo entre as respostas de fuga em ratos induzidas através da estimulação da MCPD e os ataques de pânico em humanos. Drogas panicolíticas, como a clomipramina e a fluoxetina aumentam o limiar de corrente elétrica que elicia os comportamentos de corrida e salto, enquanto drogas ansiogênicas e panicogênicas (em doses elevadas), como o pentilenotetrazol, diminuem esse limiar. Por outro lado, a modulação da ansiedade pelo receptor benzodiazepínico tem sido empregada para validar o paradigma do medo contextual como um modelo de ansiedade em roedores. Agonistas BZD, diazepam ou midazolam, reduzem a quantidade de congelamento eliciada pelo contexto previamente associado com choques nas patas.

Este trabalho se predispôs a replicar os resultados obtidos na dissertação de mestrado de Valeska Magierek (*Efeito do condicionamento contextual de medo sobre a reação de defesa produzida pela estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal em rato./ Valeska Magierek. – São Paulo, 2003*). Os dados deste experimento indicaram que o condicionamento contextual de medo induziu a um comportamento de congelamento que inibiu a fuga evocada pela estimulação elétrica da MCPD, o que implicaria na relação inversamente proporcional entre ansiedade e pânico. Estes resultados sugerem que a circuitaria neural envolvida na ansiedade poderia inibir a atividade da circuitaria envolvida nas respostas de fuga.

Utilizou-se, no presente trabalho, uma estimulação química para eliciar os comportamentos de fuga. Investigamos a relação entre ansiedade e ataques do pânico através da influencia do condicionamento contextual de medo sobre a resposta de fuga induzida pela microinjeção de NMDA na MCPD (experimento 1) e, num segundo momento, investigamos a relação de ansiedade e ataques do pânico através da influência do pentilenotetrazol e a resposta de fuga induzida pela microinjeção de NMDA na MCPD (experimento2).

5.

Experimento1: Efeito do condicionamento contextual de medo na resposta de pulos e corridas induzida pela microinjeção de NMDA na matéria cinzenta periaquedutal dorsal

5.1.

Materiais e Métodos

5.1.1.

Animais

Foram utilizados 26 ratos albinos machos, experimentalmente ingênuos em torno de 3 a 4 meses de idade pesando 250-300 gr foram utilizados como sujeitos experimentais. Uma semana antes do início do experimento, todos os animais foram manuseados uma vez por dia. A temperatura ambiente do biotério foi mantida em torno de 22° C. As luzes do biotério foram mantidas num intervalo de 12 horas iluminado por 12 horas de escuro. Os treinos e testes ocorreram durante o período iluminado do ciclo. Os experimentos foram todos conduzidos segundo as normas da SBNeC (Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento).

5.1.2.

Equipamento

Foi utilizado o campo aberto com a função de quantificar as respostas de saltos e corridas emitidas pelo animal através da ação do NMDA na MCPD; utilizou-se também uma grade de choque randomizada localizada no próprio campo aberto para induzir choques nas patas, para elevação da ansiedade do animal e para o condicionamento de medo ao contexto. O comportamento dos animais foi observado através de um sistema de câmera interna, suas imagens passadas e gravadas diretamente no computador. Para microinjeção foi utilizada uma seringa Hamilton de 5.0 µl, tubo de polietileno (PE50 e PE10) para condução do NMDA e uma agulha gengival (13.5mm) para ser introduzida na cânula guia.

5.1.3.

Drogas

Foi utilizado o pentilenotetrazol (*Sigma, USA*). Antes da injeção, o PTZ foi diluído em água destilada e injetado intraperitonealmente (i.p.) e NMDA (*Sigma, St. Louis, USA*).

5.1.4.

Cirurgia

Cada animal foi anestesiado com tribromoetanol intraperitonealmente na concentração de 25 mg/kg, recebendo uma associação antibiótica de largo espectro (Pentabiotico, Foutoura-Wyeth-Brasil), 0.2ml intramuscular, a fim de prevenir possíveis infecções. Após a anestesia, os animais foram afixados em um aparelho exteriorotáxico (*Harvard Apparatus*). Uma assepsia local com álcool iodado, seguido de anestesia subcutânea local (lidocaina) foi ministrada, o calvário exposto e o periósteo removido com auxílio de tesoura e pinça. Uma solução de água oxigenada seguida de aquecimento por um secador de cabelo comum facilitou a visualização de lambda. Com o crânio fixo na horizontal, usando o ponto interaural como referência (Paxinos e Watson.,1986) , a cânula guia era inserida na MCPD (AP = +2.3 mm; DV = -4.5 mm e ML = -1.7 mm). Uma cânula guia com o comprimento de 12,5 mm foi afixada ao crânio com acrílico dental. Para a microinjeção foi utilizada uma agulha gengival cujo comprimento foi 1 mm maior do que aquele da cânula guia.

5.1.5.

Procedimento

Os ratos foram submetidos a cirurgia para o implante da cânula e depois de seis dias eram divididos em quatro grupos (choque – salina; choque – NMDA; não choque – salina; não choque – NMDA) e treinados na caixa de condicionamento ao contexto. Durante a fase de condicionamento do medo ao contexto, os animais eram colocados em uma caixa de condicionamento, e, depois de dez minutos de habituação, se dava início à apresentação dos estímulos

aversivos, consistentes em quatro choques (1.0 mA, 1s), com intervalo de vinte segundos entre cada choque.

Depois do condicionamento, os ratos eram deixados por 6 horas na gaiola habitat. Passado esse período, dava-se início à segunda fase, na qual era realizada a microinjeção (0.3 μ l) de NMDA (15mg/kg) ou salina. Imediatamente após a aplicação, os sujeitos eram colocados na caixa de condicionamento e suas respostas de fuga (número e tempo de corridas e número de pulos) eram registradas, utilizando uma câmera.

