



Bruno de Oliveira Galvão

**Efeito da Estimulação Elétrica da MCPD em
Comportamentos de Defesa: Participação do
Córtex Cingulado Anterior Rostral e nas
linhagens Carioca Alto e Baixo Congelamento.**

Tese entregue como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor pelo Programa de
Pós-graduação em Psicologia Clínica no
Departamento de Psicologia do Centro de
Teologia e Ciências Humanas da PUC-Rio.

Orientador: Prof. Jesus Landeira-Fernandez



Bruno de Oliveira Galvão

**Efeito da Estimulação Elétrica da MCPD em
Comportamentos de Defesa: Participação do Córtex
Cingulado Anterior Rostral e nas linhagens Carioca
Alto e Baixo Congelamento.**

Tese entregue como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Psicologia Clínica no Departamento de Psicologia do Centro de Teologia e Ciências Humanas da PUC-Rio. Tese aprovada pela banca examinadora abaixo assinada.

Prof. Jesus Landeira-Fernandez

Orientador
Departamento de Psicologia - PUC-Rio

Profa. Helenice Charchat Fichman

Departamento de Psicologia - PUC-Rio

Profa. Silvia Soares Maisonnette

IBNeC - RJ

Prof. Marcus Lira Brandão

USP/SP

Profa. Yael de Abreu Villaça

Instituto de Biologia - UERJ

Profa. Denise Berruezo Portinari

Coordenadora Setorial de Pós-Graduação e
Pesquisa do Centro de Teologia e
Ciências Humanas – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 27 de abril de 2012.

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

Bruno de Oliveira Galvão

Aluno de Doutorado em Psicologia Clínica pela linha Clínica e Neurociências, Departamento de Psicologia PUC-Rio início em 03/2008 Bolsista CNPq. Mestrado em Psicologia Clínica: PUC-Rio – 11/2007. Trabalha desde 2005 com Psicologia Experimental e modelos animais de transtornos de ansiedade e pânico.

Ficha Catalográfica

Galvão, Bruno de Oliveira

Efeito da estimulação elétrica da MCPD em comportamentos de defesa: participação do córtex cingulado anterior rostral e nas linhagens carioca alto e baixo congelamento / Bruno de Oliveira Galvão ; orientador: Jesus Landeira-Fernandez. – 2012.

105 f. : il. (color.) ; 30 cm

Tese (doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Psicologia, 2012.

Inclui bibliografia

1. Psicologia – Teses. 2. Comportamento de congelamento. 3. Ataque de pânico. 4. Estimulação elétrica da MCPD. 5. Analgesia condicionada. 6. Comportamento recuperativo. 7. Teste de formalina. I. Landeira-Fernandez, Jesus. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Psicologia. III. Título.

CDD: 150

Para minha Tia Rosa uma das três Marias que já
brilha no céu – *in memoriam*.

Agradecimentos

Ao meu orientador Jesus Landeira-Fernandez, pelo rigor de seu trabalho, por ser sempre impecável em suas posições, críticas, por seu trabalho inspirador e ideias fundamentais ao longo desta caminhada final.

Ao CNPq e PUC-Rio, pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ser realizado.

Ao professor Marcus Lira Brandão, por me acolher em seu laboratório num período crucial, e a Julia Santos, uma grande amiga, por me acolher nos momentos de estresse.

Ao professor Miguel Barbosa do Rosário do Departamento de Letras da UFRJ, por me auxiliar 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 e Rogério, pelo bom humor; Val, pela calma; Yana e Fernando, pelas boas risadas; Flávia, pelo suporte logístico inestimável.

Aos meus antigos e novos amigos do doutorado: Alberto Filgueiras, pela prestatividade e pela nova amizade que se fortalece a cada dia; Bruno Larrubia, que, apesar da distância, a grande amizade manteve-se a mesma; Carlos Barroso, por sua grandeza de ser e paciência; Carolina Irurita, por ser umas das pessoas mais doces que já conheci na vida; Érica de Lana, pela seriedade do seu trabalho; Emmy e Fabiano, pelos momentos agradáveis do café; ICs, por facilitarem a minha vida ou testarem a minha paciência; um abraço especial para Monique e Vitor que agora são mais do que meros ICs; Luciana, por sua calma contagiante;

Luciene Rocinholi, pelo seu sotaque e sorriso; Silvia, pelas elucubrações, contribuições, críticas pertinentes ao longo deste trabalho e pelo chopp sempre engraçado.

Um abraço especial a Vitor de Castro Gomes, que começou junto comigo esta caminhada, um sujeito de brilhantismo único e força de vontade invejável. Um grande amigo, que, sempre que possível, farei questão de reencontrar, apesar da distância.

Aos meus grandes amigos, por deixarem sempre a minha vida agradável quando estou com eles: Alexandre Rupert Skyrme, Daniel Mograbi, Fábio Pires Bento e Fábio Isaac Levi. Nunca irei esquecê-los.

À minha “irmã” companheira, compositora e pianista Clarice Assad, que, apesar da distância, estará sempre perto quando eu precisar.

Ao meu pai Délio Esteves Galvão, um exemplo sempre a ser seguido. Uma admiração que cresce mais ainda a cada dia.

À minha mãe, por participar da escolha que mudou a vida dela, e criou a minha. Isto definitivamente foi o início de tudo.

A Miguel, Rosa e Fabricio, por me terem acolhido com tanto carinho e sempre me receberem de braços abertos.

Resumo

Galvão, Bruno de Oliveira. Landeira-Fernandez, J. (Orientador). **Efeito da Estimulação Elétrica da MCPD em Comportamentos de Defesa: Participação do Córtex Cingulado Anterior Rostral e nas linhagens Carioca Alto e Baixo Congelamento.** Rio de Janeiro, 2012, 105p. Tese de Doutorado – 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 da MCPD induzem a um repertório de defesa: o congelamento pré fuga, reação de fuga e congelamento pós fuga. Evidências já apresentadas suportam a hipótese que enquanto o congelamento pré fuga seria um modelo de ataque de pânico o congelamento pós fuga seria um modelo de transtorno de pânico. Os resultados no experimento 1 indicaram que as duas linhagens de animais selecionadas para alto (Carioca alto congelamento) e baixo (Carioca baixo congelamento) congelamento em resposta ao contexto associado com choque nas patas, demonstraram que embora a ansiedade antecipatória possa exercer um efeito inibitório na expressão do congelamento pré fuga e na reação de fuga, pode por sua vez facilitar o congelamento pós fuga. No experimento 2, o efeito de lesões eletrolíticas no Córtex Cingulado Anterior Rostral não alteraram o congelamento pré fuga e a reação de fuga, porém as mesmas exercem um efeito inibitório no congelamento pós fuga demonstrando que os tipos de congelamento no medo incondicionado são mediados por circuitarias de defesa independentes. No experimento 3, o efeito de lesões eletrolíticas no Córtex Cingulado Anterior Rostral (CCAr) aumentou a sensibilidade a dor (comportamento recuperativo) de animais submetidos ao teste de formalina no paradigma de analgesia condicionada demonstrando a importância do CCAr na modulação da circuitaria de dor.

Palavras-Chave

Comportamento de Congelamento; ataque de pânico; transtorno de pânico; Estimulação Elétrica da MCPD; analgesia condicionada; comportamento recuperativo; teste de formalina.

Abstract

Galvão, Bruno de Oliveira. Landeira-Fernandez, J. (Advisor). **DPAG Electrical Stimulation Effect in Defense Behaviors: in the Rostral Anterior Cingulated Cortex participation and in Carioca High-Freezing and Low-Freezing breeding lines.** Rio de Janeiro, 2012, 105p. Doctoral Thesis – 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 stimulation of the DPAG induces a repertoire of defense: dPAG-evoked freezing, escape reaction and dPAG post-stimulation freezing. Past evidence support the hypothesis that whereas dPAG-evoked freezing would serve as model of panic attack, the dPAG post-stimulation freezing appears to be a model of panic disorder. The experiment 1 used two lines of animals selectively bred for high (Carioca High-Freezing) and low (Carioca Low-Freezing) freezing in response to contextual cues associated with footshock. The results suggest that although anticipatory anxiety might exert an inhibitory effect on the dPAG-evoked freezing and escape reaction, it might also facilitate the dPAG post-stimulation freezing. The experiment 2 studied the effect of electrolytic lesions on rostral anterior cingulated cortex (rACC). The results of electrolytic lesions on rACC suggest that although rACC lesions did not change the dPAG-evoked freezing and escape threshold, it might exert an inhibitory effect on the dPAG post-stimulation freezing, reinforcing the hypothesis that dPAG-evoked freezing and dPAG post-stimulation freezing are modulated by two independent circuitry of defense. The experiment 3 studied pain sensibility of rACC lesioned animals submitted to formalin test on conditioned analgesia paradigm. The results suggest that rACC lesions might exert an inhibitory effect on conditioned analgesia and consequently exacerbates recuperative behavior. The results also support the hypothesis of the rule of rACC on pain modulation.

Keywords

Freezing Behavior; Panic Attack; Panic Disorder; dPAG electrical stimulation; Conditioned Analgesia; Recuperative Behavior; Formalin Test.

Sumário

1. Introdução	12
1.1. Transtornos de Ansiedade	12
1.2. Níveis de Comportamento de Defesa Animal	17
1.3. Substratos Neurais do Comportamento de Defesa animal	18
1.4. Respostas de Defesa: O Congelamento	21
2. O Teste de Formalina. Considerações Gerais	27
2.1. O Teste de Formalina: Sítios de injeção	29
3. Circuitaria Neural da Dor: Considerações Gerais	31
3.1. Circuitaria Neural da Dor: Relação com Pânico	32
3.2. Circuitaria Neural da Dor: Processo de Estímulos Nociceptivos	33
3.3. Circuitaria Neural da Dor: Etiologia do Pânico	35
4. Córtex Cingulado Anterior: Dimensão Afetiva da Dor	38
4.1. Córtex Cingulado Anterior: Aprendizagem Aversiva	42
5. Analgesia Condicionada: Considerações Gerais	43
5.1. Opióides Endógenos: Regulação Emocional	47
6. Objetivos	49
7. Experimento 1	50
7.1. Sujeitos	50
7.2. Cirurgia	50
7.3. Material	51
7.4. Procedimentos	51
7.5. Resultados	52
8. Experimento 2	59
8.1. Sujeitos	59

8.2. Cirurgia	59
8.3. Material	59
8.4. Procedimentos	59
8.5. Resultados	60
9. Experimento 3	63
9.1. Sujeitos	63
9.2. Cirurgia	63
9.3. Material	64
9.4. Procedimentos	64
9.5. Resultados	65
10. Discussão	69
11. Referências	77
12. Anexo	99

Para Vanessa

Que sempre me cativa e me move

1

Introdução

1.1

Transtornos de Ansiedade

Psicopatologias que têm associação com os transtornos de ansiedade se encontram entre os mais frequentes distúrbios na área da saúde mental. Estudos verificaram que 20% da população mundial irão apresentar pelo menos um episódio relacionado com transtornos de ansiedade durante a vida (Almeida-Filho et al., 1997; Arikian & Gorman, 2001). Levantamentos econômicos já indicaram que mais de 30% da verba destinada para a saúde mental nos Estados Unidos foi exclusivamente utilizada para o tratamento de pacientes diagnosticados com algum tipo de transtorno de ansiedade (DuPont et al., 1996). Desta maneira, estudos relacionados com estes transtornos são justificados não apenas pelo seu aspecto básico relacionado com a descoberta de seus mecanismos patofisiológicos, mas também por sua aplicabilidade clínica e melhora da saúde humana, principalmente nos dias de hoje.

De forma geral, os transtornos de ansiedade podem vir a apresentar três grandes classes de sintomas: alterações na atividade consciente, agitação ou inibição comportamental e desregulação de sua fisiologia interna corporal (homeostase). Dentre as alterações da consciência, a ansiedade pode, sem sombra de dúvida, provocar confusões ou distorções perceptivas e conseqüentemente modificar o significado de um acontecimento registrado por um indivíduo. Transtornos de ansiedade podem inclusive interferir de maneira direta em processos de atenção, gerar déficits na aprendizagem e memória. As sensações de apreensão, hipervigilância, insônia e perda de concentração se configuram, por sua vez, como outros sintomas associados à atividade mental consciente. Sinais de inquietação, como andar de um lado para o outro, movimentar mãos e pés, bem como outras partes do corpo de forma não intencional aparente, ilustram alguns dos sintomas comportamentais que estão ligados à ansiedade. Expressões faciais caracterizando apreensão (Ekman, 1993), redução ou inibição da atividade motora, podem estar ligadas a alguns estados de ansiedade. Por conseqüência de

toda esta sintomatologia cognitiva e comportamental, os estados de ansiedade ainda têm a capacidade de promover alterações na regulação do sistema simpático em determinados órgãos e glândulas, que acabam desencadeando sudorese, taquicardia, náuseas, tremores e sensações de vazio no estômago.

O estudo sistemático dos diferentes transtornos de ansiedade teve a sua origem em Sigmund Freud (1856-1939). Através de uma série de observações clínicas, Freud (1886/1976) fez uma descrição clara das várias disfunções relacionadas com a ansiedade: A crise aguda de angústia, a neurose de angústia e a expectativa ansiosa. De forma muito provável, estas disfunções descritas por Freud no final do século XIX seriam conhecidas hoje, respectivamente, como o ataque de pânico (AP), o transtorno de pânico (TP) e o transtorno de ansiedade generalizada (TAG).

Destaca-se, no entanto, que este sistema de classificação psicanalítico dos transtornos de ansiedade tornou-se, com o passar do tempo, altamente inferencial e especulativo, calcado quase que de forma exclusiva em pressupostos teóricos que ainda carecem de validação empírica.

Uma classificação mais objetiva dos transtornos de ansiedade pode ser encontrada tanto no Manual Estatístico de Doenças Mentais DSM-IV-TR (APA, 2002) quanto na Classificação Internacional das Doenças Mentais (CID-10, Organização Mundial de Saúde, 1993). Estes manuais definem os diferentes transtornos de ansiedade através de critérios claros, que possibilitam a formulação de um diagnóstico mais preciso e confiável. Os transtornos de ansiedade constituem um grupo heterogêneo de categorias nosológicas relacionadas. Esta ansiedade patológica pode manifestar-se de duas formas: Episódica ou tônica. De acordo com o DSM-IV-TR (APA, 2002), um exemplo de estado tônico é o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) que envolve a presença constante de preocupação associada a diversos sintomas, como irritabilidade, sensação de cansaço e dificuldades de concentração. O indivíduo nesta condição ainda pode vir a ter uma variedade de sintomas somáticos, como diarreia crônica, dores musculares, dor de cabeça, palpitações, taquicardia e disfunções gastrointestinais. Por sua vez, um exemplo mais típico da manifestação episódica é o transtorno de pânico.

A diferença do ataque de pânico (AP) para o TAG é que a manifestação do episódio de AP caracteriza-se por uma série de sintomas que surgem de forma

súbita em menos de 10 minutos. O AP seriam episódios intensos de medo e terror acompanhado por aceleração dos batimentos cardíacos, dores no peito, tonteados 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 DSM-IV- TR (APA, 2002). O AP inclusive pode manifestar-se nas fobias (caracterizada por um medo irracional de um objeto específico, de uma atividade que leva a um comportamento de esquiva ou evitação). Entretanto, de maneira geral, a ansiedade nesta condição é relacionada com um estímulo específico, sob a forma de uma ansiedade situacional.

A característica essencial do transtorno de pânico é nada mais do que a presença de ataques de pânico recorrente e inesperado DSM-IV- TR (APA, 2002). Embora a presença de ataques de pânico seja a marca maior deste transtorno, uma condição crônica observada neste transtorno ansiogênico é um constante e persistente medo de experimentar novos ataques de pânico ou preocupações constantes acerca das consequências de se ter um AP. Indivíduos que sofrem deste transtorno podem vir a viver quase que num estado constante de apreensão, apenas à espera de um novo episódio de pânico. A apavorante perspectiva de se vivenciar um novo ataque pode ser tão extrema que o indivíduo pode vir a desenvolver agorafobia (medo de espaços abertos ou situações em que a fuga pode ser difícil ou a ajuda não chegar a tempo no caso de um AP ou sintomas relacionados).

A ansiedade patológica existe em várias condições, estando presente inclusive em algumas situações, como doenças, medicação ou drogas (psicoestimulantes), síndrome de abstinência (depressores do SNC ex. álcool). Salienta-se que os transtornos de ansiedade não são os únicos quadros psiquiátricos que apresentam níveis patológicos de ansiedade. De um modo geral, esse quadro ansiogênico se manifesta em quase todas as formas de transtornos mentais. Classifica-se hoje em dia como transtorno de ansiedade aquele transtorno no qual a ansiedade diretamente observada ou manifesta é a principal condição sintomatológica.

Certos estudos sugerem que a ansiedade antecipatória e o AP fazem parte de um mesmo continuum. De acordo com esta interpretação, um aumento no nível de ansiedade pode resultar num episódio de AP (Bouton, Mineka and

Barlow, 2001). Seguindo este viés, pacientes que sofrem de transtorno de pânico reportam inclusive que a maioria dos episódios de pânico ocorre quando os mesmos estão num plateau de ansiedade altíssimo (Basoglu, Marks e Sengun, 1992). Em adição, pacientes que tiveram ataques de pânico induzidos por infusão de lactato de sódio reportaram um alto nível de ansiedade imediatamente antes da ocorrência do episódio de pânico (Liebowitz et al., 1984 e 1985).

Sabe-se hoje que tanto AP quanto TAG constituem-se em categorias nosológicas independentes. Em um destes estudos, Klein e Fink (1962) demonstraram que a imipramina, um antidepressivo tricíclico que atua na inibição de recaptção tanto da serotonina quanto da noradrenalina, atenuava de forma significativa a manifestação dos ataques de pânico, mas era ineficaz no TAG. Posteriormente, verificou-se também que os inibidores antidepressivos mais antigos, que, no caso, eram capazes de inibir a monoaminoxidase também agiam de forma eficaz no tratamento do transtorno de pânico (Sheenan, 1980).

Estudos que se seguiram não apenas corroboraram essas observações, como também demonstraram que os principais ansiolíticos benzodiazepínicos eram altamente eficazes no tratamento farmacológico do TAG, contudo os mesmos eram ineficazes ou, de forma paradoxal, até mesmo precipitavam os ataques de pânico. Uma proposta em voga nos dias de hoje sugere que a ansiedade e pânico são qualitativamente patologias diferentes, que, por sua vez, apresentam uma relação multifacetada. De acordo com esta proposta, a ocorrência de ataques de pânico pode de fato gerar intensas reações de ansiedade, mas os sintomas de ansiedade podem, por sua vez, inibir a ocorrência dos ataques de pânico. Algumas evidências clínicas suportam esta proposta. Por exemplo, as técnicas de relaxamento implementadas durante o tratamento de sintomas ansiogênicos podem induzir a ataques de pânico (Adler, Craske e Barlow, 1987). Além disso, o AP parece ocorrer mais frequentemente durante o curso inicial do transtorno de pânico, quando os níveis de ansiedade estão relativamente baixos, comparado com estágios prolongados de transtorno de pânico quando os sintomas ansiogênicos já se manifestam em níveis extremamente altos (Klein & Klein, 1989). Em adição, outros resultados farmacológicos corroboram com a visão de que um alto índice de ansiedade pode vir a inibir a ocorrência de ataques de pânico. Pacientes diagnosticados com transtorno de pânico e tratados com agonistas serotoninérgicos apresentaram um decréscimo na ocorrência dos ataques

de pânico (Gorman et al., 1987; Cassano, Perugi e McNair, 1988), mas demonstraram um acréscimo nos sintomas ansiogênicos (Targum e Marshall, 1989). Atualmente, drogas antidepressivas relacionadas com a inibição seletiva da recaptação da serotonina (ISRS) têm sido empregadas no tratamento do transtorno do pânico (Graeff, 2012). Como dito anteriormente, o emprego dos ISRS no tratamento do pânico, de maneira paradoxal, aumenta os sintomas de ansiedade em pacientes. Este paradoxo tem sido esclarecido por meio da teoria de Deakin e Graeff (1991) em que a estimulação de receptores serotoninérgicos na amígdala aumenta a sensibilidade do indivíduo a estímulos de perigo, produzindo assim um efeito ansiogênico. Com isso, antagonistas serotoninérgicos tendem a reduzir a ansiedade. Entretanto, a estimulação de receptores serotoninérgicos na matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) reduzia a ocorrência de AP. Sendo assim, podemos observar que os agonistas serotoninérgicos têm a capacidade de reduzir a ocorrência de AP, mas aumentam o nível de ansiedade no indivíduo através de sua atuação na amígdala. A conclusão a que podemos chegar é que a solução para este paradoxo serotoninérgico pode estar amparada no fato de que a ansiedade e o pânico não apenas constituem transtornos distintos, mas mantêm também relações opostas. Sem sombra de dúvidas, as manifestações clínicas dos diversos tipos de transtornos de ansiedade são extremamente complexas (Kemp & Felmingham, 2008). Entender então a circuitaria neural e os mecanismos de ação destes transtornos é essencial para a melhora substancial da qualidade de vida na população.

Verificamos que a expressão de reações de ansiedade diante de situações adversas é um fenômeno tipicamente humano. Apesar disto, é viável encontrar correlações entre certos transtornos de ansiedade e comportamento de defesa expressada por animais diante de alguns estímulos ou situações de perigo. Teorias que tentam relacionar reações de ansiedade em seres humanos com o comportamento de defesa em diferentes espécies animais tiveram origem em Darwin (1872/2000). Ao longo dos anos, uma gama crescente de estudos tem definido a ansiedade como um componente essencial de uma circuitaria neural. Este sistema tem como função a detecção de sinais de perigo no meio ambiente, mas também é responsável pela ativação de reações fisiológicas e comportamentais de defesa que preparam o organismo, e atuam de acordo com a situação de perigo.

Seguindo este viés, uma gama de modelos animais foi desenvolvida com o objetivo específico de simular determinadas situações de perigo, permitindo, desta forma, uma investigação que avaliasse experimentalmente os aspectos etiológicos e eventuais formas de tratamento associados a um dado transtorno de ansiedade. Por conta disto, a utilização destes modelos tem sido de suma importância e decisiva para um melhor esclarecimento das bases neurais e farmacológicas envolvidas nas reações de defesa.

1.2

Níveis de Comportamento de Defesa Animal

Um importante passo na pesquisa sobre comportamento defensivo se deu com o trabalho de Blanchard et al (1986) através de estudos sistemáticos das estratégias de defesa tomadas por ratos selvagens diante de diferentes tipos de ameaças predatórias. Os resultados obtidos levaram ao conceito de três níveis de perigo: potencial (incerto), distal e proximal, cada um deles evocando um diferente tipo de reação de defesa. Exemplificando, quando o perigo é incerto, o rato faz uma série de comportamentos de avaliação de risco e exploração cautelosa. Quando o predador é percebido à distância, uma imobilidade (comportamento de congelamento) irrompe com frequência proporcional à distância do predador (quanto mais próximo o predador está do rato, maior o comportamento de congelamento). Finalmente, quando o predador está muito perto ou de fato em contacto com o rato, é observado um comportamento de fuga não direcionado ou até mesmo o rato pode vir a atacar o predador de forma defensiva (Blanchard & Blanchard 1989). De fato, estudos comparativos demonstraram estratégias de defesas homólogas em outros animais, incluindo espécies não mamíferas (Blanchard Griebel & Blanchard, 2001).

Bolles e Fanselow (1980/1982), por sua vez, desenvolveram um modelo similar de comportamento de defesa utilizando o paradigma conhecido de condicionamento de medo ao contexto. Nesta situação, o rato é colocado em um contexto novo e, após alguns minutos, é apresentado um choque nas patas do animal, sem chance de fuga; o animal reage então com uma vigorosa atividade motora incluindo tentativas de fuga, pulos e vocalizações. Ao final do choque,

esta grande atividade locomotora dá lugar a um período de congelamento (Bolles e Collier, 1976). De acordo com este modelo, estas duas respostas de defesa são mediadas por dois sistemas motivacionais independentes: Um relacionado com o medo e outro relacionado com a dor (Figura 1.). O sistema motivacional de medo é ativado através de estímulos distais que podem gerar alguma ameaça ao animal. Um padrão de resposta inibitória diante de dada situação, o congelamento, é o principal comportamento de defesa ativado por este sistema. Por outro lado, o sistema motivacional de dor é ativado por estímulos proximais nociceptivos que servem para proteger a integridade física do animal, através de comportamento ativo de corrida e pulos. Em adição, este estímulo de dor atua como estímulo incondicionado produzindo imediatamente um condicionamento de medo contextual. Em suma, a resposta de congelamento que irrompe quando o choque é interrompido é relacionado com o sistema motivacional de medo que é ativada pelo contexto pareado com os choques. Nota-se então que o primeiro e segundo níveis de perigo caracterizado pelo casal Blanchard são análogos ao sistema motivacional de medo proposto por Fanselow e Bolles e o terceiro nível de perigo do casal Blanchard parece estar relacionado com o sistema motivacional de medo descrito por Bolles e Fanselow (Brandão et al., 2008). Estes dois sistemas (medo e dor) fazem parte do sistema motivacional de defesa (Fanselow 1986) que será desenvolvido mais à frente.



Figura 1. Esquema mostrando a interação entre os sistemas motivacionais de medo e dor descrito por Fanselow (1980/1982)

1.3

Substratos Neurais do Comportamento de Defesa animal

De acordo com Brandão et al (2008), o sistema septo-hipocampal junto com a amígdala poderiam ser estruturas principais tanto para comportamento de

avaliação de risco quanto para comportamento defensivo (congelamento) em resposta à ameaça potencial e estímulos condicionados (Figura 2.).

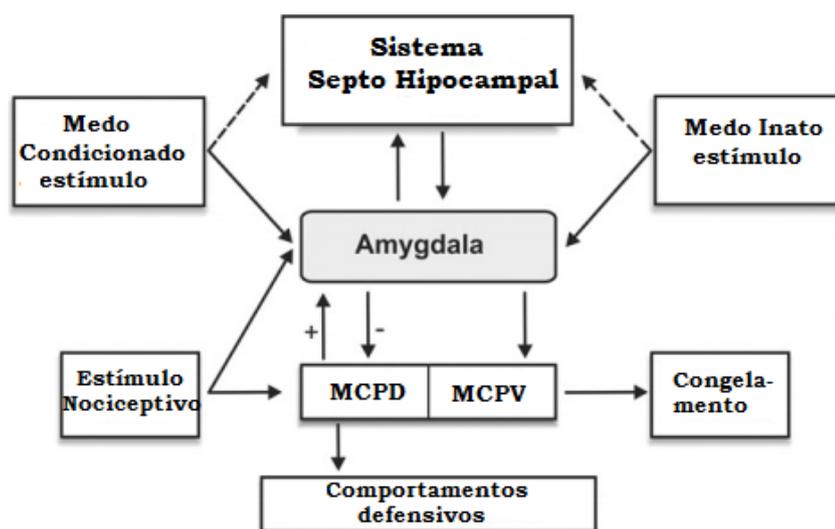


Figura 2. Ativação de substratos neurais distintos em função da natureza ameaçadora do estímulo.

Segundo o esquema acima, o sistema septo-hipocampal poderia ser responsável pelo componente cognitivo da ansiedade, ao passo que a amígdala seria uma estrutura integrativa dos componentes afetivos (Gray e McNaughton, 2000). Projeções da amígdala para a parte ventral da matéria cinzenta periaquedutal (MCPV) poderiam estar associadas com a ocorrência do congelamento defensivo. De fato, segundo Fanselow (1980), a amígdala teria a função de decodificar os estímulos do ambiente e sinalizar para a parte ventral da matéria cinzenta periaquedutal (MCPV) sobre o nível de ameaça apresentado para o organismo. Este sistema neural longitudinal e organizado hierarquicamente teria a função de selecionar, organizar e executar a reação defensiva comportamental e neurovegetativa mais apropriada.

Além da circuitaria neural associada a comportamento de defesa inibitório, existe também um sistema diferente responsável por um padrão de defesa completamente oposto. Este padrão de defesa envolve padrões vigorosos de comportamento ativo (reações de luta e fuga) diante de ameaças proximais, geralmente associadas com nocicepção. A matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) parece ser a estrutura principal responsável por organizar estes comportamentos defensivos, pois a mesma recebe as principais projeções associadas com processamento de dor (Brandão et al., 2008).

De grande relevância é o fato de a amígdala e a MCPD poderem vir a trabalhar de maneira oposta. A ativação da MCPD através de estímulos nociceptivos pode acionar a amígdala a produzir medo condicionado. Por outro lado, a ativação da amígdala através de estímulos de perigo inato ou condicionado pode neutralizar comportamentos vigorosos de defesa associados à MCPD. De fato, já foi verificado que o condicionamento de medo ao contexto que envolve ativação da amígdala pode acionar uma reação de analgesia que pode inclusive inibir ou diminuir respostas nociceptivas vindas de dois modelos de dor: reflexo de retirada do rabo, um modelo largamente utilizado, e o teste de formalina, outro modelo mais complexo e com respostas mais elaboradas (Fanselow, 1984). Em adição, tem-se visto que o condicionamento de medo contextual pode inibir respostas vigorosas de pulos e corridas eliciadas por choques nas patas, e de maneira complementar verificou-se também que o condicionamento de medo ao contexto pode inibir a ocorrência de respostas de fuga eliciadas pela estimulação elétrica e/ou química da MCPD (Magierek et al., 2003; Galvão et al., 2010).

De acordo com o esquema proposto por Brandão et al (2008), podemos assumir então que as porções ventrais e dorsais da MCP atuam em diferentes papéis na reação de defesa. Enquanto que o eixo Amígdala-MCPV parece estar envolvido na ocorrência do comportamento de congelamento, a circuitaria neural do medo na MCPD estaria mais associada com formas mais vigorosas de comportamento de defesa. Delgado et al (1954) mostraram que animais em laboratório rapidamente aprendiam a operar um mecanismo que desligava a passagem de corrente elétrica na MCPD. De fato, Brandão et al (1982/1990), em trabalhos anteriores, confirmaram que a estimulação elétrica da MCPD evocava extremas reações aversivas que eram atenuadas pela injeção de morfina. Está claro, inclusive, que a estimulação elétrica da MCPD pode aumentar o ritmo cardíaco, pressão sanguínea, hiperventilação, a manifestação do comportamento de congelamento e a alternância entre pulos e corridas, em intensidades maiores. Levamos em conta que as estratégias de defesa citadas são expressas em situações naturais quando o predador está muito perto ou em direto contato com a presa (Blanchard, Griebel e Blanchard, 2001). Salienta-se também que, em termos de validação e abordagem farmacológica, as manifestações de medo incondicionado têm sido propostas como um modelo animal de ataque de pânico (Deakin e Graeff, 1991; Schenberg et al., 2001). Conseqüentemente, o mau funcionamento

da MCPD, estrutura retratada como o centro primordial responsável por reações de defesa, poderia estar relacionado com o AP. De fato, a MCPD é a melhor opção na organização do comportamento de fuga evocado por ameaças proximais.

