



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CENTRO BIOMÉDICO

**EFEITOS DO MIBEFRADIL, UM BLOQUEADOR DE CANAIS
DE CÁLCIO TIPO-T, SOBRE OS LIMIARES DA REAÇÃO DE
DEFESA PRODUZIDA POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA
MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DO RATO**

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Érika Amorim Melo Moreira Sacchi

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Vitória, ES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória, 10 de junho de 2005

Sacchi, Érika A.M.M.

Título: Efeitos do Mibefradil, um Bloqueador de Canais de Cálcio Tipo-T, sobre os Limiares da Reação de Defesa Produzida por Estimulação Elétrica da Matéria Cinzenta Periaquedutal do Rato

Vitória, 2005.

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro Biomédico, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. Luiz C. Schenberg

1. Reação de defesa, 2. Matéria Cinzenta Periaquedutal, 3. Mibefradil, 4. Canais de cálcio tipo-T, 5. Estimulação Elétrica, 6. Rato.

EFEITOS DO MIBEFRADIL, UM BLOQUEADOR DE CANAIS DE CÁLCIO TIPO-T, SOBRE OS LIMIARES DA REAÇÃO DE DEFESA PRODUZIDA POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DO RATO

ÉRIKA AMORIM MELO MOREIRA SACCHI

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg - Orientador
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES

Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra
Departamento de Farmacologia – FMRP-USP

Prof. Dr. José Guilherme Pinheiro Pires
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES

Profa. Dra. Ester Myiuki Nakamura Palácios
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Ciências Fisiológicas – UFES

Vitória, 10 de junho de 2005

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Ricardo, que sempre me apoiou e incentivou na realização desse Mestrado e cuja contribuição a todo o momento foi imprescindível na conclusão dessa dissertação. Agradeço ao meu filho, Matheus, por ter tolerado com firmeza a privação da companhia materna durante seus primeiros anos de vida, para que essa obra se tornasse possível.

Ao professor e orientador Dr. Luiz Carlos Schenberg, cujos conhecimentos e orientação foram essenciais nessa conclusão.

Ao professor Athelson Stefanon Bittencourt, pela valiosa colaboração na realização deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da UFES, pela orientação e atenção dedicados aos alunos determinando uma boa formação.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Neurobiologia pelos bons momentos de descontração e colaboração que passamos juntos. Aos funcionários, com os quais convivemos durante a realização deste trabalho, que sempre de alguma forma contribuíram nesta conclusão.

Aos amigos anestesiólogistas do Hospital Pediátrico de Vitória, que por meio de muito apoio e compreensão tornaram possível a conclusão desse Mestrado.

Agradeço aos meus pais, que me ensinaram os primeiros passos da vida, incentivando-me e mostrando sempre o melhor caminho para se obter uma formação profissional digna.

“O medo faz parte da vida da gente. Algumas pessoas não sabem como enfrentá-lo, outras - acho que estou entre elas - aprendem a conviver com ele e o encaram não como uma coisa negativa, mas como um sentimento de autopreservação.”

Ayrton Senna

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. TOPOGRAFIA NEURAL DA REAÇÃO DE DEFESA	03
1.2. PAPEL DOS CANAIS DE CÁLCIO NA GERAÇÃO DE PADRÕES DE DISPARO NEURONAL	05
1.3. VARIEDADE DE CANAIS DE CÁLCIO VOLTAGEM-DEPENDENTES	07
1.4. ANTAGONISTAS DOS CANAIS DE CÁLCIO	10
1.5. FARMACOLOGIA DO MIBEFRADIL	12
1.6. DETERMINANTES AMBIENTAIS E NEURAIS DA HIERARQUIA DAS RESPOSTAS DE DEFESA DE RATOS	13
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. ANIMAIS	19
3.2. QUIMITRODO	19
3.3. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	21
3.4. EQUIPAMENTOS	23
3.5. REGISTROS COMPORTAMENTAIS	23
3.5.1. Etograma do Rato	23
3.6. DROGAS	25
3.7. PROCEDIMENTO ESPECÍFICO	25
3.8. ANÁLISE HISTOLÓGICA	26
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4. RESULTADOS	29
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÕES	44
7. RESUMO	46
8. ABSTRACT	48
9. REFERÊNCIAS	50
10. APÊNDICES	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Fórmula estrutural do mibefradil	12
Figura 2:	Hierarquia das respostas de defesa do rato selvagem em função da distância entre presa e experimentador e da possibilidade de fuga	14
Figura 3:	Quimitrodo, agulha de injeção e cabo de estimulação.....	20
Figura 4:	Seqüência dos procedimentos cirúrgicos	22
Figura 5:	Bomba de microinjeção	26
Figura 6:	Sítios de estimulação dos ratos tratados com mibefradil (N = 20)	31
Figura 7:	Efeitos do mibefradil sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal	33
Figura 8:	Efeitos do mibefradil sobre a distribuição dos limiares (funções de densidade de probabilidade) das respostas de defesa induzidas por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal	34
Figura 9:	Intervalos de confiança (I.C.95%) dos efeitos do mibefradil sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal	35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Efeitos do mibefradil sobre os parâmetros das curvas intensidade-resposta dos comportamentos de defesa produzidos por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal	32
Tabela 2:	Isomorfismo dos ataques de pânico e das respostas induzidas por estimulação da MCPAd em homens e ratos	42

APÊNDICES

Apêndice 1:	Planilha de estimulação	59
Apêndice 2:	Gelatinização de lâminas para a histologia	61
Apêndice 3:	Coloração dos cortes do cérebro	63
Apêndice 4:	<i>Print out</i> do programa de análise logística	65

Lista de Abreviaturas

AHP.....	potenciais de pós-hiperpolarização
ADP.....	potencial de pós-despolarização
CS.....	colículo superior
DHP.....	diidropiridinas
EIC	estimulação intracraniana
HVA.....	ativados por alta voltagem
LC.....	locus coeruleus
LVA.....	ativados por baixa voltagem
MCPA	matéria cinzenta periaquedutal
MCPAdl.....	matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral
MCPAdm	matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial
MCPAl.....	matéria cinzenta periaquedutal lateral

1 INTRODUÇÃO

A resposta do homem amedrontado foi primeiramente descrita por Charles Darwin, há mais de um século, em “*A Expressão das Emoções no Homem e nos Animais*” (1872). Darwin descreve que “o homem amedrontado, inicialmente, permanece imóvel e sem respirar, como uma estátua, ou agacha-se instintivamente como para escapar à observação... Em outras situações, ocorre uma tendência repentina e incontida para a fuga desabalada”.

Os comportamentos defensivos compreendem um conjunto de respostas inatas e aprendidas apresentadas por um animal diante de uma situação ameaçadora ou aversiva (Adams, 1979). Respostas similares aos comportamentos incondicionados de defesa são obtidas em laboratório através de estimulação intracraniana (EIC) de animais. A EIC de animais intactos, livres e não-anestesiados iniciou-se na primeira metade do século passado com os experimentos de Walter Rudolph Hess, em Zurich. Hess observou que a estimulação hipotalâmica de gatos produzia uma “reação de defesa” caracterizada por um comportamento agressivo, isto é, uma postura imóvel com dorso levemente arqueado, retração auricular, silvar, rosnar, exposição das garras e presas, piloereção e acentuada midríase (Hess e Brügger, 1943) a qual denominou “reação afetiva de defesa” (*affektiven abwehrreaktion*).

Estas respostas podem ser obtidas por estimulação elétrica ou química de áreas que se estendem da base do telencéfalo à ponte, denominadas “sistema encefálico de defesa”. Este sistema compreende a amígdala, algumas regiões do hipotálamo medial, a matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) e partes adjacentes do teto do mesencéfalo, bem como suas conexões recíprocas (Hess e Brügger, 1943; Hunsperger, 1956; Fernadez de Molina e Hunsperger, 1959, 1962; Ursin e Kaada, 1960; Wolfle *et al.*, 1971; Waldbilling, 1975; Lipp e Hunsperger, 1978).

Tal como no gato, a reação de defesa do rato também é composta de inúmeras respostas. Em particular, estudos de nosso laboratório mostraram que as respostas de imobilidade, exoftalmia, trote, galope, saltos, micção e defecação podem ser obtidas pela estimulação de um único sítio da MCPA com variações pequenas da intensidade (Schenberg *et al.*, 1990, 2001; Sudré *et al.*, 1993; Vargas e Schenberg, 2001; Bittencourt *et al.*, 2004).

Por outro lado, Schenberg *et al.* (2000) demonstraram o envolvimento dos canais de cálcio voltagem-dependentes tipo-L no surgimento das respostas produzidas

por estimulação da MCPA. De fato, o verapamil e o CoCl_2 , antagonistas destes canais, bloquearam todas as respostas de defesa exceto a defecação e micção. O presente estudo prossegue esta investigação, verificando o efeito do mibefradil (Posicor®), um bloqueador seletivo dos canais de cálcio tipo-T, nos limiares das respostas de imobilidade, exoftalmia, trote, galope, saltos, micção e defecação, induzidas por estimulação elétrica da MCPA de ratos albinos machos da linhagem Wistar.

1.1 TOPOGRAFIA NEURAL DA REAÇÃO DE DEFESA.

O sistema neural de defesa foi proposto inicialmente por Fernandez de Molina e Hunsperger (1962) baseado em experimentos com gatos. Segundo estes autores, este sistema seria constituído de duas zonas nucleares (*core zones*), que controlariam a postura de imobilidade agressiva, envolvidas por uma zona mais difusa que controlaria a resposta de fuga.

As zonas nucleares estariam localizadas na região do hipotálamo perifornical e MCPA, e a zona difusa se estenderia desde a área pré-óptica ao mesencéfalo caudal. Baseados em estudos com combinação de estimulação elétrica e lesão destas áreas, Fernandez de Molina e Hunsperger (1962) também sugeriram que a reação de defesa originada por estimulação elétrica da amígdala era mediada por estas áreas de defesa. Entretanto, esta topografia não foi corroborada em ratos, uma vez que nem a estimulação elétrica, nem química, da MCPA produz ataques contra outros animais ou experimentador. Adicionalmente, a fuga também pode ser obtida por estimulação da MCPA com intensidades de corrente elétrica reduzidas (Sudré *et al.*, 1993; Bittencourt *et al.*, 2004, 2005).

Mais recentemente, a MCPA foi dividida em colunas funcionalmente distintas distribuídas ao longo do aqueduto (Carrive, 1993). Dentre estas colunas, as colunas dorsomedial (MCPAdm), dorsolateral (MCPAdl) e lateral (MCPAl) são fundamentais na eliciação dos comportamentos defensivos (Schenberg e Graeff, 1978; Graeff, 1981; Brandão *et al.*, 1982; Sandner *et al.*, 1982; Schenberg *et al.*, 1983). De fato, Adams (1968) já havia demonstrado que os neurônios da metade dorsal da MCPA respondiam especificamente a estímulos nocivos ou ameaçadores. A estimulação elétrica e química das colunas dorsais e lateral também causam alterações cardiovasculares e

respiratórias que preparam o organismo para o exercício da fuga ou luta (Adams *et al.*, 1971; Carobrez *et al.*, 1983; Castro e Schenberg, 1989; Schenberg *et al.*, 1993).

Estudos recentes mostraram que os componentes individuais da reação de defesa produzida por estimulação elétrica ou química da MCPA também apresentam uma organização colunar (Bittencourt *et al.*, 2004). Assim, enquanto a resposta de defecação parece estar restrita à MCPAI, a exoftalmia, micção e respostas somáticas de defesa estão igualmente organizadas na MCPAdl e MCPAI. Por outro lado, a coluna ventrolateral não parece estar envolvida primariamente na produção das respostas incondicionadas de defesa (Bittencourt *et al.*, 2004). Não obstante, esta região está reconhecidamente associada ao controle de dor (Fardin *et al.*, 1984).

É importante destacar que os menores limiares de defesa foram consistentemente obtidos por estimulação da MCPAdl (Bittencourt *et al.*, 2004). Contudo, como a MCPAdl não envia projeções diretas para as regiões caudais do tronco cerebral e medula espinhal, mas se projeta para as outras colunas da MCPA, locus coeruleus (LC) e núcleo cuneiforme, as respostas devidas à estimulação desta coluna parecem ser mediadas por estas estruturas (Holstege, 1991; Cameron *et al.*, 1995; Sandkühler and Herdegen, 1995, *apud* Bittencourt *et al.*, 2004).

Além da MCPA, existem evidências do envolvimento do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo no controle das respostas defensivas. De fato, lesões químicas deste núcleo aboliram as respostas de congelamento e fuga à apresentação de um gato, intensificando as atividades exploratórias (Canteras *et al.*, 1997). Estudos de nosso laboratório com estimulação elétrica e química do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo corroboraram estas observações (Cezário, 2001). Este autor demonstrou que a estimulação deste núcleo produz as respostas de esquadrinhar, exoftalmia, imobilidade, trote, saltos, micção e defecação. Contudo, enquanto os limiares elétricos da resposta de salto foram três vezes superiores àqueles da MCPAdl, a imobilidade não foi eliciada pela estimulação química e o galope não foi eliciado por ambos os tipos de estimulação (Schenberg *et al.*, 2001).

O hipotálamo medial também tem sido envolvido nas respostas incondicionadas de defesa. (Hess e Brügger, 1943) Contudo, estudos realizados em ratos e macacos sugerem que o hipotálamo seja a estrutura responsável pelos aspectos autonômicos da resposta condicionada, enquanto a MCPA caudal participaria

com o controle motor desta, assim como pela resposta de vocalização (Floody e O'Donohue, 1980; Yajima *et al.*, 1980; Ploog, 1981).

Por outro lado, os núcleos central e lateral da amígdala participariam com os aspectos autonômicos e motores de respostas defensivas aprendidas (Smith *et al.*, 1980; Iwata *et al.*, 1986; Le Doux *et al.*, 1988). Existem ainda, indícios de participação do LC, o principal núcleo noradrenérgico do encéfalo, como um importante substrato nos estados de atenção e emoção (Bunney, 1976; Servan-Schreiber, 1990; Aston-Jones, 2000)

Edwards (1980) sugeriu uma conexão da MCPA com extratos profundos, branco e cinzento, do colículo superior (CS). A MCPA e o CS na verdade, compartilham conexões recíprocas. A estimulação da MCPA e das camadas adjacentes do colículo produzem respostas como congelamento (imobilidade tensa) e fuga (trote, galope e salto) com exoftalmia (abertura ocular completa) e mais raramente, micção e defecação (Bittencourt *et al.*, 2004).

Sendo uma estrutura classicamente relacionada ao controle visuomotor, o CS tem sido proposto como uma estrutura importante na detecção de predadores (Blanchard *et al.*, 1981; Redgrave e Dean, 1991; Bittencourt *et al.*, 2005).

1.2 PAPEL DOS CANAIS DE CÁLCIO NA GERAÇÃO DE PADRÕES DE DISPARO NEURONAL.

Os canais de cálcio voltagem-dependentes desempenham papel fundamental em nosso organismo, estando presentes em células neuronais centrais e periféricas, nas quais desempenham importantes funções. Dentre estas destacamos seu papel na excitabilidade, neurotransmissão, vias de sinalização intracelular e regulação da expressão gênica (McDonough e Bean, 1998). O cálcio também é o principal sinal para a síntese de óxido nítrico em neurônios (Snyder e Bredt, 1992).

Além de seu papel iônico na bioeletrogênese, o cálcio age como segundo mensageiro, principalmente, ativando fosfoquinasas que regulam outras enzimas, canais iônicos e expressão gênica, inclusive, participando da potencialização sináptica prolongada (*long-term potentiation*) (Bertolino e Llinás, 1992).

Llinás e Yarom (1981) conduziram experimentos fundamentais para a compreensão do papel dos canais de cálcio voltagem-dependentes na produção dos padrões de disparo neuronal. Estes autores mostraram que os neurônios do núcleo olivar inferior da cobaia geram potenciais de despolarização rápida (*fast depolarizing potentials*) seguidos por um potencial de pós-despolarização lento (ADP, *after-depolarizing potential*), de duração variável e amplitude de 49 ± 8 mV, e por um período prolongado de hiperpolarização, o potencial de pós-hiperpolarização (AHP, *after-hiperpolarizing potential*), com duração de 250 ms e amplitude de -12 ± 3 mV. Enquanto a fase de despolarização rápida é bloqueada por tetrodotoxina, demonstrando sua dependência da condutância de sódio, tanto o ADP quanto o AHP são bloqueados por cátions divalentes ou pela remoção de cálcio do meio, mostrando sua dependência de cálcio. Assim, o cálcio tem um efeito direto na geração do ADP e indireto na geração do AHP mediante a ativação de correntes de potássio. Conseqüentemente, o potencial de ação devido ao aumento da condutância do cálcio subsequente ao potencial de sódio, desencadeia o aumento da condutância do potássio, fazendo o potencial da célula oscilar numa frequência relativamente baixa de 4 a 10 Hz.

Adicionalmente, demonstraram que a hiperpolarização do neurônio revela uma corrente de cálcio de baixo limiar, que está inativa no repouso, e apresenta propriedades farmacológicas similares ao ADP. Contudo, esta tem amplitude muito menor e não é seguida por AHP de longa duração. Estes autores propuseram que estas correntes são fundamentais para o retorno da membrana à condição de repouso após o AHP. Devido ao caráter transiente desta corrente, os canais de cálcio de baixo limiar foram denominados 'canais do tipo-T'.

A atividade oscilatória neuronal produzida pela ativação do canal de cálcio tipo-T é uma flutuação do potencial de membrana que pode ser espontânea, pois suas correntes são ativadas em potenciais próximos ao potencial de repouso (Bertolino e Llinás, 1992), ou depender de atividade sináptica (Steriade e Llinás, 1988).

Steriade e Llinás (1988) estudaram a atividade oscilatória de neurônios do tálamo, correlacionando-a à atividade dos canais de cálcio. Esta atividade exerce um importante papel na regulação do ciclo sono-vigília. Estes autores demonstraram que em neurônios talâmicos de cobaias a condutância voltagem-dependente gera 2 padrões de atividade, quais sejam, (1) disparos repetitivos tônicos e (2) disparos fásicos (Steriade e Llinás, 1988; Bertolino e Llinás, 1992). Estes padrões de atividade

permitem que os neurônios talâmicos se comportem como osciladores em frequências distintas. Desta forma, mudanças no potencial de membrana permitem ao neurônio mudar de um modo de oscilação para outro. Em potenciais mais positivos que -60mV, a célula exibe atividade de disparo repetitiva com uma frequência de aproximadamente 10 Hz, que se deve à ativação persistente da condutância do sódio (Bertolino e Llinás, 1992). Entretanto, em potenciais de membrana mais negativos que -60 mV, potenciais de ação na frequência de 5 Hz são disparados devido à de-inativação (*de-inactivation*) da condutância do canal de cálcio tipo-T. Enquanto, a atividade tônica (10 Hz) foi correlacionada à vigília, o disparo fásico (5 Hz) parece corresponder às ondas lentas do sono. O disparo do tipo fásico é dependente da entrada de cálcio por canais tipo-T.

1.3 VARIEDADE DE CANAIS DE CÁLCIO VOLTAGEM-DEPENDENTES.

Como resultado destes e outros estudos, admite-se que as células neuronais tenham uma grande variedade de canais de cálcio voltagem-dependentes que diferem na sua cinética, dependência de voltagem e características farmacológicas (Bean, 1989; Tsien *et al.*, 1995; Todorovic e Lingle, 1998).

Estes canais são classificados segundo vários critérios. Porém, uma classificação amplamente aceita é sua divisão em canais de cálcio ativados por alta voltagem (HVA, *high-voltage activated*) ou baixa voltagem (LVA, *low voltage-activated*).