5.2.

Resultados Comportamentais

-Frequência de corridas

A Tabela 1. ilustra, de forma clara, a mediana dos resultados obtidos nos comportamentos de correr e pular dos ratos tratados. O teste de *Kruskal-Wallis* mostrou uma diferença geral entre os grupos, $H(3) = 15,0$; $P = 0,002$ para frequência de corrida. O teste de Mann Whitney mostrou que os ratos tratados com NMDA correram mais que os ratos que receberam injeção de salina. O mesmo teste também mostrou que os sujeitos submetidos ao condicionamento correram menos que os ratos que não foram submetidos. Finalmente, o teste mostrou que os ratos que foram tratados com NMDA e que receberam o condicionamento correram menos que os ratos que foram submetidos ao mesmo tratamento, mas não receberam o condicionamento ($P < 0,05$).

-Tempo de corridas

O teste *Kruskal-Wallis* mostrou uma diferença geral no tempo de corrida entre os grupos, $H(3) = 15,0$; $P = 0,002$.

-Frequência de pulos

O teste de *Kruskal-Wallis* mostrou uma diferença geral na frequência de pulos entre os grupos, $H(3) = 10,77$; $P = 0,013$.

Tabela 1. Mediana dos comportamentos de correr e pular de ratos tratados com injeção intracerebral de NMDA (0,3 µl) e salina (0,3 µl).

Tratamento	Condicionamento ao contexto	
	Ausente	Presente
Frequência de corridas		
Salina Intracerebral	0,0 (0-0)	0,0 (0,0)
NMDA Intracerebral	1,5 (0-6)	0,0 (0-0)
Frequência de pulos		
Salina Intracerebral	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)
NMDA Intracerebral	3,5 (0-25)	0,0 (0-7)
Tempo gasto correndo (s)		
Salina Intracerebral	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)
NMDA Intracerebral	9,5 (0-68)	0,0 (0-0)

6.

Experimento2: Efeito do pentilenotetrazol na resposta de pulos e corridas induzida pela microinjeção de NMDA na matéria cinzenta periaquedutal dorsal

6.1.

Materiais e Métodos

6.1.1.

Animais

Conforme descrito no experimento 1.

6.1.2.

Equipamento

Foi utilizado o campo aberto com a função de quantificar as respostas de saltos e corridas emitidas pelo animal através da ação do NMDA na MCPD; para elevação da ansiedade no animal foi utilizado o pentilenotetrazol. O comportamento dos animais foi observado através de um sistema de câmera interna, suas imagens passadas e gravadas diretamente no computador. Para microinjeção foi utilizada uma seringa Hamilton de 5.0 µl, tubo de polietileno (PE50 e PE10) para condução do NMDA e uma agulha gengival (13.5mm) para ser introduzida na cânula guia.

6.1.3.

Drogas

Foi utilizado o pentilenotetrazol (*Sigma, USA*). Antes da injeção, o PTZ foi diluído em água destilada e injetado intraperitonealmente (15.0 mg/kg i.p.) e NMDA (*Sigma, St. Louis, USA*).

6.1.4.

Cirurgia

Conforme descrito no Experimento 1.

6.1.5.

Procedimento

Os ratos já submetidos à cirurgia para o implante da cânula, depois de 5 dias de recuperação cirúrgica, foram divididos em 2 subgrupos (Salina – NMDA; PTZ - NMDA) . Um subgrupo de animais foi o grupo controle e recebeu uma solução salina (0,9%), ministrada intraperitonealmente, enquanto o segundo subgrupo também receberia da mesma forma o pentilenotetrazol (PTZ; 15.0 mg/kg i.p.). Os animais, antes do início do experimento, foram colocados em gaiolas habitat individuais para inoculação da droga citada acima (os animais foram injetados com PTZ 5 minutos antes da exposição ao campo aberto). Somente depois deste tempo os mesmos foram colocados no campo aberto e microinjetados com NMDA na MCPD onde permaneceram por 30 min, e seus comportamentos de corridas e saltos verificados.

6.2.

Resultados Comportamentais

-Frequência de corridas

A tabela 2. ilustra os resultados do experimento 2. O teste de *Mann whitney* mostrou diferenças significantes no número de corridas ($U = 21$; $P = 0,001$) entre o grupo Salina-NMDA e grupo PTZ-NMDA. A quantidade de corridas do grupo salina-NMDA foi superior ao do grupo PTZ-NMDA.

-Tempo de corridas

O teste de *Mann whitney* mostrou diferenças significantes no tempo de corrida ($U = 7,5$; $P < 0,001$) entre o grupo Salina-NMDA e grupo PTZ-NMDA. O tempo de corrida do grupo Salina-NMDA foi superior ao do grupo PTZ-NMDA.

-Frequência de pulos

O teste de *Mann whitney* mostrou diferenças significantes no número de pulos ($U = 25$; $P = 0,002$) entre o grupo Salina-NMDA e PTZ-NMDA. O número de pulos do grupo Salina-NMDA foi superior ao do grupo PTZ-NMDA.

Tabela 2. Mediana dos comportamentos de correr e pular de ratos tratados com injeção intracerebral de NMDA (0,3 µl) e pentilenotetrazol intraperitoneal (15.0 mg/kg i.p.).

Tratamento	Salina	Pentilenotetrazol
Frequência de corridas		
NMDA Intracerebral	3,0 (0-7)	0,0 (0-4)
Frequência de pulos		
NMDA Intracerebral	5,5 (0-25)	0,0 (0-3)
Tempo gasto correndo (s)		
NMDA Intracerebral	20,0 (0-71)	0,0 (0-6)

6.3.