A importância da MCPD na etiologia do AP foi verificada também pelo fato de a estimulação elétrica desta estrutura induzir sintomas de pânico em pacientes neurocirúrgicos (Tab1). Os sintomas manifestos foram de palpitação, hiperventilação, sensação subjetiva de morte iminente, extremo terror e desejo de fuga (Nashold, Wilson e Slaughter, 1969). Esta evidência citada e outras encontradas ao longo dos anos acabaram por colocar a MCPD no patamar de estrutura potencialmente envolvida no transtorno de pânico (Deakin e Graeff, 1991; Graeff et al, 1997; Del Ben e Graeff, 2009).

Tabela 1. Similaridade entre sintomas observados durante um ataque de pânico com a estimulação da MCPD em seres humanos e ratos de laboratório. Baseado em Landeira-Fernandez e Cruz (2007).

Similaridades	Natureza do sintoma	
	Sistema nervoso central	Sistema nervoso periférico
Ataque de pânico.	Terror ou medo intenso, sentimento de morte iminente e medo de estar ficando louco.	Taquicardia, hipertensão arterial, asfixia, hiperventilação e sudorese.
Estimulação elétrica da MCPD em humanos.	Sentimento abrupto de ansiedade e medo de morrer.	Taquicardia, hipertensão arterial, hiperventilação, sudorese e piloereção.
Estimulação elétrica da MCPD em ratos.	Resposta de alerta e fuga. Aquisição de comportamento para terminar a estimulação.	Taquicardia, hipertensão arterial, hiperventilação e piloereção.

1.4

Respostas de Defesa: O Congelamento

O congelamento é definido como uma completa ausência de movimento corporal, excetuando aqueles responsáveis pela respiração (Bolles e Collier, 1976). Landeira-Fernandez, Cruz e Brandão (2006) afirmam que duas classes de estímulos podem vir a ativar a resposta de congelamento: Os estímulos naturalmente ameaçadores, que são devidamente reconhecidos de forma inata pelo animal e estímulos condicionados de perigo, que são adquiridos através do processo de aprendizagem. O animal vir a reconhecer o estímulo inato de perigo independente do processo prévio de aprendizagem. Este reconhecimento está presente em todos os indivíduos da mesma espécie. Embora ratos criados em laboratórios não tenham tido experiência prévia com seus predadores naturais, os

mesmos reagem não apenas de forma defensiva ao gato (Lester e Fanselow, 1985), mas também quando o ambiente dá sinais da presença de um possível predador. Podemos citar, como exemplo, o odor de gato (Lester e Fanselow, 1985). O cheiro deixado por um rato, submetido a uma situação estressante, também é captado por indivíduos da mesma espécie (Fanselow, 1985) e a estimulação tátil feita por humanos na cabeça e costas do rato fazem o mesmo congelar também (Fanselow e Sigmundi, 1986). Em qualquer uma destas situações, o comportamento de congelamento pode ser verificado assim que os ratos são expostos a estes estímulos logo pela primeira vez.

Importante ressaltar que, além dos estímulos de perigo, que são reconhecidos de maneira inata pelo rato, existem outros tipos de estímulos que têm a capacidade também de eliciar o comportamento de congelamento através da aprendizagem associativa. Temos como exemplo o som, a luz ou o contexto ambiental como formas de indução de congelamento através de uma aprendizagem associativa junto com um estímulo aversivo incondicionado (ex: choque nas patas). O condicionamento utilizando o choque nas patas é extremamente rápido, simples e atua de forma duradoura. Num exemplo de experimento típico demonstrando esta forma de aprendizagem, o experimentador coloca um rato numa caixa experimental por alguns minutos (período de habituação) e em seguida uma série de choques nas patas (de curta duração e pequena intensidade) é apresentada. No dia seguinte recoloca-se o animal na mesma caixa experimental e não apresenta nenhum choque. O que será observado é que os estímulos contextuais que ficaram associados aos choques nas patas foram capazes de ativar respostas defensivas de congelamento. Segundo Landeira-Fernandez (1996), a intensidade da corrente elétrica, utilizada no condicionamento contextual, parece estar diretamente relacionada com a magnitude da resposta de congelamento.

O comportamento de congelamento produzido através do paradigma de condicionamento contextual aversivo está sob o controle dos estímulos contextuais que foram previamente associados ao choque. Sendo assim, se fizermos um teste de mudança de contexto, que se caracteriza pela transferência do rato para outra caixa experimental após apresentação do choque, observa-se que a resposta de congelamento estará ausente (Fanselow, 1980). Como citado anteriormente, as respostas de congelamento condicionado é um tipo de

comportamento de defesa associado a substratos de medo gerenciados pela MCPV.

A modulação bidirecional da resposta de congelamento contextual através do efeito de fármacos que aumentam ou reduzem sintomas ansiogênicos em humanos tem sido utilizada para a validação deste procedimento como um modelo animal de TAG. Drogas que têm a eficácia já estabelecida no tratamento do TAG (ansiolíticos benzodiazepínicos) têm a capacidade de atenuar ou abolir a resposta de congelamento contextual em animais, dentro de uma dosagem semelhante à utilizada clinicamente em humanos. Entretanto, certos compostos ansiogênicos (beta-carbolinas), conseguem produzir sintomas ansiogênicos em humanos e aumentam o nível de resposta condicionada do congelamento contextual em ratos (Conti, Maciver, Ferkany e Abreu, 1990). Com estes resultados, podemos verificar um isomorfismo entre o comportamento de congelamento acionado por estímulos contextuais associados a choques elétricos e o TAG. Estudos anteriores, por sua vez, apresentaram o fato de que a resposta de congelamento condicionado está associada com a MCPV, pois a destruição desta área conseguia abolir a expressão do comportamento de congelamento condicionado (Fanselow et al., 1995). Projeções entre o complexo amigdalóide e a MCPV sugerem que a atividade neural que é responsável por ativar a MCPV para a produção de uma resposta de congelamento teria origem no complexo amigdalóide (Carrive, Lee e Su, 2000; Rizvi, Ennis, Behbehani e Shipley, 1991). Em adição, a inativação reversiva destas estruturas produzidas por microinjeções de muscimol e lidocaína reduzia a resposta de congelamento contextual (Carrive, Lee e Su, 2000; Landeira-Fernandez, 1996; Macedo, Martinez e Brandão, 2006).

De acordo com Brandão et al (2008), a MCPV parece estar envolvida no aspecto motor do comportamento de congelamento, que é provavelmente controlado por projeções descendentes da amígdala para esta região. A MCPD, por sua vez, parece estar mais envolvida com controle sensorial e aspectos mais afetivos do congelamento incondicionado. Um exemplo disto é a estimulação elétrica gradual de ambas MCPV e MCPD produzirem inicialmente o comportamento de alerta e congelamento. O congelamento induzido pela estimulação elétrica da MCPV diminui com o término da estimulação. Entretanto, estimulações elétricas da MCPD induzem a um longo período de congelamento que permanece em altos níveis, mesmo após a interrupção da

estimulação (Vianna, Graeff, Brandão e Landeira-Fernandez, 2001; Vianna, Landeira-Fernandez, Graeff e Brandão, 2001). Salienta-se a importância de estudos anteriores que sugerem que tanto o comportamento de alerta quanto o de congelamento eliciado pela MCPD, antes do comportamento de fuga ocorrer, são respostas comportamentais preparatórias para a fuga do animal e são mediadas pelos mesmos processos neuroquímicos (Brandão, DiScala, Bouchet, Schmitt, 1986; Brandão et al., 1999; Brandão et al., 2005; Schmitt et al., 1986).

Evidências sobre o envolvimento da MCPD na geração e elaboração do comportamento defensivo têm sido largamente reportadas através de dados comportamentais, imuno-histoquímicos e eletrofisiológicos (Brandão et al., 1999; Brandão et al., 2003; Graeff, 1990; Graeff, 2002). Vários estudos inclusive obtiveram resultados que indicavam a MCPD criticamente envolvida na regulação de reações de defesa a estímulos de perigo iminente (Blanchard e Blanchard 1989; Blanchard, Griebel e Blanchard, 2001). Como citado anteriormente, a corrida e pulos eliciados por uma ameaça proximal podem estar relacionados com o AP, estando a MCPD como estrutura crítica na mediação desta condição, pelo fato de tanto a estimulação elétrica quanto a química mimetizarem os efeitos de um estímulo proximal de perigo (Brandão, Aguiar e Graeff, 1982). Os substratos neurais do medo na MCPD parecem estar de fato relacionados com o transtorno de pânico. Evidências vêm-se acumulando ao longo dos anos com a noção de que a ansiedade e o transtorno de pânico poderiam ativar diferentes circuitarias neurais, que se dissociam inclusive farmacologicamente. Seguindo este conceito, o comportamento de congelamento pode ser conceitualizado como uma resposta diante de um nível intermediário de ameaça ou a uma ameaça proximal (junto com a sensação dolorosa). Por conta disto, duas respostas de congelamento podem ser eliciadas de acordo com o tipo de ameaça em questão (proximal ou distal). Estes tipos de congelamento, como falado anteriormente, podem se dissociar farmacologicamente. Enquanto o congelamento relacionado com uma ameaça distal é sensível a ansiolíticos, o congelamento relacionado com uma ameaça proximal é resistente a ansiolíticos. Entretanto, este último tipo de congelamento é sensível aos efeitos panicolíticos dos inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS), como, por exemplo, a fluoxetina, sugerindo que este efeito é resultante do recrutamento dos substratos neurais de aversão localizados na MCPD (Santos et al., 2005; Santos, Martinez e Brandão, 2006).

Como vimos anteriormente, a estimulação elétrica da MCPD, além de produzir o comportamento de congelamento, pode, em maiores intensidades, levar ao comportamento de fuga. Contudo, este comportamento de fuga extingue-se, assim que a estimulação elétrica da MCPD cessa, dando início a uma nova resposta de congelamento: o congelamento pós-fuga (CPF). Durante esta resposta de congelamento, tanto a MCPD como o núcleo dorsolateral do tálamo são concomitantemente ativados. Sugere-se então que este tipo de informação suba para estruturas cerebrais mais rostrais, ao invés de esta resposta de congelamento ser apenas o resultado de uma estrutura associada com comportamento motor (Borelli, Ferreira-Netto, Coimbra e Brandão, 2005; Ferreira-Netto, Borelli e Brandão, 2005). De importância é o fato de lembrarmos que o congelamento evocado pela estimulação elétrica da MCPD parece estar envolvido com a resposta preparatória de fuga. Sabemos, contudo, que a resposta inibitória do CPF parece se diferenciar bastante daquela obtida pela estimulação direta da MCPD, bem como daquela induzida por estímulos contextuais aversivos. A resposta comportamental do CPF que se tem início após o término da estimulação elétrica da MCPD parece ser independente de qualquer processo de aprendizagem associativa, se diferenciando, assim, da resposta induzida por estímulos contextuais aversivos (Vianna, Landeira-Fernandez e Brandão, 2001). Mais relevante ainda, este comportamento de defesa está sob influência do complexo amigdalóide, ao contrário daquela resposta de congelamento eliciada diretamente pela estimulação elétrica da MCPD. Microinjeções de um agonista gabaérgico na amígdala acabaram por reduzir a resposta do CPF de forma similar à resposta de congelamento induzida por estímulos contextuais aversivos (Ruiz-Martinez et al., 2006), sem mudar os limiares de congelamento ou fuga eliciados pela estimulação elétrica da MCPD (Oliveira, Nobre, Brandão e Landeira-Fernandez, 2004; Santos, Martinez e Brandão, 2006; Brandão et al., 2008).

Levando-se em conta que o comportamento de congelamento que se manifesta após o término da estimulação elétrica da MCPD se diferencia da resposta de congelamento obtido diretamente pela estimulação elétrica da MCPD (modelo animal de ataque de pânico), assim como daquele congelamento obtido através de estímulos contextuais aversivos (modelo animal de TAG), torna-se possível levantar a hipótese de que este congelamento pode vir a representar outro transtorno de ansiedade (Landeira-Fernandez, de Mello Cruz e Brandão, 2007).

Algumas observações clínicas apontaram para diferenças acerca da reação intensa de ansiedade (ataque de pânico) e a preocupação e apreensão constante que os indivíduos que sofrem de pânico, de terem um novo episódio de AP. Esta preocupação constante se caracteriza como um elemento importante, uma ansiedade antecipatória, que se faz presente no transtorno de pânico, mas está ausente no AP.

O complexo amigdalóide, por ser uma estrutura neural que se relaciona com ansiedade antecipatória, exercendo uma modulação sobre o CPF eliciado, após a estimulação elétrica da MCPD, mas não sobre a resposta de congelamento eliciado pela estimulação direta da MCPD, sugere que a resposta do CPF pode vir a estar associada com o transtorno de pânico, mas não ao ataque (Landeira-Fernandez, de Mello Cruz e Brandão, 2007). Resultados farmacológicos tendem a corroborar esta hipótese. Estudos anteriores verificaram que agonistas serotoninérgicos que são utilizados no tratamento do transtorno de pânico, mas não no AP, de forma paradoxal aumentam os sintomas de ansiedade. De maneira análoga, a microinjeção de um agonista serotoninérgico no complexo amigdalóide foi capaz de diminuir a expressão do CPF após a estimulação da MCPD. Foi verificado, contudo, um aumento na manifestação do congelamento obtido através de estímulos contextuais aversivos, no caso, choque nas patas (Ruiz-Martinez, 2006).

2

O Teste de Formalina. Considerações Gerais

A nociceção seria uma sensação produzida por um estímulo com uma intensidade suficiente para ocasionar uma lesão em potencial e conseqüentemente provocar uma série de comportamentos protetores dos tecidos lesados. Por sua vez, a expressão da resposta nociceptiva é determinada por uma série de fatores como: anatomia, morfologia, fisiologia neural, além da sua modulação através de vários fatores biológicos tanto endógenos quanto exógenos (Kavaliers, 1988a).

Como falado anteriormente, a habilidade dos animais em responderem a estímulos aversivos do ambiente é uma característica básica do sistema de defesa animal. Este comportamento adaptativo implica que nociceptores estão presentes para responderem às aferências sensoriais com comportamentos que podem ser reflexos ou não. Os nociceptores podem vir a ser mais sensíveis a um estímulo nocivo específico, podendo inclusive codificar a sua intensidade.

A dor é uma experiência perceptual com certa complexidade e que de fato é essencial para qualquer mamífero. A percepção da dor age como um sistema de aviso, alertando o sujeito para possíveis danos a sua integridade física (Kavaliers, 1999). A Associação Internacional de Estudos da Dor define a dor em humanos como “uma experiência desagradável sensorial emocional associada como dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”. Esta definição sofreu uma ampliação quando foi incluída a expressão “comportamentos de dor”, que podem variar de comportamentos visíveis ou audíveis a comportamentos aversivos e/ou modificações comportamentais aprendidas. Define-se a dor em animais como: “uma experiência sensorial aversiva causada por uma injúria potencial ou real que provoca reações vegetativas e motoras protetoras. Resulta em aversão aprendida e pode modificar comportamentos específicos da espécie, incluindo comportamento social (Kavaliers, 1988a). No caso, a dor corresponde à atividade de nociceptores por consequência de estimulações nocivas. As qualidades emocionais desagradáveis envolvidas na sensação da dor e, no caso, a forte motivação de remover a fonte da estimulação nociceptiva parece compreender a experiência que é amplamente conhecida como sofrimento. A ocorrência do sofrimento em animais é normalmente inferida através de mudanças

comportamentais e fisiológicas, como, por exemplo, reflexos flexores, aumento da pressão sanguínea e/ou vocalizações, todas elas sendo concomitantes de dor severa em humanos.

Os testes mais tradicionais de nocicepção, como por exemplo, o “teste de retirada de cauda” e da “placa quente” baseia-se em estímulos físicos de alta intensidade. A experiência nociceptiva é de curta duração, sendo inviável acessar com acuidade mecanismos modulatórios que podem ser ativados pelo estímulo em si.

O teste de formalina se diferencia dos demais testes de dor, pois é possível verificar a resposta do animal a uma dor contínua e moderada gerada por tecido lesionado. Devido a esta relação com tecido lesionado, acredita-se que este teste produza um modelo mais válido de dor clínica do que os testes de mecanismo físico ou de estímulo térmico (Dubuisson e Dennis, 1977; Abbott et al., 1981, 1982b; Alreja et al., 1984). Leva-se em conta que a injeção de formalina pode induzir a estados que se aproximam mais de condições clínicas do que de estimulações cutâneas (testes de reflexos ou limiares).

Dubuisson e Dennis apresentaram o teste de formalina em 1977. Desde então um grande número de pesquisadores usaram e ainda usam este modelo para tentar explicar uma série de problemas.

O presente uso da formalina como agente nociceptivo foi precedido pelo trabalho de Lewis e Kellgren (1939) e outros pesquisadores que injetaram volumes pequenos de salina hipertônica em indivíduos para produzir dor experimental. Mais tarde, Selye (1949) e Winter (1965) usaram formalina como estímulo em estudos de inflamação em ratos. Injeções subcutâneas de uma pequena quantidade de formalina diluída foram também utilizadas como estímulo nociceptivo em gatos (O’ Keefe, 1964; Melzack e Melinkoff, 1974). Em 1977, Dubuisson e Dennis introduziram uma modificação deste procedimento em gatos e ratos (Dubuisson e Dennis 1977). Dubuisson e Dennis não apenas descreveram em detalhes o comportamento induzido pela injeção de formalina, mas também desenvolveram um esquema de quantificação do comportamento de dor manifesto. A quantificação foi baseada no tempo total que o animal levou em diferentes estados comportamentais que foram caracterizados como: elevação, lambida, mordida e balanço da pata injetada, além da redução do peso em cima da mesma. Dubuisson e Dennis descreveram inclusive a ocorrência de duas distintas

fases de comportamento nociceptivo no rato. Uma com início imediato, após a injeção de formalina, com duração de 3 a 5 minutos e provavelmente ocorrendo devido à estimulação química de nociceptores (Dubuisson e Dennis, 1977; Hunskaar et al., 1985b). Em seguida, existe um período de 10 a 15 minutos no qual os animais mostram pouquíssimo comportamento nociceptivo; a segunda fase se inicia 15 a 20 minutos após a injeção e com duração de 20 a 40 minutos.

Como já verificado, o estímulo adquirido pela injeção subcutânea de formalina é tônico, induzindo o animal a uma resposta comportamental com uma duração de praticamente 1 hora e se diferenciando dos demais testes com estímulos físicos, como, por exemplo, o “teste da retirada de cauda” e da placa quente. O estímulo de longa duração facilita a observação dos mecanismos de modulação atuantes no teste, assim como o papel de sistemas de regulação de dor endógenos, como, por exemplo, o sistema opioide (Porro et al., 1988; 1991c).

Dubuisson e Dennis também reportaram que a injeção de formalina causa dores latejantes em humanos, de difícil localização específica e com um curso de tempo correspondente às mudanças comportamentais observadas nos animais. De fato, o teste de formalina sofreu mudanças ou adaptações em seu método, quando trabalhado com ratos (Dennis e Melzack, 1980, 1983; Dennis et al., 1980; Abbott et al., 1982b; Abbott e Melzack, 1983; Coderre et al., 1984a; Abbott 1988; Lin et al., 1989; Gamble e Milne 1990; Pertovaara et al., 1990; Fanselow, 1984), gatos (Melzack e Melinkoff 1974; Dubuisson e Dennis, 1977; Auerbach et al., 1985; Shima et al., 1987) e macacos (Alreja et al., 1984).

2.1.

O Teste de Formalina: Sítios de injeção

Nas primeiras descrições do teste, assim como em estudo subsequentes, a formalina teve como seu sítio de injeção as patas anteriores do animal (Dubuisson e Dennis 1977; Amodei e Paxinos, 1980; Dennis et al., 1980; Abbott et al., 1981, 1982a; Abbott e Melzack 1982, 1983; Takahashi et al., 1984a; Ansuategui et al., 1989; Pertovaara et al., 1990; Porro et al., 1991c). Entretanto, alguns pesquisadores utilizaram as patas posteriores (Abbott et al., 1984; Coderre et al., 1984a,b; Fanselow, 1984; Fasmer et al., 1985, 1986 a,b, 1987a,b,c 1989; Hunskaar et al., 1985a, b, 1986a,b,c 1987, 1989; Sugimoto et al., 1986;

Calgagnetti et al., 1987; Fanselow et al., 1989a; Shibata et al., 1989b Gamble e Milne 1990a,b Mclaughlin et al., 1990; Ohkubo et al., 1990; Wheeler-Aceto et al., 1990; Rosland, 1991 e Cowan, 1991). Como o comportamento de lambida das patas posteriores raramente ocorre durante um comportamento de grooming normal, a resposta de nocicepção advinda de uma injeção nestas patas pode vir a ser mais específica do que uma injeção nas patas anteriores.

No caso do teste de formalina, têm sido utilizadas várias localizações para as injeções nas patas. A maioria dos pesquisadores, por sua vez, prefere dar a formalina subcutânea. O sítio mais comum usado para injeção é a superfície dorsal da pata (Dubuisson e Dennis, 1977; Amodei e Paxinos, 1980; Fanselow, 1984; Fanselow et al., 1989; Rosland, 1991; Wheeler-Aceto e Cowan, 1991). Embora injeções na região plantar da pata tenham sido utilizadas (Abbott et al., 1984; Coderre et al., 1984a,b; Fujii et al., 1987; Abbott 1988; Gamble e Milne 1990), no caso é possível que a escolha do sítio de injeção tenha de fato algum impacto na intensidade e no padrão de resposta do animal injetado, porém novos estudos devem ser feitos para avaliar se de fato o sítio de injeção gera uma diferença significativa no comportamento nociceptivo observado no teste de formalina.

Em adição, para investigações especiais, o teste de formalina foi utilizado em outras partes do corpo. Como exemplo, temos as injeções na região trigeminal que foram utilizadas na investigação da dor orofacial (Clavelou et al., 1989; Raboisson et al., 1990) e as injeções subcutâneas feitas nas costas de cobaias (Takahashi et al., 1984).

3

Circuitaria Neural da Dor: Considerações Gerais

Por mais de 60 anos, as experiências de dor têm sido vistas como associadas com vários estados emocionais negativos, incluindo depressão, ansiedade, medo e raiva (Chapman et al., 1946; Hemphill et al., 1952; Ramzy e Wallerstein, 1958; Schachter, 1957; Webb e Lascelles, 1962). Os estudos geralmente encontram que níveis elevados de emoção negativa estão associados com uma grande intensidade de dor aguda e crônica (Bruehl et al., 2002; Janssen, 2002; Linton, 2000; Staud, 2004) e uma grande possibilidade de se desenvolver dor crônica (Linton, 2005). Embora sejam significativas estas associações entre dor e estados emocionais negativos, alguns mecanismos relacionados com o sofrimento afetivo do indivíduo permanecem com o seu entendimento ainda incompleto.

Indo por uma vertente evolucionista, uma associação entre emoções e resposta de dor poderia ser esperada, se se levar em conta que a dor num passado remoto seria apenas o resultado de situações que ameaçam a sobrevivência de um organismo (ex: um ataque). Medo e pânico poderiam ser as duas emoções mais vezes eliciadas sob circunstâncias de ameaça, por eles refletirem estados motivacionais que subservem as respostas de “luta ou fuga” (Averill, 1983; Fendt e Fanselow, 1999; Sowards e Sowards, 2002). Em adição, estados emocionais podem de fato afetar a dor e, em alguns casos, ficar associados com a resposta de analgesia. Por exemplo, existe uma rica literatura animal indicando que altas reações de medo são associadas com reduções subsequentes na sensibilidade à dor, em parte via mecanismos de analgesia endógenos derivados da MCP (De Oca et al., 1998; Lichman e Fanselow, 1990). Mais à frente estes mecanismos de analgesia serão debatidos de maneira mais clara e específica.

Revisões de neuroimagens da dor na literatura concluíram que as respostas a dores agudas são de maneira consistente associadas com a atividade neural de regiões cerebrais que incluem o córtex pré-frontal dorsolateral, ínsula e córtex cingulado anterior (Peyron et al., 2000). De acordo com Devinsky et al (1995), o CCA pode ser subdividido em divisões afetivas e cognitivas. Mais tarde, Vogt (1996, 2009) determinaria que a melhor forma de se compreender melhor o córtex

cingulado seria dividindo o mesmo em 4 sub-regiões com determinadas características que serão desenvolvidas mais à frente.

Interações funcionais entre áreas cerebrais relacionadas com a dor feitas com estudos de imagens de ressonância magnética funcional sugeriram resultados que permitem dizer que o CCA exerce uma influência na MCP (Valet et al., 2004). Em adição, análises de tomografia por emissão de pósitrons dão suporte à ideia de que o CCA exerce uma influência na dor através de ativações descendentes em direção a MCP (Peyron et al., 2007). Esta correlação entre CCA-MCP na circuitaria de dor é consistente também com alguns resultados obtidos em macacos em que projeções do córtex pré-frontal (CXPF), córtex cingulado anterior (CCA) e ínsula se projetam para a MCP (Devinsky et al., 1995; Hardy e Leichnetz, 1981). No caso, é interessante como a MCP é uma das principais fontes de analgesia opioide (Devinsky et al., 1995). Resumindo, vários estudos sugerem que a atividade relacionada com a dor no CCA, CXPF e ínsula podem todos eliciar a mediação de analgesia endógena através de conexões descendentes para a MCP (Wagner et al., 2007).

3.1

Circuitaria Neural da Dor: Relação com Pânico

Como visto anteriormente, da mesma forma que existe um debate envolvendo a relação pela qual a ansiedade se relaciona com o ataque de pânico, uma discussão acerca da circuitaria neural responsável pela origem destas duas psicopatologias persiste. Autores já citados propõem uma relação linear entre a ansiedade e o pânico, acreditando que ambas as disfunções constituiriam apenas variações de intensidade de um mesmo fenômeno dentro de um único sistema relacionado ao medo. Contudo, se tanto a ansiedade quanto o pânico constituírem manifestações independentes, logo, podemos sugerir que o pânico estaria relacionado com uma circuitaria neural distinta daquela envolvida no medo.

O presente estudo está baseado na hipótese de que existem sistemas neurais específicos ligados à manifestação do pânico. Sugerimos inclusive que o ataque de pânico estaria relacionado com certas disfunções em determinados sistemas neurais responsáveis pela resposta de defesa a estímulos nociceptivos. Como o ataque de pânico se caracteriza pela ausência de qualquer estímulo que

seja responsável pelo seu desencadeamento, podemos sugerir que o pânico seria uma ativação desta circuitaria neural responsável pela nocicepção na ausência de qualquer estímulo nociceptivo.

A diferenciação entre a ansiedade patológica e o ataque de pânico como consequência de disfunções em sistemas adaptativos relacionados com o medo e com a dor, pode ser mais bem elucidada através de estímulos que de maneira natural ativam estes sistemas. De acordo com Landeira-Fernandez e Cruz (2007) os circuitos neurais envolvidos no sentimento de dor são ativados por estímulos nociceptivos, considerados como estímulos proximais exatamente por fazerem contato físico com o indivíduo. De fato, estímulos proximais representam uma ameaça real ao indivíduo em oposição aos estímulos distais de perigo, que ativam uma circuitaria relacionada ao medo, representando assim uma possível ameaça. Uma das características principais do ataque de pânico é a manifestação de intensas reações de defesa. Com isso, podemos sugerir que a ocorrência do ataque de pânico esteja ligada com disfunções de sistemas neurais mais primitivos, que seriam responsáveis por reações defensivas rápidas e intensas diante de estímulos de perigo real.

A capacidade da ansiedade em inibir a ocorrência de pânico (Magierek et al., 2003; Galvão et al., 2010) evidencia que estes dois transtornos são de natureza diferente. Em adição, é de relevância destacar que a relação inibitória entre ansiedade e pânico é a mesma relação que o medo mantém com a dor. Experimentos passados indicam que a ativação de sistemas relacionados ao medo tem a capacidade de inibir reações a estímulos nociceptivos (Cruz e Landeira-Fernandez, 2001). Com estes resultados, a hipótese de que a etiologia do ataque de pânico poder estar relacionada com circuitos neurais responsáveis pelo processamento de estímulos nociceptivos se fortalece.

3.2

Circuitaria Neural da Dor: Processo de Estímulos Nociceptivos

Informações neurais de um estímulo nociceptivo têm a sua origem em receptores ou terminações nervosas espalhadas pela pele, nos músculos e nos órgãos internos do corpo. Os receptores envolvidos na nocicepção transformam

os estímulos de dor em impulsos neurais e estes por sua vez são transmitidos para o sistema nervoso central.

De importância é o fato de que estudos psicofísicos indicam a existência de pelo menos duas dimensões relacionadas com a experiência subjetiva da dor: uma experiência associada a certos aspectos sensoriais e a outra experiência relacionada com aspectos afetivos desse estímulo (Prince, 2000). Por sua vez, estas duas dimensões da dor refletem a ativação de diferentes circuitarias neurais frente a um mesmo estímulo nociceptivo. Deve-se salientar que o aspecto afetivo do estímulo nociceptivo está relacionado com projeções do tálamo para o córtex cingulado anterior (CCA) e que exatamente a parte rostral desta área é especializada em estímulos de nocicepção.

De acordo com Landeira-Fernandez e Cruz (2007), o melhor exemplo para ilustrar a dissociação entre os aspectos sensoriais e afetivos frente a um estímulo de dor, são as reações de indivíduos portadores de dores crônicas após a remoção cirúrgica de parte do córtex cingulado anterior. No caso, estes indivíduos relatam que embora possam sentir ainda a presença do estímulo nociceptivo, aquele aspecto desagradável associado ao estímulo deixa de existir e conseqüentemente o mesmo já não incomoda mais.

De forma curiosa, certas situações podem de fato gerar um sentimento de dor mesmo na ausência de qualquer estímulo nociceptivo. De acordo com Eisenberger et al (2003), os resultados obtidos através de técnicas de neuroimagens sugeriram que indivíduos, quando colocados numa situação de exclusão social, não apenas reportaram uma forte sensação de mal-estar, mas também uma ativação do CCA, na região relacionada com aspecto afetivo do processamento do estímulo nociceptivo. Por sua vez, Eisenberger et al. (2006) e MacDonald e Leary (2005) sugerem inclusive uma forte correlação entre os sentimentos dolorosos relatados pelos indivíduos nas várias situações de separação e exclusão social e os sentimentos relacionados com o aspecto afetivo do processamento de estímulos nociceptivos.

Algumas projeções do tálamo para a amígdala estão relacionadas com a capacidade que o estímulo de dor tem ao promover aprendizagem (associativa) com estímulos ambientais que estão presentes antes da ocorrência do estímulo nociceptivo. Este tipo de aprendizagem se estabelece devido à convergência de estímulos ambientais com estímulos nociceptivos que chegam até a amígdala.

Sendo assim, as reações que têm relação com o sistema neural de medo observadas após a ocorrência de um estímulo de dor, não foram acionadas pelo estímulo doloroso, mas sim por estímulos neutros que ficaram associados ao estímulo de dor (Landeira-Fernandez, 1995).

Além das projeções para o tálamo, um grande fluxo de informações de dor segue para estruturas mais caudais do sistema nervoso central, que se localizam no tronco encefálico, como a MCPD e os núcleos da rafe (principal gerador de serotonina no cérebro). A MCPD, por sua vez, está relacionada com respostas primitivas, porém altamente eficazes contra estímulos de dor. Este tipo de resposta envolve a ativação de um comportamento de defesa que visa afastar o animal da presença deste estímulo de dor.

