



Carlos Eduardo Barroso Silva

**O envolvimento do córtex pré-frontal medial nos
comportamentos defensivos de ratos submetidos a
estimulação da matéria cinzenta periaquedutal**

Dissertação de Mestrado

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
Fevereiro de 2013



Carlos Eduardo Barroso Silva

**O envolvimento do córtex pré-frontal medial nos
comportamentos defensivos de ratos submetidos a
estimulação da matéria cinzenta periaquedutal**

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 a baixo assinada.

Prof. Jesus Landeira-Fernandez

Orientador

Departamento de Psicologia - PUC-Rio

Prof. Cláudio Carneiro Filgueiras

Departamento de Ciências Fisiológicas - UERJ

Profa. Silvia Soares Maisonette

Instituto Brasileiro de Neuropsicologia e Comportamento

Profa. Denise Berruezo Portinari

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

Rio de Janeiro, 22 de fevereiro de 2013

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

Carlos Eduardo Barroso Silva

Aluno de Mestrado em Psicologia Clínica pela linha Clínica e Neurociências, Departamento de Psicologia PUC-Rio início 03/2011. Graduação: Psicologia – Universidade Estácio de Sá (UNESA) 08/ 2005 - 08/ 2010

Ficha Catalográfica

Silva, Carlos Eduardo Barroso

O envolvimento do córtex pré-frontal medial nos comportamentos defensivos de ratos submetidos a estimulação da matéria cinzenta periaquedutal / Carlos Eduardo Barroso Silva; orientador: Jesus Landeira-Fernandez. – 2012.

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

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

Inclui bibliografia

1. Psicologia – Teses. 2. Ansiedade. 3. Ataque de pânico. 4. Medo condicionado. 5. Córtex pré-frontal. 6. Eletrofisiologia. I. Landeira-Fernandez, Jesus. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Psicologia. III. Título.

CDD: 150

Agradecimentos

Ao professor Landeira, pela oportunidade e confiança depositados em mim para realizar este trabalho, o suporte dado para que eu pudesse continuar, e as chances dadas para que pudesse agregar valor e conhecimento à minha bagagem acadêmica.

À PUC-Rio pelos auxílios e concessões, sem as quais este trabalho não poderi ser realizado.

Ao professor Ferrnando Cardenas por todo o auxílio em um momento crítico para resolver problemas, e a inspiração.

Aos amigos pela ajuda e companhia: Vitor, Galvão, Silvia, Alberto, Flávia, Érica, Carolina Irurita, Samantha, Natascha, Laura León, a todos os alunos de iniciação científica que passaram pelo laboratório em 3 anos, e às professoras Ana Stingel e Norma Franco pelas oportunidades de ensino e aprendizagem.

Resumo

Silva, Carlos Eduardo Barroso; Landeira-Fernandez, Jesus (Orientador). **O Envolvimento do Córtex Pré-Frontal Medial Nos Comportamentos Defensivos de Ratos Submetidos a Estimulação da Matéria Cinzenta Periaquedutal.** Rio de Janeiro, 2013. Dissertação de Mestrado – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Este estudo investiga o envolvimento do córtex pré-frontal medial ventral nos comportamentos de defesa inatos e aprendidos em paradigmas de condicionamento de medo e estimulação elétrica intracraniana em ratos. A lesão cortical aumentou significativamente o comportamento defensivo condicionado. No comportamento defensivo incondicionado, a lesão cortical diminuiu significativamente o congelamento pós-fuga dos animais. Os resultados replicam os dados da literatura científica a respeito do papel do córtex infralímbico como uma estrutura inibitória do estímulo condicionado em um circuito amigdalóide de medo condicionado, e indicam uma participação do córtex pré-frontal na modulação dos comportamentos de defesa originários da estimulação da MCPd, em especial a sustentação do congelamento motor pós fuga.

Palavras-chave

Ansiedade; ataque de pânico; medo condicionado; córtex pré-frontal; MCPd; eletrofisiologia.

Abstract

Silva, Carlos Eduardo Barroso; Landeira-Fernandez, Jesus (Advisor). **The Medial Pre Frontal Cortex Involvement in Defensive Behaviours of Rats After Electrical Stimulation of dPAG**. Rio de Janeiro, 2013. MSc. Dissertation – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

This study investigates the role of the prefrontal cortex in the innate and conditioned defensive behaviors in rats during classical conditioning and intracranial electrical stimulation procedurals. It was found that the cortical lesion augmented the conditioned freezing behavior to contextual fear cues. On the other hand, the lesions impaired the motor freezing presented after the escaping provoked by dPAG stimulation. These results replicate the findings from the literature about a prefrontal cortex role as an inhibitory structure in the aversive classic conditioning circuitry, as well as presenting a role for it in modulating freezing behavior in a panic circuitry involving the dPAG, especially regarding its function as a possible short term memory device for innate fear expression.

Keywords

Anxiety; panic attacks; conditioned fear; pré-frontal córtex; dPAG, electrophysiology.

SUMÁRIO

1. O Ataque e Transtorno do Pânico	13
2. As bases Neurais do Pânico	17
2.1. O Comportamento de Fuga	17
2.2. O Congelamento Motor	18
2.3. O Medo Condicionado	19
2.4. O Envolvimento do Córtex Pré-Frontal	22
3. Objetivos	25
4. Métodos	26
4.1. Sujeitos	26
4.2. Materiais da Cirurgia	26
4.2.1. Procedimento Cirúrgico	27
4.3. Materiais dos Testes Comportamentais	27
4.3.1. Estimulação Elétrica da MCPd	28
4.3.2. Aquisição e Expressão do Medo ao Contexto	29
4.4. Histologia	30
4.4.1. Materiais dos Procedimentos Histológicos	30
4.4.2. Análises Histológicas	30
5. Resultados	34
5.1. Estimulação Elétrica da MCPd	34
5.1.2. Limiares Elétricos de Congelamento e Fuga	34
5.1.3. Congelamento Pós Estimulação	35

5.2. Procedimento de Condicionamento	
Clássico ao Contexto	36
5.2.1. Congelamento Motor Imediatamente	
Após o Choque nas Patas	36
5.2.2. Congelamento por Condicionamento	
Contextual, 24 Horas Depois	37
6. Discussão	38
6.1. A Estimulação Elétrica da MCPd	38
6.2. O Condicionamento ao Medo Contextual	41
7. Referências	42

Lista de Figura

Figura 1 — Projeções da Matéria Cinzenta para o Córtex Frontal	24
Figura 2 — Exemplo de Lesão Eletrolítica	31
Figura 3 — Montagem das Extensões das Lesões	32
Figura 4 — Exemplo Histológico de implantação do Eletrodo	33
Figura 5 — Circuitos Frontais Envolvidos na Expressão do Medo	41

Lista de Tabelas

Tabela 1 — Critérios diagnósticos e sintomas para ataque de pânico	14
Tabela 2 — Critérios diagnósticos e sintomas para transtorno do pânico	16
Tabela 3 — Critérios para ataque de pânico de acordo com o DSM-IV	21
Tabela 4 — Reações comportamentais e autonômicas da estimulação da MCPd em ratos e humanos	40

Lista de Gráficos

Gráfico 1 — Resultados da estimulação elétrica nos comportamentos de congelamento e fuga	34
Gráfico 2 — Resultado do congelamento pós estimulação da MCPd	35
Gráfico 3 — Resultado do congelamento pós choque	36
Gráfico 4 — Resultado do congelamento ao contexto 24 horas após o choque	37

Lista de Abreviações

DSM-IV-TR — Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 4º Edição

NS — Estímulo Neutro

US — Estímulo incondicionado

CS — Estímulo Condicionado

MCP — Matéria Cinzenta Periaquedutal

MCPd — Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal

MCPv — Matéria Cinzenta Periaquedutal Ventral

CPF — Córtex Pré-Frontal

CPFmd — Córtex Pré-Frontal Medial Dorsal

CPFmv — Córtex Pré-Frontal Medial Ventral

PrL — Córtex Pré Límbico

IL — Córtex Infralímbico

BLA — Núcleo Basolateral da Amígdala

NCm — Núcleo Central Medial da Amígdala

NCI — Núcleo Central Lateral da Amígdala

HPCv — Hipocampo Ventral

“I love deadlines. I love the whooshing noise they make as they go by.”
— Douglas Adams

O Ataque e Transtorno do Pânico

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 4ª Edição Texto Revisado (DSM IV-TR, 2000), ataques de pânico são episódios em que um indivíduo se sente submetido a sensações de extremo desconforto, medo e perigo iminente, com o processo se iniciando de forma súbita e podendo ser provocado tanto por um elemento conhecido como também podendo ser deflagrado sem nenhuma causa identificável.

Alcançando o seu pico em 10 minutos, o DSM-IV reconhece que 13 sintomas cognitivos e somáticos acompanham o ataque, como por exemplo aceleração de batimentos cardíacos, aumento da pressão arterial, tremores, sentimentos de não realidade, e medo de perda de controle (tabela 1).

Apesar de se apresentar condicionada a fatores culturais e sociais, um estudo global da Organização Mundial de Saúde indicou que transtornos do pânico são responsáveis por uma diminuição do índice de esperança de vida corrigida pela incapacidade (EVCI) na mesma ordem que doenças isquêmicas do coração (Ayuso-Mateos, 2002).

O transtorno de pânico é caracterizado essencialmente pela ocorrência de repetidos ataques de pânico, concomitantes com a ocorrência por pelo menos um mês de persistente preocupação com um possível novo ataque ou as consequências daqueles já ocorridos (DSM IV-TR, 2000). Uma lista dos sintomas está relacionado na tabela 2.

Dada a natureza de suas características, o transtorno do pânico pode ter consequências extremamente desabilitantes para as pessoas atingidas por ele, afetando profundamente a capacidade de um indivíduo funcionar corretamente em suas relações pessoais e sociais.

Um dos desdobramentos do transtorno do pânico é o desenvolvimento de agorafobia em sujeitos diagnosticados com o distúrbio. A agorafobia é a aversão de se expor a lugares públicos e abertos, justificado pelo medo da incapacidade de fuga local ou medo de se sentir exposto a pessoas estranhas no eventual caso da ocorrência de um ataque espontâneo de pânico.