Análises Histológicas

A Figura 4 mostra com clareza as áreas microinjetadas nos dois experimentos. Ao final dos experimentos, os animais receberam uma overdose de Thiopenal Sódico, foram perfundidos intracardiamente com a utilização de solução salina (0,9%) seguida de formalina (4%). Antes da remoção dos cérebros, o local da microinjeção foi marcado com a aplicação local de azul de metileno. Depois da remoção, foram colocados numa solução de formalina e sacarose por três dias e cortados em secções coronais de 40 µm utilizando um criostato. Os cortes foram preparados em lâminas de microscopia e colorados com cresyl violeta. A localização do local preciso da injeção foi avaliada com o auxílio de uma lupa. A análise histológica indicou que as cânulas estavam localizadas dentro ou nas bordas da MCPD. Os ratos que apresentaram cânulas em outras localizações foram descartados de ambos os experimentos (Exp1 - 75 animais descartados; Exp2 - 85 animais descartados).

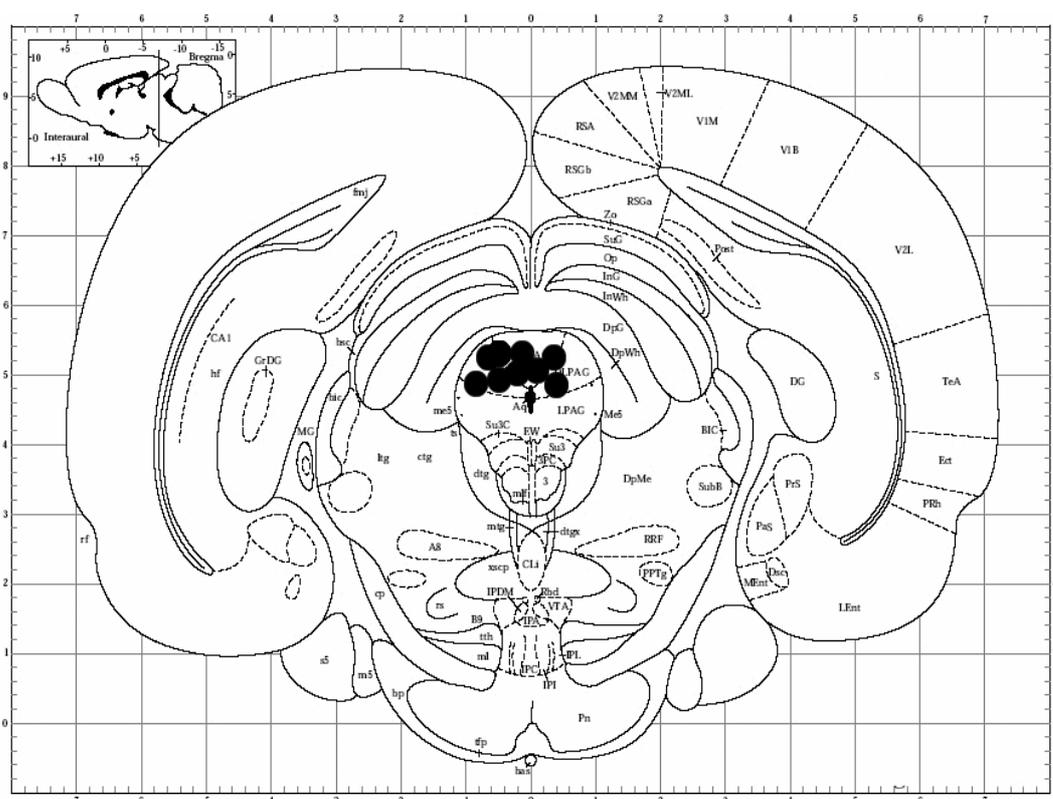


Figura 4. As áreas marcadas indicam o sítio afetado pela microinjeção de NMDA em ambos os experimentos

6.4.

Análises estatísticas

Uma Análise não paramétrica (Kruskal-Wallis) foi utilizada para detectar diferenças significativas entre as quatro amostras do experimento 1. No caso de diferenças estatisticamente significantes, utilizou-se o teste de Mann-Whitney para comparações *post hoc*. Utilizou-se o teste Mann Whitney para detectar diferenças significativas entre as duas amostras do experimento 2. O nível de significância adotado nos testes foi de $p < 0,05$.

7.

Discussão

Evidências indicam que ansiedade e pânico são diferentes emoções, não apenas em termos de experiência subjetiva, mas também no que concerne às manifestações comportamentais e neurofisiológicas já citadas no trabalho. Acredita-se que a ansiedade está relacionada a respostas de defesa a ameaças em potencial. Diversas evidências experimentais indicam que drogas benzodiazepínicas têm a capacidade de reduzir níveis de ansiedade, muito provavelmente graças à ação sobre a amígdala e o hipocampo.

O ataque de pânico parece ser uma outra reação de defesa associada a estímulos de perigos proximais, ou seja, estímulos que fazem contato físico com o indivíduo produzindo algum tipo de ameaça à sua existência. Drogas que alteram a comunicação de sinapse serotoninérgica têm a capacidade de aliviar a ocorrência destes ataques. Estruturas neurais filogeneticamente mais antigas, tais como o hipotálamo e a MCP parecem estar associadas com a origem desta patologia.