A ativação da MCPD tem a capacidade de produzir também uma série de reações fisiológicas que são mediadas pela área hipotalâmica. Em contraposição ao sistema neural de medo responsável pela regulação da atividade não só do meio interno mediante uma grande ativação do sistema hormonal, como também de uma interação entre sistema simpático e parassimpático (Graeff et al., 2005).

3.3

Circuitaria Neural da Dor: Etiologia do Pânico

Neste trabalho sugerimos que os ataques de pânico tenham uma relação com uma ativação patológica de uma determinada circuitaria relacionada com o processamento de estímulos nociceptivos na ausência de qualquer estímulo de dor. David Barlow (1988) por sua vez, refere-se ao ataque de pânico como um tipo de “alarme falso”. O que David Barlow sugere é que não existe um estímulo externo responsável pela origem da reação de defesa, que acomete o indivíduo em situações diferentes. De fato, o ataque de pânico está em oposição a outros tipos de transtorno de ansiedade em que existe sempre um estímulo específico responsável pela origem da ansiedade no indivíduo.

Como visto anteriormente, a estimulação elétrica da MCPD em humanos gera efeitos muito parecidos com os sintomas presentes durante um ataque de pânico (Nashold, Wilson e Slaughter, 1969). Com isto, sugere-se que a MCPD esteja envolvida na etiologia do ataque de pânico. Neste caso, a MCPD junto com áreas hipotalâmicas que são responsáveis pela modulação do sistema nervoso

autônomo, ativariam uma série de respostas fisiológicas que eventualmente seriam processadas no córtex cingulado anterior, na ausência de qualquer estímulo externo que justificasse as intensas reações autonômicas.

Algo que devemos deixar claro, é que o AP é apenas um dos elementos que constituem o transtorno de pânico. O transtorno de pânico também se caracteriza pela presença de sinais ansiogênicos diante de estímulos ou situações que ficaram associadas com a ocorrência do ataque de pânico. Castilho e Brandão (2001) demonstraram que a estimulação elétrica da MCPD feita de forma repetitiva em animais, pode acabar ficando associada ao contexto em que ocorreram as estimulações da MCPD. Um aspecto relevante desta forma de aprendizagem é a ocorrência de associações entre os estímulos contextuais e a estimulação da MCPD de forma muito lenta, tendo a possibilidade de alguns animais não apresentarem essa forma de aprendizagem. Este tipo de padrão podemos observar em alguns indivíduos que sofrem de transtorno de pânico e são acometidos de diversas formas de ansiedade elevada, chegando até mesmo a se sentirem impossibilitados de sair de sua residência, o que caracteriza o quadro psicopatológico de transtorno de pânico com agorafobia (DSM-IV-TR, APA, 2002). Em outros casos, a aprendizagem associativa é tão fraca que estes indivíduos que são acometidos por episódios de AP jamais chegam a desenvolver o transtorno de pânico propriamente dito. As formas pelas quais as reações autonômicas são interpretadas pelo córtex cingulado anterior rostral parecem ser variáveis importantes na origem e no curso do transtorno de pânico (Dean Mobbs et al., 2007).

Reis e McNally (1985) desenvolveram o conceito de sensibilidade à ansiedade que estaria relacionado com a capacidade que o sujeito tem de detectar as reações autonômicas presentes numa situação de perigo. De acordo com estes pesquisadores, existem sujeitos mais sensíveis a reações autonômicas, com maior sensibilidade à ansiedade e interpretando-as como algo desastroso ou catastrófico. Estes indivíduos então teriam uma possibilidade maior de desenvolver um transtorno de ansiedade após passarem por um primeiro episódio de ataque de pânico. Por outro lado, pessoas que são menos sensíveis aos sintomas de ansiedade interpretam as reações autonômicas de forma mais branda. Desta forma, o AP e o transtorno de pânico, embora intimamente ligados, são fenômenos distintos. O AP parece ser consequência de um mau funcionamento

de uma circuitaria neural relacionada com o processamento de estímulos dolorosos, ao passo que o transtorno de pânico envolve, além do ataque de pânico, circuitos neurais de ansiedade (Landeira-Fernandez, Cruz., 2007).

Embora tanto a ansiedade patológica quanto o pânico possam vir a manifestar-se de maneira concomitante em um mesmo sujeito, estes fenômenos são relativamente independentes. De fato, Magierek et al. (2003), Galvão et al (2010) e Brandão et al. (2008) demonstraram situações experimentais que indicavam que tanto a ansiedade quanto o pânico poderiam ser induzidos separadamente em animais mediante a ativação dos sistemas neurais de defesa relacionados com o medo e com a dor.

Os transtornos de ansiedade, por sua vez, estão relacionados a sistemas neurais responsáveis por processar, decodificar e interpretar reações a estímulos que indicam uma situação potencial ou real de perigo. Este estudo, por sua vez, propõe que a ansiedade patológica esteja associada com um sistema responsável pelo processamento de estímulos potenciais de perigo que dão origem ao sentimento de medo, enquanto que o ataque de pânico estaria relacionado com uma circuitaria neural responsável pelo processamento de estímulos reais de perigo e que dão origem ao sentimento de dor (Tab2).

O medo envolve estruturas neurais mais rostrais do SNC (ex: amígdala, hipocampo) assim como a ativação do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal que regula a atividade hormonal. Sugere-se que o mau funcionamento desta circuitaria neural pode vir a ser responsável por sintomas relacionados com a ansiedade, enquanto que a dor está mais relacionada com um sistema filogeneticamente mais antigo que envolve estruturas mais caudais do SNC (ex: matéria cinzenta periaquedutal). Sugere-se também que o mau funcionamento desta circuitaria pode levar à ocorrência do AP, e, conseqüentemente, a experiência de se ter um AP pode vir a gerar outros transtornos ansiogênicos, que podem vir a se caracterizar como um transtorno de pânico.

TABELA 2. Características dos dois sistemas funcionais de defesa (medo e dor) e suas respectivas relações com a ansiedade e o pânico. Retirado de Landeira-Fernandez e Cruz (2007).

Características	Sistema funcional de defesa	
	Medo	Dor
Origem filogenética	Recente	Antiga
Ativação	Estímulos distais-perigo potencial	Estímulos proximais-perigo real
Reação comportamental	Inibição	Ativação
Respostas autonômicas	Reduzida	Intensa
Respostas hormonais	Intensa	Reduzida
Manifestação patológica	Ansiedade	Pânico
Intervenção psicofarmacológica	Ansiolítico-sistema gabaérgico	Antidepressivo-sistema serotoninérgico
Intervenção psicoterápica	Reestruturação da atividade cognitiva. Desenvolvimento de hábitos eficazes para lidar com situações ansiogênicas.	Reinteração das reações fisiológicas que caracterizam o ataque de pânico. Alteração de padrões de pensamento catastrófico (sensibilidade à ansiedade).

4

Córtex Cingulado Anterior: Dimensão Afetiva da Dor

De maneira tradicional, como já visto anteriormente, o processamento da dor é visto de acordo com dois domínios cognitivos (Melzack e Casey, 1968). O domínio sensorio discriminativo envolve localização do estímulo e intensidade e, no caso, é acessada de diversas formas incluindo uma escala visual análoga, enquanto o domínio afetivo-motivacional envolve o componente afetivo da dor e, no caso, é medido com níveis de desconforto. Antes da Imagem funcional (por ressonância magnética ou emissão de pósitrons) entrar no uso geral em pesquisas laboratoriais, a ênfase dada era no processo sensorio discriminativo no sistema somatosensorial que incluía o córtex somatosensorial primário, somatosensorial secundário e córtex parietal posterior. Com a introdução da tomografia por emissão de pósitrons (TEP) e imagem funcional por ressonância magnética (IFRM), ficou claro que outras regiões telencefálicas estavam envolvidas durante a estimulação nociceptiva aguda. As novas regiões seriam o córtex motor, áreas pré-motoras, córtex cerebelar e o estriado que eram ativadas durante estimulação nociceptiva aguda (Derbyshire, 2000; Peyron, Laurent e Garcia-Larrea, 2000), mas não se encaixavam facilmente nos dois domínios de processamento de dor baseados em sensação.

O mais importante no contexto atual é o fato de várias estruturas límbicas serem ativadas durante a estimulação nociceptiva do corpo. Estas áreas seriam os núcleos talâmicos intralaminares que se projetam para o córtex límbico, a matéria cinzenta periaquedutal (MCP), a amígdala e o CCA (Vogt, Sikes e Vogt, 1993). Em adição, é possível que a ínsula anterior esteja entre os dois sistemas de dor, estando envolvida nos aspectos de processamento associados com regulações autonômicas, avaliação do estado corporal. Embora o modelo de dois domínios possa ter uma utilidade geral, estimulações nociceptivas podem vir a ativar de 8 a 10 áreas no cérebro, o que indica que deve existir mais de dois domínios de processamento da dor, o que não se enquadra no modelo de dois domínios.

Estudos com imagem funcional indicam que o CCA pode vir a mediar respostas afetivas a estímulos nociceptivos. Os estudos de Paul MacLean (1990) além de outros estudos dão suporte a uma noção geral de que o córtex cingulado é

uma região crucial para emoção. Muitos estudos de ativação cerebral durante estimulação nociceptiva aguda não consideram o fato do CCA estar envolvido em outras funções que não relacionadas com a dor, recompensa (Bush et al., 2002; Rolls, 2003) e ativação durante o amor (Bartels e Zeki, 2000). A visão sobre uma “área de dor” acaba por procurar e identificar funções de processamento de dor específico e acaba levantando paradoxos interessantes sobre a organização e funções do córtex cingulado. Primeiro, o esforço por identificar um processamento específico de dor no córtex cingulado deriva dos neurônios nociceptivos localizados na lâmina I na medula espinhal onde teorias traçam um processamento de dor específico através do núcleo mediodorsal talâmico (Craig, 2003). Infelizmente estas conexões não foram ainda experimentalmente demonstradas e nem a sua especificidade para qualquer parte do córtex cingulado (Vogt, 2009). Segundo, apenas parte do CCA está envolvida na emoção. A área subgenual do CCA está envolvida tanto em regulação autonômica quanto em condicionamento clássico, de acordo com estudos de estimulação elétrica (Neafsey et al., 1993). Contudo, a pergunta central permanece: O CCA contribui de maneira igual para as respostas de afeto associadas à dor?

Uma nova perspectiva na literatura sobre processamento de dor e emoção no córtex cingulado está sendo sugerida por Vogt (1996 e 2009), que propõe o modelo das quatro regiões e suas sub-regiões associadas. O autor sugere que existem 4 regiões com suas devidas sub-regiões que formam o giro do cíngulo. As regiões e sub-regiões seriam divididas da seguinte forma: CCA (s, subgenual; p, pregenual) córtex cingulado medial (CCM; a, anterior; p, posterior), córtex cingulado posterior (CCP; d, dorsal; v, ventral) e córtex retro-esplênico (CRE). De fato, o modelo de 4 regiões proposto por Vogt (2009) mostra que o CCA está envolvido em controle autonômico e armazenamento de memória emocional. Contudo, cada região não é uniforme devido a subfunções internas que podem resultar de conexões particulares, que poderiam vir a alterar o tipo de processamento, embora a vasta literatura sugira o papel do CCA na regulação autonômica e emoção (Neafsey et al., 1993; Buchanan, 1993). Um dos primeiros estudos de neuroimagens explorando o aspecto da emoção mostrou que o CCA estaria envolvido em afeto negativo em mulheres saudáveis (George et al., 2005). No entanto, Simpson et al. (2001) e Porro et al. (2002) sugeriram que a antecipação da dor pode causar alterações na atividade do CCA (redução de

fluxo sanguíneo cerebral). Isto contribui para os achados referentes a uma atividade baixíssima do CCAs, especificamente durante a dor aguda. Por sua vez, uma revisão de neuroimagens em humanos, levando em consideração o modelo das quatro regiões, mostrou uma ativação proeminente durante eventos ruins no CCAs e durante momentos de alegria na posição rostral do CCA numa sub-região denominada CCAp. Em termos de processamento de dor, uma resposta em CCAp, demonstrada com magnetoencefalografia (MEG), sugeriu uma associação com ativação de fibras-C e inclusive o componente de sofrimento afetivo da dor (Ploner, Gross, Timmermann, Schnitzler, 2002). A atividade nociceptiva, por sua vez, está associada diretamente com o CCAp. Estudos (Vogt, 2009) verificaram, por sua vez, que no CCMA ocorre uma sobreposição de atividades tanto de medo quanto de dor, sugerindo que esta área poderia estar relacionada com comportamento de esquiva. Entretanto, apesar de nenhuma ativação emocional consistente ter sido encontrada no CCMp, o mesmo teve grande ativação nociceptiva.

Observações neurocirúrgicas sugerem que, de fato, a área rostral do córtex cingulado anterior (CCA) contribui para as dimensões afetivas da dor (Harte, Spuz e Borszcz, 2011). O CCA humano contém neurônios que respondem a estimulação nociva (Dostrovsky et al., 1999). Como falado anteriormente por Landeira e Cruz (2007), a ablação de grandes porções do córtex cingulado anterior alivia o sofrimento emocional sentido por pacientes com dores crônicas. Porém, estes mesmos pacientes continuam a ter habilidade para julgar a localização da dor ou sua intensidade. (Foltz e White, 1962; Ballantine et al., 1967; Hassenbusch et al., 1990). Em anos mais recentes, estudos utilizando neuroimagem funcional têm implicado o CCA no processamento da dor. Tomografia por emissão de pósitrons e ressonância magnética funcional têm demonstrado um aumento na atividade neural do CCA em consequência de estimulação nociva (Casey, 1999). De maneira relevante, devemos citar que estas medidas de atividade cerebral no CCA têm sido correlacionadas especificamente com o componente afetivo da dor em humanos. Através da utilização de sugestão hipnótica, Rainville et al (1997) conseguiram diminuir o sofrimento emocional de um estímulo nocivo sem afetar o nível de intensidade do próprio estímulo. A modulação do sofrimento emocional de fato está ligada ao CCA, mas não ao córtex somatosensorial.

Estudos de anatomia funcional sugeriram, por sua vez, o envolvimento do CCA no processamento da dor relacionada ao afeto negativo (Buchel et al., 2002).

Algo de extrema relevância com relação à anatomia do córtex cingulado é o fato do CCP (d, dorsal; v, ventral) no rato (Figura 3.) não ser equivalente à mesma área nos primatas. Nos ratos esta área é composta inteiramente pelo CRE e não existe de fato um giro cingulado pelo fato de um sulco cingulado não ser presente.

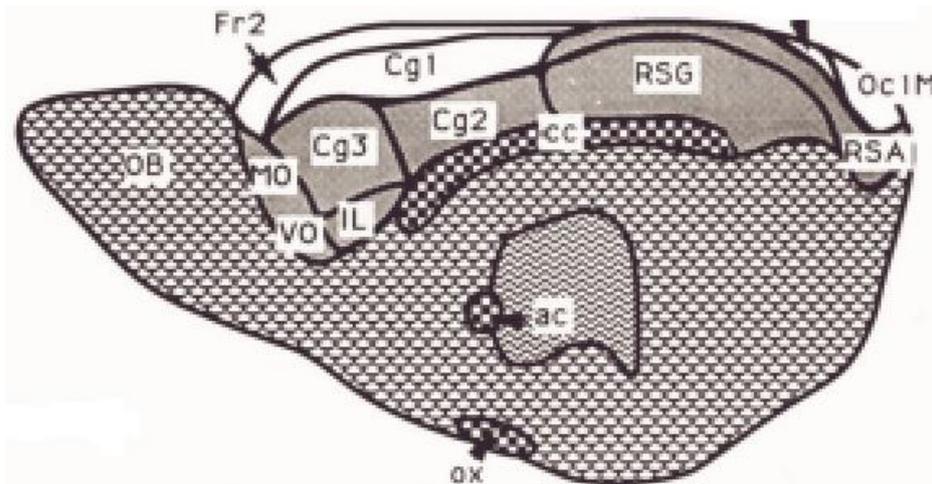


Figura 3. Organização regional do córtex cingulado anterior e posterior segundo Zilles e Wree (1995) retirado do livro “The Rat Nervous System” de Paxinos (2004).

Uma série de estudos em animais sugere o papel do CCA no processamento nociceptivo. Tanto no coelho quanto no rato os neurônios localizados na área 24b de Brodmann no CCA têm sido caracterizados como respondentes a dor (Sikes e Vogt, 1992). Estas células por sua vez têm propriedades que não são inconsistentes no papel do processamento afetivo (Johansen, Fields, e Manning, 2001). De acordo com Allen e Hopkins (1989), Beart et al (1987) o CCA faz interconexões com outras estruturas límbicas (ex: amígdala, e hipotálamo) e com regiões envolvidas na modulação da dor como o tálamo medial e a MCP (Royce, 1983; Wyss e Sripanidkulchai, 1984) sugerindo com isso, que o CCA pode influenciar outras áreas cerebrais que estão envolvidas no processamento da informação emocional e nas reações aos estímulos nocivos (aprendizagem por estímulo aversivo ex: choque). Evidências em estudos com animais até então coletadas, sugerem a noção de circuitarias neurais diferentes, relacionadas a componentes distintos da experiência de dor que implicam o CCA como um elemento chave neste processamento. Johansen, Fields, e Manning,

(2001) sugerem que o processamento da dimensão afetiva da dor seja mediado pelo CCAr.

Levamos em conta que tanto a literatura humana quanto a animal descreve evidências fortes sugerindo um papel do CCA na dor relacionada ao sofrimento afetivo. Como descrito anteriormente, estudos indicaram que existem diferenças de regiões dentro do próprio CCA no que concerne ao processamento e modulação afetiva da dor. A visão de que a área rostral do córtex cingulado anterior (CCAr) está envolvida no processamento afetivo da dor foi proposta por Vogt et al (1996). Vogt propôs que a área rostral do CCA em humanos (área 24, 32 e 25) está envolvida no processamento de dor afetiva, ao passo que as regiões mais caudais do CCA são responsáveis no planejamento motor como uma resposta secundária à estimulação nociceptiva. De fato, algumas pesquisas com neuroimagem em humanos sugerem que as porções caudais são preferencialmente ativadas por estimulação nociceptiva (Mikulis et al.,1997). Em animais, a ativação neuronal na parte caudal do CCA eliciada por estímulo nocivo está relacionada com o processamento da dor (Porro et al., 2003) enquanto que a parte rostral do CCA contribui na modulação inibitória do processo nociceptivo (Harte, Suz e Borszcz, 2011). A estimulação elétrica do CCAr em ratos aumenta a resposta de latência nos testes de “retirada de cauda” e “placa quente” (Hardy, 1985), sugerindo, de fato, uma modulação inibitória no processo de nocicepção.

4.1

Córtex Cingulado Anterior: Aprendizagem Aversiva

O medo é uma resposta adaptativa à dor ou a uma ameaça. Acredita-se que a amígdala é uma área chave no cérebro para o estudo do medo e ansiedade. Em adição, o córtex cingulado anterior é conhecido por ser uma estrutura a contribuir não apenas para a recordação da memória de medo (Frankland. et al., 2004), mas também para a formação da memória de medo (Tang et al., 2005). Por sua vez, consideráveis evidências sugerem que tanto a aprendizagem quanto a memória de medo são mediadas pelo CCA (Zhuo , 2008).

Com o desenvolvimento de abordagens mais integrativas, incluindo manipulações tanto farmacológicas quanto genéticas, os mecanismos moleculares e celulares subjacentes ao medo aprendido e plasticidade sináptica na amígdala e

no CCA puderam ser melhor elucidados. O CCA está posicionado de forma estratégica entre estruturas tanto límbicas quanto corticais (Bush, Luu e Posner, 2000; Bissière et al., 2008) para poder integrar aspectos emocionais e cognitivos. De fato, estudos tanto em humanos quanto em animais mostraram que a ativação neuronal na amígdala e CCA mudavam quando indivíduos eram confrontados com expressões faciais de ameaça ou confrontados com situações assustadoras, respectivamente (Atkinson e Adolphs, 2011; Jeon, Kim e Chetana, 2010). Com isso, sugere-se que a conexão funcional entre a amígdala e o CCA possa ser responsável pela circuitaria de medo aprendido e do processamento emocional do organismo diante deste tipo de ameaça.

Estudos de neuroimagem humana sugeririam que o CCA é também uma peça chave no processamento normal da emoção e aprendizagem (Fendt e Fanselow, 1999). Outros estudos de neuroimagens com humanos corroboram mais a ideia do CCA ser composto por duas regiões funcionais distintas, sendo a parte rostral do CCA relacionada com tarefas emocionais e a parte caudal com tarefas cognitivas (Davis et al., 2005; Taylor et al., 2003; Whalen et al., 1998).

Evidências substanciais se acumulam indicando que o CCA está envolvido na aprendizagem aversiva. Lesões no CCA fazem um déficit na aquisição de respostas de esquiva ativa (Gabriel et al., 1991; Kimble e Gostnell, 1968; Peretz, 1960). Por sua vez, experimentos que investigam os efeitos das lesões no CCAr e CCAc em ratos sugerem que apenas o CCAr está envolvido na aprendizagem por estímulo aversivo (Johansen, Fields e Manning, 2001) e lesões no CCAr também geram um déficit no condicionamento clássico ao som utilizando um estímulo aversivo (Kung, 2003).

Estudos que envolvem medo condicionado foram feitos em humanos, revelando a ativação do CCAr (Buchel e Dolan, 2000; Knight, Smith, Stein e Helmstetter, 1999). Estes estudos, por sua vez, perceberam tanto a ativação da amígdala quanto do CCAr durante o processo de associação. Outros estudos, por sua vez, relataram a ativação tanto do CCAr quanto da amígdala em demais processos relacionados com aspectos afetivos (Bush, Luu e Posner, 2000; Devinsky, Morrell e Vogt, 1995; Cannistraro e Rauch, 2003). Em adição, estudos indicam que a amígdala basolateral (ABL) modula a consolidação de memória através da interação com outras áreas cerebrais (McGaugh, 2004; Packard, Cahill e McGaugh, 1994).

Lesões ou inativações farmacológicas da ABL bloqueiam funcionalmente os efeitos da modulação da memória de drogas injetadas em outras regiões cerebrais incluindo o hipocampo (Roozendaal e McGaugh, 1997; Roozendaal Nguyen, Power e McGaugh, 1999), córtex entorrinal (Roesler, Roozendaal e McGaugh, 2002), córtex pré-frontal medial (Roozendaal, McReynolds e McGaugh, 2004; McGaugh, 2004), córtex insular (Miranda e McGaugh, 2004) e o núcleo *accumbens* (Roozendaal, de Quervain, Ferry, Setlow e McGaugh, 2001). Por sua vez, inativações farmacológicas no CCA também foram feitas evidenciando que o mesmo tem função crítica no comportamento ansiogênico em roedores (Zhuo et al., 2011). De fato, estudos feitos em modelos de psicopatologia em roedores descreveram uma ativação neuronal no CCAr mais sensível a uma variedade de agentes ansiogênicos assim como em diferentes estressores (Singewald, Salchner e Sharp, 2003).

Embora a amígdala tenha sido considerada o centro das emoções no cérebro humano (Pessoa e Adolphs, 2010), o CCA tem aparecido como um componente crítico na circuitaria de medo. O CCA está envolvido no processamento da dor-emoção e a estímulos relacionados com ameaça (Zhuo, 2008). Dados de eletrofisiologia em humanos mostraram que neurônios no CCA tiveram atividade em resposta a estímulos nocivos (Hutchison et al., 1999) e diversas observações em humanos demonstraram um papel fundamental do CCA no sofrimento afetivo (Rainville, 1997). Durante a aprendizagem ao medo ambos, amígdala e CCA, são ativados, onde a atividade neural na amígdala sinaliza para uma situação de perigo, enquanto que o CCA estabelece a atividade neural necessária para sustentar a atenção para a ameaça em questão (Bishop, 2008). De fato, durante paradigmas de medo condicionado no qual se introduz um intervalo entre uma pista visual e a consequente apresentação do choque (Cheng, 2006), a atividade no CCA tem demonstrado uma diminuição no intervalo entre a pista e a apresentação do choque. Outros estudos com animais têm identificado, por sua vez, o CCA como uma área crítica envolvida na aquisição e armazenamento da memória de medo.

A contribuição do CCA para memória remota de medo foi também avaliada utilizando o paradigma de medo ao contexto. Frankland et al (2004) demonstraram que a recordação da memória remota através do medo contextual elevou a expressão da proteína *c-fos* no CCA e que a infusão de lidocaína no CCA

inibiu a memória remota de medo (Ding Teixeira e Frankland, 2008). A formação da memória de medo remota vem acompanhada com mudanças na estrutura neuronal do CCA (Restivo, Vetere, Bontempi e Ammassari-Teule, 2009). Estes dados sugerem que o CCA tem um papel crítico no armazenamento da memória remota de medo. Em adição, alguns experimentos mostraram que a estimulação elétrica do CCA consegue induzir a memória de medo (Tang, 2005). Os resultados deste experimento ainda sugerem que o CCA estaria também envolvido no processo de aquisição da memória num paradigma de medo contextual.

Evidências de conexões diretas entre a ABL e o CCAr (Krettek e Prince, 1977; Sarter e Markowitsch, 1983; Sripanidkulchai, Sripanidkulchai e Wyss, 1984) sugerem que o CCAr e a ABL podem interagir na consolidação de memórias aversivas (Malin, Ibrahim, Tu e McGaugh, 2007). De grande relevância são outros estudos com dados anatômicos sobre a conectividade entre CCA-Amígdala em ratos (Cassell e Wright, 1986; Pitkanen, 2000; Gabbott et al, 2005), e outros roedores (Buchanan, Thompson, Maxwell e Powell, 1994); relevância fisiológica desta conectividade durante o processo de aquisição no medo condicionado ainda não está de todo esclarecida. Uma série de procedimentos deverão ainda ser feitos para determinarem o papel desta área no condicionamento aversivo.

5

Analgesia Condicionada: Considerações Gerais

O sistema motivacional de defesa é uma circuitaria neurofisiológica que seleciona respostas de defesa apropriadas a uma variedade de sinais ambientais de perigo. Diversos estímulos têm a habilidade de ativar este sistema sem a necessidade do organismo em questão ter tido uma experiência anterior. No caso do rato, exemplos de estímulo de perigo inato incluem certos predadores como gatos e fuinhas (Fanselow e Lester, 1986; Blanchard e Blanchard, 1971), estimulação tátil no dorso do animal (Adams, 1979) e odores residuais deixados mediante situação estressante (Brown, 1979). Estímulos neutros, que não teriam a capacidade inata de ativar o sistema defensivo, podem desenvolver a habilidade para fazê-lo através do processo de condicionamento Pavloviano. Já foi demonstrado que sons, luzes e a própria caixa experimental podem vir a ativar o sistema defensivo, se os mesmos tiverem a história de associação com um estímulo nociceptivo como, por exemplo, choques elétricos (Sigmundi, Bouton e Bolles, 1980; Fanselow, 1980). A ativação deste sistema de defesa resulta em consequências comportamentais específicas; o repertório comportamental do animal fica dominado por reações defensivas específicas da espécie (RDEE). Para o rato, a resposta dominante já falada anteriormente é a resposta de congelamento (Fanselow e Lester, 1986).

A apresentação de um estímulo nociceptivo tem pouca diferença nas consequências comportamentais se comparado com um estímulo de perigo inato ou aprendido. O estímulo nociceptivo pode, de forma incondicionada, eliciar comportamentos reflexos. Entretanto, caso um estímulo nociceptivo cause uma lesão tecidual, comportamentos mais complexos surgirão e serão direcionados exatamente para o centro da lesão. Estes comportamentos foram denominados como comportamentos recuperativos (Fanselow, 1986) pelo fato de ser hipotetizado que eles poderiam facilitar a recuperação e cura da lesão. Respostas nociceptivas comportamentais podem ser vistas pelo animal quando o mesmo recebe uma injeção subcutânea de formalina diluída na pata (Dubuisson e Dennis, 1977).

Wall (1979) notou que um machucado ou dano tecidual não leva invariavelmente a uma reação de dor. De fato, a reação imediata a uma situação de lesão é frequentemente caracterizada por “luta, fuga e obtenção de ajuda”. Bolles e Fanselow (1980), baseado no seu trabalho de comportamento defensivo animal sugeriram que tanto dor quanto medo deveriam ser considerados como sistemas motivacionais independentes, servindo a funções biológicas totalmente diferentes. Os autores apontaram que comportamentos de defesa diante de situações de ameaça receberiam prioridade, ao passo que comportamentos relacionados à dor seriam suprimidos. Os autores, por sua vez, sugeriram que a supressão do comportamento relacionados com dor dar-se-ia através da ativação de mecanismos endógenos de analgesia. Isto é, um estímulo ambiental que prediz uma ameaça potencial aciona o sistema motivacional de medo que é caracterizado por uma ocorrência simultânea de comportamento defensivo e analgesia. Quando a resposta nociceptiva vinda de um tecido lesionado não consegue ser finalizada pelos mecanismos de analgesia, a dor se manifesta, e o comportamento animal é dominado por comportamentos recuperativos que funcionam para promover a cura. Então, de acordo com o modelo de medo e dor proposto por Bolles e Fanselow (1980), Fanselow e Bolles (1979), Fanselow e Sigmundi (1982), uma das funções do mecanismo de analgesia endógena seria prevenir o comportamento recuperativo gerado pela lesão tecidual de interromper as RDEE que o animal utiliza em autodefesa.

O mecanismo de analgesia endógena necessita de um evento chave para ter a sua ativação (Fanselow e Bolles, 1979a, 1979b). Pelo visto, o evento chave mais estudado para o acionamento do mecanismo de analgesia é a exposição ao estresse (Amir, Brown, e Amit, 1980). Se a exposição a um elemento estressor faz o organismo menos sensível à dor, e esta analgesia é reversível com um antagonista opioide, como, por exemplo, a naloxona, então teríamos evidências de que um estressor em particular ativou a analgesia mediada por opioides endógenos. Fanselow (1984) verificou então que um choque de severidade pequena nas patas (1mA, 1s de duração) conseguia produzir uma analgesia do tipo opioide, que era totalmente revertida pela naloxona, denominada analgesia condicionada.

Um estudo utilizando TEP examinou a resposta para um breve estímulo de dor térmico e verificou que a analgesia opioide eliciada por este estímulo de dor,

teve sua ativação estabelecida pela parte rostral do CCA e da ínsula (Sprenger et al., 2006). Ao ser utilizado um estímulo de dor mais prolongado, Zubieta et al (2001) verificaram que a dor aguda acionou de forma significativa a analgesia opioide endógena derivada de atividade não apenas da parte rostral do CCA e ínsula, mas agora recrutando áreas como o córtex pré-frontal e amígdala. Verificou-se que os níveis de intensidade da dor (aspecto sensorial) tiveram uma correlação negativa com o nível de atividade opioide endógena na amígdala e na MCP, enquanto que os níveis de intensidade da dor afetiva tiveram uma correlação negativa com a ativação opioide no CCA. Este último achado é mais consistente com a sugestão de que uma subdivisão dentro do CCA estaria mais envolvida na dimensão do sofrimento afetivo (Prince, 2000). Alguns investigadores, por sua vez, sugeriram que a amígdala estaria envolvida em analgesia opioide através de conexões diretas com a MCP, consistentes com os resultados de Hadjipavlou et al (2006).