Critérios Diagnósticos e Sintomas para Ataques de Pânico, segundo o DSM-IV

Um período de intenso medo ou desconforto, no qual quatro ou mais dos seguintes sintomas se desenvolvem abruptamente e alcançam um pico em 10 minutos:

- 1. Palpitações ou batimentos cardíacos acelerados**
- 2. Sudorese**
- 3. Tremores**
- 4. Sensações de falta de ar ou respiração curta**
- 5. Sensação de sufocamento**
- 6. Dor ou desconforto na região torácica**
- 7. Náusea ou mal estar abdominal**
- 8. Sensação de tontura, desequilíbrio ou desmaio eminente**
- 9. Desrealização (sensações de irrealidade) ou despersonalização (sensação de não estar conectado a si mesmo)**
- 10. Medo de perder o controle ou surtar**
- 11. Medo de morrer**
- 12. Parestesia (sensações de formigamento ou dormência)**
- 13. Calafrios ou ondas de calor**

Tabela 1: Sintomas diagnósticos para ataque do pânico. Adaptado do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 4ª Edição

Ainda segundo dados do DSM, estudos epidemiológicos de escalas globais indicam que a prevalência do Transtorno de Pânico (com ou sem agorafobia) é de 1,5% a 3,5% durante a vida de uma pessoa.

Em dados de populações específicas, que se encontram em situações de risco potencial, como veteranos de combate, refugiados de guerra e vítimas da violência urbana, a prevalência de quadros relacionados ao pânico é ainda maior, podendo chegar a 60% nas amostras pesquisadas (Hinton et al., 2000; Breslau et al., 1998, Fukuda et al., 1998). Altas correlações também são encontradas na literatura entre traumas familiares sofridos durante a juventude e diagnósticos de transtornos do pânico na vida adulta (Perkonigg et al, 2003), pacientes submetidos a tratamento médico intensivo (Cuthbertson et al., 2004), assim como índices de diagnóstico de 25% a 75% em sobreviventes de tragédias de origem natural ou causadas pelo homem (Galea et al., 2005; Neria et al., 2009).

Dada a natureza debilitante dos casos de transtorno do pânico e sua prevalência na população mundial e em populações expostas a situações de risco, um melhor entendimento das bases neurais envolvidas nesses processos é extremamente importante afim de uma melhor compreensão sobre esta disfunção, possíveis prevenções e tratamentos.

Critérios Diagnósticos e Sintomas para Transtorno do Pânico, DSM-IV

- 1. Recorrentes ataques de pânico não esperados**
- 2. Pelo menos um dos ataques foi procedido por 1 mês (ou mais) dos seguintes:**
 - Preocupação persistente em ter outro ataque**
 - Preocupação a respeito das implicações ou consequências do ataque**
 - Mudança significativa de comportamento por conta dos ataques**
- 3. Os ataques de pânico não são diretamente causados por efeitos fisiológicos ou medicação**
- 4. Os ataques de pânico não são explicados por outras disordens mentais, como fobia social, transtorno obsessivo-compulsivo ou transtorno do stress pós-traumático**

Tabela 2: Sintomas diagnósticos para o transtorno do pânico. Adaptado do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 4ª Edição

2

As bases neurais do Pânico

2.1.

O Comportamento de Fuga

Desde estudos de Hunsperger nas décadas de 50 e 60, sabe-se que a matéria cinzenta periaqueductal (MCP) possui um forte envolvimento com a deflagração de comportamentos panicolíticos tanto em animais quanto em humanos (Vianna e Brandão, 2003).

Pacientes conscientes, submetidos a estimulação elétrica da MCP em estudos exploratórios (Nashold, 1969; Amano et al, 1969), relatam sensações subjetivas de medo e perigo iminente, similares aos relatados por pacientes clínicos em relação a ataques espontâneos de pânico. De forma análoga, ratos e camundongos que sofrem estimulação da MCP em contextos experimentais apresentam comportamentos singulares (Graeff et al, 1986; Schenberg, 1983), como uma forte atividade motora de corrida e pulos, antecidos e seguidos por momentos de imobilidade física.

Etologicamente, segundo uma hipótese proposta por Robert e Caroline Blanchard, existem muitas similaridades entre os comportamentos singulares de fuga sob estimulação da MCP e a fuga causada por um estímulo proximal nocivo ou ansioso ao animal, como a exposição a um predador (Blanchard et al, 1986). A partir dos resultados deste estudo, foi conceitualizado que os comportamentos de defesa animal se apresentam em três níveis distintos de intensidade de acordo com a natureza e apresentação do estímulo aversivo.

Em um primeiro nível em que o animal se encontra em um ambiente no qual um encontro prévio com um predador foi estabelecido, porém a ameaça real não está mais presente, o comportamento apresentado é o de exploração ponderada, provavelmente com fins de avaliação de risco. Em um segundo nível, em que a ameaça é real e presente, porém situada em uma distância segura da presa, o comportamento predominante é o do congelamento motor, com o objetivo de preservação e evitação de um possível ataque. Finalmente, no momento de uma aproximação física ou contato com o predador, a presa executa vigorosos comportamentos de fuga, como corridas, pulos e vocalizações.

A ideia central desta comparação é apontar uma possível equivalência direta entre o comportamento defensivo de animais e o ataque de pânico em humanos, onde o distúrbio possa ser interpretado como um contínuo evolutivo do comportamento animal, porém se manifestando de forma desadaptativa e disfuncional.

Em um experimento com humanos (Mobbs et al., 2007), o paradigma de diferentes organizações do medo foi empregado em uma tarefa simulada de fuga de um predador capaz de capturar e causar dor. A partir de resultados obtidos a partir de neuroimagem, o estudo aponta para uma semelhança nos papéis das estruturas envolvidas nos comportamentos de fuga em humanos e outros mamíferos.

2.2.

O Congelamento Motor

O congelamento motor é compreendido como a total ausência de movimento em animais, a não ser aqueles necessários para a respiração, quando confrontados com estímulos aversivos ou a presença tanto direta quanto indireta de predadores, sem a possibilidade de fuga (Fanselow, 1984).

Manipulações farmacológicas, assim como estudos neuroanatômicos (Lang et al, 2000), apontam a similaridade entre o comportamento de congelamento e o fenômeno da ansiedade em humanos: a administração de drogas ansiolíticas em ratos reduz drasticamente o congelamento apresentado frente a um estímulo nocivo inato ou condicionado, similar ao efeito clínico que a droga possui em reduzir sintomas negativos de pacientes que sofrem de transtornos da ansiedade.

Apoiando-se na maior capacidade observacional do uso de animais em situações experimentais, diferentes padrões comportamentais associados à estimulação elétrica da MCPd foram identificados. Segundo uma revisão realizada por Brandão et al. (2008), o congelamento provocado pelo medo condicionado possui como substrato a porção ventral da matéria cinzenta (MCPv), uma vez que injeções de midazolam nesta região provocam a cessão do congelamento por estimulação da área, porém não afetam as respostas ao medo inato no teste do labirinto em cruz elevado, ao ponto em que animais com lesões da MCPv diminuem significativamente suas respostas de medo condicionado ao contexto.

Ainda segundo os autores, projeções da amígdala para a MCPv parecem compor o circuito do congelamento motor ao medo contextual.

A porção dorsal da MCP (MCPd) parece estar muito mais relacionada ao componente afetivo do comportamento de medo, ao contrário da simples expressão motora dele assumida pela MCPv, que parece subservir a ativação do complexo amigdalóide. A estimulação elétrica gradual da MCPd em ratos provoca uma série de comportamentos, se iniciando com um aumento da vigília do animal, seguido por um estado de alerta, congelamento, e finalmente uma explosão motora caracterizada por corrida e pulos vigorosos. Após a cessão da corrente o animal interrompe o comportamento de fuga, e inicia um processo de congelamento motor duradouro. Este padrão se distingue da estimulação elétrica da MCPv, que apesar de similar em todas as etapas, se diferencia em seu último momento, onde o animal retorna ao comportamento exploratório normal assumido antes do início da administração da corrente.

Essas evidências eletrofisiológicas de que a MCPd possa ser um substrato essencial no entendimento do pânico e transtorno do pânico em humanos encontram suporte em observações etológicas, onde o acervo comportamental de defesa que um animal apresenta face ao predador parece ser similar aos comportamentos apresentados durante a estimulação elétrica da MCPd, ou seja, a deflagração de movimentos rápidos de fuga e congelamento pré e pós ataque físico

2.3.

O Medo Condicionado

Oposto ao congelamento pós-fuga causado pela estimulação da MCPd, o congelamento causado por um estímulo aversivo é facilmente aprendido e expressado por um animal dias após a aquisição.

Este processo de aprendizado é conhecido desde os trabalhos seminais de Pavlov (1941), e tem sido replicado em uma pluralidade de organismos desde moluscos terrestres e gastrópodes marinhos, até primatas superiores como humanos (Whelan e McCrohan, 1996; Dickinson e Mackintosh, 1978).

Respostas de medo condicionado podem ser obtidas ao se parear um estímulo neutro (NS), como um sinal sonoro, a um estímulo incondicionado, como um choque elétrico nas patas do animal ou a exibição de predador.

As respostas subsequentes ao estímulo uma vez neutro, e agora chamado de estímulo condicionado (CS), é duradoura e resistente ao tempo. Um processo de aprendizagem secundário, onde o CS é repetidamente exibido ao animal à medida em que a resposta condicionada é diminuída gradualmente aos níveis pré-aquisição, é conhecido como extinção.

O processo de extinção é dependente de diversas regiões corticais e subcorticais, algumas envolvidas também na aquisição e expressão do medo. O núcleo amigdalóide, por exemplo, é necessário para a extinção do medo (Milad et al. 2006; Myers e Davis 2007; Laurent et al, 2008) ao mesmo tempo em que é necessário para a aquisição e expressão dele.

A extinção do medo envolve não só a capacidade do organismo diminuir regularmente a sua resposta de medo ao CS em curto prazo, mas também a habilidade de lembrar este processo em futuros encontros com o CS e estabelecer uma resposta cumulativamente baixa a cada futura, dando ao processo de extinção uma caracterização de aprendizagem de longo prazo.