Do ponto de vista da evolução, o papel funcional tanto da ansiedade quanto do pânico pode ser ilustrado através de uma analogia com os padrões comportamentais de defesa demonstrados por animais diante de uma situação de ameaça ao seu bem-estar, à sua integridade física e, principalmente, à sobrevivência. Esta ameaça pode ser representada através de estímulos inatos (ex: predador ou agressor de mesma espécie) ou estímulos condicionados (CSs) que tiveram esta capacidade adquirida através de associações com estímulos causadores de desconforto, dor e outras sensações desagradáveis. Conseqüentemente, padrões de luta/fuga e congelamento poderiam ser desencadeados.

A resposta de defesa que animais apresentam à estimulação da MCPD tem sido amplamente utilizada como modelo animal de pânico. Por outro lado, o condicionamento contextual de medo pode ser utilizado como modelo animal de ansiedade. Dessa forma, a relação entre ansiedade e transtorno de pânico pode ser investigada em uma condição experimental controlada através de animais de laboratório.

Visto que os resultados indicaram que o comportamento de congelamento, induzido pelo condicionamento contextual aversivo, foi capaz de inibir reações

ativas de fuga induzida pela microinjeção de NMDA na MCPD, pode-se concluir que ativação de mecanismos cerebrais que permeiam a ansiedade produz um efeito inibitório nos ataques de pânico. Assim, como sugerido na teoria do papel dual da serotonina por Deakin e Graeff, os dados estão de acordo com a proposição que o sistema serotoninérgico ascendente aumentaria o medo (ou ansiedade) por estimular o substrato de defesa da amígdala e, simultaneamente, impediria a expressão de pânico por inibir os neurônios que comandam a fuga na MCPD.

Nesse sentido, os estímulos aversivos condicionados teriam a função de guiar o organismo fora de situações de perigo. Tais estímulos produziram medo e a ativação disfuncional desse mecanismo de defesa produziria ansiedade generalizada.

O fato do condicionamento de medo contextual ter sido capaz de inibir reações ativas de fuga pela microinjeção de NMDA na MCPD está em conformidade com a teoria de Fanselow que diz serem as respostas defensivas animais organizadas hierarquicamente. Segundo esta teoria (Fanselow., 1980) o congelamento é a principal resposta a um estímulo aversivo, inato ou aprendido, e pode inibir formas ativas de comportamento nociceptivos a uma variedade de situações ameaçadoras. Por exemplo, o condicionamento de medo contextual pode disparar uma reação analgésica que pode inibir o reflexo de retirada a um estímulo doloroso (Brandão, Aguiar e Graeff, 1982). Além disso, tem sido mostrado que o condicionamento do medo contextual pode inibir vigorosas respostas de corrida e saltos disparados pelo choque nas patas assim como a fuga defensiva induzida por choque (Bolles e Fanselow, 1982).

A farmacologia da ansiedade, medo e pânico dentro da circuitaria da MCP tem mostrado a importância do envolvimento tanto da serotonina quanto do GABA (Behbehani, 1995) na modulação dos níveis de ansiedade no organismo. A MCP contém, de fato, uma rica rede gabaérgica com receptores tanto de BZD quanto de GABA (Mennini e Gobbi, 1990); o bloqueio dos receptores de GABA, em particular os receptores GABA-A, por parte de drogas antagonistas, acabam por ocasionar respostas aversivas, (Graeff *et al.*, 1986; Shaikh e Siegel, 1990) autonômicas (Carrive *et al.*, 1991; Bandler *et al.*, 1991) e, de fato, um aumento da ansiedade nos animais.

Apesar de termos trabalhado com apenas uma droga que atua via neurotransmissão mediada pelo GABA, temos que salientar as diversas evidências que sustentam outros neurotransmissores e neuromoduladores na ansiedade que incluem aminas biogênicas como a noradrenalina, dopamina e alguns peptídeos.

O fato de a injeção intraperitoneal de PTZ ter sido capaz de diminuir as reações de fuga pela microinjeção de NMDA na MCPD mostra a importância do papel do GABA na ansiedade e pânico. O efeito do PTZ sugere que a ação deste antagonista na neurotransmissão do GABA pode influenciar na reação de fuga dentro de um contexto experimental. Mais uma vez evidencia-se que o efeito de uma ansiedade antecipatória pela ação do PTZ pode diminuir uma resposta de fuga induzida pela microinjeção de NMDA na MCPD.

Por sua vez, a hipótese de que um alto índice de ansiedade (ansiedade antecipatória) reduz a resposta de fuga foi experimentalmente testado. Como esperado, os resultados demonstraram que ratos expostos pela primeira vez a um determinado contexto sob o efeito de uma droga ansiogênica demonstraram ter menor reação de resposta de fuga eliciada pela estimulação química da MCPD.

Outros estudos demonstraram resultados farmacológicos, sugerindo que o aumento da ansiedade pode inibir a ocorrência de ataques de pânico. Pacientes com Transtorno de Pânico tratados com drogas que bloqueavam a recaptção de serotonina mostraram uma diminuição nos ataques de pânico (Klein e Klein, 1989). Portanto, parece que a ativação da circuitaria neural envolvida na ansiedade pode de fato inibir a incidência de pânico.

Finalmente, nossos resultados têm uma consequência imediata na compreensão acerca da relação entre ansiedade e pânico em humanos. Experimentos bem controlados indicam que há duas, mas diferentes circuitarias neurais responsáveis pela ocorrência de vias opostas dos comportamentos defensivos dos animais (Fanselow e Sigmund, 1986). Um sistema, relacionado a uma postura de congelamento defensivo, envolve a ativação do complexo amigdalóide e da MCPV. O mau funcionamento deste sistema defensivo, como falado antes, parece estar relacionado aos Transtornos de Ansiedade Generalizada (Gray, 1982).