A existência de mecanismos endógenos que diminuem a dor através de uma circuitaria de inibição está cada dia mais aceita. Evidências antigas do funcionamento dos mecanismos de modulação da dor vieram das observações de H. K Beecher, que percebeu uma atenuação incrível da dor experienciada por soldados em situações de combate (Beecher, 1946). Observações análogas têm sido vistas em atletas que continuam numa competição, apesar de estarem severamente lesados (Bingel e Tracey, 2008). Beecher, na função de médico de campanha, (serviu no exército dos EUA durante a segunda grande guerra) observou que pelo menos três quartos dos soldados gravemente feridos teriam reportado não sentir sequer dores moderadas e por conta disto não queriam nenhuma medicação que aliviasse a dor (Beecher, 1946). Esta observação feita por Beecher era de fato incrível, partindo do princípio de que as feridas nestes soldados não eram triviais, e sim compostas por fraturas de ossos ou feridas à base de penetração no abdômen, tórax ou crânio. Entretanto, foi observado também que apenas indivíduos, que estavam claramente em estado de alerta, responsivos e não em estado de choque, foram incluídos neste relatório (Beecher, 1946). Isso levou Beecher à conclusão de que “emoções fortes” bloqueiam a dor (Beecher, 1946).

A modulação da dor existe na forma de uma circuitaria descendente de modulação nociceptiva com conexões que vêm de várias áreas, que incluem o

hipotálamo, a amígdala, o CCAr, que envia informação para MCP. Neurônios no interior do núcleo magno da rafe e do núcleo reticular gigante cellularis que, por sua vez, estão incluídos na medula ventromedial rostral, enviam projeções para o corno dorsal da medula, para, de maneira direta ou indireta, aumentar ou diminuir o tráfico de nocicepção, mudando assim a experiência da dor (Fields, Basbaum e Heinricher, 2005). Este circuito modulatório descendente é uma circuitaria com receptores sensíveis a opioides e de grande relevância para a experiência humana em diversas funções, incluindo a regulação emocional diante da dor crônica, na ação de analgésicos, canabinoides, opiáceos e no bloqueio da recaptção de serotonina/norepinefrenia que mimetizam, em parte, as ações de opiáceos. Enquanto o mecanismo preciso no qual as drogas produzem alívio da dor não for de todo conhecido, evidências fortes sugerem a ação desta drogas através da circuitaria de modulação da dor e mimetizando as consequências da ativação desta circuitaria descendente.

As vias de modulação descendentes são sugeridas como responsáveis pelo fenômeno clínico importante da “analgesia ao placebo”, que pode ser demonstrado em pelo menos um terço da população (Beecher, 1955). Pacientes que tiveram a remoção dos seus molares e que esperavam alguma ação analgésica demonstraram níveis de dor mais baixos após a injeção de placebo (Levine, Gordon e Fields 1978). Pessoas com uma resposta maior ao efeito placebo e que, de maneira cega, receberam o antagonista opioide naloxona indicaram níveis de dor similares aos não respondentes, indicando que a analgesia ao placebo requer ativação inibitória mediada por opioide endógeno (Levine, Gordon e Fields 1978). Técnicas de neuroimagem, por sua vez, têm sugerido agora que a resposta ao placebo teria a origem de sua mediação na circuitaria de inibição à dor, originária de regiões corticais e subcorticais (Petrovic, Petersson e Ingvar, 2002; Zubieta, 2005). Estudos com humanos, por sua vez, revelaram que a analgesia ao placebo poderia estar relacionada com ativação de receptores opioides- μ localizados no CCAr, córtex pré-frontal dorsolateral e ínsula (Zubieta, 2005). Aumento do fluxo sanguíneo nestas regiões foi associado com uma grande resposta ao placebo, dando a sugestão de que variações individuais na resposta ao placebo podem estar ligadas às diferenças na concentração e função dos receptores opioides- μ .

Estudos de imagens sugeriram áreas que, de forma bem consistente, são superativadas diante de um estímulo nocivo. Estas áreas incluiriam o CCAr, a

ínsula, a amígdala e a MCP (Tracey e Mantyh, 2007). De maneira relevante, estas regiões demonstraram uma sobreposição de atividade quando sofrem tanto a ação de opioides quanto o fenômeno de analgesia ao placebo. Outros estudos, por sua vez, sugerem que a ligação entre o CCAr e a MCP tem por base uma ligação opioide endógena e que, de fato, a mesma é essencial tanto para a analgesia opioide quanto para a analgesia ao placebo (Eippert et al., 2009). Deve-se deixar claro que as regiões citadas (Figura 4.) agem juntas dentro de um contexto da modulação da nocicepção e parecem estar intimamente ligadas à experiência da dor (Tracey e Johns, 2010).

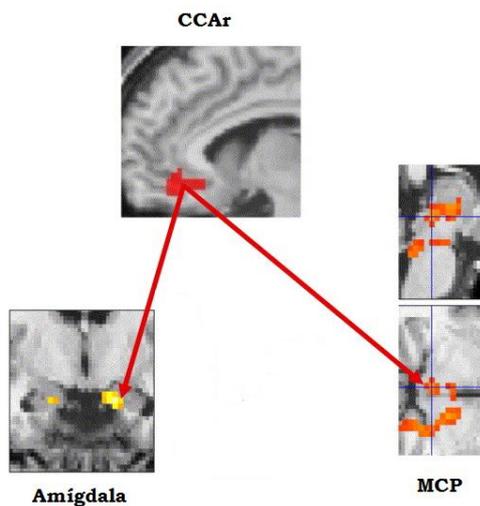


Figura 4. Circuitaria de antinocicepção proposta por Bingel et al (2006) sugerindo como estruturas principais o CCAr, amígdala e a MCP.

5.1

Opióides Endógenos: Regulação Emocional

Dentro do contexto da dor, algumas regiões do cérebro que formam o sistema límbico rostral (ex: CCA, amígdala e MCP) apresentam receptores opioides, sendo a MCP uma das estruturas que expressa, de forma significativa, atividade de analgesia opioide. Dada a presença de receptores opioides nestas regiões cerebrais, é provável que a atividade opioide possa ter algum impacto na regulação emocional relacionada com estas áreas. Estudos experimentais sugerem um possível papel para os opioides endógenos no processo de regulação emocional. Por exemplo, episódios de depressão maior em humanos e medo contextual em ratos (Sanders, Kieffer e Fanselow, 2005). Em situações não patológicas, altos níveis de circulação de opioides endógenos têm sido

demonstrados diante de grande estabilidade emocional (Zorrilla et al., 1995) e em humor positivo após a feitura de exercícios (Wildmann et al., 1986). Em adição, alguns estudos sugerem que o bloqueio farmacológico opioide resultaria num aumento substancial da raiva (ex: Martin Del Campo et al., 1994; Pickar et al., 1982). De forma complementar, estudos clínicos com abuso de heroína verificaram que um déficit na atividade endógena opioide está associado com aumento da raiva e ansiedade expressa por estes pacientes (Powell e Taylor, 1992).

De fato, opioides endógenos podem estar envolvidos na regulação de estados emocionais. Um trabalho sugere, de forma direta, a ideia da regulação emocional mediada por opioides (Zubieta et al., 2003). De fato, os autores verificaram que uma grande atividade no CCAr e amígdala resultante de afeto negativo foi associada com uma diminuição da atividade opioide nestas áreas. Frey e Drummond (2008), por sua vez, relataram que a natureza da modulação opioide dos estados emocionais negativos pode ser influenciada por fatores como desordens afetivas e diferenças individuais, que ainda não foram esclarecidas.

Mais recentemente, estudos sugeriram que a atividade opioide, na parte rostral do sistema límbico, também contribuiria com a regulação dos estados emocionais positivos (Boecker, et al., 2008). Juntando com os resultados coletados de Zubieta et al. (2003), sugere-se então que opioides endógenos em regiões chaves do sistema límbico rostral parecem ter um papel relevante em ambos estados emocionais sejam elas emoções negativas ou positivas, o que levanta a questão sobre o papel deste sistema límbico na regulação emocional do estado de medo e pânico.

6

Objetivos

No primeiro experimento, duas novas linhagens de ratos wistar denominadas Carioca Alto Congelamento (CAC) e Carioca Baixo Congelamento (CBC), foram selecionadas geneticamente para alto e baixo nível de congelamento através do paradigma de medo ao contexto (Gomes e Landeira-Fernandez, 2008). Após três gerações, a linhagem CAC foi considerada como mais propensa a exibir níveis altos de congelamento comparado com a linhagem CBC. Um estudo recente indicou um isomorfismo entre ratos CAC e ansiedade antecipatória (Dias, Bevilaqua, Silveira, Landeira-Fernandez e Gardino, 2009). As linhagens CAC e CBC podem ser uma importante ferramenta para a investigação da relação entre ansiedade, ataque de pânico e transtorno de pânico. O objetivo do presente estudo foi o de investigar se os animais CAC e CBC exibem de fato diferentes padrões comportamentais de defesa, relacionados com o ataque de pânico e o transtorno de pânico induzidos pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal.

O segundo experimento empregou ratos wistar no paradigma de medo incondicionado. O objetivo deste estudo foi verificar a importância do Córtex Cingulado Anterior Rostral neste paradigma. Para isto, um grupo de animais recebeu lesões eletrolíticas no CCAr e o outro não. Investigamos se os animais lesados e não lesados no CCAr exibem de fato diferentes padrões comportamentais de defesa, relacionados com o ataque de pânico e/ou transtorno de pânico induzidos pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal. No terceiro experimento, verificamos novamente o papel do Córtex Cingulado Anterior Rostral no mesmo paradigma de medo incondicionado. Para isto, replicamos o segundo experimento. Em adição, no dia seguinte à estimulação elétrica da MCPD, submetemos estes mesmos animais ao teste de formalina dentro do paradigma de analgesia condicionada. O objetivo desta segunda parte do estudo, chamado de experimento 3, foi verificar a importância do Córtex Cingulado Anterior Rostral na analgesia condicionada e o seu papel na modulação da sensibilidade à dor.

7

Experimento 1

Efeito de Lesões eletrolíticas no Córtex Cingulado Anterior Rostral na Analgesia Condicionada e no Comportamento de Defesa eliciado pela Estimulação Elétrica da MCPD.

7.1

Sujeitos

Os sujeitos foram 20 machos wistar entre 200 e 340g. Os animais foram colocados em grupos de cinco a sete indivíduos em gaiola viveiro (18 x 31 x 38 cm³) com acesso a água e comida ad libitum. A temperatura da sala era controlada ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), com ciclo de claro e escuro de 12h/12h (07:00-19:00h). O experimento foi conduzido durante a fase clara do ciclo. Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos de acordo com a sociedade brasileira de neurociência e comportamento que se baseia no United States National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (revisado em 1996).

7.2

Cirurgia

Todos os 26 animais foram implantados com uma cânula guia direcionada a MCPD com coordenadas similares ao experimento 1. Após a implantação da cânula guia, foram efetuadas lesões eletrolíticas bilaterais no córtex cingulado anterior rostral (CCAr) de 13 animais (grupo experimental). A lesão eletrolítica foi aplicada através de um lesionador elétrico (insight equipamentos, Brasil), a corrente elétrica (1mA, 20s de duração) para a lesão foi conduzida através de um fio conectado a uma peça de eletrodo (PlasticsOne Inc) direcionada a MCPD. As coordenadas que foram utilizadas para lesão eletrolítica tiveram lambda como ponto de referência, de acordo com o atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (1986): Antero/posterior, +2.7mm; Medial/lateral, $\pm 0.5\text{mm}$; Dorsal/Ventral, +2.2mm. O grupo controle da lesão eletrolítica teve

procedimento cirúrgico idêntico, porém nenhuma corrente elétrica para lesão foi acionada e conduzida pelo eletrodo.

7.3

Material

O experimento foi conduzido numa caixa experimental (25 x 20 x 20 cm³) e a mesma colocada dentro de uma caixa antirruído. Uma luz vermelha (25W) foi colocada no interior da caixa antirruído, uma câmera foi colocada atrás da caixa experimental para captar o comportamento do animal num monitor que fora instalado fora da sala experimental. Um miniventilador foi afixado dentro da caixa antirruído, provendo assim um ruído branco de 78dB.

7.4

Procedimento

Sete dias após a cirurgia, os dois grupos de animais (lesados e não lesados) foram colocados na caixa experimental, já tendo passado por 3 dias de manipulação (3 minutos cada animal) seguidos. Cinco minutos depois, os limiares de congelamento e fuga foram determinados através de um estimulador elétrico (insight equipamentos, Brasil), a corrente elétrica foi conduzida através de um fio ligado a uma peça de eletrodo móvel (PlasticsOne Inc) conectada a uma cânula guia e direcionada a MCPD. A estimulação cerebral (AC, 60Hz, 15s) foi apresentada em intervalos de 1 min com intensidade da corrente iniciando a partir de 10 μ A e aumentando 5 μ A a cada nova tentativa. O limiar de congelamento foi operacionalmente definido como a menor intensidade de corrente a produzir não observância de movimento com exceção da respiração, acompanhada de pelo menos duas respostas autonômicas: defecação, piloereção, exoftalmia e micção. A intensidade da corrente que produzisse comportamentos de corrida e pulos foi considerada o limiar de fuga. A estimulação elétrica da MCPD era interrompida quando o limiar para o comportamento de fuga era atingido. Para investigar o comportamento de congelamento que se iniciava após o término da estimulação elétrica da MCPD para o limiar de fuga, os animais permaneciam na caixa experimental por mais 12 min sem qualquer estimulação. Durante este período, o

comportamento de congelamento era avaliado a cada 2s por um observador treinado.

No segundo dia, cada rato foi colocado numa caixa experimental de acrílico transparente. Cinco minutos depois, três choques nas patas randomizados, não sinalizados (1mA, 1s de duração) e de severidade pequena (Fanselow, 1984) foram feitos com intervalos de 20s entre eles. Três minutos após o último choque, o animal era retirado da caixa experimental e colocado de volta a sua gaiola viveiro. A caixa experimental era limpa antes e depois de cada animal adentrá-la com 5% de uma solução de amônia, para retirar qualquer marca residual de cheiro, urina ou fezes.

No terceiro dia, a sensibilidade à dor (analgesia condicionada) foi medida com o teste de formalina (Dubuisson e Dennis, 1977; Fanselow, 1984). Para cada rato foi dada uma injeção (sc) de .05ml de formalina a 15% sob a superfície dorsal da pata direita traseira do animal. Após a injeção de formalina, o animal era recolocado na mesma caixa experimental para uma sessão teste de 60 min. Um observador cego para as condições de tratamento (grupo lesado/grupo não lesado) marcou cada comportamento do animal dentro das categorias seguintes: (a) congelamento - foi definido como ausência de movimento corporal com exceção do necessário para respiração; (b) pata levantada - foi definido como um movimento no qual o animal levanta ou mantém a pata tratada próxima ao corpo; (c) pata lambida - foi definido como qualquer lambida ou contato da pata tratada com a boca do animal; (d) atividade - foi definido como qualquer outra atividade locomotora. Pata levantada e pata lambida foram colocadas dentro de uma única categoria: comportamento recuperativo para fins de uma primeira análise. Em seguida pata levantada foi colocada na categoria de congelamento para fins de segunda análise.

7.5

Resultados

Uma primeira ANOVA de duas vias de medidas repetidas foi utilizada para avaliar as diferenças nos limiares aversivos (congelamento e fuga) dos animais lesados e não lesados. Uma segunda ANOVA de duas vias de medidas repetidas foi também utilizada para avaliar as diferença no CPF entre os animais

lesados, não lesados e os 12 minutos de análise a que os mesmos foram submetidos. Para os dados significativos da segunda ANOVA foi utilizado o teste de Newman Keuls como post hoc. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Análises histológicas das partes cerebrais indicaram que todas as pontas dos eletrodos estavam localizadas dentro da MCPD. O grupo utilizado no trabalho final ficou estabelecido desta forma: Lesados, $n = 10$; Não lesados, $n = 10$.

A figura 5. mostra a média (\pm SEM) do limiar de corrente elétrica necessária para acionar os comportamentos de congelamento e fuga em animais lesados e não lesados. A primeira ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito principal para os limiares aversivos ($F[1,18] = 42.27$, $p < 0.0001$), mas não para os grupos lesados e não lesados ($F[1,18] = 0.01$, $p = 0.92$). Nenhuma interação entre limiares aversivos e os grupos foi encontrada ($F[1,18] = 0.02$, $p = 0.91$).

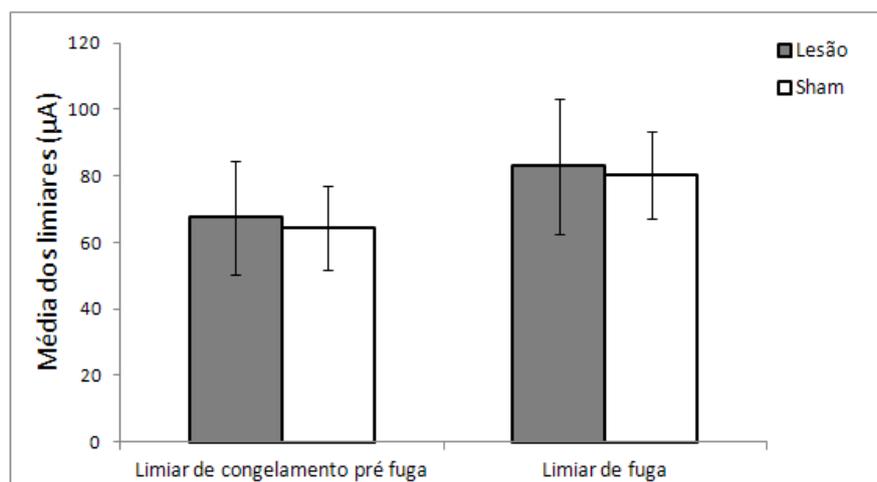


Figura 5. Média (\pm SEM) dos limiares de congelamento e fuga determinados através do procedimento de estimulação elétrica da MCPD nos animais lesados e não lesados no CCAr.

A figura 6. mostra a média (\pm SEM) de porcentagem de tempo que os animais lesados e não lesados tiveram de CPF após o término da estimulação elétrica na MCPD. A segunda ANOVA de duas vias de medidas repetidas mostrou efeito significativo para os grupos lesados e não lesados ($F[1,18] = 315.84$, $p < 0.0001$), mas não houve efeito de tempo ($F[1,18] = 1.22$, $p = 0.28$) e não houve interação entre os grupos e tempo no CPF durante os 12 minutos ($F[1,18] = 0.92$, $p = 0.52$) de análise.

A análise post hoc indicou que os animais lesados mostraram uma frequência menor de CPF comparado com os animais não lesados durante os 12 minutos de análise ($p < 0.001$).

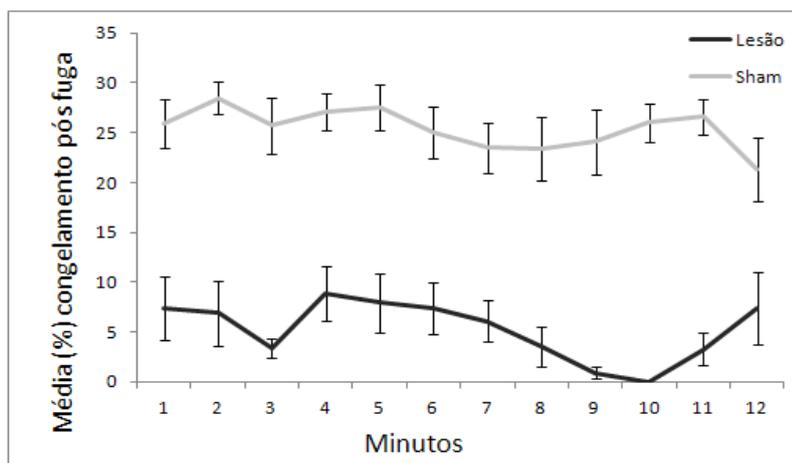


Figura 6. Média (\pm SEM) dos limiares de congelamento dos animais lesados e não lesados no CCAr durante o período de 12 minutos após a interrupção da estimulação elétrica aplicada na MCPD para eliciação do comportamento de fuga

Duas ANOVA de duas vias de medidas repetidas foram utilizadas para avaliar as diferenças nos comportamentos de congelamento e recuperação entre os animais lesados e não lesados.

As figuras 7. e 8. mostram a média (\pm SEM) de porcentagem de tempo que os animais lesados e não lesados tiveram de comportamento de congelamento e recuperação durante o paradigma de analgesia condicionada. Uma primeira ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito principal para os grupos lesados e não lesados ($F[1,39] = 176.75$, $p < 0.001$), e para congelamento e recuperação tendo pata levantada como índice de recuperação ($F[1,39] = 133.59$, $p < 0.001$). Houve interação entre congelamento, recuperação e os grupos ($F[1,39] = 366.23$, $p < 0.001$).

A análise post hoc indicou que os animais lesados e não lesados tiveram diferença tanto em comportamento recuperativo quanto em congelamento ($p < 0.001$).

As figuras 9. e 10. mostram a média (\pm SEM) de porcentagem de tempo que os animais lesados e não lesados tiveram de comportamento de congelamento e recuperação durante o paradigma de analgesia condicionada. Uma segunda ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito principal para os grupos lesados e não lesados ($F[1,39] = 11.05$, $p < 0.02$), e para congelamento e

recuperação tendo pata levantada agora como índice de congelamento ($F[1,39] = 153.43$ $p < 0.001$). Houve interação entre congelamento, recuperação e os grupos ($F[1,39] = 279.38$, $p < 0.001$).

A análise post hoc indicou que os animais lesados e não lesados tiveram diferença tanto em comportamento recuperativo quanto em congelamento ($p < 0.001$). Em função da interação encontrada nas duas ANOVAS, novas análises foram necessárias para investigar o fenômeno. A tabela 3. faz uma comparação minuto a minuto utilizando o test-t student pareado ao longo dos 60 minutos do teste de formalina dentro do paradigma de analgesia condicionada.

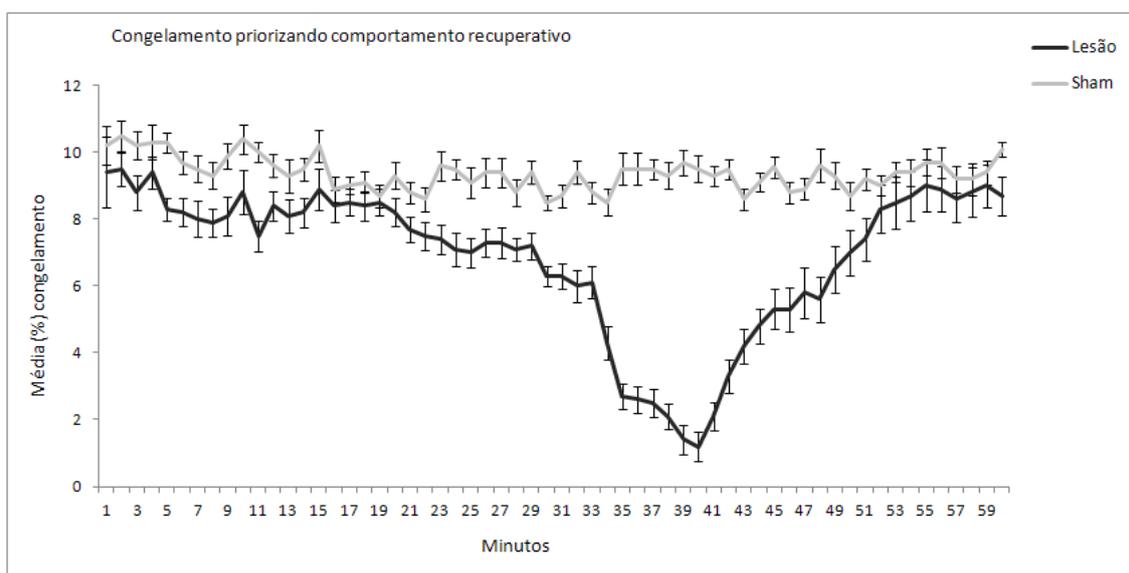


Figura 7. Média (\pm SEM) do comportamento de congelamento dos animais lesados e não lesados no CCAr durante o período de 60 minutos do teste de formalina no paradigma de analgesia condicionada.

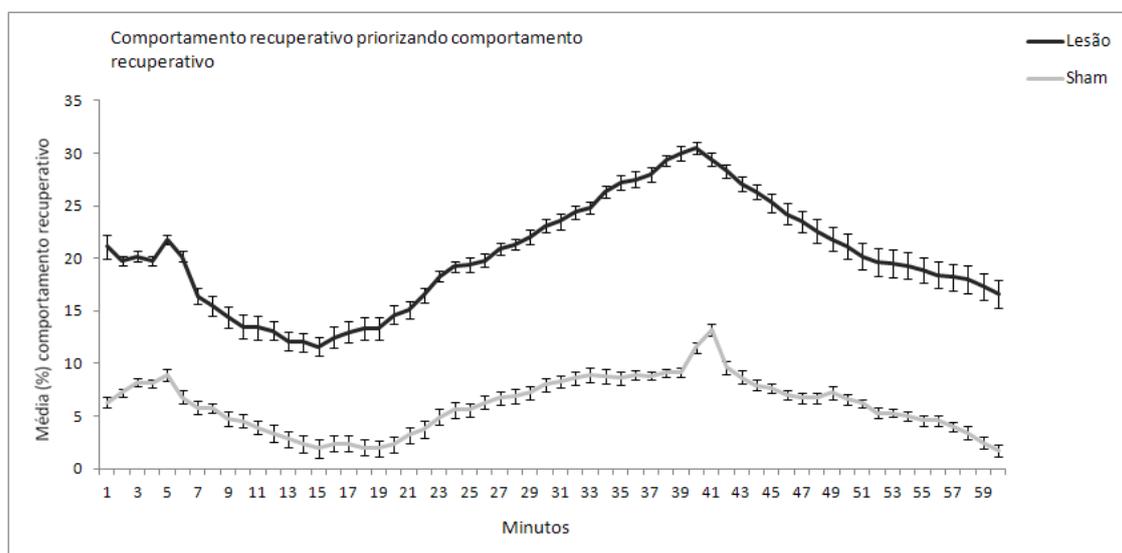


Figura 8. Média (\pm SEM) do comportamento recuperativo dos animais lesados e não lesados no

CCAr durante o período de 60 minutos do teste de formalina no paradigma de analgesia condicionada.

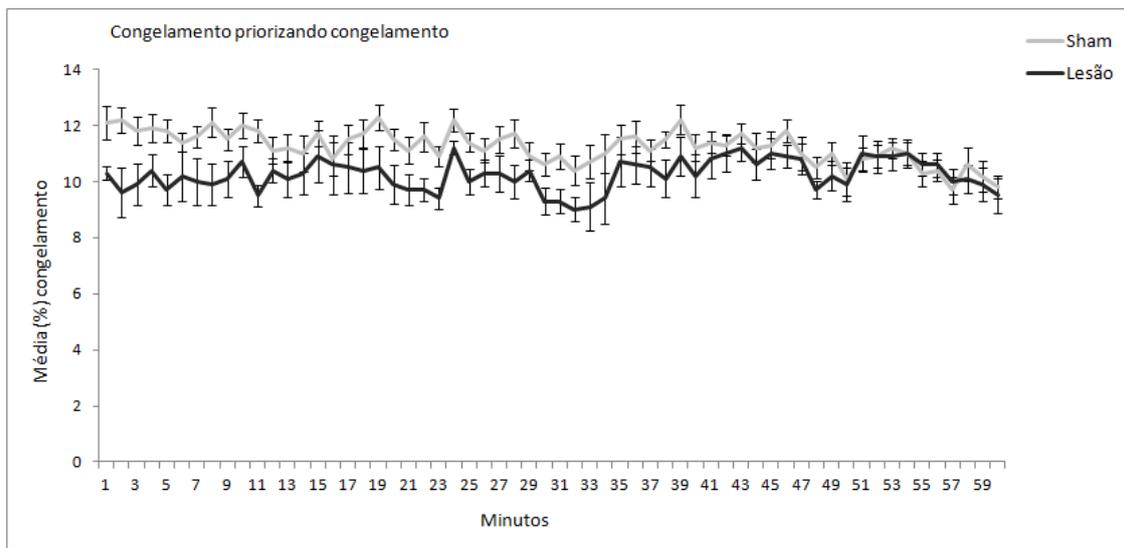


Figura 9. Média (\pm SEM) do comportamento de congelamento dos animais lesados e não lesados no CCAr durante o período de 60 minutos do teste de formalina no paradigma de analgesia condicionada.

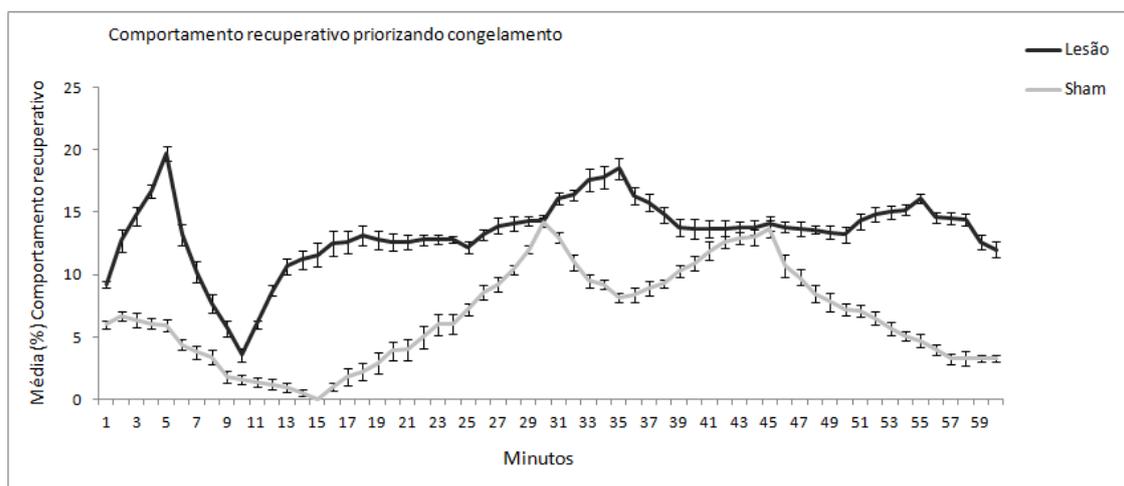


Figura 10. Média (\pm SEM) do comportamento recuperativo dos animais lesados e não lesados no CCAr durante o período de 60 minutos do teste de formalina no paradigma de analgesia condicionada.

TABELA 3. Comparação dos comportamentos do teste de formalina no paradigma de analgesia condicionada entre dois grupos: Não-Lesados (N = 10) e Lesados (N = 10), divididos minuto a minuto.

