

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

JOHNATHAN JUNIOR VAZ CARVALHO

**PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO NORADRENÉRGICA DA SUBSTÂNCIA  
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL NA MODULAÇÃO DE  
COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS RELACIONADOS AOS TRANSTORNOS DE  
ANSIEDADE GENERALIZADA E DE PÂNICO**

VITÓRIA – ES  
2016

JOHNATHAN JUNIOR VAZ CARVALHO

**PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO NORADRENÉRGICA DA SUBSTÂNCIA  
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL NA MODULAÇÃO DE  
COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS RELACIONADOS AOS TRANSTORNOS DE  
ANSIEDADE GENERALIZADA E DE PÂNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Valquíria Camin de Bortoli

VITÓRIA – ES

2016

JOHNATHAN JUNIOR VAZ CARVALHO

**PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO NORADRENÉRGICA NA MODULAÇÃO DE  
COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS RELACIONADOS AOS TRANSTORNOS DE  
ANSIEDADE GENERALIZADA E DO PÂNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovada em 19 de julho de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valquíria Camin de Bortoli – UFES

Orientadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula S. de V. Bittencourt – UFES

Examinador Interno

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniele Cristina de Aguiar - UFMG

Examinador Externo

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade  
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

C331p Carvalho, Johnathan Junior Vaz, 1982 -  
Papel da neurotransmissão noradrenérgica da substância  
cinzenta periaquedutal dorsal na modulação de comportamentos  
defensivos relacionados aos transtornos de ansiedade  
generalizada e de pânico / Johnathan Junior Vaz Carvalho –  
2016.  
67 f. : il.

Orientador: Valquíria Camin de Bortoli.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da  
Saúde.

1. Noradrenalina. 2. Substância Cinzenta Periaquedutal.  
3. Ansiedade. 4. Pânico. 5. Labirinto. I. Bortoli, Valquíria Camin  
de. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de  
Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---

Dedico esse trabalho à minha família e a todas as pessoas que direta e indiretamente participaram dessa conquista.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, meu Senhor e Pai. Obrigado por ter me permitido a realização desse sonho. O Senhor me sonda e me conhece. Me fortaleceu quando os desafios eram maiores do que eu. Me manteve no caminho nos momentos em que a fuga era a saída mais fácil. Obrigado por nunca desistir de mim.

À minha esposa Gabriela. Esse trabalho é tão seu quanto meu. Gostaria de ter a certeza que você tinha que isso poderia ser possível. Sempre me apoiou e perdoou minha ausência nos momentos em que o trabalho precisava ser feito. Sei que não foi fácil para você e lhe prometo que esse investimento será para colhermos bons frutos em toda nossa vida. Te amo linda!

Aos meus filhos. Meu Deus, como amo vocês! Quantas saudades tive de vocês nos momentos que precisei estar fora de casa. No mesmo instante em que pensava em abandonar tudo pela saudade eu me fortalecia por acreditar que tudo isso é por vocês. Além disso pude proporcionar a vocês um pai que trabalha fabricando “capacete para rato”.

À minha inestimável orientadora, Profa. Dra. Valquíria Camin de Bortoli. Profissional exemplar com um coração de mãe. Sou eternamente grato por me aceitar como orientado. Pode ter a certeza que serei um multiplicador dos seus ensinamentos. Tenho conhecimento das minhas falhas como orientado, mas pode ter certeza que sempre me empenhei em ser um aluno que lhe desse orgulho e garantia de que seu tempo e dedicação foram bem aproveitados. Sou muito feliz em ter participado contigo nos primeiros passos do laboratório de psicofarmacologia e espero deixar minha colaboração para os próximos orientados.

Aos meus pais por todo o apoio em meus estudos. Sempre acreditaram em mim me proporcionando a segurança necessária desde os primeiros anos escolares. Espero ter dado orgulho a vocês e espero ser a cada dia um filho melhor. Amo vocês!

Ao Prof. Dr. Juliano Manvailer Martins pelos constantes ensinamentos e pela paciência ímpar nas orientações técnicas em nosso laboratório. Fico muito agradecido por ter trabalhado ao seu lado.

À Profa. Dra. Vanessa Beijamini Harres por todo apoio durante o mestrado. Sempre nos recebeu de portas abertas e compartilhou seu vasto conhecimento com total dedicação. Serei eternamente grato por tudo.

À minha amiga Dayane de Oliveira Souza pela parceria no laboratório e pela ajuda nos experimentos. Sua ajuda foi inestimável para a realização desse trabalho. Rimos muito, choramos muito, nos desesperamos muito e trabalhamos muito. Pode ter certeza que deixaremos uma pequena contribuição para os futuros orientados do laboratório de psicofarmacologia.

Ao amigo André Martins Fontes (Parça) pela amizade, pelo apoio e pelos incontáveis cafés ao longo do curso e da vida profissional.

À Dra. Claudia Janaína Torres Muller por todo o conhecimento compartilhado e pela amizade oferecida.

Às amigas do laboratório de psicofarmacologia Gabriela Siloti, Flávia Chaves, Juliana Morais e Mayana Cardoso de Oliveira por todo o apoio técnico que me ofereceram sem pedir nada em troca. Suas contribuições são imensuráveis para esse trabalho, além da amizade e apoio nos momentos difíceis do mestrado.

Aos amigos da turma 2013/02 do curso de mestrado em bioquímica e farmacologia Willyan Franco Hilário, Tassiane Servare Andrade, Bárbara Altoé Milaneze, Gabriela

Siloti, Bruna Zanetti, Rayssa Arruda, Erich Moraes e Tamara Alarcon. A convivência com vocês fez total diferença em minha vida e me ajudou a romper as barreiras durante essa jornada.

Ao Professor Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes por gentilmente ter cedido as drogas utilizadas no presente trabalho.

Ao Laboratório de Histologia Molecular e Imunoistoquímica (LHMI), à coordenadora científica Prof. Dra. Cristina Martins e Silva e aos técnicos Danielle Lessa Junger e Mário Armando Dantas pela colaboração na realização deste trabalho. Sempre foram muito cordiais e compreensíveis quanto as dificuldades de deslocamento.

À equipe do Biotério Central da UFES, em especial ao médico veterinário Rodolpho José da Silva Barros pelos incontáveis momentos de apoio ao nosso laboratório.

Sempre nos ajudaram com profissionalismo e paciência.

Aos professores pelos ensinamentos compartilhados que expandiram meus horizontes de forma incalculável.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt e Profa. Dra. Daniele Cristina de Aguiar pela disponibilidade e pelas importantes contribuições ao presente trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo pelo apoio financeiro.

A todos que acreditaram que esse sonho poderia ser realizado.



*“Julgue seu sucesso pelas coisas que  
você teve que renunciar para conseguir”.*

*Dalai Lama*

## RESUMO

A substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) é uma estrutura mesencefálica envolvida na mediação de comportamentos defensivos associados aos transtornos de ansiedade generalizada (TAG) e de pânico (TP). Existem evidências que indicam um envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica da SCPD na modulação da ansiedade, no entanto, não existe evidência sobre sua participação nos ataques de pânico. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi investigar a participação da neurotransmissão noradrenérgica da SCPD na mediação de comportamentos defensivos relacionados ao TAG e ao TP em animais testados no labirinto em T elevado (LTE), um modelo animal que associa a resposta de esquiva inibitória ao TAG e a resposta de fuga ao TP. Para tal, ratos Wistar receberam a administração intra-SCPD de noradrenalina (10, 30 ou 60 nmoles/0,1µL) ou salina e foram testados no LTE. Adicionalmente, investigamos o efeito do pré-tratamento intra-SCPD com os antagonistas não seletivos de receptores alfa e beta-adrenérgicos, fentolamina e propranolol, respectivamente, no efeito da injeção de noradrenalina na mesma estrutura. Nossos resultados mostram que a administração intra-SCPD de noradrenalina na maior dose prejudicou a aquisição da esquiva inibitória, sugerindo um efeito do tipo ansiolítico, porém não apresentou efeito sobre a resposta de fuga no LTE. Além disso, a injeção de noradrenalina não alterou a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto, sugerindo que o efeito ansiolítico não foi devido a um aumento na atividade exploratória. Os resultados mostram ainda que o pré-tratamento intra-SCPD de fentolamina ou propranolol atenuou o efeito do tipo ansiolítico da noradrenalina. Assim, o presente estudo sugere um envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica na SCPD, via receptores alfa e beta-adrenérgicos, em reações defensivas associadas com o TAG, mas não com o TP em animais submetidos ao LTE.

Palavras-chave: noradrenalina, substância cinzenta periaquedutal dorsal, ansiedade, pânico, labirinto em T elevado.

## ABSTRACT

The dorsal periaqueductal gray matter (DPAG) is a midbrain structure involved in the mediation of defensive behaviors associated with generalized anxiety disorder (GAD) and panic disorder (PD). There is evidence indicating the involvement of noradrenergic neurotransmission DPAG in the modulation of anxiety, however, there is no evidence for their involvement in panic attacks. In this sense, the objective of this study was to investigate the involvement of noradrenergic neurotransmission DPAG in mediating defensive behaviors related to GAD and PD in the elevated T-maze (ETM), an animal model that combines the inhibitory avoidance response to GAD and the escape response to PD. For this, Wistar rats were given intra-DPAG administration of noradrenaline (10, 30 or 60 nmol / 0,1µL) or saline and tested in ETM. In addition, we investigated the effect of pre-treatment with intra-DPAG nonselective antagonists of alpha and beta-adrenergic receptors, phentolamine and propranolol, respectively, in effect noradrenaline injection in the same structure. Our results show that intra-DPAG administration of noradrenaline at the highest dose impaired the acquisition of inhibitory avoidance, suggesting an anxiolytic-like effect, but no effect on the escape response in ETM. Furthermore, noradrenaline injection did not alter locomotor activity of animals in the open field test, suggesting that the anxiolytic effect was not due to an increase in exploratory activity. The results also show that pre-treatment with phentolamine or propranolol attenuated anxiolytic-like effect of noradrenaline. Thus, this study suggests an involvement of noradrenergic neurotransmission in DPAG partially mediated by alpha and beta-adrenergic receptors in defensive reactions associated with GAD, but not with PD in the ETM.