Os canais HVA foram subdivididos farmacologicamente em 5 tipos (Speeding e Paoletti, 1992; Kim *et al.*, 1997), quais sejam:

1. Tipo-L ou de longa duração: sensível as diidropiridinas (DHP).
2. Tipo N ou neuronal: sensível à ω -conotoxina (GVIA).
3. Tipo P (célula de Purkinje): sensível à ω -agatoxina (IVA).
4. Tipo Q: sensível à ω -conotoxina MVIIIC, mas insensível à DHP, ω -conotoxina GVIA e ω -agatoxina IVA.
5. Tipo R ou resistente.

A seguir, descrevemos, sucintamente, as propriedades farmacológicas dos principais canais:

Canal tipo-L: Amplamente distribuído nos tecidos. É altamente sensível à DHPs, fenilalquilaminas (verapamil) e benzotiazepinas (diltiazem). É constituído de várias subunidades conhecidas como α_1 , α_2 , β , γ , δ . A subunidade α_1 contém importantes sítios de fosforilação e sítios de ligação para antagonistas do cálcio. A proteína tem 4 seqüências repetidas, denominadas de S₁ a S₄, das quais a região S₄ é o sensor putativo de voltagem. A subunidade α_1 lembra fortemente os canais de sódio. De fato, algumas drogas que apresentam afinidade pelos canais de sódio, também se ligam aos canais de cálcio tipo-L (Speeding e Paoletti, 1992). Ela também é a subunidade responsável tanto pelo sensor de voltagem, assim como pela função de poro do canal. Aparentemente, os sítios receptores para drogas classificadas como antagonistas de cálcio localizam-se nesta subunidade. O papel das demais subunidades não foi tão bem elucidado como a α_1 , mas ao que tudo indica, elas parecem modular a atividade desta subunidade (Singer *et al.*, 1991).

Canal tipo-N: sua função parece estar relacionada à liberação do neurotransmissor (Miller, 1987; Hirning *et al.*, 1988). Apesar de serem voltagem-dependentes, a condutância de cálcio dos canais tipo-N é inibida pela ativação dos adrenoreceptores α_2 . Portanto, parecem ser modulados por sistemas de 2º mensageiros.

Canal tipo-P: esta variedade de canal de cálcio é responsável pela maior proporção de canais de cálcio cerebrais (Speeding e Paoletti, 1992) e talvez seja responsável pela liberação neurotransmissora em várias áreas do cérebro (Hillman *et al.*, 1989). Esses canais têm como característica eletrofisiológica o fato de apresentarem pouca inativação. Os canais tipo-Q têm propriedades similares.

Canal tipo-R: é resistente às DHPs e ω -conotoxina MVIIC (Tottene *et al.*, 1996). Recentemente foi descoberta uma toxina, denominada SNX-482, proveniente do veneno da aranha *Hysteroocrates gigas*, que bloqueia este canal (IUPHAR, 2000).

Por sua vez, os canais LVA compreendem os canais tipo-T. Conforme mencionamos, a existência de um canal de cálcio de baixo limiar de disparo ou “low-threshold”, foi proposta por Llinás e Yarom (1981) em neurônios do núcleo olivar inferior de cobaias. Em potenciais negativos de membrana, estes canais são ativados por fraca despolarização, produzindo correntes transientes e inativando-se rapidamente durante um pulso de longa duração.

Experimentos '*patch-clamp*' do tipo '*whole-cell*' em neurônios do gânglio da raiz dorsal de frangos e ratos (Bertolino e Llinás, 1992) demonstraram que a corrente tipo-T é ativada em cerca de -50mV, alcançando seu valor máximo entre -40 e -10mV. Em potenciais mais positivos que -60mV o canal se encontra totalmente inativado. Esta inativação é abolida em potenciais bastante negativos, à medida que o potencial passa de -60 a -100mV. A constante de tempo da fase de declínio é de aproximadamente 10 a 50 ms e a corrente é rapidamente inativada com a manutenção da despolarização.

O potencial do canal de cálcio tipo-T apresenta duração de 20 a 25 ms, com rápida ascensão e lento declínio, gerando uma onda de negatividade extracelular que indica sua localização somática.

Embora a corrente tipo-T de neurônios do gânglio da raiz dorsal ter sido uma das primeiras correntes descritas (Carbone e Lux, 1984), a estrutura deste canal e sua descrição farmacológica continuam incompletas (Todorovic e Lingle, 1998). As correntes de cálcio tipo-T, foram observadas em grande variedade de tipos celulares excitáveis como as células neurosecretoras e células do córtex e medula adrenal, células justa-glomerulares e neurônios (Pitt, 1997). Seu papel no SNC parece estar relacionado à regulação fisiológica de várias propriedades neuronais, incluindo oscilação neuronal intrínseca e potenciais de baixo limiar (*low-threshold spikes*), tendo ainda relação com a geração de condições patológicas como as crises de ausência (Lee *et al.*, 2002). De fato, Coulter *et al.* (1989 *apud* Todorovic e Lingle, 1998) demonstraram que o antiepilético etossuximida reduz a corrente tipo-T nos neurônios talâmicos.

No cérebro do rato, Snutch *et al.* (1990) estimam que haja no mínimo oito transcrições diferentes de canais de cálcio. Em particular, Kim *et al.* (1997) demonstraram que os neurônios da MCPA contêm canais de cálcio de alto limiar do tipo-L, N, P, Q e R. Mais importante para o presente estudo, demonstraram que os efeitos celulares do DAMGO, um agonista de receptores opióides do tipo μ , dependem basicamente dos canais do tipo-N que, presumivelmente, estão envolvidos na exocitose. Os outros tipos de canais HVA poderiam, desta forma, exercer funções não relacionadas à analgesia. De fato, estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram o envolvimento de canais de cálcio do tipo-L no surgimento de respostas de defesa produzidas por estimulação da MCPA dorsal (Schenberg *et al.*, 2000). Assim, as respostas de imobilidade, exoftalmia, corrida e saltos, mas não

micção e defecação, produzidas por estimulação da MCPA dorsal, foram atenuadas pela injeção local de verapamil, um bloqueador de canais de cálcio tipo-L, ou CoCl_2 , um modulador competitivo não-seletivo dos canais de cálcio (Schenberg *et al.*, 2000).

Os canais de cálcio também parecem ser importantes no desenvolvimento encefálico. Mize *et al.* (2002) observaram que eles são expressos nos primeiros quatro dias pós-natais, podendo ser encontrados em várias estruturas das vias visuais, em particular, CS, núcleo geniculado lateral e córtex visual. Possivelmente, contribuem no desenvolvimento destas vias, bem como em suas funções. Por outro lado, Wallace e Stein (1997) demonstraram que a integração multissensorial no CS surge no mesmo período. Como o CS participa da detecção visual de predadores (Blanchard *et al.*, 1981), podendo contribuir para respostas de atenção implicadas nos comportamentos de defesa (Bittencourt *et al.* 2005), estes canais podem estar envolvidos nas respostas de imobilidade e exoftalmia características dos estados de hipervigilância. De fato, observações não publicadas de nosso laboratório mostraram que a reação de defesa de ratos selvagens emerge no mesmo período de desenvolvimento dos canais de cálcio tipo-L (Póvoa, 2003).

1.4 ANTAGONISTAS DOS CANAIS DE CÁLCIO

Os antagonistas do cálcio constituem uma classe heterogênea de drogas, diferindo na estrutura química e efeitos clínicos. Possuem três classes principais: as DHP (nifedipina, amlodipina, etc), benzotiazepinas (diltiazem) e as fenilalquilaminas (verapamil). Os antagonistas do cálcio de uso clínico produzem seus efeitos através do bloqueio do canal tipo-L (Pitt, 1997). Contudo, não existem antagonistas para canais de cálcio tipo-T com potência e seletividade comparáveis àquelas das toxinas que bloqueiam os canais tipo N ou P, ou das DHP para os canais tipo-L (Bean, 1989). Este canal de cálcio pode ser antagonizado pelo níquel em alguns tipos celulares e pelo inseticida tetrametrim (Tsien *et al.*, 1988; Bean, 1989; Mc Donough e Bean, 1998). Não obstante, descobriu-se recentemente que a curtoxina (*kurtosin*), uma toxina proveniente do veneno do escorpião, produz o bloqueio seletivo de algumas correntes do tipo-T, mas também de correntes de sódio (Chuang *et al.*, 1998; IUPHAR, 2000; Sidach e Mintz, 2002; Lopez- Gonzalez *et al.*, 2003).

Embora parte do efeito de vários anticonvulsivantes e anestésicos gerais pareça ser devido ao bloqueio de canais tipo-T, este bloqueio não é seletivo. Por exemplo, o ácido valpróico é um anticonvulsivante cujos efeitos primários envolvem o bloqueio da corrente de sódio (Van den Berg *et al.*, 1993 *apud* Todorovic e Lingle, 1998) e da transmissão gabaérgica (MacDonald e McLean, 1986 *apud* Todorovic e Lingle, 1998). Contudo, ele exerce um pequeno bloqueio da corrente tipo-T de neurônios do gânglio nodoso de ratos (Kelly *et al.*, 1990 *apud* Todorovic e Lingle, 1998). Os barbituratos, classe de drogas usadas tanto como anticonvulsivantes como anestésicos hipnóticos, também bloqueia correntes tipo-T e facilitam a transmissão gabaérgica. Contudo, o bloqueio de correntes tipo-T somente se expressa em concentrações bem superiores às observadas na clínica. Também foi demonstrado que o anticonvulsivante fenitoína bloqueia correntes do tipo-T em neuroblastomas e em neurônios hipocâmpais (Todorovic e Lingle, 1998). Por fim, conforme mencionado, a etossuximida é um anticonvulsivante de amplo uso nas crises de ausência que parece exercer um bloqueio relativamente mais seletivo dos canais do tipo-T de neurônios talâmicos (Coulter *et al.*, 1989 a, b *apud* Todorovic e Lingle, 1998). Por outro lado, é interessante destacar que embora as doses reduzidas dos anticonvulsivantes fenitoína, valproato e metil-fenil-succinimida (MPS) exerçam algum bloqueio da corrente tipo-T, este bloqueio permanece incompleto mesmo em concentrações elevadas (Todorovic e Lingle, 1998).

Também existem evidências de bloqueio da corrente tipo-T por drogas utilizadas em anestesia geral, como o propofol, etomidato e quetamina. Porém, é improvável que estes efeitos sejam responsáveis pelos seus efeitos clínicos. Também foi demonstrado que o isoflurano, um anestésico inalatório amplamente utilizado, bloqueia correntes tipo-T de células neonatais do gânglio da raiz dorsal (Takenoshito e Steinbach, 1991 *apud* Todorovic e Lingle, 1998) e em neurônios hipocâmpais (Study, 1994 *apud* Todorovic e Lingle, 1998). Estudos sugerem que 50% da corrente tipo-T encontram-se bloqueadas nos neurônios do gânglio da raiz dorsal na concentração alveolar mínima (CAM) de isoflurano, sugerindo que a indução anestésica com isoflurano possa envolver alguns efeitos sobre a transmissão aferente primária (Todorovic e Lingle, 1998). A CAM de halotano, um anestésico volátil estruturalmente distinto do isoflurano, bloqueia 20% da corrente tipo-T de neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos. A maior potência do isoflurano em inibir as correntes tipo-T parece ser um dos fatores responsáveis pela superioridade clínica deste anestésico, quais sejam,

a maior potência anestésica, o maior relaxamento muscular e a inibição mais acentuada dos potenciais evocados somatossensoriais e atividade eletroencefalográfica espontânea (Todorovic e Lingle, 1998).

O mibefradil (Posicor®), uma droga desenvolvida para o tratamento da hipertensão, é um antagonista de canais de cálcio não-diidropiridínico e de longa duração, que apresenta seletividade maior para os canais tipo-T. A seguir descrevemos suas propriedades.

1.5 FARMACOLOGIA DO MIBEFRADIL

O mibefradil apresenta elementos estruturais das fenilalquilaminas (verapamil) e benzimidazolininas (McDonough e Bean, 1998). Sua denominação química é diidrocloreto de (1S, 2S) -2 -[2 -[3 -(2 – benzimidazolil) propil] metilamina] etil] -6 – fluor -1, 2, 3, 4-tetrahidro-1-isopropil-2-naftil methoxiacetato (Fig.1). Ele é um derivado do tetralol com peso molecular 568,56.

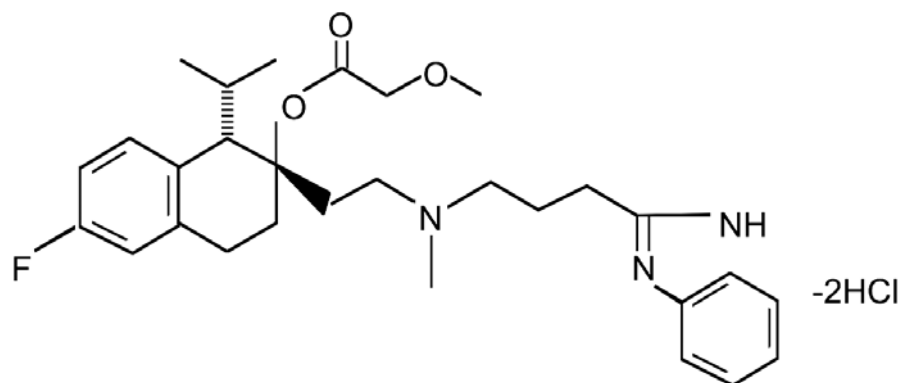


Figura 1: Fórmula estrutural do mibefradil.

O mibefradil bloqueia os canais tipo-T com potência 5 a 15 vezes maior que as outras variedades de canais de cálcio (IUPHAR, 2000; Xi e Angus, 2001). Embora ele não interaja com os receptores das DHP e ligar-se aos receptores fenilalquilaminas, sua farmacocinética e efeitos cardiovasculares lembram estas drogas (Triggle, 1996). Contudo, em humanos e preparações de motoneurônios espinhais de ratos, o mibefradil também parece inibir canais tipo N, P ou Q (Viana *et al.*, 1997; Meder *et al.*, 1997;., 1997; Meder *et al.*, 1999 *apud* Xi e Angus, 2001). Porém, nas concentrações de

0,3 a 30 μM , não foram observados efeitos sobre canais tipo-N em preparações de nervos simpáticos de ratos e cobaias (Xi e Angus, 2001).

O mibefradil tem alta biodisponibilidade e lento início de ação (Triggle, 1996). Atinge a concentração plasmática máxima em 24 horas e apresenta meia-vida superior a 12 horas ($t_{1/2} = 17\text{-}25\text{ h}$). (Triggle, 1996; Welker *et al.*, 1998). Sua ligação a proteínas plasmáticas é superior a 99,5%, predominando a $\alpha 1$ - glicoproteína ácida. O *clearance* não parece ser afetado por raça, sexo, idade ou peso corporal (Welker *et al.*, 1998). No homem, a droga é completamente metabolizada por duas vias, quais sejam, hidrólise e oxidação catalisadas por esterase e citocromo P450(CYP)3A4, respectivamente. Conseqüentemente, menos de 3% da dose oral é excretada na urina na forma intacta. Assim, a função renal não altera sua farmacocinética (Welker *et al.*, 1998). A administração de doses orais múltiplas (50 a 100 mg) está associada à inibição da via do CYP3A4, causando o aumento da meia-vida e da biodisponibilidade. As inúmeras interações medicamentosas que resultam destes efeitos levaram à retirada da droga do mercado (Welker *et al.*, 1998).

Todorovic e Lingle (1998) afirmam que os efeitos clínicos do mibefradil são predominantemente periféricos, visto que ele não penetra a barreira hematoencefálica *in vivo*. De fato, a despeito do comprovado efeito do mibefradil de bloqueio dos canais de cálcio neuronais *in vitro*, Viana *et al.* (1997) relatou que os únicos efeitos centrais da administração periférica do mibefradil são tonteiras leves ou cefaléia.

Não obstante, apesar de inapropriado como medicamento, o mibefradil é uma importante ferramenta para a investigação das funções dos canais de cálcio tipo-T.

1.6 DETERMINANTES AMBIENTAIS E NEURAIS DA HIERARQUIA DAS RESPOSTAS DE DEFESA DE RATOS

O repertório de defesa dos ratos selvagens depende tanto da distância presa-predador quanto da disponibilidade de fuga. Na impossibilidade de fuga, os ratos apresentam a resposta de congelamento (imobilidade e exoftalmia) quando o predador encontra-se a 2,5 m de distância, ameaças (guinchos, exposição das presas) a 1 m de distância e ataques com saltos dirigidos ao predador na iminência do contato físico, ou

seja, em distâncias inferiores a 0,5 m. Quando há uma via de escape, os ratos não congelam. Ao contrário, fogem quando o predador encontra-se a 2,5 m de distância, e apresentam ameaças e saltos na iminência da captura (Blanchard *et al.*, 1990) (Fig. 2).

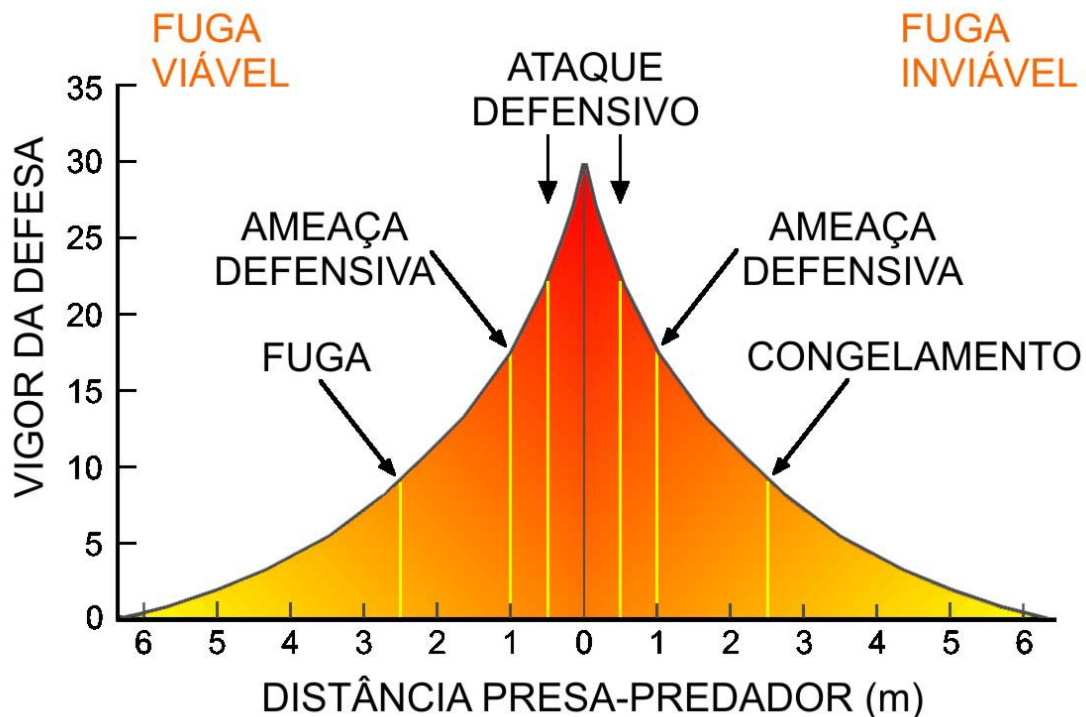


Figura 2: Hierarquia das respostas de defesa do rato selvagem em função da distância entre presa e predador e da possibilidade de fuga (redesenhado de Blanchard *et al.*, 1990).

