



Carolina Irurita Ballesteros

**Participação do Hipocampo Dorsal e Ventral nas
reações de defesa produzidas pelo condicionamento
contextual de medo e pela estimulação elétrica da
Matéria Cinzenta Periaquedutal dorsal**

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção de grau de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Psicologia Clínica do Centro de
Teologia e Ciências Humanas da PUC-Rio.

Orientador: Prof. Jesus Landeira-Fernandez

Rio de Janeiro
Março de 201



Carolina Irurita Ballesteros

**Participação do Hipocampo Dorsal e Ventral nas reações
de defesa produzidas pelo condicionamento contextual de
medo e pela estimulação elétrica da Matéria Cinzenta
Periaquedutal dorsal**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Psicologia Clínica do Departamento de Psicologia do Centro de Teologia e Ciências Humanas da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Jesus Landeira Fernandez

Orientador

Departamento de Psicologia – PUC-Rio

Profa. Helenice Charchat Fichman

Departamento de Psicologia – PUC-Rio

Profa. Patricia Franca Gardino

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ

Profa. Denise Berruezo Portinari

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

Rio de Janeiro, 30 de março de 2012.

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

Carolina Irurita Ballesteros

Aluna de Mestrado em Psicologia Clínica pela linha Clínica e Neurociências, Departamento de Psicologia PUC-Rio início 03/2010. Graduação: Psicologia - University of Central Florida (UCF) 08/ 2004 - 08/ 2009

Ficha Catalográfica

Irurita Ballesteros, Carolina

Participação do hipocampo dorsal e ventral nas reações de defesa produzidas pelo condicionamento contextual de medo e pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal / Carolina Irurita Ballesteros ; orientador: Jesus Landeira-Fernandez. – 2012.

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

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Psicologia, 2012.

CDD: 150

Para José Daniel Gomez Norena, um ser humano
extraordinário e uma benção de Deus.

Obrigada por existir
e por ser a inspiração de muitas pessoas.

Dedico esta tese aos dois amores de minha vida, meu marido David F. Henao e minha filha Valentina Henao Irurita que diversas vezes tiveram que ficar sem minha companhia, que tiveram paciência para me esperar e que sempre se orgulharam de mim.

Amo vocês com todas as forças de meu ser

Agradecimentos

Ao meu professor J. Landeira-Fernandez, pela oportunidade de me deixar trabalhar com ele, confiar em mim e me ensinar a sentir a ciência;

À minha filha Valentina, meu maior presente de Deus e meu maior amor. Você me incentiva todos os dias a ser uma pessoa melhor;

Ao meu amado marido, companheiro de todas as horas que sempre está ao meu lado me apoiando em tudo. Te amo com todas as minhas forças;

Aos meus pais Kenny Ballesteros e Alvaro Irurita, melhores pais que sempre estão me incentivando para realizar meus sonhos; amo vocês com toda minha alma e quero que sempre sintam orgulho de mim.

Diana e Gerardo, muito obrigada pelo carinho incondicional;

Aos meus irmãos, Nestor, Alvaro, Alejandra, Maria Fernanda e Jorge Andrés, vocês são pedacinhos do meu coração, os amo imensamente;

À Flavia, muito obrigada por tudo, você é muito mais que a técnica do laboratório que fez muitos milagres para eu conseguir fechar o meu experimento, você é uma grande amiga que vou levar sempre no meu coração;

Monique Dantas e Vitor Rocha, dois grandes ajudantes, sou muito grata a vocês pela ajuda imensa;

Bruno Galvão, a pessoa mais genuína que eu já conheci, muito obrigada por me ensinar tantas coisas e por sempre ser um amigo incondicional;

Vitor Gomes, muito obrigada por me acolher no laboratório com tanto carinho, desejo muita sorte para você nos EUA e quero que saiba que sempre terá uma amiga por lá;

Silvia Massonetti, a alegria de nosso laboratório, obrigada por fazer meus dias muito felizes com sua presença. Você é uma dessas pessoas que sempre quero ter na minha vida!

Érica de Lana, AMIGA!!! Obrigada por muitas coisas, você sempre me deu muita força... você é uma grande amiga e uma excelente profissional, te admiro muito!

Ana Carolina Fioravanti, mãe do Gabriel, foi muito bacana compartilhar nossas experiências e dicas como mães grávidas, fico muito feliz porque o Gabriel é um menino cheio de saúde e espero ele e a Valentina sejam bons amigos assim como as mães;

Alberto Filgueiras, amigão de mestrado... espero sempre estar perto de você... ANIMO! Você é uma grande pessoa;

Carlos Barroso, amigo muito querido. Obrigada pela sua amizade.

Luciene Rocinholi, uma excelente amiga e profissional. Muito obrigada por tantas oportunidades, espero sempre contar com sua amizade;

Michelle Ribeiro, grande amiga! Obrigada pelo seu carinho;

Emmy Uhera, obrigada por sempre me acolher;

Luciana Brooking, super amiga! Espero que saiba que do fundo do meu coração desejo que todos seus sonhos se realizem!! Obrigada por ser minha amiga e por essa amizade incondicional;

Gisele Dias, a amiga mais doce! Você é fofa demais, quero dividir muitas coisas contigo! Espero nunca nos separarmos.

Laura A Leon, fue muy rico haberte conocido y sobre todo tener com quien hablar español cuando más necesitaba huir del portugués. Adoro nuestras conversas filosóficas...

Prof. Fernando Cardenas. Um excelente professor, bom amigo e um grande orgulho de compatriota, você me faz sentir muito orgulhosa de ser colombiana.

Resumo

Irurita-Ballesteros, Carolina; Landeira-Fernandez, Jesus (Orientador). **Participação do Hipocampo Dorsal e Ventral nas reações de defesa produzidas pelo condicionamento contextual de medo e pela estimulação elétrica da Matéria Cinzenta Periaquedutal dorsal.** Rio de Janeiro, 2012. 75p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Este estudo investiga o papel do hipocampo no comportamento de defesa condicionado e incondicionado examinando o efeito de lesões eletrolíticas pré-treino no hipocampo dorsal e ventral de ratos expostos a dois tipos de estímulos aversivos: estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal e choque nas patas. A lesão na parte dorsal e ventral diminuiu significativamente o comportamento defensivo condicionado. No comportamento defensivo incondicionado, a lesão ventral alterou significativamente o congelamento pré-fuga e a fuga. Os resultados sugerem um papel específico da parte dorsal e ventral do hipocampo na modulação de defesa através da utilização do modelo animal de ataque de pânico e TAG.

Palavras-chave

Ansiedade; medo condicionado; hipocampo ventral; ataque de pânico; MCPD.

Abstract

Irurita-Ballesteros, Carolina; Landeira-Fernandez, Jesus (Advisor). **Role of dorsal and ventral hippocampus on conditioned and unconditioned fear elicited by dorsal periaqueductal grey matter electrical stimulation in rats.** .Rio de Janeiro, 2012. 75p. MSc. Dissertation – Departamento de Psicologia, Pontificia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

This study investigates the role of the hippocampus in both unconditioned and conditioned defense behavior by examining the effects of pre-training electrolytic lesions to the dorsal and ventral hippocampus in male rats exposed to two types of threat stimuli: electrical stimulation of the DPAG and footshock. Our results indicate that ventral and dorsal lesions significantly attenuated conditioned defensive behavior. During unconditioned trials, ventral hippocampal lesion altered threshold needed for escape and pre-escape freezing. These results suggest a specific role of the ventral and dorsal hippocampus in modulating GAD and panic-attack like behaviors in certain animal model of defense.

Keywords

Anxiety; context fear conditioning; ventral hippocampus; panic attack; DPAG.

Sumário

1. Introdução	18
1.1. Medo e ansiedade	18
1.2. Medo e Ansiedade: Diferenças e similaridades conceituais	20
1.3. Transtornos de ansiedade	21
1.3.1. O DSM-IV e o CID-10	23
1.3.2. Transtorno de Ansiedade Generalizada	26
1.3.3. Transtorno de Pânico	29
1.4. Medo condicionado e medo incondicionado	31
1.5. Medo e ansiedade: Bases neuroanatômicas	32
1.5.1. Primeiras descobertas neuroanatômicas do Sistema Motivacional de Defesa	32
1.5.2. Hipocampo Dorsal	34
1.5.3. Hipocampo Ventral	36
1.5.4. Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal	38
1.6. Modelos Animais para o estudo de Ansiedade e Pânico	40
1.6.1. A resposta do congelamento	42
1.6.2. A resposta de fuga	46
2. Objetivo	47
3. Metodologia	48
3.1. Animais	48
3.2. Cirurgia	49
3.3. Equipamento	50

3.4. Eletrodo	51
3.5.Procedimento	52
3.5.1. Dia 1 - Congelamento e fuga induzida pela estimulação elétrica da Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal	52
3.5.2. Dia 2 - Condicionamento Contextual Aversivo	53
3.5.3. Dia 3 - Teste ao Contexto	54
4. Histologia	56
5. Resultados	60
5.1 Estimulação elétrica da MCPD	60
5.2 Congelamento pós-estimulação	61
5.3 Congelamento imediato após a apresentação do choque nas patas	62
5.4 Congelamento por condicionamento ao contexto	63
6. Discussão	64
7. Conclusão	68
8. Referências	70

Lista de Figuras

Figura 1 - Curva de Yerkes-Dodson	21
Figura 2 - Circuito mediador do medo	33
Figura 3 – Eletrodo e cânula	51
Figura 4 – Procedimento	55
Figura 5 – Histologia – Hipocampo dorsal	56
Figura 6 – Histologia – Hipocampo ventral	57
Figura 7 – Composé – Hipocampo dorsal	58
Figura 8 – Composé – Hipocampo ventral	59
Figura 9 – Circuitaria proposta	66

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classificação dos Transtornos de Ansiedade segundo o DSM-IV e o CID-10	25
Tabela 2: Critérios de diagnósticos para transtorno de ansiedade generalizada de acordo com o DSM-IV	27
Tabela 3: Critérios para ataque de pânico de acordo com o DSM-IV	30
Tabela 4. Diferentes tipos de Congelamento	45
Tabela 5. Principais estruturas partícipes dos circuitos de medo incondicionado e condicionado	69

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Estimulação elétrica da MCPD	60
Gráfico 2 – Congelamento pós-estimulação	61
Gráfico 3 – Congelamento imediato após a apresentação do choque nas patas	62
Gráfico 4 – Congelamento por condicionamento ao contexto	63

Lista de abreviações

AM: Amígdala

AP: Ataque de pânico

CID-10: Código Internacional de doenças - 10 edição

CPC: Congelamento pós-choque

CPF: Congelamento pós-fuga

DSM-IV: Manual de associação psiquiátrica Norte-Americana - 4ª edição

GABA: Ácido gama-aminobutírico

HD: Hipocampo dorsal

HPA: Hipotálamo, pituitaria e amígdala

HPC: Hipocampo

HV: Hipocampo ventral

MCP: Matéria cinzenta periaquedutal

MCPD: Matéria cinzenta periaquedutal dorsal

MCPV: Matéria cinzenta periaquedutal ventral

NLST: Núcleo do leito da estria terminal

SNC: Sistema nervoso central

SSDR: Reações de defesa específicas de defesa

TEA: Transtorno de estresse agudo

TEPT: Transtorno de estresse pós-traumático

TOC: Transtorno obsessivo compulsivo

TP: Transtorno de Pânico

INTRODUÇÃO

1.1

Medo e Ansiedade

Ainda que não exista uma definição única e geral da ansiedade, sabemos que este fenômeno é uma experiência recorrente e evolutivamente antiga para seres humanos e outras espécies. A ansiedade e o medo formam a primeira linha de defesa, que seriam como uma antecipação de um perigo potencial à sua ocorrência, sendo ambos parte de um mecanismo de sobrevivência como resultado de um processo evolutivo.

Etimologicamente, a palavra *ansiedade*, derivada do latim *axietate*, traz um significado referente à ânsia, sufocamento e opressão. Outras definições enfatizam dimensões subjetivas, aspectos comportamentais e aspectos fisiológicos. Muitos são os conceitos e definições encontrados na literatura acerca da ansiedade. Outras definições encontradas na literatura focam-se na questão evolutiva - isto é, a ansiedade como característica selecionada ao longo da história filogenética das espécies que as apresentam por sua função adaptativa e protetora. Segundo Gross e Hen, 2004, a ansiedade pode ser definida como um conjunto característico de respostas comportamentais e fisiológicas como evitação, vigilância, alerta e excitação, que evoluíram para proteger o indivíduo do perigo.

A ansiedade pode se relacionar a sintomas somáticos, perceptuais, comportamentais e cognitivos, deflagrado não apenas por estímulos aversivos, mas também por antecipação (Landgraf e Wigger, 2002).

Determinados autores evolucionistas enumeram algumas das diferentes modificações que ocorrem em um organismo quando é detectado um sinal de perigo ou alerta (Cosmides e Tooby, 2000):

Primeiro há mudanças em percepção e atenção, como por exemplo, um aumento na capacidade de distinguir sons; segundo, objetivos e metas motivadas mudam – a segurança passa a ser uma prioridade absoluta; terceiro, os processos de memória são redirecionados a novas tarefas de evocação; quarto, os processos

comunicativos se modificam de tal maneira que o animal pode emitir um alarme ou ficar paralisado; quinto, alguns sistemas de aprendizagem são ativados, conforme mostra a ampla literatura de medo condicionado; sexto, importantes mudanças fisiológicas ocorrem, decorrentes da ativação simpática e conseqüente descarga adrenérgica, como o aumento da frequência cardíaca, o clareamento da mucosa gástrica (conseqüência da saída do sangue do trato digestivo para estruturas com função prioritária na situação de perigo, como os músculos), a liberação de hormônios do estresse, a hipoalgesia e a potenciação dos reflexos (LeDoux, 2000); sétimo, regras de decisão comportamental são ativadas, e diferentes cursos de ação podem ser potenciados, como esconder-se, fugir, lutar, fingir-se de morto ou tornar-se imóvel (Dias, G, 2009) – estes comportamentos foram respostas comportamentais estudadas neste trabalho.

1.2

Medo e Ansiedade: Diferenças e similaridades conceituais

Como mencionado anteriormente, a definição de ansiedade e medo ainda não é um conceito claro e generalizado para muitos pesquisadores. A resposta induzida por um estímulo aversivo corresponde tanto à definição de medo quanto à definição de ansiedade (Gross e Hen 2004) criando certa dificuldade em distinguir entre estes dois conceitos.

Alguns autores alegam que o medo está relacionado a um perigo real e presente e a ansiedade está relacionada a uma percepção de perigo potencial, ou seja a um medo antecipatório (Graeff, 1990). Determinados estudos têm mostrado que animais de linhagens selecionadas para respostas de medo mais acentuadas após passarem por experiência de choque nas patas apresentam comportamento igualmente acentuado em alguns testes de ansiedade (Ponder *et al.*, 2007). Evidências mostram que situações que evocam medo ou ansiedade parecem deflagrar reações fisiológicas e comportamentais semelhantes, ainda que uma diferença conceitual não seja marcada e definitiva entre estes dois termos, algumas propostas psicobiológicas entre ambos é proposta (Alves, 2001).