Sabe-se que neurônios do córtex pré-frontal medial (CPFm) são ativados durante a exibição do CS após aquisição do medo e durante a extinção (Milad e Quirk, 2002). O papel definido das diferentes regiões do CPFm que contribuem para a aquisição, expressão e extinção do medo, entretanto, nunca foi claramente esclarecido, com trabalhos alcançando resultados contraditórios na literatura (para um resumo, ver Sierra-Mercado et al, 2010).

Por meios comparativos baseando-se em evidências anatômicas, farmacológicas e neuropsicológicas (através de estudos de lesão), uma vasta literatura comparativa estabelece que modelos animais de medo condicionado são uma importante ferramenta usada para compreender os transtornos de ansiedade em humanos (para uma revisão, ver Brandão et al, 2007).

“Transtorno de ansiedade” é um termo amplo utilizado para abranger os diferentes quadros que possuem sintomas de ansiedade como ponto central classificatório. Entre eles, podemos citar fobias sociais, transtorno do estresse pós traumático ou o transtorno obsessivo-compulsivo. Como referencia, uma lista dos sintomas do transtorno de ansiedade generalizada é apresentada na tabela 3.

Crêterios Diagnósticos e Sintomas para a Ansiedade Generalizada, DSM-IV

1. Excessiva ansiedade ou preocupa o, ocorrendo na maioria dos dias, por um período de 6 meses, com diversos acontecimentos como performance na escola ou no trabalho

2. A pessoa tem dificuldade em controlar a ansiedade

3. A ansiedade ou preocupa o está associada a três ou mais dos seguintes sintomas (por um período de 6 meses):

- a) agita o ou sensa o de tensão**
- b) fadiga excessiva**
- c) dificuldade de concentra o**
- d) irritabilidade**
- e) tensão muscular**
- f) distúrbios do sono**

4. Sintomas causam prejuízos significantes na vida da pessoa

5. Os sintomas não são causados pelo uso de substâncias, drogas ou não ocorre concomitantemente a transtornos do humor ou disordens psicóticas

Tabela 3: Sintomas diagnósticos para o transtorno da ansiedade generalizada. Adaptado do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 4  Edi o

2.4.

O Envolvimento do Córtex Pré-Frontal Medial

O CPFm possui um papel muito bem estabelecido de processamento emocional, em especial dos aspectos temporais e cognitivos do medo (Morgan, ET. AL, 1993).

De fato, o CPFm possui conexões aferentes e eferentes tanto com a MCPv quanto com a MCPd, e o consentimento parece ser de que as porções dorsais deste córtex (CPFmd) – englobando o córtex anterior cingulado e a porção dorsal do córtex pré límbico – estão mais envolvidas nos aspectos cognitivos do congelamento motor em animais e ansiedade em humanos, ao passo em que o córtex pré-frontal medial ventral (CPFmv) – constituído pelo córtex pré límbico ventral e o córtex infralímbico – parece estar mais envolvido no aspecto afetivo destes circuitos emocionais (Bush, 2000; Etkin et al, 2006).

A organização anatômica parece ser similar em roedores. No rato, a MCP projeta amplamente para regiões corticais frontais; entretanto, ela parece possuir um número maior de enervações no CPFm do que em outras regiões (Floyd et al, 2000).

Ainda assim, o papel do CPFm nos circuitos de medo condicionado sempre foi controverso, onde estudos apontavam tanto uma diminuição quanto um aumento do congelamento motor provocado por estímulos condicionados (Divac et al, 1984; Fryszak e Neafsey, 1991; Holson, 1986; Kolb, 1974; para uma revisão no tema, ver Morgan et al, 1993). Porém, Sierra-Mercado e colaboradores (2011) apresentaram uma possível solução para este impasse, ao demonstrar que inativações restritas a subregiões do CPFm, preservando ao máximo divisões anatômicas vizinhas, eram capazes de separar mais claramente o papel específico de cada estrutura.

Segundo os achados deste estudo, injeções de muscimol (um agonista de receptores GABA_A) no córtex infralímbico, era capaz de aumentar a resposta de congelamento condicionado de ratos após a exposição a um estímulo sonoro previamente pareado a um choque. Paradoxalmente, a mesma inativação do córtex pré-límbico provocava uma diminuição expressiva do medo condicionado, comparado a níveis de intervenções no núcleo basolateral da amígdala.

Tais noções a respeito das funções do CPFm também são corroboradas pela natureza de suas conexões com estruturas profundamente límbicas. Estudos

de enervação axonal indicam que o IL e PrL são mais fortemente conectados à MCP do que outras regiões corticais. Enquanto a MCPv projeta tanto para estruturas mediais e orbitais, a MCPd projeta mais exclusivamente às regiões do CPFm, mais especificamente o IL e PrL. Um resumo das projeções da eferentes da MCP em direção ao córtex estão resumidas na tabela 4.

A organização neuroanatômica dessas regiões parece ser análoga em humanos. Em uma meta-análise de diversos estudos de neuroimagem funcional, Kober et al. (2008) distinguem funcionalmente as porções ventrais e dorsais do CPFm, afirmando entretanto que enquanto aspectos mais cognitivos parecem ser mediados quase que exclusivamente pelo CPFmd, funções afetivas parecem se apresentar num padrão muito mais difuso e dividido entre as duas estruturas. Estes dados, entretanto, devem ser examinados com precaução em contextos comparativos, dado as irregularidades experimentais em se obter um sinal consistente de certas estruturas; conforme apontado por Etkin (2009), o fato dessas regiões possuírem uma menor ativação em análises de ressonância com pacientes pode ser explicado por complicações técnicas como ruído ou perda de sinal gerados por artefatos de suscetibilidade magnética ou por uma seletividade de estímulos, onde o CPFmv só seja ativado na necessidade da modulação de aspectos específicos da emoção. Apesar das incompatibilidades técnicas e a necessidade de uma investigação mais profunda e concisa sobre as bases comparativas entre espécies, parece existir uma correlação bem clara entre as estruturas em humanos e outras espécies não-primatas.

Desta forma, o envolvimento do CPFm na sustentação do medo deflagrado por estímulos condicionados e incondicionados parece estar sendo mediado por um processo mnemônico de curto prazo, fato ainda mais ressaltado pelo conhecido papel desta região nas funções de memória de curto prazo.

Vianna e Brandão (2003) hipotetizaram que regiões corticais frontais como o CPFm e o córtex cingulado anterior estariam envolvidas no congelamento motor deflagrado após a estimulação elétrica da MCPd a partir destas funções de memória de curto prazo.

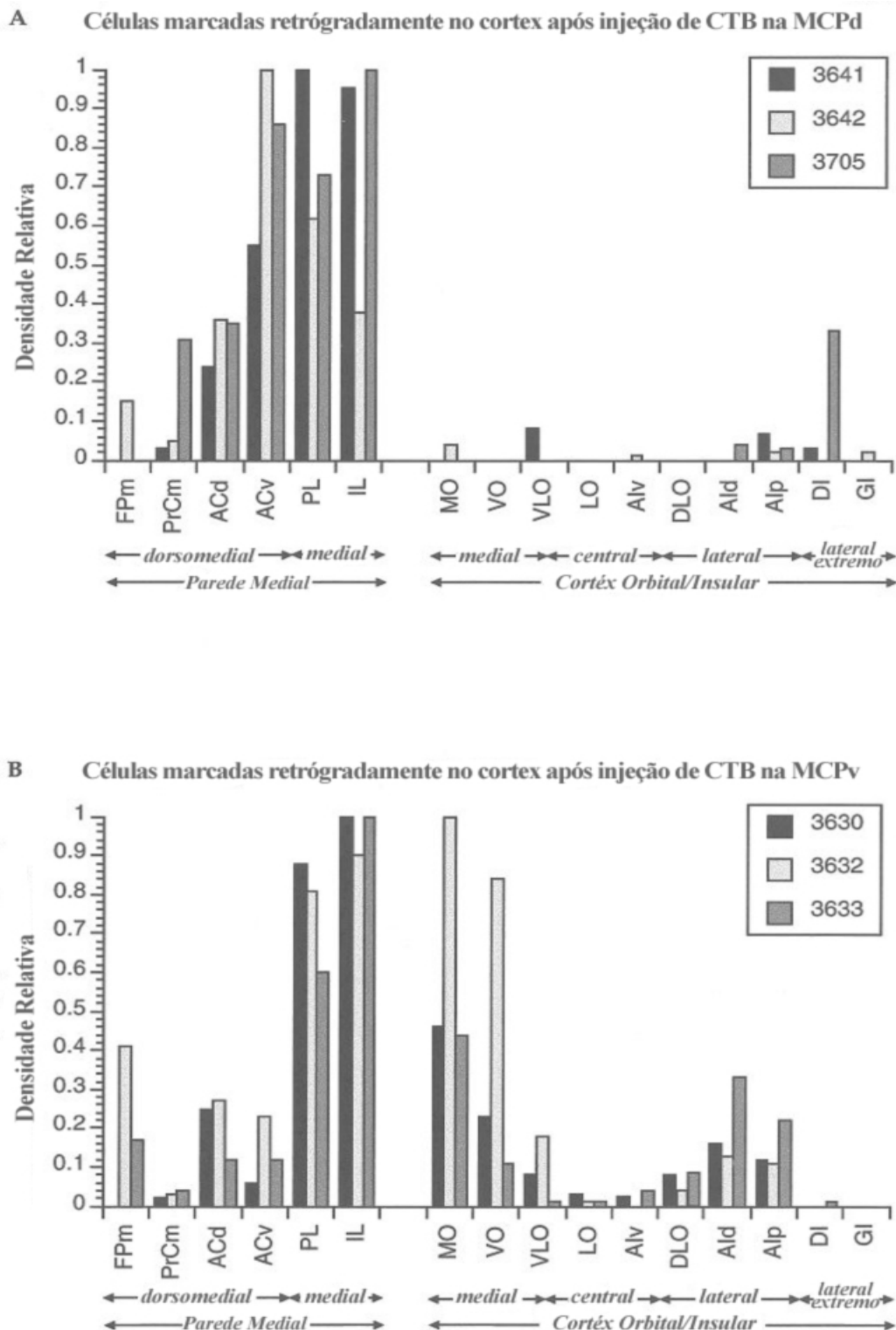


Figura 1: volume de células marcadas retrógradamente através de injeção de CTB na MCP em 6 diferentes estudos de casos. Apesar da MCPv se conectar a uma variedade maior de estruturas em diferentes regiões corticais, ela possui consideráveis conexões eferentes com o córtex infralímbico. Já a MCPd concentra suas projeções exclusivamente na região medial do córtex pré-frontal, em especial o IL e PrL. Também é possível perceber projeções para o córtex anterior cingulado ventral (ACv). Adaptado de Floyd et al, 2000.