Embora os ratos albinos raramente ataquem o experimentador, as respostas de defesa eliciadas pela estimulação da MCPA assemelham-se àquelas do rato selvagem na ausência de uma via de escape (Sudré *et al.*, 1993; Bittencourt *et al.*, 2004, 2005). De fato, tanto a estimulação elétrica quanto química da MCPA produz os comportamentos de congelamento (imobilidade e exoftalmia) e fuga (trote e galope) com estímulos progressivamente maiores, reproduzindo as respostas da presa à aproximação gradual do predador. Nas intensidades mais elevadas os ratos também apresentam saltos 'de fuga', uma vez que são dirigidos à borda da arena. Estes saltos podem ser interpretados como um vestígio 'domesticado' dos saltos de ataque do rato selvagem. Sudré *et al.* (1993) também demonstraram que a hierarquia destas respostas desaparece quando os estímulos são apresentados de forma abrupta e aleatória. Nesta condição, as respostas de imobilidade, corrida (galope ou trote) e

saltos têm a mesma probabilidade de ocorrência. Este repertório não-hierárquico é similar àquele das presas surpreendidas por uma emboscada (Sudré *et al.*, 1993).

Sudré *et al.* (1993) sugeriram que o repertório hierárquico da estimulação da MCPA com intensidades crescentes era devido às correntes de potássio (K_B) ativadas pela entrada de cálcio nos estímulos anteriores de menor intensidade. Assim, os limiares crescentes de imobilidade, corrida e saltos seriam devidos aos potenciais de pós-hiperpolarização (AHP) dependentes da saída de potássio. Diferentemente, na estimulação da MCPA com estímulos isolados aplicados em intervalos de 24h, não haveria a ativação preliminar das correntes de cálcio, rompendo a hierarquia e simulando as respostas dos ratos a um ataque de emboscada. Contudo, este modelo não explica porque as respostas de congelamento (exoftalmia e imobilidade) são as respostas de menor limiar.

As propriedades eletrofisiológicas dos neurônios da MCPA foram pouco estudadas, bem como a participação do cálcio no controle destes fenômenos. Porém, evidências de experimentos *in vitro* sugerem que a atividade dos neurônios da MCPA tenha alta dependência do cálcio extracelular (Sánchez *et al.*, 1988). Visto que os canais de cálcio voltagem-dependentes exercem um importante papel na modulação da atividade neural de várias áreas do SNC (Llinás e Yarom, 1981), as diversas respostas da reação de defesa do rato poderiam ser controladas pela atividade de tipos diferentes de canais de cálcio dos neurônios pós-sinápticos. De fato, Schenberg *et al.* (2000) verificaram a participação diferencial dos canais de cálcio tipo-L na produção das respostas de defesa produzidas por estimulação da MCPA. Demonstraram, assim, que o verapamil e $CoCl_2$, respectivamente, um antagonista e um modulador de canais de cálcio, bloqueiam todas as respostas de defesa, exceto a defecação e a micção. No entanto, estas drogas produziram a atenuação indiscriminada das respostas de exoftalmia, imobilidade, corrida (trote e/ou galope) e saltos. Espera-se, por outro lado, que as menores intensidades associadas às respostas de exoftalmia e imobilidade ativem, primeiramente, as correntes de cálcio de baixo limiar que são operadas por canais tipo-T em potenciais próximos ou inferiores aos potenciais de repouso.

Portanto, o presente estudo investigou o papel dos canais de cálcio tipo-T na gênese das respostas de defesa do rato produzidas por estimulação da MCPA.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo analisar o papel dos canais de cálcio tipo-T nos limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação da MCPA. Para isto, foi utilizado o mibefradil, um antagonista seletivo de canais de cálcio tipo-T, e seus efeitos sobre estes limiares foram examinados por meio da análise logística de limiares (Schenberg *et al.*, 1990; Bittencourt *et al.*, 2004, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, pesando 290 ± 20 g, fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais eram mantidos em gaiolas individuais com paredes de vidro (25 x 15 x 30 cm) e assoalho coberto com jornal e maravalha. Os ratos tinham livre acesso à água e comida e eram mantidos em ambiente com ciclo de iluminação de 12 h (luzes acesas às 6:00 h) e temperatura controlada (20-25°C). Dos 72 animais utilizados, 20 foram incluídos na análise estatística pois tiveram os eletrodos localizados nas áreas de interesse deste trabalho.

3.2 QUIMITRODO

Os quimitrodos eram confeccionados com uma cânula-guia de aço inoxidável de 600 μm de diâmetro externo e 11 mm de comprimento, à qual era colado um fio de aço inoxidável (Califórnia Fine Wire Company, Grover City, EUA) de 250 μm de diâmetro externo e 5 mm de comprimento, isolado em toda extensão exceto na seção transversal de sua extremidade. A cânula-guia, que servia de eletrodo indiferente, e o eletrodo, eram soldados a um soquete de circuito integrado (Cellis, BCPT), permitindo a fixação deste na prótese de acrílico e posterior conexão ao cabo de estimulação elétrica, ou à agulha de microinfusão da droga (Fig. 3).

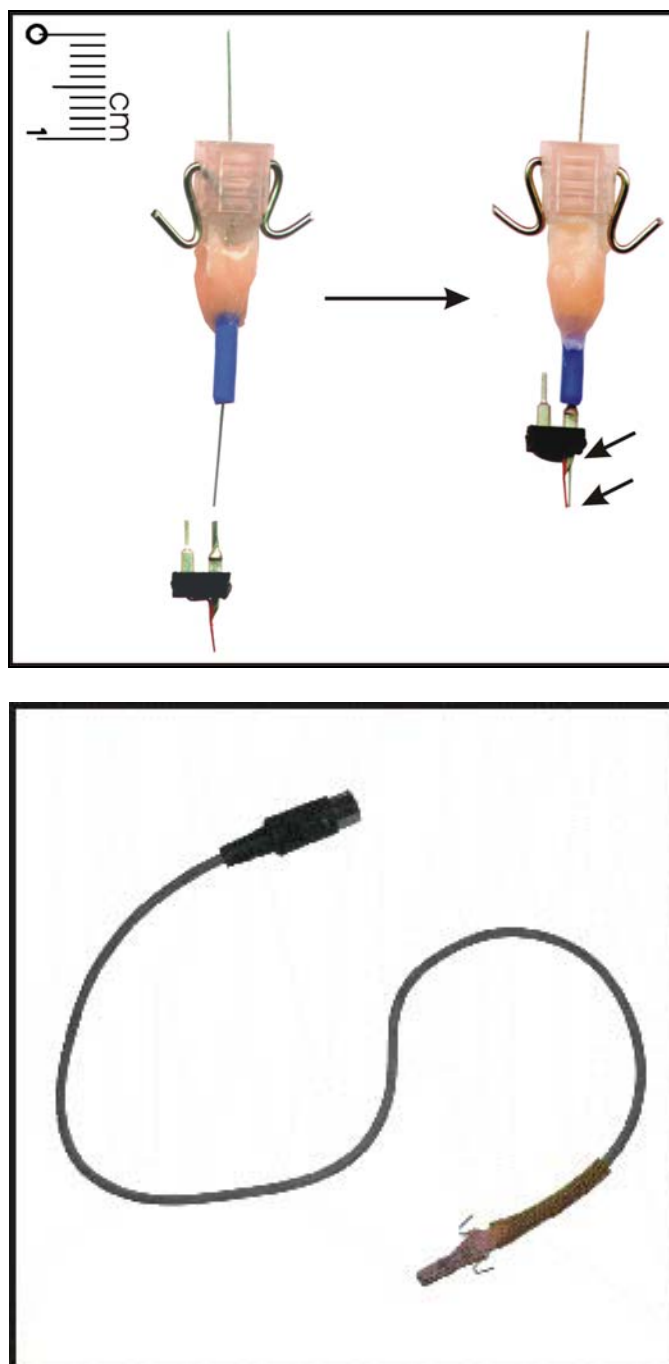


Figura 3: Quimetrodo, agulha de injeção e cabo de estimulação. O painel superior mostra o quimetrodo e a agulha de injeção separada (esquerda) e acoplados (direita). Note-se que a agulha e o eletrodo atingem pontos contíguos. Somente a região delimitada pelas setas menores é introduzida no cérebro do rato. Os ganchos de aço inoxidável servem para fixar a agulha de injeção ao quimetrodo por meio de pequenos elásticos e ganchos similares ancorados à prótese cirúrgica.

3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais eram anestesiados com hidrato de cloral (0,4 g/kg, IP) e fixados em aparelho estereotáxico (ICB-USP, Brasil), com bregma e o lâmbda situados no mesmo plano horizontal.

Após a tricotomia da parte superior da cabeça, era feita a assepsia com álcool a 70% e infiltração subcutânea da área exposta com 0,2 ml de solução de cloridrato de Lidocaína 1% com adrenalina a 1:200.000. A calota craniana era exposta através da remoção de um segmento oval de pele e tecido subcutâneo com aproximadamente 10 mm de diâmetro, na altura da sutura lambdóide.

Após a superfície óssea estar completamente seca, eram feitos 5 orifícios na calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica, na parte anterior e posterior de cada osso parietal e o último na linha mediana, no osso occipital, nas quais eram inseridos 5 parafusos, que auxiliavam na fixação de prótese. (Fig.4 A)

A seguir, o centro do campo cirúrgico era desgastado com a broca odontológica adiamantada (KG Sorensen 1016) até permitir a completa remoção do osso com o auxílio de uma pinça.

O quimitrodo era então introduzido verticalmente através do orifício e implantado 0,4 mm lateral ao lâmbda e introduzidos à profundidade de 4,8 mm a partir da superfície do seio venoso.(Figs.4 B e C)

Após a hemostasia do campo cirúrgico, recobria-se a superfície craniana com resina acrílica autopolimerizável de secagem rápida (Jet[®], SP, Brasil) para ancoragem do quimitrodo, permitindo que a resina aderisse às bordas do campo cirúrgico para evitar a entrada de microorganismos.

O quimitrodo era protegido por um cilindro de plástico com 10 mm de altura e diâmetro. Dois ganchos de aço inoxidável eram presos neste cilindro para facilitar a conexão do cabo de estimulação ao quimitrodo.(Fig. 4D)

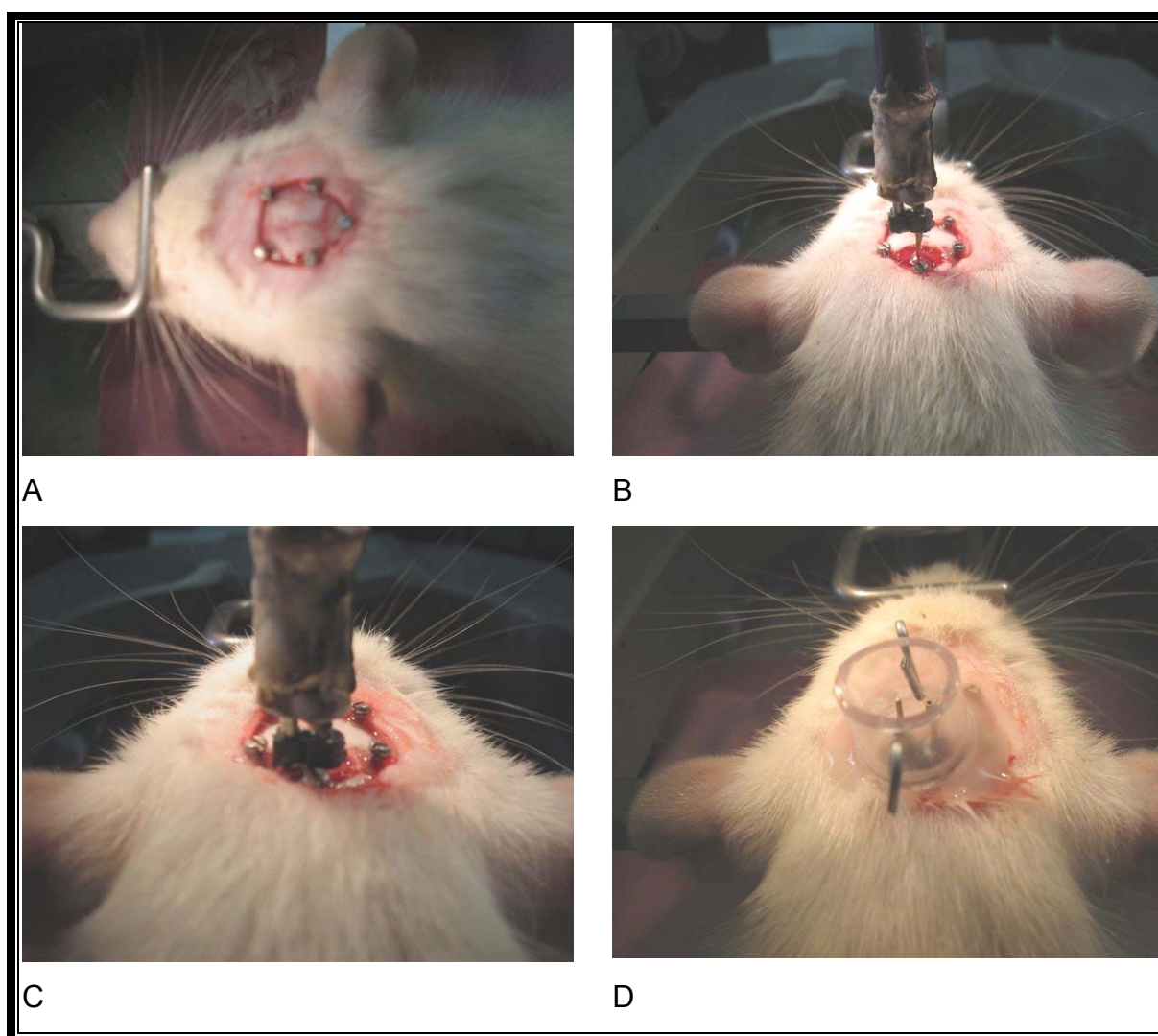


Figura 4. Seqüência dos procedimentos cirúrgicos: A) exposição da calota craniana ao nível do lâmbda e fixação dos parafusos, B) trepanação e aproximação do quimitrodo, C) inserção do quimitrodo, D) fixação com acrílico autopolimerizável da prótese e protetor, bem como dos ganchos de conexão ao cabo de estimulação.

Um mandril de aço inoxidável, do mesmo comprimento da cânula, evitava sua obstrução.

No final da cirurgia aplicava-se penicilina-G-benzatina (24.000 UI, IM) e alojava-se o animal em uma gaiola aquecida para evitar hipotermia até que o mesmo se recuperasse da anestesia.

Cinco dias após a cirurgia, os animais eram submetidos às sessões de EIC.

3.4 EQUIPAMENTOS

O registro comportamental era feito com a observação dos animais em uma arena cilíndrica de acrílico transparente com 50 cm de altura e diâmetro.

Os animais eram estimulados com pulsos senoidais (60 Hz, CA) gerados por um estimulador de corrente alternada (Marseillan, 1977). A intensidade dos pulsos era aumentada em passos de 5 μ A em intervalos de três minutos, até o limite máximo de 70 μ A. Os estímulos eram aplicados através de um cabo flexível (Fig. 3) acoplado a um conector giratório de mercúrio e monitorados através de um osciloscópio (V-121 Hitachi-Denshi, Malásia).

Os experimentos eram realizados em sala com atenuação acústica e com temperatura ambiente em 25° C.

3.5 REGISTROS COMPORTAMENTAIS

Os itens comportamentais foram registrados de modo binário, isto é, se foram emitidos ou não, durante os 30 s de EIC, não importando latência ou o número de vezes que ocorria durante este período, para cada animal. Somente a resposta limiar de cada item comportamental, ou seja, a resposta observada com a menor intensidade de estimulação foi utilizada para análise. A frequência acumulada das respostas limiares em função da intensidade de estimulação foi computada para o ajuste das funções logísticas.

3.5.1 Etograma do Rato

As respostas de defesa do rato à EIC foram registradas diretamente pela experimentadora segundo um etograma elaborado previamente, conforme se segue:

Dormir –	Postura horizontal com olhos fechados e sem atividade olfativa, e com relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco, cabeça e pescoço e pela flexão dos membros.
Repouso –	Postura horizontal com olhos abertos ou semi-abertos, atividade olfativa reduzida e relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco e pela flexão dos membros, e/ou rebaixamento da cabeça e pescoço. Com a cabeça erguida o rato assume uma “postura de esfinge”.

Olfação –	Jorros de atividade olfativa indicada pelo movimento do focinho e vibrissas.
Esquadrinhar –	Exploração visuo-motora do ambiente caracterizada por movimentos laterais da cabeça, geralmente, acompanhados de olfação.
Autolimpeza –	Postura ereta sobre as patas posteriores flexionadas (“rato sentado”), acompanhada da manipulação repetitiva e seqüencial dos pêlos da cabeça, tronco e genitálias, usando as patas dianteiras ou a boca.
Levantar –	Postura ereta com extensão das patas posteriores.
Marcha –	Locomoção lenta do animal com movimentos de apoio e balanço em oposição de fase das patas contralaterais.
Imobilidade Tensa–	Cessar brusco de todos os movimentos, exceto da respiração, freqüentemente acompanhado, da extensão dos membros, elevação do tronco, orelhas e pescoço e, às vezes, da cauda, indicando o aumento do tônus muscular. O cessar brusco das atividades podia resultar em posturas anômalas.
Trote –	Locomoção rápida do animal ao longo do perímetro da arena (peritaxia) mantendo o padrão da marcha.
Galope –	Locomoção muito rápida ao longo do perímetro da arena, alternando movimentos de apoio e projeção dos membros anteriores e posteriores.
Saltos –	Impulso vertical ou oblíquo em direção à borda da arena.
Exoftalmia –	Abertura máxima dos olhos que assume a forma esférica e cor brilhante, presumivelmente, devida a uma maior entrada de luz.
Defecação –	Eliminação de fezes.
Micção –	Eliminação de urina.

3.6 DROGAS

O di-hidrocloreto de mibefradil (Posicor®) foi gentilmente doado pelos Laboratórios Roche da Suíça. Como anestésico, utilizamos o hidrato de cloral (Reagen, Brasil). O mibefradil foi dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) na concentração de 18,7 mM.

3.7 PROCEDIMENTO ESPECÍFICO.

Os animais foram submetidos a 4 sessões de estimulação em intervalos de 24 h, quais sejam: 1) sessão de triagem, 2) sessão 10 min após a administração de mibefradil, 3) sessão 24 h após a administração de mibefradil e 4) sessão 48 h após a administração de mibefradil.

Cinco dias após a cirurgia, os animais (n=20) foram conectados ao cabo de estimulação e colocados na arena. Após um período de 10 a 15 minutos de habituação ao novo ambiente, os ratos eram estimulados com estímulos sequenciais com 30 seg de duração em intervalos regulares de 3 min. A intensidade de cada estímulo era aumentada em passos de 5 μ s até que o rato apresentasse a resposta de fuga. Somente os ratos que apresentaram as respostas de defesa com intensidades inferiores a 50 μ A na sessão de triagem foram selecionados para o tratamento com mibefradil. Através de injeções intracranianas, 24 horas após a sessão de triagem, o mibefradil à 18,7 mM foi administrado num volume de 400nL (7,5 nanomoles) ao longo de 8 min (50 nL/min), utilizando-se uma microseringa de 1,0 μ l (Hamilton 7001 H, Reno, EUA) e uma bomba de microinjeção (Harvard 906, Dover, EUA) (fig.5). A microseringa foi acoplada a um tubo de polietileno (PE -10, Clay Adams, EUA) em cuja extremidade fixou-se uma agulha odontológica de 0,3 mm de diâmetro externo e com comprimento igual ao do eletrodo.



Figura 5. Bomba de microinjeção (Harvard 906, Dover, EUA).

Para impedir o refluxo da solução injetada, um pequeno cilindro de polietileno ajustava a agulha firmemente à cânula-guia. Em seguida, os animais eram conectados ao cabo de estimulação e colocados na arena. Após período de 10 a 15 min de adaptação ao ambiente, iniciava-se a estimulação seguindo o mesmo padrão da sessão triagem.