De um modo geral, a ansiedade e o medo se referem a um mesmo conjunto de respostas, sendo diferença entre os dois termos conceitual e variável entre os diferentes pesquisadores.

1.3

Transtornos de Ansiedade

Os transtornos de ansiedade são difíceis de ser reconhecidos já que determinados graus de ansiedade são considerados benéficos ao indivíduo, ajudando-o a se preparar para a execução de várias tarefas ao longo da vida. A ansiedade normal é evolutivamente adaptativa, mas o medo excessivo pode ser incapacitante para um indivíduo, se desencadeando como um transtorno de ansiedade (Anagnostara, et al., 1999a; Landgraf et al., 2007).

A lei de Yerkes-Dodson (Dractu e Lader, 1993) sugere que existe um ponto ótimo de ansiedade para a melhor execução de uma determinada tarefa, conforme representada na figura 1. De acordo com a lei de Yerkes-Dodson a relação entre atividade e desempenho toma a forma de uma curva em “U” invertido; ou seja, até um ponto determinado, o aumento da ansiedade tem a capacidade de aumentar o desempenho. É interessante também notar que o aumento da ansiedade depois de certo ponto implica a queda do desempenho. Simplificando e corroborando o anteriormente mencionado, em certos níveis, a ansiedade é um fenômeno adaptativo, pois tem a capacidade de melhorar o desempenho de um indivíduo frente a algumas exigências ambientais.

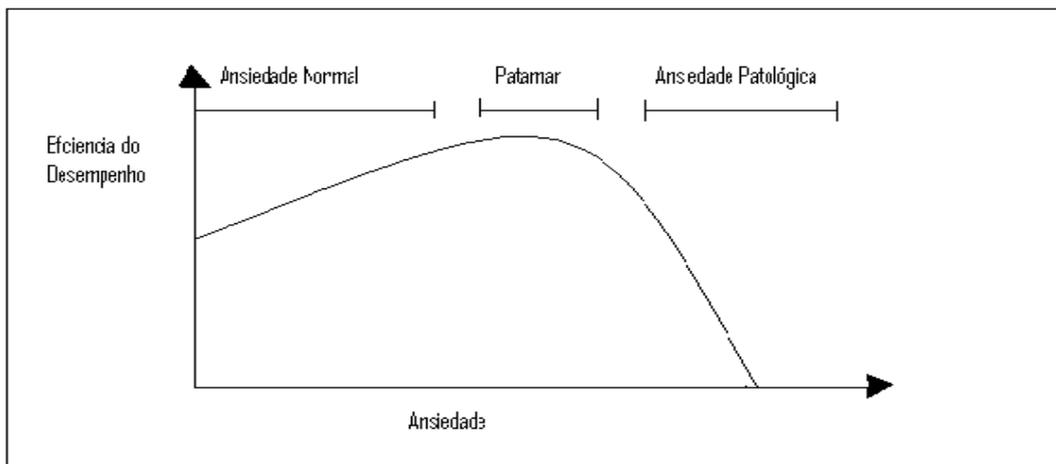


Figura 1: Curva de Yerkes-Dodson (Dractu e Lader, 1993)

A ansiedade patológica é provavelmente a disfunção emocional que mais atinge a qualidade de vida humana e pode ser definida como uma expressão inapropriada de determinados comportamentos (Landgraf e Wigger, 2003).

No presente trabalho focaremos no entendimento maior das circuitarias de defesa do ataque de pânico, transtorno de pânico e o transtorno de ansiedade generalizada.

1.3.1

O DSM IV e o CID -10

O DSM-IV e o CID-10 são utilizados para definir e diagnosticar diferentes transtornos incluindo quadros relacionados ao transtorno de ansiedade. Como mostra a tabela 1, existe certa discrepância entre suas definições e classificações, por exemplo, o DSM-IV entende que a agorafobia está sempre associada ao transtorno de pânico (TP), classificando-a assim em agorafobia sem história de pânico, ou em transtorno do pânico com ou sem agorafobia. Por outro lado, o CID-10 mostra uma visão diferente ao classificar a agorafobia, pois a classifica com ou sem transtorno de pânico.

Com relação às fobias sociais e às fobias específicas não se encontram diferenças significativas, pelo contrario, o CID-10 e o DSM-IV as classificam e definem similarmente.

No DSM-IV, o transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) é classificado entre os transtornos de ansiedade enquanto que no CID-10 ele é uma categoria independente. O TOC caracteriza-se por pensamentos obsessivos ou atos compulsivos recorrentes.

O DSM-IV e o CID-10 definem de forma similar as duas formas patológicas que o estresse grave pode causar em um individuo: Transtorno de estresse agudo (TEA) e transtorno de estresse pós-traumático (TEPT). O transtorno de estresse agudo caracteriza-se pelo desencadeamento transitório de sintomas de ansiedade logo após um evento traumático, enquanto a TEPT caracteriza-se por uma resposta tardia e mais duradoura a um evento traumatizante em relação ao TEA.

O CID-10 tem entre suas categorias o distúrbio misto de ansiedade e depressão, sem existir um conceito similar no DSM-IV. O distúrbio misto caracteriza-se por ter sintomas tanto de ansiedade como de depressão.

Finalmente, o transtorno de ansiedade generalizada (TAG), é um conceito compartilhado pelos dois sistemas de classificação, tanto pelo DSM-IV e pelo CID-10.

A seguir mais informação acerca do transtorno de ansiedade generalizada e do transtorno de pânico que são as duas condições psiquiátricas mais estudadas e avaliadas neste projeto.

Tabela 1: Classificação dos Transtornos de Ansiedade segundo o DSM-IV e o CID-10

DSM-IV	CID-10
Transtorno do Pânico (TP)	Distúrbio do Pânico
Sem agorafobia	Ansiedade Paroxística Episódica
Com agorafobia	Agorafobia
Agorafobia sem transtorno do pânico	Agorafobia com Distúrbio do Pânico
Fobias Específicas (simples)	Agorafobia sem distúrbio do Pânico
Fobia social	Fobias Específicas Isoladas
Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC)	Fobia Social
Transtorno de Estresse Pós-traumático (TEPT)	
Transtorno de estresse agudo	
Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG)	Distúrbio de Ansiedade
	Distúrbio Misto de Ansiedade e Depressão
Transtorno de Ansiedade sem Origem Específica (SOE)	Distúrbio de Ansiedade sem Origem Específica (SOE)

Fonte: Adaptado de America Psychiatric Association –Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4 ed., 1994.

1.3.2

Transtorno de ansiedade generalizada

A sintomatologia deste transtorno é comum, mas sua persistência não. Os pacientes que sofrem deste transtorno continuamente se queixam de se sentirem tensos e nervosos, se preocupam com coisas negativas que por acaso poderiam acontecer e experimentam todos os sintomas de excitação do sistema nervoso autônomo. Uma das piores características deste transtorno é a incapacidade do paciente identificar e, portanto, não poder evitar a causa destes sintomas persistentes e desagradáveis. Basicamente este transtorno consiste em uma ansiedade excessiva e preocupações, acompanhadas de queixas somáticas, não estando restritas a uma única situação (Nardi ET AL., 1996).

O DSM-IV define o TAG da seguinte forma:

Tabela 2: Criterios de diagnósticos para transtorno de ansiedade generalizada de acordo com o DSM-IV

A. Ansiedade e preocupação excessivas (expectativa apreensiva), ocorrendo na maioria dos dias por pelo menos 6 meses, com diversos eventos ou atividades.

B. O indivíduo considera difícil controlar a preocupação

C. A ansiedade e a preocupação estão associadas com três (ou mais) dos seguintes seis sintomas (com pelo menos alguns deles presentes na maioria dos dias nos últimos 6 meses):

1. Inquietação ou sensação de estar com os nervos à flor de pele ;

2. Fatigabilidade;

3. Dificuldade em concentrar-se ou sensações de “branco” na mente;

4. Irritabilidade;

5. Tensão muscular

6. Perturbação do sono (dificuldades em conciliar ou manter o sono, ou sono insatisfatório e inquieto).

D. O foco da ansiedade ou preocupação não está confinado a aspectos de um transtorno de eixo I.

E. A ansiedade, a preocupação ou os sintomas físicos causam sofrimento clinicamente significativo ou prejuízo no funcionamento social ou ocupacional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo.

F. A perturbação não se deve aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância ou de uma condição médica geral nem ocorre exclusivamente durante um transtorno de humor, psicótico ou invasivo do desenvolvimento.

G. A perturbação não se deve aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância (droga de abuso, medicamento) ou de uma condição médica geral nem ocorre exclusivamente durante um transtorno do humor, transtorno psicótico ou transtorno invasivo do desenvolvimento.

Fonte: Adaptado de America Psychiatric Association –Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4 ed., 1994.

O transtorno da ansiedade generalizada possivelmente se envolve em um complexo circuito neurobiológico que inclui o sistema simpático de noradrenalina no lócus ceruleus, o eixo HPA, e a participação de moduladores de GABA e serotonina (Brawman-Mintzer e Lydiard, 1997). Por conseguinte, entre os

tratamentos mais poderosos para este transtorno está o uso de benzodiazepínicos, inibidores de receptação de serotonina e, o uso da terapia cognitivo-comportamental (Gross e Hen, 2004).

Entre as principais estruturas que participam do transtorno da ansiedade generalizada se encontram: os núcleos dorsais da rafe, hipotálamo, hipocampo, amígdala, tálamo, cerebelo, gânglios da base, córtex cingulado e córtex. Apesar da ansiedade ser um fenômeno tipicamente humano, os aspectos funcionais deste transtorno se encontram correlacionados às reações de defesa produzidas por alguns animais frente a estímulos aversivos ou situações de perigo, conseqüentemente, diferentes modelos animais tem sido utilizados como ferramentas para investigar os mecanismos envolvidos nos transtornos de ansiedade.

1.3.3

Transtorno de pânico

A manifestação do episódio de AP caracteriza-se por uma série de sintomas que surgem de forma subita em menos de 10 minutos. O AP seria 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 (DSMIV, 1995). O transtorno de pânico por sua vez, se caracterizará exatamente pela presença de Ataques de Pânico recorrentes e inesperados, seguidos por pelo menos 1 mês de preocupação persistente acerca de ter um outro Ataque de Pânico, preocupação acerca das possíveis implicações ou conseqüências dos Ataques de Pânico, ou uma alteração comportamental significativa relacionada aos ataques (DSM IV,1995).

Devido aos ataques de pânico também podem ocorrer outros transtornos de ansiedade. Durante o diagnóstico diferencial é importante levar em conta o contexto no qual ocorre o ataque de pânico. Existem três tipos característicos do ataque de pânico: ataques de pânico inesperados (não evocados) que são os ataques que não estão associados com nenhum ativador situacional, ou seja o ataque é totalmente inesperado e sem razão nenhuma; os ataques de pânico ligados a situações (evocados) estes ataques ocorrem quase que invariavelmente logo após a exposição ou antecipação a um ativador ou evocador situacional, são mais característicos da fobia social e específica e os ataques de pânico predispostos pela situação, são aqueles ataques que ocorrem quase sempre na exposição a um específico evocador porém nem sempre ocorrem no instante, pode ser um pouco antes ou depois, estes ataques são muito frequentes no transtorno de pânico ainda que também possam ocorrer nas fobias tanto específica como social.

O DSM-IV define o ataque de pânico da seguinte forma:

Tabela 3: Critérios para ataque de pânico de acordo com o DSM-IV

Um período distinto de intenso temor ou desconforto, no qual quatro (ou mais) dos seguintes sintomas desenvolveram-se abruptamente e alcançaram um pico em 10 minutos:

- (1) Palpitações ou ritmo cardíaco acelerado
- (2) Sudorese
- (3) tremores ou abalos
- (4) sensações de falta de ar ou sufocamento
- (5) sensações de asfixia
- (6) dor ou desconforto torácico
- (7) náusea ou desconforto abdominal
- (8) sensação de tontura, instabilidade, vertigem ou desmaio
- (9) desrealização (sensações de irrealidade) ou despersonalização (estar distanciado de si mesmo)
- (10) medo de perder o controle ou enlouquecer
- (11) medo de morrer
- (12) parestesias (anestesia ou sensações de formigamento)
- (13) calafrios ou ondas de calor

Fonte: Adaptado de America Psychiatric Association –Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4 ed., 1994.

1.4

Medo condicionado e medo incondicionado

Estes conceitos foram primeiramente propostos pelo fisiologista Ivan Pavlov (1927), cujos experimentos foram realizados associando uma campainha (estímulo neutro) a uma porção de comida (estímulo incondicionado) produzindo assim uma resposta de salivação (resposta condicionada). Desta forma o som da campainha se torna um estímulo condicionado. Uma vez que a relação entre o estímulo condicionado e o estímulo incondicionado é aprendida, as respostas comportamentais e fisiológicas do indivíduo passam a ser emitidas na apresentação do estímulo condicionado (LeDoux, 2000).

O medo condicionado é um mecanismo de defesa aprendido. É um processo no qual um estímulo que não representa nenhuma ameaça passa a ser aversivo para o indivíduo por meio do processo de associação, ou seja, por haver ocorrido paralelamente ou imediatamente depois de um estímulo naturalmente provocador de medo. O termo medo condicionado, se refere a um medo totalmente aprendido baseado em experiências aversivas anteriores, cujos estímulos associados acarretam as respostas de medo. Estímulos neutros podem ficar associados com estímulos nocivos ou dolorosos como, por exemplo, um choque elétrico, que adquire a capacidade de ativar respostas de defesa.

O medo incondicionado é um mecanismo de defesa inato, portanto, não é um medo aprendido, se trata de respostas automáticas filogeneticamente selecionadas ao longo da história evolutiva de cada espécie. O medo incondicionado é evocado quando o indivíduo se vê frente a uma situação naturalmente ameaçadora. Algo a levar em consideração é que as respostas de medo condicionado e medo incondicionado são as mesmas, então, estes dois mecanismos de defesa se diferenciam no contexto em que ocorre cada experiência.

1.5

Medo e ansiedade: Bases neuroanatômicas

1.5.1

Primeiras descobertas neuroanatomômicas do sistema motivacional de defesa.

Embora o sistema motivacional de defesa tenha sido considerado um constructo teórico, empregado como uma variável interveniente entre o momento em que um estímulo de perigo é detectado e a ocorrência de uma resposta de defesa, vários trabalhos, desde a primeira metade do século XX, tem tentado mapear que estruturas neurais participem deste sistema.

Em 1878, Broca observou que uma série de estruturas telencefálicas se comunicavam entre si, formando um anel situado abaixo do manto cortical e envolvendo o corpo caloso. A esse conjunto de estruturas, Broca denominou o grande lobo límbico, atribuindo a essa estrutura uma função olfativa.

Papez (1937) sugeriu que um circuito fechado de estruturas deveria ser o suporte físico das emoções. De acordo com este circuito, o giro do cíngulo manteria conexões com o hipocampo que enviaria projeções para o corpo mamilar, via fornix, que por sua vez se projetaria para os núcleos anteriores do tálamo, através do trato mamilotálâmico, e daí fechava-se o círculo através de projeções para o giro do cíngulo.