O outro sistema é responsável pela via completamente oposta do comportamento defensivo. Ele envolve formas extremamente vigorosas de comportamento ativo, como as reações tipo fuga-luta. A MCPD está claramente

associada com estas respostas defensivas ativas estereotipadas e sua hiperativação parece estar relacionada ao Transtorno do Pânico (Landeira, Decola, Kim e Fanselow, 2006). Assim, nossos resultados indicaram que o condicionamento de medo contextual induziu comportamento defensivo de congelamento e diminuiu as reações defensivas ativas evocadas pela microinjeção de NMDA na MCPD, que pode estar implicada na relação inversa entre ansiedade e ataques de pânico. A injeção intraperitoneal de PTZ, por sua vez, tendo apenas o papel de eliciar uma ansiedade antecipatória por meio químico no animal, acabou por inibir uma resposta de fuga, corroborando também a hipótese proposta neste trabalho. Estudos em humanos demonstraram ainda que pacientes que sofrem de transtorno de pânico preferem antes manter-se ocupados do que relaxados, deixando, assim, os seus níveis de ansiedade altos. Em adição, terapias que envolvem relaxamento podem precipitar ataques de pânico (Adler, 1987).

Leva-se em conta que a frequência de ataques de pânico é maior no início da agorafobia, quando há pouca ansiedade antecipatória, se comparada com a última fase, quando a ansiedade está totalmente desenvolvida (Graeff e Zangrossi, 2002). Existem evidências que mostram que a sensação de medo extremo experienciada por pacientes que sofrem de transtorno de pânico não está relacionada à atividade cortical; a mesma é produzida por atividades neurais hipotalâmicas e representações da MCP. Por outro lado, a ansiedade antecipatória está relacionada à atividade do córtex cingulado anterior (Hsieh, Stone-Elender, e Ingvar, 1999). Estas evidências mostram que tanto a ansiedade antecipatória quanto o pânico são ativadas por diferentes partes dentro da circuitaria cerebral. Com isso, podemos afirmar que a mesma circuitaria neural, que comanda as reações de defesa inata, eliciadas por perigo proximal, também têm envolvimento nos ataques de pânico.

8.

Referências bibliográficas

ADLER, CA. Relaxation-induced panic (RIP): when resting isn't peaceful. **Integrative Psychiatry** V. 2, pp. 94-112, 1987.

ALBIN, RL.; MAKOWIEC, RL.; HOLLINGSWORTH, Z.; DURE, LS 4th, PENNY, JB., YOUNG, AB. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. **Neurosci Lett** V. 118(1), pp. 112-115, 1990.

BANDLER, R.; CARRIVE, P.; ZHANG, SP. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatotopic and functional organization. **Prog Brain Res** V. 87, pp. 269-305, 1991.

BANKS, MI.; WHITE, JA.; PEARCE, RA. Interactions between distinct GABA(A) circuits in hippocampus. **Neuron** V. 25, pp. 449-457, 2000.

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

BITTENCOURT, A.S.; CAROBREZ, A. P.; ZAMPROGNO, L. P.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L.C. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: Role of N-methyl d-aspartic acid glutamate receptors. **Neuroscience**. V. 125, pp. 71-89, 2004.

BLANCHARD D.C.; BLANCHARD R.J.; RODGERS R.J. Pharmacological and neural control of anti predator defense in the rat. **Aggr Behav** V. 16, pp. 165-75, 1990.

BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C., & HORI, K. An ethoexperimental approach to the study of defense. In R.J. Blanchard, P. F. Brain, D. C. Blanchard, & S. Parmigiani Ed. **Ethoexperimental approaches to the study of behavior**. Boston: Kluver Academic Publishers NATO ASI Series D, V. 48, pp. 114-36, 1989.

BOLLES, R.C.; FANSELOW, M. S. Endorphins and behavior. **Annual Review Psychology** V. 33, pp. 87-101, 1982.

BOLLES, R.C. Species-specific defensive reactions and avoidance learning. **Psychological Review**. V. 71, pp. 32-48, 1970.

BRANDÃO, ML.; TRONCOSO, AC.; DE SOUZA SILVA, MA.; HUSTON, JP. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. **Eur J Pharmacol** V. 463(1-3), pp. 225-233, 2003.

BRANDÃO, M.L.; AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F. G. GABA mediation of the antiaversive action of the minor tranquilizers. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** V. 16, pp. 397-402, 1982.

BUENO, CH.; ZANGROSSI, H Jr.; NOGUEIRA, RL.; SOARES, VP.; VIANA, MB. Panicolytic-like effect induced by the stimulation of GABAA and GABAB receptors in the dorsal periaqueductal grey of rats. **Eur J Pharmacol** V. 516(3), pp. 239-246, 2005.

CARRIVE, P.; BANDLER, R. Viscerotopic organization of neurons subserving hypotensive reactions within the midbrain periaqueductal grey: a correlative functional and anatomical study. **Brain Res** V. 541(2), pp. 206-215, 1991.

CLEMENTS, JR.; MADL, JE.; JOHNSON, RL.; LARSON, AA.; BEITZ, AJ. Localization of glutamate, glutaminase, aspartate and aspartate aminotransferase in the rat midbrain periaqueductal gray. **Exp Brain Res** V. 67(3), pp. 594-602, 1987.

COLLINGRIDGE, G. L.; WATKINS, J. C. (Eds) *The NMDA Receptor*, 2nd ed Oxford University Press, Oxford, 1994.

CONTI, L.H.; MACIVER, C.R.; FERKANY, J.W.; AND ABREU, M.E.; **Psychopharmacology**. V. 102, pp. 492-97, 1990.