Keywords: noradrenaline, periaqueductal gray matter, anxiety, panic, elevated T-maze.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Modelo esquemático do Labirinto em T elevado.....	22
<b>Figura 2:</b> Fotos ilustrativas do aparelho utilizado para o teste do LTE.....	33
<b>Figura 3:</b> Foto ilustrativa da arena utilizada para o teste do campo aberto.....	35
<b>Figura 4:</b> Diagramas de secções coronais do encéfalo de ratos mostrando a localização dos sítios de injeção na SCPD.....	40
<b>Figura 5:</b> Efeito da injeção intra-SCPD de NA nas doses de 10, 30 ou 60 nmoles/0,1µL ou salina sobre as respostas de esquiva inibitória e de fuga.....	42
<b>Figura 6:</b> Efeito da injeção prévia intra-SCPD de fentolamina ou salina 10 minutos antes da injeção intra-SCPD de NA na dose de 60 nmoles/0,1µL ou salina sobre as respostas de esquiva inibitória e fuga no LTE .....	45
<b>Figura 7:</b> Efeito da injeção prévia intra-SCPD de propranolol ou salina 10 minutos antes da injeção intra-SCPD de NA na dose de 60 nmoles/0,1µL ou salina sobre as respostas de esquiva inibitória e fuga no LTE.....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Estratégias comportamentais em relação ao nível de ameaça.....	20
<b>Tabela 2:</b> Efeito da administração intra-SCPD de noradrenalina ou salina sobre o número de cruzamentos no campo aberto.....	43
<b>Tabela 3:</b> Efeito da injeção prévia intra-SCPD de fentolamina ou salina sobre o número de cruzamentos no campo aberto de animais que receberam injeção intra-SCPD de noradrenalina ou salina.....	46
<b>Tabela 4:</b> Efeito da injeção prévia intra-SCPD de propranolol ou salina sobre o número de cruzamentos no campo aberto de animais que receberam injeção intra-SCPD de noradrenalina ou salina.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – Serotonina	SCP – Substância cinzenta periaquedutal
ACTH – Adrenocorticotropic hormone	SCPD – Substância cinzenta periaquedutal dorsal
APA – Associação Psiquiátrica Americana	SCPV – Substância cinzenta periaquedutal ventral
CID – Classificação internacional de doenças	SNC – Sistema nervoso central
DA – Dopamina	TAG – Transtorno de ansiedade generalizada
DSM – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders	TP – Transtorno de pânico
E1 – Esquiva 1	
E2 – Esquiva 2	
F1 – Fuga 1	
F2 – Fuga 2	
F3 – Fuga 3	
LB – Latência basal	
LC – Locus coeruleus	
LCE – Labirinto em cruz elevado	
NA – Noradrenalina	
NLET – Núcleo leito da estria terminal	
OMS – Organização Mundial da Saúde	

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1 Ansiedade.....	14
1.2 Transtorno de pânico e Transtorno de ansiedade generalizada .....	17
1.3 Reações de defesa e ansiedade .....	19
1.4 Labirinto em T elevado .....	22
1.5 Sistema noradrenérgico central e substância cinzenta periaquedutal.....	24
1.6 Noradrenalina e ansiedade .....	27
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
2.1 Objetivo geral .....	29
2.2 Objetivos específicos .....	29
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
3.1 Animais.....	30
3.2 Drogas .....	30
3.3 Cirurgia estereotáxica .....	31
3.4 Injeção das drogas .....	32
3.5 Aparelhos Experimentais.....	32
3.5.1 Labirinto em T elevado .....	32
3.5.2 Campo aberto.....	34
3.6 Testes Comportamentais .....	35
3.6.1 Habituação.....	35
3.6.2 Pré-exposição .....	36
3.6.3 Teste no labirinto em T elevado.....	36
3.6.4 Teste no campo aberto.....	37
3.7 Grupos experimentais .....	38

3.7.1	Experimento 1: Efeito da injeção intra-SCPD de noradrenalina (curva dose-resposta) sobre as respostas de esquiva inibitória e fuga em animais submetidos ao LTE. ....	38
3.7.2	Experimento 2: Efeito do pré-tratamento intra-SCPD com fentolamina (antagonista não seletivo de receptores alfa-adrenérgicos) sobre a administração intra-SCPD de noradrenalina em ratos submetidos ao LTE.....	38
3.7.3	Experimento 3: Efeito do pré-tratamento intra-SCPD com propranolol (antagonista não seletivo de receptores beta-adrenérgicos) sobre a administração intra-SCPD de noradrenalina em ratos submetidos ao LTE.....	38
3.8	Perfusão e Histologia .....	38
3.9	Análise estatística.....	39
4.	RESULTADOS .....	40
4.1	Experimento 1: Efeito da noradrenalina ou salina administradas intra-scpd de ratos submetidos ao modelo do LTE.....	40
4.2	Experimento 2: Efeito do pré-tratamento intra-SCPD com fentolamina (antagonista não seletivo de receptores alfa-adrenérgicos) sobre a administração intra-SCPD de noradrenalina em ratos submetidos ao LTE.....	43
4.3	Experimento 3: Efeito do pré-tratamento intra-SCPD com propranolol (antagonista não seletivo de receptores beta-adrenérgicos) sobre a administração intra-SCPD de noradrenalina em ratos submetidos ao LTE.....	46
5.	DISCUSSÃO.....	50
6.	REFERÊNCIAS.....	57



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Ansiedade

A ansiedade, palavra derivada do grego *agkho* que significa estrangular, sufocar e oprimir, é caracterizada como um estado apreensivo ou amedrontador, de caráter subjetivo, acompanhado por alterações fisiológicas, cognitivas e emocionais, tais como: aumento da pressão arterial, aumento da frequência respiratória, pensamentos negativos, aumento do estado de vigília e inquietação (BRANDÃO, 2001; GRAEFF e GUIMARÃES, 2012; PRATT, 1992; VIANA, 2010).

Diferentemente de outras patologias mentais, como a depressão e a esquizofrenia, a ansiedade pode ser tanto uma emoção normal quanto um transtorno psiquiátrico (NUTT, 1990; PRATT, 1992). Pode ser ainda considerada uma emoção semelhante ao medo, porém, ao passo que o medo é derivado de uma ameaça conhecida, a ansiedade se relaciona com uma ameaça potencial. Dessa forma, tanto o medo quanto a ansiedade representam avanços adaptativos, reunindo respostas que visam manter a integridade física ou psíquica do indivíduo (GRAEFF e GUIMARÃES, 2012; KIM e GORMAN, 2005). Contudo, a ansiedade como patologia pode ser resultante da perda da capacidade do organismo de responder de forma adequada frente a determinados estímulos, podendo gerar respostas exageradas ou interferindo em seu funcionamento normal (PRATT, 1992).

Historicamente, no século XIX, a ansiedade passou a despertar um maior interesse da medicina sendo abordada como um quadro patológico específico, juntamente com o nascimento da psiquiatria como uma especialidade médica. Assim, em 1813, o médico francês Augustin-Jacob Landré-Beauvais em seus relatos caracterizou a

ansiedade por sintomas de inquietude e desconforto emocional. Nesse mesmo século o médico alemão Otto Domrich descreveu os “ataques de ansiedade”, o que hoje é denominado de ataque de pânico, associando sintomas como palpitação e a tontura ao quadro clínico, e em 1871 Jacob Mendez DaCosta descreveu esses sintomas na “síndrome do coração irritável” (NARDI, 2006; PAPAKOSTAS et al., 2003; PEREIRA, 1997 *apud* VIANA, 2010).

No ano de 1869 George Miller Beard descreveu a neurastenia como um tipo menor de ansiedade e depressão. Ele associou a presença de fadiga física de origem nervosa (exaustão nervosa), dores de cabeça, dificuldades de concentração e insônia ao quadro clínico (MILLON, 2005; NARDI, 2006; PEREIRA, 1997 *apud* VIANA 2010).

Cabe ressaltar, que em 1895 a ansiedade alcançou destaque na medicina psiquiátrica com os estudos do médico austríaco Sigmund Freud. Ele descreveu uma síndrome, a qual chamou de “neurose de angústia” diferenciando-a da neurastenia. A “neurose de angústia” foi caracterizada por irritabilidade geral, ataques de angústia, vertigem e parestesia. Adicionalmente Freud propôs duas formas de “neurose de angústia”: ataques de angústia e estado crônico, mas não as considerou como entidades nosológicas distintas, e sim como variantes de uma mesma síndrome. Além disso, Freud descreveu alguns aspectos que nas classificações contemporâneas são referentes aos “ataques de pânico”, como a imprevisibilidade dos ataques e a sensação de morte iminente (SHORTER, 1997; VIANA, 2010).

A classificação dos transtornos de ansiedade teve início em 1853 com a criação da Classificação Internacional de Doenças (CID), uma publicação da Organização Mundial da Saúde (OMS), com revisões em intervalos de dez anos. A CID na sua

quinta edição (CID-5) continha apenas uma categoria para doenças mentais, contida na Seção VI – doenças do sistema nervoso e dos órgãos dos sentidos. Posteriormente, em 1948, como parte da CID na sua sexta edição (CID-6), surgiu a primeira classificação internacional de doenças mentais, que contava com 26 categorias diagnósticas entre psicoses, transtornos do caráter e comportamento (GRAEFF e HETEM, 2012; VIANA, 2010).

Finalmente, em 1952 a Associação Psiquiátrica Americana (APA) publicou o Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM, em inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), motivada pela insatisfação dos psiquiatras norte-americanos com a CID-6 que não continha algumas entidades nosológicas, dessa forma, prejudicando o diagnóstico. Em sua primeira edição os transtornos de ansiedade aparecem nas psiconeuroses com a nomenclatura de reação ansiosa, reação fóbica e reação obsessivo-compulsiva (GRAEFF e HETEM, 2012; VIANA, 2010).