Behavior	valor do teste-t minuto a minuto e a soma total no teste de formalina																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Freezing																						
prioritizing Freezing	0,09	0,02*	0,02*	0,02*	<0,01*	0,03*	0,03*	<0,01*	0,06	0,12	<0,01*	0,31	0,14	0,36	0,29	0,79	0,16	0,07	0,01*	0,01*	0,03*	0,02*
prioritizing Recuperative Behavior	0,51	0,16	0,05*	0,22	<0,01*	0,01*	0,04*	0,03*	0,02*	0,06	<0,01*	0,05*	0,11	0,03*	0,11	0,42	0,31	0,20	0,71	0,07	0,04*	0,07
Recuperative Behavior																						
prioritizing Freezing	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*
prioritizing Recuperative Behavior	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*

TABELA 3.

Behavior	valor do teste-t minuto a minuto e a soma total no teste de formalina																					
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
Freezing																						
prioritizing Freezing	0,02*	0,11	0,02*	0,20	0,09	0,01*	0,41	0,02*	0,02*	0,06	0,05*	0,08	0,23	0,17	0,31	<0,01*	0,07	0,14	0,34	0,64	0,27	0,84
prioritizing Recuperative Behavior	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*
Recuperative Behavior																						
prioritizing Freezing	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	0,88	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	0,01*	0,09	0,20	0,19	0,35	
prioritizing Recuperative Behavior	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*

* Resultados para um teste-t pareado considerando diferenças significativas com p ≤ 0,05

TABELA 3.

Behavior	valor do teste-t minuto a minuto e a soma total no teste de formalina																					
	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	SUM					
Freezing																						
prioritizing Freezing	0,27	0,34	0,80	0,81	0,78	0,78	0,77	0,99	0,63	0,99	0,67	0,78	0,67	0,55	0,66	0,30	<0,01*					
prioritizing Recuperative Behavior	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	0,05*	0,05*	0,02*	0,38	0,30	0,41	0,43	0,34	0,45	0,66	0,59	0,04*	<0,01*					
Recuperative Behavior																						
prioritizing Freezing	0,65	0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*					
prioritizing Recuperative Behavior	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*					

* Resultados para um teste-t pareado considerando diferenças significativas com p ≤ 0,05

Em adição foram feitas duas ANCOVA (tabela 4.) utilizando o comportamento recuperativo como variável dependente, comparando os grupos lesados e não lesados e usando o congelamento como covariável, considerando pata levantada primeiramente como índice de recuperação e depois como índice de congelamento. De acordo com Fanselow (1984) uma análise correlacional de Pearson (tabela 5.) também foi feita entre os índices de recuperação e congelamento entre os grupos lesados e não lesados considerando a pata levantada nas diferentes condições (como índice de congelamento e como índice de recuperação).

TABELA 4. Análise de Covariância para comparação entre grupo Sham ($N=10$) e Lesionado ($N=10$) tendo como Variável Dependente o Comportamento Recuperativo no teste de formalina e o Congelamento como Covariável em duas condições de coleta das frequências dos comportamentos: privilegiando recuperação (Fanselow, 1984) e congelamento.

<i>Pata Levantada</i>	ANCOVA			
	Fonte	Graus de Liberdade	F	P
Recuperação	Efeito Principal	2,19	211,46	<0,001*
	Interação	1,20	39,85	<0,001*
	Grupo	1,20	4,88	<0,05*
Congelamento	Efeito Principal	2,19	20,49	<0,001*
	Interação	1,20	0,92	0,35
	Grupo	1,20	17,66	<0,001*

*Dados considerados significativos aceitando nível de significância $p \leq 0,05$.

TABELA 5. Correlação de Pearson (r) entre os comportamentos de Recuperação e Congelamento privilegiando diferentes condições.

Grupo	<i>Pata Levantada</i>	Correlação
		Recuperação x Congelamento
Não-Lesado	Recuperação	-0,76
	Congelamento	-0,26
Lesado	Recuperação	-0,92
	Congelamento	-0,38

Valores significativos para $p \leq 0,05$.

8

Experimento 2

Efeito de Lesões Eletrolíticas no Córtex Cingulado Anterior Rostral sobre o Comportamento Defensivo eliciado pela Estimulação Elétrica da Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal.

8.1

Sujeitos

Os sujeitos foram 26 machos *wistar* entre 200 e 340g. Os animais foram colocados em grupos de cinco a sete indivíduos em gaiola viveiro (18 x 31 x 38 cm³) com acesso a água e comida *ad libitum*. A temperatura da sala era controlada ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), com ciclo de claro e escuro de 12h/12h (07:00-19:00h). O experimento foi conduzido durante a fase clara do ciclo. Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos de acordo com a sociedade brasileira de neurociência e comportamento, que se baseia no United States National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (revisado em 1996).

8.2

Cirurgia

O procedimento cirúrgico no experimento 2 foi conduzido da mesma maneira que o experimento 1.

8.3

Material

O experimento 2 foi conduzido na mesma caixa experimental (25 x 20 x 20 cm³) do experimento 1.

8.4

Procedimento

Sete dias após a cirurgia, os dois grupos de animais (lesados e não lesados) foram colocados na caixa experimental, já tendo passado por 3 dias de manipulação (3 minutos cada animal) seguidos. Cinco minutos depois, os limiares de congelamento e fuga foram determinados através de um estimulador elétrico (insight equipamentos, Brasil), a corrente elétrica foi conduzida através de um fio ligado a uma peça de eletrodo móvel (PlasticsOne Inc) conectada a uma cânula guia e direcionada a MCPD. A estimulação cerebral (AC, 60Hz, 15s) foi apresentada em intervalos de 1 min com intensidade da corrente iniciando a partir de 10 μ A e aumentando 5 μ A a cada nova tentativa. O limiar de congelamento foi operacionalmente definido como a menor intensidade de corrente a produzir não observância de movimento com exceção da respiração, acompanhada de pelo menos duas respostas autonômicas: defecação, piloereção, exoftalmia e micção. A intensidade da corrente que produzisse comportamentos de corrida e pulos foi considerada o limiar de fuga. A estimulação elétrica da MCPD era interrompida quando o limiar para o comportamento de fuga era atingido. Para investigar o comportamento de congelamento que se iniciava após o término da estimulação elétrica da MCPD para o limiar de fuga, os animais permaneciam na caixa experimental por mais 12 min sem qualquer estimulação. Durante este período, o comportamento de congelamento era avaliado a cada 2s por um observador treinado.

8.5

Resultados

Uma primeira ANOVA de duas vias de medidas repetidas foi utilizada para avaliar as diferenças nos limiares aversivos (congelamento e fuga) dos animais lesados e não lesados. Uma segunda ANOVA de duas vias de medidas repetidas foi utilizada para avaliar as diferenças no CPF entre os animais lesados, não lesados e os 12 minutos de análise a que os mesmos foram submetidos. Para os dados significativos da segunda ANOVA foi utilizado o teste de Newman Keuls como *post hoc*. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Análises histológicas das partes cerebrais indicaram que todas as pontas dos eletrodos estavam localizadas dentro da MCPD. O grupo utilizado no

trabalho final ficou estabelecido desta forma: Lesados, $n = 13$; Não lesados, $n = 13$.

A figura 11. mostra a média ($\pm SEM$) do limiar de corrente elétrica necessária para acionar os comportamentos de congelamento e fuga em animais lesados e não lesados. A primeira ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito principal para os limiares aversivos ($F[1,24] = 88.70$, $p < 0.01$), mas não para os grupos lesados e não lesados ($F[1,24] = 0.12$, $p = 0.74$). Nenhuma interação entre limiares aversivos e os grupos foi encontrada ($F[1,24] = 0.03$, $p > 0.8$).

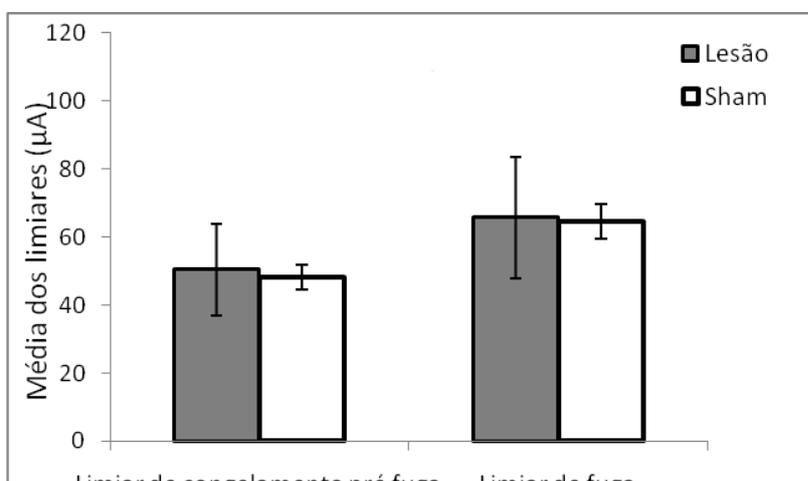


Figura 11. Média ($\pm SEM$) dos limiares de congelamento e fuga determinados através do procedimento de estimulação elétrica da MCPD nos animais lesados e não lesados no CCAr.

A figura 12. mostra a média ($\pm SEM$) de porcentagem de tempo que os animais lesados e não lesados tiveram de CPF após o término da estimulação elétrica na MCPD. A segunda ANOVA de duas vias de medidas repetidas mostrou efeito significativo para os grupos lesados e não lesados ($F[1,24] = 30.95$, $p < 0.001$), efeito de tempo ($F[1,24] = 15.73$, $p < 0.001$) e não houve interação entre os grupos e tempo no CPF durante os 12 minutos ($F[1,24] = 0.93$, $p = 0.51$) de análise.

A análise *post hoc* indicou que os animais lesados mostraram uma frequência menor de CPF comparado com os animais não lesados durante os 12 minutos de análise ($p < 0.05$) menos nos minutos 1 ($p = 0.22$), 7 ($p = 0.31$) e 12 ($p = 0.12$).

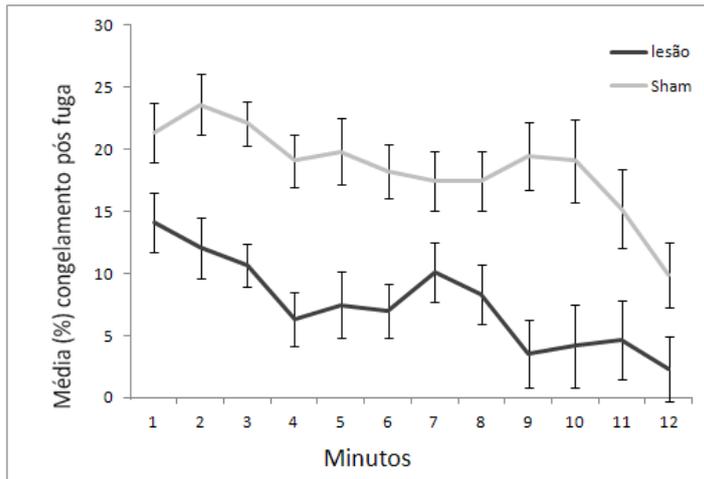


Figura 12. Média (\pm SEM) dos limiares de congelamento dos animais lesados e não lesados no CCAr durante o período de 12 minutos após a interrupção da estimulação elétrica aplicada na MCPD para eliciação do comportamento de fuga.

9

Experimento 3

Avaliação Comportamental do Pânico em Modelos Animais em duas linhagens: Carioca Alto Congelamento e Carioca Baixo Congelamento.

9.1

Sujeitos

Animais geneticamente selecionados para alto (CAC) e baixo (CBC) congelamento dentro do paradigma de medo contextual foram obtidos de acordo com procedimento descrito em trabalho feito anteriormente em nosso laboratório (Gomes e Landeira-Fernandez, 2008). De forma resumida, ratos albinos foram colocados numa caixa experimental de acrílico transparente. Cinco minutos depois, três choques nas patas randomizados e não sinalizados (0.7mA, 1s de duração) foram feitos com intervalos de 20s entre eles. Três minutos após o último choque, o animal era retirado da caixa experimental e colocado de volta a sua gaiola viveiro. Aproximadamente 24hs depois da sessão de treino, o animal era recolocado na mesma caixa experimental para uma sessão teste de 8 min sem a apresentação de choque nas patas. O presente estudo empregou 7 machos CAC e 7 machos CBC da nona geração com maiores (CAC) e menores (CBC) níveis de congelamento. Todos os 14 animais foram empregados como procriadores no programa de procriação seletiva antes de iniciarem o experimento.

Os animais foram colocados em grupos de cinco a sete indivíduos de acordo com sua linhagem respectiva, em gaiola viveiro (18 x 31 x 38 cm³) com acesso a água e comida ad libitum. A temperatura da sala era controlada (24 ± 1°C), com ciclo de claro e escuro de 12h/12h (07:00-19:00h). O experimento foi conduzido durante a fase clara do ciclo. Os animais tinham 6 meses de vida no início do experimento. Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos de acordo com a sociedade brasileira de neurociência e comportamento, que se baseia no United States National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (revisado em 1996).

9.2

Cirurgia

Todos os 14 animais foram implantados com uma cânula guia direcionada a MCPD. Os animais receberam uma anestesia de tribromoetanol (250mg/kg, i.p.). Após o efeito da mesma, os animais eram afixados ao exteriorotácico (David Kopf, Tujunga, CA) e injetados localmente com lidocaína (20mg/ml). As coordenadas que foram utilizadas para implantação da cânula guia tiveram lambda como ponto de referência, de acordo com o atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (1986): Antero/posterior, +2.3mm; Medial/lateral, -1.7mm; Dorsal/Ventral, -4.5mm. A cânula guia foi fixada ao crânio do animal com uma resina acrílica e 1 mini parafuso de aço inoxidável. Um mini estilete com o mesmo comprimento da cânula guia foi introduzido na mesma para prevenir possível obstrução.

9.3

Material

O experimento 3 foi conduzido na mesma caixa experimental (25 x 20 x 20 cm³) do experimento 1.

9.4

Procedimento

Sete dias após a cirurgia, os dois grupos de animais (CAC e CBC) foram colocados na caixa experimental, já tendo passado por 3 dias de manipulação (3 minutos cada animal) seguidos. Cinco minutos depois, os limiares de congelamento e fuga foram determinados através de um estimulador elétrico (insight equipamentos, Brasil), a corrente elétrica foi conduzida através de um fio ligado a uma peça de eletrodo móvel (PlasticsOne Inc) conectada a uma cânula guia e direcionada a MCPD. A estimulação cerebral (AC, 60Hz, 15s) foi apresentada em intervalos de 1 min com intensidade da corrente iniciando a partir de 5 μ A e aumentando 5 μ A a cada nova tentativa. O limiar de congelamento foi

operacionalmente definido como a menor intensidade de corrente a produzir não observância de movimento com exceção da respiração, acompanhada de pelo menos duas respostas autonômicas: defecação, piloereção, exoftalmia e micção. A intensidade da corrente que produzisse comportamentos de corrida e pulos foi considerada o limiar de fuga. A estimulação elétrica da MCPD era interrompida quando o limiar para o comportamento de fuga era atingido. Para investigar o comportamento de congelamento que se iniciava após o término da estimulação elétrica da MCPD para o limiar de fuga, os animais permaneciam na caixa experimental por mais 8 min sem qualquer estimulação. Durante este período, o comportamento de congelamento era avaliado a cada 2s por um observador treinado.

Após o experimento, os animais eram sacrificados com hidrato de cloral. O cérebro perfundido com solução salina (0.9%) seguido de solução de formalina (10%), removido e colocado numa solução de formalina com sacarose. Para a histologia, o cérebro era congelado a -20° num criostato e cortes de $55\mu\text{m}$ eram feitos para localizar a posição do eletrodo de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1986). Apenas os dados de animais nos quais a ponta do eletrodo se localizava dentro da MCPD foram incluídos na análise estatística. Os animais que não seguiram estes critérios foram devidamente descartados.

9.5

Resultados

Uma primeira ANOVA de duas vias de medidas repetidas foi utilizada para avaliar as diferenças nos limiares aversivos (congelamento e fuga) entre os animais CAC e CBC. Uma segunda ANOVA de duas vias de medidas repetidas foi também utilizada para avaliar as diferenças nos animais CAC, CBC e CPF durante 8 minutos de análise a que os mesmos foram submetidos. Para os dados significativos da ANOVA foi utilizado o teste de Newman Keuls como post hoc. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Análises histológicas das partes cerebrais indicaram que todas as pontas dos eletrodos estavam localizadas dentro da MCPD. O grupo utilizado no trabalho final ficou estabelecido desta forma: CAC, $n = 7$; CBC, $n = 7$. Os sítios

representativos da estimulação elétrica da MCPD são mostrados na figura 13. abaixo.

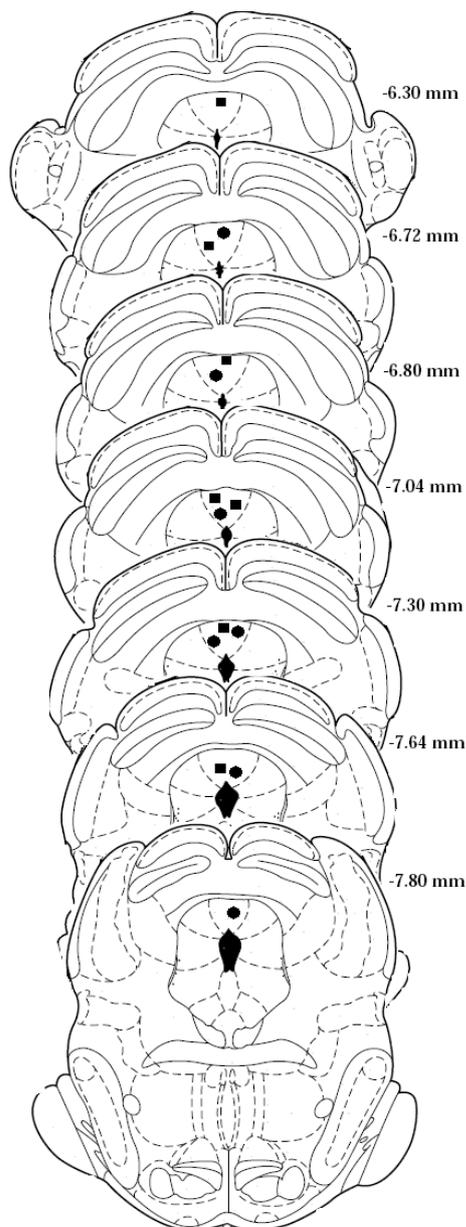


Figura 13. Composição dos eletrodos de estimulação dentro da MCPD. De acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1986), os números do lado direito de cada prancha indicam a distancia em milímetros de bregma. Animais CAC são representados por círculos e animais CBC são representados por quadrados.

Como visto anteriormente (Oliveira, Nobre, Brandão e Landeira-Fernandez, 2004), as respostas de congelamento e fuga induzidas pela estimulação elétrica da MCPD ocorreram de maneira gradual. Assim que a intensidade da corrente aplicada na MCPD era aumentada, os animais paravam repentinamente, ficavam imóveis e com frequência urinavam e defecavam. Em maiores intensidades, este comportamento de congelamento dava lugar a reações vigorosas de corridas e pulos. A resposta de fuga terminava assim que a estimulação elétrica na MCPD era desligada. A figura 14. mostra a média (\pm SEM) do limiar de corrente elétrica necessária para acionar os comportamentos de congelamento e

fuga em animais CAC e CBC. A primeira ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito principal nas linhagens ($F[1,12] = 5.42, p < 0.05$) e limiar aversivo ($F[1,12] = 234.37, p < 0.0001$). Nenhuma interação entre limiares aversivos e linhagem foi encontrada ($F[1,12] = 0.37, p > 0.5$). A análise post hoc indicou que os animais CAC apresentaram um limiar de congelamento e fuga mais alto do que os animais CBC (Ambos $p < 0.05$).

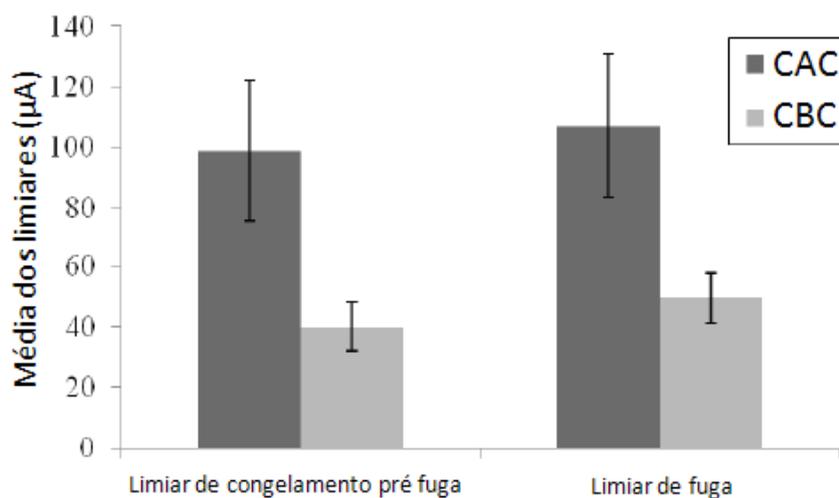


Figura 14. Média (\pm SEM) dos limiares de congelamento e fuga determinados através do procedimento de estimulação elétrica da MCPD em duas linhagens (CAC; CBC)

A figura 15. mostra a média (\pm SEM) de porcentagem de tempo que os animais CAC e CBC tiveram de CPF após o término da estimulação elétrica na MCPD. A segunda ANOVA de duas de medidas repetidas vias utilizando medidas repetidas mostrou efeito significativo da linhagem ($F[1,12] = 12.10, p < 0.005$), nenhum efeito de tempo ($F[1,12] = 2.18, p > 0.1$) ou interação entre as linhagens dos animais durante os 8 minutos de CPF ($F[1,12] = 0.34, p > 0.5$) foi encontrado.

A análise post hoc indicou que os animais CAC mostraram uma frequência maior de CPF comparado com os animais CBC durante os 8 minutos de análise (todos $p < 0.05$). Devido ao fato dos animais CAC requererem um limiar de corrente maior que dos CBC para eliciar a resposta de fuga, é possível que as diferenças entre estes dois grupos no comportamento de congelamento, que ocorre exatamente após a reação de fuga eliciada pela estimulação elétrica da MCPD, pode ser devido a diferenças nos limiares das correntes entre CAC e CBC. De forma a testar esta possibilidade, uma análise de covariância (ANCOVA) usando o parâmetro de limiar de fuga da MCPD como fator covariante foi feita. Os

resultados desta análise indicaram uma confirmação de efeito na linhagem ($F[1,12] = 9.34, p = 0.01$), um efeito no tempo ($F[1,12] = 8.47, p = 0.01$) e nenhuma interação entre as linhagens dos animais durante o período de 8 minutos de CPF ($F[1,12] = 0.55, p > 0.4$) foi encontrada.

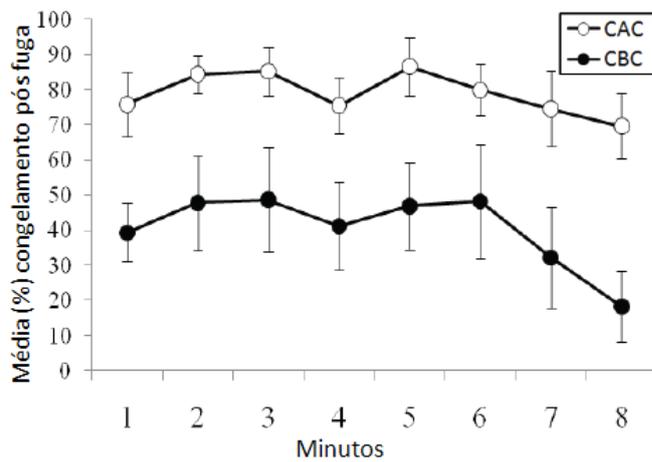


Figura 15. Média (\pm SEM) dos limiares de congelamento dos animais CAC e CBC durante o período de 8 minutos após a interrupção da estimulação elétrica aplicada na MCPD para eliciação do comportamento de fuga.

10

Discussão

Trabalhos empregando ratos geneticamente selecionados para alto e baixo nível de emocionalidade representam uma importante ferramenta na investigação da relação entre os diferentes aspectos que envolvem os transtornos de ansiedade. No presente trabalho, os ratos foram geneticamente selecionados para exibir alto (CAC) ou baixo (CBC) nível de congelamento em resposta ao contexto que foi previamente associado ao choque nas patas (Gomes e Landeira-Fernandez, 2008). Embora o comportamento de congelamento pareça ser a resposta condicionada principal, respostas de fuga ativa têm sido sugeridas durante esta situação de aprendizagem (Tarpley, Shlifer, Halladay e Blair, 2010). Essa questão é particularmente importante, pois pode vir a desafiar a visão de que o fenótipo do CAC está associado com mais comportamento ansiogênico do que o fenótipo do CBC; logo, os ratos CAC poderiam congelar menos, não pelo fato de estarem com menos “medo”, mas pelo fato de estarem muito mais “assustados” e com isso mais inclinados a exibirem respostas de defesa ativa do que comportamento defensivo de congelamento.

Por sua vez, muitas evidências parecem excluir a proposta de Tarpley et al (2010). Por exemplo, o congelamento condicionado atua diretamente em função da intensidade do choque nas patas (Morris, Bouton, 2008), e tem sido farmacologicamente validado como um modelo animal de ansiedade antecipatória. De acordo com estudos feitos, agonistas benzodiazepínicos como diazepam e midazolam, reduzem a quantidade de congelamento condicionado, ao passo que o agonista inverso benzodiazepínico dimethoxy-b-carboline produziu uma quantidade de comportamento de congelamento similar àquela eliciada no paradigma de medo condicionado (Fanselow, 1991). Verificou-se também que substâncias ansiolíticas, como, por exemplo, os receptores agonistas 5-HT_{1A}, os Inibidores de Recaptação Seletiva de Serotonina e os Inibidores da Monoamino Oxidase, todos estes com eficácia clínica comprovada no tratamento dos sintomas de ansiedade diminuíram o comportamento condicionado nos animais, indicando que este paradigma é apto e validado para o melhor entendimento da ansiedade humana. Em adição, camundongos selecionados para alto e baixo nível de

congelamento em resposta ao contexto previamente associado a choque nas patas também apresentaram alto e baixo nível de ansiedade antecipatória no teste de medo sobressaltado (Ponder et al., 2007). Resultados anteriores de nosso laboratório com diferentes modelos de ansiedade, como o labirinto em cruz elevado e o de interação social indicaram que o CAC exibiu, de forma significativa, maior comportamento ansiogênico que o grupo controle (Dias et al., 2008). Com isso, a linhagem CAC parece representar um modelo robusto de ansiedade antecipatória.

Os resultados deste estudo indicaram que os animais CAC tiveram um limiar maior de estimulação elétrica da MCPD para manifestação do comportamento de congelamento e depois fuga do que os animais CBC. Este resultado é consistente com outros estudos, sugerindo que o condicionamento de medo contextual pode inibir respostas de defesa a estímulos aversivos proximais ou dolorosos, como o reflexo de retirada da cauda, placa quente, respostas nociceptivas complexas, como o teste de formalina e corridas e saltos eliciados pelo choque nas patas (Fanselow, 1982). O condicionamento de medo contextual pode também inibir resposta de fuga induzida por *N-methyl-D-Aspartate* (Galvão et al., 2010) ou estimulação elétrica da MCPD (Magierek et al., 2003). Várias evidências indicam que a amígdala e suas projeções para a parte ventral da MCPD estão criticamente envolvidas na regulação do condicionamento de medo ao contexto. O mau funcionamento deste sistema poderia estar associado com formas patológicas de ansiedade antecipatória (ex: transtorno de ansiedade generalizada). Projeções inibitórias descendentes a partir da amígdala podem alcançar a MCPD, o que, por sua vez, pode inibir reações de defesa que são acionadas por esta estrutura. De fato, a ativação da circuitaria neural envolvida na ansiedade pode inibir a ocorrência de comportamentos panicogênicos associados com neurônios localizados na MCPD.

Neste estudo, os resultados também indicaram que os animais CAC demonstraram maior CPF do que os animais CBC. Esta diferença pode ser atribuída ao fato dos animais CAC requisitarem um limiar de corrente maior do que os CBC para atingir o comportamento de fuga eliciado pela estimulação elétrica da MCPD. Uma ANCOVA por sua vez contestou esta hipótese indicando que embora os CAC fossem mais resistentes à estimulação da MCPD, eles eram

mais suscetíveis ao CPF após a ocorrência da estimulação da MCPD, se comparados com os animais CBC.

Como visto anteriormente, o CPF não é suscetível a mudança de contexto. Estudos anteriores empregando o procedimento de mudança de contexto sugeriram que o CPF persistia nos ratos, mesmo quando os animais eram expostos a contextos diferentes logo após a estimulação elétrica da MCPD (Vianna et al., 2001). Em adição, como visto anteriormente, outros estudos indicaram que o CPF teria um mecanismo neural diferente do congelamento e fuga eliciados durante a estimulação elétrica da MCPD. Por exemplo, lesões eletrolíticas ou inativação induzida por muscimol na amígdala reduziam a resposta de CPF nos animais, mas não afetavam os limiares de congelamento ou fuga eliciados durante a estimulação elétrica da MCPD (Oliveira et al., 2004; Ruiz-Martinez, de Oliveira e Brandão, 2006). De fato, o CPF parece estar sendo mediado por projeções ascendentes possivelmente via tálamo para estruturas corticais relacionadas com o processamento sensorial do estímulo aversivo. Os estudos sugerem que o CPF pode vir a representar um modelo animal de transtorno de pânico. O fato dos animais CAC expressarem mais CPF do que os animais CBC pode ser um indicativo de que a ansiedade antecipatória possa vir a aumentar a possibilidade de desenvolvimento do transtorno de pânico acionado exatamente pelos ataques de pânico.

A complexa natureza dos sintomas envolvidos no transtorno de pânico sugere que várias áreas cerebrais possam vir a estar implicadas nesta psicopatologia. Por exemplo, técnicas de neuroimagens indicaram que a reação de ansiedade entre pacientes que sofrem de transtorno de pânico recruta várias áreas corticais, entre elas o córtex cingulado anterior, gânglios da base e ínsula (de Carvalho et al., 2010). Outra importante região que parece estar implicada na modulação da ansiedade e pânico seria a amígdala. De fato, projeções da MCPD para a amígdala podem representar uma das rotas principais responsáveis pela etiologia do transtorno de pânico. Embora as reações de ansiedade que estão presentes no transtorno de pânico possam vir a recrutar estruturas corticais relacionadas com ansiedade antecipatória, outros estudos necessitam ser feitos para elucidar melhor a ativação neural destas circuitarias associadas com a amígdala e MCP que possivelmente possam ter um papel inibitório na ocorrência do ataque de pânico ou envolvido na modulação do transtorno de pânico.

Diversas estruturas cerebrais que organizam as reações de defesa e representam o substrato neural do medo e ansiedade tem sido implicada na neuroanatomia funcional do transtorno de pânico.