Após 24 e 48 horas os animais foram novamente estimulados com a finalidade de se verificar a resposta do mibefradil e sua duração.

3.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Ao término dos experimentos, os animais eram perfundidos por método gravimétrico para análise histológica dos cérebros. Após a exposição do coração e da ligadura da aorta descendente, introduzia-se uma agulha no ventrículo esquerdo do rato. A agulha estava conectada a 2 frascos, contendo salina (NaCl 0,9 %) ou solução de formaldeído (10%), situados 1,5 m acima do rato. O átrio direito era então seccionado e a preparação era seqüencialmente perfundida com 100 mL salina e 100 mL de formaldeído. Os ratos eram decapitados e suas cabeças mantidas em

formaldeído (10%) por, pelo menos, 3 dias. Em seguida, os cérebros eram retirados da caixa craniana e colocados em solução de formaldeído 10% (pH 7,6) por um período de, pelo menos, 4 dias.

Os cérebros eram preparados em blocos da região mesencefálica que eram posicionados em um micrótomo de congelamento (Ernst Leitz, Wetzlar, Germany) e seccionados em cortes de 60 μm de espessura. Os cortes eram montados em lâminas previamente gelatinizadas e submetidos à secagem em estufa de baixa temperatura (38 °C). Em seguida, os cortes eram corados com vermelho neutro (Sigma, EUA) e montava-se as lâminas com DPX (Aldrich Chemical Company, EUA). Os sítios estimulados eram identificados com o auxílio de uma câmera lúcida de projeção e registrados em diagramas coronais do atlas do cérebro de rato de Paxinos e Watson (1986).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ratos cujos eletrodos localizaram-se nas colunas dorsais, na coluna lateral da MCPA e camadas adjacentes do colículo superior foram submetidos à análise estatística. As curvas de probabilidade de resposta foram obtidas por ajuste logístico das freqüências acumuladas de resposta em função do logaritmo das intensidades de corrente, freqüência ou volume, de acordo com o modelo,

$$P(y_{ij}|x_{ij}) = [1 + \exp(-(\alpha_j + \beta_j x_{ij}))]^{-1}$$

onde P é a probabilidade esperada da resposta y_{ij} para um dado estímulo x_{ij} , α_j é o intercepto e β_j a inclinação da *jésima* curva intensidade-resposta (sessões dos dias 1 – 4).

Efeitos significantes do estímulo foram avaliados pelo chi-quadrado de Wald ($\chi^2_w = [\beta/\text{e.p.}]^2$), onde e.p. é o erro padrão de β_j . As curvas intensidade-resposta foram parametrizadas por meio de variáveis indicadoras (0 e 1) e comparadas através de testes de coincidência por razão de verossimilhanças, para locação ou paralelismo das regressões. As regressões foram comparadas pela diferença dos desvios de verossimilhança do modelo completo (k parâmetros) e dos respectivos modelos reduzidos ($k-r$ parâmetros), proporcionando valores de χ^2 com r graus de liberdade (χ^2_r). Os χ^2_r dos testes gerais de locação e paralelismo (6 e 3 g.l., respectivamente), assim como o χ^2 de Wald, foram considerados significantes ao nível de 5%. Os χ^2_r dos

testes pareados de locação e paralelismo (1 g.l.) foram considerados significantes ao nível de 5% segundo o critério de Bonferroni ($p=0,008$ para a comparação de 4 curvas de limiares). O ajuste por máxima verossimilhança foi realizado pelo procedimento “Logistic” do programa SAS (SAS®, Cary, EUA). A intensidade mediana (I_{50}) assim como seu erro padrão (e.p.) e o respectivo intervalo de confiança (I.C. 95%) foram computados pelas fórmulas que se seguem,

$$\text{Log}(I_{50}) = -\alpha/\beta$$

$$I_{50} = 10^{-\alpha/\beta}$$

$$\text{s.e.}\{\text{Log}(I_{50})\} = \{[\text{Var}(\alpha) - 2(\alpha/\beta)\text{Cov}(\alpha, \beta) + (\alpha/\beta)^2\text{Var}(\beta)]/\beta^2\}^{1/2}$$

$$\text{s.e.}(I_{50}) = I_{50}\{\text{s.e.}[\text{Log}(I_{50})]\}$$

$$\text{I.C. 95\%}(I_{50}) = \pm 1,96\{\text{s.e.}(I_{50})\}$$

Onde as variâncias (Var) e covariâncias (Cov) dos parâmetros foram obtidas pela matriz estimada de covariância do procedimento Logistic. A descrição detalhada destes métodos pode ser encontrada em Collett (1991).

4 RESULTADOS

Os eletrodos dos ratos cuja estimulação na sessão de triagem induziu a reação de defesa com intensidades inferiores a 50 μ A localizaram-se majoritariamente na MCPA (75%) (Fig.6). Em adição, 4 eletrodos (20%) localizaram-se nas camadas profundas do CS e apenas um na camada intermediária do CS (5%). Dentre os 15 eletrodos localizados na MCPA, a maior parte localizou-se na MCPAdm (40%) e MCPAdl (47%), e apenas 2 (13%) na MCPAl. Por fim, a maioria dos eletrodos da MCPA (67%) localizou-se no terço intermediário desta estrutura (-7,04 a -7,8 mm posterior ao bregma), 2 no terço rostral (13%) e 3 no caudal (20%).

Exceto pela resposta de defecação na sessão com administração de mibefradil, todas as respostas apresentaram regressões estatisticamente significantes ($P < 0,05$) (Figs.7-8).

Não foram observadas diferenças significantes de paralelismo em relação à sessão triagem (Fig.7, Tab.1). Contudo, a administração aguda de mibefradil causou um aumento acentuado dos limiares das respostas de defesa em relação àqueles da sessão triagem (Figs.7-9). Dentre as respostas somáticas, o maior aumento foi observado para os limiares de imobilidade ($\Delta I_{50}=95\%$; $\chi^2=85,7$; g.l.=1; $P < 0,0001$). Não obstante, aumentos acentuados também foram observados para as respostas de trote ($\Delta I_{50}=68\%$; $\chi^2=17,9$; g.l.=1; $P < 0,0001$), galope ($\Delta I_{50}=43\%$; $\chi^2=17,3$; g.l.=1; $P < 0,0001$) e salto ($\Delta I_{50}=38\%$; $\chi^2=20,9$; g.l.=1; $P < 0,0001$). Por outro lado, dentre as respostas autonômicas, a defecação foi virtualmente abolida, não apresentando ajuste significativo da regressão logística (Fig.7). O mibefradil também causou aumentos acentuados dos limiares de micção ($\Delta I_{50}=115\%$; $\chi^2=20,9$; g.l.=1; $P < 0,0001$) e exoftalmia ($\Delta I_{50}=39\%$; $\chi^2=26,0$; g.l.=1; $P < 0,0001$).

Aumentos significantes dos limiares ainda foram observados um dia após a administração de mibefradil para as respostas de imobilidade ($\Delta I_{50}=24\%$; $\chi^2=13,2$; g.l.=1; $P < 0,001$), exoftalmia ($\Delta I_{50}=22\%$; $\chi^2=10,9$; g.l.=1; $P < 0,001$) e, em menor grau, micção ($\Delta I_{50}=17\%$; $\chi^2=8,6$; g.l.=1; $P < 0,005$). Os limiares retornaram aos valores basais 48h após a administração de mibefradil (Figs.7,9).

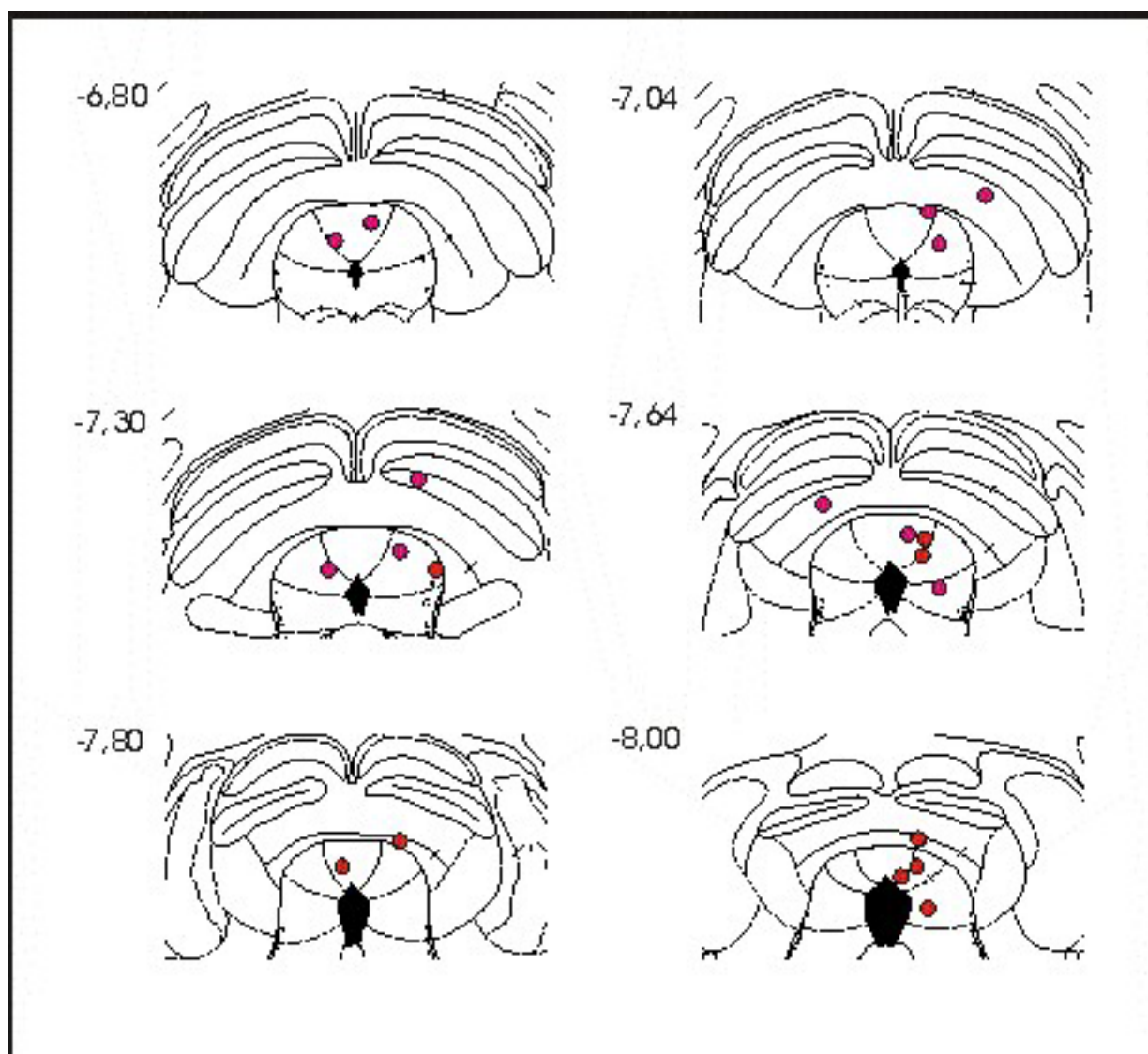


Figura 6. Sítios de estimulação dos ratos tratados com mibefradil (N = 20). Os números indicam as coordenadas antero-posteriores em relação ao bregma (mm), - 6,80 no terço rostral, de -7,04 a -7,80 no terço intermediário e a -8.00 no terço caudal.

Tabela 1. Efeitos do mibefradil sobre os parâmetros das curvas intensidade-resposta dos comportamentos de defesa produzidos por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal. I_{50} – mediana, $\beta_{\max}$ – inclinação da curva dose-resposta em I_{50} . * $P < 0,05$, valores significativamente diferentes da sessão triagem.

Resposta	Sessão	$I_{50} \pm EP$ (μA)	$\beta_{\max} \pm EP$
Exoftalmia	Triagem	31,7 $\pm$ 0,2	2,52 $\pm$ 0,34
	Mibefradil	44,3 $\pm$ 0,0*	1,70 $\pm$ 0,25
	+24h	38,7 $\pm$ 0,2*	1,70 $\pm$ 0,24
	+48h	30,9 $\pm$ 0,2	2,93 $\pm$ 0,36
Imobilização	Triagem	37,3 $\pm$ 0,2	2,47 $\pm$ 0,32
	Mibefradil	72,8 $\pm$ 2,2*	1,64 $\pm$ 0,33
	+24h	46,2 $\pm$ 0,0*	2,00 $\pm$ 0,28
	+48h	37,0 $\pm$ 0,2	2,63 $\pm$ 0,34
Trote	Triagem	51,4 $\pm$ 0,2	1,95 $\pm$ 0,31
	Mibefradil	86,6 $\pm$ 6,1*	1,14 $\pm$ 0,35
	+24h	66,4 $\pm$ 2,1	1,27 $\pm$ 0,32
	+48h	52,7 $\pm$ 0,2	1,81 $\pm$ 0,38
Galope	Triagem	55,1 $\pm$ 0,3	2,14 $\pm$ 0,37
	Mibefradil	78,9 $\pm$ 3,5*	1,71 $\pm$ 0,48
	+24h	72,3 $\pm$ 3,0	1,37 $\pm$ 0,40
	+48h	53,8 $\pm$ 2,0	2,53 $\pm$ 0,44
Salto	Triagem	58,3 $\pm$ 0,5	2,34 $\pm$ 0,40
	Mibefradil	80,4 $\pm$ 3,4*	2,10 $\pm$ 0,57
	+24h	79,7 $\pm$ 4,7	1,25 $\pm$ 0,41
	+48h	61,7 $\pm$ 0,8	2,17 $\pm$ 0,51
Micção	Triagem	56,9 $\pm$ 0,7	1,55 $\pm$ 0,29
	Mibefradil	122,1 $\pm$ 15,1*	0,94 $\pm$ 0,29
	+24h	66,6 $\pm$ 1,3	2,27 $\pm$ 0,55
	+48h	60,0 $\pm$ 0,7	1,90 $\pm$ 0,48
Defecação	Triagem	95,1 $\pm$ 10,0	0,75 $\pm$ 0,25
	Mibefradil	--	--
	+24h	75,7 $\pm$ 3,1	1,63 $\pm$ 0,45
	+48h	64,1 $\pm$ 1,1	1,94 $\pm$ 0,43

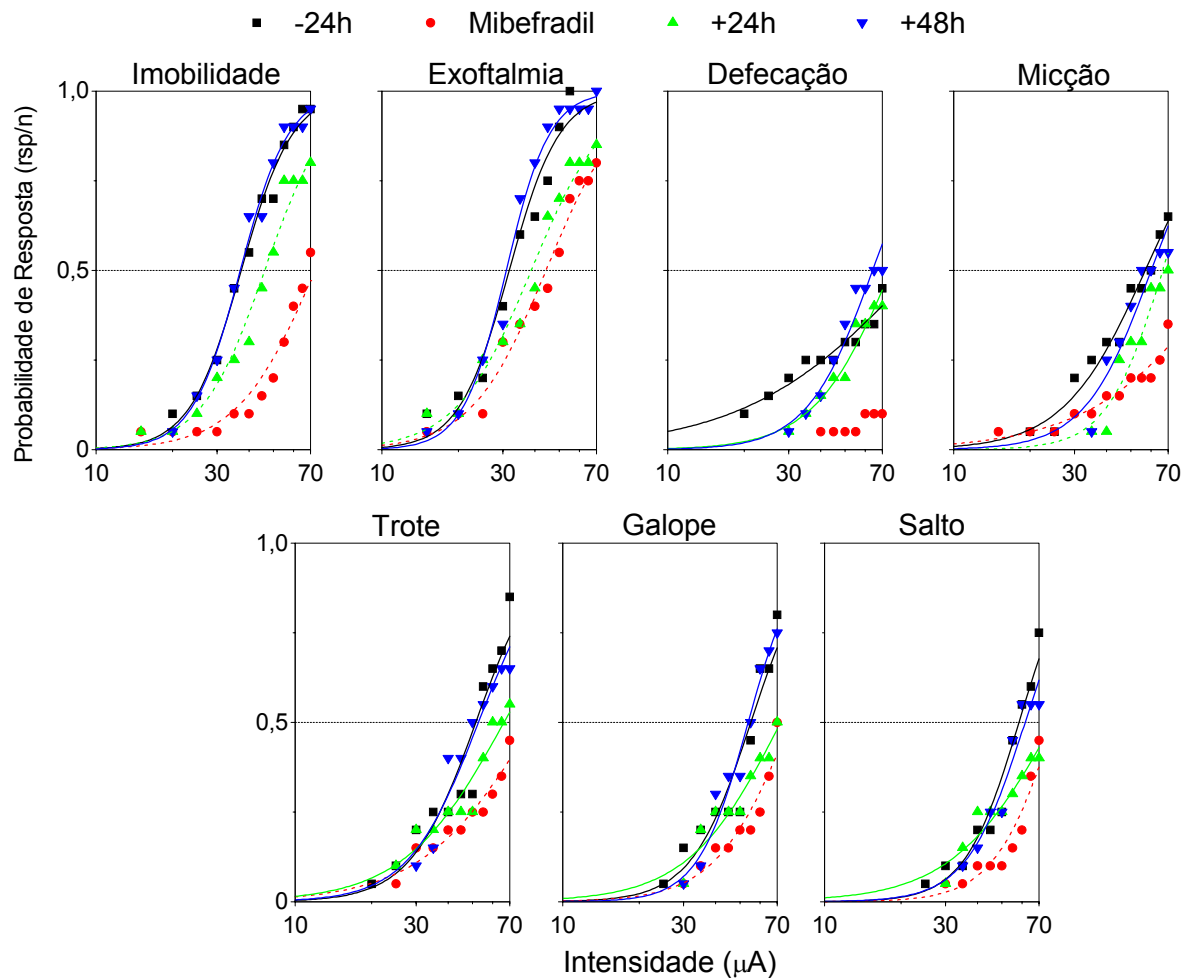


Figura 7. Efeitos do mibefradil sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal. As curvas intensidade-resposta representam as funções de distribuição de probabilidade das sessões triagem (-24h), 10 min após a administração de mibefradil (mibefradil) e nos dois dias subsequentes (+24h e +48h) ajustadas segundo o modelo logístico. rsp – número de animais que apresentaram a resposta, n – número total de ratos estimulados. As linhas tracejadas indicam as diferenças significantes em relação à sessão triagem (teste do χ^2 da razão de verossimilhanças, critério de Bonferroni).