Segundo a classificação mais recente dos transtornos mentais publicada na quinta edição (DSM-V, 2013) os transtornos de ansiedade foram classificados em:

- Transtorno de ansiedade de separação,
- Mutismo seletivo,
- Fobia específica,
- Transtorno de ansiedade social (fobia social),
- Transtorno de pânico,
- Agorafobia,
- Transtorno de ansiedade generalizada,

- Transtorno de ansiedade induzido por substância/medicamento,
- Transtorno de ansiedade devido a outra condição médica,
- Outro transtorno de ansiedade especificado,
- Outro transtorno de ansiedade não-especificado.

Dentre esses transtornos, de especial interesse para o presente trabalho estão o Transtorno de ansiedade generalizada e o Transtorno de pânico, que serão abordados na seção a seguir.

## **1.2 Transtorno de pânico e Transtorno de ansiedade generalizada**

A principal característica do transtorno de pânico (TP) é a ocorrência espontânea, inesperada e recorrente de ataques de pânico, onde sentimentos de medo extremo são acompanhados de sintomas neurovegetativos (CLARK, 1986; GRAEFF, 2004; GRAEFF e DEL-BEM, 2008; GRAEFF e HETEM, 2012).

Conforme o DSM-V o ataque de pânico é definido como um surto abrupto de medo ou desconforto intenso, que pode ser iniciado a partir de um estado calmo ou ansioso, cujo ápice ocorre em minutos acompanhado de quatro ou mais dos seguintes sintomas: palpitações, coração acelerado, taquicardia, sudorese, tremores ou abalos, sensações de falta de ar ou sufocamento, sensações de asfixia, dor ou desconforto torácico, náusea ou desconforto abdominal, sensação de tontura, instabilidade, vertigem ou desmaio, calafrios ou ondas de calor, parestesias (anestesia ou sensações de formigamento), desrealização (sensações de

irrealidade) ou despersonalização (sensação de estar distanciado de si mesmo), medo de perder o controle ou “enlouquecer”; medo de morrer.

Adicionalmente, pelo menos um dos ataques de pânico é seguido no decorrer de um mês ou mais por preocupação ou apreensão constante de novos ataques ou suas consequências e/ou por uma mudança comportamental significativa em relação ao AP, como evitar exercícios físicos, reorganização da rotina diária visando haver ajuda em caso de novos ataques de pânico e restrição de atividades habituais.

Segundo o DSM-V o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) tem como características fundamentais a ansiedade e preocupação excessivas sobre eventos e atividades cotidianas por pelo menos seis meses, onde o indivíduo tem dificuldade de manter a ansiedade em níveis não-prejudiciais. Essa ansiedade e preocupação estão associadas à pelos menos três dos seguintes sintomas: inquietação ou sensação de estar com os nervos à flor da pele, fadigabilidade, dificuldade em concentrar-se ou sensações de “branco” na mente, irritabilidade, tensão muscular, perturbação do sono (dificuldade em conciliar ou manter o sono, ou sono insatisfatório e inquieto). Esses sintomas, juntamente com a ansiedade e preocupação excessivas, podem causar um sofrimento que é clinicamente significativo, além de perturbações em diversas áreas da vida do paciente.

A epidemiologia dos transtornos de ansiedade em pacientes atendidos pela atenção primária em saúde aponta uma média de 7,9% de pacientes com TAG, 1,1% com TP segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em estudos realizados desde a década de 1990, em quinze países, incluindo o Brasil. Nos Estados Unidos, considerando a população em geral, a estimativa de prevalência de 12 meses para ataques de pânico é de 11,2% em adultos. Indivíduos do sexo feminino são afetados com mais frequência do que os do masculino. Os ataques de pânico podem ocorrer

em crianças, mas são relativamente raros até a puberdade, quando a prevalência aumenta. As taxas de prevalência declinam em indivíduos mais velhos, possivelmente isso reflete uma diminuição na gravidade dos sintomas até níveis subclínicos (DSM-V, 2013).

A prevalência média do TAG no Brasil, segundo a OMS é de 22,6% (*apud* GRAEFF e HETEM, 2012). Outro estudo, realizado no Hospital Universitário Pedro Ernesto do Rio de Janeiro mostrou que entre os pacientes atendidos com transtornos mentais comuns, aproximadamente 40% eram pacientes com algum tipo de transtorno de ansiedade (FORTES et al., 2008). A prevalência de 12 meses do TAG é de 0,9% entre adolescentes e de 2,9% entre adultos na comunidade em geral nos Estados Unidos. Indivíduos do sexo feminino têm duas vezes mais probabilidade do que os do masculino de apresentar esse transtorno. A prevalência do diagnóstico tem seu pico na meia-idade e declina ao longo dos últimos anos de vida (DSM-V, 2013).

### **1.3 Reações de defesa e ansiedade**

Em seu livro intitulado “*A expressão das emoções no homem e nos animais*” (1872) Charles Darwin, por meio de sua abordagem sistemática, demonstra a importância das emoções nas diferentes espécies e como algumas podem ter sido preservadas ao longo das gerações. Dessa forma, o homem compartilha emoções básicas com outros mamíferos possibilitando a comparação de comportamentos entre as espécies.

Com base na teoria evolutiva de Darwin, os estados emocionais de ansiedade e medo humanos teriam raízes nos comportamentos de defesa dos animais frente ao

perigo ou algum estímulo prejudicial ao organismo. Por essa perspectiva, patologias relacionadas com transtornos de ansiedade poderiam ser desencadeadas por problemas em regiões encefálicas envolvidas com reações de defesa (GRAEFF, 2004; GRAEFF e HETEM, 2012).

Pelo estudo das reações de roedores frente a ameaças predatórias, os pesquisadores Robert e Caroline Blanchard classificaram as respostas defensivas adotadas pelos animais de acordo com o nível de ameaça em potencial, distal e proximal em relação à distância entre a presa e o predador (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988).

A tabela 1 apresenta de forma sucinta essa classificação relacionando cada nível de ameaça com as estratégias comportamentais adotadas pelo animal frente a um estímulo aversivo.

**Tabela 1: Estratégias comportamentais em relação ao nível de ameaça**

<b>Nível de ameaça</b>	<b>Estratégia comportamental</b>
Potencial	Avaliação de risco/inibição comportamental
Distal	Fuga/congelamento
Proximal	Ameaça/luta/fuga

(Adaptado de GRAEFF e HETEM, 2012; GRAEFF e GUIMARÃES, 2012)

Além das estratégias comportamentais, os trabalhos dos Blanchard relacionaram diversas estruturas encefálicas com os diferentes níveis de ameaças. Dessa forma o

primeiro nível, representado pela avaliação de risco, está associado a amígdala e o sistema septo-hipocampal. O segundo nível, tendo como respostas a fuga e/ou congelamento tem a participação da amígdala e a substância cinzenta periaquedutal ventral (SCPV). Já no último nível de ameaça os comportamentos preferencialmente observados são fuga, ameaça defensiva ou respostas de agressão defensiva e tem como principal substrato neural a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) (BLANCHARD et al., 1993; GRAY e MCNAUGHTON, 2000). Em trabalhos posteriores McNaughton e Corr (2004) sugerem que essas estruturas encefálicas participam em todos os níveis de ameaça, porém com maior atuação das estruturas rostrais em ameaças potenciais e de estruturas caudais nas respostas de luta e fuga.

Adicionalmente, foi sugerido que a avaliação de risco, caracterizada principalmente pela tendência de aproximação ao estímulo ameaçador, invocada quando o perigo é potencial ou incerto gera um conflito entre aproximação/esquiva e está relacionada com a ansiedade, mais precisamente a ansiedade antecipatória ou transtorno de ansiedade generalizada. Enquanto que a fuga eliciada pelo perigo proximal está relacionada com o medo e pânico, observando uma falta de impulso de aproximar ao perigo. Dessa forma, além da distância defensiva, pode-se diferenciar essas respostas pela direção defensiva (BLANCHARD, 1988; GRAY e MCNAUGHTON, 2000).

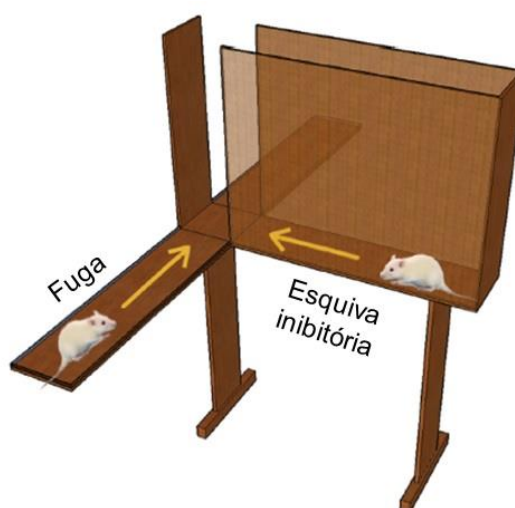
A fim de se estudar essas reações defensivas no animal experimental, a utilização de situações aversivas baseadas no repertório etológico de roedores apresenta a vantagem de não necessitar da privação de água e/ou alimento e da percepção de estímulos dolorosos. Essa abordagem é empregada em modelos como o labirinto em cruz elevado (LCE; HANDLEY e MITHANI, 1984) e o modelo de transição



claro/escuro (CRAWLEY e GOODWIN, 1980) que são extensamente utilizados em estudos dos transtornos de ansiedade (GRIEBEL e HOLMES, 2013). O modelo animal utilizado no presente trabalho também se baseia no repertório etológico do animal experimental e será abordado a seguir.

#### 1.4 Labirinto em T elevado

Com base no estudo etoexperimental do comportamento de roedores e objetivando testar a teoria dual da participação da serotonina de Deakin e Graeff (1991), onde a serotonina facilita a ansiedade na amígdala e inibe o pânico na SCPD, foi desenvolvido o labirinto em T elevado (LTE), um modelo capaz de eliciar no mesmo animal experimental duas respostas comportamentais distintas, uma relacionada com o TAG e outra com o TP (GRAEFF et al., 1998; GRAEFF e HETEM, 2012). Sua estrutura consiste de dois braços abertos perpendiculares a um braço fechado de iguais dimensões elevados do chão (Figura 1).