Evidência considerável indica a importância do condicionamento de medo ao contexto no entendimento do comportamento ansiogênico em animais. Neste paradigma específico, a resposta de congelamento a estímulos contextuais previamente associados a choque nas patas é um dos modelos animais mais confiáveis para ansiedade antecipatória (Brandão et al., 2008). Num experimento típico, um rato é exposto a um ambiente novo (caixa experimental) e, passado um período, breves e não sinalizados choques nas patas são apresentados após alguns minutos. Tempos depois (no outro dia), o animal faz o comportamento de congelamento quando retorna à mesma caixa experimental na ausência de choque nas patas (Landeira-Fernandez, 1996). Neste estudo, os resultados indicaram que o fato de os animais com lesão no CCAr terem congelado menos que o grupo controle, pode ser atribuído a uma diminuição na ansiedade antecipatória do grupo lesionado diante do contexto ameaçador. Sugere-se que a modulação da ansiedade antecipatória seja regida pelo CCAr (Mobbs et al., 2007) e que o CCA tenha uma participação ativa no processo de regulação da ansiedade (Chen et al., 2011); logo, a lesão no CCAr poderia ter gerado um efeito ansiolítico nos animais durante o paradigma de analgesia condicionada e conseqüentemente os animais congelariam menos.

Um trabalho investigando o papel do CCA no condicionamento clássico verificou que lesões no CCAr inibiram o condicionamento clássico ao som (Kung et al., 2003) pareado com um estímulo nocivo (laser direcionado à pata traseira). Outro estudo ainda verificou que a inativação bilateral da atividade cerebral no CCAr através do receptor agonista muscimol inibiu o condicionamento clássico ao som e contexto (Tang et al., 2005) ambos pareados com estímulo nocivo (choque nas patas).

Os resultados deste estudo corroboram com a literatura, indicando que os animais com lesão no CCAr que sofreram condicionamento clássico ao contexto pareado com estímulo nocivo (choque nas patas), tiveram inibida a sua resposta de congelamento, em comparação com o grupo controle sem lesão no CCAr. Este resultado é consistente com o estudo que sugere uma conexão funcional entre CCAr e amígdala, ambos tendo um papel essencial no medo aprendido (Bissiere

et al., 2008) e no armazenamento de memória contextual de medo de curta e longo prazo, (Tang et al., 2005; Bissiere et al., 2008); logo, nós sugerimos que a lesão no CCAr poderia ter de fato afetado a conexão funcional entre estas duas áreas, interrompendo assim o processo de aquisição ao medo contextual e por consequência havendo uma diminuição do comportamento de congelamento no dia seguinte em que os animais foram reexpostos ao mesmo contexto. Em adição, um trabalho investigando os receptores opioides verificou a sua importância nos processos de aprendizagem e memória. Por exemplo, o papel dos receptores opioides na aquisição durante o condicionamento de medo ao contexto (Sanders, Kieffe e Fanselow., 2005), tendo em vista que estudos antigos (Fanselow, Calcagnetti e Helmstetter, 1989; Helmstetter e Fanselow, 1987) já apontavam os receptores opioides como principais responsáveis pela regulação do medo condicionado. Estudos indicam o CCAr como uma estrutura envolvida na modulação opioide e importante para este sistema (Petrovic, Kalso, Petersson e Ingvar, 2002), sendo o seu processo de aquisição mediado por receptores opioides (Sanders, Kieffer e Fanselow, 2005). Logo, a lesão no CCAr possivelmente alterou a modulação da circuitaria opioide envolvida nos processos de aprendizagem, ocasionando assim uma diminuição no processo de aquisição, e gerando um menor comportamento de congelamento dos animais lesados 24 horas após os mesmos terem sido reexpostos ao contexto.

Como já citado, este estudo empregou duas categorias comportamentais: *congelamento* de medo ao contexto e o *comportamento recuperativo*. De acordo com este índice, nossos resultados demonstraram que os animais que foram analgesiados exibiram medo. Nossos resultados sugeriram que uma possível competição de respostas pode ter ocorrido. A ANCOVA considerando o comportamento de *pata levantada* como índice de *recuperação* sugere que existe uma interação entre *congelamento* e *recuperação*. Essa interação é confirmada pelos índices de moderado a alto da correlação entre ambos os comportamentos quando a *pata levantada* é considerada *recuperação*. Para elucidar melhor a causa da interação, uma segunda ANCOVA foi feita colocando a *pata levantada* como índice de *congelamento*. De acordo com os dados desta nova ANCOVA nenhuma interação ocorreu entre os grupos lesados e não lesados e os comportamentos (*congelamento* e *recuperação*), o que também é confirmado pela baixa correlação encontrada entre os comportamentos de congelamento e

recuperação em função dos dois grupos (lesados e não lesados). De acordo com Abbot, Franklin e Westbrook (1995), o comportamento de *pata levantada* é considerado um *comportamento recuperativo* dentro do teste de formalina. Sugerimos que o animal parado e com *pata levantada* está com medo e dor; porém, nesta situação de análise específica, o medo tem ascendência sobre a dor, de acordo com o pressuposto do RDEE. Por sua vez, uma análise correlacional (Fanselow, 1984) entre os comportamentos de congelamento e recuperação em diferentes condições demonstrou que tanto o grupo não lesado quanto lesado para *pata levantada* privilegiando comportamento de *congelamento* tiveram os menores índices de correlação. Nossas análises verificaram que a interação entre a resposta de congelamento (índice de medo) e recuperação (índice de dor) modulada pela analgesia ocorrida em nosso trabalho é consistente com as predições dos modelos de Bolles e Fanselow (1980) e Fanselow e Sigmundi (1982) que demonstram que uma das funções adaptativas dos mecanismos de analgesia endógenos foi exatamente a de prevenir o comportamento recuperativo gerado pelo dano tecidual de interromper o RDEE. Essas análises de comportamento foram conduzidas com objetivos de dirimir eventuais dúvidas acerca do comportamento de *pata levantada* como *comportamento recuperativo* ou *congelamento*. Alguns trabalhos sugerem que os receptores opioides atuam de forma crucial na regulação da analgesia condicionada resultante do medo condicionado. Por exemplo, em ratos, aplicações periféricas ou centrais de antagonistas opioides inibem a analgesia condicionada resultante exatamente do medo condicionado (Fanselow, Calcagnetti e Helmstetter, 1989; Helmstetter e Fanselow, 1987). Outro exemplo da importância dos receptores opioides na regulação antinociceptiva endógena no medo condicionado foi a aplicação de naloxona (antagonista opioide) de forma sistêmica, central ou específica na MCP que acabou causando uma melhora substancial no desenvolvimento do medo condicionado e um decréscimo significativo na analgesia condicionada, resultante do condicionamento de medo contextual (Fanselow, 1981; Fanselow et al., 1991; Hammer e Kapp, 1996; Sanders e Fanselow, 2002).

Neste trabalho, para ocorrer a analgesia condicionada foi utilizado o que é considerado por Fanselow (1984) um choque de severidade pequena (1mA, 1s de duração) que tem a capacidade de produzir uma analgesia do tipo opioide. Os resultados deste estudo indicaram que os animais com lesão no CCAr, que

sofreram condicionamento de medo ao contexto pareado com choque nas patas, tiveram um aumento substancial no comportamento recuperativo observado em comparação com o grupo controle sem lesão no CCAr, quando reexpostos ao mesmo contexto e submetidos ao teste de formalina para avaliação da analgesia condicionada. Isto pode ser explicado pelo fato do CCAr estar envolvido na mediação antinociceptiva endógena, junto com outras estruturas importantes também envolvidas nesta circuitaria de antinocicepção, como amígdala (Fanselow, 1994) e a MCP (Petrovic, Kalso, Petersson e Ingvar, 2002). Logo, a lesão no CCAr foi robusta o suficiente para inibir a analgesia condicionada resultante do condicionamento de medo contextual e conseqüentemente aumentar significativamente o comportamento recuperativo observado nos animais lesados, durante o teste de formalina. Ao trabalharmos com este tipo de analgesia induzida pelo estresse, verificamos a importância do papel do CCAr dentro da circuitaria mediada por opioides endógenos. Se a hipótese de Bolles e Fanselow (1982) no qual a severidade do choque é um determinante para a natureza da analgesia que vem logo após o mesmo, os resultados deste trabalho sugerem que o CCAr seja não apenas uma estrutura envolvida na mediação antinociceptiva endógena junto com as demais áreas citadas, mas nós sugerimos que o CCAr esteja no papel de estrutura chave na mediação da analgesia opioide dentro do paradigma de medo condicionado.

Trabalhos anteriores demonstraram que o CPF ocorrido após uma estimulação elétrica da MCPD é resistente a mudança de contexto e não dura 24hs, sugerindo uma sensibilização por parte do animal e não um condicionamento (Vianna, Landeira-Fernandez e Brandão, 2001). De acordo com Vianna et al (2001), uma possível circuitaria neural para o CPF seria através de projeções ascendentes para estruturas corticais envolvidas no reconhecimento sensorial do estímulo aversivo. Sugere-se que a MCPD mande projeções também para o núcleo talâmico que, por sua vez, alcançam o CCA, uma estrutura que estaria envolvida na identificação de estímulos ameaçadores (Krout e Loewy, 2000; Mobbs et al., 2007) e que poderia em parte ser responsável pelo CPF.

Os resultados deste estudo verificaram que os animais que foram lesados no CCAr tiveram a sua resposta de CPF totalmente abolida em comparação com o grupo controle. Este resultado se manteve nos dois experimentos que envolviam a lesão no CCAr e posteriormente a estimulação da MCPD. De acordo com Brandão et al

(2007), o CPF permitiria ao animal também avaliar as consequências da estimulação aversiva e conseqüentemente uma melhor tomada de decisão diante de situações ameaçadoras futuras. Logo, a lesão no CCAr foi suficiente para inibir o CPF, reforçando a sugestão de que o mesmo está sendo mediado por projeções ascendentes, que passam pelo tálamo e seguem para estruturas corticais especializadas, no caso o CCAr, que é sugerido como área integradora e moduladora da circuitaria de nocicepção e defesa animal.

Em trabalhos anteriores (Brandão et al., 2008), a dissociação farmacológica verificada entre a resposta de congelamento obtido diretamente pela estimulação elétrica da MCPD e o congelamento que se manifesta após o término da estimulação elétrica da MCPD (CPF) dão suporte à clara noção de que distintos substratos neurais suprem estas reações de defesa. Brandão et al (2008) estabeleceram que a porção basolateral da amígdala regula um tipo específico de medo incondicionado (no caso o CPF) gerado pela estimulação elétrica da MCPD.

Nós verificamos, neste estudo, os efeitos da lesão do CCAr no medo condicionado e incondicionado eliciado pela estimulação elétrica da MCPD. Os resultados sugerem que a lesão eletrolítica no CCAr diminuiu a aquisição de medo condicionado e do CPF eliciado pela estimulação elétrica da MCPD. De maneira interessante, a lesão eletrolítica no CCAr não mudou os limiares de congelamento e fuga determinado pelo aumento gradual na corrente da estimulação elétrica da MCPD (Oliveira, Nobre, Brandão e Landeira, 2004; Martinez, Oliveira, e Brandão, 2006). Baseado nesta evidência, nós sugerimos que mecanismos moduladores distintos no CCAr junto com a amígdala basolateral (Davis, 1989; Davis, 1992; LeDoux, Farb, Ruggiero, 1990; Martinez, Oliveira, e Brandão, 2006) são recrutados durante o medo condicionado e incondicionado eliciado pela estimulação da MCPD.

11

Referências

Abbott, FV. Peripheral and central antinociceptive actions of ethylketocyclazocine in the formalin test, **European Journal of Pharmacology**. V. 152, pp. 93-100, 1988.

Abbott, FV., Franklin, KB., Ludwick, RJ., Melzack, R. Apparent lack of tolerance in the formalin test suggests different mechanisms for morphine analgesia in different types of pain. *Pharmacol Biochem Behav*. V.15, pp. 637-40, 1981.

Abbott, FV., Melzack, R. Dissociation of the mechanisms of stimulation-produced analgesia in tests of tonic and phasic pain, **Advances in Pain Research and Therapy**. V. 5, pp. 401-409, 1983.

Abbott, FV., Melzack, R., Leber, BF. Morphine analgesia and tolerance in the tail-flick and formalin tests: dose-response relationships, **Pharmacology Biochemistry Behavior**. V 17, pp. 1213-1219, 1982a.

Abbott, FV., Melzack, R., Samuel, C. Morphine analgesia in tail-flick and formalin pain tests is mediated by different neural systems, **Experimental Neurology**. V. 75, pp. 644-651, 1982.

Abbott, FV., Melzack, R., Samuel, C. Morphine analgesia in tail-flick and formalin pain tests is mediated by different neural systems, **Experimental Neurology**. V. 75, pp. 644-651, 1982b.

Adams, JC. Ascending projections to the inferior colliculus. **Journal of Comparative Neurology**. V.183, pp. 519-538, 1979.

Adler, CM., Craske, MG., Barlow, DH. Relaxation-induced panic (RIP): When resting isn't peaceful. **Integrative Psychiatry** V. 5, pp. 94-100, 1987.

Allen, GV., Hopkins, DA. Topography and synaptology of mammillary body projections to the mesencephalon and pons in the rat, **Journal of Comparative Neurology**, V. 301, pp. 214-231, 1990.

Almeida-Filho, N., Mari, JJ., Coutinho, E., França, JF., Fernandes, J., Andreoli, SB., Busnello, ED. Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity: methodological features and prevalence estimates. **Brazilian Journal of Psychiatry** V. 171, pp. 524-9, 1997.

Alreja, M., Mutalik, P., Nayar, U., Manchanda, SK. The formalin test: a tonic pain model in the primate, **Pain**. V. 20, pp. 97-105, 1984.

Amir, S., Brown, ZW., Amit, Z. The role of endorphins in stress: Evidence and speculations. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, V. 4, pp. 77-86, 1980.

Amodei, N., Paxinos, G. Unilateral knife cuts produce ipsilateral suppression of responsiveness to pain in the formalin test, **Brain Research**. V. 193, pp. 85-94, 1980.

Anagnostaras, SG., Maren, S., Fanselow, MS. Scopolamine selectively disrupts the acquisition of contextual fear conditioning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**. V. 64, pp. 191-4, 1995.

Ansuategui, M., Naharro, L., Feria, M. Noradrenergic and opioidergic influences on the antinociceptive effect of clomipramine in the formalin test in rats, **Psychopharmacology**. V. 98, pp. 93-96, 1989.

Arikian, SR., Gorman, JM. A review of the diagnosis pharmacologic treatment and economic aspects of anxiety disorders. **Journal of Clinical Psychiatry** V. 3, pp. 110-117, 2001.

Atkinson, AP., Adolphs, R. The neuropsychology of face perception: Beyond simple dissociations and functional selectivity. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Series B*, **Biological Sciences**, V. 366, pp. 1726-1738, 2011.

Aurbach, S., Fornal, C., Jacobs, BL. Response of serotonin-containing neurons in nucleus raphe magnus to morphine, noxious stimuli and periaqueductal gray stimulation in freely moving cats, **Experimental Neurology**. V. 88, pp. 609-628, 1985.

Averill, JR. Studies on Anger and Aggression: Implications for Theories of Emotion, **American Psychologist**. V.38, pp. 1145-1160, 1983.

Ballantine, HT., Cassidy, WL., Flanagan, NB., Marino, R Jr. Stereotaxic anterior cingulotomy for neuropsychiatric illness and intractable pain. **Journal of Neurosurgery**. V. 26, pp. 488-495, 1967.

Barlow, DH. **Anxiety and its disorders: the nature and treatment of anxiety and panic**. New York: Guilford, 1988.

Bartels, A., Zeki, S. The neural basis of romantic love. *NeuroReport*. V. 11, pp. 3829-3834, 2000.

Basoglu, M., Marks, IM., e Sengun, SA. Prospective study of panic and anxiety in agoraphobia with panic disorder. **British Journal of Psychiatry** V. 160, pp. 57-64, 1992.

Bear, MF., Cooper, LN., Ebner, FF. A physiological basis for a theory of synaptic modification, **Science**. V. 237, pp. 42118, 1987.

Beecher, HK. Pain in Men Wounded in Battle. **Annals of Surgery**. V. 123, pp. 96-105, 1946.

Beecher, HK. The powerful placebo. **JAMA**. V. 159, pp.1602 -1606, 1955.

Bingel, U., Tracey, I. Imaging CNS modulation of pain in humans. **Physiology**. V. 23, pp. 371-380, 2008.

Bishop, SJ. Neural mechanisms underlying selective attention to threat, **Annals of the New York Academy of Sciences**. V. 1129, pp. 141-152, 2008.

Bissière S, Plachta N, Hoyer D, McAllister KH, Olpe HR, Grace AA, Cryan JF. The rostral anterior cingulate cortex modulates the efficiency of amygdala-dependent fear learning, **Biological Psychiatry**.V. 63, pp.821-31, 2008.

Bissiere, S., Plachta, N., Hoyer, D., McAllister, KH., Olpe, HR., Grace, AA., Cryan, JF. The rostral anterior cingulate cortex modulates the efficiency of amygdala-dependent fear learning. **Biological Psychiatry**. V. 63, pp. 821–831, 2008.

Blanchard RJ, Blanchard DC (1971) Defensive reactions in the albino rat. **Learning & Motivation**. V. 2, pp. 351–362, 1971.

Blanchard, DC., Griebel, G., Blanchard, RJ. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience Biobehavioral Review**. V.25, pp. 205-18, 2001.

Blanchard, DC., Griebel, G., e Blanchard, RJ. (2001). Mouse defense behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, V. 25, pp. 205-218, 2001.

Blanchard, RJ., Blanchard, DC. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **Journal of Comparative Psychology**, V. 103, pp. 70-82, 1989.

Blanchard, RJ., Blanchard, DC., Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Progress in Neuropsychopharmacol & Biological Psychiatry**. V.13, pp. 3-14, 1989.

Blanchard, RJ., Flannelly, KJ., e Blanchard, DC. Defensive behaviors of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. **Journal of Comparative Psychology**, V. 100, pp. 101-107, 1986.

Boecker, H., Sprenger, T., Spilker, ME., Henriksen, G., Koppenhoefer, M., Wagner, KJ., Valet, M., Berthele, A., Tolle, TR. The runner's high: opioidergic mechanisms in the human brain. **Cereb Cortex**. V.18, pp. 2523-2531, 2008.

Bolles, RC., Collier, AC. The effect of predictive cues on freezing rats. **Animal learning & Behavior**, V. 4, pp. 6-8, 1976.

Bolles, RC., Fanselow, MS. A perceptual defensive recuperative model of fear and pain. **Behavioral & Brain Sciences**, V. 3, pp. 291-323, 1980.

Bolles, RC., Fanselow, MS. Endorphins and behavior. **Annual Review of Psychology**, V. 33, pp. 87-101, 1982.

Borelli, KG., Ferreira-Netto, C., Coimbra, NC., Brandão, ML. Fos-like immunoreactivity in the brain associated with freezing or escape induced by inhibition of either glutamic acid decarboxylase or GABAA receptors in the dorsal periaqueductal gray. **Brain Research**. V. 1051, pp. 100-11, 2005.

Bouton, ME., Mineka, S., e Barlow, DH. A modern learning theory perspective on the etiology of panic disorder. **Psychological Review** V. 108, pp. 4-32, 2001.

Brandão, M.L., Zanoveli, JM., Ruiz-Martinez, RC., Oliveira LC., e Landeira-Fernandez, J. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety. **Behavioral Brain Research**, V. 188, pp. 1-13, 2008.

Brandão, ML., Aguiar, JC., Graeff, FG. GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, V. 16, pp. 397-402, 1982.

Brandão, ML., Anseloni, VZ., Pandóssio, JE., De Araújo, JE., Castilho, VM. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience Biobehavioral Review**. V. 23, pp. 863-75, 1999.

Brandão, ML., Coimbra, NC., Borges, PC. Effects of morphine and midazolam on reactivity to peripheral noxious and central aversive stimuli. **Neuroscience Biobehavioral Review**. V. 14, pp. 495-9, 1990.

Brandão, ML., Di Scala, G., Bouchet, MJ., Schmitt, P. Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. V. 24, pp. 497-501, 1986.

Brandão, ML., Vasquez, EC., Cabral, AM., Schmitt, P. Chlordiazepoxide and morphine reduce pressor response to brain stimulation in awake rats. **Pharmacology Biochemical Behavior**. V. 6, pp. 1069-71, 1985.

Brown, RE. **Mammalian social odors: A critical review**, in: J.S. Rosenblatt, R.A. Hinde, C. Beer, M. Claire-Busnel (Eds.), *Advances in the Study of Behavior*, Academic Press, New York. V.10, pp. 103–162, 1979.

Bruehl, S., Burns, JW., Chung, OY., Ward, P., Johnson, B. Anger and pain sensitivity in chronic low back pain patients and pain-free controls: The role of endogenous opioids, **Pain**. V. 99, pp. 223-233, 2002.

Buchanan, A., Reed, A., Wessely, S. Acting on delusions. II: The phenomenological correlates of acting on delusions, **British Journal of Psychiatry**, V. 163, pp. 77-81, 1993.

Buchanan, SL., Thompson, RH., Maxwell, BL., Powell, DA. Efferent connections of the medial prefrontal cortex in the rabbit. **Experimental Brain Research**. V. 100, pp. 469-483, 1994.

Buchel, C., Bornhove, K., Quante, M., Glauche, V., Bromm, B., Weiller, C. Dissociable neural responses related to pain intensity, stimulus intensity, and stimulus awareness within the anterior cingulate cortex: a parametric single-trial laser functional magnetic resonance imaging study, **Journal of Neuroscience**. V. 22, pp. 970-976, 2002.

Buchel, C., Dolan, RJ. Classical fear conditioning in functional neuroimaging, **Curr Opin Neurobiol**. V. 10, pp. 219-223, 2000.

Bush, G., Luu, P., Posner, MI. Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex, **Trends in Cognitive Science**. V. 4, pp. 215-22, 2000.

Bush, G., Vogt, BA., Holmes, J., Dale, AM., Greve, D., Jenike, MA., Rosen, BR. Dorsal anterior cingulate cortex: a role in reward-based decision making. **Proc Natl Acad Sci**. V. 99, pp. 523-528, 2002.

Calcagnetti, DJ., Helmstetter, FJ., Fanselow, MS. Quaternary naltrexone reveals the central mediation of conditional opioid analgesia, **Pharmacology Biochemistry Behavior**. V27, pp. 529-531.

Cannistraro, PA., Rauch, SL. Neural circuitry of anxiety: Evidence from structural and functional neuroimaging studies, **Psychopharmacology. Bulletin**. V. 37, pp. :8-25, 2003.

Carrive, P., Lee, J., Su, A. Lidocaine blockade of amygdala output in fear-conditioned rats reduces Fos expression in the ventrolateral periaqueductal gray. **Neuroscience**. V.95, pp. 1071-80, 2000.

Casey, KL. Forebrain mechanism of nociception and pain: Analysis through imaging, **Proc. Natl. Sci**. V. 96, pp. 7668-7674, 1999.

Cassano, GB., Perugi, G., & McNair, DM. Panic disorder: review of the empirical and rational basis of pharmacological treatment. **Pharmacopsychiatry**, V. 21, pp. 157-65, 1988.

Cassell, M.D., Wright, D.J. Topography of projections from the medial prefrontal cortex to the amygdala in the rat. **Brain Research. Bulletin**, 1986.

Castilho, VM., Brandão, ML. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT_{2A} receptors in rats. **Psychopharmacology (Berl)**. V.155, pp. 154-162, 2001.

Chapman, WP., Cohen, ME., Cobb, S. Measurements related to pain in neuro-circulatory asthenia, anxiety neuroses, or effort syndromes: Levels of heat stimulus perceived as painful and producing wince and withdrawal reactions, **Journal of Clinical Investigation**. V. 25, pp. 890, 1946.

Cheng, DT., Knight, DC., Smith, CN., Helmstetter, FJ. Human amygdala activity during the expression of fear responses. **Behavioral Neuroscience**. V. 120, pp.1187-95, 2006.

Clavelou, P., Pajot, J., Dallel, R., Raboisson, P. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat, **Neuroscience Letters**. V. 103, pp. 349-353, 1989.

Coderre, TJ., Abbott, FV., Melzack, R. Effects of peripheral antisympathetic treatments in the tail- flick, formalin and autotomy tests, **Pain**. V. 18, pp. 13-23, 1984b.

Coderre, TJ., Abbott., Melzack, R. Behavioral evidence in rats for peptidergic-noradrenergic interaction in cutaneous sensory and vascular function, **Neuroscience Letters**. V. 47, pp. 113-118, 1984a.

Conti, LH., Maciver, CR., Ferkany, JW., Abreu, ME. Footshock-induced freezing behavior in rats as a model for assessing anxiolytics. **Psychopharmacology (Berl)**. V. 102, pp. 492-7. 1990

Cowan, A., Porreca, F. Wheeler, H. Use of the formalin test in evaluating analgesics, **NIDA Res Monog**, V. 95, pp. 116-122, 1989.

Craig, AD. Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing, **Annual Review of Neuroscience**, V 26, pp. 1-30, 2003.

Cruz, APM., Landeira-Fernandez, J. A ciência do medo e da dor. *Ciência Hoje*. V. 29, pp. 16-23, 2001.

Cruz, APM., Landeira-Fernandez, J. **Por uma psicologia baseada em um cérebro em transformação**, Landeira-Fernandez, J. e Silva, M.T.A (Orgs.).Intersecções entre Neurociência e Psicologia. Editora MedBook, Rio de Janeiro, 2007.

Darwin, CR: **The expression of the emotions in man and animals**. London: John Murray, 1st edition, 1872.

Davis KD, Taylor KS, Hutchison WD, Dostrovsky JO, McAndrews MP, Richter EO, Lozano AM. Human anterior cingulate cortex neurons encode cognitive and emotional demands. *Journal of Neuroscience*. V. 25, pp. 8402-6, 2005.

Davis, M. Neural system involved in fear potentiated startle. In M. Davis , BL, Jacobs & RI Schonfeld (Eds), *Annals of The New York Academy of Sciences*. V. 563, pp. 165-183, 1989.

Davis, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. **Annu. Rev. Neurosci.** V. 5, pp.:353 –375, 1992.

De Carvalho, MR., Dias, GP., Cosci, F., de-Melo-Neto, VL., Bevilacqua, MC., Gardino, PF., Nardi, AE, Current findings of fMRI in panic disorder: contributions for the fear neurocircuitry and CBT effects **Expert Rev. Neurother.** V. 10, pp. 291-303, 2010.

De Oca BM., DeCola, JP., Maren, S., Fanselow, MS. Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses, **Journal of Neuroscience**.V.18, pp. 3426–3432, 1998.

Deakin, JFW., Graeff, FG. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of Psychopharmacology**, V. 5, pp. 305-315, 1991.

Del-Ben, CM., Graeff, FG. Panic disorder: is the PAG involved? **Neural Plasticity**. Publicação online, 2009.

Delgado, JMR., Roberts. WW., Miller, NE. Learning motivated by electrical stimulation of the brain. **American. Journal of Physiology**, V. 179, pp. 587, 1954.

Dennis, SG., Melzack, R. Effects of cholinergic and dopaminergic agents on pain and morphine analgesia measured by three pain tests, **Experimental Neurology**. V. 81, pp. 167-176, 1983.

Dennis, SG., Melzack, R. Pain modulation by 5-hydroxytrypt-aminergic agents and morphine as measured by three pain tests, **Experimental Neurology**. V. 69, pp. 260-270, 1980.

Dennis, SG., Melzack, R., Gutman, S., Boutcher, F. Pain modulation by adrenergic agents and morphine as measured by three pain tests, **Life Science**, V. 26, pp. 1247-1259, 1980.

Derbyshire, SWG. Exploring the pain “neuromatrix.” **Current Review of Pain**. V. 6, pp. 467-477, 2000.

- Devinsky, O., Morrell, MJ., Vogt, BA. Contributions of anterior cingulate to behavior, **Brain**, V. 118, pp. 279-306, 1995.
- Devinsky, O., Vickrey, BG., Cramer, J., Perrine, K., Hermann, B., Meador, K. Development of the Quality of Life in Epilepsy Inventory, **Epilepsia**. V. 36, pp. 1089-1104, 1995.
- Dias, GP., Bevilaqua, MC., Silveira, AC., Landeira-Fernandez, J., Gardino, PF. Behavioral profile and dorsal hippocampal cells in carioca high-conditioned freezing rats. **Behavioral Brain Research**, V. 205, pp. 342-8, 2009.
- Ding, HK., Teixeira, CM., Frankland, PW. Inactivation of the anterior cingulate cortex blocks expression of remote, but not recent, conditioned taste aversion memory. **Learning Memory**. V.25, pp. 290-3, 2008.
- DSM IV^{TR}: **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995.
- Dubuisson, D., Dennis, SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain-stem stimulation in rats and cats, **Pain**. V. 4, pp. 161-174, 1977.
- DuPont, RL., Rice, DP., Miller, LS., Shiraki, SS., Rowland, CR., Horwood, HJ. Economic costs of anxiety disorders. **Anxiety** V. 2, pp. 167-172, 1996.
- Eippert, F., Bingel, U., Schoell, ED., Yacubian, J., Klinger, R., Lorenz, J. Activation of the opioidergic descending pain control system underlies placebo analgesia. **Neuron**. V. 63, pp. 533-543, 2009a
- Eisenberg, NI., Fabes, RA., Spinrad, TL. **Prosocial development**. W. Damon (ed): Handbook of child psychology, volume 3: Social, emotional, and personality development. 5th edition. New York: Wiley, 2006.
- Eisenberger, NI., Lieberman, MD., Williams, KD. Does rejection hurt? An fMRI study of social exclusion. **Science**. V. 302, pp. 290-292, 2003.
- Ekman, P. Facial expression of emotion. **American Psychologist** V. 48, pp. 384-92, 1993.
- Fanselow MS. Odors released by stressed rats produce opioid analgesia in unstressed rats. **Behavioral Neuroscience**. V. 99, pp. 589-92, 1985.
- Fanselow, M. S., & Bolles, R. C. (1979). Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93, 736-744.
- Fanselow, MS. 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, 1986.

Fanselow, MS. Conditional and Unconditional components of post-shock freezing, **Pavlovian Journal of Biological Science**, V. 15, pp. 177-82, 1980.

Fanselow, MS. Shock-induced analgesia on the formalin test: effects of shock severity naloxone, hypophysectomy, and associative variables. **Behavioral Neuroscience**. V. 98, pp. 79-95, 1984.

Fanselow, MS., Bolles, RC. Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**. V. 93, pp.736-744, 1979b.

Fanselow, MS., Bolles, RC. Triggering of the endorphin analgesic reaction by a cue previously associated with shock: Reversal by naloxone. *Bulletin of the Psychonomic Society*. V. 14, pp. 88-90, 1979a

Fanselow, MS., Calcagnetti, DJ., Helmstetter, FJ. Delta opioid antagonist, 16-Me cyprenorphine, selectively attenuates conditional fear and DPDPE-induced analgesia on the formalin test, **Pharmacology Biochemistry Behavior**. V. 32, pp. 469-473, 1989a.

Fanselow, MS., Lester, LS. **A functional behavioristic approach to aversively motivated behavior: Predatory imminence as a determinant of the topography of defensive behavior**. In R. C. Bolles & M. D. Beecher (Eds.), *Evolution and learning*. Hillsdale, NJ: Erlbaum, 1986.

Fanselow, MS., Sigmundi, RA. Species-specific danger signals, endogenous opioid analgesia, and defensive behavior. **Journal of Experimental Psychology and Animal Behavioral Process**. V. 12, pp. 301-9, 1986.