CROSSLAND, J. The Problems of non-cholinergic transmission in the central nervous system. In **Metabolism of The Nervous System** pp. 523-541, 1957. Richter, D.; (Ed), Pergamon Press, London

CURTIS, D. R. In **Studies in Physiology** Curtis, D. R. and McIntyre, A. K. (Eds), pp. 34-42, 1965.

CURTIS, D. R.; PHILLIS, J. W.; WATKINS, J. C. The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. **J Physiol** V. 150(3), pp. 656-682, 1960.

CURTIS, DR.; PHILLIPS, JW.; WATKINS, JC. Chemical excitation of spinal neurones. **Nature** V. 183(4661), pp. 611-612, 1959.

DARWIN, C. The expression of the emotions an man and animals. Chicago; University of Chicago Press, 1960.

DAVIDSON, RJ. Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. **Biol Psychiatry** V. 51(1), pp. 68-80, 2002.

DAVIS, M. Neurobiology of Fear Response: The Role of the Amygdala. **J Neuropsychiatry** V. 9, pp. 382-402, 1997.

DEAKIN, J.W.F.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. **Journal of Psychopharmacolgy**, V. 5, pp. 305-315,1991.

DOBLE, A. T The GABA-A / Benzodiazepine Receptors as a target for Psychoactive Drugs. **RG Landes Company**. Georgetown, 1998.

DRACTU, L.; LADER, M. Ansiedade: conceito, classificação e biologia. Uma interpretação contemporânea da literatura. **Jornais Brasileiros de Psiquiatria**. V. 42(1), pp. 19-32, 1993.

DREVETS, WC. Prefrontal cortical-amygdalar metabolism in major depression. **Ann N Y Acad Sci** V. 877, pp. 614-637, 1999.

DSM IV^{TR}: **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. Porto Alegre : Artes Médicas, 1995.

FANSELOW, M.S. Neural organization of the defensive behaviour system responsible for fear. **Psychol Bull Rev**. V. 1, pp. 429-438, 1994.

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: Functional, Anatomical and immunohistochemical organization**. New York: Plenum NATO ASI Series A, V 213, pp. 151-73, 1991.

FANSELOW M.S.; LESTER L. S. A functional behavioristic approach to aversively motivated behaviour: predatory imminence as a determinant of the topograph of defensive behaviour. Em Bolles RC, Beecher MD, editors. **Evolution and Learning** New York: Hillsdale , pp. 185, 1988.

FANSELOW, M.S. Associative vs topographical accounts of the immediate shock freezing deficit in rats: Implications for the response selection rules governing species specific defensive reactions. **Learning and Motivation**.. V. 17, pp. 16-39, 1986a.

FANSELOW, M. S.; SIGMUND, R. A .Specie specific dangers signals, endogenous opiod analgesia, and defensive behavior. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Process** V. 12, pp. 301-309, 1986.

FANSELOW, M. S. Conditional and unconditional components of post-shock freezing. **Pavlovian Journal of Biological Science** V. 15, pp. 177-182, 1980.

GODDARD, A. W.; CHARNEY, D. S. Toward an Integrated Neurobiology of Panic Disorder **J Clin Psychiatry** V. 58(suppl.2), pp. 4-11, 1997.

GOMITA, Y.; MORIYAMA, M.; ICHIMARU, Y.; ARAKI, Y. Effects of anxiolytics drugs on escape behavior induced by dorsal central gray stimulation in rats. **Physiol Behav** V. 49, pp. 125-129, 1991.

GRAEFF, G. F. Serotonina, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. **Ver. Bras. Psiquiatr.** V. 25(Supl II), pp. 42-5, 2003.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI, H. Jr. Animal models of anxiety disorders. In: D'haenen, H.; den Boer, J.A and Willner, P. Ed. **Biological Psychiatry**. John Wiley & Son Ltd, New York. 2002.

GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: Graeff, F.G. & Brandão, M.L. (Eds) **Neurobiologia das Doenças Mentais**. São Paulo, Lemos Editorial, 1997a

GRAEFF, F. G. Serotonergic Systems. **Psychiatr Clin North Am** V. 20(4), pp. 723-739, 1997b

GRAEFF, FG.; SILVEIRA, MC.; NOGUEIRA, RL.; AUDI, EA., OLIVEIRA, RM. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behav Brain Res** V. 58(1-2), pp. 123-131, 1993.

GRAEFF, F. G. Neurotransmitters in the dorsal periaqueductal gray and animal models of panic anxiety. Em Briley M., File S.E. editors. **New concepts in anxiety**. London: Macmillan Press, pp. 288-312, 1991.

GRAEFF, FG.; BRANDÃO, ML., AUDI, EA.; SHÜTZ, MT. Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. **Behav Brain Res** V. 21(1), pp. 65-72, 1986.

GRAEFF, F. G. Minor tranquilizers and brain defense systems. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 14, pp. 239-65, 1981.

GRAY, J. A. **The Neuropsychology of Anxiety**. New York, Oxford University Press, 1982.

GUNDLACH, A. Regional subdivisions in the midbrain periaqueductal gray of the cat revealed by in vitro receptor autoradiograph. In: **The midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, anatomical and Neurochemical Organization** pp. 1449-1464, 1991. Eds A. Depaulis and R. Bandler. Plenum Press: New York

HAEFELY, W. E. Central Action of the Benzodiazepines: General Introduction. **Br J Psychiatry** V. 133 pp. 231-238, 1978.

HAYASHI, T. **Chemical Physiology of Excitation in Muscle and Nerve**, Nakayama- Shoten Ltd, Tokyo, 1956.

HAYASHI, T. Effects of sodium glutamate on the nervous. system **Keio J Med** V. 3, pp. 183-192, 1954.