**Figura 1:** Modelo esquemático do Labirinto em T elevado. Adaptado de Zangrossi e Graeff, 2014.

Neste aparelho o animal executa duas tarefas distintas: a esquiva inibitória, relacionada com o medo condicionado e a fuga, relacionada com o medo incondicionado (GRAEFF et al., 1998). A análise da proteína Fos, utilizada como marcador da ativação neuronal, demonstrou um aumento de sua expressão em áreas relacionadas com a ansiedade generalizada como o núcleo medial amigdalóide, o núcleo mediano da rafe e núcleo anterior hipotalâmico após a resposta de esquiva inibitória, enquanto que a resposta de fuga aumentou a expressão desse marcador na amígdala basolateral e na substância cinzenta periaquedutal dorsal, áreas ligadas ao pânico (SILVEIRA et al., 2001).

Desde sua criação (1993), o modelo do LTE vem demonstrando uma boa validação pelo critério de predictabilidade ou validação farmacológica (ZANGROSSI e GRAEFF, 2014). Neste sentido, estudo prévio com a administração do benzodiazepínico diazepam, uma droga que possui eficácia clínica no TAG sem efeitos em doses terapêuticas sobre o TP, prejudicou a esquiva inibitória sem afetar a fuga dos braços abertos no LTE (VIANA et al., 1994). Por outro lado, a administração crônica, mas não a aguda, do inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS) fluoxetina e do inibidor da recaptação de noradrenalina e serotonina (IRNS) clomipramina prejudicaram a fuga dos braços abertos, sugerindo um efeito do tipo panicolítico, sem afetar a esquiva inibitória. Além disso, a administração de buspirona, um agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, que possui eficácia clínica no TAG, prejudicou a esquiva inibitória, porém não afetou a resposta de fuga. Em conjunto, esses resultados mostram a sensibilidade do LTE na detecção dos efeitos de diferentes drogas com eficácia clínica no TP e no TAG (POLTRONIERI et al., 2003).

Além da validação farmacológica, estudos de validação comportamental também foram realizados com o LTE. Um dos estudos realizados por Zangrossi e Graeff (1997) indicaram que o contato do experimentador com o animal não é o fator motivador da resposta de esquia inibitória, além de indicar que a experiência do animal nos braços abertos é o fator determinante dessa resposta comportamental.

### **1.5 Sistema noradrenérgico central e substância cinzenta periaquedutal**

As monoaminas estão entre as principais classes de neurotransmissores centrais e periféricos e ocorrem em várias regiões do sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos. Esse grupo é formado pela serotonina (5-hidroxitriptamina – 5-HT), dopamina (DA) e noradrenalina (NA) (FUXE, 1965).

Os receptores seletivos para a NA são conhecidos como receptores noradrenérgicos ou adrenoreceptores e pertencem a família de receptores acoplados a proteínas G, responsável por alterações nos canais de membrana e em cascatas de sinalização celular. Esses receptores são divididos em duas classes principais: alfa e beta, que por sua vez, são subdivididos em alfa-1, alfa-2, beta-1, beta-2 e beta-3 noradrenérgicos. Esses subtipos de receptores atuam por meio de diferentes subunidades de proteína G. Como exemplo o subtipo alfa-1 noradrenérgico atua por ativação da proteína Gq enquanto o subtipo alfa-2 atua por ativação de uma proteína Gi (GOLAN, 2009).

Os grupos de neurônios que produzem monoaminas estão localizados principalmente no tronco cerebral e distribuem seus produtos por meio de fibras que se projetam para muitas regiões do encéfalo e medula espinhal (NIEUWENHUYTS,

1985). Assim, 26 grupos celulares monoaminérgicos foram identificados, sendo denominados A1 a A15 (noradrenérgicos e dopaminérgicos), B1 a B9 (serotoninérgicos) e C1 a C2 (adrenérgicos). O grupo noradrenérgico mais importante, o A6, é conhecido como *Locus Coeruleus* (LC), termo derivado do latim que significa “lugar celeste”, visto a pigmentação azul escuro de suas células e está localizado adjacente ao quarto ventrículo na porção rostral pontina (NIEUWENHUYS, 1985; BERRIDGE e WATERHOUSE, 2003). Suas principais eferências ascendentes constituem dois sistemas de fibras, um dorsal (mais calibroso) e um periventricular (menos calibroso), além das eferências para o cerebelo. Essas eferências inervam praticamente quase todo o encéfalo, projetando para áreas como hipotálamo, amígdala, hipocampo e neocórtex (NIEUWENHUYS, 1985). O feixe dorsal noradrenérgico atravessa a área tegmental do mesencéfalo na porção ventrolateral em direção a substância cinzenta periaquedutal (SCP). Essa estrutura possui conexões ascendentes e descendentes distintas que a conectam com diversas regiões relacionadas ao processamento de estímulos sensoriais, provavelmente de natureza nociceptiva (medula espinhal) e outras relacionadas a reações emocionais (amígdala, córtex e hipotálamo, por exemplo).

Anatomicamente a SCP é a região do mesencéfalo que circunda o aqueduto cerebral. Sua porção mais rostral se encontra no nível da comissura posterior e a mais caudal está próxima do núcleo tegmental dorsal (BEHBEHANI, 1995). Originalmente a SCP foi dividida em três regiões anatômicas com características funcionais distintas em forma de colunas que se estendem no plano rostro-caudal, sendo elas a região dorsal, lateral e ventral (OLZEWSKI e BAXTER, 1954 *apud* BEHBEHANI, 1995). Posteriormente foi subdividida em quatro regiões de acordo com sua localização ao redor do aqueduto cerebral: dorsomedial, dorsolateral,

lateral e ventrolateral (CARRIVE, 1993; BANDLER et al., 1991 *apud* CARRIVE, 1993).

A presença de monoaminas, mais especificamente a noradrenalina, foi determinada em diversas áreas do SNC como o hipotálamo, hipocampo, córtex frontal, amígdala, cerebelo, *locus coeruleus*, núcleo dorsal da rafe, e de particular interesse na SCP no mesencéfalo (FUXE, 1965; FUXE et al., 1968; HÖKFELT et al., 1974; VERSTEEG et al., 1976), sugerindo que exista alguma participação desse neurotransmissor na modulação de comportamentos comandados pela SCP.

A estimulação elétrica ou química da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) em ratos produz respostas semelhantes ao medo, como imobilidade e fuga, além de alterações autonômicas como elevação da pressão arterial e taquicardia (CARRIVE, 1993). Em humanos, estudos com estimulação elétrica da SCPD produz sensações de ansiedade intensa, terror, pânico e de morte iminente, acompanhadas de alterações fisiológicas (NASHOLD et al., 1964). Assim, baseado nas similaridades entre os efeitos autonômicos e comportamentais da estimulação da SCPD e os sintomas de ataques de pânico, a estimulação aversiva da SCPD tem sido utilizada como modelo experimental de ataques de pânico (DEAKIN e GRAEFF, 1991; de BORTOLI et al., 2006, 2008; de OLIVEIRA SERGIO et al., 2011; JACOB et al., 2002; JENCK et al., 1995; LOVICK, 2000; SCHENBERG et al., 1998; SCHENBERG et al., 2001). Dessa forma, acredita-se que a SCPD possui papel de destaque na expressão de comportamentos defensivos relacionados com estados emocionais (CARRIVE, 1993).

## 1.6 Noradrenalina e ansiedade

A administração de noradrenalina e adrenalina sobre neurônios da SCP em estudos de eletrofisiologia mostrou que existem receptores que respondem a esses neurotransmissores, e que esses têm efeitos diferenciados sobre as propriedades das membranas desses neurônios que medeiam as respostas comportamentais autônomas (JIANG et al., 1992; VAUGHAN et al., 1996). Assim, considerando que a SCP está envolvida em respostas de luta, fuga e imobilidade, é possível supor que exista a participação do sistema noradrenérgico da SCP na modulação dessas respostas em situações aversivas.

Quanto à participação do sistema noradrenérgico na ansiedade, as evidências existentes são divergentes. Em modelos experimentais de conflito como o LCE e no teste de Vogel a administração intra-SCPD de noradrenalina apresentou efeito do tipo ansiolítico. Aumentou tanto a exploração dos braços abertos quanto o tempo de permanência dos animais nesses braços do LCE, além de aumentar o número de lambidas punidas no teste de Vogel (PELOSI et al., 2009).

Adicionalmente, estudos clínicos mostraram eficácia nos transtornos de ansiedade dos antidepressivos tricíclicos e inibidores da enzima monoaminoxidase, os quais atuam, em parte, por facilitar a neurotransmissão noradrenérgica (KLEIN, 1964; YAMADA e YASUHARA, 2004). Efeitos ansiolíticos similares também são observados com a utilização de inibidores seletivos da recaptação neuronal de noradrenalina (BRUNELLO et al., 2003).

Por outro lado, alguns estudos sugerem que a noradrenalina apresente efeito ansiogênico. Neste sentido, a estimulação elétrica do Locus coeruleus (LC) de

primatas eliciu comportamentos semelhantes ao ataque de pânico (REDMOND et al., 1976). Outro estudo, utilizando a microinjeção do antagonista seletivo alfa-1 noradrenérgico benoxatian no núcleo central da amígdala mostrou que o antagonismo desse receptor atenuou a resposta de ansiedade induzida pelo stress agudo em animais expostos ao modelo de interação social (CECCHI et al., 2002a). Além disso, a administração sistêmica de ioimbina, um antagonista seletivo alfa-2 noradrenérgico induziu ataques de pânico em pacientes com transtorno do pânico, sugerindo uma relação entre o aumento da atividade neuronal noradrenérgica e a fisiopatologia do ataque de pânico (CHARNEY et al., 1987).

Apesar da SCPD representar uma importante estrutura para a expressão do comportamento defensivo, poucos estudos sugerem o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica dessa estrutura mesencefálica na modulação da ansiedade.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar a participação da neurotransmissão noradrenérgica da substância cinzenta periaquedutal dorsal na mediação de comportamentos defensivos relacionados aos transtornos de ansiedade generalizada e de pânico.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Testar a hipótese de que a noradrenalina administrada diretamente na SCPD apresenta efeito do tipo ansiolítico e/ou panicolítico em animais expostos ao LTE.
- Verificar o envolvimento de receptores alfa e/ou beta-adrenérgicos da SCPD nos efeitos da noradrenalina em animais expostos ao LTE.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar adultos (240 a 290g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), alojados em grupos de 5 animais por caixa. Os animais tiveram livre acesso a água e comida, com ciclo claro-escuro de 12 x 12 horas (luzes acesas às 07:00h). A temperatura da sala era controlada em 21°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES) sob protocolo nº 046/2014.