Fanselow, MS., Sigmundi, RA. The enhancement and reduction of defensive fighting by naloxone pretreatment. **Physiological Psychology**, V 10, 313-316, 1982.

Fasmer OB., Berger, OG., Hole, K. Development of tolerance to the antinociceptive effect of metergoline, **Psychopharmacology**. V. 93, pp. 16-18, 1987a.

Fasmer OB., Post, C., Hole, K. Changes in nociception after acute and chronic administration of zimelidine: different effects in the formalin test and the substance P behavioural assay, **Neuropharmacology**. V. 26, pp. 309-312, 1987c.

Fasmer, OB., Berge, OG., Hole, K. Changes in nociception after lesions of descending serotonergic pathways induced with 5,6-dihydroxytryptamine. Different effects in the formalin and tail-flick tests, **Neuropharmacology**. V. 24, pp. 729-734, 1985.

Fasmer, OB., Berge, OG., Jorgensen, HA., Hole, K. Antinociceptive effects of (+/-) and (-) nefopam in mice, **J. Pharm. Pharmacol.** V.39, pp. 508-511, 1987b.

Fasmer, OB., Berge, OG., Post, C., Hole, K. Effects of the putative: 5-HT1A: receptor agonist 8-OH-2-(di-n-propylamino)-tetralin on nociceptive sensitivity in mice, **Pharmacology Biochemistry and behavior.** V 25, pp. 883-888, 1986a.

Fasmer, OB., Berge, OG., Tveiten, L., Hole, K. Changes in nociception after 6-hydroxydopamine lesion of descending catecholaminergic pathways in mice, **Pharmacology Biochemistry and Behavior.** V. 24, pp. 1441-1444, 1986b.

Fasmer, OB., Hunskaar, S., Hole, K. Antinociceptive effects of serotonergic reuptake inhibition in mice, **Neuropharmacology.** V. 28, pp. 1363-1366, 1989.

Fendt, M., Fanselow, MS. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear, **Neuroscience. Biobehavioral. Review.** V. 23, pp. 743-760, 1999.

Fendt, M., Fanselow, MS. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear, **Neuroscience. Biobehavioral. Review.** V.23, pp. 743-760, 1999.

Ferreira-Netto, C., Borelli, KG., Brandão, ML. Neural segregation of Fos-protein distribution in the brain following freezing and escape behaviors induced by injections of either glutamate or NMDA into the dorsal periaqueductal gray of rats. **Brain Research.** V. 1031, pp. 151-63, 2005.

Fields, HL., Basbaum, AI., Heinricher, M. **Central nervous system mechanisms of pain modulation** SB. McMahon, M. Koltzenburg (Eds.), Wall and Melzack's textbook of pain (5th edition), Elsevier, London, pp. 125-142, 2005.

Foltz, EL., White, LE. Journal of. Pain "relief" by frontal cingulumotomy, **Journal. of Neurosurgery,** V. 19, pp. 89-100, 1962.

Frankland, PW., Cestari, V., Filipkowski, R., McDonald, RJ., Silva, AJ. The dorsal hippocampus is essential for context discrimination but not for contextual conditioning, **Behavioral Neuroscience.** V. 112, pp. 863-874, 1998.

Freud, S. (1976). Sobre os critérios para destacar da neurastenia uma síndrome particular intitulada neurose de angústia Neurastenia e neurose de Angustia. (Trabalho original publicado em 1895) **S. Freud, Edição standard brasileira das obras psicológicas completas de Sigmund Freud, Rio de Janeiro: Imago** V. 3, pp. 107-136, 1993.

Frew, AK., Drummond, PD. Stress-evoked opioid release inhibits pain in major depressive disorder. **Pain.** V.139, pp. 284-292, 2008.

Fujii, T., Sakurada, S., Tanno, K., Yabuta, M., Sasaki, T., Yamaguchi, K., Andob, R., Kisara, K. The effect of nonanoylvanillylamide on the chemically-induced nociception, **Nippon Yakuigaku Zasshi**. V. 90, pp. 267-272, 1987.

Gabbott, PL., Warner, TA., Jays, PR., Salway, P., Busby, SJ. Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor and limbic centres. **Journal of Computational Neurology**. V. 492, pp. 145-177, 2005.

Gabriel, M., Kubota, Y., Sparenborg, S., Straube, K., Vogt, BA. Effects of cingulate cortical lesions on avoidance learning and training-induced unit activity in rabbits, **Experimental Brain Research**. V. 86, pp. 585-600, 1991.

Galvão, BO., Larrubia, BC., Hommes, W.J., Cardenas, F.P., Cruz, A.P.M., e Landeira-Fernandez, J. Effects of contextual fear conditioning and pentylentetrazol on panic-like reactions induced by dorsal periaqueductal gray stimulation with N-methylD-aspartate. **Psychology & Neuroscience**, V. 3, pp. 67-72, 2010.

Gamble, GD., Milne, RJ. Hypercapnia depresses nociception: endogenous opioids implicated, **Brain Research**. V. 479, pp. 306-312, 1989.

George, MS., Ketter, TA., Parekh, PI., Horwitz, B., Hercovitch, P., RM. Post Brain activity during transient sadness and happiness in healthy women, **American Journal of Psychiatry**. V. 152, pp. 341-351, 1995.

Gomes, V.C., & Landeira-Fernandez, J. Amygdaloid lesions produced similar contextual fear conditioning disruption in the Carioca high- and low-conditioned freezing rats. **Brain Research**. V. 1233, 137-45, 2008.

Gorman, JM., Liebowitz, MR., Fyer, AJ., Goetz, D., Campeas, RB., Fyer, MR. An open trial of fluoxetine in the treatment of panic attacks. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, V. 7, pp. 329-332, 1987.

Graeff FG, Viana MB, Mora PO. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. **Neuroscience Biobehavioral Review**. V. 21, pp. 791-9, 1997.

Graeff, FG. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology (Berl)**. V.163, pp. 467-76, 2002.

Graeff, FG.; Garcia-Leal, C.; Del-Ben, CM.; Guimaraes, FS. Does the panic attack activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. V. 77, pp. 1-15, 2005.

Graeff, FG. New perspective on the pathophysiology of panic: merging serotonin and opioids in the periaqueductal gray. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 45, pp. 366-375, 2012.

Gray, J.A. and McNaughton, N. **The Neuropsychology of Anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system.** Oxford: University Press, 2nd edition, 2000.

H.E. Webb, R.G. Lascelles Treatment of facial and head pain associated with depression, **Lancet.** V 1, pp. 355–356, 1962.

Hadjipavlou, G., Dunckley, P., Behrens, TE., Tracey, I. Determining anatomical connectivities between cortical and brainstem pain processing regions in humans: a diffusion tensor imaging study in healthy controls, **Pain.** V. 123, pp. 169-178, 2006.

Hardy, SGP., Leichnetz, GR. Frontal cortex projections to the periaqueductal gray in the rat: a retrograde and orthograde horseradish peroxidase study. **Neuroscience Letters.** V. 23, pp. 13-17, 1981.

Harte, SE., Spuz, CA., Borszcz, GS. Functional interaction between medial thalamus and rostral anterior cingulate cortex in the suppression of pain affect. **Neuroscience.** V. 172, pp. 460-73, 2011.

Hassenbusch, SJ., Pillay, PK., Magdinec, M., Currie, K., Bay, JW., Covington, ED., Tomaszewski, MZ. Constant infusion of morphine for intractable cancer pain using an implanted pump. **Neurosurgery,** V.73, pp. 405-409, 1990.

Hemphill, RE., Hall, KRL., Crookes, TG. A preliminary report on fatigue and pain tolerance in depressive and psychoneurotic patients, **Journal of Mental Science.** V. 98, pp.433–440, 1952.

Hunskar, S., Berge, OG., Broch, OJ., Hole, K. Lesions of the ascending serotonergic pathways and antinociceptive effects after systemic administration of p-chloroamphetamine in mice, **Pharmacology Biochemistry and Behavior.** V. 24, pp. 709-714, 1986b.

Hunskar, S., Berge, OG., Hole, K. Orphenadrine citrate in mice, **Acta Pharmacol. Toxicol.** V. 59, pp. 53-59, 1986c.

Hunskar, S., Berge., OG., Hole, K. Antinociceptive effects of orphenadrine citrate in mice, **Journal of Pharmacology.** V. 111, pp. 221-226, 1985a

Hunskar, S., Fasmer, OB., Broch, OJ., Hole, K. Involvement of central serotonergic pathways in nefopam-induced antinociception, **European Journal of Pharmacology.** V. 138, pp. 77-82, 1987.

Hunskar, S., Fasmer, OB., Hole, K. Formalin test in mice a useful technique for evaluating mild analgesics, **Journal of Neuroscience Methods.** V. 14, pp. 69-76, 1985b.

Hunnskaar, S., Rosland, JH., Hole, K. Mechanism of orphenadrine-induced antinociception in mice: a role for serotonergic pathways, **European Journal of Pharmacology**. V. 160, pp. 83-91, 1989.

Hutchison, WD., Davis, KD., Lozano, AM., Tasker, RR., Dostrovsky, JO. Pain-related neurons in the human cingulate cortex. **Nature Neuroscience**. V. 2, pp. 403-405, 1999.

Janssen, SA. Negative affect and sensitization to pain, **Scandinavian Journal of Psychology**. V. 43, pp.131–37, 2002.

Jeon, D., Kim, S., Chetana, M., Jo, D., Ruley, HE., Lin, SY., Rabah, D., Kinet, JP., Shin, HS. Observational fear learning involves affective pain system and Cav1.2 Ca²⁺ channels in ACC, **Nature Neuroscience**. V. 13, pp. 482-8, 2010.

Johansen, JP., Fields, HL., Manning, BH. The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. V. 98, pp. 8077-8082, 2001.

Kavaliers, M. Evolutionary and comparative aspects of nociception. **Brain Research. Bulletin**. V. 21, pp. 923-931, 1988.

Kavaliers, M. **Nociception & Pain in Animals**. Kluwer Academic Publishers, 1999.

Kemp, AH., e Felmigham, KL. The psychology and neuroscience of depression and anxiety: towards an integrative model of emotion disorders. **Psychology & Neuroscience**, V. 1, pp. 177-181, 2008.

Kimble, DP., and Gostnell, D. Role of cingulate cortex in shock avoidance behavior of rats, **Journal of Comparative.& Physiological. Psychology**. V. 65, pp. 290-294, 1968.

Klein, DF., e Fink, M. Psychiatric reaction patterns to imipramine. **American Journal of Psychiatry** V. 119, pp. 432-438, 1962.

Klein, DF., e Klein, HM. The utility of the panic disorder concept. **European Archives of Psychiatry and Neurological Sciences**, V. 238, pp. 268-279, 1989.

Knight, DC., Smith, CN., Stein, EA., Helmstetter, FJ. Functional MRI of human pavlovian fear conditioning: Patterns of activation as a function of learning, **Neuroreport**. V. 10, pp. 3665-3670, 1999.

Krettek, JE., Prince, JL. Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the cat and rat. **Journal of. Cornputacional. Neurology**. V. 172, pp. 687-722, 1977.

- Krout, KE., Loewy, AD. Parabrachial nucleus projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat **Journal of Comparative Neurology**. V. 428, pp. 475-494, 2000.
- Kung, JC., Su, NM., Fan, RJ., Chai, SC., Shyu, BC. Contribution of the anterior cingulate cortex to laser-pain conditioning in rats, **Brain Research**. V. 970, pp. 58-72, 2003.
- Landeira-Fernandez, J. Context and Pavlovian conditioning. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, V.29, pp. 149-73, 1996.
- Landeira-Fernandez, J., Cruz, APM., e Brandão, ML. Padrões de respostas defensivas de congelamento associados a diferentes transtornos de ansiedade. **Psicologia USP**, V. 17, pp. 175-192, 2006.
- Landeira-Fernandez, J., Fanselow, M.S., DeCola, JP., Kim, JJ. Effects of Handling and Context Preexposure on the Immediate Shock Deficit. **Animal Learning and Behavior**. V. 23, pp. 335-338, 1995.
- LeDoux, JE., Farb, CF., Ruggiero, DA. Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. **Journal of Neuroscience**. V. 10, pp. 1043-1054, 1990
- Lester, LS., Fanselow, MS. Exposure to a cat produces opioid analgesia in rats. **Behavioral Neuroscience**, V. 99, pp. 756-759, 1985.
- Levine, JD., Gordon, NC., Fields, HL. The mechanism of placebo analgesia. **Lancet**, pp. 654-657, 1978a.
- Lewis, T., Kellgren, JH. Observations relating to referred pain, visceromotor reflexes and other associated phenomena, **Clinical Science**. V. 4, pp. 47-71, 1939.
- Lichtman, AH., Fanselow, MS. Cats produce analgesia in rats on the tail-flick test: naltrexone sensitivity is determined by the nociceptive test stimulus, **Brain Research**. V. 533, pp. 91-94, 1990.
- Liebowitz, MR., Fyer, AJ., Gorman, JM., Dillon, D., Appleby, IL., Levy, G. Lactate provocation of panic attacks. I. Clinical and behavioral findings. **Archives of General Psychiatry** pp. 764-770, 1984.
- Liebowitz, MR., Fyer, AJ., Gorman, JM., Levitt, M., Dillon, D., Levy, G. Lactate provocation of panic attacks. II. Biochemical and physiological findings. **Archives of General Psychiatry** V. 42, pp. 709-719, 1985.
- Lin, Y., Morrow, TJ., Kiritsy-Roy, JA., Terry, LC., Casey, KL. Cocaine: evidence for supraspinal, dopamine-mediated, non-opiate analgesia, **Brain Research**. V. 479, pp. 306-312, 1989.

Linton, S.J. **Understanding Pain for Better Clinical Practice. A Psychological Perspective. Pain Research and Clinical Management**, Edinburgh: Elsevier, pp.180,2005.

Linton, SJ. Psychologic risk factors for neck and back pain. **Nachemsom A, Jonsson E, editors. Neck and back pain: The scientific evidence of causes, diagnosis, and treatment**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p 57–78, 2000.

MacDonald, G., e Leary, MR. Why does social exclusion hurt? The relationship between social and physical pain. **Psychological Bulletin**, V. 131, pp. 202-223, 2005.

Macedo, CE., Martinez, RC., Brandão, ML., Conditioned and unconditioned fear organized in the inferior colliculus are differentially sensitive to injections of muscimol into the basolateral nucleus of the amygdala. **Behavioral Neuroscience**. V. 120, pp. 625-31, 2006.

MacLean PD, ed. **The triune brain in evolution: Role in paleocerebral functions**. New York: Plenum, 1990.

Magierek, V., Ramos, PL., da Silveira-Filho, NG., Nogueira, RL., Landeira-Fernandez J. Context fear conditioning inhibits panic-like behavior elicited by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray, **Neuroreport**, V. 14, pp. 1641-4, 2003.

Malin, EL., Ibrahim, DY., Tu, JW., McGaugh, JL. Involvement of the rostral anterior cingulate cortex in consolidation of inhibitory avoidance memory: Interaction with the basolateral amygdala. **Neurobiology of Learning and Memory**. V. 87, pp. 295-302, 2007.

Martin del Campo, AF., Dowson, J., Herbert, J., Paykel, E. Effects of naloxone on diurnal rhythms in mood and endocrine function, a dose/response study in man **Psychopharmacology**. V. 114, pp. 583-590, 1994.

McGaugh, JL. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences, **Annual Review Neuroscience**. V. 27, pp. 1-28, 2004.

Mclaughlin, CR., Lichtman, AH., Fanselow, MS., Cramer, CP. Tonic nociception in neonatal rats, **Pharmacology Biochemistry Behavior**. V. 36, pp. 859-862, 1990.

Melzack, R., Casey, K. **The skin senses, Sensory, motivational, and central control determinants of pain**, Kenshalo, pp 423–443, 1968.

Melzack, R., Melinkoff, DF. Analgesia produced by brain stimulation: Evidence of a prolonged onset period, **Experimental Neurology**. V. 43, pp. 369-374, 1974.

Mikulis, DJ., Jurkiewicz, MT., McIlroy, WE., Staines, WR., Rickards, L., Kalsi-Ryan, S., Crawley, AP., Fehlings, MG., Verrier, MC. Adaptation in the motor cortex following cervical spinal cord injury, **Neurology**. V. 58, pp.794-801, 2002.

Miranda MI, McGaugh JL. Enhancement of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion memory with insular cortex infusions of 8-Br-cAMP: involvement of the basolateral amygdala, **Learning and Memory**. V. 2004; V. 11, pp. 312-317, 2004.

Mobbs, D., Petrovic, P., Marchant, JL., Hassabis, D., Weiskopf, N., Seymour, B., Dolan, RJ., Frith, CD. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science*. V. 317, pp. 1079-83, 2007.

Nashold, Jr., BS., Wilson, WP., e Slaughter, DG. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **Journal of Neurosurgery**, V. 30, pp. 14-24, 1969.

Neafsey, EJ., Terreberry, RR., Hurley, KM., Ruit, KG., Fryszak, RJ. **Anterior cingulate cortex in rodents: Connections, visceral control functions, and implications for emotion**, In "Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus" (B. A. Vogt and M. Gabriel, Eds.), pp. 207-223. Birkhäuser, Boston, 1993.

O'Keefe, J. Spinal cord mechanisms subserving pain perception. **Unpublished M.Sc. thesis, McGill University**, 1984.

Ohkubo, T., Shibata, M., Takahashi, H., Inoki, R. Roles of substance P and somatostatin on transmission of nociceptive information induced by formalin in spiral Cord, **Journal of Pharmacology Experimental Therapy**, V. 252, pp. 1261-1268.

Oliveira, LC., Nobre, MJ., Brandão, ML., Landeira-Fernandez, J. Role of amygdala in conditioned and unconditioned fear generated in the periaqueductal gray. **Neuroreport**. V.15, pp. 2281-5, 2004.

Packard, MG., Cahill, L., McGaugh, JL. Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes, **Proc. Natl. Acad. Sci.** V. 91, pp. 8477-8481, 1994.

Peretz, E. The effects of lesions of the anterior cingulate cortex on the behavior of the rat, **Journal of Comparative & Physiological Psychology**. V. 53, pp. 540-548, 1960.

Pertovaara, A., Kauppila, T., Tukeva, T. The effect of medetomidine, an alpha 2 adreno captor agonist, in various pain tests, **European Journal of Pharmacology**. V. 179, pp. 323-328, 1990.

- Petrovic, P., Kalso, E., Peterson, KM., Ingvar, M. Placebo and opioid analgesia imaging a shared neuronal network. **Science**. V. 295, pp. 1737–40, 2002.
- Peyron, C., Faraco, J., Rogers, W., Ripley, B., Overeem, S., Charnay, Y., Nevsimalova, S., Aldrich, M., Reynolds, D., Albin, R., Li, R., Hungs, M., Pedrazzoli, M., Padigaru, M., Kucherlapati, M., Fan, J., Maki, R., Lammers, GJ., Bouras, C., Kucherlapati, R. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains, **Nature Medicine**. V. 6, pp. 991-997, 2000.
- Peyron, R., Faillenot, I., Mertens, P., Laurent, B., Garcia-Larrea, L. Motor cortex stimulation in neuropathic pain. Long term effects and their correlation with protracted brain activations. A PET study, **NeuroImage**. V. 34, pp. 310–321, 2007.
- Peyron, R., Laurent, B., García-Larrea, L. Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis. **Neurophysiologie Clinique**. V. 30, pp. 263-88, 2000.
- Pickar, D., Cohen, MR., Naber, D., Cohen, RM. Clinical studies of the endogenous opioid system. **Biological Psychiatry**. V. 17, pp. 1243-1276, 1982.
- Pitkanen, A. **Connectivity of the rat amygdaloid complex**. In: The Amygdala: A Functional Analysis, edited by Aggleton JP: Oxford: Oxford University Press, pp. 31-116, 2000.
- Ploner, M., Gross, J., Timmermann, L., Schnitzler, A. Cortical representation of first and second pain sensation in humans, **Proc Natl Acad Sci**. V. 99, pp. 12444-12448, 2002.
- Ponder, CA., Kliethermes, CL., Drew, MR., Muller, J., Das, K., Risbrough, VB., Crabbe, JC., Gilliam, TC., Palmer, AA.. Selection for contextual fear conditioning affects anxiety-like behaviors and gene expression. **Genes, Brain and Behavior**, 2007.
- Porro, CA. Does anticipation of pain affect cortical nociceptive systems? **Journal of Neuroscience**. V. 22, pp. 3206-3214, 2002.
- Porro, CA. Functional imaging and pain: behavior, perception, and modulation, **The Neuroscientist**. V. 9, pp. 354 -369, 2003.
- Porro, CA., Facchinetti, F., Pozzo, P., Benassi, C., Biral, GP., Genazzani, AR. Tonic pain time-dependently affects beta-endorphin-like immunoreactivity in the ventral periaqueductal Gray matter of the rat brain, **Neuroscience Letters**. V.86, pp. 89-93, 1988.
- Porro, CA., Tassinari, G., Facchinetti, F., Panerai, AE., Carli, G. Central beta-endorphin system involvement in the reaction to acute tonic pain, **Experimental Brain Research**. V. 83, pp. 549-554, 1991c.

Powell JE, Taylor D. Anger, depression, and anxiety following heroin withdrawal. **Int J Addict.** V. 27, pp.25-35, 1992.

Price, DD. Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. **Science.** V.288, pp. 1769-1772, 2000.

Raboisson, P., Bourdiol, P., Dallel, R., Clavelou, P., Woda, A. Responses of trigeminal subnucleus oralis nociceptive neurons to subcutaneous formalin in the rat, **Neuroscience Letters.** V. 125, pp. 179-182, 1991.

Rainville, P., Duncan, GH., Price, DD., Carrier, B., Bushnell, MC. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. **Science.** V. 277, pp. 968-71, 1997.

Rainville, P., Duncan, GH., Price, DD., Carrier, B., Bushnell, MC. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex, **Science.** V. 277, pp. 968-970, 1997.

Ramzy, I., Wallerstein, RS. Pain, fear, and anxiety, **The Psychoanalytic Study of the Child.** V. 13, pp. 147-90, 1958.

Reiss, S., McNally, RJ. (1985). **Expectancy model of fear.** S. Reiss & R. R. Bootzin (Eds.), *Theoretical issues in behavior therapy.* New York: Academic, pp. 107-121, 1985.

Restivo, L., Vetere, G., Bontempi, B., Ammassari-Teule, M. The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. **Journal of Neuroscience.** V.29, pp. 8206-14, 2009.

Rizvi, TA., Ennis, M., Behbehani, MM., Shipley, MT., Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. **Journal of Comparative Neurology** V. 303, pp. 121-31, 1991.

Roesler, R., Roozendaal, B., McGaugh, JL. Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of 8-Br-cAMP infused into the entorhinal cortex of rats after training, **The European Journal of Neuroscience.** V. 15, pp. 905-910, 2002.

Rolls, ET., O'Doherty, J., Kringelbach, ML., Francis, S., Bowtell, R., McGlone, F. Representations of pleasant and painful touch in the human orbitofrontal and cingulate cortices, **Cerebral Cortex,** V. 13, pp. 308-17, 2003a

Roozendaal, B., de Quervain, DJ., Ferry, B., Setlow, B., McGaugh, JL. Basolateral amygdala-nucleus accumbens interactions in mediating glucocorticoid

enhancement of memory consolidation, **The Journal of Neuroscience**. V. 21, pp. 2518-2525, 2001.

Roozendaal, B., McGaugh, JL. Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. **The European Journal of Neuroscience**. V.9, pp.76–83, 1997.

Roozendaal, B., McReynolds, JR., McGaugh, JL. The basolateral amygdala interacts with the medial prefrontal cortex in regulating glucocorticoid effects on working memory impairment, **The Journal of Neuroscience**. V. 24, pp. 1385–1392, 2004.

Rosland, JH. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature, **Pain**. V. 45, pp. 211-216, 1991.

Royce, GJ. Cortical neurons with collateral projections to both the caudate nucleus and the centromedian-pararascicular thalamic complex: a fluorescent retrograde double labeling study in the cat, **Experimental Brain Research**, V.50, pp. 157, 1983.

Ruiz-Martinez, RC., de Oliveira, AR., e Brandão, ML. Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. **Neurobiology Learning and Memory**. V. 85, pp. 58-65, 2006.

S.G. Hardy, H.J. Haigler Prefrontal influences upon the midbrain: a possible route for pain modulation, **Brain Research**. V. 339, pp. 285-293, 1985.

Sanders, MJ., Kieffer, BL., Fanselow, MS. Deletion of the mu opioid receptor results in impaired acquisition of Pavlovian context fear, **Neurobiology Learning & Memory**. V. 84, pp. 33-41, 2005.

Santos JM., Martinez, RC., Brandão, ML. Effects of acute and subchronic treatments with fluoxetine and desipramine on the memory of fear in moderate and high-intensity contextual conditioning. **European Journal of Pharmacology**, V. 542, pp. 121–128, 2006.

Santos, JM., Gárgaro, AC., Oliveira, AR., Masson, S., Brandão, ML. Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing behavior and fear-potentiated startle. **European Neuropsychopharmacology**. V.15, pp. 239-46, 2005.

Sarter, M., Markowitsch, HJ. Convergence of basolateral amygdaloid and mediodorsal thalamic projections in different areas of the frontal cortex in the rat, **Brain Research Bulletin**. V.10, pp. 607-622, 1983.

Schachter, J. Pain, fear, and anger in hypertensives and normotensives, **Psychosomatic Medicine**. V.19, pp. 17-29, 1957.

Schenberg, LC., Bittencourt, AS., Sudré, EC., Vargas, LC. Modeling panic attack. **Neuroscience Biobehavioral Review**. V. 25, pp. 647-59, 2001.

Schmitt, P., Carrive, P., Di Scala, G., Jenck, F., Brandao, M., Bagri, A., Moreau, JL., Sandner, G. A neuropharmacological study of the periventricular neural substrate involved in flight. **Behavioral Brain Research**. V. 22, pp. 181-90, 1986.

Selye, H. Further studies concerning the participation of the adrenal cortex in the pathogenesis of arthritis, **British Medical Journal**. V. 2, pp. 1129-1135, 1949.

Sewards, TV., Sewards, MA. Fear and power-dominance drive motivation: neural representations and pathways mediating sensory and mnemonic inputs, and outputs to premotor structures, **Neuroscience Biobehavioral Review**. V. 26, pp. 553-79, 2002.

Sheehan, D. Treatment of endogenous anxiety with phobic, hysterical, and hypochondriacal symptoms. **Archives of General Psychiatry**, V. 37, pp. 51-59, 1980.

Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response, **Pain**. V. 38, pp. 347-352, 1989b.

Shima, K., Nakahama, H., Yamamoto, M., Aya, K., Inase, M. Effects of morphine on two types of nucleus raphe dorsalis neurons in awake cats, **Pain**. V. 29, pp. 375-386, 1987.

Sigmund, .TRA., BOUTON, ME., BOLLES, RC. Conditioned freezing in the rat as a function of shock intensity and CS modality. **Bulletin of the Psychonomic Society** V.15, pp..254-256, 1980.

Sikes, RW., Vogt, BA. Nociceptive neurons in area 24 of rabbit cingulate cortex, **Journal of Neurophysiology**. V. 68, pp. 1720-1732, 1992.

Simpson, JR. Emotion-induced changes in human medial prefrontal cortex: II. During anticipatory anxiety, **Proc. Natl. Acad. Sci.** V.98, pp. 688-693, 2001.

Singewald, N., Salchner, P., Sharp, T. Induction of c-Fos expression in specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs, **Biological Psychiatry**. V.53, pp. 275- 283, 2003.

Sprenger, T., Valet, M., Boecker, H., Henriksen, G., Spilker, ME., Willloch, F., Wagner, KJ., Wester, HJ., Tölle, TR. Opioidergic activation in the medial pain system after heat pain. **Pain**. V. 122, pp. 63-7, 2006.

Sripanidkulchai, K., Sripanidkulchai, B., Wyss, JM. The cortical projection of the basolateral amygdaloid nucleus in the rat: a retrograde fluorescent dye study. **The Journal of Comparative Neurology**. V.229, pp. 419–431, 1984.

Staud, R. Fibromyalgia pain: do we know the source? **Curr Opin Rheumatol**. V.16, pp. 157-63, 2004.

Sugimoto, M., Kuraishi, Y., Satoh, M., Takagi, H. Involvement of medullary opioid-peptidergic and spinal noradrenergic systems in the regulation of formalin-induced persistent pain, **Neuropharmacology**. V. 25, pp. 481-485, 1986.

Takahashi, H., Onkubo, T., Shibata, M., Naruse, S. A modified formalin test for measuring analgesia in mice, **Jpn J. Oral Biol**. V. 26 ,pp. 543-548, 1984a.

Tang, J., Ko, S., Ding, HK., Qiu, CS., Calejesan, AA., Zhuo, M. Pavlovian fear memory induced by activation in the anterior cingulate cortex, **Molecular Pain**. V. 1, pp. 6, 2005.

Tang, J., Ko, S., Ding, HK., Qiu, CS., Calejesan, AA., Zhuo, M. Pavlovian fear memory induced by activation in the anterior cingulate cortex. **Molecular pain**. , pp.. 1: 6, 2005.

Targum, SD., e Marshall, LE. Fenfluramine provocation of anxiety in patients with panic disorder. **Psychiatry Research**, V. 28, pp. 295-306, 1989.

Tarpley, JW., Shlifer, IG., Halladay, LR., Blair, HT. Conditioned turning behavior: a Pavlovian fear response expressed during the post-encounter period following aversive stimulation. **Neuroscience**, V. 169, pp. 1689-704, 2010.

Taylor, S., Thordarson, DS., Maxfield, L., Fedoroff, IC., Lovell, K., Ogrodniczuk, J. Comparative efficacy, speed, and adverse effects of three PTSD treatments: exposure therapy, EMDR, and relaxation training, **Journal of Consulting and Clinical Psychology**. V.71, pp. 330-338, 2003.

Tracey, I., Mantyh, PW. 'The cerebral signature for pain perception and its modulation,' **Neuron**. V. 55, pp. 377-391, 2007.

Valet, M., Sprenger, T., Boecker, H., Willloch, F., Rummeny, E., Conrad, B. Distraction modulates connectivity of the cingulo-frontal cortex and the midbrain during pain-an fMRI analysis, **Pain**. V. 109, pp. 399-408, 2004.

Vianna, DM., Borelli, KG., Ferreira-Netto, C., Macedo, CE., Brandão, ML. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. **Brain Research Bulletin**. V. 62, pp. 179-89, 2003.

Vianna, DM., Graeff, FG., Brandão, ML., Landeira-Fernandez, J. Defensive freezing evoked by electrical stimulation of the periaqueductal gray: comparison

between dorsolateral and ventrolateral regions. **Neuroreport**.V. 12, pp. 4109-12, 2001.

Vianna, DM., Graeff, FG., Landeira-Fernandez, J., Brandão, ML. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. **Learning and Memory**.V. 8, pp. 164-9, 2001.

Vianna, DM., Landeira-Fernandez, J., Brandão, ML. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. **Neuroscience Biobehavioral Review**. V. 25, pp. 711-9, 2001.