MacLean (1958) observou que outras estruturas, além das descritas por Papez (por exemplo, o complexo amigdalóide e a área septal), se relacionavam entre si e que essas também deveriam estar envolvidas com a emoção. MacLean denominou esse conjunto de estruturas de sistema límbico, embora, hoje em dia, não exista um consenso das estruturas deste sistema.

Em termos neurobiológicos, estímulos ameaçadores ativam o chamado circuito mediador do medo. As respostas de medo são deflagradas a partir do acionamento de uma estrutura subcortical chamada amígdala, que recebe aferências de algumas estruturas envolvidas no processamento cognitivo, como o

córtex sensorial, o tálamo e o hipocampo (LeDoux, 2001), conforme mostra a figura 2.

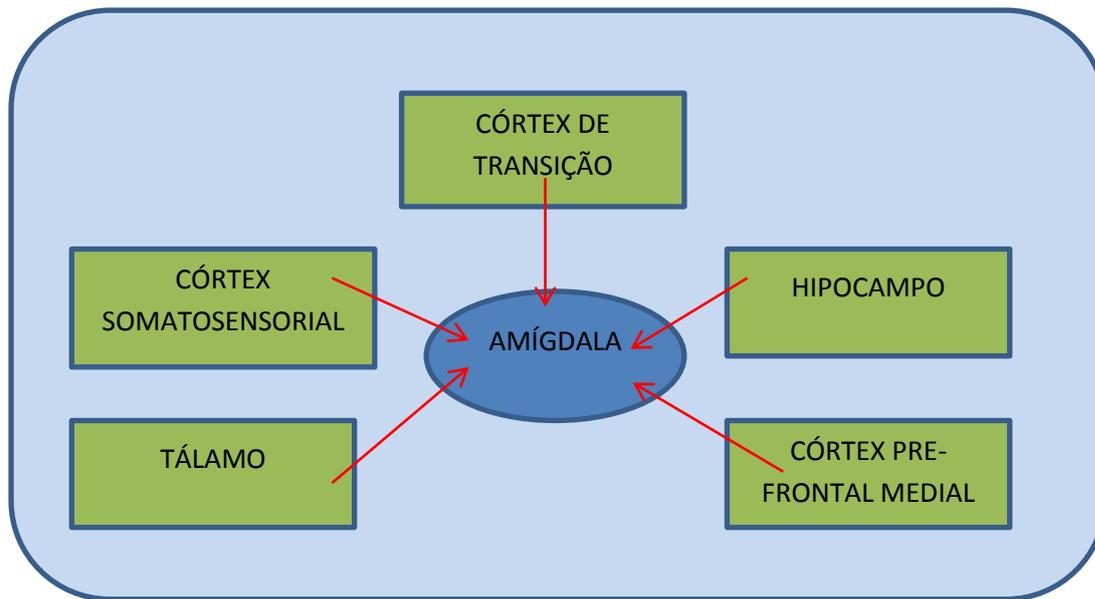


Figura 2: Circuito mediador do medo Estruturas corticais e subcorticais envolvidas na resposta de medo/ ansiedade enviam informações sobre os estímulos à amígdala, que envia sinal a diversas regiões do organismo, para que as respostas sejam deflagradas. Adaptado de Dias, G.,2009.

1.5.2

Hipocampo dorsal

Embora O'keefe & Nadel (1978), Izquierdo (1992), Eichenbaum (1994 e 2000) e Squire (1992, 2004) tenham mostrado o papel da formação hipocampal (giro denteado, hipocampo, córtex entorrinal, subículo, presubículo e parasubículo) no que concerne a aprendizagem e memória em mamíferos, evidências (Gray, 1982; Gray e McNaughton, 2000 e Bannerman, 2004) acerca do envolvimento da formação hipocampal em mecanismos associados com medo e ansiedade vêm se acumulando.

Segundo Gray (1982), Gray e McNaughton (2000), embora a influência do hipocampo (HPC) sobre as reações de medo possa vir a ser uma consequência necessária das suas operações mnemônicas, é também possível que tanto o medo quanto a ansiedade sejam controlados por esta estrutura independente do processo de aprendizagem. Confirmando esta hipótese, dados da literatura sugerem que o HPC poderia vir a ter funções diferenciadas ao longo de seu eixo dorso-ventral (Risold e Swanson, 1996; Moser e Moser, 1998; Bannerman, 2004 e Esclassan, 2009). O presente trabalho tenta evidenciar algumas diferenças entre o hipocampo dorsal e ventral.

A porção dorsal do hipocampo é bem conhecida por seu envolvimento na memória, aprendizagem, e no medo condicionado (Kjelstrup ET AL., 2002). Esta região também é chamada de *cold hippocampus* (Fanselow e Dong, 2009) por ser a região do hipocampo mais ligada aos processos cognitivos. Desde o caso de H.M - um paciente que perdeu grande parte de sua memória quando seu lóbulo temporal-medio foi removido como tratamento buscando uma melhora para a epilepsia - uma grande quantidade de dados unem o hipocampo com a memória em humanos, outros primatas e ratos (Scoville and Milner, 1957; Squire, 1992).

O hipocampo dorsal cumpre um papel crítico em diferentes processos de memória incluindo a memória episódica (Squire and Zola 1996; Eichenbaum, 2000), a atividade locomotora, a exploração e os processos de navegação espacial (Fanselow and Dong, 2009). Em anos anteriores, considerável evidência suporta a questão de que lesões no hipocampo dorsal interferem na aquisição de medo

contextual enquanto que não tem nenhum efeito no medo condicionado ao som. (Kim, 1992; Maren e Fanselow, 1997; Phillips e Ledoux, 1992 e 1995). Também, foi sugerido que esta região do hipocampo desempenhava um importante papel na recuperação de memórias contextuais (Hirsh, 1974).

Consistente com esta visão, diversos estudos responsabilizam o hipocampo dorsal não só na codificação de representações contextuais (Kim e Fanselow, 1992; Philips e Ledoux, 1992; Maren et al, 1997; Frankland et al. 1998; Good et al. 1998; Rudy e O'Reilly, 2001) mas também em usar estas representações para a recuperação destas memórias (Good e Honey, 1991; Honey e Good, 1993; Kennedy e Shapiro, 2004). Foi demonstrado que o hipocampo dorsal é uma estrutura implicada na aquisição, recuperação e expressão do medo contextual (Kim, JJ; et al, 1993).

1.5.3

Hipocampo ventral

A literatura também mostra o outro lado do hipocampo, um *hipocampo quente* que seria a parte ventral desta estrutura. Esta parte está intimamente relacionada com a emoção, regulação às respostas de estresse e sua disfunção resulta em desordens afetivas como, por exemplo, a depressão (Fanselow e Dong, 2009).

Historicamente, a relação existente desde então entre o hipocampo e a emoção se deve à posição proeminente desta região no circuito límbico de Papez e seu hipotético papel no controle da emoção. Gray sugeriu que o hipocampo está envolvido em “estados emocionais, especialmente em decepção e frustração” (Gray e Jeffrey, 1971, p 201; Gray e McNaughton, 2000; Sokolov e Vinograda, 1975).

O hipocampo exerce um forte controle regulador do eixo HPA (*hypothalamic-Pituitary-Adrenal*). Lesões hipocampais prejudicam o controle hormonal à resposta de estresse (Dedovic et al., 2009; Jacobson e Sapolsky, 1991). Está claro que as elevações de hormônios de estresse levam à disfunção hipocampal tanto em pessoas como em roedores (McEwen et al., 1997; Herman et al., 2005). Em humanos, volumes hipocampais diminuídos e disfunção hipocampal são associados com desordens psicológicas com fortes componentes afetivos, como a desordem do estresse pós- traumático, transtorno bipolar e depressão (Bonne et al., 2008; Frey et al., 2007). Tratamentos farmacológicos eficazes destas desordens afetam positivamente a função hipocampal e a sua fisiologia. A relação do hipocampo com a emoção é tão forte quanto sua relação com a memória (Fanselow, M.S e Dong, H.W., 2009)

Testes comportamentais de navegação espacial e memória têm sido particularmente úteis para entender as funções do hipocampo. Um teste comportamental para estudar a cognição espacial em roedores altamente usado é o labirinto aquático de Morris, onde os animais devem nadar em busca de uma plataforma para se localizar utilizando sinais visuais fora da água (Morris, 1981). Este teste responsabiliza claramente o hipocampo dorsal no uso da memória

espacial. Lesões restritas a só 25 % do hipocampo dorsal prejudicam o desempenho no labirinto aquático, já que lesões no hipocampo ventral não afetam em nada este desempenho (Moser et al., 1995).

Em um estudo que claramente manipulou o estresse sobre a cognição, Henke (1990) relatou que lesões no hipocampo ventral, mas não no hipocampo dorsal produziram a apresentação de úlceras de estresse produzidas por frio/restrição. Além disso, Kjelstrup et al. (2002) relataram que lesões no maior quarto ventral do hipocampo, incrementaram as entradas nos braços abertos de um labirinto em cruz elevado e diminuíram a defecação na caixa claro-escuro, ambos comportamentos nos dois testes mencionados corroboram a redução da ansiedade com a lesão do hipocampo ventral. Os animais lesionados no hipocampo ventral também mostraram menos incremento nos níveis de corticosterona quando foram apresentados na caixa claro-escuro (Kjelstrup et al, 2002).

1.5.3

Matéria cinzenta periaquedutal dorsal

Graeff (1981 e 1994), Nogueira (1991), Behbehani (1995), Vianna (2001), Magierek (2003), Bittencourt, et. al., (2004) e Brandão (2007) sugerem que a matéria cinzenta periaquedutal (MCP), que se localiza ao longo do mesencéfalo, tem-se mostrado como uma área relevante no controle dos comportamentos de defesa. A estimulação elétrica da MCPD em animais tem sido empregada há bastante tempo para um melhor entendimento do fenômeno do pânico. Verificou-se que, ao se fazer um aumento gradual da corrente elétrica para estimular a MCPD, produzia-se um comportamento de alerta, congelamento, e, num dado momento, resposta de corrida e salto. De fato, as estimulações elétricas da MCPD, que ocasionam respostas de fuga (Landeira, Fanselow e Deoca, 1992), proporcionam um dos modelos animais para o estudo do pânico. Este sistema está relacionado com formas vigorosas de comportamento ativo, como reações de fuga ou luta.

Segundo Behbehani (1995), Brandão (2007), Siqueira (2009) e Casarotto (2010), a estimulação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal e dorsolateral produz comportamento aversivo em animais. Isto indica que esta região cerebral faz uma importante conexão com a circuitaria cerebral envolvida no processo de ansiedade e medo. Projeções sistemáticas da amígdala para a matéria cinzenta periaquedutal sugere que um estímulo relacionado ao perigo ativa um circuito específico na amígdala que se projeta para a MCP, ativando assim mecanismos da MCP que lidam com reações de defesa, analgesia e respostas autonômicas (Fanselow, 1991). De acordo com este modelo, avisos de perigo (presa avista o predador) ativam regiões da amígdala que se projetam para a matéria cinzenta periaquedutal ventral (MCPV) responsável pela resposta de congelamento (neurônios intrínsecos às porções caudais da MCPV são cruciais para o congelamento), a destruição química destas áreas atenua o congelamento segundo Ledoux, et. al., (1988), provando-se crucial também para a analgesia opilácea (Helmstetter e Landeira-Fernandez, 1990).

Contudo, quando o animal encontra o perigo (predador pega a presa), uma circuitaria na amígdala que se projeta para a matéria cinzenta lateral é ativada. A

ativação desta rede produz respostas de fuga associadas com vocalizações e respostas autonômicas (Behbehani,1995). De acordo com este modelo, existe uma interação inibitória entre MCP ventral e lateral. Os resultados sugeriram então que a estimulação da MCPD produziu fuga e respostas de defesa, e a estimulação da MCPV produziu congelamento. Entretanto estudos mais avançados devem ser feitos para elucidar melhor a comunicação entre essas estruturas e suas vias de ação para um entendimento melhor dos mecanismos que permeiam o funcionamento desta circuitaria neural, portanto, este trabalho só estuda os comportamentos gerados mediante a estimulação da MCPD.

1.6

Modelos animais para o estudo de Ansiedade

Diferentes modelos de animais têm sido empregados como poderosas ferramentas, com o objetivo de investigar e compreender os mecanismos envolvidos no sistema motivacional de defesa. Para compreender o emprego de modelos animais para o estudo dos transtornos de ansiedade é importante definir a ansiedade como um sistema funcional comportamental, ou seja, a ansiedade é uma estrutura complexa de controle, relacionada a uma função ou uma necessidade particular do animal (Timberlake e Lucas, 1989).

Apesar da ansiedade se constituir num fenômeno tipicamente humano, os aspectos funcionais da ansiedade encontram correlação nas reações de defesa dos animais. Os animais assim como os seres humanos, expressam suas emoções com certos comportamentos específicos que exibem (Sudre, et al., 1993; Schenberg *et al.*, 2000,2001; Vargas e Schenberg, 2000,2001) como *freezing* (congelamento), *activity burst* (corrida e salto), *galloping trotting* são verificadas e expressam diretamente níveis de ansiedade frente a uma situação de perigo específico.

Bolles (1970), através da sua teoria *Species-Specific Defense Reaction* (SSDR), demonstra que o rato, de forma inata, determina comportamentos de defesa, como a resposta de congelamento ou luta, por exemplo. Quando o mesmo é confrontado com uma ameaça ambiental natural (um predador) ou uma ameaça ambiental artificial (choque nas patas), os seus comportamentos acabam por se delimitar somente aos SSDRs. Nestas situações é quase impossível o rato manifestar comportamentos que não se adequam aos esquemas da SSDRs.

Contudo, o próprio animal teria uma flexibilidade de escolha comportamental dentro da SSDR a escolher. Parte-se do princípio de que o animal, através de uma abordagem adaptativa, irá selecionar, dentro de um seletor repertório de ações, a melhor reação comportamental que confronte de forma adequada a ameaça em questão, e que tenha maior chance de sobrevivência. Este sistema de defesa tem regras específicas que governam as reações comportamentais; essas regras autorizam mudanças de comportamentos de forma

abrupta ou crescente, a partir do momento em que ocorram mudanças relevantes nas condições ambientais.

Panksepp (1982) propôs a circuitaria de defesa animal cujo mecanismo evolutivo mais provável seria a redução da dor, autopreservação e sobrevivência. Sendo assim, a ansiedade é um produto de um sistema motivacional responsável pela organização de respostas específicas com objetivo de lidar de forma adequada às ameaças do meio externo. A partir dessa perspectiva, vários estudos têm definido um nível elevado de ansiedade, como um componente essencial de um sistema neural que teve origem nos mamíferos, e desde então vem se mantendo ao longo da evolução das espécies. Esse sistema é responsável pela detecção de estímulos de perigo no meio ambiente, bem como pela reação de forma adequada a esses estímulos que ameaçam a integridade do organismo (Fanselow, 1986 e 1994). Nesse sentido a ansiedade tem grande poder motivacional e sua vantagem evolucionária é a de garantir a sobrevivência da espécie através da devida interação do animal com o meio ambiente.