HAYASHI, T. A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. **Jpn J Physiol** V. 3(1) pp. 46-64, 1952.

HELMSTETTER, FJ.; LANDEIRA FERNANDEZ, J. Conditional hypoalgesia is attenuated by naltrexone applied to the periaqueductal gray. **Brain Res** V. 537(1-2), pp. 88-92, 1990.

HSIEH, JC.; STONE-ELANDER, S., INGVAR, M. Anticipatory coping of pain expressed in the human anterior cingulate cortex: a positron emission tomography study. **Neurosci Lett** V. 262(1), pp. 61-64, 1999.

HYND, MR.; SCOTT, HL.; DODD, PR. Differential expression of N-methyl-D-aspartate receptor NR2 isoforms in Alzheimer's disease. **J. Neurochem** V. 90(4), pp. 913-919, 2004.

JEFFREY, C.; WATKINS, J. C.; JANE, D. E. The glutamate story. **British Journal of Pharmacology** V. 147, pp. 100-108, 2006.

KALUEFF, AV. Neurobiology of memory and anxiety: from genes to behavior. **Neural Plast** V 2007 ID 78171, 12 páginas, doi: 10.1155/2007/78171

KALUEFF, AV.; NUTT, DJ. Role of GABA in anxiety and depression. **Depress Anxiety** pp. 1-23, 2006.

KALUEFF, AV.; NUTT, DJ. Role of GABA in memory and anxiety. **Depress Anxiety** V. 4(3), pp. 100-110, 1996.

KAPLAN, H. I.; SADOCK, B. J.; GREBB, J. A. Anxiety Disorders In: Kaplan, H. I.; Sadock, B. J. (Eds) **Synopsis of Psychiatry: Behavioral Sciences, Clinical Psychiatry**. 7. ed. Maryland, Williams & Wilkins, 1994.

KIERNAN, M.; CRANNEY, J. Immediate-startle stimulus presentation fails to condition freezing responses to contextual cues. **Behav Neurosci** V. 106(1), pp. 121-124, 1992.

KIM, J.; GORMAN, J. Psychobiology of anxiety. **Clinical Neuroscience Research**; V. 4, pp. 335-47, 2005.

KLEIN, D. F.; KLEIN, H. M. The definition and psychopharmacology of spontaneous panic and phobia. In: **Psychopharmacology of Anxiety** p 135-162, 1989. Ed. Oxford University Press, Oxford

KROGSGAARD-LARSEN, P.; HANSEN, J. J. (Eds) **Excitatory Amino Acid Receptors. Design of Agonist and Antagonist**, 1992 Ellis Horwood, Chichester

LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; DECOLA, J. P.; KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. . Immediate Shock Deficit in Fear Conditioning: Effects of Shock Manipulations. **Behavioral Neuroscience** V. 120, pp. 873-879, 2006.

LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; FANSELOW, M. S.; DEOCA, B. Opposite roles of ventral dorsolateral periaqueductal gray in conditioned fear-related defensive behavior. Em: **Soc. Neuroscience Abstract**. 1992, Anaheim, 1992.

LEDOUX, J.E.; IWATA, J.; CICHETTI, P.; & REIS, D.J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **Journal of neuroscience** V. 8, pp. 2517-2529, 1988.

LEUNG, JW.; XUE, H. GABAergic functions and depression: from classical therapies to herbal medicine. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord** V. 2(6), pp. 363-374, 2003.

MACDONALD, RL.; BARKER, JL. Different actions of anticonvulsant and anesthetic barbiturates revealed by use of cultured mammalian neurons. **Science** V. 200(4343), pp. 775-777, 1978.

MCCRAE, N. 'A violent thunderstorm': Cardiazol treatment in British mental hospitals. **Hist Psychiatry** V. 17(1), pp. 67-90, 2006.

MELDRUM, BS. Glutamate as Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. **J Nutr** V. 130, pp. 1007-1115, 2000.

MENNINI, T.; GOBBI, M. Regional distribution of low affinity GABA receptors coupled to benzodiazepine receptor subtypes in rat brain: An autoradiographic evaluation. **Eur J Pharmacol** V. 189, pp. 143-148, 1990.

OTTERSEN, OP.; STORM-MATHISEN, J. Glutamate. In **Björklund A, Hökfelt T**, eds. Handbook of chemical neuroanatomy. V 18. Amsterdam: Elsevier, 2000.

PANKSEPP, J. Toward a general psychobiological theory of emotions. **Behav. Brain Sci.** V. 5, pp. 407-67, 1982.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press**, New York, 1986.

POLC, P.; MOHLER, H.; HAEFELY, W. The Effect of Diazepam on Spinal Cord Activities, Possible Sites and Mechanisms of Actions. **NS Arch Pharmacol** V. 284, pp. 319-337, 1974.

RAMANJANEYULU, R.; TICKU, MK. Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. **Eur J Pharmacol** V. 98(3-4), pp. 337-345, 1984.

RANDALL, L.O.; SCHALLECK, W.; HEISE, G. A. *et al.* The psychosedative Properties of Methaminodiazepoxide. **J Pharmacol Exp Therap** V. 129, pp. 163-171, 1960.

REICHLING, DB. GABAergic neuronal circuitry in the periaqueductal gray matter. In: **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization** pp. 329-344, 1991.

REICHLING, DB.; BASBAUM, AI., Contribution of brainstem GABAergic circuitry to descending antinociceptive controls: I. GABA-immunoreactive projection neurons in the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus. **J comp Neurol** V. 302, pp. 370-377, 1990a

RUANG, RQ.; BELL-HORNER, CL.; DIBAS, MI., COVEY, DF.; DREWE, JA., DILLON, GH. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action. **J Pharmacol Exp Ther** V. 298(3), pp. 986-995, 2001.