3

Objetivos

Com base nos pressupostos teóricos descritos acima, o objetivo deste trabalho foi investigar o envolvimento do CPFm no circuito do pânico e medo condicionado em ratos Wistar, utilizando técnicas eletrofisiológicas, lesões eletrolíticas e análise do comportamento.

Em uma primeira etapa, os animais foram submetidos a uma cirurgia para a destruição seletiva do CPFm (mais especificamente do IL) e implantação de uma cânula guia direcionada à MCPd – animais controle receberam o mesmo tratamento, porém nenhuma corrente foi passada pelo eletrodo, preservando as regiões corticais estudadas.

Após uma semana de recuperação, os animais foram colocados em uma caixa de observação comportamental, e receberam uma corrente elétrica de intensidade crescente administrada através de um eletrodo alojado na MCPd, até que o comportamento de fuga tenha sido apresentado. Neste momento, as correntes utilizadas para se deflagrar o congelamento pré fuga e a fuga em si são registradas, e durante os próximos 11 minutos um observador treinado analisou o comportamento do animal para ocorrências de congelamento motor. Todo o procedimento é explicado em detalhes na próxima sessão.

4

Métodos

4.1.

Sujeitos

Os sujeitos usados nessa pesquisa foram ratos machos Wistar, com peso médio de 280g. Os animais foram acomodados em caixas-viveiro com medidas de 18 x 31 x 38 cm, com acesso a água e comida *ad libitum*, e mantidos em um biotério durante todo o momento, com temperatura controlada de 24°C (+/- 1°C). Um ciclo constante de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão foi mantido (07:00-19:00) e os experimentos comportamentais foram realizados durante a fase escura. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo comitê de ética da universidade PUC-Rio e seguiram as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento.

4.2.

Materiais da Cirurgia

Para o procedimento cirúrgico, foi empregado um quadro estereotáxico (Kopf Instruments, California) e o atlas estereotáxico The RatBrain in StereotaxicCoordinates (Paxinos e Watson, 1997). Eletrodos monopolares teflonados (PlasticsOne, Virginia, EUA) foram utilizados para a realização das lesões eletrolíticas assim como para a estimulação elétrica. Cânulas guias de 12mm de comprimento foram fabricadas no laboratório utilizando agulhas hipodérmicas (25mm/0,6 BD, Estados Unidos), e os eletrodos foram ajustados para que se estendessem por 1mm para fora dela após serem encaixadas em posição. Um lesionador e estimulador elétrico modelo EL-0502 (Insight Equipamentos, Ribeirão Preto) foi empregado durante a cirurgia e o teste comportamental.

4.2.1.

Procedimento Cirúrgico

Os animais submetidos ao procedimento cirúrgico foram anestesiados com uma combinação de cloridato de cetamina e xilazina (.16cc e .04cc por 100g de peso, respectivamente) e verificados para certificação de um estado adequado de analgesia e sedação para plano cirúrgico. Em seguida, o animal era afixado em um estereotáxico, com o crânio posicionado horizontalmente de forma que Bregma e Lambda se mantivessem no mesmo plano dorso-ventral. Uma injeção subcutânea de cloridato de lidocaína (.30cc) foi administrada acima do crânio a fim de assegurar analgesia local. Após exposição do crânio, as coordenadas a partir de Bregma de AP 3,2mm, ML 0,6mm e -0,6mm, DV -5,0mm foram seguidas para lesões eletrolíticas bilaterais do córtex infralímbico, e Bregma de AP 3,2mm, ML 0,6mm e -0,6mm, DV -3,0mm para lesões do córtex pré-límbico (ambos com corrente de 0.5 mA e duração de 20 segundos). Em seguida, uma cânula guia foi posicionada em direção a MCPd nas coordenadas a partir de Bregma de AP -6.7mm, ML 0,0mm DV -3,8mm, e fixada em posição com a ajuda de uma resina acrílica e o uso de um mini parafuso preso ao crânio pelo furo utilizado para a lesão anterior. Um falso eletrodo das mesmas dimensões da cânula foi alojado dentro dela com o propósito de proteger o tubo de contaminações e obstruções, e removido no dia do experimento.

4.3.

Materiais dos Testes Comportamentais

Para ambos os procedimentos comportamentais (avaliação do comportamento de fuga e condicionamento clássico) o mesmo ambiente experimental foi utilizado. Os animais eram acomodados em caixas de avaliação comportamental medindo 25 x 20 x 20 cm (Insight, Ribeirão Preto). As caixas possuíam paredes traseiras compostas de acrílico transparente, o que possibilitava a observação remota dos animais através de uma câmera digital capaz de gravar imagens em situações de baixa luz. Estas caixas, por sua vez, eram acomodadas dentro de caixas maiores que isolam o ruído externo, e são equipadas com ventiladores para circulação do ar e a geração de um ruído branco de fundo de aproximadamente 78dB. Uma luz vermelha de 25W provia iluminação com o mínimo necessário de incomodo ao animal. A temperatura ambiente do local foi

mantida em 24°C durante os experimentos e no intervalo das análises dos animais a caixa era limpa para remoção de excrementos e aplicação de uma solução de hidróxido de amônia 5%, mantendo um ambiente neutro para todos os sujeitos no experimento.

Estas mesmas caixas de análise possuíam o chão composto por 18 barras de metal, espaçadas 1,4 mm umas das outras. Estas barras estavam ligadas a um circuito eletrônico na parte traseira da caixa, que é capaz de administrar uma corrente elétrica aos animais. Esta corrente se originava de geradores (Insight, Ribeirão Preto) localizados fora do ambiente de análise do comportamento. A administração dos choques foi utilizada no procedimento de condicionamento, não tendo participação na avaliação do comportamento de fuga.

4.3.1.

Estimulação Elétrica da MCPd

Sete dias após o procedimento cirúrgico os animais eram acomodados em grupos de 3 com livre acesso a água e comida. Durante este período os sujeitos eram monitorados para certificação da ausência de dor pós-cirúrgica ou outros incômodos, seguindo as recomendações do manual de uso de animais em pesquisa da Academia Nacional de Ciências Americana (Institute for Laboratory Animal Research 2009). Do total de animais utilizados, somente 2 sujeitos não resistiram ao procedimento cirúrgico, e todos os outros se recuperaram sem indício de dor, mantendo padrões normais de movimentação, alimentação, higiene, e sem apresentar sinais de incomodo ou de desconforto ao serem estimulados fisicamente na região em que a cirurgia foi realizada, indicando o bem-estar geral do animal.

Após este período de recuperação, os animais estavam prontos para o procedimento experimental, que foi realizado no ciclo claro em que eram alojados. Os animais eram acomodados na caixa de análise comportamental, com um eletrodo removível alojado dentro da cânula implantada cirurgicamente; este eletrodo era isolado ao longo de seu comprimento, com exceção da ponta que se inseria na MCPd.

Uma corrente era passada através do eletrodo a partir de um gerador, com corrente inicial de 5 microA, sendo gradualmente aumentada na proporção de 5 microA a cada tentativa. O limiar de congelamento era registrado a partir da

menor corrente necessária para causar a cessão dos movimentos do animal, com o início de um período de congelamento motor, hipervigilância e estado de alerta, seguido por exoftalmia e piloereção (Brandão et. Al, 2008). A administração da corrente elétrica continuava de forma crescente até o momento em que o rato apresentava o comportamento de fuga, caracterizado de forma muito evidente por uma explosão motora composta de corridas e pulos vigorosos. A corrente utilizada para gerar este comportamento era registrada como o limiar mínimo de fuga.

Após este momento, toda estimulação era cessada, e por 11 minutos o animal foi avaliado em relação ao congelamento motor. A cada 2 segundos um observador treinado analisava o comportamento do sujeito, que poderia ser registrado como movimento ou congelamento – que era constituído pela total ausência de movimento, a não ser aqueles necessários para a respiração.

Com o fim da sessão experimental o animal era retornado à sua caixa viveiro, sob as mesmas condições anteriores.

4.3.2.

Aquisição e expressão do medo ao contexto

24 horas após a estimulação elétrica da MCPd os animais retornavam ao mesmo contexto experimental descrito na etapa anterior. Desta vez, entretanto, quatro animais eram testados simultaneamente. Após 8 minutos de um processo de habituação, onde os ratos exploravam livremente a caixa e tinham seu comportamento registrado, três choques de 0.6 microA eram administrados através das barras de metal no chão, com intervalos de 20 segundos entre eles. Logo em seguida o comportamento dos animais para congelamento foi registrado a cada 4 segundos para cada animal durante 3 minutos. Ao fim do processo os animais retornavam às caixas viveiro sob as mesmas condições anteriores.

24 horas depois os animais retornavam às caixas de análise. Neste momento, porém, nenhum choque ou outro estímulo era administrado, e durante 8 minutos o comportamento dos animais era registrado para a resposta de congelamento condicionada ao contexto.

Em todas as etapas o observador encarregado de avaliar e registrar o comportamento dos animais não era informado a respeito de qual grupo cada sujeito fazia parte, evitando erros de inferência e tendências observacionais.

4.4.

4.4.1.