Blanchard, Blanchard e Rogers (1990), por sua vez, fizeram um estudo etológico do comportamento do rato diante de situações com diferentes níveis de ameaça. De acordo com os estudos destes autores, sugeriu-se que as principais variáveis relevantes na magnitude da resposta comportamental de defesa seria a distância da presa com relação ao predador, alternativas de fuga-esquiva e a discriminação da fonte de perigo.

Consequentemente, diferentes modelos de animais tem sido estudados com o objetivo de poder entender os mecanismos, circuitos e demais elementos envolvidos nos transtornos de ansiedade. Através de alguns comportamentos específicos foi possível determinar circuitarias neurais de diferentes transtornos, em particular dos comportamentos de defesa com circuitos neurais específicos, que podem ser utilizados como modelos para diferentes transtornos de ansiedade e em particular o transtorno de pânico (Graeff, 2003).

1.6.1

Resposta de Congelamento

A resposta de congelamento ou a imobilidade tensa pode ser facilmente medida através da observação. Este comportamento é caracterizado por uma redução total de atividade geral motora (Landeira-Fernandez, 1996). Para os ratos, a medida de congelamento é um comportamento de defesa altamente específico e tem sido utilizada desde o século passado (Small, 1898) como indicador de ansiedade condicionada (Rescorla, 1998; Landeira-Fernandez, 1996).

Grifith (1920) concluiu que os ratos exibem uma resposta de congelamento com a presença de um gato ou qualquer estímulo que indique a presença deste, como, por exemplo, seu odor. Considerável evidência indica que a resposta de congelamento a estímulos contextuais previamente associados com choques elétricos é um modelo de ansiedade generalizada (Landeira-Fernandez J, Cruz e Brandão 2006); (Fanselow, MS, 1991); (Conti LH, et al., 1990); (Maki Y, Inoue T, Izumi T., et al, 2000). A resposta de congelamento do animal seria uma tentativa para dificultar sua localização pelo predador em situações onde a fuga não é possível, permitindo a correlação destes comportamentos com os transtornos de ansiedade; portanto, é importante mencionar que existem 4 tipos de congelamentos associados a diferentes modelos de comportamentos de defesa (Brandão et al, 2008).

O primeiro tipo de congelamento é produzido pela estimulação elétrica da MCPD. Brandão e colaboradores (2008) sugerem que a MCPV parece estar envolvida nos aspectos motores do comportamento de congelamento que provavelmente é controlado por projeções descendentes da amígdala para MCPV como dito anteriormente. Contudo, a MCPD parece controlar aspectos de controle sensorial e afetivo do congelamento incondicionado (Brandão et al, 2008). Por exemplo, um aumento gradual na estimulação elétrica tanto da MCPV quanto da MCPD produz inicialmente o comportamento de alerta e em seguida congelamento. O congelamento induzido pela estimulação elétrica da MCPV cessa imediatamente após o término da estimulação, enquanto que o congelamento produzido pela MCPD demora a cessar mesmo já com o término da estimulação (Vianna et al, 2001a; Vianna, 2001b). O congelamento induzido pela

estimulação elétrica da MCPD pode vir a induzir no animal mudanças cardiovasculares, hiperventilação, piloereção, exoftalmia (Monassi CR e Menescal de Oliveira L, 2004) e comportamento de fuga (corridas e pulos) em alta intensidade (Brandão, Coimbra e Borges, 1990) se observa reações fisiológicas como este congelamento se obtém antes do comportamento de fuga. Varias evidências apontam para o fato de que a resposta de congelamento induzida pela estimulação elétrica da MCPD é um excelente modelo animal de ataque de pânico. (Landeira-Fernandez, 2006). Drogas capazes de atenuar a ocorrência de ataques de pânico em seres humanos, tais como clomipramina e a fluoxetina, aumentam a intensidade de estimulação elétrica da MCPD para produzir as respostas de congelamento em ratos (Brandão ET AL, 2008).

O segundo tipo de congelamento é o Congelamento Pós estimulação da MCPD 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). De acordo com estudos anteriores, este tipo de congelamento está sob influencia do complexo amigdalóide, ao contrário daquela resposta de congelamento eliciada durante a estimulação elétrica da MCPD (Oliveira, et al., 2004). Microinjeções de um agonista gabaérgico na amígdala acabaram reduzindo a resposta do CPF de forma similar à resposta de congelamento induzida por estímulos contextuais aversivos (Ruiz-Martinez et al., 2006). O fato de o complexo amigdalóide ser uma estrutura neural relacionada com ansiedade antecipatória e exercer uma modulação sobre a resposta de congelamento observada após a estimulação da MCPD, mas não aquela induzida pela estimulação direta desta mesma estrutura, sugere que esta resposta de congelamento pode estar associada ao transtorno, mas não ao ataque de pânico (Landeira-Fernandez et al., 2006).

O terceiro tipo de congelamento é o congelamento pós-choque. Quando um rato recebe um choque elétrico, ele reage com uma atividade vigorosa chamada de *Activity Burst* (Fanselow, 1984b). Esta atividade persiste por um breve período de tempo e gradualmente vai diminuindo para uma inatividade chamada de congelamento (Myer, 1971). Este congelamento será chamado de congelamento pós-choque (CPC), segundo Fanselow (1980), o CPC é uma

resposta condicionada ao contexto e não uma resposta incondicionada estendida (Weiss, 1968). Por sua vez, o congelamento pós-choque parece ser um modelo de memória imediata contextual, já interpretado por alguns autores como modelo de memória de curto prazo (Wood and Anagnostaras, 2011). Este congelamento específico pode variar pela intensidade utilizada no choque elétrico, e pela sensibilidade a dor (Fanselow, 1984b).

O quarto é o congelamento por condicionamento. Num experimento típico que demonstra essa forma de aprendizagem, um animal é colocado numa caixa experimental por alguns minutos. Em seguida, apresenta-se um choque elétrico nas patas de curta duração e baixa intensidade. No dia seguinte o animal é recolocado na caixa experimental e os estímulos contextuais que ficaram associados ao choque são capazes de ativar a resposta de congelamento (Landeira-Fernandez, Cruz e Brandão, 2006). De acordo com Brandão e colaboradores (2008) esta resposta de congelamento gerada através do medo condicionado é claramente modulada por conexões entre amígdala e MCPV. A modulação bidirecional da resposta de congelamento ao contexto como efeitos de agentes farmacológicos que acrescentam ou diminuem os sintomas de ansiedade em seres humanos tem sido usada para validar este procedimento como um modelo de TAG. Drogas altamente eficazes no tratamento farmacológico do TAG, como os ansiolíticos benzodiazepínicos, atenuam ou mesmo eliminam a resposta de congelamento ao contexto em ratos em uma faixa de dose parecida àquela utilizada clinicamente em humanos (Landeira-Fernandez, 2006). Em adição, o paradigma de condicionamento de medo ao contexto está diretamente sob o controle de estímulos contextuais previamente associados ao choque. Por exemplo: quando um teste de mudança de contexto é feito, que seria a transferência do animal para outra caixa experimental após a apresentação do choque, observa-se que a resposta de congelamento está ausente (Fanselow, 1980).

Tabela 4. Diferentes tipos de Congelamento

TIPO DE CONGELAMENTO	MODELO ANIMAL
Estimulação da MCPD*	Ataque de Pânico
Pós-estimulação da MCPD*	Transtorno de Pânico
Pós-choque	Memória Emocional
Ao contexto*	Transtorno de Ansiedade Generalizada

Nota: * Adaptado de Brandão et al., 2008

1.6.2

Resposta de Fuga

A luta e a fuga são respostas incondicionadas que se fundamentam na observação de comportamentos específicos de defesa da espécie frente a estímulos inatos de perigo (Blanchard et al, 1986; Rodgers et al, 1997). Este comportamento pode ser induzido mediante a estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal e tem sido proposto como um modelo de ataque de pânico (Shenberg LC, et al., 2001). Os comportamento de luta e fuga estariam relacionados à raiva e ao pânico (Graeff, 1993; Graeff, 1994), pois o paulatino incremento na intensidade da corrente usada para estimular a DPAG produz alerta em seguida a resposta de congelamento e finalmente o comportamento de ataque de pânico caracterizado por respostas de pulos e corridas (Shenberg LC ET AL, 2001).

Resultados farmacológicos suportam o isomorfismo entre a resposta de fuga induzida pela estimulação da MCPD e ataques de pânico em humanos. Drogas panicolíticas como clomipramina e fluoxetina incrementam o limiar de corrente elétrica necessário para elicitare os comportamentos de pânico enquanto drogas panicogênicas como pentilenotetrazol diminuem este limiar (Jenk F, Moreau JL and Martin JR, 1995).

A estimulação elétrica em humanos na DPAG produz sintomas relacionados aos ataques de pânico como, por exemplo, palpitações no coração e sentimentos de morte iminente acompanhados de dores no peito (Nashold BS Jr, Wilson NP and Slaughter GS, 1974).

OBJETIVOS

Obejtivo geral:

Este trabalho procura avaliar a participação das porções dorsal e ventral do hipocampo de ratos nas reações comportamentais de defesa produzidas pela estimulação elétrica da MCPD e pelo condicionamento contextual aversivo.

Objetivo específico:

- 1) Identificar e comparar comportamentos relacionados aos diferentes transtornos de ansiedade
- 2) Entender melhor a circuitaria do medo condicionado e incondicionado.

3

Metodologia

3.1

Animais

Os animais selecionados para este experimento foram obtidos no biotério do Laboratório de Neuropsicologia Clínica e Experimental da PUC-Rio, sob temperatura de 22 °C e luminosidade controlada, com ciclos claro/ escuro alternados a cada 12 horas e este trabalho foi realizado durante o período de luminosidade clara.

De seis a oito dias depois do nascimento, os animais foram marcados com amputação de um dedo de cada pé. Depois de o animal completar 21 dias, os animais foram separados por sexo em grupos de seis em gaiolas de polietileno com medidas de 18x31x38 cm, os animais tiveram acesso *ad libitum* à água e comida.

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar (n =27), machos, com peso entre 250 e 350 g. Uma semana antes do início do experimento, todos os animais foram manuseados uma vez por dia por um período de 2 minutos para cada um. Os experimentos foram todos conduzidos segundo as normas da SBNeC (Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento).

3.2

Cirurgia

Os animais foram escolhidos ao acaso e divididos em 4 grupos: lesão no HD (n=8), controle HD (n=6), lesão no HV (n=7) e controle HV (n=6). Estes animais foram anestesiados com xylazina e ketamina intraperitonealmente na concentração de (0,1mg/100g) para ambas drogas, também receberam uma associação antibiótica de largo espectro (Pentabiótico, Fontoura- Wyeth-Brasil), 0,2 ml via intramuscular, a fim de prevenir possíveis infecções. Após a anestesia e a dose de pentabiótico, os animais foram afixados em um aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, CA). Uma assepsia local com álcool iodado, seguido de anestesia subcutânea local (lidocaína) foi ministrada.

Com o crânio fixo na horizontal, usando como referência (Paxino e Watson 1986) foram utilizadas as seguintes coordenadas para a realização da lesão eletrolítica bilateral: **HD**, (AP = -2,8 mm; ML = +/-1,8; DV = - 3,8 mm ventral) e para o **HV**, (AP = -5,2 mm; ML = +/-5,3 Mm; DV = - 6,0mm ventral). Esta lesão foi realizada através da inserção de um eletrodo, utilizando-se um lesionador percorreu-se uma corrente de 5 mA, com duração de 20 seg.

Os animais controles passaram pelo mesmo procedimento a exceção de que nenhuma corrente foi passada. Depois da lesão eletrolítica, um eletrodo unilateral foi implantado na **MCPD**, (AP = +2,3 mm; ML = -1,7 mm; DV = -4,5 mm) sem inclinação em relação ao plano sagital. O eletrodo foi afixado ao crânio com um parafuso e com acrílico dental.

3.3

Equipamento.

Os testes comportamentais foram realizados em uma caixa experimental quadrangular medindo 25 x 20 x 20 cm. Duas paredes eram de alumínio e as outras duas de acrílico. A base da caixa tinha 15 barras de metal distando 1,5 cm entre si, permitindo a administração de choques elétricos através de um gerador de choque com misturador de voltagem (AVS, SCR04 São Paulo). Uma interface com 8 canais (Insight, Riberão Preto) conectada a um micro computador, permitiu a apresentação dos choques elétricos. Esta caixa experimental estava em isolamento acústico. No teto desta caixa experimental foi instalado um conector elétrico ligado a duas saídas. A primeira saída estava ligada a um estimulador, gerador de corrente senoidal de 60 Hz e constante (Marseillan, 1977), o qual permitia a estimulação elétrica da MCPD. A corrente elétrica aplicada foi monitorada através de um osciloscópio conectado a um estimulador (Insight, Ribeirão Preto). A outra saída do conector estava ligada a um cabo flexível que se encaixava nos pólos do eletrôdo implantado no cérebro do animal. Permitindo a passagem da corrente elétrica. Uma lâmpada vermelha de 25 W foi instalada no teto da câmara de isolamento acústico o que permitia a observação dos animais durante os testes comportamentais através de um monitor. A sala onde foram realizados os experimentos possuía um extrator que produzia um ruído de fundo constante.

3.4

Eletrodo

O eletrodo foi feito de aço inoxidável (160 μm de diâmetro e 13,5 mm de comprimento), isolado exceto nas seções transversas das extremidades. A estimulação elétrica da MCPD ocorreu a partir da seção transversa distal do eletrodo. O eletrodo podia ser conectado a um pino macho e então conectado a um soquete no final de um cabo elétrico flexível e usado para a estimulação elétrica cerebral. Também se utilizou uma cânula unilateral que foi implantada na MCPD do animal para permitir a passagem de corrente elétrica para a MCPD.



Figura 3: Eletrodo e cânula

3. 5

Procedimento

3.5.1

Dia 1 - Congelamento e fuga induzida pela estimulação elétrica da Matéria cinzenta periaquedutal dorsal e congelamento pós-fuga.

Sete dias após a cirurgia, cada animal foi colocado dentro da caixa experimental por um período de 5 minutos para habituação. Depois disso, a estimulação elétrica da MCPD foi apresentada através do eletrôdo implantado nesta área (AC, 60 Hz, 15 s). O intervalo entre os estímulos elétricos foi de 1 minuto e a intensidade da corrente foi iniciada com 10 0mA e aumentada gradualmente em 5 mA. O limiar de congelamento foi operacionalmente definido como a menor intensidade de corrente necessária para produzir imobilidade geral motora (resposta de congelamento) e, seguido a este limiar, se buscou o limiar de fuga, ou seja, a menor intensidade de corrente utilizada para produzir o comportamento de corrida ou saltos (resposta de fuga). Animais com um limiar de fuga maior de 150 mA foram descartados do experimento.

Depois de coletar tanto o limiar de congelamento como o de fuga, se prosseguiu a medir o congelamento pós fuga por um período de 12 minutos. A resposta foi registrada através de um procedimento de amostragem de tempo. A cada dois segundos, o experimentador marcou o comportamento do animal quando estava em congelamento ou quando mostrava atividade motora. Uma solução de amônia foi utilizada para limpar a caixa experimental depois de retirar cada animal.