Vogt, BA., Derbyshire, S., Jones, AKP. Pain processing in four regions of human cingulate cortex localized with coregistered PET and MRI, **European. Journal of Neuroscience**. V. 8, pp. 1461–1473, 1996.

Vogt, BA., Sikes, RW. **Cingulate Nociceptive circuitry and roles in pain processing: The cingulate premod pain model**. Vogt BA Cingulate Neurobiology and disease Oxford University Press, Oxford, 2009.

Vogt, BA., Sikes, RW., Vogt, LJ. **Anterior cingulate cortex and the medial pain system**. In: Vogt BA, Gabriel M (eds) Neurobiology of cingulate cortex and limbic thalamus. Birkhauser, Boston, pp. 313-344, 1993.

Wagner, KJ., Sprenger, T., Kochs, EF., Tolle, TR., Valet, M., Willoch, F. Imaging human cerebral pain modulation by dose-dependent opioid analgesia: a positron emission tomography activation study using remifentanyl. **Anesthesiology**. V. 106, pp. 548-556, 2007.

Wall, PD. On the relation of injury to pain, **Pain**. V. 6, pp. 253-264, 1979.

Whalen, PJ., Rauch, SL., Etcoff, NL., McInerney, SC., Lee, MB., Jenike, MA. Masked presentations of emotional facial expressions modulate amygdala activity without explicit knowledge, **Journal of Neuroscience**. V. 18, pp. 411-418, 1998.

Wheeler-Aceto, H., Porreca, F., Cowan, A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents, **Pain**. V 40, pp. 229-238, 1990.

Wildmann, J., Kruger, A., Schmole, M., Niemann, J., Matthaei, H. Increase of circulating beta-endorphin-like immunoreactivity correlates with the change in feeling of pleasantness after running. **Life Science**. V. 38, pp. 997-1003, 1986.

Winter, CA. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of indomethacin and other agents. **S. Garattini and M.N.G Dukes, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs**, V. 82, pp. 190-202, 1965.

Wyss, JM., Sripanidkulchai, K. The topography of the mesencephalic and pontine projections from the cingulate cortex of the rat, **Brain Research**. V. 293, pp. :1-15, 1984.

Zhou, Y., Lin, FC., Du, YS., Qin, LD., Zhao, ZM., Xu, JR. Gray matter abnormalities in internet addiction: a voxel-based morphometry study, **European Journal of Radiology**. V. 79, pp. 92–95, 2011.

Zhuo, M. Cortical excitation and chronic pain, **Trends in Neuroscience**. V. 31, pp. 199-207, 2008.

Zhuo, M. Cortical excitation and chronic pain. **Trends in Neuroscience**. V. 31, pp.:199-207, 2008.

Zorrilla, EP., DeRubeis, RJ., Redei, E. High self-esteem, hardiness and affective stability are associated with higher basal pituitary-adrenal hormone levels **Psychoneuroendocrinology**. V. 20, pp. 591-601, 1995.

Zubieta, JK., Bueller, JA., Jackson, LR., Scott, DJ., Xu, Y., Koeppe, RA., Stohler, CS. Placebo effects mediated by endogenous opioid neurotransmission and μ -opioid receptors. *Journal of Neuroscience*. V. 25, pp. 7754-7762, 2005a.

Zubieta, JK., Ketter, TA., Bueller, JA., Xu, Y., Kilbourn, MR., Young, EA. Regulation of human affective responses by anterior cingulate and limbic mu-opioid neurotransmission. **Archives of Gen Psychiatry** 60: 1145–1153, 2003.

Zubieta, JK., Smith, YR., Bueller, JA., Xu, Y., Kilbourn, MR., Jewett, DM., Meyer, CR., Koeppe, RA., Stohler, CS. Regional mu opioid receptor regulation of sensory and affective dimensions of pain. **Science**. V.293, pp.:311-5, 2001.



Panic-like behaviors in Carioca High-and Low-conditioned Freezing rats

Bruno de Oliveira Galvão¹, Vitor de Castro Gomes¹, Silvia Maisonnette¹, and J. Landeira-Fernandez^{1,2}

1 - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

2 - Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Abstract

Panic disorder involves both recurrent unexpected panic attacks and persistent concern about having additional attacks. Electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray (dPAG) is an animal model of both panic attack and panic disorder, whereas contextual fear conditioning represents a model of anticipatory anxiety. Previous research indicated that anxiety has an inhibitory effect on panic attack-like behavior. However, still unclear is the role that anticipatory anxiety plays in panic disorder-like behaviors. This issue was investigated with two lines of animals selectively bred for high (Carioca High-Freezing) and low (Carioca Low-Freezing) freezing in response to contextual cues associated with footshock. The results suggest that although anticipatory anxiety might exert an inhibitory effect on the expression of panic attack, it might also facilitate the pathogenesis of panic disorder. **Keywords:** breeding lines, dorsal periaqueductal gray, contextual fear conditioning, freezing behavior, escape behavior, panic attack, panic disorder.

Received 28 January 2011; received in revised form 1 June 2011; accepted 3 June 2011. Available on line 10 October 2011

Introduction

Panic disorder is a complex anxiety disorder that involves both recurrent, unexpected panic attacks and persistent concern about having additional attacks (American Psychiatric Association, [APA], 1994). A panic attack is a sudden surge of overwhelming fear or terror that occurs without warning or any obvious reason. Symptoms are accompanied by major neurovegetative changes such as palpitation, hypertension, difficulty with deep breathing, sweating, an urge to void the bladder, increased peristalsis, the desire to flee, and a feeling of imminent death or losing control. An attack is an acute condition with an abrupt onset that reaches a peak within 10 min.

Although the occurrence of a panic attack is a hallmark of panic disorder, the chronic conditioning

of this anxiety disorder is defined by the constant and persistent fear of experiencing further attacks or worry about the possible consequences of a panic attack. Patients suffering from panic disorder may live in a nearly constant state of apprehension. The frightening prospect of experiencing another panic attack might be so extreme that the patient can develop agoraphobia (i.e., a fear of being in places or situations in which escape might be difficult or help might not be available in the event of a panic attack or panic-like symptoms).

Electrical stimulation of the dorsal portion of the periaqueductal gray (dPAG) has been successfully employed as an animal model of both panic attack (i.e., the acute reaction that might trigger the panic disorder condition) and panic disorder (i.e., the chronic or continuous condition that characterizes the full expression of this anxiety disorder). A stepwise increase in the electrical current intensity used to stimulate the dPAG in rats produces a suppression of spontaneous locomotor activity (i.e., freezing) accompanied by piloerection and exophthalmus at lower intensities. As stimulation continues, active escape behaviors such as running and jumping appear at higher intensities (Brandão, de Aguiar, & Graeff, 1982). After the termination of the dPAG electrical stimulation at the escape threshold, the animal engages in a long-lasting freezing response (Vianna, Graeff,

Bruno de Oliveira Galvão, Vitor de Castro Gomes, and Silvia Maisonnette, Department of Psychology, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. J. Landeira-Fernandez, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil AND curso de Psicologia, Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, RJ, Brazil Correspondence concerning this article should be addressed to J. Landeira-Fernandez, Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Ed. Cardeal Leme, Sala 201L, Rua Marquês de São Vicente 225, Gávea, RJ-Brazil, 22451-900. Email: landeira@puc-rio.br

Brandão, & Landeira-Fernandez, 2001). Freezing and escape responses triggered by dPAG stimulation are mediated by the same neurochemical processes and represent a model of panic attack, whereas dPAG post-stimulation freezing at the aversive escape threshold is mediated by a distinct neuronal substrate and appears to be a model of panic disorder (for review, see Brandão, Zanoveli, Ruiz-Martinez, Oliveira, & Landeira-Fernandez, 2008).

Considerable evidence also indicates that the freezing response to contextual cues previously associated with electrical footshock is one of the most reliable animal models of anticipatory anxiety (Brandão et al., 2008). In a typical experiment, a rat is exposed to a novel chamber, and a brief unsignaled footshock is presented several minutes later. Some time later (i.e., the next day), the animal freezes when returned to the same chamber in the absence of footshock (Landeira-Fernandez, 1996). This defensive freezing response differs from the one triggered by dPAG stimulation because no piloerection or exophthalmus is observed. Moreover, freezing in response to contextual cues previously paired with footshock involves an initial active motor component with the purpose of withdrawing to a safe and hidden location next to an object (thigmotaxis), such as a corner or a wall.

Previous studies indicated that rats exposed to contextual cues previously associated with electrical footshock exhibited a robust defensive freezing response and exhibited a higher dPAG electrical stimulation threshold to induce escape responses compared with control animals that were not exposed to contextual fear conditioning (Magierek, Ramos, da Silveira-Filho, Nogueira, & Landeira-Fernandez, 2003). This pattern of results has been replicated recently (Galvão, Larrubia, Hommes, Cardenas, & Cruz, 2010) and indicates that anticipatory anxiety might play an inhibitory role on the occurrence of panic attack-like behavior. However, still unclear is the extent to which anxiety might influence the development of panic disorder.

Two new lines of Wistar rats, termed Carioca High- and Low-Freezing (CHF, CLF), were selectively bred for high and low levels of freezing in response to contextual cues previously associated with footshock (Gomes & Landeira-Fernandez, 2008). After three generations of breeding, CHF rats were considered to naturally have a greater propensity for exhibiting higher freezing responses compared with CLF animals. A recent study indicated isomorphism between CHF rats and anticipatory anxiety (Dias, Bevilacqua, Silveira, Landeira-Fernandez, & Gardino, 2009). Therefore, these lines of animals may be an important tool for investigating the relationship between anxiety with panic attack and panic disorder. Accordingly, the purpose of

the present study was to investigate whether CHF and CLF animals exhibit different patterns of panic attack- and panic disorder-like behaviors induced by electrical stimulation of the dPAG.

Method

Subjects

Experimental animals selectively bred for high (CHF) and low (CLF) contextual fear conditioning were obtained according to a procedure described in a previous study (Gomes & Landeira-Fernandez, 2008). Briefly, albino Wistar rats were placed in an observation chamber. Three minutes later, three unsignaled electrical footshocks (0.7 mA, 1 s duration) were delivered 20 s apart. Three minutes after the last shock, the animal was returned to its home cage. Approximately 24 h after the training session, the animal was returned to the same observation chamber for an 8-min test session in the absence of any stimulation. The present study employed male CHF and CLF rats from the ninth generation with the highest (CHF) and lowest (CLF) conditioned freezing scores. All animals were employed as breeders in our ongoing selective breeding program before the beginning of the experiment.

Animals were housed in groups of five to seven, according to their respective lines, in polycarbonate cages measuring $18 \times 31 \times 38 \text{ cm}^3$, with food and water available *ad libitum*. The room temperature was controlled ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), with a 12 h/12 h light/dark cycle (07:00–19:00 h). The experiment was conducted during the light phase of the cycle. Animals were 6 months old at the beginning of the experiment. The experimental procedures were performed in accordance with the guidelines for experimental animal research established by the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior, which are based on the United States National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (revised 1996).

Surgery

All animals were implanted with a stainless steel unilateral guide-cannula aimed at the dPAG. Under tribromoethanol anesthesia (250 mg/kg, i.p.), each animal was fixed in a Kopf stereotaxic frame and injected locally with lidocaine (20 mg/ml). The upper incisor bar was set 3.3 mm below the interaural line such that the skull was horizontal between bregma and lambda. The following coordinates were used for implantation of the guide-cannula, with lambda serving as the reference for each plane according to the Paxinos and Watson (1986) rat brain atlas: anterior/posterior, +2.3 mm; medial/lateral, -1.7 mm; dorsal/ventral, -4.5 mm. The guide-cannula was attached to the skull of the animal with acrylic resin and three stainless steel screws. A stylet of the same length as the guide-cannula was introduced inside the guide-cannula to prevent obstruction.

Material

The experiment was conducted in the same observation chamber ($25 \times 20 \times 20 \text{ cm}^3$) where CHF and CLF animals were phenotyped for contextual fear conditioning. The observation chamber was placed inside a sound-attenuating box. A red light bulb (25 W) was placed inside the box, and a video camera mounted on the back of the observation chamber was used to observe the animal's behavior on a monitor placed outside the experimental room. A ventilation fan attached to the box supplied 78 dB background noise.

Procedure

Seven days after surgery, each animal was placed inside the observation chamber. Five minutes later, freezing and escape aversive thresholds were determined using electrical stimuli (alternating current, 60 Hz, 20 s) presented through a removable electrode connected to the guide-cannula aimed at the dPAG. Brain stimulation was presented at 20-s intervals, with the current intensity beginning at 5 μA and increasing by 5 μA steps. The freezing threshold was operationally defined as the lowest current intensity that produced an absence of movement, with the exception of respiration, accompanied by at least two of the following autonomic reactions: urination, defecation, piloerection, or exophthalmia. The current intensity producing running or jumping was considered to be the escape threshold. The dPAG electrical stimulation was stopped when the threshold for eliciting an escape was reached. To investigate freezing behavior that occurred after cessation of dPAG stimulation applied at the escape threshold, the animals remained in the observation chamber for an additional 8 min without any stimulation. During this period, freezing was scored using a time-sample procedure. Every 2 s, the animal's freezing behavior was scored by a well-trained observer.

After the experiment, animals were sacrificed under deep anesthesia with chloral hydrate. The brain was perfused through the heart with saline solution (0.9%) followed by 10% formalin solution, removed, and postfixed in 10% formalin. Frozen 55- μm sections were cut using a microtome to localize the positions of the electrode tips according to the atlas of Paxinos and Watson (1986). Only data from rats with electrode tips located inside the dPAG were included in the statistical analysis.

Results

Data are expressed as mean \pm SEM. Two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate differences in aversive threshold between CHF and CLF animals. The breeding line (CHF and CLF) was considered the between-subjects factor, and aversive thresholds (freezing and escape) were considered

the within-subjects factors. Two-way repeated-measures ANOVA was also used for dPAG-evoked post-stimulation freezing analysis, with breeding line (CHF and CLF) the between-subjects factor and time (min) the within-subjects factor. Significant effects in the ANOVA were followed by the Newman-Keuls *post hoc* test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Histological examination of the brain slices indicated that all electrode tips were located inside the dPAG. The final group samples were the following: CHF, $n = 7$; CLF, $n = 7$. The representative sites of the dPAG stimulation are shown in Figure 1.

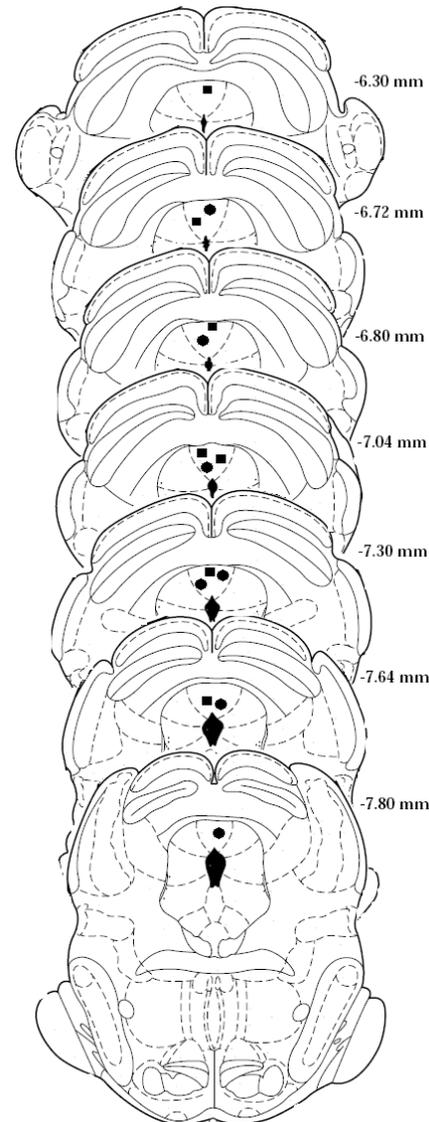


Figure 1. Composite of stimulation electrode tips within the dPAG. According to the Paxinos and Watson (1986) atlas, the numbers on the right-hand side of each plate indicate the distance in millimeters from bregma. CHF animals are represented by circles, and CLF animals are represented by squares.

As reported previously (Oliveira, Nobre, Brandão, & Landeira-Fernandez, 2004), freezing and escape responses induced by dPAG electrical stimulation occurred in a stepwise fashion. As the intensity of the current applied to the dPAG increased, the animals suddenly stopped, became immobile, and often urinated and defecated. With higher intensities, this freezing behavior was followed by vigorous running and jumping reactions. The escape response stopped as soon as the dPAG electrical stimulation was switched off. Figure 2 shows the mean (\pm SEM) of the electrical current threshold required to trigger freezing and escape behaviors in CHF and CLF animals. Two-way ANOVA revealed main effects of breeding line ($F[1,12] = 5.42$, $p < 0.05$) and aversive threshold ($F[1,12] = 234.37$, $p < 0.0001$). No breeding line \times aversive threshold interaction was found ($F[1,12] = 0.37$, $p > 0.5$). *Post hoc* analysis indicated that CHF animals presented higher aversive freezing and escape thresholds than CLF animals (both $p < 0.05$).

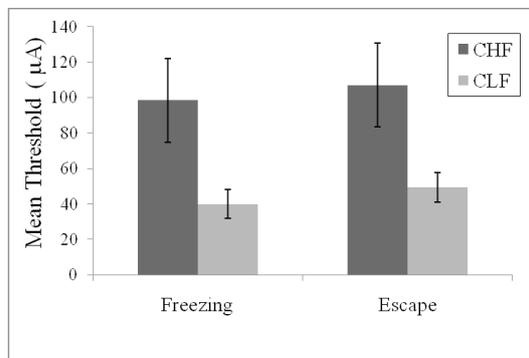


Figure 2. Mean (\pm SEM) freezing and escape thresholds determined with the procedure of the dPAG electrical stimulation in the two breeding lines selected according to their emotional reactivity.

Figure 3 shows the mean (\pm SEM) percentage of time that CHF and CLF animals spent freezing following dPAG stimulation at the escape threshold. Two-way repeated-measures ANOVA showed a significant effect of breeding line ($F[1,12] = 12.10$, $p < 0.005$). No main effect of time ($F[1,12] = 2.18$, $p > 0.1$) or interaction between lines of animals during the 8-min dPAG post-stimulation period ($F[1,12] = 0.34$, $p > 0.5$) was found. *Post hoc* analysis indicated that CHF animals expressed more dPAG-evoked post-stimulation freezing behavior compared with CLF animals during the 8-min test period (all $p < 0.05$). Because CHF animals required a higher threshold current than CLF animals to elicit an escape response it is possible that differences between these two groups in freezing behavior immediately after dPAG electrical stimulation at the escape threshold might be due to differences in the threshold current between CHF and CLF. In order to test this possibility, an analysis of

covariance (ANCOVA) using the escape dPAG electrical stimulation threshold parameter as covariant factor was performed. Results from this analysis indicated confirmed significant main effect of breeding line ($F[1,12] = 9.34$, $p = 0.01$). A main effect of time ($F[1,12] = 8.47$, $p = 0.01$) and no interaction between lines of animals during the 8-min dPAG post-stimulation period ($F[1,12] = 0.55$, $p > 0.4$) was also detected.

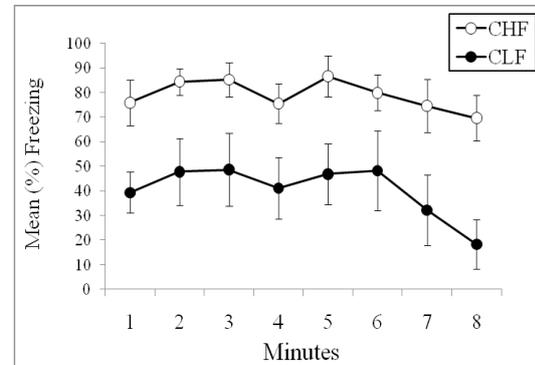


Figure 3. Mean (\pm SEM) percentage of freezing in CHF and CLF animals during the 8-min period after the cessation of dPAG stimulation applied at the escape threshold.

Discussion

The current understanding of anxiety disorders departed from an earlier concept of a unitary process and evolved into a more recent view that suggests a group of different but interrelated nosological categories. A major shift in this recent view of anxiety disorder occurred with Klein's pioneering work (1962; 1964), which showed that imipramine had a selective effect in the treatment of panic attacks. Since then, a qualitative distinction between anticipatory anxiety and spontaneous panic attack has been repeatedly observed in clinical settings (Battaglia & Ogliari, 2005). However, the relationship between anticipatory anxiety with panic attack and the development of panic disorder remains a subject of intense debate.

Experimental research employing rats selectively bred for high or low levels of emotionality represents an important and powerful tool for investigating the relationships between different aspects of anxiety disorders. Rats in this study were selectively bred to exhibit high (CHF) or low (CLF) levels of freezing in response to contextual cues previously associated with footshock (Gomes & Landeira-Fernandez, 2008). Although freezing appears to be the main conditioned response observed during fear conditioning, active escape responses have also been suggested to be present during this aversive learning situation (Tarpley, Shlifer, Halladay, & Blair, 2010). This is a particularly important issue because it might challenge the view that the CHF

phenotype is associated with more anxiety-like behavior than the CLF phenotype. Thus, CLF rats may freeze less not because they are less “afraid,” but because they are more “frightened” and thus more prone to exhibit active escape responses than defensive freezing behavior.

Much evidence appears to exclude this possibility. For example, conditioned freezing is a direct function of footshock intensity (Morris & Bouton, 2008) and has been pharmacologically validated as an animal model of anticipatory anxiety. Accordingly, benzodiazepine receptor agonists such as diazepam and midazolam reduced the amount of conditioned freezing, whereas the benzodiazepine inverse agonist dimethoxy- β -carboline produced freezing behavior similar to that elicited by context fear conditioning (Fanselow, 1991). Consistent with this, anxiolytic-like substances such as 5-HT_{1A} receptor agonists, selective serotonin reuptake inhibitors, and monoamine oxidase inhibitors with verified clinical efficacy in the treatment of anxiety symptoms, attenuated conditioned behavior in rats, indicating considerable construct and face validity of this paradigm to human anxiety (Conti, Maciver, Ferkany, & Abreu, 1990; Maki et al., 2000). Moreover, mice selectively bred for high and low levels of freezing in response to contextual cues previously associated with footshock also presented, respectively, higher and lower levels of anticipatory anxiety in the fear-potentiated startle test (Ponder et al., 2007). Finally, previous results from our laboratory with different models of anxiety, such as the elevated plus maze and social interaction test, indicated that CHF animals exhibited significantly more anxiety-like behavior than control rats (Dias et al., 2008). Therefore, the CHF line appears to represent a robust animal model of anticipatory anxiety.

The results of the present study indicated that CHF animals had a higher dPAG electrical stimulation aversive threshold for producing freezing and escape reactions than CLF animals. This result is consistent with several other studies, which indicated that contextual fear conditioning can inhibit defensive responses to aversive proximal or painful stimuli such as the tail-flick response to radiant heat, complex and elaborated nociceptive responses elicited in the formalin test, vigorous running and jumping triggered by footshock (Fanselow, 1982) and shock-induced defensive fight reactions (Bolles and Collier, 1976). Moreover, contextual fear conditioning can also inhibit vigorous escape responses induced by *N*-methyl-D-aspartate (Galvão et al., 2010) or electrical stimulation (Magierek et al., 2003) of the dPAG. Much evidence indicates that the amygdaloid complex and its projections to the ventral portion of the PAG are critically involved in the regulation of contextual fear conditioning. Malfunctioning of this system might be associated with pathological forms of anticipatory anxiety (e.g., generalized anxiety disorder). Descending inhibitory projections from the amygdaloid complex might reach

the dPAG, which in turn might inhibit defensive reactions triggered by this structure. Therefore, activation of the neural circuitry involved in anxiety might indeed inhibit the occurrence of panic attack-like behavior associated with neurons located within the dPAG.

The present results also indicated that CHF animals displayed more freezing behavior immediately after dPAG electrical stimulation at the escape threshold compared with CLF animals. This difference might be attributable to the fact that CHF animals required a higher threshold current than CLF animals to elicit an escape response. An ANCOVA contested this hypothesis indicating that although CHF animals were more resistant to the expression of escape behavior in response to dPAG stimulation, they were more prone to freezing after the occurrence of the dPAG aversive stimulation compared with CLF animals.

The dPAG post-stimulation freezing is not fear-conditioning in response to contextual cues associated with the dPAG electrical stimulation. Previous studies employed a context shift procedure and indicated that freezing after dPAG stimulation persisted when animals were placed in a different context immediately after the dPAG stimulation (Vianna et al., 2001). Moreover, several studies indicated that freezing observed after dPAG stimulation has a different neural mechanism from freezing and escape responses elicited by dPAG electrical stimulation. For example, electrolytic lesions or muscimol-induced inactivation of the amygdaloid complex reduced dPAG post-stimulation freezing but did not affect freezing or escape responses induced by dPAG electrical stimulation (Oliveira et al. 2004; Ruiz-Martinez, de Oliveira, & Brandão, 2006). Indeed, dPAG post-stimulation freezing appears to be mediated by ascending projections, possibly relayed through the thalamus to forebrain structures related to the sensory processing of aversive stimuli. These findings suggest the possibility that dPAG post-stimulation freezing might represent an animal model of panic disorder. Therefore, the fact that CHF animals expressed more dPAG post-stimulation freezing than CLF animals might indicate that anticipatory anxiety could enhance the development of panic disorder triggered by panic attacks.

The complex nature of the symptoms involved in panic disorders suggests that several brain regions may be implicated in this pathology. For example, brain imaging techniques indicated that anxiety reactions among patients who suffer from panic disorder recruits several forebrain areas such as the anterior cingulate cortex, hippocampus, basal ganglia, and insula (de Carvalho et al., 2010). Another important brain region that appears to be implicated in the modulation of anxiety in panic disorder is the amygdaloid complex. Indeed, ascending projections from the dPAG to the amygdaloid complex might represent one of the main routes responsible for the pathogenesis of panic disorder. Therefore, anxiety

reactions that are present in panic disorder might also recruit some forebrain structures related to anticipatory anxiety. Further studies are needed to elucidate whether activation of neural circuitries associated with the amygdaloid complex might play an inhibitory role in the occurrence of panic attack and excitatory modulation of structures associated with panic disorders.

Acknowledgment

This research was supported by Brazilian National Research Council CNPq, 522720/95-10 awarded to J. Landeira-Fernandez.

References

- American Psychiatric Association. (1994) *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, (4th ed). Washington: American Psychiatric Association.
- Battaglia, M., & Oliari, A. (2005). Anxiety and panic: from human studies to animal research and back. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 29, 169-79.
- Bolles, R.C., & Collier, A. C. (1976). The effect of predictive cues of freezing in rats. *Animal Learning Behavior*, 4, 6-8.
- Brandão, M.L., de Aguiar, J.C., & Graeff, F.G. (1982) GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 16, 397-402.
- Brandão, M.L., Zanoveli, J.M., Ruiz-Martinez, R.C., Oliveira L.C., & Landeira-Fernandez J. (2008). Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. *Behavioral Brain Reviews*, 188, 1-13.
- Conti, L.H., Maciver, C.R., Ferkany, J.W., & Abreu, M.E. (1990). Footshock-induced freezing behavior in rats as a model for assessing anxiolytics. *Psychopharmacology (Berl)*, 102, 492-497.
- de Carvalho, M.R., Dias, G.P., Cosci, F., de-Melo-Neto, V.L., Bevilacqua, M.C., Gardino, P.F. & Nardi, A.E. (2010) Current findings of fMRI in panic disorder: contributions for the fear neurocircuitry and CBT effects. *Expert Reviews of Neurotherapeutics*, 10, 291-303.
- Dias, G.P., Bevilacqua, M.C., Silveira, A.C., Landeira-Fernandez, J., & Gardino P.F. (2009). Behavioral profile and dorsal hippocampal cells in carioca high-conditioned freezing rats. *Behavioral Brain Research*, 205, 342-8.
- Fanselow, M.S. (1982). The post-shock activity burst. *Animal Learning and Behavior*, 10, 448-54.
- Fanselow, M.S. (1991). Analgesia as a response to aversive Pavlovian conditional stimuli: Cognitive and emotional mediators. In Denny M.R. *Fear, avoidance, and phobias: A fundamental analysis*, (pp. 61-86) Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum.
- Galvão, B., Larrubia, B., Hommes, W.J., Cardenas, F.P., Cruz, A.P.M., & Landeira-Fernandez, J. (2010). Effects of contextual fear conditioning and pentylenetetrazol on panic-like reactions induced by dorsal periaqueductal gray stimulation with N-methyl-D-aspartate. *Psychology Neuroscience*, 3, 67-72.
- Gomes, V.C., & Landeira-Fernandez, J. (2008). Amygdaloid lesions produced similar contextual fear conditioning disruption in the Carioca high- and low-conditioned freezing rats. *Brain Research*, 1233, 137-45.
- Klein, D.F. (1964). Delineation of two drug-responsive anxiety syndromes. *Psychopharmacologia*, 5, 397-408.
- Klein, D.F., & Fink, M. (1962). Psychiatric reaction patterns to imipramine. *American Journal of Psychiatry*, 119, 432-8.
- Landeira-Fernandez, J. (1996). Context and Pavlovian conditioning. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, 29, 149-73.
- Magierek, V., Ramos, P.L., da Silveira-Filho, N.G., Nogueira, R.L., & Landeira-Fernandez, J. (2003). Context fear conditioning inhibits panic-like behavior elicited by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray. *Neuroreport*, 14, 1641-4.
- Maki, Y., Inoue, T., Izumi, T., Muraki, I., Ito, K., Kitaichi, Y., Li X., & Koyama T. (2000). Monoamine oxidase inhibitors reduce conditioned fear stress-induced freezing behavior in rats. *European Journal of Pharmacology*, 406, 411-8.
- Morris, R.W., & Bouton, M.E. (2006). Effect of unconditioned stimulus magnitude on the emergence of conditioned responding. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 32, 371-85.
- Oliveira, L.C., Nobre, M.J., Brandão, M.L., & Landeira-Fernandez, J. (2004) Role of amygdala in conditioned and unconditioned fear generated in the periaqueductal gray. *Neuroreport*, 15, 2281-5.
- Paxinos G., & Watson C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, (2nd ed). New York: Academic Press.
- Ponder ,C.A., Kliethermes, C.L., Drew, M.R., Muller, J., Das, K., Risbrough, V.B., Crabbe, J.C., Gilliam, T.C., & Palmer, A.A. (2007). Selection for contextual fear conditioning affects anxiety-like behaviors and gene expression. *Genes Brain and Behavior*, 6, 736-49.
- Ruiz-Martinez, R.C., de Oliveira, A.R., & Brandão, M.L. (2006). Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. *Neurobiology Learning and Memory*, 85, 58-65.
- Tarpley, J.W., Shlifer, I.G., Halladay, L.R., & Blair, HT. (2010). Conditioned turning behavior: a Pavlovian fear response expressed during the post-encounter period following aversive stimulation. *Neuroscience*, 169,1689-704.
- Vianna, D.M., Graeff, F.G., Brandão, M.L., & Landeira-Fernandez J. (2001) Defensive freezing evoked by electrical stimulation of the periaqueductal gray: comparison between dorsolateral and ventrolateral regions. *Neuroreport* 12, 4109-12.