#### **3.2 Drogas**

Foram utilizadas as seguintes drogas, diluídas em salina estéril (NaCl 0,9%):

- DL-Noradrenalina (Sigma-Aldrich, USA) nas doses 10, 30 e 60 nmoles/0,1  $\mu\text{L}$  (curva dose resposta).
- L-Propranolol (Sigma-Aldrich, USA) antagonista não seletivo de receptores beta-adrenérgicos na dose de 10 nmoles/0,1  $\mu\text{L}$  [dose com base nos estudos de Alves e colaboradores (2011)].
- Fentolamina (Sigma-Aldrich, USA) antagonista não seletivo de receptores alfa-adrenérgicos na dose de 10 nmoles/0,1  $\mu\text{L}$  [dose com base nos estudos de Hott e colaboradores (2012)].

### 3.3 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol (250 mg/Kg, i.p., Sigma-Aldrich, USA), e em seguida fixados a um aparelho estereotáxico (Insight, Brasil) com a barra dos incisivos 2,5 mm abaixo da linha interaural. O campo cirúrgico era limpo com iodo 1% em solução alcoólica seguido de uma injeção subcutânea do anestésico local cloridrato de lidocaína associado ao vasoconstrictor epinefrina (DFL, Brasil). Em seguida foi realizada uma incisão sagital para expor a calvária e remover o perióstio. Foram perfurados dois orifícios com uma broca dental para a introdução de dois parafusos de aço inoxidável com a finalidade de prender a prótese ao crânio. Outro orifício era perfurado para o implante de uma cânula-guia de 13 mm de comprimento confeccionada a partir de uma agulha hipodérmica (25 x 6 mm) nas seguintes coordenadas: Interaural: 1,6 mm; Médio-lateral: 2,0 mm; e Dorso-ventral: 4,0 mm, ângulo de 15° ao plano sagital, com base no Atlas de Paxinos e Watson, 2007. Após o implante, a cânula era fixada ao encéfalo por meio de resina dental autopolimerizável (Jet, Brasil). Para evitar o entupimento da cânula-guia foi introduzido em seu interior um mandril feito de aço inoxidável que também era fixado à prótese com resina autopolimerizável.

No final da cirurgia, todos os animais receberam uma injeção (i.m.) de 0,2 mL de uma associação antibiótica de amplo espectro (pentabiótico de uso veterinário para animais de pequeno porte; Forte Dodge, Brasil). Em adição, flunixinina meglumina (Banamine®, Schering e Plough, Brasil; 2,5 mg/kg), um fármaco com propriedades analgésica, antipirética e antiinflamatória também foi administrado subcutaneamente para analgesia pós-cirúrgica. Os experimentos foram iniciados 5 a 7 dias após a recuperação dos animais.

### **3.4 Injeção das drogas**

As drogas ou salina foram administrados na SCPD através de uma agulha dental, 0,3 mm de diâmetro externo e 14 mm de comprimento, introduzida na cânula-guia. A ponta da agulha dental alcançava o tecido cerebral localizado a 1 mm abaixo da extremidade inferior da cânula-guia. A agulha foi conectada a uma microsseringa de 10 µL (Hamilton 701, Suíça) através de um tubo de polietileno (PE-10), o qual era preenchido com água. O deslocamento de uma bolha de ar no polietileno foi utilizado para monitorar a microinjeção. Um volume de 0,1 µL de noradrenalina, salina ou dos antagonistas (CRESTANI et al., 2008) foi injetado durante 15 segundos com o auxílio de uma bomba automática de infusão (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Para evitar o refluxo da droga, a agulha permanecia na posição de injeção durante os 30 segundos subsequentes. Durante a injeção, os animais permaneciam com livre movimentação em uma caixa (30 x 19 x 13 cm) com serragem no assoalho. As doses para realização da curva dose-resposta para noradrenalina foram selecionadas com base em resultados prévios mostrando efeitos do tipo ansiolítico da noradrenalina em dois modelos distintos de ansiedade (PELOSI et al., 2009).

### **3.5 Aparelhos Experimentais**

#### **3.5.1 Labirinto em T elevado**

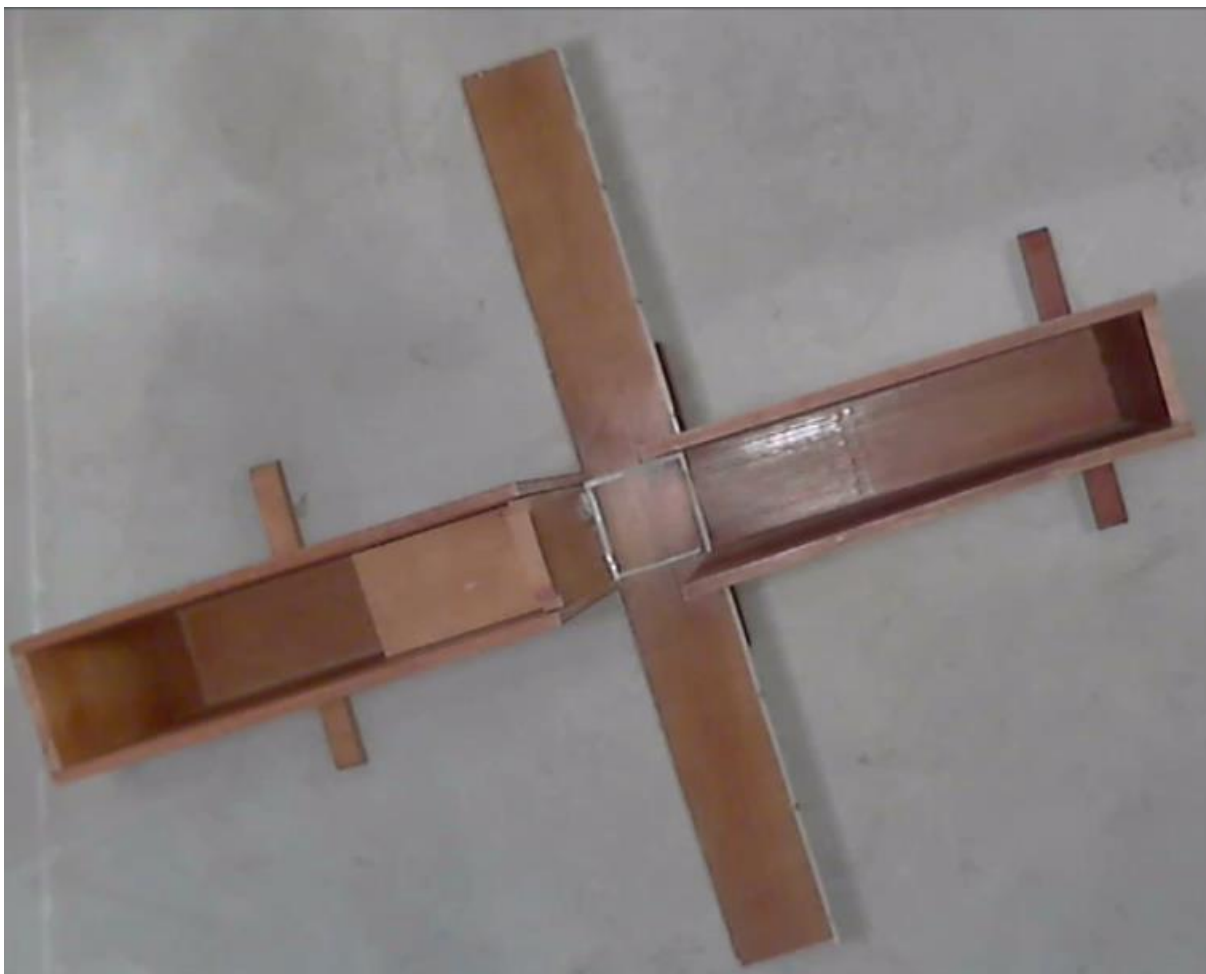
O labirinto em T elevado (LTE) é constituído de três braços de madeira com as mesmas dimensões (50 x 12 cm) elevados 50 cm em relação ao solo. Um dos

braços é fechado por paredes laterais de 40 cm e está disposto perpendicularmente aos outros dois braços, que são desprovidos de paredes. Os braços abertos são rodeados por régua de acrílico de 1 cm de altura para evitar eventuais quedas dos animais durante os testes.