3.5.2

Dia 2 - Condicionamento Contextual Aversivo

Passadas 24 horas da estimulação elétrica, cada animal foi colocado na mesma caixa experimental por um período de 5 minutos para habituação. Depois do período de habituação, se deu início a apresentação dos estímulos aversivos, consistentes em três choques (0.6 mA) com intervalos de 20 segundos entre cada choque.

Todos os animais foram submetidos ao condicionamento ao contexto com a função de verificar as lesões eletrolíticas tanto no hipocampo dorsal e ventral. O congelamento pós-choque foi medido durante 3 minutos através do mesmo procedimento utilizado para medir o congelamento pós fuga no Dia 1. Depois da sessão de teste, os animais retornaram para o biotério e foram postos na mesma gaiola onde estavam anteriormente.

3.5.3

DIA 3 - Teste ao contexto

Cerca de 24 horas após o condicionamento contextual aversivo, o animal é recolocado na mesma caixa experimental por um período de 12 minutos. Nenhuma apresentação de choque é administrada durante estes 12 minutos e o comportamento de congelamento é registrado da mesma maneira que se registrou o congelamento pós- fuga no dia 1. Depois da sessão de teste, os animais retornaram para o biotério e foram postos na mesma gaiola donde estavam anteriormente.

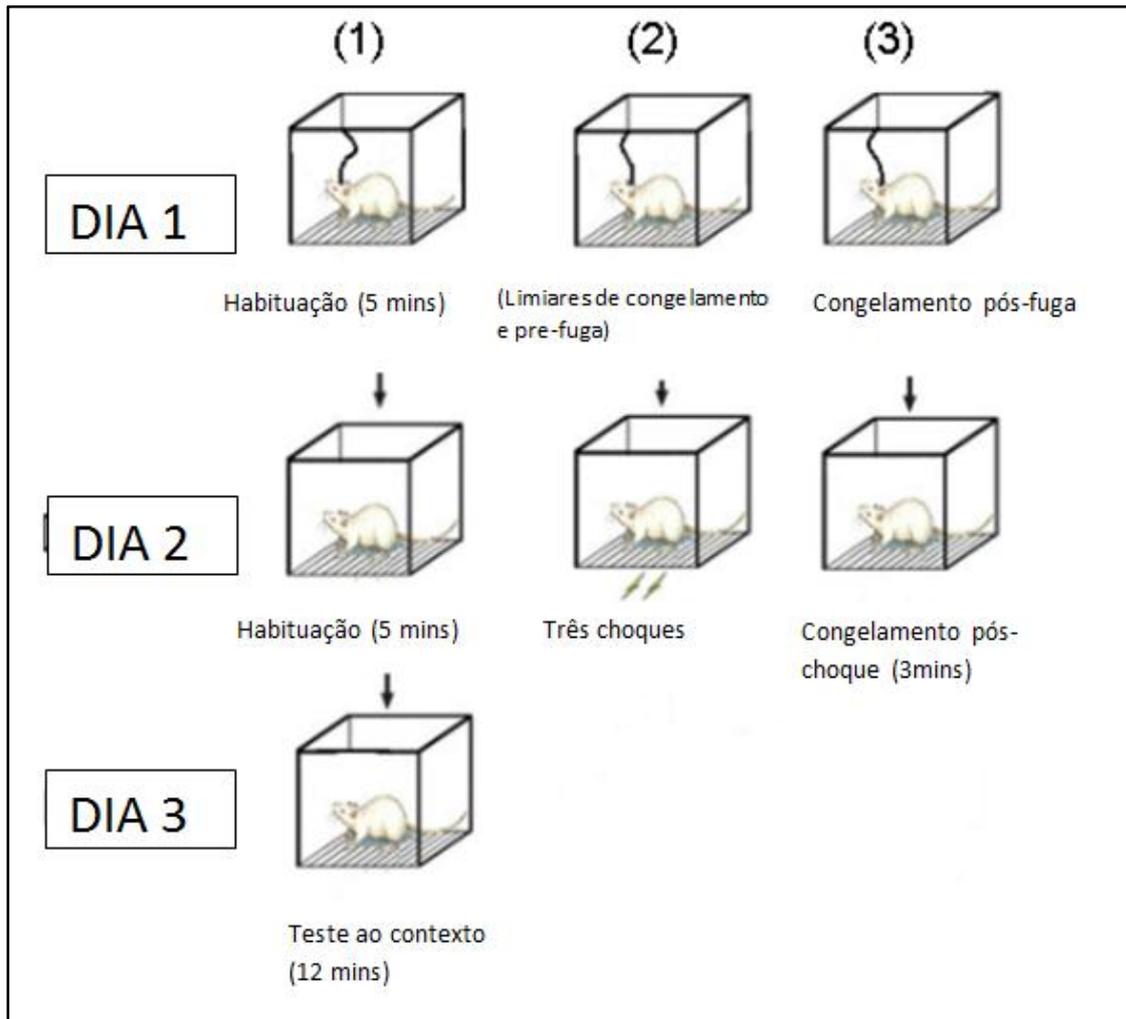


Figura: 4 Procedimento. **Dia 1:** (1) O animal foi colocado na caixa experimental por um período de 5 minutos. (2) O animal foi estimulado eletricamente na MCPD e foram coletados os limiars de congelamento pré-fuga e fuga. (3) Depois de achar os limiars, o congelamento pós-fuga foi coletado por um período de 12 minutos. **Dia 2:** (1) 24 horas após a estimulação da MCPD, cada animal foi colocado na mesma caixa por 5 minutos e foram apresentados 3 choques com intervalos de 20 segundos. O congelamento pós-choque foi medido da mesma maneira como o congelamento foi medido no dia 1. **Dia 3:** (1) 24 horas após a apresentação dos choques, o animal foi recolocado na mesma caixa experimental e o comportamento de congelamento foi medido por um período de 12 minutos

4

HISTOLOGIA

No final do experimento, todos os animais foram sacrificados. Os animais foram submetidos a uma perfusão cardíaca com solução salina e formol (4%) contendo potássio de ferrocianeto (1%). Os cérebros foram extraídos e colocados em uma solução de formol (10%) por 24 horas e depois foram colocados por mais uma semana em uma solução com sacarose (20%). Os cérebros foram cortados em secções coronais de 60 μm utilizando um criostato e foram montados em lâminas de microscopia previamente gelatinizadas. Depois de 5 dias as lâminas com os cortes foram coloridas em cresyl violeta.

A localização da lesão eletrolítica tanto no hipocampo dorsal como no hipocampo ventral foi analisada utilizando um micro projetor sobre a estrutura correspondente no atlas. A magnificação foi ajustada até que a estrutura projetada e a estrutura no atlas se igualassem. Dados obtidos com lesões incorretas foram descartados da análise estatística.

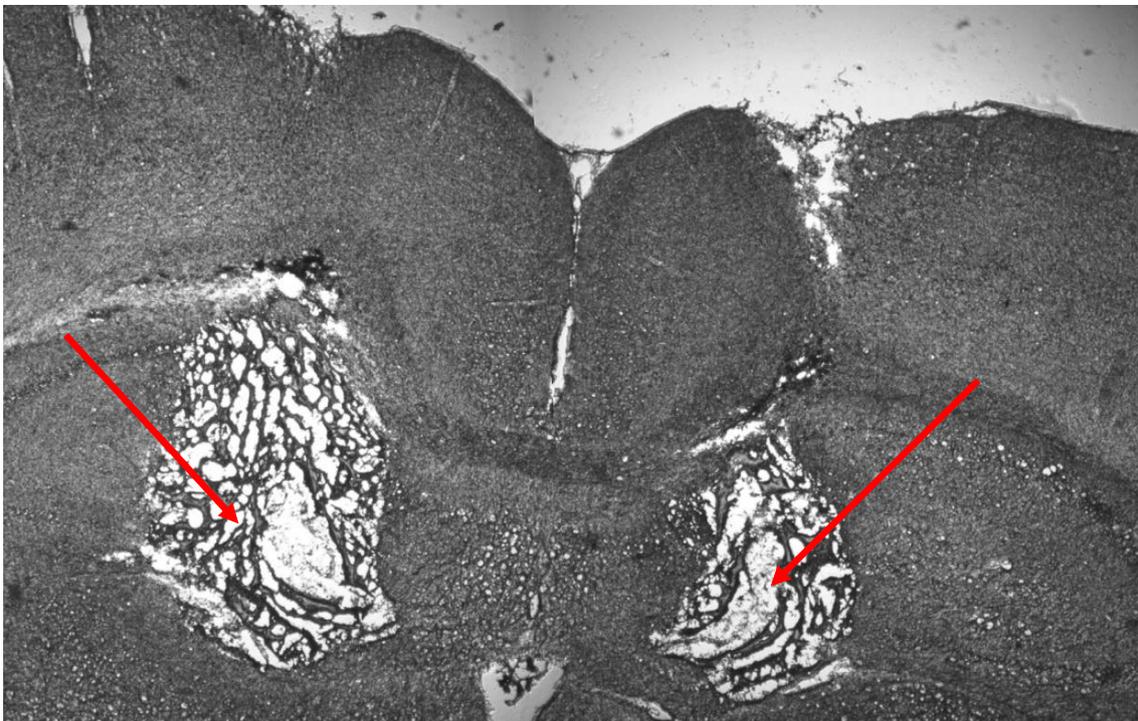


Figura 5. Imagem que mostra as lesões eletrolíticas bilaterais feitas no hipocampo dorsal indicadas pelas setas.



Figura 6. Imagem que mostra as lesões eletrolíticas bilaterais feitas no hipocampo ventral, indicadas pelas setas.

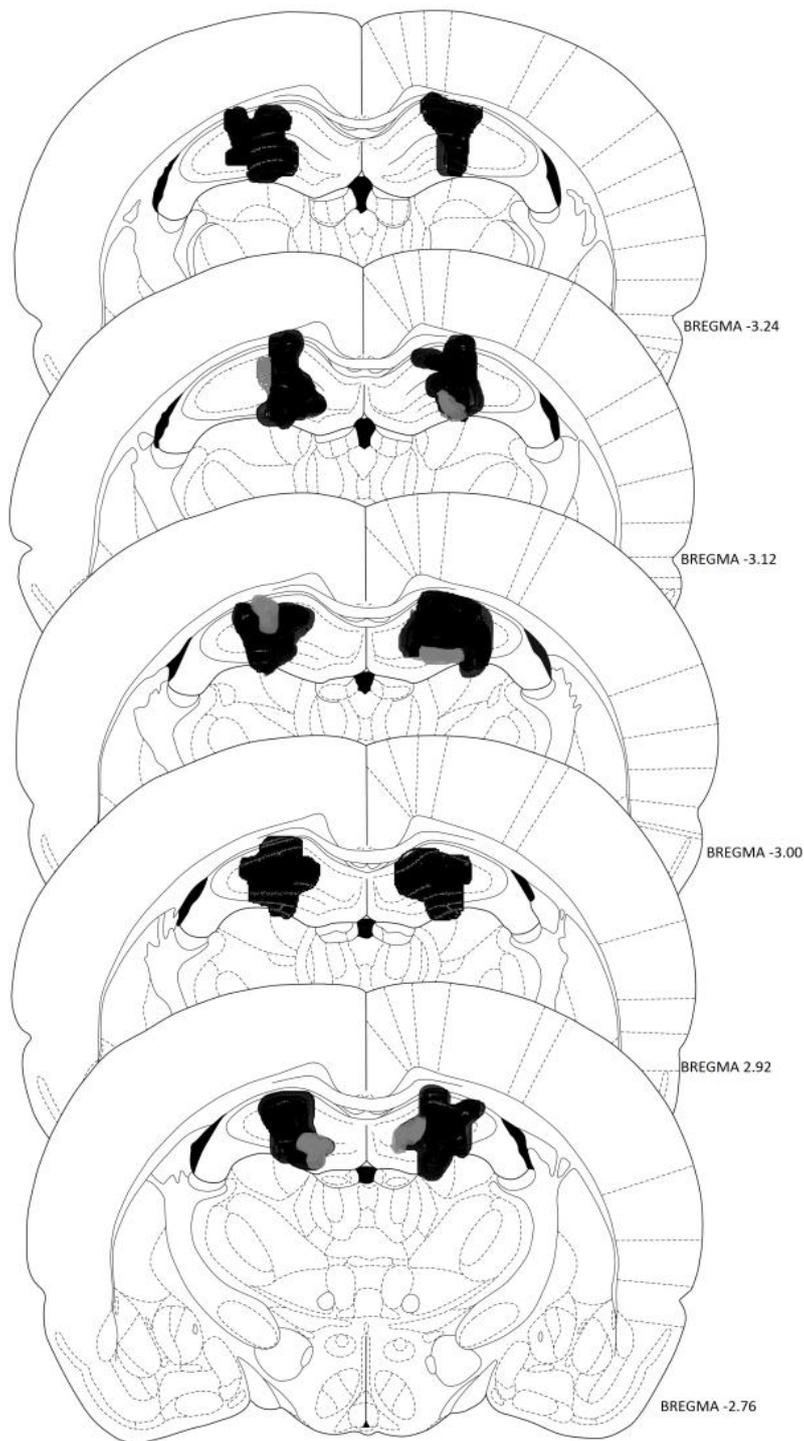


Figura 7: Composé de cortes coronais adaptado de *Paxinos and Watson (1986) rat brain atlas*. A figura mostra as maiores (cinza) e menores (preto) áreas afetadas pela lesão eletrolítica no hipocampo dorsal

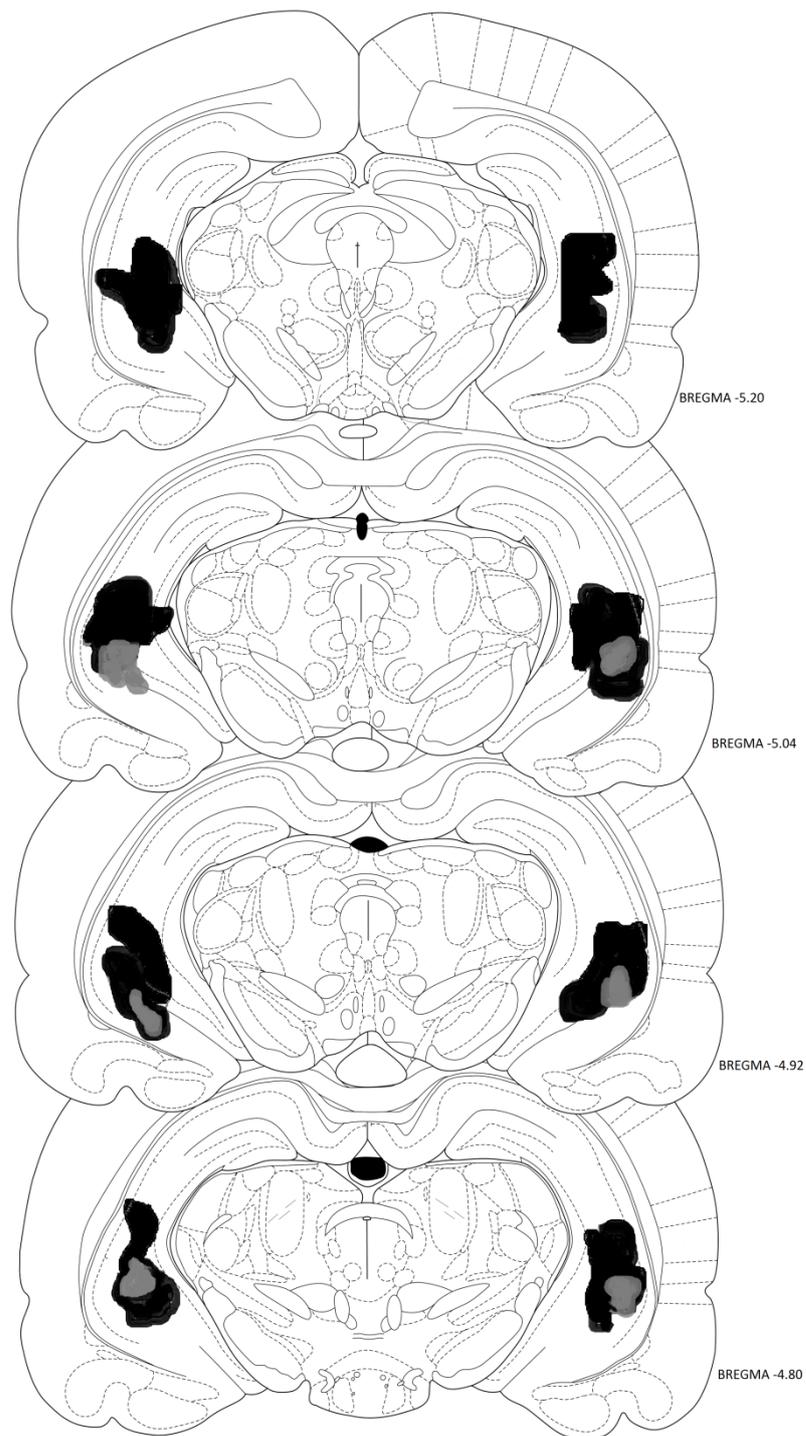


Figura 8: Composé de cortes coronais adaptado de *Paxinos and Watson (1986) rat brain atlas*. A figura mostra as maiores (cinza) e menores (preto) áreas afetadas pela lesão eletrolítica no hipocampo ventral.