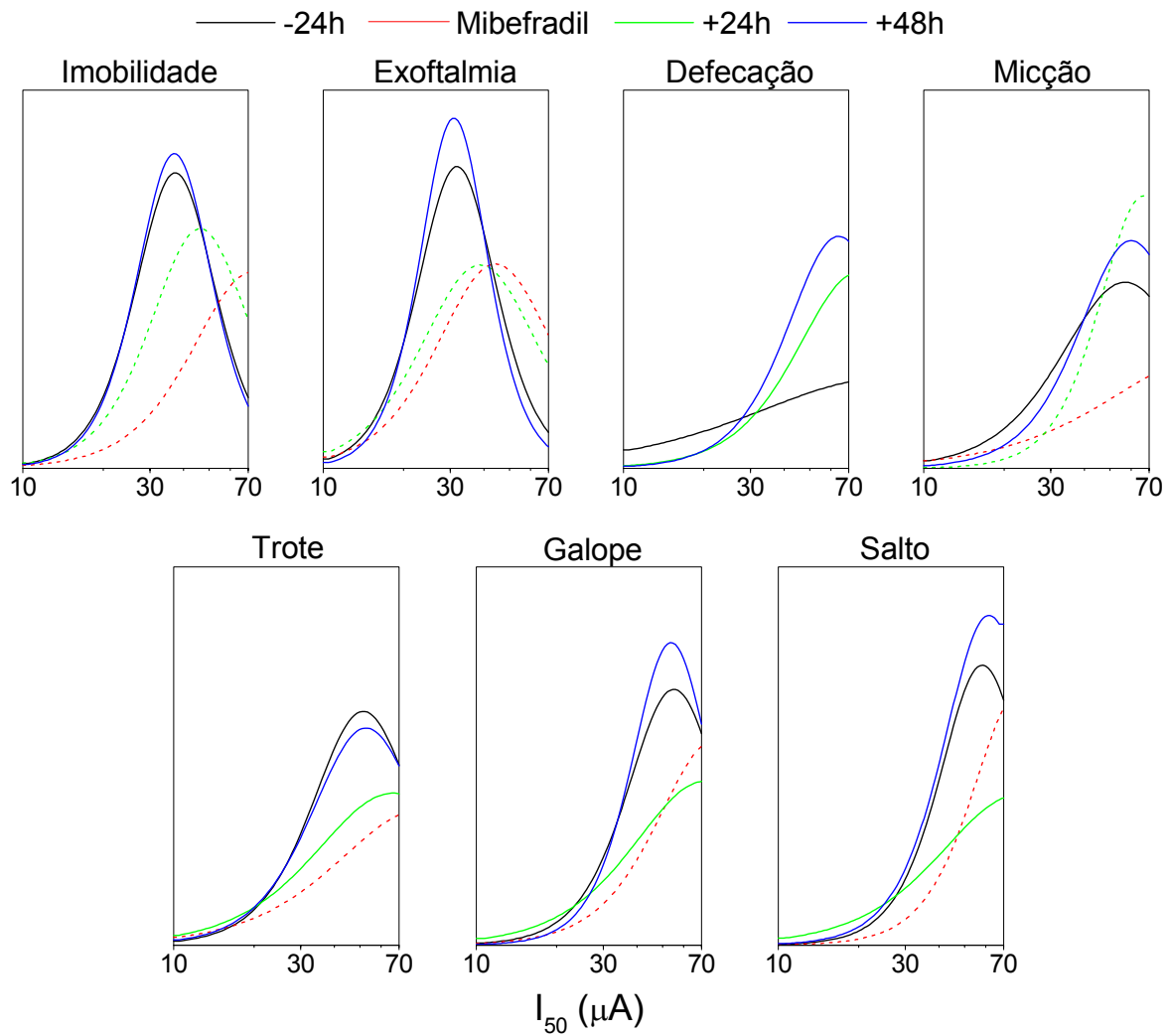


Figura 8. Efeitos do mibefradil sobre a distribuição dos limiares (funções de densidade de probabilidade) das respostas de defesa induzidas por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal. As linhas tracejadas indicam as diferenças significantes em relação à sessão triagem (teste do χ^2 da razão de verossimilhanças, critério de Bonferroni). Outros detalhes como na Fig.7.

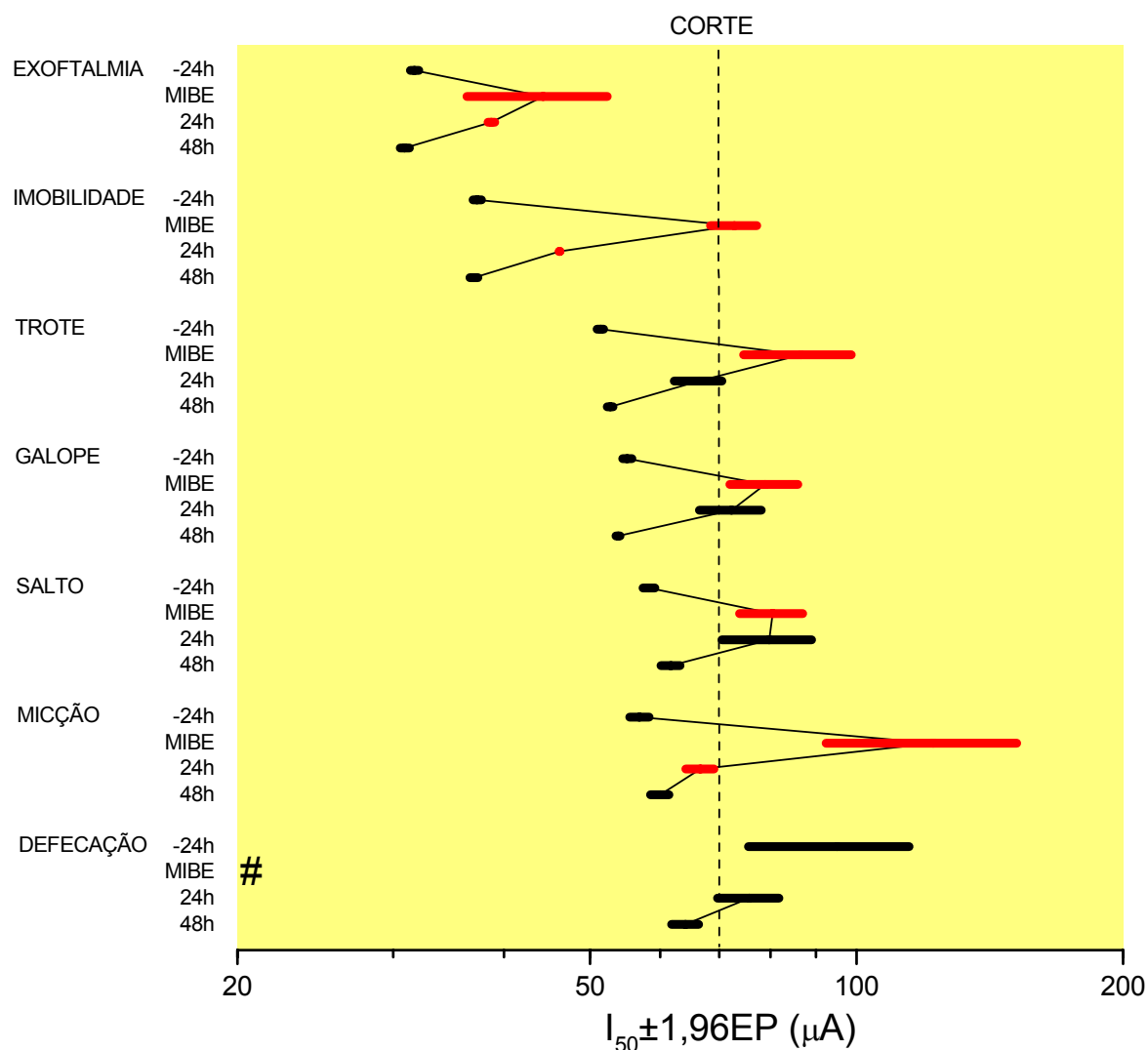


Figura 9. Intervalos de confiança (I.C.95%) dos efeitos do mibefradil sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal. Os I.C.95% estão representados pelas barras horizontais. As linhas conectam os valores medianos (I_{50}) dos limiares. Os IC95% vermelhos indicam distribuições estatisticamente diferentes da sessão triagem. # mediana não estimável devido à ausência de ajuste logístico.

5 DISCUSSÃO

A reação de defesa de ratos, tanto natural quanto induzida por estimulação da MCPA, é composta por um conjunto heterogêneo de respostas somáticas e autonômicas. Embora este fato seja conhecido desde os estudos pioneiros de Hess e colaboradores de meados do século passado (Hess e Brügger, 1943; Hess, 1954), os mecanismos subjacentes a cada resposta, bem como à sua organização temporal (hierarquia), ainda não foram esclarecidos. Possivelmente, as dificuldades de registro e quantificação destas respostas foram os principais impedimentos para a consecução desta tarefa. Em vista destes fatos, elas passaram a serem genericamente denominadas de 'reação de defesa', desconsiderando-se os mecanismos de sua produção, individualmente. Não por acaso, a maioria dos estudos sobre a reação de defesa induzida por estimulação intracraniana é apenas qualitativa ou, no máximo, semiquantitativa. Tal como foi demonstrado em estudos anteriores (Sudré *et al.*, 1993; Schenberg *et al.*, 1998; Bittencourt *et al.*, 2004, 2005), a estimulação da MCPA e camadas profundas do CS com pulsos senoidais de intensidades crescentes eliciu as respostas de exoftalmia, imobilidade, micção, defecação, trote, galope e salto em forma seqüencial. Este repertório reproduz a hierarquia natural do repertório de defesa do rato selvagem (Blanchard *et al.*, 1981). No presente estudo utilizamos um método original para a quantificação destas respostas, a análise logística de limiares (Schenberg *et al.*, 1990). De posse deste método, avaliamos os efeitos do mibefradil, um bloqueador seletivo de canais de cálcio tipo-T, sobre as respostas de defesa induzidas pela estimulação do teto do mesencéfalo.

Por outro lado, os canais de cálcio voltagem-dependentes exercem um papel fundamental na determinação do padrão de disparo neuronal. Embora estes mecanismos tenham sido relacionados aos ritmos de disparo de neurônios talâmicos durante o ciclo sono-vigília (Steriade e Llinás, 1988), ou aos ritmos de disparo da oliva inferior (Llinás e Yarom, 1981), é possível que eles também tenham amplas funções no SNC. O presente estudo baseou-se na possibilidade de que as várias respostas da reação de defesa possam exprimir padrões distintos de disparo neuronal, nos quais os canais de cálcio desempenhariam um papel fundamental. Em particular, estudos anteriores de nosso laboratório já haviam mostrado que bloqueio do canal de cálcio tipo-L atenua todas as respostas de defesa, exceto a defecação e a micção (Schenberg *et al.*, 2000). Contudo, enquanto os limiares da reação de defesa retornaram aos valores basais após o bloqueio destes canais pelo verapamil, o cloreto de cobalto, um modulador competitivo dos canais de cálcio, causou o aumento permanente dos

limiares, sugerindo a morte celular (Schenberg *et al.*, 2000). De fato, existem evidências de que o níquel, um cátion que também exerce modulação competitiva dos canais de cálcio, provoque a morte celular por inibição intracelular da captação mitocondrial de cálcio (Taylor e Broad, 1998). Notavelmente, o cloreto de cobalto apenas teve efeitos permanentes sobre os limiares das respostas de defesa que foram atenuadas pela sua administração (Schenberg *et al.*, 2000). Ou seja, os aumentos permanentes dos limiares não foram observados para a micção e defecação, que não sofreram atenuação pelos bloqueadores de canais tipo-L. Estes resultados sugerem a necessidade da entrada do cobalto para a produção dos efeitos tóxicos, possivelmente, pelo bloqueio da captação mitocondrial de cálcio. Em contraste, nem o verapamil (Schenberg *et al.*, 2000), nem o mibefradil tiveram efeitos tóxicos, havendo o retorno dos limiares aos níveis pré-droga 48 h após a administração de ambos os bloqueadores. Não obstante, parte dos efeitos do mibefradil persistiu por mais de 24 h, corroborando o curso prolongado de ação deste bloqueador que se inicia lentamente e atinge concentração plasmática máxima em 24 horas, apresentando meia-vida entre 17 e 25 h (Triggle, 1996; Welker *et al.*, 1998). Contudo, estes efeitos prolongados somente foram observados para imobilidade, exoftalmia e, em menor grau, micção, indicando um papel relativamente mais importante destes canais no controle destas respostas.

Presumivelmente, o sistema de defesa encontra-se totalmente inibido na ausência de estímulos ameaçadores. Esta inibição deve-se à inibição tônica de interneurônios gabaérgicos do sistema de defesa. De fato, as respostas de defesa são deflagradas pela administração de bicuculina, um antagonista competitivo do receptor GABA-A, sugerindo a natureza tônica da atividade gabaérgica (Brandão *et al.*, 1982; Schenberg *et al.*, 1983). É igualmente plausível que em condições naturais, a visão e/ou odor do predador revertam a inibição gabaérgica mediante a liberação de neurotransmissores excitatórios (glutamato, peptídeos, etc), tal como indicam os estudos com administração local de aminoácidos excitatórios (Carrive, 1993; Bittencourt *et al.*, 2004, 2005). Contudo, além de promover a liberação de neurotransmissores, os estímulos elétricos ou químicos produzem a despolarização direta dos neurônios da MCPA. Como os limiares das respostas de imobilidade e exoftalmia são consistentemente inferiores aos das demais respostas de defesa, e como os canais de cálcio tipo-T operam em níveis próximos ou inferiores ao potencial de repouso, esperava-se que o bloqueio destes canais tivesse uma ação predominante sobre os limiares destas respostas. De fato, embora o mibefradil tenha produzido o aumento

indiscriminado dos limiares de todas as respostas de defesa, os limiares de exoftalmia e imobilidade permaneceram elevados 24 h após administração da droga. A atenuação indiscriminada das respostas de defesa após a administração aguda do mibefradil pode ser devida à seletividade parcial deste bloqueador, que também apresenta ação significativa em canais tipo-L e ações de menor importância nos canais tipo-N, P e Q. Porém, nas concentrações de 0,3 a 30 μ M, não foram observados efeitos sobre canais tipo-N em preparações de nervos simpáticos de ratos e cobaias (Xi e Angus, 2001). Adicionalmente, Viana *et al.* (1997) demonstraram em culturas de motoneurônios de ratos que todas as correntes de cálcio são inibidas em concentrações micromolares do mibefradil, com pequenas diferenças de potência para os diferentes tipos de canais. Estes efeitos inibitórios foram rápidos, reversíveis e concentração-dependentes. Por outro lado, a potência e o curso temporal dos efeitos inibitórios do mibefradil em motoneurônios foram comparáveis aos observados em subunidades- α clonadas, sugerindo a semelhança estrutural destes canais com os canais nativos (Viana *et al.*, 1997). Entretanto, Todorovic e Lingle (1998) ressaltaram que o bloqueio dos canais tipo-T por mibefradil é revertido apenas parcialmente nas preparações *in vitro*, de forma similar ao que ocorre com canais clonados (Bezprozvanny e Tsien, 1995). A reversão parcial do bloqueio pode explicar o curso prolongado de ação deste bloqueador.

As ações prolongadas do mibefradil foram comprovadas num ensaio prévio, no qual 10 ratos foram administrados com o bloqueador na concentração de 37,4 mM (15 nanomoles), ou seja, o dobro da dose utilizada no grupo de ratos aproveitado para este estudo. Nesta dose obtivemos o bloqueio total de todas as respostas de defesa por mais de 72 horas. Contudo, no presente estudo, a permanência dos limiares elevados para exoftalmia e, principalmente, imobilidade, 24 h após a administração do mibefradil, sugere a atenuação seletiva destas respostas após a eliminação parcial da droga. Tais resultados sugerem que concentrações inferiores às utilizadas podem produzir uma atenuação mais seletiva destas respostas devido ao bloqueio exclusivo dos canais tipo-T.

Por outro lado, a administração aguda de mibefradil praticamente aboliu a resposta de defecação e causou um aumento acentuado dos limiares de micção. No último caso o aumento dos limiares persistiu por mais de 24 h. Estes resultados são surpreendentes uma vez que estas respostas apresentam os maiores limiares da reação de defesa, sendo iguais ou superiores aos limiares de galope e saltos. Conseqüentemente, elas também apresentam as menores frequências de ocorrência,

com respostas máximas de apenas 45% (micção) e 65% (defecação) dos ratos estimulados na sessão de triagem. Dentre outros fatores, os limiares elevados da micção e defecação podem ser devidos tanto ao número reduzido dos neurônios responsáveis por estas respostas, quanto à inibição gabaérgica mais pronunciada dos mesmos. De fato, ao contrário das demais respostas de defesa, a micção e defecação são marginalmente atenuadas pelos benzodiazepínicos (Schenberg *et al.*, 2001; Vargas, 2002). Em ambos os casos – menor número de neurônios ou maior inibição gabaérgica - o bloqueio de quaisquer canais excitatórios, incluindo os canais tipo-T, pode levar à atenuação, ou mesmo abolição, destas respostas. Alternativamente, os neurônios responsáveis pela micção e defecação podem ter uma densidade maior de canais tipo-T, tornando-os particularmente sensíveis ao mibefradil. Por fim, os circuitos periaquedutais subjacentes a estas respostas poderiam apresentar um menor número de neurônios combinado a uma intensa inibição gabaérgica e alta densidade de canais tipo-T. Nesta condição, o mibefradil atenuaria, de um lado, a exoftalmia e imobilidade, e de outro, defecação e micção, por mecanismos distintos devidos aos graus diferentes de inibição gabaérgica. A hipótese de participação dos canais tipo-T na deflagração das respostas de baixo limiar somente se aplicaria aos circuitos que controlam a imobilidade e exoftalmia.

As respostas de defesa têm sido associadas tanto à ansiedade fisiológica quanto aos transtornos de ansiedade em psiquiatria (Schenberg e Graeff, 1978, Graeff, 1988; Gentil, 1988; Deakin e Graeff, 1991; Jenck *et al.*, 1995; Vargas e Schenberg, 2001). Até meados do século passado os transtornos de ansiedade eram chamados de neurastenias (Francês *et al.*, 1993; Graeff, 1999). O Manual de Estatística e Diagnóstico da Sociedade Psiquiátrica Norte-americana, em sua 3ª edição revisada (DSM – III – R, 1987), passou a classificar a neurose crônica como transtorno de ansiedade generalizada e separou o transtorno de pânico deste e dos demais transtornos de ansiedade (fobias, transtorno obsessivo-compulsivo, etc).

O ataque espontâneo de pânico, primeiramente descrito por Freud (1895), é o fenômeno central do transtorno do pânico, que também inclui: ansiedade antecipatória e agorafobia (Klein, 1981). Tipicamente, os ataques compreendem uma experiência súbita de intenso desconforto, temor catastrófico e ansiedade severa, acompanhados por sintomas autonômicos e neurológicos incluindo dispnéia, hipertensão, palpitação, dor precordial, sudorese, tremores e tonteados. Fuga da situação imediata, congelamento, sensação de asfixia ou sufocamento, ou dificuldade

em respirar profundamente, são bastante freqüentes. Além disso, alguns pacientes temem perder o controle dos esfíncteres anal e vesical (Cassano e Savino, 1993).

Os ataques de pânico podem ser provocados por drogas, particularmente, através da infusão de lactato de sódio (Liebowitz *et al.*, 1984). As comparações entre os ataques de pânico espontâneo e os induzidos por lactato mostram que a maioria dos sintomas são similares, vale dizer, pavor em geral, desejo de fuga, dispnéia, dor precordial e sensação de frio e/ou calor (Goetz *et al.*, 1994).

Existem semelhanças marcantes entre os ataques de pânico e as respostas aversivas evocadas por estimulação da MCPAd. Em humanos, a estimulação elétrica da MCPAd (0-5mm lateral ao aqueduto) produz ansiedade intensa, pânico, terror e sensações de morte iminente acompanhadas por dor medial difusa na face e “próximo ao coração” ou “profundamente no peito”, aumento na pulsação (não correlacionada à dor precordial), dispnéia (apnéia, suspiros ou respiração profunda, exoftalmia, sensação de queimação e/ou frio, urgência vesical, urgência de vomitar e sensação de vibração na cabeça, face ou peito (Nashold *et al.*, 1969). Estas respostas são evocadas pela porção dorsal mas não ventral da MCPA (Young, 1989).

De fato, embora o medo e ansiedade tenham sido relatados após estimulação do hipotálamo medial, amígdala e hipocampo, somente a amígdala e o teto do mesencéfalo (MCPA e camadas coliculares profundas) foram ativados durante a tomografia de emissão positrônica dos ataques de pânico induzidos por lactato (Reiman *et al.*, 1989). Mais importante, retratação posterior de um dos autores do último estudo sugere que a ativação da amígdala tenha sido ocasionada pelos movimentos mandibulares (Drevets *et al.*, 1992). Por fim, em contraste à amígdala e ao hipotálamo, a ‘raiva’ não é produzida pela estimulação elétrica da MCPA em seres humanos. Este aspecto é importante uma vez que a raiva não é considerada como um sintoma do ataque de pânico. A estimulação da amígdala também difere da MCPA ao evocar uma larga gama de emoções, incluindo prazer intenso, associado à imaginação vívida e a recordação de experiências emotivas passadas (Ervin e Mark, 1969).