Materiais dos procedimentos histológicos

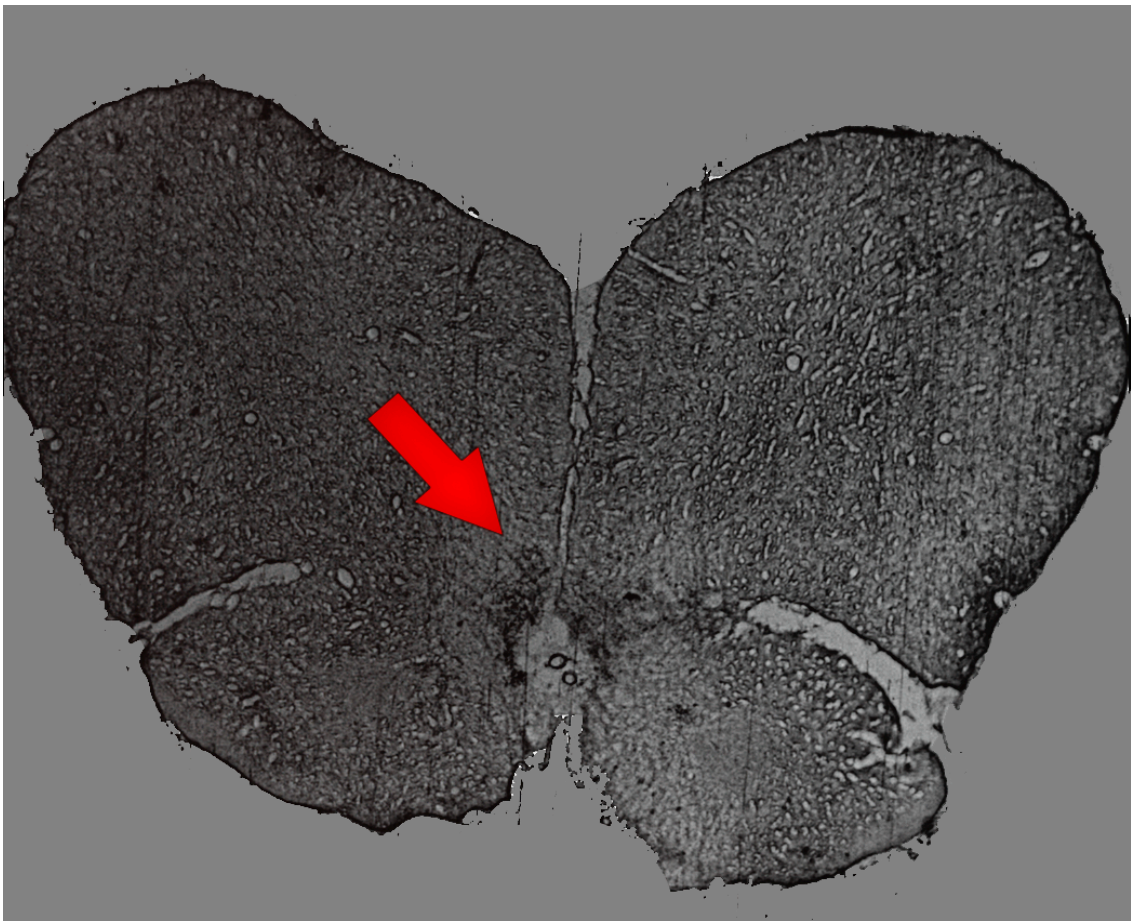
Para a perfusão dos animais, foi utilizada uma bomba dosadora peristáltica (Milan, São Paulo). Para a secção dos cérebros, um Crio-Micrótomo Leica (CM1850UV, Leica, Alemanha) e crio-solução de congelamento (O.C.T. Tissue-Tek, Sakura, Japão) foram utilizadas, e os cortes alocados em lâminas histológicas (25,4 x 76,2mm, Bioslide). A localização das lesões foi verificada com um microscópio Leica (DM2500, Alemanha) e o Rat Brain Atlas (6ª Edição, Paxinos e Watson, 2007).

4.4.2.

Análises histológicas

Ao fim dos testes comportamentais descritos acima os animais eram sacrificados com uma solução de hidrato de cloral, e passavam por um processo de perfusão intracardíaca, onde uma sequência de 100 ml de solução salina (0,9%), 100 ml de formalina (10%) e 50 ml de sacarose (10%) era bombeada pelo corpo do animal com o auxílio de uma bomba peristáltica. Em seguida o cérebro era removido da caixa craniana e armazenado em uma solução de formalina e sacarose a 10°C por 48 horas.

Para a histologia, o cérebro foi submerso em uma crio-solução de O.C.T e congelado a -20°C em um crio-micrótomo. Cortes de 30µm eram realizados na região do córtex frontal e da matéria cinzenta para averiguação do posicionamento adequado da lesão e da cânula guia, respectivamente. O Atlas de Coordenadas Histológicas foi utilizado como referência. A figura 2 indica os locais da lesão, e os animais cujas lesões ultrapassavam as áreas circunscritas eram eliminados da análise estatística. A figura 3 indica a região da MCPd onde a cânula foi implantada verticalmente.



Figuras 2: Exemplos de secção coronal, em torno de Bregma 3.2mm, onde a lesão eletrolítica é visível na região correspondente ao IL e ao PrL.

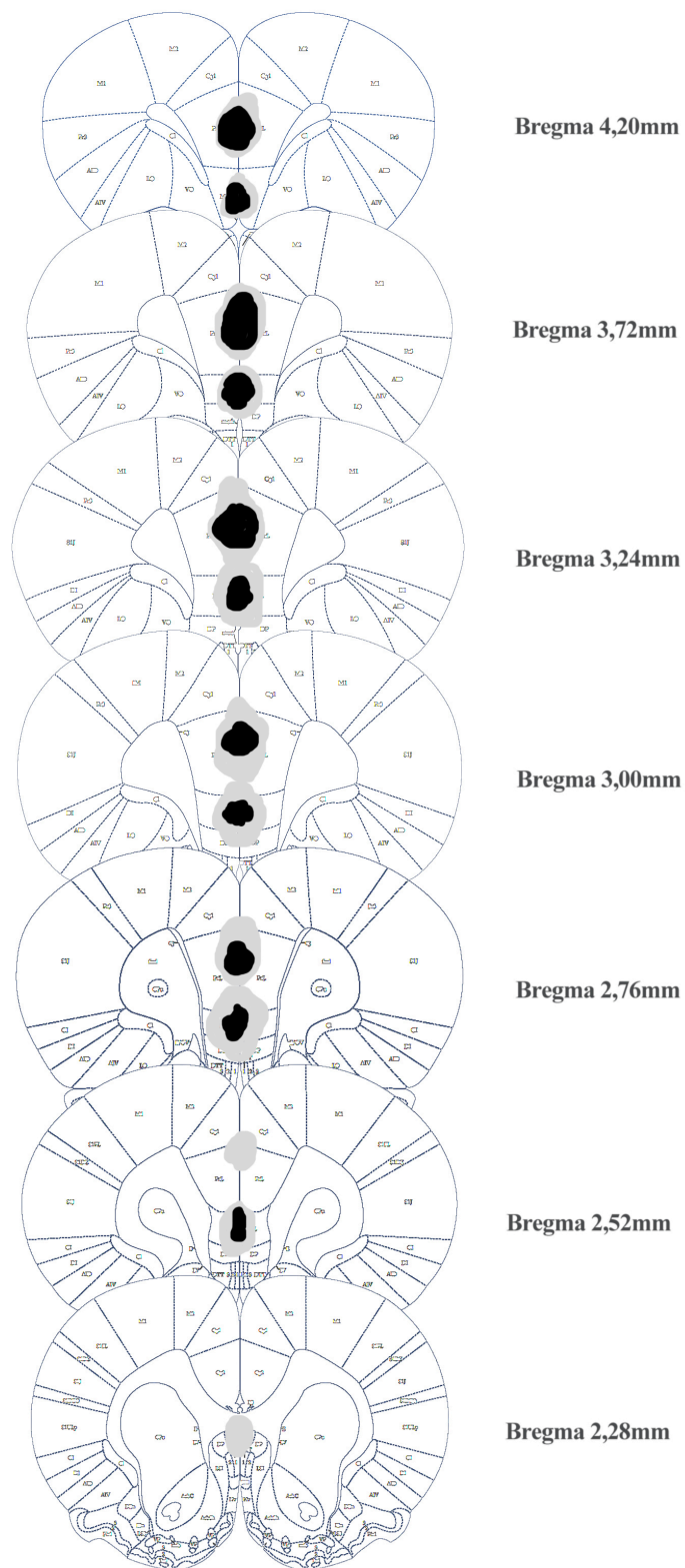


Figura 3: Montagem indicando a amplitude das lesões em IL e PrL. Indicado em cinza, o tamanho máximo das lesões; em preto, a menor extensão.

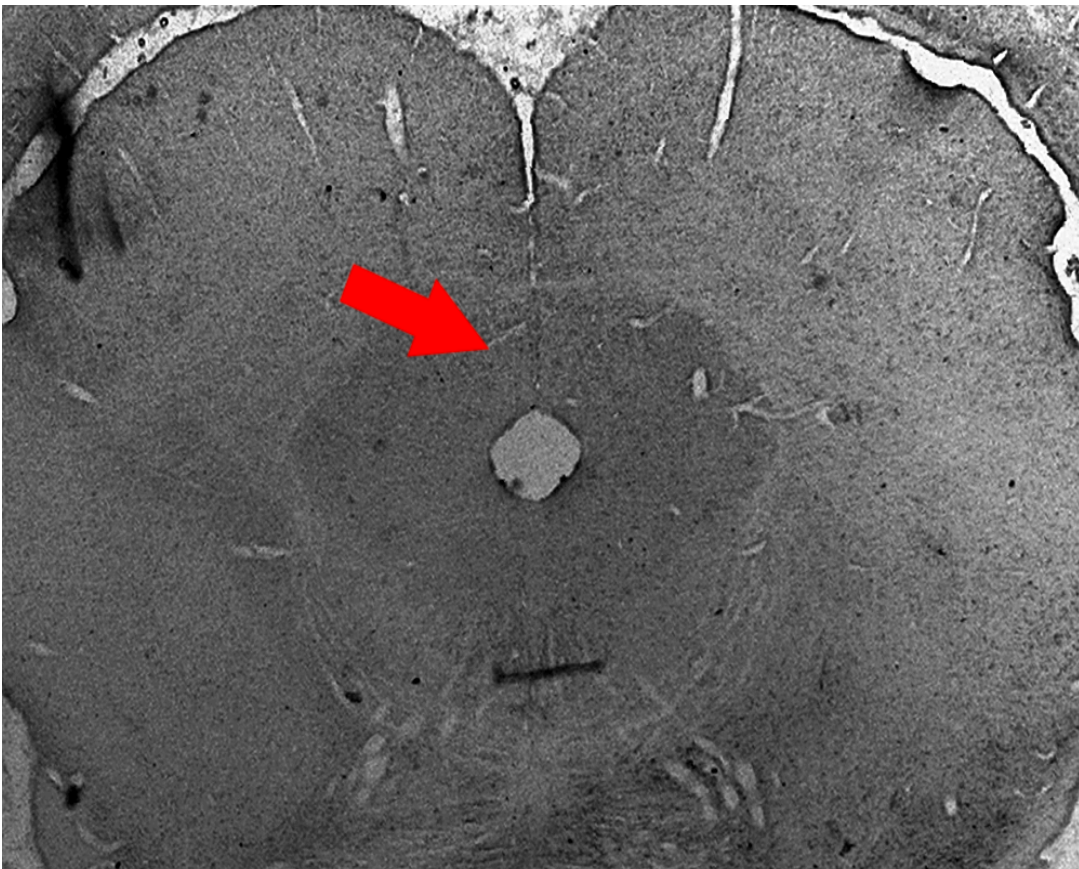


Figura 4: Exemplo de rastro deixado pela cânula guia direcionada à MCPd.