5

RESULTADOS

5.1

Estimulação elétrica da MCPD

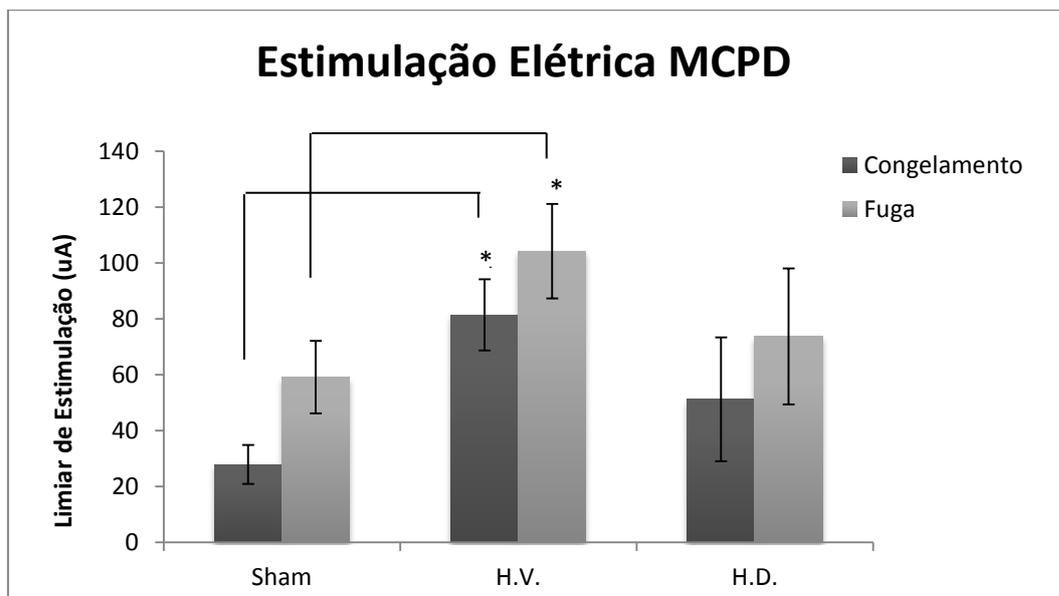


Gráfico 1. Estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal

A lesão no hipocampo ventral mas não no dorsal aumenta o limiar para a resposta de congelamento e de fuga. Na análise estatística, os limiares foram transformados em logaritmo uma vez que a distribuição desses limiares não apresenta distribuição normal. Foi realizada uma ANOVA de duas vias. O primeiro fator, com três níveis independentes, está relacionado com os três diferentes grupos: controle, lesão na porção dorsal e ventral do hipocampo. O segundo fator, com dois níveis com medidas repetidas, está relacionado os limiares de congelamento e fuga. Essa análise revelou um efeito principal do Grupo ($F(2,24)=3,79$; $p=0,04$) e dos limiares de congelamento e fuga ($F(1,24)=46,9$; $p<0,001$), assim como uma interação entre os dois fatores ($F(2,24) = 5,27$; $p=0,013$). Uma análise *pos-hoc* com o teste de *Bonferroni* indicou que a lesão no hipocampo ventral causou um aumento nos limiares para a produção da resposta de congelamento ($p < 0,05$) como da resposta de fuga ($p=0,05$). Nenhuma outra comparação par a par foi significativa.

5.2

Congelamento pós- estimulação

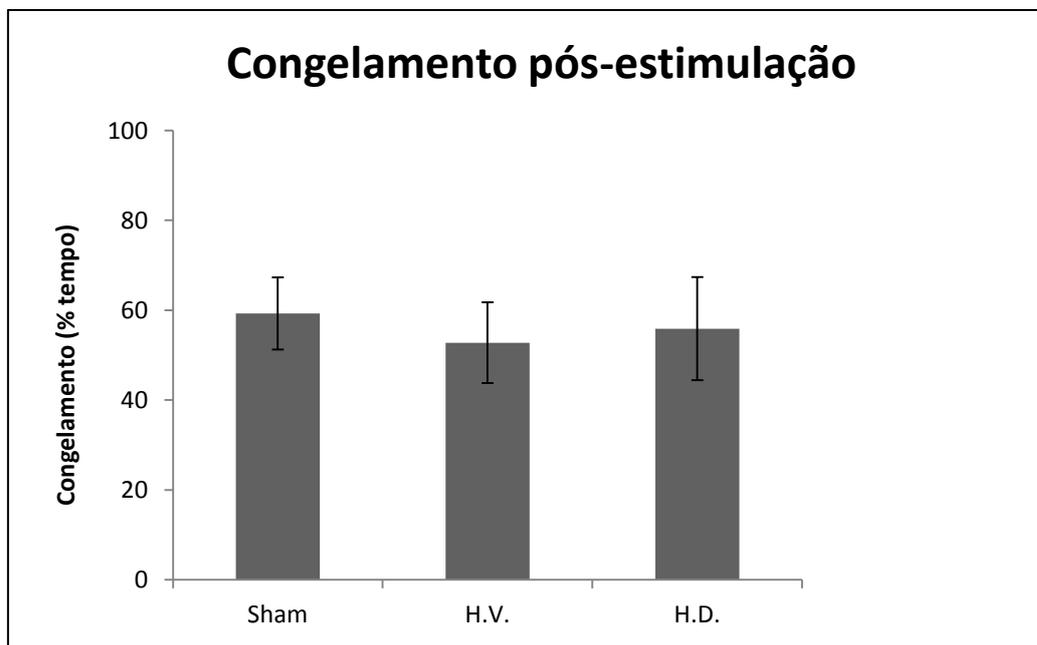


Gráfico 2. Congelamento pós- estimulação.

Não há diferença entre os três grupos.

Os dados foram analisados por meio de uma ANOVA de uma via com relacionado com os três diferentes grupos: controle, lesão na porção dorsal e ventral do hipocampo. A análise não mostrou qualquer efeito significativo ($F(2, 24) = 0,47; p > 0,6$)

5.3

Congelamento imediato após a apresentação do choque nas patas

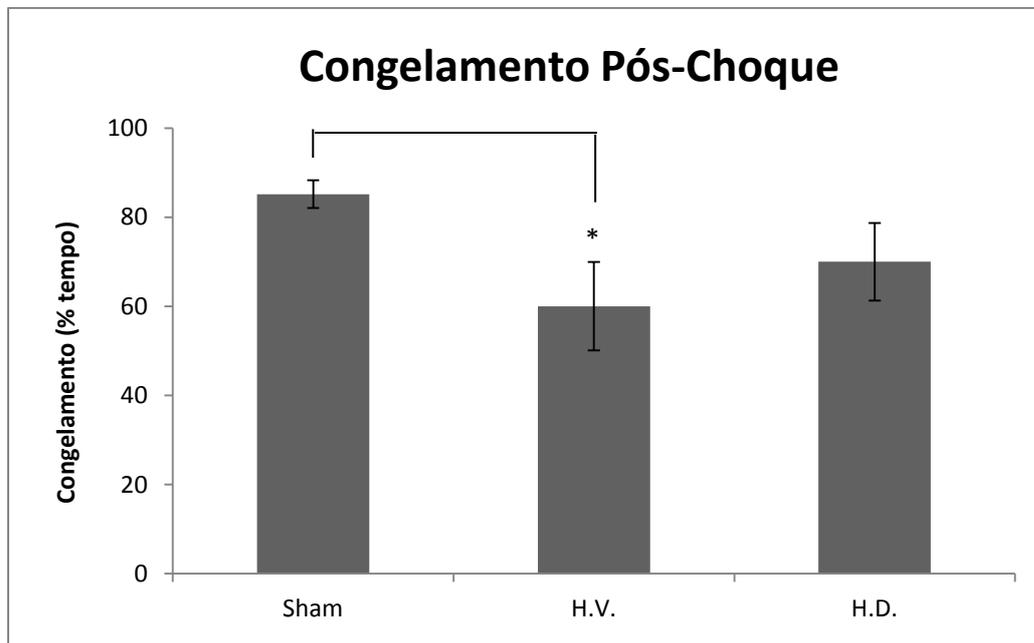


Grafico 3. Congelamento pós-choque

A lesão no hipocampo ventral reduziu o congelamento pós-choque. Os dados foram analisados por meio de uma ANOVA de uma via com relacionado com os três diferentes grupos: controle, lesão na porção dorsal e ventral do hipocampo. A análise mostrou uma diferença significativa entre os três grupos ($F(2,24)= 3,71$; $p=0,04$). Uma análise *pos-hoc* com o teste de *Bonferroni* indicou que a lesão no hipocampo ventral levou a uma redução da resposta de congelamento imediatamente após o choque elétrico nas patas em comparação ao grupo controle ($p=0,015$). Nenhuma outra comparação par a par foi significativa.

5.4

Congelamento por condicionamento ao contexto

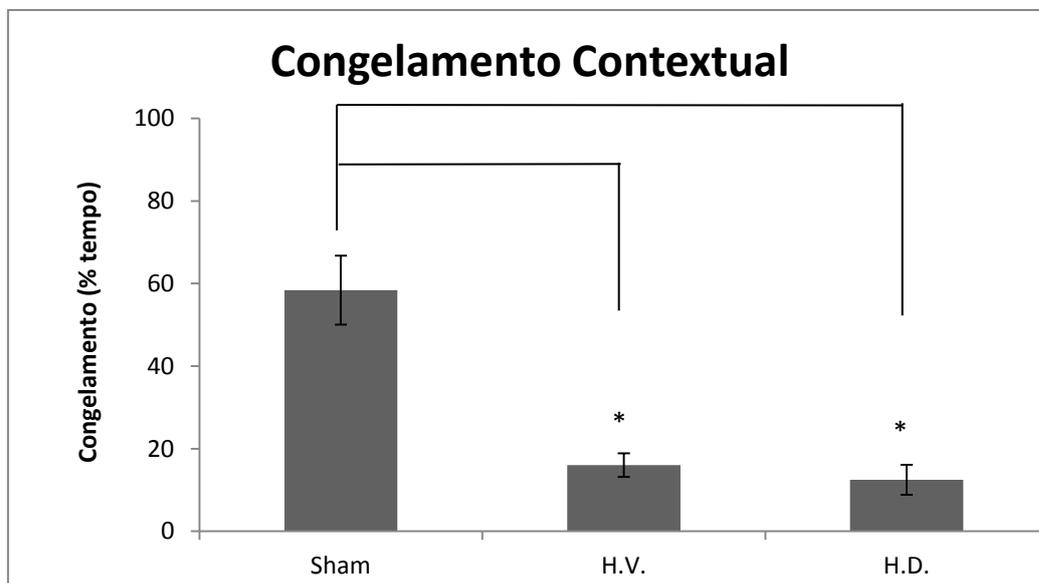


Figura 12: Congelamento Contextual

Lesões no hipocampo ventral ou dorsal reduzem a resposta de congelamento. Os dados foram analisados por meio de uma ANOVA de uma via com relacionado com os três diferentes grupos: controle, lesão na porção dorsal e ventral do hipocampo.

A análise mostrou uma diferença significativa entre os três grupos ($F(2,24)= 14,55$; $p<0,001$). Uma análise pós-choque com o teste de Bonferroni indicou que tanto a lesão no hipocampo dorsal como no hipocampo ventral levaram a uma redução da resposta de congelamento 24 horas após o choque. (ambos os p 's $<0,001$). Nenhuma outra comparação par a par foi significativa.

6

DISCUSSÃO

Hoje em dia, graças aos avanços da neurociência, podemos entender com maior clareza as diferenças entre os diferentes tipos de emoções. Evidências indicam que a ansiedade e o pânico são emoções distintas e que, por sua vez, cada uma tem suas próprias bases neurofisiológicas e, conseqüentemente, suas determinadas reações comportamentais que podem ser quantificadas através das reações de defesa que os animais apresentam frente a estímulos de perigo inatos ou aprendidos. Estes modelos animais são altamente utilizados para esclarecer o entendimento sobre as reações que existem entre os diferentes transtornos de ansiedade.

A resposta que os animais apresentam à estimulação da MCPD tem sido utilizada como modelo animal de pânico e o condicionamento contextual de medo tem sido relacionado como modelo animal de transtorno de ansiedade generalizada. Tanto o hipocampo como a MCPD estão altamente relacionadas com a ansiedade e o pânico, sendo estas estruturas as mais estudadas neste trabalho.