Notavelmente, os ataques de pânico situacionais ou induzidos por lactato em seres humanos e os comportamentos de defesa induzidos por estimulação da MCPA de ratos não são acompanhados por aumentos dos níveis plasmáticos de cortisol (seres humanos), ACTH e prolactina (humanos e ratos) mostrando que estes comportamentos não são devido à reação de stress generalizado (Schenberg *et al.*, 1998; Silva, 2003).

O isomorfismo entre os ataques de pânico e os comportamentos de defesa por estimulação da MCPA estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Isomorfismo dos ataques de pânico e das respostas induzidas por estimulação da MCPd em homens e ratos. Abreviações: n.d. – dados não disponíveis, n.o. – resposta não observada. (Schenberg *et al.*, 2001)

	Ataques de pânico espontâneos ou induzidos por lactato em homens (Reiman <i>et al.</i> , 1989)	Estimulação da MCPD em homens (Nashold <i>et al.</i> 1969)	Estimulação da MCPD em ratos
Sensações/ Comportamento	“bloqueio do andar” desejo de fugir intenso desconforto ansiedade severa pânico, terror sensação de morte iminente medo de ficar louco medo de perder o controle	n.d. interrupção do estímulo intenso desconforto ansiedade severa pânico, terror “medo de morrer” n.d. n.d.	congelamento fuga aversão --- --- --- ---
Respostas Autonômicas	taquipnéia hiperventilação dispnéia sensação de asfixia taquicardia ¹ hipertensão urgência de esvaziamento da bexiga peristalse n.d. sudorese n.d.	n.d. hiperventilação apnéia respiração profunda taquicardia n.d. urgência de esvaziamento da bexiga n.d. abertura dos olhos n.d. piloereção	taquipnéia hiperventilação n.o. respiração profunda taquicardia hipertensão micção defecação exoftalmia n.d. n.o.
Respostas Endócrinas	ausência de resposta da prolactina ausência de resposta do ACTH ausência de resposta do cortisol	n.d. n.d. n.d.	ausência de resposta da prolactina ausência de resposta do ACTH ausência de resposta da corticosterona
Respostas Neurológicas	sensação de tremor dor torácica sensação de calor/frio tonteira n.d. n.d.	sensação de vibração dor torácica e no coração sensação de calor/frio n.d. entorpecimento dor facial medial	--- --- --- --- --- ---
Áreas cerebrais estimuladas ou ativadas	MCPD, camadas profundas do colículo superior, amígdala (PET) ²	MCPD e teto adjacente (0-5mm lateral ao aqueduto) (raio-X)	MCPD, camadas profundas do colículo superior

¹ Estudos recentes parecem contradizer o consenso anterior acerca da resposta taquicárdica.

² Tomografia por emissão positrônica. Retratação posterior de um dos autores sugere que a ativação da amígdala tenha sido um artefato devido aos movimentos mandibulares (Drevets *et al.*, 1992).

De fato, a administração crônica, mas não aguda, dos pânicolíticos clormipramina e fluoxetina atenuou a resposta de galope induzida por estimulação da MCPAd no rato em doses e curso similares aos observados na terapia do pânico. No mesmo sentido, o agente pânicogênico pentilenotetrazol facilitou esta resposta. Em contraste, enquanto os benzodiazepínicos de baixa potência (diazepam e midazolam) e um antidepressivo não-pânicolítico (maprotilina) foram ineficazes na atenuação da resposta de galope, a injeção aguda de uma dose sedativa de midazolam e a administração crônica de maprotilina atenuaram a resposta de imobilidade. Tais resultados sugerem que enquanto a imobilidade seria uma resposta de atenção mediada pela norepinefrina, o galope seria o melhor representante do ataque de pânico (Schenberg *et al.*, 2001).

Como a administração aguda de mibefradil atenuou todas as respostas da reação de defesa, incluindo as relacionadas ao aumento da atenção e medo, os resultados do presente estudo sugerem a possibilidade de utilização de doses sub-cardíacas de bloqueadores de canais de cálcio tipo-T, principalmente, associadas aos pânicolíticos, para promover um tratamento mais eficaz do transtorno do pânico.

6 CONCLUSÕES

Os canais de cálcio voltagem-dependentes desempenham um papel fundamental na determinação do padrão de disparo neuronal, dessa forma podemos pressupor que as várias respostas de defesa sejam controladas por padrões distintos de disparo neuronal, sendo estes canais os responsáveis pela gênese e hierarquia das respostas de defesa apresentadas pelo animal numa sessão de EIC da MCPA. Em particular, estudos anteriores demonstraram que bloqueio do canal de cálcio tipo-L atenua todas as respostas de defesa, exceto a defecação e a micção já demonstrando que tais canais apresentam efeito seletivo sobre essas respostas.

Como no atual estudo observamos que o bloqueio seletivo dos canais de cálcio tipo-T promove um aumento acentuado dos limiares de todas as respostas de defesa, principalmente, da defecação e da imobilidade, persistindo esse efeito sobre as respostas de imobilidade, exoftalmia e, em menor grau, da micção, 24 horas após a administração do mibefradil, podemos então desse modo concluir que os canais de cálcio voltagem-dependentes sejam os responsáveis pelo desencadeamento seletivo destas respostas, tendo o canal tipo-T um papel mais proeminente sobre a resposta de imobilidade.

7 RESUMO

A reação de defesa de ratos, tanto natural quanto induzida por estimulação elétrica ou química da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA), é composta por um conjunto heterogêneo de respostas somáticas e autonômicas. A estimulação da MCPA com intensidades crescentes elicia as respostas de exoftalmia, imobilidade, micção, defecação, trote, galope e salto em forma sequencial. A hierarquia destas respostas reproduz aquela do repertório natural de defesa do rato. Os mecanismos subjacentes à produção hierárquica destas respostas ainda não foram elucidados. Por outro lado, os canais de cálcio voltagem-dependentes desempenham um papel fundamental na determinação do padrão de disparo neuronal. Como as várias respostas de defesa podem ser controladas por padrões distintos de disparo neuronal, estes canais podem desempenhar um papel fundamental na gênese e hierarquia destas respostas. Em particular, estudos anteriores demonstraram que bloqueio do canal de cálcio tipo-L abole todas as respostas de defesa, exceto a defecação e a micção. O presente estudo investigou o efeito do bloqueio dos canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-T sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação da MCPA. Para isto, ratos adultos machos Wistar ($n = 20$) foram implantados com quimitrodos na MCPA e submetidos a sessões de estimulação intracraniana (0-70 μ A, 60 Hz, AC). No dia seguinte, os ratos foram estimulados 10 min após a administração local de 7,5 nmoles/400 nL de mibefradil (Posicor®), um bloqueador seletivo destes canais. Adicionalmente, os ratos foram submetidos a sessões de estimulação conduzidas, um e dois dias após a administração da droga. O mibefradil causou um aumento acentuado dos limiares de todas as respostas de defesa, principalmente, da defecação, que foi virtualmente abolida, e da imobilidade ($\Delta I_{50}=95\%$). Aumentos significantes dos limiares de imobilidade ($\Delta I_{50}=24\%$), exoftalmia ($\Delta I_{50}=22\%$) e, em menor grau, da micção ($\Delta I_{50}=17\%$), ainda foram verificados 24 horas após a administração do mibefradil. Os limiares retornaram aos valores basais 48 horas após a microinfusão da droga, descartando efeitos tóxicos neuronais. Assim, o presente estudo sugere que os canais de cálcio tipo-T tenham um papel importante no surgimento das respostas de defesa da MCPA. Contudo, eles parecem exercer um papel mais importante na resposta de imobilidade.

8 ABSTRACT

The defense reaction of the rat, both natural or elicited by electric or chemical stimulation of the periaqueductal gray matter (PAG), is composed by an heterogeneous group of somatic and autonomic responses. The stimulation of the PAG by stepwise increasing currents elicit responses like exophthalmus, immobility, micturition, defecation, running and jumping in a sequential way. These responses hierarchy reproduce that one of the natural repertory of defense of the rat. The mechanisms responsible for the hierarchical production of these responses still not explained. On the other hand, the voltage-dependent calcium channels occupy an important place determining the neuronal pattern of overshooting. As the many responses of defense could be controlled by distinct neuronal discharge, these channels could be responsible for the genesis and hierarchy of these responses. In fact, previous studies showed that the blockage of the L-type calcium channel abolish all the defense response, except defecation and micturition. The present study investigated the effect of the blockage of T-type voltage-dependent calcium channels on the defensive responses threshold induced by stimulation of the periaqueductal gray matter. For that, adult Wistar male rats ($n = 20$) were implanted with chemitrodes in PAG and submitted to intracranial stimulation (0-70 μ A, 60 Hz, AC). In the day after, the rats were stimulated 10 minutes after local administration of 7,5 nmol/400 nL of mibefradil (Posicor®), a selective antagonist of these channels. Then, the rats were stimulated in sessions carried out in two consecutive days after the administration of the drug. Mibefradil induced an increasing thresholds of all defense response, specially in defecation wich was virtually abolished, and immobility($\Delta I_{50}=95\%$). Significant increasing thresholds of immobility($\Delta I_{50}=24\%$), exophthalmus($\Delta I_{50}=22\%$) and in a lesser degree, of micturition($\Delta I_{50}=17\%$), still present 24 hours after mibefradil administration. The thresholds returned to basal scores 48 hours after the microinfusion of the drug, discarding toxical effects. Hence, the present study suggest that T-type calcium channels play an important role in arising of defense response of periaqueductal gray matter. Nevertheless, they seems to be more important for immobility response.

9 REFERÊNCIAS

1. Adams DB. (1968). The activity of single cells in the midbrain and hypothalamus of the cat during affective defence behavior. *Arch. Ital. Biol.*, 106:243-269.
2. Adams DB (1979). Brain mechanisms of offense, defense and submission. *Behav. Brain Sci.*,2: 201-241.
3. Adams DB, Baccelli G, Mancina G, Zanchetti A (1971). Relation of cardiovascular changes in fighting to emotion and exercise. *J. Physiol (London)*. 212:321-35.
4. American Psychiatric Association (1987). *DSM-III-R: Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders (3ª edição revisada)*, Washington, DC, American Psychiatric Press.
5. Aston- Jones G, Rajkowsky J, Cohen J. (2000). Locus coeruleus and regulation of behavioral flexibility and attention. *Prog Brain Res* 126:165-182.
6. Bean BP(1989).Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Ann. Rev.Physiol.*,51:367-384.
7. Bertolino, M & Llinás, R. (1992). The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32: 399-421.
8. Bezprozvanny I & Tsien RW. (1995) Voltage-dependent blockade of diverse types of voltage-gated calcium channels expressed in xenopus oocytes by the calcium channel antagonist mibefradil.(Ro-5967). *Mol. Pharmacol.*48:540-549.
9. 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-Metil-D-Aspartic Acid Glutamate Receptors. *Neuroscience*, 125: 71-89.
10. Bittencourt AS, Nakamura-Palácios E, Mauad H, Tufik S, Schenberg LC.(2005).Organization of electrically and chemically-evoked defensive behaviors within the deeper collicular layers as compared to the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience*(no prelo).
11. Blanchard DC, Blanchard RJ, Rodgers RJ. (1990) Pharmacological and neural control of anti-predator defense in the rat.*Aggr Behav* 16:165-175.
12. Blanchard DC, Williams G, Lee MC, Blanchard RJ. (1981) Taming of wild *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central gray. *Physiologic Psychol*, 9: 157-163.
13. Brandão ML, Aguiar JC, Graeff FG. (1982) GABA mediation of the antiaversive action of minor tranquilizers. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 16:397-402.
14. Buney BS, Aghajanian GK. (1976). Dopamine and norepinephrine innervated cells in the rat prefrontal cortex: pharmacological differentiation using microiontophoretic techniques. *Life Sci.* 19:1783-1789.
15. Canteras NS, Chiavegatto S, Valle LE, Swanson LW. (1997). Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res. Bull*, 44:297-305.

16. Carbone E & Lux HD. (1984). A low voltage-activated, fully inactivating calcium channel in vertebrate sensory neurons. *Nature* 310: 501-502.
17. Carobrez AP, Schenberg LC & Graeff FG. (1983). Neuroeffector mechanisms of the defense reaction in the rat. *Physiol. Behav.*, 31:439-444.
18. Carrive P(1993).The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav.Brain Res.* 58:27-47.
19. Cassano GB and Savino M. (1993) Symptomatology of panic disorder: an attempt to define the panic-agoraphobic spectrum phenomenology. Em: *The Psychopharmacology of Panic* (S.A. Montgomery, editor). New York, Oxford University Press, págs. 38-57.
20. Castro MFS & Schenberg LC. (1989) Cardiovascular change in response to prolonged defense area stimulation in freely moving rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 22:115-119.
21. Cezário AF (2001). Caracterização das funções comportamentais do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro Biomédico, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil.
22. Chuang RS, Jaffe H, Cribbs L, Perez-ReyesE, Swartz KJ. (1998) Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat Neurosci.* Dec;1(8):668-74
23. Collett D (1991) *Modelling Binary Data*, Chapman & Hall, London.
24. Darwin C (1872). "The expression of emotions in man and animals", London, Murray.
25. Deakin JFW & Graeff FG.(1991) 5-HT and mechanisms of defence. *J. Psychopharmacol.*,5:305-315
26. Drevets WC, Videen TQ, MacLeod AK, Haller JW, Raichle ME. (1992) PET images of blood flow changes during anxiety: correction. *Science* 19; 256 (5064):1696
27. Edwards S (1980). The deep cells of the superior colliculus:Their reticular characteristics and sructural organization. *Apud* Hobson JA and Brazier MAB (eds.), 'The Reticular Formation Revisited',New York, Raven Press,pp.193-209.
28. Ervin FR, MarkVH. (1969) Behavioral and affective responses to brain stimulation in man. In: Zubbin J, Shagass C, editors. *Neurobiological aspects of psychopathology*, New York: Grune & Stratton, p.54-65
29. Fardin V, Oliveras JL & Besson JL. (1984) A reinvestigation of the analgesic effects induced by the stimulation of periaqueductal gray matter in the rat.I. The production of behavioral side effects together with analgesia. *Brain res.*, 306:105-123.
30. Fernandez de Molina A & Hunsperger RW. (1959) Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem:electrical stimulation of

- amygdala, stria terminalis and adjacent structures. J. Physiol. London, 145:251-265.
31. Fernandez de Molina A & Hunsperger RW. (1962). Organization of the subcortical system governing defense and flight reactions in the cat. J. Physiol. London, 160:200-213.
 32. Floody OR & O'Donohue TL. (1980) Lesions of the mesencephalic central gray depress ultrasound production and lordosis by female hamsters. Physiol. Behav., 24:79-85.
 33. Frances A, Miele GM, Widiger TA, Pincus HA, Manning D and Davis WW. (1993) The Classification Of Panic Disorders: From Freud To DSM-IV. J Psychiat Res, 27: 3-10.
 34. Freud S (1895). On The Right To Separate From Neurasthenia A Definitive Symptom-Complex As Anxiety Neurosis (*Angstneurose*). Em: *Great books of the Western world* (MJ Adler editor associado), Encyclopedia Britannica, 1978.
 35. Gentil V. (1988) The aversive system, 5-HT and panic attacks. Em: *Animal Models of Psychiatric Disorders* (Simon P, Soubrié P, Wildlocher D, editores). Basel, Karger. 1:142-145.
 36. Goetz RR, Klein DF, Gorman JM. (1994) Consistencies between recalled panic and lactate-induced panic. Anxiety, 1: 31-36.
 37. Graeff FG. (1988) Animal models of aversion. Em: *Animal Models of Psychiatry* (Simon P, Soubrié P and Wildlocher D, editores); Selected Models of Anxiety, Depression and Psychosis, Basel, Karger, vol 2, págs. 115-141.
 38. Graeff FG (1999) Medicamentos Ansiolíticos. Em: *Fundamentos de psicofarmacologia* (Graeff FG, Guimarães FS, editores) São Paulo: Editora Atheneu, págs. 123-160.
 39. Graeff FG. (1981) Minor tranquilizers and brain defense systems. Braz. J. Med.Biol. Res., 14:239-265.
 40. Hess WR.(1954) Diencephalon. New York: Grune & Stratton.
 41. Hess WR & Brügger M (1943). Das subkortikale zentrum der affectiven abwehrreaktion. Helv. Physiol.Acta, 1:33-52.
 42. Hillman D., Chen S., Aung TT., Cherksey B., Sugimori M., Llinás RR.(1989) Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7076-7080.
 43. Hirning LD., Fox A., McCleskey EW., Oliveira, BM., Thayer S., Miller RJ , Tsien RW. (1988) Dominant role of N-type calcium channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. Science 239:57-60.
 44. Hunsperger RW. (1956). Affektreaktionem auf elektrische reizung im hirnstamm der katze. Helv.Physiol.Acta, 14:70-92.
 45. IUPHAR(2000) International Union of pharmacology. The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification. p 125-128.

46. Iwata J., Le Doux JE, Meely MP, Arneric S & Reis DJ. (1986) Intrinsic neurons in the amygdaloid mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. *Brain Res.*, 383:195-214.
47. Jenck F, Moreau JL, Martin JR. (1995) Dorsal periaqueductal gray –induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res*; 57: 181-91.
48. Kim C-J, Rhee J-S, Akaike N. (1997) Modulation of high-voltage activated calcium channels in the rat periaqueductal gray neurons by μ -type opioid agonist. *J Neurophysiol.* 77: 1418-1424.
49. Klein DF (1981) Anxiety reconceptualize. Em: *Anxiety: New Research and Changing Concepts* (Klein DF, Rabkin JG, editores), New York, Raven Press.
50. Le Doux JE, Iwata J, Cinchetti P & Reis DJ. (1988) Different projection of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J. Neurosci.*, 8:2517-2529.
51. Lee J-H, Kim E-G, Park B-G, Kim K-H, Cha S-K, Kong ID, Lee J-W, Jeong S-W. (2002) Identification of T-type α_1H calcium channels ($Ca_v3.2$) in major pelvic ganglion neurons. *J. Neurophysiol*, 87:2844-2850.
52. Liebowitz MR, Fyer AJ, Gorman JM, Dillon D, Appleby IL, Levy G, Anderson S, Levitt M, Palij M, Davies SO (1984) Lactate provocation of panic attacks. I. Clinical and behavioral findings. *Arch. Gen Psychiatry*, 41:764-760.
53. Lipp HP & Hunsperger RW. (1978) Threat, attack and flight elicited by electrical stimulation of the ventromedial hypothalamus of the marmoset monkey *Callithrix jacchus*. *Brain Behav. Evol.*, 15:260-293.
54. Llinás R & Yarom Y. (1981) Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones *in vitro*. Different types of voltage dependent ionic conductances. *J. Physiol.*, 315:549-567.
55. Lopez-Gonzalez I, Olamendi-Portugal T, De La Vega-Beltran JL, Van der Walt J, Dyason K, Possani LD, Felix R, Darszon A. (2003) Scorpion toxins that block T-type Calcium channels in spermatogenic cells inhibit the sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 300(2):408-14.
56. Marseillan RF. (1977) A solid state sine-wave stimulator. *Physiol. Behav* 19:339-340.
57. Mc Donough SI & Bean BP. (1998) Mibefradil Inhibition of T-Type Calcium Channels in Cerebellar Purkinje Neurons. *Molecular Pharmacology*, 54:1080-1087.
58. Miller RJ. (1987). Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 235:46-52.
59. Mize, RR. Graham, SK. Cork, RJ. (2002) Expression of the L-type calcium channel in the developing mouse visual system by use of immunocytochemistry. *Dev. Brain Research* 136:185-195.
60. Nashold JR. BS, Wilson WP & Slaughter DG. (1969, a) Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J. Neurosurg.*, 30:14-24.