A



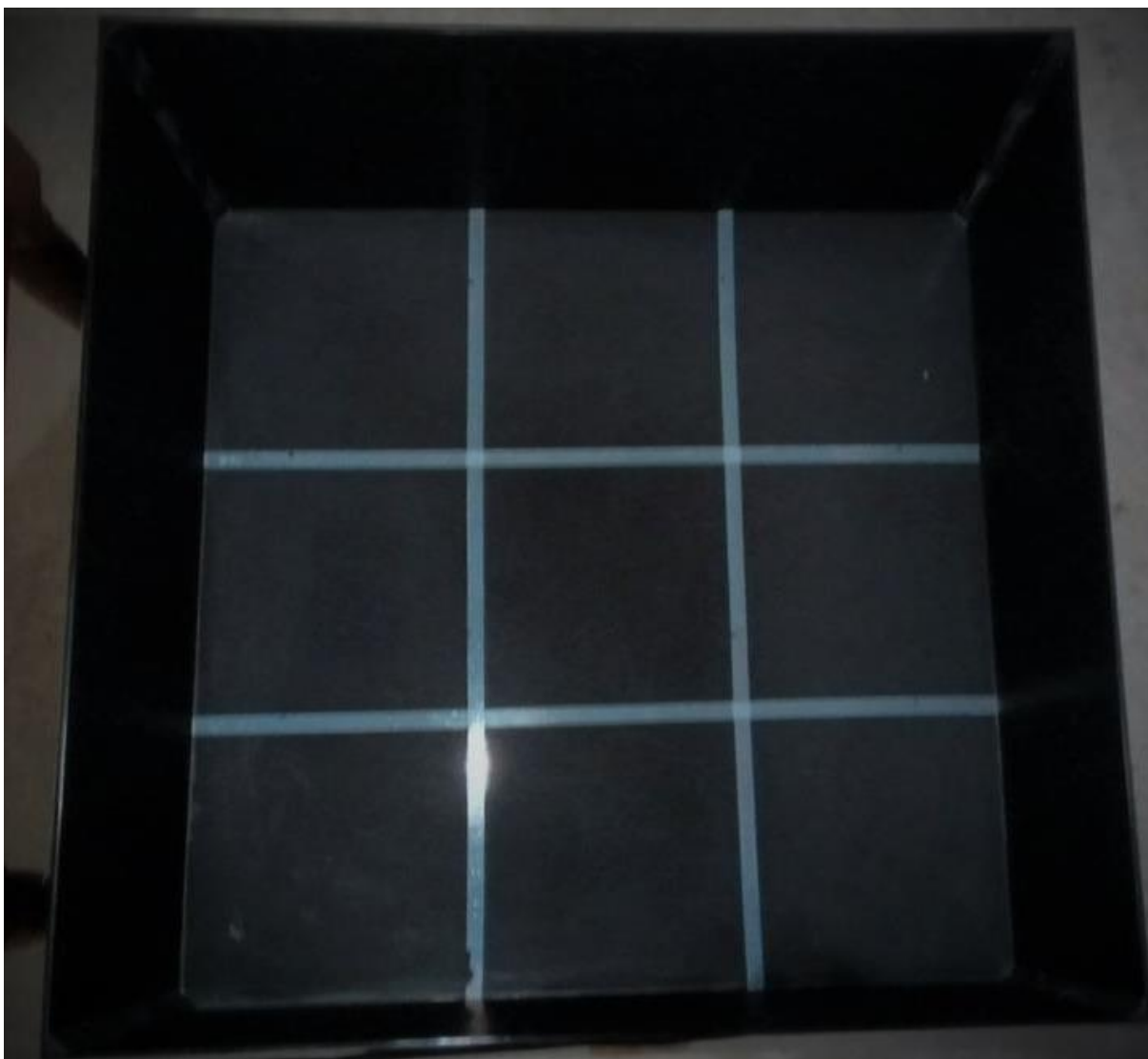
B



**Figura 2 A e B:** Fotos ilustrativas do aparelho utilizado para o teste do LTE.

### 3.5.2 Campo aberto

O campo aberto é constituído por uma arena quadrada de 60 x 60 cm dividida em nove áreas de 20 x 20 cm, circundada por paredes laterais de 40 cm de altura, utilizado para quantificar a atividade locomotora dos animais após o teste do labirinto em T elevado.



**Figura 3:** Foto ilustrativa da arena utilizada para o teste do campo aberto.

## **3.6 Testes Comportamentais**

### **3.6.1 Habituação**

No sexto dia após o procedimento cirúrgico, os animais foram levados para a sala de teste a fim de serem habituados às condições experimentais. Cada animal era manuseado pelo experimentador por 5 minutos e em seguida colocado em uma

gaiola de acrílico com serragem no assoalho, onde permanecia por 5 minutos. Esse procedimento era realizado duas vezes no mesmo dia.

### **3.6.2 Pré-exposição**

No sétimo dia após a cirurgia, cada animal foi colocado individualmente em um dos braços abertos do LTE, onde permaneceu confinado por 30 minutos. O braço aberto era isolado do braço fechado, bem como do outro braço aberto, por uma parede de madeira (50 cm de comprimento por 12 cm de largura), disposta na linha de separação entre a área central do labirinto e a porção proximal do braço aberto.

A pré-exposição teve como objetivo potencializar a expressão do comportamento de fuga, reduzindo reações comportamentais à novidade, tais como exploração e inibição do comportamento, o que pode prejudicar a análise deste comportamento (TEIXEIRA et al., 2000; ZANOVÉLI et al., 2003; ZANGROSSI e GRAEFF, 2014).

Durante o procedimento de pré-exposição, a sala apresentava as mesmas condições do dia da habituação.

### **3.6.3 Teste no labirinto em T elevado**

Vinte e quatro horas após a pré-exposição, foi realizada a injeção intra-SCPD das drogas como descrito acima e realizado o teste no LTE. Inicialmente foi avaliada a resposta de esquiva inibitória. Para tal, o animal era colocado na extremidade distal do braço fechado e cronometrado o tempo gasto para o mesmo sair deste braço com as quatro patas [Latência basal (LB)]. A mesma medida era tomada por mais

duas vezes com intervalos de 30 segundos entre elas [Esquiva 1 (E1) e Esquiva 2 (E2)] sendo que, neste intervalo, o animal permanecia na gaiola de acrílico. O tempo máximo de permanência do animal neste braço, em cada uma das esquivas, era de 5 minutos (300 segundos). Quando atingido este tempo limite, o animal era retirado do braço fechado do LTE pelo experimentador, colocado na gaiola de acrílico, sendo dada continuidade ao teste. Trinta segundos após o término da medida da E2, foi verificada a latência de fuga dos animais de um dos braços abertos do labirinto. Para isto, cada animal era colocado na extremidade distal do braço aberto ao qual fora pré-exposto e o tempo de saída deste braço com as quatro patas foi cronometrado [Fuga 1 (F1)]. A latência de saída do braço aberto foi medida por mais duas vezes [Fuga 2 (F2) e Fuga 3 (F3)], com intervalos de 30 segundos entre elas sendo que, neste intervalo, o animal permanecia na gaiola de acrílico. O tempo máximo de permanência do animal no braço aberto, em cada uma das fugas, também era de 5 minutos.

#### **3.6.4 Teste no campo aberto**

Imediatamente após a medida da Fuga 3 no LTE, cada animal era colocado no centro do campo aberto para a observação da atividade locomotora durante 5 minutos. A atividade locomotora foi medida por meio da quantificação dos cruzamentos entre os quadrantes realizados pelo animal. Após o teste de cada animal, o campo aberto era limpo com álcool a 20%.



### **3.7 Grupos experimentais**

#### **3.7.1 Experimento 1: Efeito da injeção intra-SCPD de noradrenalina (curva dose-resposta) sobre as respostas de esquiva inibitória e fuga em animais submetidos ao LTE.**

Os grupos experimentais foram: salina, noradrenalina 10 nmoles, noradrenalina 30 nmoles e noradrenalina 60 nmoles. Os animais foram submetidos ao LTE 30 segundos após a injeção de noradrenalina ou salina.

#### **3.7.2 Experimento 2: Efeito do pré-tratamento intra-SCPD com fentolamina (antagonista não seletivo de receptores alfa-adrenérgicos) sobre a administração intra-SCPD de noradrenalina em ratos submetidos ao LTE.**

Os grupos experimentais foram: Salina/Salina, Salina/Noradrenalina, Fentolamina/Salina e Fentolamina/Noradrenalina. A injeção do antagonista foi realizada 10 minutos antes da administração da noradrenalina ou salina. Os animais foram submetidos ao LTE 30 segundos após a última injeção.

#### **3.7.3 Experimento 3: Efeito do pré-tratamento intra-SCPD com propranolol (antagonista não seletivo de receptores beta-adrenérgicos) sobre a administração intra-SCPD de noradrenalina em ratos submetidos ao LTE.**

Os grupos experimentais foram: Salina/Salina, Salina/Noradrenalina, Propranolol/Salina e Propranolol/Noradrenalina. A injeção do antagonista foi realizada 10 minutos antes da administração da noradrenalina ou salina. Os animais foram submetidos ao LTE 30 segundos após a última injeção.

### **3.8 Perfusão e Histologia**

Para a verificação da localização do sítio de injeção, após a realização dos experimentos, os animais foram anestesiados com uretana a 25% e sofreram

perfusão intracardíaca com salina seguida de uma solução de formol a 10%. Os encéfalos perfundidos foram fixados em formol 10% até serem cortados em secções coronais de 55 µm por meio de um criostato (Leica) no Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica (LHMI) da UFES. Os cortes foram preparados em lâminas de microscopia e analisados a fresco com o auxílio de um microscópio. O sítio de injeção foi localizado de acordo com os diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (2007). Foram utilizados somente os dados dos animais que tiveram o sítio de injeção localizado na SCPD.

### **3.9 Análise estatística**

Para avaliar o comportamento nas diferentes esquivas (medidas repetidas) do LTE foi empregada uma ANOVA multivariada (fator esquiva como medida repetida e fator tratamento). No caso de ocorrer efeito do tratamento ou interação entre o tratamento e a medida repetida, foi realizada uma ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey quando apropriado para comparar os diferentes grupos entre si para uma determinada esquiva (linha de base, esquiva 1 ou esquiva 2). O comportamento de fuga foi analisado através da ANOVA de uma via.

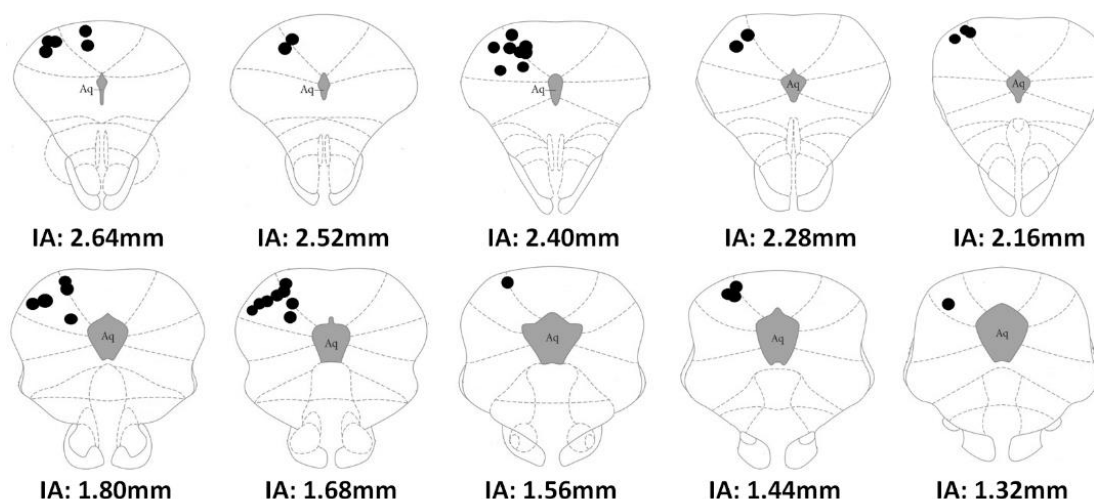
Os dados do teste do campo aberto foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey.