5.

Resultados

5.1.

Estimulação Elétrica da MCPd

5.1.2.

Limiares elétricos de congelamento e fuga

Não foram encontradas diferenças significativas na corrente elétrica necessária para provocar o aparecimento do comportamento de congelamento e fuga nos animais do grupo lesão em relação ao grupo controle.

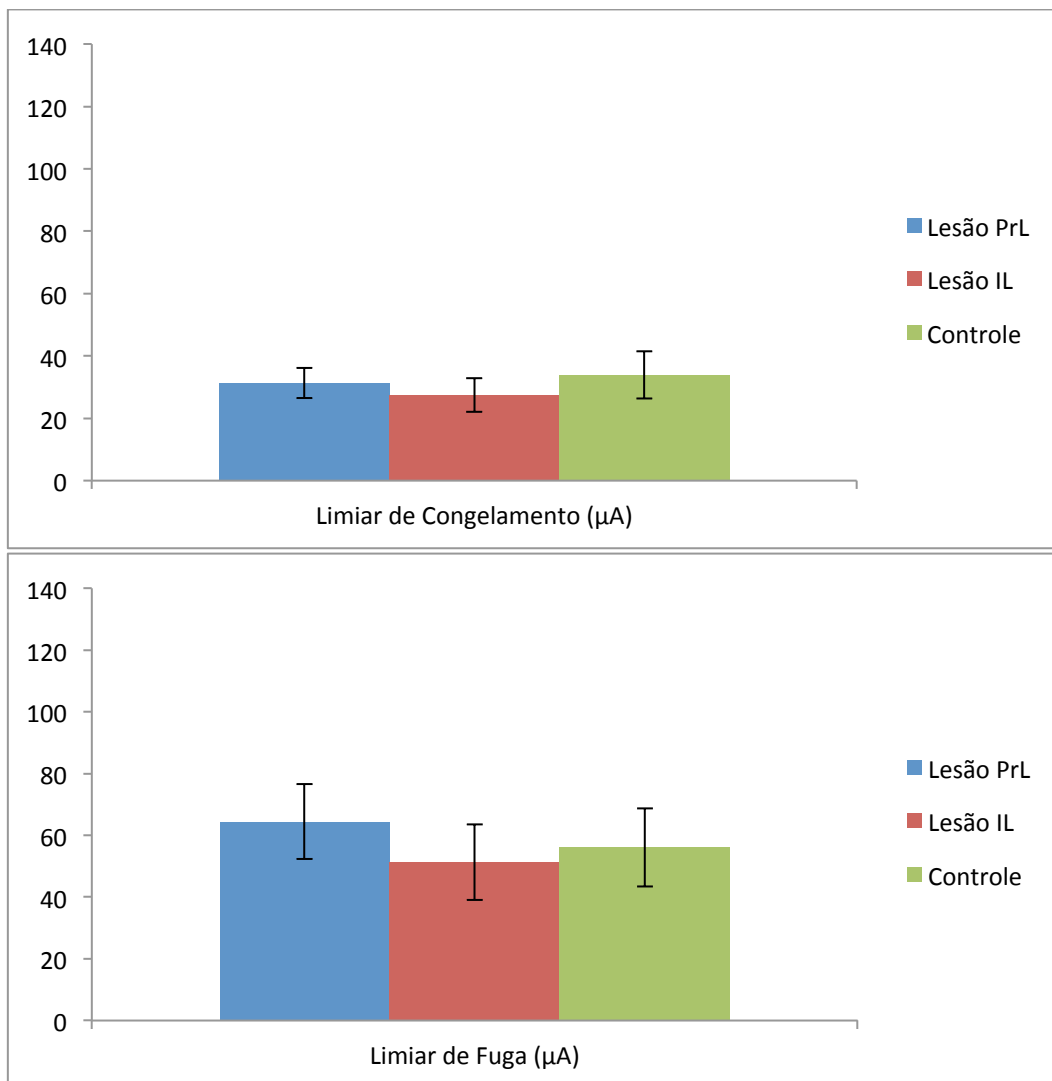


Gráfico 1: intensidade da corrente elétrica mínima necessária (+/-SEM) para provocar o comportamento de congelamento (superior) e de fuga (inferior).

5.1.3.

Congelamento pós-estimulação

Na análise do comportamento de congelamento após a estimulação elétrica, foram encontradas diferenças entre os grupos IL e Controle: $t(2,9)=3,25$; $p<0,01$. A lesão no córtex infra-límbico provoca uma redução do tempo de congelamento em relação aos animais que foram submetidos a falsas lesões. Não foram encontradas diferenças significativas no grupo PrL em relação ao grupo IL e Controle, conforme o gráfico 2.

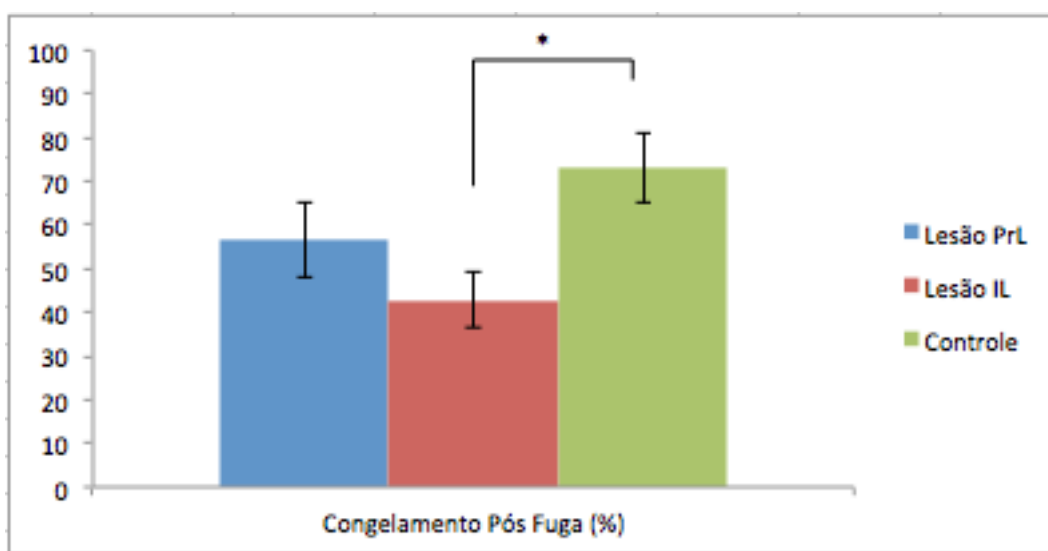


Gráfico 2: porcentagem de tempo em congelamento (+/-SEM) durante os 11 minutos após a fuga provocada pela estimulação da MCPd. $*=p<0,01$.

5.2.

Procedimento de Condicionamento Clássico ao Contexto

5.2.1.

Congelamento motor imediatamente após o choque nas patas

Foram encontradas diferenças entre os grupos PrL e IL na avaliação de congelamento motor logo após a exposição aos três choques nas patas, conforme o gráfico 3. A lesão no córtex infra-límbico provocou um aumento da incidência do congelamento em relação aos animais do grupo com lesões no córtex pré-límbico: $t(2,9)=2,26$; $p<0,05$. Entretanto, não foram encontradas diferenças nos dois grupos em relação ao animais com falsas lesões.

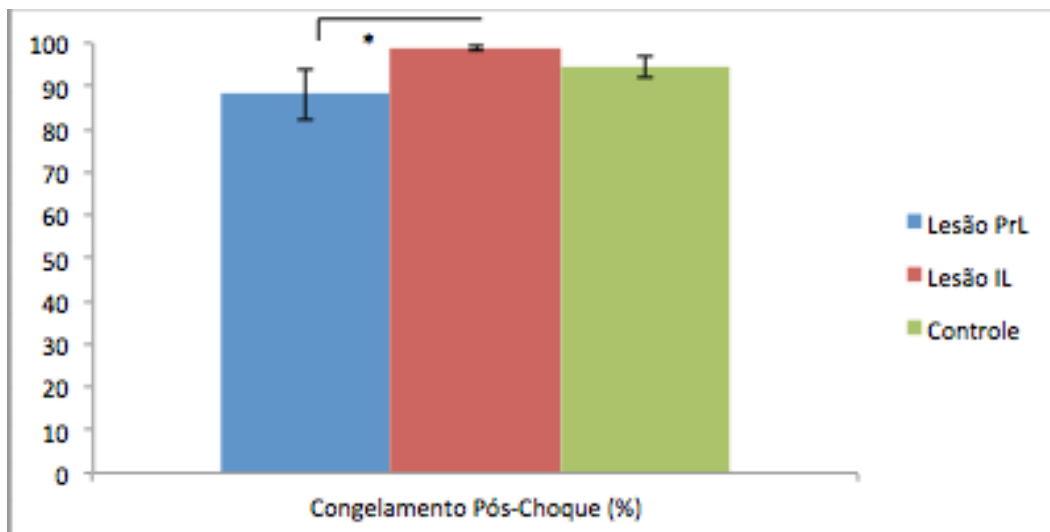


Gráfico 3: porcentagem de tempo em congelamento (+/-SEM) durante os 3 minutos após o último choque aplicado nas patas. $*=p<0,05$.

5.2.2.