RUSSO, A. S.; GUIMARÃES, F. S.; De AGUIAR, J. C. & GRAEFF, F. G. Role of Benzodiazepines Receptors Located in the Dorsal Periaqueductal Gray of Rats in Anxiety. **Psychopharmacology Berl** V. 110(1-2), pp. 198-202, 1993.

SANO, K.; MAYANAGI, Y.; SEKINO, H.; OGASHIWA, M.; ISHIJIMA, B. Results of stimulation and destruction of the posterior hypothalamus in man. **J Neurosurg** V. 33(6), pp. 689-707, 1970.

SCHENBERG, L.C.; BITTENCOURT, A.S.; SUDRÉ, E.C.; VARGAS L.C. Modeling panic attack Neurosci. **Biobehav. Rev.** V. 25, pp. 647-59, 2001.

SCHENBERG, L.C.; CAPUCHO, L.B.; VATANABE, R.O.; VARGAS, L.C. C Clomipramine and fluoxetine acute effects on dorsal periaqueductal grey evoked innate defensive behaviours of the rat. **Psychopharmacology** 2001; 10.1007/5002130100883

SCHENBERG, L.C.; MARÇAL, L.P.A.; SEEBERGER, F.; BARROS, M.R.; SUDRÉ, E.M.C. L-Type calcium channels selectively control the defensive behaviors induced by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray and overlying collicular layers. **Behav Brain Res.** V. 111, pp. 175-85, 2000.

SCHOEPP, D. D.; JANE D. E.; MONN, J. A. Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. **Neuropharmacology** V. 38, pp. 1431-1476, 1999.

SHAIKH, MB.; SIEGEL, A. GABA-mediated regulation of feline aggression elicited from midbrain periaqueductal gray. **Brain Res** V. 507(1), pp. 51-56, 1990.

SHELINE, YI. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. **Biol Psychiatry** V. 54(3), pp. 338-352, 2003.

SUDRÉ, E.C.M.; BARROS, M.R.; SUDRÉ G.N.; SCHENBERG, L.C. Thresholds of electrically induced defense reaction of the rat: Short and long-term adaptation mechanisms. **Behav Brain Res**. V. 58, pp. 141-54, 1993.

SWAN, JH.; MELDRUM, BS. Protection by NMDA antagonists against selective cell loss following transient ischaemia. **J Cereb Blood Flow Metab** V. 10(3), pp. 343-351, 1990.

TOBIN, J. M.; LEWIS, N. D.C. New Psychotherapeutic Agent Chlordiazepoxide. Use in Treatment of Anxiety States and Related Symptoms. **J Am Med Assoc** V. 174, pp. 1242-1249, 1960.

TOMAZ, C.; DICKINSON-ANSON, H.; MCGAUGH, J. L.; SOUZA SILVA, M. A.; VIANA M. B. & GRAEFF, F. G. Localization in the Amygdala of the Amnestic Action of Diazepam on Emotional Memory. **Behav Brain Res** V. 58(1-2), pp. 99-105, 1993.

VAIVA, G., THOMAS, P.; DUCROCQ, F.; FONTAINE, M.; BOSS, V.; DEVOS, P.; RASCLE, C., COTTENCIN, O.; BRUNET, A.; LAFFARGUE, P.; GOUDEMANT, M. Low posttrauma GABA plasma levels as a predictive factor in the development of acute posttraumatic stress disorder. **Biol Psychiatry** V. 55(3), pp. 250-254, 2004.

VARGAS, L.C.; SCHENBERG, L.C. Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal gray-evoked innate defensive behaviours of the rat. **Psychopharmacology**. V. 155, pp. 260-8, 2001

VARGAS, L.C.; MARQUES, T.A.; SCHENBERG, L.C. Micturition and defensive behaviors are controlled by distinct neural networks within the dorsal periaqueductal gray and deep gray layer of the superior colliculus of the rat. **Neuroscience Lett**. V. 280, pp. 45-8, 2000.

VIANA, M. B.; GRAEFF, F. G.; LOSCHMANN, P. A. Kainite Microinjection into Dorsal Raphe Nucleus Induced 5-HT Release in the Amygdala and Periaqueductal Gray. **Pharmacol Biochem Behav** V. 58(1), pp. 167-172, 1997.

WAX, PM. Analeptic use in clinical toxicology: a historical appraisal. **J Toxicol Clin Toxicol** V. 35(2), pp. 203-209, 1997.

WAELSCH, H. Amino Acid and Protein Metabolism In: **Neurochemistry** Elliot, K. A.; Page, I. H.; Quastel, J. W.; (Eds) pp. 288-320, Charles C. Thomas, Springfield. 1962.

WATKINS, J. C. In **Frontiers in Excitatory Amino Acid Research** Cavalheiro, E A.; Lehmann, J.; Turski, L. (Eds) pp. 3-10, 1988. Alan R. Liss, New York

WEIL-MALHERBE, H. Significant of glutamic acid for the metabolism of nervous tissue **Physiol Rev** V. 30, pp. 549-568, 1950.

WILLIAMS, FG.; BEITZ, A. J. Ultrastructural morphometric analysis of GABA-immunoreactive terminals in the ventrocaudal periaqueductal grey: Analysis of the relationship of GABA terminals and the GABA-A receptor to periaqueductal grey-raphe magnus projection neurons. **J Neurocytol** V. 19, pp. 686-696, 1990b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde; 10ª Revisão. CBCD, São Paulo; 1995.