61. Nashold JR.BS, Wilson WP & Slaughter DG. (1969,b) Stereotaxic midbrain lesions for central dysesthesia and phantom pain. J. Neurosurg.,30:116-126.
62. Paxinos G & Watson C.(1986) The rat brain in stereotaxic coordinates.Harcourt Brace Jovanovich publishers, Academic Press INC., 2ª edição, Califórnia.
63. Pitt B. (1997) Diversity of calcium antagonists. Clinical Therapeutics 19,supl.A, 3-12.
64. Ploog D. (1981)Neurobiology of primate audiovocal behavior. Brain Res. Rev., 3: 35-61.
65. Póvoa RMF. (2003) Influências do sexo e linhagem nos limiares da reação de defesa induzida pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal de ratos. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro Biomédico, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil.
66. Redgrave P, Dean P. (1991) Does the PAG learn about emergencies from the colliculus? In: The midbrain periaqueductal gray matter, functional, anatomical and neurochemical organization(Depaulis A, Bandler R,eds) ,pp 199-206. New york:Plenum Press.
67. Reiman EM, Raichele ME, Robins E, Mintum MA, Fusselman MJ, FoxPT, Price JL, Hackman KA (1989) Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. Arch gen Psych, 46:493-500.
68. Sanchez D, Ganfornina MD ,Ribas J. (1988) Periaqueductal gray neuron's activity in a mesencephalic slice preparation.Brain Res. 455:166-169.
69. Sandner G, Schimitt P & Karli P. (1982) Effect of medial hypothalamic stimulation inducing both escape and approach on unit activity in rat mesencephalon. Physiol. Behav, 29: 269-274.
70. Schenberg LC, Aguiar JC e Graeff FG. (1983) GABA modulation of the defense reaction induced by electrical stimulation. Physiol. Behav., 31: 429-437.
71. Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré ECM, Vargas LC. (2001) Modeling panic attacks. Neurosci Biobehav Rev, 25: 647-659.
72. Schenberg LC, Costa MB, Borges PCL, Castro MFS (1990) Logistic analysis of the defense reaction induced by electrical stimulation of the rat mesencephalic tectum. Neurosci. Biobehav. Rev.,14:473-479.
73. Schenberg LC & Graeff FG. (1978) Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. Pharmac. Biochem. Behav., 9:287-295.
74. Schenberg LC, Marcal LPA, Seeberger F, Barros MR, Sudré ECM. (2000) L-Type calcium channels selectively control the defensive behaviors induced by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray and overlying collicular layers.Behav. Brain Res. 111:175-185.
75. Schenberg LC, Vargas LC, Medeiros RL, Marques TA, Silva SR, Fraipont P, Tufik S (1998) Evaluation of the rat defense reaction as a model of a panic attack in

- man: pharmacological and neuroendocrine evidence. *Int J Psychophys*, 30:127-128.
76. Schenberg LC, Vasquez EC, Costa MB. (1993). Cardiac baroreflex dynamics during the defence reaction in freely moving rats. *Brain Res*, 621: 50-58.
 77. Servan-Schreiber D, Printz H, Cohen JD . (1990) A network model of catecholamine effects: gain, signal-to-noise ratio, and behavior. *Science* 249:892-895.
 78. Sidach SS, Mintz IM. (2002) Kurtoxin, a gating modifier of neuronal high-and low-threshold Calcium channels. *J Neurosci*. 22(6): 2023-34.
 79. Silva, S.R. (2003). Neuroendocrinologia da reação de defesa induzida pela estimulação da matéria cinzenta periaquedutal de ratos Wistar e selvagens: Uma resposta 'incomum' de estresse similar aos ataques de pânico, Tese de Doutorado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil.
 80. Singer D, Biel M., Lotan I, Flockerzi V , Hoffman F., Dascal N. (1991). The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* 253:1553-1556.
 81. Smith AO, Astley CA, DeVito JL, Stein JM & Walsh KE. (1980) Functional analysis of hypothalamic control of the cardiovascular response accompanying emotional behavior. *Fed.Proc.*, 39: 2487-2494.
 82. Snutch TP, Leonard JP, Gilbert MM, Lester HA, Davidson N. (1990) Rat brain expresses an heterogenous family of calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3391-3395.
 83. Snyder SH, Brecht DS. (1992). Biological roles of nitric oxide. *Sci Am*;268 (special issue):22-9 .
 84. Speeding M & Paoletti R (1992). Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacological Reviews*, v.44n.3363-376.
 85. Steriade M & Llinás R. (1988) The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay. *Physiol. Rev.*,68:3649-742.
 86. Sudré ECM, Barros MR, Sudré GN, Schenberg LC. (1993) Thresholds of electrically induced defence reaction of the rat: short- and long-term adaptation mechanisms. *Behav Brain Res*, 58: 141-154.
 87. Taylor CW & Broad LM. (1998) Pharmacological analysis of intracellular Ca^{2+} signalling: problems and pitfalls, *TIPS*; 19: 370-375.
 88. Todorovic SM & Lingle CJ. (1998) Pharmacological properties of T-type calcium current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *J. Neurophysiol.* 79:240-252.
 89. Tottene A, Moretti A, Pietrobon D. (1996) Functional Diversity of P-type and R- type Calcium Channels in Rat Cerebellar Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 16(20): 6353-6363.

90. Triggle DJ (1996) . Pharmacologic and Theurapeutic Differences Among Calcium channels antagonists: profile of mibefradil, a new calcium antagonist. *Am J Cardiol*;78(suppl 9A):7-12.
91. Tsien RW, Lipscombe D, Madison D, Bley K & Fox A. (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.*, 11: 431-438.
92. Tsien RW, Lipscombe D., Madison D., Bley K & Fox A. (1995) Reflections on calcium channel diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci.* 18:52-54.
93. Ursin H & Kaada BR (1960). Functional localization within the amygdaloid complex in the cat. *Electroenceph.Clin.Neurophys.*,12:1-20
94. Vargas LC (2002), "Psicofarmacologia da Reação de Defesa" Tese de Doutorado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil.
95. Vargas LC, Schenberg LC. (2001) Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal gray-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology*, 155: 260-268.
96. Viana F, Van den Bosch L, Missiaen L, Vandenberghe W, Droogmans G, Nilius B, Robberecht W. (1997) Mibefradil(Ro 40-5967) blocks multiple types of voltage-gated calcium channels in cultured rat spinal motoneurons. *Cell Calcium* 22(4):299-311.
97. Waldbilling RJ. (1975). Attack, eating, drinking and gnawing elicited by electrical stimulation of rat mesencephalon and pons. *J. Comp. Physiol.Psychol.*, 89: 200-212.
98. Wallace MT, Stein BE (1997). Development of multisensory neurons and multisensory integration in cat superior colliculus. *J. Neurosci.* 17:2429-2444.
99. Welker HA, Wiltshire H, Bullingham R. (1998) Clinical Pharmacokinetics of mibefradil. *Clin Pharmacokinet.* 35(6):405-423
100. Wolfle TI, Moyer DJ, Carder B & Liebeskind TC. (1971) Motivational effects of electrical stimulation in the dorsal tegmentum of the rat. *Physiol.Behav.*, 7:569-574.
101. Xi Q & Angus JA. (2001) Evidence against an action of mibefradil at N-type voltage-operated calcium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 364:430-436.
102. Yajima Y, Hayashi Y & Yashii N. (1980). The midbrain central gray as a highly sensitive neural structure for the production of ultrasonic vocalization in the rat. *Brain Res.*, 198: 446-452.
103. Young RF (1989). Brain and Spinal Stimulation: How and Whom! *Clin Neurosurg*, 35: 429-447.

10. APÊNDICES

APÊNDICE 1**PLANILHA DE ESTIMULAÇÃO**

Rato: E20**EXPERIMENTO:** mibefradil**SESSÃO:** triagem**DATA:** 23/04/03 **PROCEDIMENTO:** infusão de 7,5 nm/400nl **RESPONSÁVEL:** Erika

RATO	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
DORMIR															
REPOUSO	x	x	x	x	x		x		x						
OLFAÇÃO	x	x	x	x		x	x								
ESQUADRINHAR						x									
AUTOLIMPEZA					x										
LEVANTAR															
MARCHA										x	x				
EXOFTALMIA								x	x	x	x	x			
MISTACIOPLEGIA								x	x	x	x				
IMOB-pré galope								x	x	x	x				
IMOB-pós galope															
DEFECAÇÃO															
MICÇÃO															
TROTE										x	x	x			
GALOPE												x			
SALTO HORIZ.												x			
SALTO VERT															

OBS: _____

APÊNDICE 2

GELATINIZAÇÃO DE LÂMINAS PARA A HISTOLOGIA

GELATINIZAÇÃO DE LÂMINAS PARA A HISTOLOGIA

As lâminas foram previamente gelatinizadas para a montagem dos cortes permanentes da área cerebral estudada, seguindo a técnica descrita a seguir:

Procedimentos:

1. As lâminas foram colocadas em “racks” e submersas em água quente e detergente por ½ hora.
2. A seguir, estas foram lavadas diversas vezes com água quente até a remoção completa do detergente.
3. As lâminas foram lavadas várias vezes com água fria durante ½ hora.
4. Finalmente, as lâminas foram lavadas com água destilada durante 15 minutos.
5. No final da lavagem as lâminas foram mantidas na água destilada até o momento de gelatinizar.
6. A solução de gelatinização consistia de 5g de gelatina dissolvidos em 500ml de água destilada, acrescidos de 0,5g de sulfato de crômio e potássio. A mistura foi aquecida até 50 °C sendo rapidamente filtrada à vácuo.
7. Escorridos os “racks” com as lâminas lavadas, estes foram colocados na solução de gelatinização, numa temperatura de 50 °C, por 2 minutos.
8. Decorrido este tempo, as lâminas foram mantidas em estufa à 45 °C por um período mínimo de 24 horas para secagem.

APÊNDICE 3

COLORAÇÃO DOS CORTES DO CÉREBRO

SEQUÊNCIA DE EVENTOS PARA A COLORAÇÃO DOS CORTES DO CÉREBRO

- | | |
|-------------------------------------|-------|
| 1. Vermelho neutro 1% | 6min |
| 2. H ₂ O destilada | 10seg |
| 3. Álcool 70°..... | 10seg |
| 4. Álcool 95°..... | 10seg |
| 5. Álcool 100°..... | 10seg |
| 6. Álcool 100°..... | 10seg |
| 7. Álcool / Xilol 1:1..... | 10seg |
| 8. Xilol 100%..... | 2min |
| 9. Colocação de DPX | |
| 10. Colocação da lamínula | |
| 11. Secagem e estufa a 36 °C..... | 48 hs |

APÊNDICE 4

PRINT OUT DO PROGRAMA DE ANÁLISE LOGÍSTICA
(Exemplo de uma resposta – imobilidade)

REGRESSAO LOGISTICA DAS CURVAS DE LIMIARES DA REACAO DE DEFESA
COMPARACAO INTRA ENTRE TRIAGEM, AGUDO, MIBEFRADIL 24H, MIBEFRADIL
48H

OBS	RSP	N	EST1	EST2	EST3	EST4	LE1	LE2	LE3	LE4	INT	FA	PCT
157	IMO	20	1	0	0	0	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	10	.	.
158	IMO	20	1	0	0	0	1.1761	0.0000	0.0000	0.0000	15	.	.
159	IMO	20	1	0	0	0	1.3010	0.0000	0.0000	0.0000	20	2	0.10
160	IMO	20	1	0	0	0	1.3979	0.0000	0.0000	0.0000	25	3	0.15
161	IMO	20	1	0	0	0	1.4771	0.0000	0.0000	0.0000	30	5	0.25
162	IMO	20	1	0	0	0	1.5441	0.0000	0.0000	0.0000	35	9	0.45
163	IMO	20	1	0	0	0	1.6021	0.0000	0.0000	0.0000	40	11	0.55
164	IMO	20	1	0	0	0	1.6532	0.0000	0.0000	0.0000	45	14	0.70
165	IMO	20	1	0	0	0	1.6990	0.0000	0.0000	0.0000	50	14	0.70
166	IMO	20	1	0	0	0	1.7404	0.0000	0.0000	0.0000	55	17	0.85
167	IMO	20	1	0	0	0	1.7782	0.0000	0.0000	0.0000	60	18	0.90
168	IMO	20	1	0	0	0	1.8129	0.0000	0.0000	0.0000	65	19	0.95
169	IMO	20	1	0	0	0	1.8451	0.0000	0.0000	0.0000	70	19	0.95
170	IMO	20	0	1	0	0	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	10	.	.
171	IMO	20	0	1	0	0	0.0000	1.1761	0.0000	0.0000	15	1	0.05
172	IMO	20	0	1	0	0	0.0000	1.3010	0.0000	0.0000	20	1	0.05
173	IMO	20	0	1	0	0	0.0000	1.3979	0.0000	0.0000	25	1	0.05
174	IMO	20	0	1	0	0	0.0000	1.4771	0.0000	0.0000	30	1	0.05
175	IMO	20	0	1	0	0	0.0000	1.5441	0.0000	0.0000	35	2	0.10
176	IMO	20	0	1	0	0	0.0000	1.6021	0.0000	0.0000	40	2	0.10
177	IMO	20	0	1	0	0	0.0000	1.6532	0.0000	0.0000	45	3	0.15
178	IMO	20	0	1	0	0	0.0000	1.6990	0.0000	0.0000	50	4	0.20
179	IMO	20	0	1	0	0	0.0000	1.7404	0.0000	0.0000	55	6	0.30
180	IMO	20	0	1	0	0	0.0000	1.7782	0.0000	0.0000	60	8	0.40
181	IMO	20	0	1	0	0	0.0000	1.8129	0.0000	0.0000	65	9	0.45
182	IMO	20	0	1	0	0	0.0000	1.8451	0.0000	0.0000	70	11	0.55
183	IMO	20	0	0	1	0	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	10	.	.
184	IMO	20	0	0	1	0	0.0000	0.0000	1.1761	0.0000	15	1	0.05
185	IMO	20	0	0	1	0	0.0000	0.0000	1.3010	0.0000	20	1	0.05
186	IMO	20	0	0	1	0	0.0000	0.0000	1.3979	0.0000	25	2	0.10
187	IMO	20	0	0	1	0	0.0000	0.0000	1.4771	0.0000	30	4	0.20
188	IMO	20	0	0	1	0	0.0000	0.0000	1.5441	0.0000	35	5	0.25
189	IMO	20	0	0	1	0	0.0000	0.0000	1.6021	0.0000	40	6	0.30
190	IMO	20	0	0	1	0	0.0000	0.0000	1.6532	0.0000	45	9	0.45
191	IMO	20	0	0	1	0	0.0000	0.0000	1.6990	0.0000	50	11	0.55
192	IMO	20	0	0	1	0	0.0000	0.0000	1.7404	0.0000	55	15	0.75
193	IMO	20	0	0	1	0	0.0000	0.0000	1.7782	0.0000	60	15	0.75
194	IMO	20	0	0	1	0	0.0000	0.0000	1.8129	0.0000	65	15	0.75
195	IMO	20	0	0	1	0	0.0000	0.0000	1.8451	0.0000	70	16	0.80
196	IMO	20	0	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	10	.	.
197	IMO	20	0	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	1.1761	15	.	.
198	IMO	20	0	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	1.3010	20	1	0.05
199	IMO	20	0	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	1.3979	25	3	0.15
200	IMO	20	0	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	1.4771	30	5	0.25
201	IMO	20	0	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	1.5441	35	9	0.45
202	IMO	20	0	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	1.6021	40	13	0.65
203	IMO	20	0	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	1.6532	45	13	0.65
204	IMO	20	0	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	1.6990	50	16	0.80
205	IMO	20	0	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	1.7404	55	18	0.90
206	IMO	20	0	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	1.7782	60	18	0.90
207	IMO	20	0	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	1.8129	65	18	0.90
208	IMO	20	0	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	1.8451	70	19	0.95

REGRESSAO LOGISTICA DAS CURVAS DE LIMIARES DA REACAO DE DEFESA
COMPARACAO INTRA ENTRE TRIAGEM, AGUDO, MIBEFRADIL 24H, MIBEFRADIL 48H
TESTE DE COINCIDENCIA: MODELO COMPLETO: 8 PARAMETROS

----- RSP=IMO -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
Response Variable (Events): FA
Response Variable (Trials): N
Number of Observations: 46
Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	413
2	NO EVENT	507

WARNING: 6 observation(s) were deleted due to missing values for the response or explanatory variables.

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1275.391	860.788	.
SC	1275.391	899.383	.
-2 LOG L	1275.391	844.788	430.603 with 8 DF (p=0.0001)
Score	.	.	360.200 with 8 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Estimate	Variable Label
EST1	-15.5239	2.0982	54.7400	0.0001	-3.652748	TRIAGEM
EST2	-12.1959	2.2747	28.7467	0.0001	-2.954160	MibAGUDO
EST3	-13.3062	1.8565	51.3723	0.0001	-3.223094	Mib24h
EST4	-16.4930	2.1969	56.3595	0.0001	-3.880779	Mib48h
LE1	9.8757	1.2997	57.7321	0.0001	3.797623	TRIAGEM
LE2	6.5502	1.3292	24.2858	0.0001	2.543502	MibAGUDO
LE3	7.9954	1.1176	51.1808	0.0001	3.104707	Mib24h
LE4	10.5179	1.3647	59.4016	0.0001	4.044558	Mib48h

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 85.8%	Somers' D = 0.729
Discordant = 12.9%	Gamma = 0.739
Tied = 1.4%	Tau-a = 0.361
(209391 pairs)	c = 0.864

Estimated Covariance Matrix

Variable	EST1	EST2	EST3	EST4
EST1	4.4024670343	0	0	0
EST2	0	5.1741797599	0	0
EST3	0	0	3.4465006852	0
EST4	0	0	0	4.8264926197
LE1	-2.717682227	0	0	0
LE2	0	-3.01463773	0	0
LE3	0	0	-2.067297024	0
LE4	0	0	0	-2.988089519
Variable	LE1	LE2	LE3	LE4
EST1	-2.717682227	0	0	0
EST2	0	-3.01463773	0	0
EST3	0	0	-2.067297024	0
EST4	0	0	0	-2.988089519
LE1	1.6893461719	0	0	0
LE2	0	1.7666559242	0	0
LE3	0	0	1.24903503	0
LE4	0	0	0	1.862329343

REGRESSAO LOGISTICA DAS CURVAS DE LIMIARES DA REACAO DE DEFESA
 COMPARACAO INTRA ENTRE TRIAGEM, AGUDO, MIBEFRADIL 24H, MIBEFRADIL 48H
 TESTE DE COINCIDENCIA: MODELO REDUZIDO: 2 PARAMETROS
 H0: EST1=EST2=EST3=EST4

----- RSP=IMO -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 46
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	413
2	NO EVENT	507

WARNING: 6 observation(s) were deleted due to missing values for the response or explanatory variables.

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1275.391	975.117	.
SC	1275.391	984.765	.
-2 LOG L	1275.391	971.117	304.274 with 2 DF (p=0.0001)
Score	.	.	258.910 with 2 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Estimate
EST00	-12.7459	0.9207	191.6415	0.0001	0
LE00	7.7084	0.5557	192.4169	0.0001	0.800620

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 77.8%	Somers' D = 0.616
Discordant = 16.1%	Gamma = 0.657
Tied = 6.1%	Tau-a = 0.305
(209391 pairs)	c = 0.808

REGRESSAO LOGISTICA DAS CURVAS DE LIMIARES DA REACAO DE DEFESA
 COMPARACAO INTRA ENTRE TRIAGEM, AGUDO, MIBEFRADIL 24H, MIBEFRADIL 48H
 TESTE DE COINCIDENCIA: MODELO REDUZIDO: 2 PARAMETROS
 H0: EST1=EST2=EST3=EST4

----- RSP=MIC -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 39
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	222
2	NO EVENT	558

WARNING: 13 observation(s) were deleted due to missing values for the response or explanatory variables.