O nível de significância foi fixado em  $p < 0,05$ .

Para a análise estatística foi utilizado o software IBM SPSS versão 20.0.

## 4. RESULTADOS

A figura 4 representa os sítios de injeção de drogas na SCPD dos animais testados no presente estudo. Os animais que tiveram a injeção fora da coluna dorsal foram excluídos das análises.



**Figura 4:** Diagramas de secções coronais do encéfalo de ratos mostrando a localização dos sítios de injeção na SCPD [círculos fechados (•)], com base no Atlas de Paxinos e Watson (2007). O número de pontos mostrados na figura é menor que o número total de animais usados devido a várias sobreposições. Aq: Aqueduto mesencefálico. IA: Interaural.

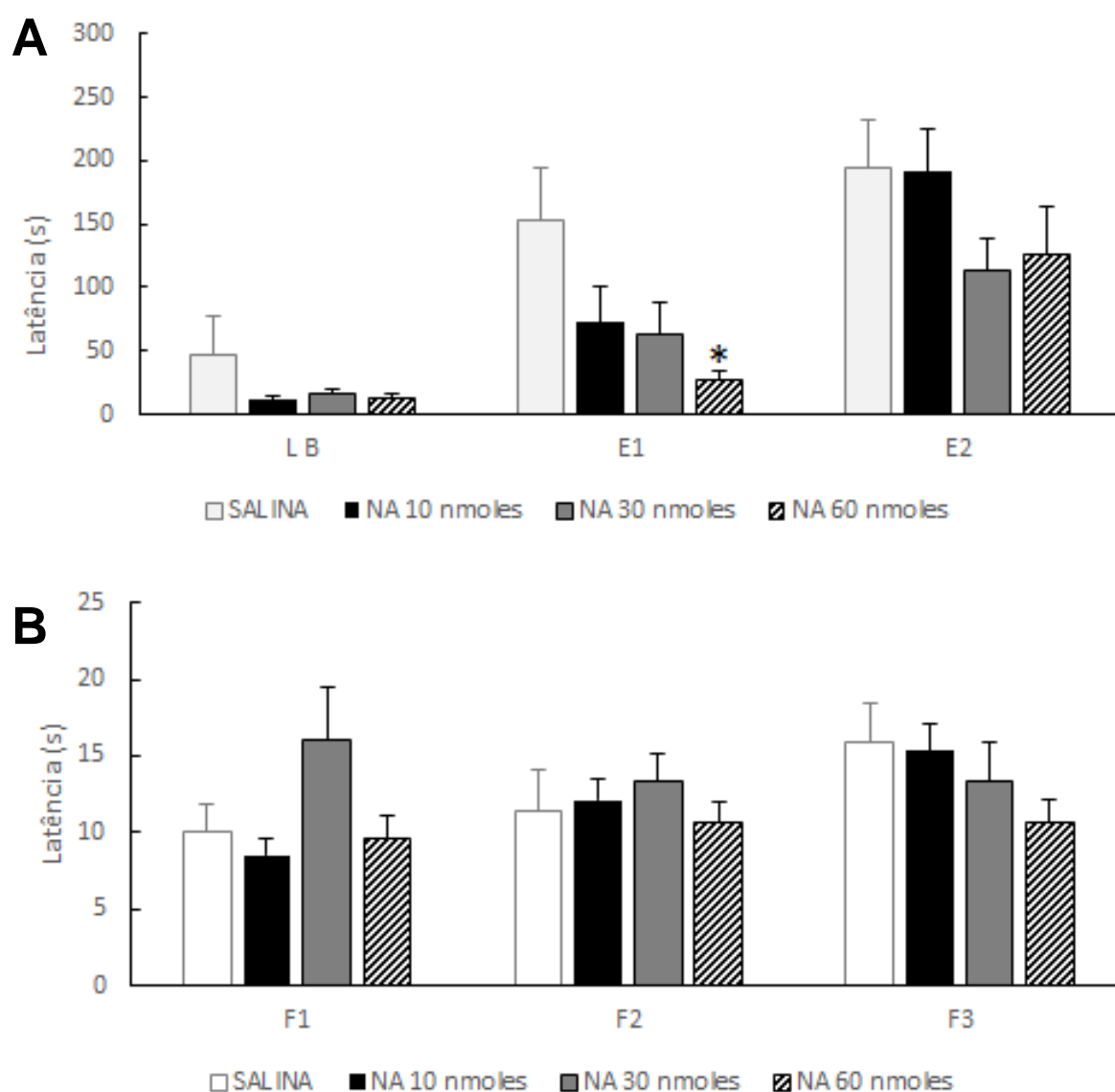
### 4.1 Experimento 1: Efeito da noradrenalina ou salina administradas intra-SCPD de ratos submetidos ao modelo do LTE

A figura 5A mostra o efeito da administração intra-SCPD de noradrenalina nas doses de 10, 30 e 60 nmoles ou salina sobre as respostas de esquiva inibitória. A ANOVA de medidas repetidas mostrou que os animais adquiriram a esquiva inibitória dos braços abertos do LTE durante o teste [Fator tentativa:  $F(2,40) = 29,76$ ;  $p < 0,0001$ ] e revelou um efeito estatisticamente significativo do tratamento [ $F(3,41) = 3,80$ ;  $p < 0,05$ ]. Porém não foi observada uma interação significativa entre esquiva e

tratamento [ $F(3,41) = 1,14$ ;  $p > 0,05$ ]. A ANOVA de uma via mostrou que a administração intra-SCPD de noradrenalina alterou a esQUIVA inibitória 1 [ $F(3,41) = 3,50$ ;  $p < 0,05$ ], mas não a esQUIVA basal [ $F(3,41) = 1,44$ ;  $p > 0,05$ ] e a esQUIVA inibitória 2 [ $F(3,41) = 1,54$ ;  $p > 0,05$ ]. A análise de *post hoc* revelou que a noradrenalina na dose de 60 nmoles prejudicou a esQUIVA inibitória 1 se comparada com o grupo salina ( $p < 0,05$ ), sugerindo um efeito do tipo ansiolítico.

Em relação à resposta de fuga (Figura 5B), a ANOVA de uma via mostrou que a administração intra-SCPD de noradrenalina não alterou as três tentativas de fuga no LTE {Fuga 1: [ $F(3,41) = 2,60$ ;  $p > 0,05$ ]; Fuga 2: [ $F(3,41) = 0,39$ ;  $p > 0,05$ ]; Fuga 3: [ $F(3,41) = 1,30$ ;  $p > 0,05$ ]}.}

A Tabela 2 mostra que a administração intra-SCPD de noradrenalina nas doses de 10, 30 e 60 nmoles não afetou a atividade locomotora dos animais se comparado com o grupo salina [ $F(3,41) = 0,096$ ;  $p > 0,05$ ].



**Figura 5:** Efeito (média  $\pm$  EPM) da injeção intra-SCPD de noradrenalina (NA) nas doses de 10 ( $n = 13$ ), 30 ( $n = 13$ ) ou 60 nmoles ( $n = 12$ ) ou salina ( $n = 9$ ) sobre as respostas de esquiva inibitória (A) e de fuga (B). \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo salina na respectiva esquiva (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

**Tabela 2:** Efeito (média  $\pm$  EPM) da administração intra-SCPD de noradrenalina ou salina sobre o número de cruzamentos no campo aberto

Tratamento	Número de cruzamentos
Salina	44,89 $\pm$ 2,29
NA 10 nmoles	43,00 $\pm$ 4,76
NA 30 nmoles	45,91 $\pm$ 4,33
NA 60 nmoles	43,58 $\pm$ 4,38

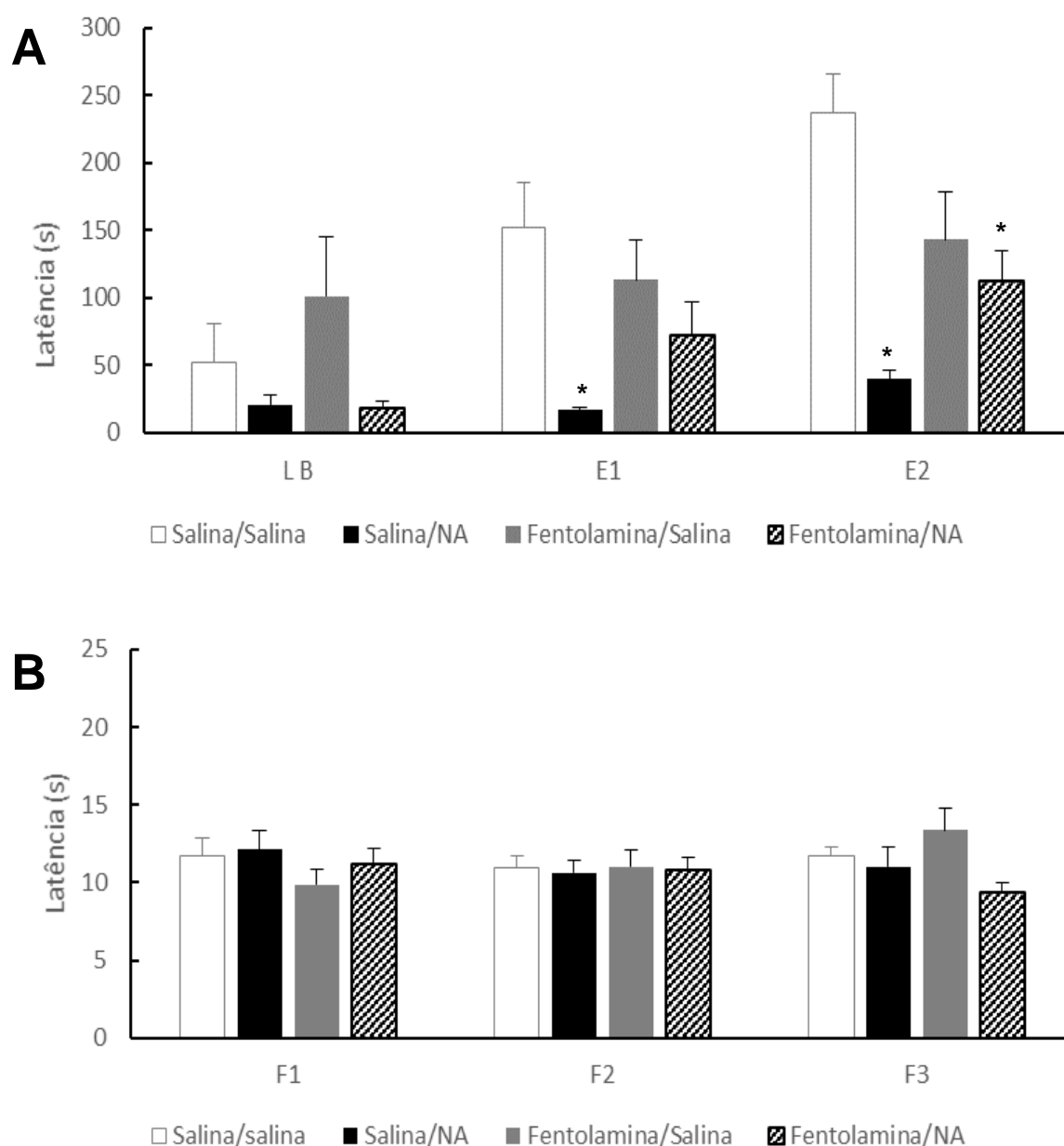
**4.2 Experimento 2: Efeito do pré-tratamento intra-SCPD com fentolamina (antagonista não seletivo de receptores alfa-adrenérgicos) sobre a administração intra-SCPD de noradrenalina em ratos submetidos ao LTE.**