Congelamento por condicionamento cotextual, 24 horas depois

Foram encontradas diferenças entre os grupos PrL e IL, assim como entre os grupos IL e Controle na avaliação do congelamento motor condicionado ao contexto, avaliado 24 horas depois da aquisição. A lesão no córtex infra-límbico provocou um aumento na incidência do congelamento em relação aos animais do grupo controle ($t(2,9)=2,26$; $p<0,05$), e em relação ao grupo com lesão no córtex pré-límbico ($t(2,9)=4,29$; $p<0,005$). Não foram encontradas diferenças significativas de comportamento entre os animais com lesão no córtex pré-límbico e aqueles com falsas lesões, conforme o gráfico 4.

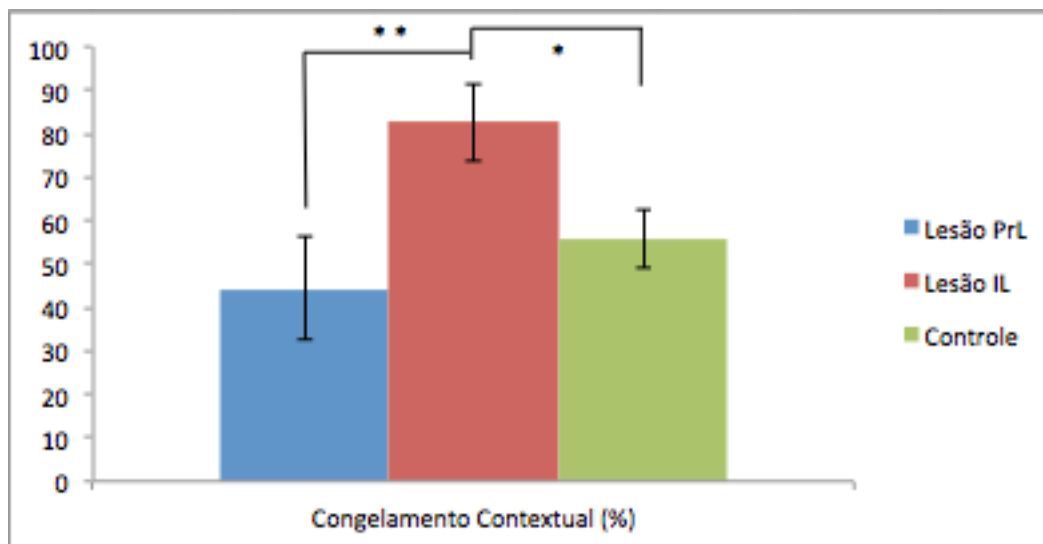


Gráfico 4: porcentagem de tempo em congelamento (+/-SEM) durante os 12 minutos de reexposição ao contexto de aquisição do choque, 24 horas depois. $*=p<0,05$; $**=p<0,005$.

6. Discussão

6.1. A Estimulação Elétrica da MCPd

Apesar de não demonstrar um possível envolvimento dos córtices IL e PrL nos limiares elétricos de fuga e congelamento, os resultados deste trabalho sugerem que a participação do IL é imprescindível na manifestação dos comportamentos de congelamento pós-fuga no procedimento de estimulação elétrica da MCPd.

Segundo trabalhos anteriores, a MCPv seria uma espécie de gatilho disparador do comportamento de congelamento, porém ao cessar a estimulação elétrica desta região, o comportamento de congelamento também é interrompido. Por outro lado, o congelamento motor é muito mais duradouro após estimulação da MCPd, se mantendo por vários minutos após o fim da estimulação.

Vianna e Brandão (2003) hipotetizaram um circuito onde o CPF teria participação ativa durante a manifestação do congelamento pós-fuga, através de seu papel atuante na sustentação da memória de curta duração. De fato, o presente resultado parece apoiar esta noção, onde a lesão no IL impediu que o animal mantivesse de forma contínua o seu comportamento de congelamento motor em relação ao grupo controle.

A natureza mnemônica do congelamento pós-fuga, desassociado de qualquer aprendizado de longo prazo por meio de condicionamento, também é suportado por evidências comportamentais anteriores. Vianna, Landeira-Fernandez e Brandão (2001) demonstraram que o congelamento pós-fuga se mantém mesmo com a mudança do contexto, e não se reapresenta 24 horas depois ao se exibir o mesmo ambiente em que o animal estava durante a estimulação.

Ainda segundo este trabalho, lesões eletrolíticas da MCPv diminuíram o congelamento a um estímulo condicionado através de choque nas patas, mas não afetaram os comportamentos de fuga e congelamento provocados por estimulação da MCPd.

Podemos afirmar com certa segurança, portanto, que o congelamento provocado pela estimulação da MCPd não se origina por meio de influencia condicionada. Uma segunda possibilidade é a de que o congelamento da MCPd seja de natureza inata. Porém, lesões na região provocam o aumento deste tipo de

medo, causando mais congelamento em ratos expostos à presença de um gato (De Oca et al, 1998).

Tais evidências colocam as estruturas frontais em destaque no circuito do medo e pânico que envolve a MCP, e apoiado na hipótese levantada por Vianna e Brandão, o presente estudo parece reforçar a noção de que o IL e as outras estruturas do CPFm possuem um papel crucial na emergência do comportamento de congelamento após estimulação elétrica da MCPd.

Uma hipótese presente na literatura em torno do valor comparativo do congelamento pós-fuga em humanos, é a de que este comportamento seria um análogo aos sintomas ansiosos de antecipação em pessoas que sofrem de transtornos do pânico. De fato, esta visão é corroborada em estudos de estimulação da MCPd em humanos (tabela 4).

Brandão e colaboradores (2008) aprofundam este aspecto comparativo, e apresentam evidências em defesa do congelamento pós-fuga como um modelo para o transtorno do pânico. A ativação da MCPd durante o congelamento pós-fuga, de acordo com estudos de FOS, provoca a atividade concomitante do núcleo dorsolateral do tálamo, uma indicação de que a informação está sendo enviada para estruturas superiores frontais. Se a MCPd e o conjunto de comportamentos associados à sua ativação fossem somente relacionadas a um *output* de um comportamento defensivo, tal padrão de processamento de informação certamente não seria observado (Brandão et al, 1986; Borelli et al, 2005).

	Reações Emocionais e/ou Comportamentais	Reações Autonômicas
MCPd ratos	Alerta, Congelamento, Fuga	Taquicardia, aumento pressão arterial, hiperventilação, piloereção
MCPd humanos	Descrições subjetivas de medo, ansiedade ou perigo eminente	Taquicardia, hiperventilação, piloereção, sudorese
Ataque de Pânico Espontâneo	Descrições subjetivas de medo, perigo eminente, sensação de estar morrendo ou surtando	Taquicardia, aumento pressão arterial, hiperventilação, sudorese

Tabela 4: Comparação entre respostas provocadas após estimulação da MCPd em ratos e humanos, assim como características e sinais relatados durante um ataque de pânico. Schenberg et al.(1983); Graeff (1990, 1997); Brandão et al., (1994, 1999); Lovick, (2000); Nashold et al., (1969); Amano et al., (1969)

6.2. O Condicionamento ao Medo Contextual

No segundo experimento, a lesão no IL provocou diferenças em duas medidas do protocolo de condicionamento ao contexto, onde o grupo lesionado nesta região apresentou uma porcentagem menor de congelamento imediatamente após a exposição ao choque, e 24 horas depois ao ser colocado no contexto da caixa experimental onde o condicionamento foi efetuado.

Tais resultados replicam os achados de Sierra-Mercado et al. (2011), onde inativação do IL através do agonista de GABA_A muscimol provocou um aumento da expressão do medo condicionado em relação a outras estruturas que diminuíram o congelamento, como o núcleo basolateral da amígdala (BLA), hipocampo ventral (HPCv) e o PrL (PL) (figura 4).

Ainda segundo este trabalho, os autores propõem uma circuitaria da expressão e extinção do medo condicionado, onde o IL teria o papel de suprimir a ativação do núcleo basolateral da amígdala (uma área importante na expressão do medo), e portanto diminuindo – ou ao menos modulando – a ocorrência do congelamento motor.

O mesmo grupo realizou estudos de estimulação do IL e PrL, encontrando efeitos que corroboram a hipótese de que essas estruturas são reguladoras positivas e negativas da expressão e extinção do medo condicionado (Vidal-Gonzalez, 2006).

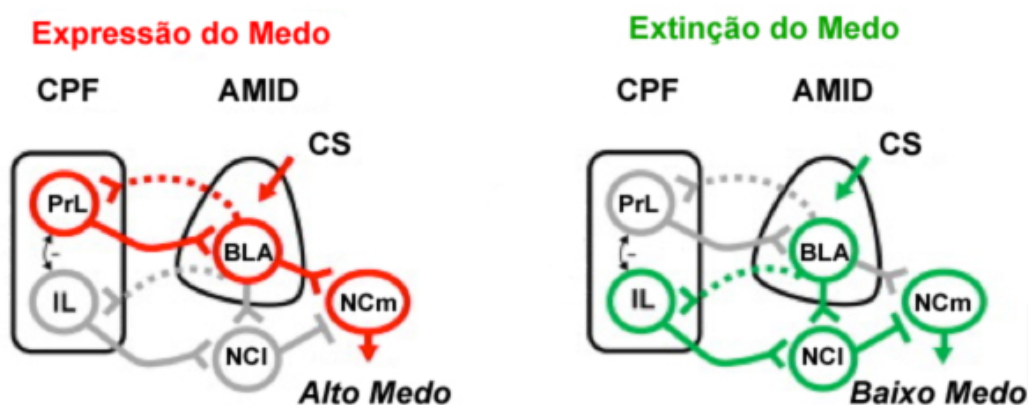


Figura 5: Circuitos propostos para o envolvimento das regiões frontais na expressão e extinção do medo condicionado. Adaptado Sierra-Mercado et al, 2011

7. Referências

Amano, K.; Tanikama, T.; Iseki, H.; Kawabatake, H.; Notani, M.; Kawamura, H.; Kitamura, K. “Single neuron analysis of the human midbrain tegmentum: rostral mesencephalicreticulotomy for pain relief.” **Appl. Neurophysiol.**, 41 (1978), pp. 66–78

American Psychiatric Association. (2000). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (**4th ed., text rev.**). Washington, DC: Author.