Os resultados deste estudo corroboram com a literatura (Ji e Maren 2007; Fanselow, 1999; Gewirtz et al.,2000; Kim, Fanselow, 1992 e Rudy, 2002) indicando que os animais com lesão eletrolítica no hipocampo dorsal que sofreram condicionamento clássico ao contexto pareado com choque nas patas, tiveram inibida a sua resposta de congelamento em comparação com o grupo controle 24 horas após. Este resultado é consistente com o estudo que sugere uma conexão funcional entre hipocampo dorsal e amígdala, ambos tendo um papel essencial no medo aprendido (Fanselow, 2009) e no armazenamento de memória contextual de medo de curto prazo (Kim e Fanselow, 1992). Logo, uma hipótese seria que a lesão no HD poderia ter de fato afetado a conexão funcional entre hipocampo e amígdala (Fanselow, 2009), interrompendo assim o processo de aquisição do medo condicionado e, por conseqüência, havendo uma diminuição do comportamento de congelamento no dia seguinte. Em adição, os resultados obtidos em animais com lesão eletrolítica no hipocampo ventral que passaram pelo mesmo paradigma de medo contextual, tiveram também inibida a sua

resposta de congelamento em comparação com o grupo controle (Sutherland, 2008; Rogers, 2006). Por conseguinte, de acordo com trabalhos anteriores (Rogers, Hunsaker e Kesner, 2006) uma segunda hipótese seria que as sub-regiões de HD e HV trabalhariam de forma integrativa no medo contextual e consequentemente a lesão de qualquer uma destas sub-regiões em ambas as áreas comprometeriam o processo de aquisição ao medo contextual, havendo assim uma diminuição no congelamento no dia seguinte que os animais foram re-expostos ao mesmo contexto.

Em termos neuropsicológicos, o aprendizado de eventos aversivos requer um ótimo funcionamento da memória que acontece pela ativação do hipocampo e suas conexões com a amígdala como foi anteriormente mencionado. Não havendo um hipocampo intacto, é impossível que as memórias fossem consolidadas em outras áreas do cérebro e por isso impossível a aquisição de aprendizagem.

Os resultados do nosso trabalho sugerem que as lesões eletrolíticas no HD e HV diminuíram a aquisição de medo condicionado. Por sua vez, no paradigma de medo incondicionado, a lesão eletrolítica no HD não mudou os limiares de congelamento pré-fuga e fuga eliciados pela estimulação da MCPD comparado com o grupo controle. De maneira interessante, a lesão eletrolítica no HV mudou os limiares de congelamento pré-fuga e fuga eliciados pela estimulação elétrica da MCPD (Oliveira, Nobre, Brandão e Landeira, 2004) comparados com o grupo controle. Baseado nesta evidência sugerimos que mecanismos moduladores distintos no hipocampo (Fanselow, 2009) são recrutados durante o medo condicionado e incondicionado eliciado pela estimulação da MCPD.

Evidências sugerem que o hipocampo junto com o complexo amigdalóide e suas projeções para a parte ventral da matéria cinzenta periaquedutal são criticamente envolvidos na regulação do condicionamento de medo contextual como via primária (Galvão et al., 2011). Embora o medo condicionado tenha uma via principal já muito conhecida na literatura, também existe uma via alterna que usa o núcleo do leito da estria terminal (Poulos, A.M., et al, 2010) como uma estrutura com papel compensador em caso de disfunção da amígdala. Estudos recentes mostram que o NLST pode sofrer plasticidade devido à experiência quando a amígdala não funciona (Vyas, A, et al, 2003, Dumont, E.C., 2005). Sugerimos que o hipocampo ventral recebe projeções da MCPD e envia para o NLST para a produção do congelamento condicionado como via alterna. Por outro

lado, sugerimos que projeções vindas da MCPD para o hipocampo ventral passando por hipotálamo, podem regular respostas de defesas incondicionadas específicas, como o congelamento pré- fuga e a resposta de fuga (ver figura 9).

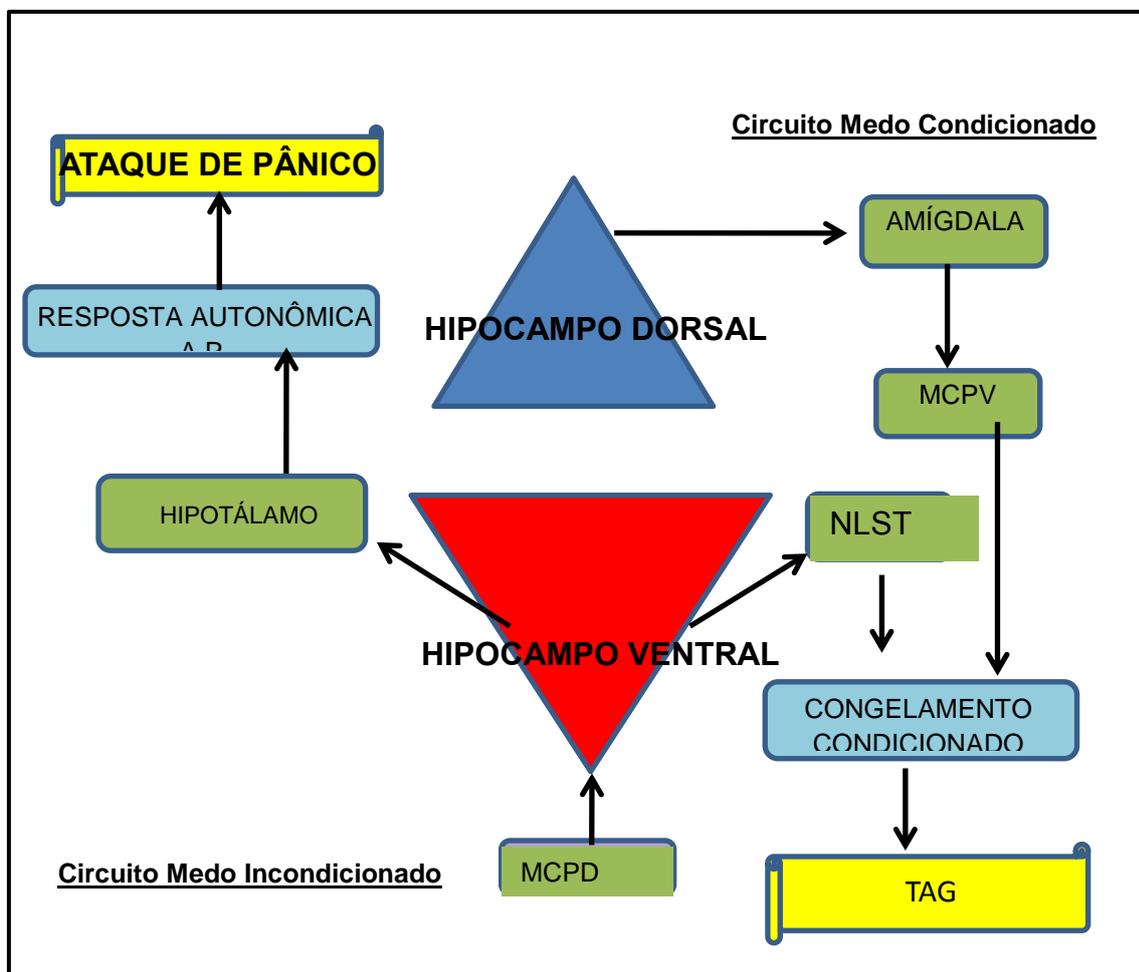


Figura 9. Circuitaria proposta

Nossos resultados verificaram que os animais que foram lesionados tanto no hipocampo ventral quanto dorsal, tiveram a sua resposta de CPF igual em comparação com o grupo controle. De acordo com Brandão e colaboradores (2007) o CPF permitiria o animal a também avaliar as consequências da estimulação aversiva e, conseqüentemente, uma melhor tomada de decisão diante de situações ameaçadoras futuras. Logo, a lesão nas sub-regiões ventral e dorsal do hipocampo não foram o 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 outras estruturas corticais especializadas, que não envolvem o hipocampo.

Os resultados deste estudo verificaram que os animais que foram lesionados no hipocampo ventral tiveram a sua resposta de Congelamento Pré-Choque menor em comparação com o grupo lesionado no hipocampo dorsal e controle. Kim, Fanselow, DeCola e Landeira-Fernandez (1992) verificaram que o CPC estaria diretamente ligado a uma memória emocional. De acordo com Fanselow (2009), a parte ventral do hipocampo também está relacionada com a modulação de respostas emocionais. Nossos dados sugerem que a lesão na parte ventral do hipocampo inibiu o processo de medo associativo gerado naquele contexto e conseqüentemente diminuindo a frequência de CPC, demonstrando assim a importância da parte ventral do hipocampo na modulação da resposta de defesa do animal.

7

CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste trabalho apontam para a direção de que as lesões eletrolíticas no hipocampo ventral aumentam os limiares de congelamento pré-fuga e fuga, indicando assim, que a porção ventral do hipocampo pode ser uma estrutura importante no circuito do medo incondicionado. Estes dados demonstram uma forte participação da parte ventral do hipocampo nos ataques de pânico, no entanto, não podemos concluir que a lesão eletrolítica nesta estrutura produz um efeito panicolítico, já que não houve diferenças no congelamento pós-fuga que é um modelo de transtorno de pânico.

Nossos dados indicam que o hipocampo dorsal não participa do circuito do medo incondicionado utilizando o paradigma da estimulação elétrica da MCPD, mas participa do circuito do medo condicionado utilizando o paradigma do medo contextual; por outro lado, o hipocampo ventral participa tanto no medo condicionado como no medo incondicionado.

Finalmente, propomos uma circuitaria para o medo incondicional dentro do paradigma da estimulação da MCPD onde projeções vindas da MCPD para o hipocampo ventral passando pelo hipotálamo, podem regular respostas de defesas incondicionadas específicas, como o congelamento pré-fuga e a resposta de fuga. (ver figura 9).

Tabela 5. Principais estruturas partícipes dos circuitos de medo incondicionado e condicionado.

	ATAQUE DE PÂNICO	TRANSTORNO DE ANSIEDADE GENERALIZADA
MODELO ANIMAL	ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MCPD	CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL
<u>ESTRUTURA</u>	<u>MEDO INCONDICIONADO</u>	<u>MEDO CONDICIONADO</u>
Amígdala	NÃO	SIM
MCPV	NÃO	SIM
Hipocampo Dorsal	NÃO	SIM
Hipocampo Ventral	SIM	SIM

*

Principais estruturas partícipes dos circuitos de medo incondicionado e condicionado usando os paradigmas de estimulação da MCPD e condicionamento contextual como modelos animais de ataque de pânico e transtorno de ansiedade generalizada.

Nota: *Novo dado

8.

Referências

ALVES, S.H.S. (2001) Efeitos da microinjeção de TFMPP nas porções ventral e dorsal do hipocampo em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado. **Dissertação de Mestrado**. Brasília: Universidade de Brasília.

American Psychiatric Association – Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders. 4.ed. Revised, Washington, DC, **American Psychiatric Association**, 1994

ANAGNOSTARAS, S.G.; CRASKE, M.G.; FANSELOW, M.S. (1999a) Anxiety: At the Intersection of Genes and Experience. **Nature Neuroscience**, 2(9): 780-782.

ANAGNOSTARAS, S.G.; MAREN, S.; FANSELOW, M.S. (1999b) Temporally Graded Retrograde Amnesia of Contextual Fear after Hippocampal Damage in Rats: Within-Subjects Examination. **Journal of Neuroscience**, 19: 1106-1114.

BANNERMAN DM, DEACON RM, OFFEN S, FRISWELL J, GRUBB M, RAWLINS JN_ (2002) Double Dissociation of Function within the Hippocampus: Spatial Memory and Hyponeophagia. **Behav Neurosci**. 116(5):884-901.

BANNERMAN DM, GRUBB M, DEACON RM, YEE BK, FELDON J, RAWLINS JN (2003)_Ventral Hippocampal Lesions Affect Anxiety But not Spatial Learning. **Behav Brain Res**. 139(1-2):197-213.

BANNERMAN DM, RAWLINS JN, MCHUGH SB, DEACON RM, YEE BK, BAST T, ZHANG WN, POTHUIZEN HH, FELDON J (2004) Regional Dissociations Within the Hippocampus--Memory and Anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**. 28(3):273-83

BEHBEHANI MM (1995).Functional Characteristics of the Midbrain Periaqueductal Gray. **Prog Neurobiol**. 46(6):575-605.

BITTENCOURT AS, CAROBREZ AP, ZAMPROGNO LP, TUFIK S, SCHENBERG LC (2004) Organization of Single Components of Defensive Behaviors Within Distinct Columns of Periaqueductal Gray Matter of the Rat: Role of N-methyl-D-aspartic Acid Glutamate Receptors. **Neuroscience**. 125(1):71-89.

BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC, RODGERS J, WEISS SM (1990) The Characterization and Modelling of Antipredator Defensive Behavior. **Neurosci Biobehav Rev**. 14(4):463-72.

BOLLES RC, GROSSEN NE (1970) Function of the CS in Shuttle-Box Avoidance Learning by Rats. **J Comp Physiol Psychol**. 70(1):165-9.

BONNE, O., VYTHILINGAM, M., INAGAKI, M., WOOD, S., NEUMEISTER, A., NUGENT, A.C., SNOW, J., LUCKENBAUGH, D.A., BAIN, E.E., DREVETS, W..C., AND CHARNEY, D.S. (2008). Reduce Posterior Hippocampal Volume in Posttraumatic Stress Disorder. **J. Clin. Psychiatry** 69, 1087-1091

[BRANDAO ML](#), [COIMBRA NC](#), [BORGES PC](#). Effects of Morphine and Midazolam on Reactivity to Peripheral Noxious and Central Aversive Stimuli. **Neurosci Biobehav Rev**. 1990 Winter;14(4):495-9

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 Research**, 188: 1-13.

BRAWMAN-MINTZER, O.; LYDIARD, R.B. (1997) Biological Basis of Generalized Anxiety Disorder. **J Clin Psychiatry**, 58 (3): 16-25.

CASAROTTO PC, DE BORTOLI VC, DE AGUIAR CORRÊA FM, MORAES RESSEL LB, ZANGROSSI H (2010) Panicolytic-Like Effect of BDNF in the Rat Dorsal Periaqueductal Grey Matter: The Role of 5-HT and GABA. **Int J Neuropsychopharmacol** 5:1-10.

CONTI, L.H.; MACIVER, C.R.; FERKANY, J.W.; ABREU, M.E. Footshock-Induced Freezing Behavior in Rats as a Model for Assessing Anxiolytics. **Psychopharmacology** (Berl), 1990; 102(4): 492-7

DEDOVIC, K., DUCHESNE, A., ANDREWS, J., ENGERT, V., AND PRUESSNER, J.C.(2009). The Brain and the Stress Axis: The Neural Correlates of Cortisol regulation in response to stress. **Neuroimage** 47, 864-871

DRACTU, L., LADER, M. Ansiedade: Conceito, Classificação e Biologia. Uma Interpretação Contemporânea da Literatura. **Jornal brasileiro de Psiquiatria**, 1993;42(1): 19-32

DUMONT EC, MARK GP, MADER S, WILLIAMS JT (2005). Self-Administration Enhances Excitatory Synaptic Transmission in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. **Nat Neurosci** 8:413-414

EICHENBAUM H, OTTO T, COHEN, NJ (1994) Two Functional Components of the Hippocampal Memory System. **Behav Brain Sci.** 17:449-518.

ESCLASSAN F, COUTUREAU E, DI SCALA G, MARCHAND AR (2009) Differential contribution of dorsal and ventral hippocampus to trace and delay fear conditioning. **Hippocampus.** 19(1):33-44.

FANSELOW [MS](#). Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. **[Pavlov J Biol Sci.](#)** 1980 Oct-Dec;15(4):177-82.