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1081.310	840.934	.
SC	1081.310	850.252	.
-2 LOG L	1081.310	836.934	244.376 with 2 DF (p=0.0001)
Score	.	.	208.913 with 2 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Estimate
EST00	-10.8002	1.2110	79.5328	0.0001	0
LE00	5.8774	0.7067	69.1721	0.0001	0.538378

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 67.0%	Somers' D = 0.427
Discordant = 24.3%	Gamma = 0.468
Tied = 8.8%	Tau-a = 0.174
(123876 pairs)	c = 0.714

REGRESSAO LOGISTICA DAS CURVAS DE LIMIARES DA REACAO DE DEFESA
 COMPARACAO INTRA ENTRE TRIAGEM, AGUDO, MIBEFRADIL 24H, MIBEFRADIL 48H
 TESTE DE COINCIDENCIA: MODELO REDUZIDO: 6 PARAMETROS
 H0: EST1=EST2

----- RSP=IMO -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 46
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	413
2	NO EVENT	507

WARNING: 6 observation(s) were deleted due to missing values for the response or explanatory variables.

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1275.391	945.663	.
SC	1275.391	974.609	.
-2 LOG L	1275.391	933.663	341.728 with 6 DF (p=0.0001)
Score	.	.	286.852 with 6 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
EST12	-11.7702	1.2892	83.3603	0.0001	-3.246401	
EST3	-13.3062	1.8564	51.3750	0.0001	-3.223094	Mib24h
EST4	-16.4930	2.1969	56.3601	0.0001	-3.880779	Mib48h
LE12	6.9276	0.7715	80.6338	0.0001	3.105612	
LE3	7.9954	1.1176	51.1833	0.0001	3.104707	Mib24h
LE4	10.5179	1.3647	59.4022	0.0001	4.044558	Mib48h

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 81.6%	Somers' D = 0.655
Discordant = 16.1%	Gamma = 0.671
Tied = 2.3%	Tau-a = 0.325
(209391 pairs)	c = 0.828

REGRESSAO LOGISTICA DAS CURVAS DE LIMIARES DA REACAO DE DEFESA
 COMPARACAO INTRA ENTRE TRIAGEM, AGUDO, MIBEFRADIL 24H, MIBEFRADIL 48H
 TESTE DE COINCIDENCIA: MODELO REDUZIDO: 6 PARAMETROS
 H0: EST1=EST3

----- RSP=IMO -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 46
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	413
2	NO EVENT	507

WARNING: 6 observation(s) were deleted due to missing values for the response or explanatory variables.

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1275.391	871.205	.
SC	1275.391	900.151	.
-2 LOG L	1275.391	859.205	416.186 with 6 DF (p=0.0001)
Score	.	.	349.936 with 6 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
EST13	-13.9241	1.3474	106.7874	0.0001	-3.840458	
EST2	-12.1959	2.2747	28.7467	0.0001	-2.954160	MibAGUDO
EST4	-16.4930	2.1969	56.3595	0.0001	-3.880779	Mib48h
LE13	8.6152	0.8215	109.9913	0.0001	3.862174	
LE2	6.5502	1.3292	24.2858	0.0001	2.543502	MibAGUDO
LE4	10.5179	1.3647	59.4016	0.0001	4.044558	Mib48h

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 84.9%	Somers' D = 0.719
Discordant = 13.0%	Gamma = 0.734
Tied = 2.0%	Tau-a = 0.356
(209391 pairs)	c = 0.859

REGRESSAO LOGISTICA DAS CURVAS DE LIMIARES DA REACAO DE DEFESA
 COMPARACAO INTRA ENTRE TRIAGEM, AGUDO, MIBEFRADIL 24H, MIBEFRADIL 48H
 TESTE DE COINCIDENCIA: MODELO REDUZIDO: 6 PARAMETROS
 H0: EST1=EST4

----- RSP=IMO -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 46
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	413
2	NO EVENT	507

WARNING: 6 observation(s) were deleted due to missing values for the response or explanatory variables.

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1275.391	856.967	.
SC	1275.391	885.913	.
-2 LOG L	1275.391	844.967	430.424 with 6 DF (p=0.0001)
Score	.	.	360.129 with 6 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
EST14	-15.9936	1.5169	111.1634	0.0001	-4.407097	
EST2	-12.1959	2.2747	28.7467	0.0001	-2.954160	MibAGUDO
EST3	-13.3062	1.8565	51.3723	0.0001	-3.223094	Mib24h
LE14	10.1871	0.9409	117.2121	0.0001	4.602208	
LE2	6.5502	1.3292	24.2858	0.0001	2.543502	MibAGUDO
LE3	7.9954	1.1176	51.1808	0.0001	3.104707	Mib24h

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 85.5%	Somers' D = 0.728
Discordant = 12.6%	Gamma = 0.743
Tied = 1.9%	Tau-a = 0.361
(209391 pairs)	c = 0.864

REGRESSAO LOGISTICA DAS CURVAS DE LIMIARES DA REACAO DE DEFESA
 COMPARACAO INTRA ENTRE TRIAGEM, AGUDO, MIBEFRADIL 24H, MIBEFRADIL 48H
 TESTE DE COINCIDENCIA: MODELO REDUZIDO: 6 PARAMETROS
 H0: EST2=EST3

----- RSP=IMO -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 46
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	413
2	NO EVENT	507

WARNING: 6 observation(s) were deleted due to missing values for the response or explanatory variables.

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1275.391	890.529	.
SC	1275.391	919.475	.
-2 LOG L	1275.391	878.529	396.862 with 6 DF (p=0.0001)
Score	.	.	331.180 with 6 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
EST23	-12.0960	1.3561	79.5632	0.0001	-3.333087	
EST1	-15.5239	2.0982	54.7400	0.0001	-3.652748	TRIAGEM
EST4	-16.4930	2.1969	56.3595	0.0001	-3.880779	Mib48h
LE23	6.8953	0.8035	73.6396	0.0001	3.063918	
LE1	9.8757	1.2997	57.7321	0.0001	3.797623	TRIAGEM
LE4	10.5179	1.3647	59.4016	0.0001	4.044558	Mib48h

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 84.0%	Somers' D = 0.701
Discordant = 13.9%	Gamma = 0.716
Tied = 2.1%	Tau-a = 0.347
(209391 pairs)	c = 0.851

REGRESSAO LOGISTICA DAS CURVAS DE LIMIARES DA REACAO DE DEFESA
 COMPARACAO INTRA ENTRE TRIAGEM, AGUDO, MIBEFRADIL 24H, MIBEFRADIL 48H
 TESTE DE COINCIDENCIA: MODELO REDUZIDO: 6 PARAMETROS
 H0: EST2=EST4

----- RSP=IMO -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 46
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	413
2	NO EVENT	507

WARNING: 6 observation(s) were deleted due to missing values for the response or explanatory variables.

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1275.391	951.998	.
SC	1275.391	980.944	.
-2 LOG L	1275.391	939.998	335.393 with 6 DF (p=0.0001)
Score	.	.	282.385 with 6 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
EST24	-11.9920	1.2995	85.1563	0.0001	-3.307554	
EST1	-15.5239	2.0982	54.7402	0.0001	-3.652748	TRIAGEM
EST3	-13.3062	1.8564	51.3750	0.0001	-3.223094	Mib24h
LE24	7.0751	0.7779	82.7275	0.0001	3.171721	
LE1	9.8757	1.2997	57.7323	0.0001	3.797623	TRIAGEM
LE3	7.9954	1.1176	51.1833	0.0001	3.104707	Mib24h

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 81.2%	Somers' D = 0.647
Discordant = 16.5%	Gamma = 0.662
Tied = 2.3%	Tau-a = 0.321
(209391 pairs)	c = 0.824

REGRESSAO LOGISTICA DAS CURVAS DE LIMIARES DA REACAO DE DEFESA
 COMPARACAO INTRA ENTRE TRIAGEM, AGUDO, MIBEFRADIL 24H, MIBEFRADIL 48H
 TESTE DE COINCIDENCIA: MODELO REDUZIDO: 6 PARAMETROS
 H0: EST3=EST4

----- RSP=IMO -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 46
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	413
2	NO EVENT	507

WARNING: 6 observation(s) were deleted due to missing values for the response or explanatory variables.

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1275.391	874.053	.
SC	1275.391	902.999	.
-2 LOG L	1275.391	862.053	413.338 with 6 DF (p=0.0001)
Score	.	.	348.170 with 6 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
EST34	-14.2423	1.3673	108.4942	0.0001	-3.928227	
EST1	-15.5239	2.0982	54.7400	0.0001	-3.652748	TRIAGEM
EST2	-12.1959	2.2747	28.7467	0.0001	-2.954160	MibAGUDO
LE34	8.8263	0.8342	111.9386	0.0001	3.956811	
LE1	9.8757	1.2997	57.7321	0.0001	3.797623	TRIAGEM
LE2	6.5502	1.3292	24.2858	0.0001	2.543502	MibAGUDO

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 84.7%	Somers' D = 0.715
Discordant = 13.2%	Gamma = 0.731
Tied = 2.1%	Tau-a = 0.354
(209391 pairs)	c = 0.858

REGRESSAO LOGISTICA DAS CURVAS DE LIMIARES DA REACAO DE DEFESA
 COMPARACAO INTRA ENTRE TRIAGEM, AGUDO, MIBEFRADIL 24H, MIBEFRADIL 48H
 TESTE DE PARALELISMO: MODELO REDUZIDO: 5 PARAMETROS
 H0: LE1=LE2=LE3=LE4

----- RSP=IMO -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 46
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Binary

Value	Outcome	Count
1	EVENT	413
2	NO EVENT	507

WARNING: 6 observation(s) were deleted due to missing values for the response or explanatory variables.

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1275.391	860.240	.
SC	1275.391	884.361	.
-2 LOG L	1275.391	850.240	425.151 with 5 DF (p=0.0001)
Score	.	.	333.201 with 5 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
EST1	-13.8599	1.0421	176.8754	0.0001	-3.261205	TRIAGEM
EST2	-16.1303	1.1185	207.9587	0.0001	-3.907167	MibAGUDO
EST3	-14.7081	1.0733	187.7850	0.0001	-3.562666	Mib24h
EST4	-13.8028	1.0398	176.2182	0.0001	-3.247783	Mib48h
LE00	8.8413	0.6394	191.2220	0.0001	0.918285	

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 85.7%	Somers' D = 0.729
Discordant = 12.9%	Gamma = 0.739
Tied = 1.4%	Tau-a = 0.361
(209391 pairs)	c = 0.864

REGRESSAO LOGISTICA DAS CURVAS DE LIMIARES DA REACAO DE DEFESA
 COMPARACAO INTRA ENTRE TRIAGEM, AGUDO, MIBEFRADIL 24H, MIBEFRADIL 48H
 TESTE DE PARALELISMO: MODELO REDUZIDO: 7 PARAMETROS
 H0: LE1=LE2

----- RSP=IMO -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 46
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	413
2	NO EVENT	507

WARNING: 6 observation(s) were deleted due to missing values for the response or explanatory variables.

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1275.391	861.904	.
SC	1275.391	895.674	.
-2 LOG L	1275.391	847.904	427.487 with 7 DF (p=0.0001)
Score	.	.	342.389 with 7 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
EST1	-13.2785	1.5237	75.9466	0.0001	-3.124414	TRIAGEM
EST2	-15.5067	1.6332	90.1457	0.0001	-3.756113	MibAGUDO
EST3	-13.3062	1.8565	51.3723	0.0001	-3.223094	Mib24h
EST4	-16.4930	2.1969	56.3595	0.0001	-3.880779	Mib48h
LE12	8.4798	0.9416	81.0977	0.0001	3.801477	
LE3	7.9954	1.1176	51.1808	0.0001	3.104707	Mib24h
LE4	10.5179	1.3647	59.4016	0.0001	4.044558	Mib48h

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 85.8%	Somers' D = 0.730
Discordant = 12.8%	Gamma = 0.741
Tied = 1.5%	Tau-a = 0.361
(209391 pairs)	c = 0.865

REGRESSAO LOGISTICA DAS CURVAS DE LIMIARES DA REACAO DE DEFESA
 COMPARACAO INTRA ENTRE TRIAGEM, AGUDO, MIBEFRADIL 24H, MIBEFRADIL 48H
 TESTE DE PARALELISMO: MODELO REDUZIDO: 7 PARAMETROS
 H0: LE1=LE3

----- RSP=IMO -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 46
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	413
2	NO EVENT	507

WARNING: 6 observation(s) were deleted due to missing values for the response or explanatory variables.

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1275.391	860.000	.
SC	1275.391	893.770	.
-2 LOG L	1275.391	846.000	429.391 with 7 DF (p=0.0001)
Score	.	.	356.826 with 7 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
EST1	-13.8995	1.3822	101.1221	0.0001	-3.270535	TRIAGEM
EST2	-12.1959	2.2747	28.7467	0.0001	-2.954160	MibAGUDO
EST3	-14.7490	1.4247	107.1675	0.0001	-3.572575	Mib24h
EST4	-16.4930	2.1969	56.3595	0.0001	-3.880779	Mib48h
LE13	8.8659	0.8529	108.0597	0.0001	3.974555	
LE2	6.5502	1.3292	24.2858	0.0001	2.543502	MibAGUDO
LE4	10.5179	1.3647	59.4016	0.0001	4.044558	Mib48h

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 85.8%	Somers' D = 0.729
Discordant = 12.9%	Gamma = 0.739
Tied = 1.4%	Tau-a = 0.361
(209391 pairs)	c = 0.864

REGRESSAO LOGISTICA DAS CURVAS DE LIMIARES DA REACAO DE DEFESA
 COMPARACAO INTRA ENTRE TRIAGEM, AGUDO, MIBEFRADIL 24H, MIBEFRADIL 48H
 TESTE DE PARALELISMO: MODELO REDUZIDO: 7 PARAMETROS
 H0: LE1=LE4

----- RSP=IMO -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 46
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	413
2	NO EVENT	507

WARNING: 6 observation(s) were deleted due to missing values for the response or explanatory variables.

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1275.391	858.904	.
SC	1275.391	892.675	.
-2 LOG L	1275.391	844.904	430.487 with 7 DF (p=0.0001)
Score	.	.	360.165 with 7 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
EST1	-16.0278	1.5243	110.5631	0.0001	-3.771330	TRIAGEM
EST2	-12.1959	2.2747	28.7467	0.0001	-2.954160	MibAGUDO
EST3	-13.3062	1.8565	51.3723	0.0001	-3.223094	Mib24h
EST4	-15.9653	1.5204	110.2623	0.0001	-3.756611	Mib48h
LE14	10.1890	0.9411	117.2104	0.0001	4.603058	
LE2	6.5502	1.3292	24.2858	0.0001	2.543502	MibAGUDO
LE3	7.9954	1.1176	51.1808	0.0001	3.104707	Mib24h

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 85.8%	Somers' D = 0.729
Discordant = 12.9%	Gamma = 0.738
Tied = 1.3%	Tau-a = 0.361
(209391 pairs)	c = 0.864

REGRESSAO LOGISTICA DAS CURVAS DE LIMIARES DA REACAO DE DEFESA
 COMPARACAO INTRA ENTRE TRIAGEM, AGUDO, MIBEFRADIL 24H, MIBEFRADIL 48H
 TESTE DE PARALELISMO: MODELO REDUZIDO: 7 PARAMETROS
 H0: LE2=LE3

----- RSP=IMO -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 46
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	413
2	NO EVENT	507

WARNING: 6 observation(s) were deleted due to missing values for the response or explanatory variables.

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1275.391	859.468	.
SC	1275.391	893.238	.
-2 LOG L	1275.391	845.468	429.923 with 7 DF (p=0.0001)
Score	.	.	352.855 with 7 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
EST1	-15.5239	2.0982	54.7400	0.0001	-3.652748	TRIAGEM
EST2	-13.7229	1.4791	86.0789	0.0001	-3.324031	MibAGUDO
EST3	-12.3922	1.4227	75.8647	0.0001	-3.001691	Mib24h
EST4	-16.4930	2.1969	56.3595	0.0001	-3.880779	Mib48h
LE23	7.4426	0.8562	75.5648	0.0001	3.307124	
LE1	9.8757	1.2997	57.7321	0.0001	3.797623	TRIAGEM
LE4	10.5179	1.3647	59.4016	0.0001	4.044558	Mib48h

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 85.8%	Somers' D = 0.730
Discordant = 12.9%	Gamma = 0.739
Tied = 1.3%	Tau-a = 0.361
(209391 pairs)	c = 0.865

REGRESSAO LOGISTICA DAS CURVAS DE LIMIARES DA REACAO DE DEFESA
 COMPARACAO INTRA ENTRE TRIAGEM, AGUDO, MIBEFRADIL 24H, MIBEFRADIL 48H
 TESTE DE PARALELISMO: MODELO REDUZIDO: 7 PARAMETROS
 H0: LE2=LE4

----- RSP=IMO -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 46
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	413
2	NO EVENT	507

WARNING: 6 observation(s) were deleted due to missing values for the response or explanatory variables.

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1275.391	863.026	.
SC	1275.391	896.796	.
-2 LOG L	1275.391	849.026	426.365 with 7 DF (p=0.0001)
Score	.	.	340.601 with 7 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
EST1	-15.5239	2.0982	54.7400	0.0001	-3.652748	TRIAGEM
EST2	-16.0755	1.6777	91.8170	0.0001	-3.893879	MibAGUDO
EST3	-13.3062	1.8565	51.3723	0.0001	-3.223094	Mib24h
EST4	-13.7518	1.5594	77.7666	0.0001	-3.235787	Mib48h
LE24	8.8095	0.9661	83.1461	0.0001	3.949261	
LE1	9.8757	1.2997	57.7321	0.0001	3.797623	TRIAGEM
LE3	7.9954	1.1176	51.1808	0.0001	3.104707	Mib24h

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 85.8%	Somers' D = 0.729
Discordant = 12.9%	Gamma = 0.739
Tied = 1.4%	Tau-a = 0.361
(209391 pairs)	c = 0.865

REGRESSAO LOGISTICA DAS CURVAS DE LIMIARES DA REACAO DE DEFESA
 COMPARACAO INTRA ENTRE TRIAGEM, AGUDO, MIBEFRADIL 24H, MIBEFRADIL 48H
 TESTE DE PARALELISMO: MODELO REDUZIDO: 7 PARAMETROS
 H0: LE3=LE4

----- RSP=IMO -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 46
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	413
2	NO EVENT	507

WARNING: 6 observation(s) were deleted due to missing values for the response or explanatory variables.

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1275.391	860.863	.
SC	1275.391	894.634	.
-2 LOG L	1275.391	846.863	428.527 with 7 DF (p=0.0001)
Score	.	.	356.024 with 7 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
EST1	-15.5239	2.0982	54.7400	0.0001	-3.652748	TRIAGEM
EST2	-12.1959	2.2747	28.7467	0.0001	-2.954160	MibAGUDO
EST3	-15.1962	1.4568	108.8029	0.0001	-3.680896	Mib24h
EST4	-14.2746	1.4090	102.6372	0.0001	-3.358785	Mib48h
LE34	9.1353	0.8716	109.8465	0.0001	4.095303	
LE1	9.8757	1.2997	57.7321	0.0001	3.797623	TRIAGEM
LE2	6.5502	1.3292	24.2858	0.0001	2.543502	MibAGUDO

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 85.7%	Somers' D = 0.727
Discordant = 12.9%	Gamma = 0.738
Tied = 1.4%	Tau-a = 0.360
(209391 pairs)	c = 0.864