Ayuso-Mateos, J. L. Global Burden of Panic Disorder in the Year 2000: Version 1 Estimates. **GBD 2000 Working Paper**. GBD 2000 Working Paper. 2002. Geneva, WHO (<http://www.who.int/evidence/bod>), December 13, 2012.

Blanchard, R. J., K. J. Flannelly, and D. C. Blanchard. “Defensive Behaviors of Laboratory and Wild RattusNorvegicus..” **Journal of Comparative Psychology** 100, no. 2 (1986): 101.

Blanchard, R. J., K. J. Flannelly, and D. C. Blanchard. “Defensive Behaviors of Laboratory and Wild RattusNorvegicus..” **Journal of Comparative Psychology** 100, no. 2 (1986): 101.

Borelli, K. G., C. Ferreira-Netto, N. C. Coimbra, and M. L. Brandão. “Fos-like Immunoreactivity in the Brain Associated with Freezing or Escape Induced by Inhibition of Either Glutamic Acid Decarboxylase or GABA Receptors in the Dorsal Periaqueductal Gray.” **Brain Research** 1051, no. 1 (2005): 100–111.

Brandão, M. L., G. Di Scala, M. J. Bouchet, and P. Schmitt. “Escape Behavior Produced by the Blockade of Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) in Mesencephalic Central Gray or Medial Hypothalamus.” **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 24, no. 3 (1986): 497–501.

Brandão, M. L., J. M. Zanoveli, R. C. Ruiz-Martinez, L. C. Oliveira, and J. Landeira-Fernandez. “Different Patterns of Freezing Behavior Organized in the Periaqueductal Gray of Rats: Association with Different Types of Anxiety.” **Behavioural Brain Research** 188, no. 1 (2008): 1–13.

Brandão, M. L., J. M. Zanoveli, R. C. Ruiz-Martinez, L. C. Oliveira, and J. Landeira-Fernandez. “Different Patterns of Freezing Behavior Organized in the Periaqueductal Gray of Rats: Association with Different Types of Anxiety.” **Behavioural Brain Research** 188, no. 1 (2008): 1–13.

Bush, G., P. Luu, and M. I. Posner. "Cognitive and Emotional Influences in Anterior Cingulate Cortex." **Trends in Cognitive Sciences** 4, no. 6 (2000): 215–222.

Cuthbertson, B. H., A. Hull, M. Strachan, and J. Scott. "Post-traumatic Stress Disorder After Critical Illness Requiring General Intensive Care." **Intensive Care Medicine** 30, no. 3 (2004): 450–455.

De Oca, B. M., J. P. DeCola, S. Maren, and M. S. Fanselow. "Distinct Regions of the Periaqueductal Gray Are Involved in the Acquisition and Expression of Defensive Responses." **The Journal of Neuroscience** 18, no. 9 (1998): 3426–3432.

Dickinson, A., and N. J. Mackintosh. "Classical Conditioning in Animals." **Annual Review of Psychology** 29, no. 1 (1978): 587–612.

Divac, I., Mogenson, J., Blanchard, R.J. and Blanchard, D.C., Mesialcortical lesions and fear behavior in the wild rat, **Physiol. Psychol.**, 12 (1984) 271-274.

Etkin, A., Egner, T., Peraza, D.M., Kandel, E.R., Hirsch, J., 2006. "Resolving emotional conflict: a role for the rostral anterior cingulate cortex in modulating activity in the amygdala." **Neuron** 51 (6), 871–882.

Etkin, A., K. E. Prater, A. F. Schatzberg, V. Menon, and M. D. Greicius. "Disrupted AmygdalarSubregion Functional Connectivity and Evidence of a Compensatory Network in Generalized Anxiety Disorder." **Archives of General Psychiatry** 66, no. 12 (2009): 1361.

extinction in rats: Implications for human brain imaging and anxiety disorders. (2006) **Biol. Psychol.** 73: 61–71.

Fanselow, M. "What Is Conditioned Fear?" **Trends in Neurosciences** 7, no. 12 (1984): 460–462.

Floyd, N. S., J. L. Price, A. T. Ferry, K. A. Keay, and R. Bandler. "Orbitomedial Prefrontal Cortical Projections to Distinct Longitudinal Columns of the Periaqueductal Gray in the Rat." **The Journal of Comparative Neurology** 422, no. 4 (2000): 556–578.

Galea, S., A. Nandi, and D. Vlahov. "The Epidemiology of Post-traumatic Stress Disorder After Disasters." **Epidemiologic Reviews** 27, no. 1 (2005): 78–91.

Graeff, F. G., M. L. Brandao, E. A. Audi, and M. T. B. Schütz.

“Modulation of the Brain Aversive System by Gabaregic and Serotonergic Mechanisms.” **Behavioural Brain Research** 22, no. 2 (1986): 173–180.

Hinton, D., P. Ba, S. Peou, and K. Um. “Panic Disorder Among Cambodian Refugees Attending a Psychiatric Clinic: Prevalence and Subtypes.” **General Hospital Psychiatry** 22, no. 6 (2000): 437–444.

Holson, R.R., Mesial prefrontal cortical lesions and timidity in rats.I. Reactivity to aversive stimuli, **Physiol. Behav.**, 37 (1986) 221 230

Institute for Laboratory Animal Research (US) Committee on, Humane Issues in the Use of Random Source Dogs, and Cats in Research. **Scientific and Humane Issues in the Use of Random Source Dogs and Cats in Research.**NationalAcademy Press, 2009.

Keiji Fukuda, MD, MPH; RosaneNisenbaum, PhD; Geraldine Stewart, MA; William W. Thompson, PhD; Laura Robin, DO, MPH; Rita M. Washko, MD; Donald L. Noah, DVM, MPH; Drue H. Barrett, PhD, MS; Bonnie Randall, MCP; Barbara L. Herwaldt, MD, MPH; Alison C. Mawle, PhD; William C. Reeves, MD, MSPH. “Chronic Multisymptom Illness Affecting Air Force Veterans of the Gulf War.” **JAMA**. 1998;280(11):981-988.

Kober, H., L. F. Barrett, J. Joseph, E. Bliss-Moreau, K. Lindquist, and T. D. Wager. “Functional Grouping and Cortical–subcortical Interactions in Emotion: A Meta-analysis of Neuroimaging Studies.” **Neuroimage** 42, no. 2 (2008): 998.

Kolb, B.J., Social behavior of rats with chronic prefrontal lesions, **Comp. Physiol. Psychol.**, 87 (1974)466474.

Lang, P. J., M. Davis, and A. Öhman. “Fear and Anxiety: Animal Models and Human Cognitive Psychophysiology.” **Journal of Affective Disorders** 61, no. 3 (2000): 137–159.

Laurent, Vincent ;Marchand, Alain R. ; Westbrook, R. Frederick. “The basolateral amygdala is necessary for learning but not relearning extinction of context conditioned fear.” **Learning & Memory**, Volume: 15 Issue: 5 Pages: 304-314

Milad, M.R., Rauch, S.L., Pitman, R.K., and Quirk, G.J. Fear

Mobbs, M. S., L. Predrag, K. H. Marchant, P. V. Attwood, J. C. Wallace, W. W. Cleland, and I. Rayment. "When Fear Is Near." **Science** 317, no. 5841 (2007): 1076–1079.

Morgan, M. A., L. M. Romanski, and J. E. LeDoux. "Extinction of Emotional Learning: Contribution of Medial Prefrontal Cortex." **Neuroscience Letters** 163, no. 1 (1993): 109–113.

Morgan, M. A., L. M. Romanski, and J. E. LeDoux. "Extinction of Emotional Learning: Contribution of Medial Prefrontal Cortex." **Neuroscience Letters** 163, no. 1 (1993): 109–113.

Myers, K.M. and Davis, M. Mechanisms of fear extinction (2007). **Mol. Psychiatry** 12: 120–150.

Naomi Breslau, PhD; Ronald C. Kessler, PhD; Howard D. Chilcoat, ScD; Lonni R. Schultz, PhD; Glenn C. Davis, MD; Patricia Andreski, MA. "Trauma and Posttraumatic Stress Disorder in the Community: The 1996 Detroit Area Survey of Trauma." **Arch Gen Psychiatry**. 1998;55(7):626-632.

Nashold, B.S.; Wilson, W.P; Slaughter. D.G. "Sensation evoked by stimulation in the midbrain of man." **J. Neurosurg.**, 30 (1969), pp. 14–24

Neria, Y., A. Nandi, and S. Galea. "Post-traumatic Stress Disorder Following Disasters: a Systematic Review." **Psychological Medicine** 38, no. 4 (2008): 467–480.

Perkonigg, A., R. C. Kessler, S. Storz, and H. U. Wittchen. "Traumatic Events and Post-traumatic Stress Disorder in the Community: Prevalence, Risk Factors and Comorbidity." **Acta Psychiatrica Scandinavica** 101, no. 1 (2001): 46–59.

Schenberg, L. C., J. C. de Aguiar, and F. G. Graeff. "GABA Modulation of the Defense Reaction Induced by Brain Electrical Stimulation." **Physiology & Behavior** 31, no. 4 (1983): 429–437.

Sierra-Mercado, D., K. A. Corcoran, K. Lebrón-Milad, and G. J. Quirk. "Inactivation of the Ventromedial Prefrontal Cortex Reduces Expression of Conditioned Fear and Impairs Subsequent Recall of Extinction." **European Journal of Neuroscience** 24, no. 6 (2006): 1751–1758.

Vianna, D. M. L., and M. L. Brandao. "Anatomical Connections of the Periaqueductal Gray: Specific Neural Substrates for Different Kinds of Fear."

Brazilian Journal of Medical and Biological Research 36, no. 5 (2003): 557–566.

Vianna, D. M. L., J. Landeira-Fernandez, and M. L. Brandão.

“Dorsolateral and Ventral Regions of the Periaqueductal Gray Matter Are Involved in Distinct Types of Fear.” **Neuroscience & Biobehavioral Reviews** 25, no. 7 (2001): 711–719.

Vidal-Gonzalez, Ivan, Benjamín Vidal-Gonzalez, Scott L. Rauch, and Gregory J. Quirk. “Microstimulation Reveals Opposing Influences of Prelimbic and Infralimbic Cortex on the Expression of Conditioned Fear.” **Learning & Memory** 13, no. 6 (2006): 728–733.