FANSELOW [MS](#)., Shock-induced Analgesia on the Formalin Test: Effects of Shock Severity, Naloxone, Hypophysectomy, and Associative Variables. **[Behav Neurosci.](#)** 1984 Feb;98(1):79-95.

FANSELOW MS, SIGMUNDI RA (1986) Species-Specific Danger Signals, Endogenous Opioid Analgesia, and Defensive Behavior. **J Exp Psychol Anim Behav Process.** 12(3):301-9.

FANSELOW, M.S. The Midbrain Periaqueductal Gray as a Coordinator of Action in Response to Fear and Anxiety. Em: Depaulis A. e Bandler R.

(Editores), The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Immunohistochemical Organization. **Plenum Publishing Corp., New York**, 1991 a. p. 151-173

FANSELOW, M.S. The Midbrain Periaqueductal Gray as a Coordinator of Action in Response to Fear and Anxiety. Em A Depaulis & R. Bandler (Eds). The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Immunohistochemical Organization. **New York: Plenum NATO ASI Series A**, V 213, p. 151-73, 1991.

FANSELOW MS, KIM JJ, YIPP J, DE OCA B (1994) Differential Effects of the N-methyl-D-Aspartate Antagonist DL-2-amino-5-phosphonovalerate on Acquisition of Fear of Auditory and Contextual Cues. **Behav Neurosci.** 108(2):235-40.

FANSELOW MS, DONG HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron.** 2010 Jan 14;65(1):7-19. Review

FRANKLAND, PW., CESTARI V., FILIPSKOWSKI RK., McDONALD RJ., SILVA AJ. The Dorsal Hippocampus is Essential for Context Discrimination but not for Contextual Conditioning. **Behav Neurosci.** 1998 Aug;112(4):863-74.

FREY, B.N., ANDREAZZA, A.C., NERY, F.G., MARTINS, M.R., QUEVEDO, J., SOARES, J.C., AND KAPOZINSKI, F. (2007). The Role of Hippocampus in the Pathophysiology of Bipolar Disorder. **Behav. Pharmacol.** 18, 419-430

GOOD M, HONEY RC. Conditioning and Contextual Retrieval in Hippocampal Rats. **Behav Neurosci.** 1991 Aug;105(4):499-509.

GRAEFF FG (1981) Minor Tranquilizers and Brain Defense Systems. **Braz J Med Biol Res.** 14(4-5):239-65.

GRAEFF, F.G. Brain defense systems and anxiety. (1990) In: Roth M. Burrows G.D., Noyes (eds). **Handbook of anxiety**, v. 3, pp. 307-354. Amsterdam: Elsevier

Graeff FG (2003) Serotonin, Periaqueductal Gray Matter and Panic Disorder. **Rev Bras Psiquiatr.** 25(2):42-5.

GRAY, JA. (1982) The Neuropsychology of Anxiety. **Oxford University Press**, New York.

GRAY, J., AND JEFFREY, A (1971). The Psychology of Fear and Stress. World University Library (**New York: McGraw-Hill**)

GRAY JA, MCNAUGHTON N (2000) The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry Into the Functions of the Septo-Hippocampal System (**Oxford Univ. Press, Oxford**), 2nd Ed.

GROSS, C.; HEN, R. (2004) The developmental origins of anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, 5: 545-552.

HELMSTETTER FJ, LANDEIRA-FERNANDEZ J. (1990) Conditional Hypoalgesia is Attenuated by Naltrexone Applied to the Periaqueductal Gray. **Brain Res.** 537(1-2):88-92.

HERMAN, JP., OSTRANDER, M.M., MULLER, N.K., AND FIGUEREDO, H (2005). Limbic System Mechanisms of Stress Regulation: Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis. *Prog. Neuropsychopharmacol.* **Biol. Psychiatry** 29, 1201-1213.

HENKE, P.G. (1990). Hippocampal Pathway to the Amygdala and Stress Ulcer Development. **Brain Res. Bull.** 25, 691-695.

HIRSH, R., The Hippocampus and Contextual Retrieval of Information From memory: A Theory. **Behav Biol.** 1974 Dec;12(4):421-44.

[HONEY, RC.](#), [GOOD, M.](#) Selective Hippocampal Lesions Abolish the Contextual Specificity of Latent Inhibition and Conditioning. [Behav Neurosci.](#) 1993 Feb;107(1):23-33

IZQUIERDO I, DA CUNHA C, ROSAT R, JERUSALINSKY D, FERREIRA MB, MEDINA JH (1992) Neurotransmitter Receptors Involved in Post-Training Memory Processing by the Amygdala, Medial Septum, and Hippocampus of the Rat. **Behav Neural Biol.** 58(1):16-26.

JACOBSON, L., AND SAPOLSKY, R. (1991). The Role of the Hippocampus in Feed-Back Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis. **Endocr. Rev.** 12, 118-134

J.M. WEISS, E. E. KRIECKHAUS, R. CONTE. Effects of Fear Conditioning of Subsequent Avoidance Behavior and Movement. **J. Comp. Physiol. Psychol.** 65 (1968) 413-421

J. PANKSEPP, S. SIVITY, L. NORMANSELL, K (1982) White, P. Bishop Effects of B-chlornaltrexamine on Separation Distress in Chicks Life **Sci.** 15-22;31(20-21):2387-90.

KENNEDY, PJ., SHAPIRO, ML., Retrieving Memories Via Internal Context Requires the hippocampus. [J Neurosci.](#) 2004 Aug 4;24(31):6979-85.

KJELSTRUP KG, TUVNES FA, STEFFENACH HA, MURISON R, MOSER EI, MOSER MB (2002). Reduced Fear Expression After Lesions of the Ventral Hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 99(16):10825-30.

KAPLAN, H.I.; SADOCK, B.J. (1990) **Compêndio de Psiquiatria.** Artes Médicas: Porto Alegre, 1990.

KELLY, D. (1980) Clinical aspects of anxiety. In: Thomas, C.C. (ed.) Anxiety and emotions. Publisher Springfield: Illinois, 3-19.

KIM, J.J.; FANSELOW, M.S. (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, 256: 675-677.

KIM JJ, RISON RA, FANSELOW MS (1993) Effects of Amygdala, Hippocampus, and Periaqueductal Gray Lesions on Short- and Long-Term Contextual Fear. **Behav Neurosci.** 107(6):1093-8.

LANDEIRA-FERNANDEZ, J., FANSELOW, M.S.; DEOCA, B.M. Opposite Roles of ventral and Dorsolateral Periaqueductal Gray in Conditional Fear-Related Defensive Behavior. **Society for Neuroscience**, 1992. p. 1005

LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Pavlovian Context Conditioning. **Brazilian Journal of medical and Biological Research.** 1996Ç 29: 149-173

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

LANDGRAF, R.; WIGGER, A. (2002) High x low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. **Behav. Genet.**, 32: 301-314.

LANDGRAF, R.; WIGGER, A. (2003) Born to be Anxious: Neuroendocrine and Genetic Correlates of Trait Anxiety in HAB Rats. **Estresse**, 6(2): 111-119.

LANDGRAF, R.; KEßLER, M. S.; BUNCK, M.; MURGATROYD, C.; SPENGLER, D.; ZIMBELMANN, M.; NUßBAUMER, M.; CZIBERE, L.; TURCK, C. W.; SINGEWALD, N.; RUJESCU, D.; FRANK, E. (2007) Candidate Genes of Anxiety-Related Behavior in HAB/LAB Rats and Mice: Focus on Vasopressin and Glyoxalase-I. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 31: 89-102

LEDOUX JE, IWATA J, CICHETTI P, REIS DJ (1988) Different Projections of the Central Amygdaloid Nucleus Mediate Autonomic and Behavioral Correlates of Conditioned Fear. **J Neurosci.** 8(7):2517-29.

LEDOUX, J. (2000) Emotion circuits in the brain. **Annu. Rev. Neurosci.** 23:155-184.

MAGIEREK V, RAMOS PL, DA SILVEIRA-FILHO NG, NOGUEIRA RL, LANDEIRA-FERNANDEZ J (2003) Context Fear Conditioning Inhibits Panic-Like Behavior Elicited by Electrical Stimulation of Dorsal Periaqueductal Gray. **Neuroreport.** 26;14(12):1641-4.

MAKI, Y., INOUE, T., IZUMI, T., MURAKI, I., ITO, K., KITAICHI, Y., LI, X., KOYAMA, T. Monoamine Oxidase Inhibitors Reduce Conditioned Fear Stress-induced Freezing behavior in Rats. **European Journal Pharmacology**, 2000; 406(3):411-8.

MAREN S, FANSELOW MS (1997) Electrolytic Lesions of the Fimbria/Fornix, Dorsal Hippocampus, or Entorhinal Cortex Produce Anterograde Deficits in Contextual Fear Conditioning in Rats. **Neurobiol Learn Mem.** 67(2):142-9

McEWEN, B.S., CONRAD, C.D., KURODA, Y., FRANKFURT, M., MAGARINOS, A.M., AND MCKITTRICK, C. (1997). Prevention of Stress-Induced Morphological and Cognitive Consequences. **Eur. Neuropsychopharmacol.** 7 (Suppl 3), S323-S328

MCHUGH SB, DEACON RM, RAWLINS JN, BANNERMAN DM (2004) Amygdala and Ventral Hippocampus Contribute Differentially to Mechanisms of Fear and Anxiety. **Behav Neurosci.** 118(1):63-78.

MCLEAN, P.D. The Limbic System with Respect to Self Preservation and the Preservation of the Species. **Journal of Nervous and Mental disease**, 1958; 127:1-10

MYER, J.S. Some effects of noncontingent aversive stimulation. In F. R. Brush (Ed.), *Aversive Conditioning and Learning*. New York; **Academic Press**, 1971

MORRIS, R.G.M. (1981). Spatial Localization Does not Require the Presence of Local Cues. *Learn. Motiv.* 12, 239-260.

MOSER MB, MOSER EI (1998) Functional Differentiation in the Hippocampus. **Hippocampus**. 8(6):608-19.

MOSER, M.B., MOSER, E.I., FORREST, E., ANDERSEN, P., and MORRIS, R.G. (1995) Spatial Learning with a Minislab in the Dorsal Hippocampus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92, 9697-9701.

NARDI, A.E.; MENDLOWICZ, M.; FIGUEIRA, I.; ANDRADE, Y.; CAMISÃO, C.; MARQUES, C.; KINRYS, G.; COSCARELLI, P.; VERSIANI, M. (1996) Transtorno de Ansiedade Generalizada: Questões Teóricas e Diagnósticas. **J Bras Psiquiatr**, 45(3):173-178.

NOGUEIRA RL (1991) 5-HT Mediation of the Antiaversive Effect of Isamoltane Injected into the Dorsal Periaqueductal Grey. **Behav Pharmacol**. 2(1):73-77.

O'KEEFE J, NADEL L (1978) The Hippocampus as a Cognitive Map. **Oxford University Press**, Sydney

PAVLOV, I. (1927) **Conditioned Reflexes**. New York: Dover.

PHILLIPS RG (1992) Differential Contribution of Amygdala and Hippocampus to Cued and Contextual Fear Conditioning. **Behav Neurosci**. 106(2):274-85.

PHILLIPS RG, LEDOUX JE (1994) Lesions of the Dorsal Hippocampal Formation Interfere with Background but not Foreground Contextual Fear Conditioning. **Learn Mem**. 1(1):34-44.

RESCORLA, R.A., Behavioral Studies of Pavlovian Conditioning. **Annual Review of Neuroscience**, 1988; 11:329-352

RISOLD PY, SWANSON LW (1996) Structural Evidence for Functional Domains in the Rat Hippocampus. **Science**. 272(5267):1484-6.

RUIZ MARTINEZ, MA., LÓPEZ-VIOTA GALLARDO J., DE BENAVIDES MM., DE DIOS GARCÍA LÓPEZ-DURAN J., GALLARDO LARA V.,
Rheological Behavior of Gels and Meloxicam Release. **Int J Pharm.** 2007 Mar 21;333(1-2):17-23. Epub 2006 Sep 30.

SCOVILLE, W.B., AND MILNER, B. (1957). Loss of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry** 20, 11-21

SCHENBERG, L.C., MARÇAL, L.P.A., SEEBERGER, F., BARROS, M.R., SUDRE, E.M.C. L-Type Calcium Channels Selectively Control the Defensive Behaviors Induced by Electrical Stimulation of Dorsal Periaqueductal Gray and Overlying Collicular Layers. **Behav Brain Res** V. 111, pp. 175-85, 2000

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

SIQUEIRA CC, ROSSONI RR, SCHENBERG LC (2009) Dorsal Periaqueductal Gray Matter-Evoked Panic-Like Behaviors are Markedly Inhibited by a Low Peripheral Dose of Thyrotropin Releasing Hormone. **Psychoneuroendocrinology.**

SMALL, W. Notes on the Psychic Development of Young White Rat. **American Journal of Psychology**, 1899; 11:80-100

SOKOLOV, E.N., AND VINOGRADA, O.S. (1975) Neuronal Mechanisms of the Orienting Reflex (**Mahwah, NJ: Erlbaum**).

SQUIRE LR (1992)_Memory and the Hippocampus: A Synthesis from Findings with Rats, Monkeys, and Humans. **Psychol Rev.** 99(2):195-231.

SUDRE, E.C., DE BARROS, M.R., SUDRE, G.N., SCHENBERG, L.C. Thresholds of Electrically Induced Defense Reaction of the Rat: Short-and Long Term Adaptation Mechanisms. **Behavioral Brain Research**, 1993; 20-58(1-2): 141-54

TIMBERLAKE, W., LUCAS, G.A. Behavior System and Learning: From Misbehavior to general Principles. Em: Klein S. E Mowrer R. (Editores). Contemporary Learning Theories: Instrumental Conditioning Theory and the Impact of Biological Constraints on Learning. Hillsdale, NJ: **Erlbaum**, 1989. p.237-275

VARGAS, L.C., MARQUES, T.A., SCHENBERG, L.C. Micturition and Defensive Behaviors are Controlled by Distinct Neural Networks within the Dorsal Periaqueductal Gray and Deep Gray Layer of the Superior Colliculus of the Rat. **Neuroscience Lett**. V. 280, pp. 45-8, 2000.

VARGAS, L.C., SCHENBERG, L.C. Long-term Effects of Clomipramine and Fluoxetine on Dorsal Periaqueductal Gray-Evoked Innate Defensive Behaviours of the Rat. **Psychopharmacology**. V. 155, pp. 260-8, 2001

VIANNA DM, LANDEIRA-FERNANDEZ J, BRANDÃO ML (2001) Dorsolateral and Ventral Regions of the Periaqueductal Gray Matter are Involved in Distinct Types of Fear. **Neurosci Biobehav Rev**. 25(7-8):711-9.

VYAS A, BERNAL S, CHATTARJI S (2003) EFFECTS OF CHRONIC STRESS ON DENDRITIC Arborization in the Central and Extended Amygdala. **Brain Res** 965:290-294

WOOD SC, ANAGNOSTARAS SG. Interdependence of measures in Pavlovian conditioned freezing. **Neurosci Lett**. 2011 Nov 14;505(2):134-9. Epub 2011 Oct 8.