A figura 6 mostra o efeito do pré-tratamento com fentolamina, na dose de 10 nmoles, sobre a injeção de noradrenalina na dose de 60 nmoles nas respostas de esquiva inibitória e fuga no LTE. A ANOVA de medidas repetidas mostrou que ocorreu a aquisição da aprendizagem da esquiva inibitória durante o teste [Fator tentativa:  $F(2,32) = 16,48$ ;  $p < 0,0001$ ]. Houve, ainda, um efeito estatisticamente significativo do tratamento [ $F(3,33) = 7,57$ ;  $p < 0,05$ ] e da interação da esquiva e tratamento [ $F(3,33) = 3,20$ ;  $p < 0,01$ ]. A ANOVA de uma via mostrou que o tratamento afetou a esquiva inibitória 1 [ $F(3,33) = 4,58$ ;  $p < 0,01$ ] e a esquiva 2 [ $F(3,33) = 9,85$ ;  $p < 0,01$ ]. O teste *post hoc* mostrou que o tratamento com noradrenalina prejudicou a esquiva inibitória 1 ( $p < 0,01$ ) e a esquiva inibitória 2 ( $p < 0,001$ ) em comparação com o grupo Salina/Salina. O pré-tratamento, per se, com a fentolamina não alterou a resposta de esquiva dos animais ( $p > 0,05$ ) quando comparado ao grupo Salina/Salina. No entanto foi capaz de atenuar o efeito do tipo ansiolítico da noradrenalina na esquiva

inibitória 1, pois não houve diferença entre o grupo Salina/Salina e o grupo Fentolamina/NA ( $p > 0,05$ ). Porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo Salina/NA e Fentolamina/NA ( $p > 0,05$ ).

Como pode ser observado na figura 6B o pré-tratamento com fentolamina sobre a injeção de NA não alterou as três tentativas de fuga no LTE {Fuga 1: [F (3,33) = 0,66;  $p > 0,05$ ]; Fuga 2: [F (3,33) = 0,29;  $p > 0,05$ ]; Fuga 3: [F (3,33) = 3,16;  $p > 0,05$ ].

Além disso, a atividade locomotora dos animais no campo aberto (tabela 3) não foi alterada pelos tratamentos empregados [F (3,33) = 0,24;  $p > 0,05$ ].



**Figura 6:** Efeito (média  $\pm$  EPM) da injeção intra-SCPD de fentolamina ou salina 10 minutos antes da injeção intra-SCPD de NA na dose de 60 nmoles ou salina sobre as respostas de esquia inibitória (A) e fuga (B) no LTE. Grupos: Salina/Salina (n = 10); Salina/NA (n = 8); Fentolamina/Salina (n = 8); Fentolamina/NA (n = 11). \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Salina/Salina na respectiva esquia (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).



**Tabela 3:** Efeito (média  $\pm$  EPM) da injeção prévia intra-SCPD de fentolamina ou salina sobre o número de cruzamentos no campo aberto de animais que receberam injeção intra-SCPD de noradrenalina ou salina

Tratamento	Número de cruzamentos
Salina/Salina	42,40 $\pm$ 3,79
Salina/NA	43,25 $\pm$ 3,87
Fentolamina/Salina	39,38 $\pm$ 3,82
Fentolamina/NA	40,00 $\pm$ 3,29

#### **4.3 Experimento 3: Efeito do pré-tratamento intra-SCPD com propranolol (antagonista não seletivo de receptores beta-adrenérgicos) sobre a administração intra-SCPD de noradrenalina em ratos submetidos ao LTE.**

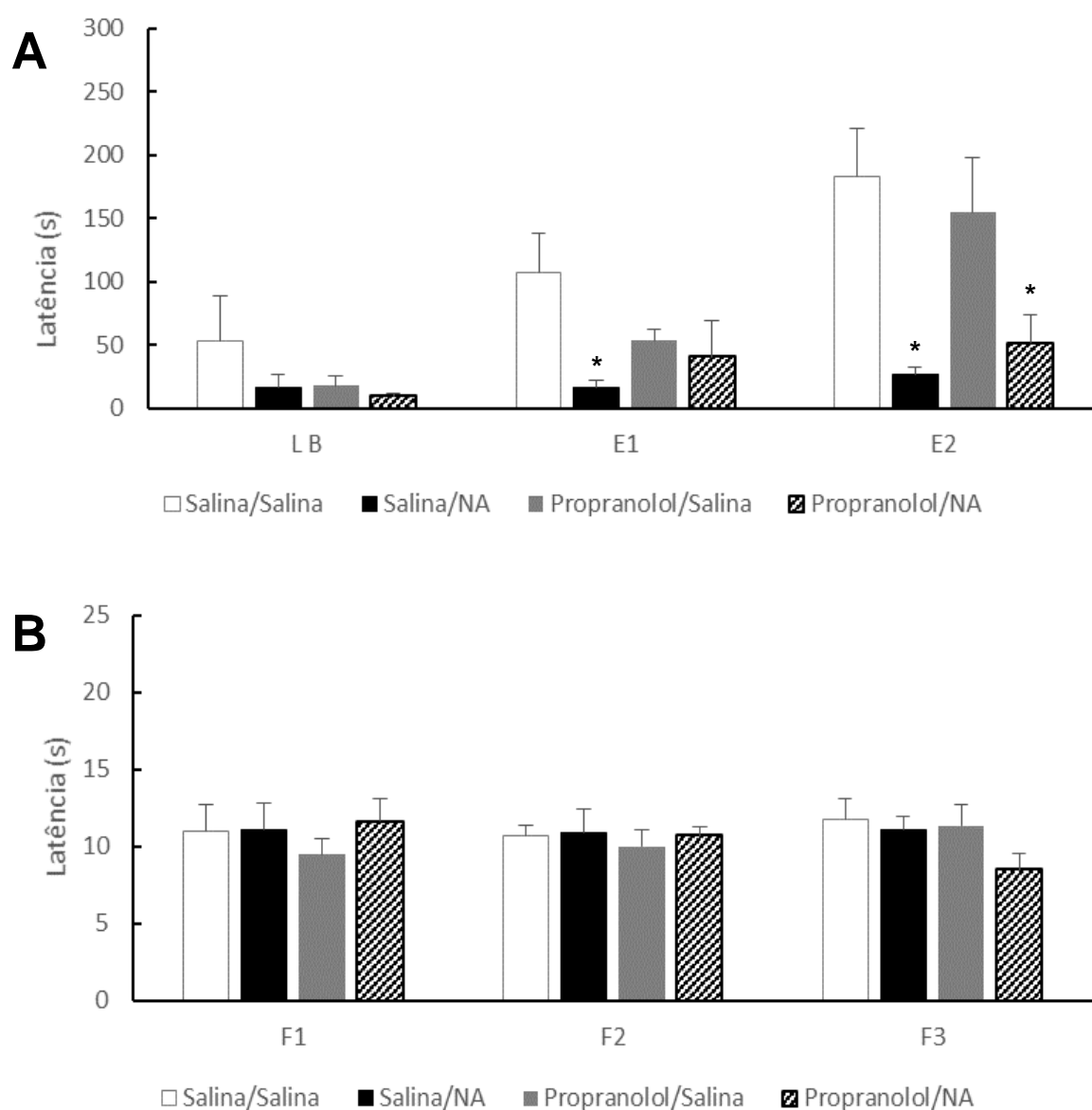
A figura 7 mostra os resultados do pré-tratamento com propranolol, na dose de 10 nmoles, sobre a injeção de noradrenalina na dose de 60 nmoles nas respostas de esQUIVA inibitória e fuga no LTE. A ANOVA de medidas repetidas mostrou que ocorreu a aquisição da aprendizagem da esQUIVA inibitória durante o teste [Fator tentativa:  $F(2,28) = 20,67$ ;  $p < 0,0001$ ] e mostrou um efeito estatisticamente significativo da interação esQUIVA e tratamento [ $F(3,29) = 3,53$ ;  $p < 0,01$ ] e do tratamento [ $F(3,29) = 5,19$ ;  $p < 0,01$ ]. A ANOVA de uma via mostrou que o tratamento afetou a esQUIVA inibitória 1 [ $F(3,29) = 3,24$ ;  $p < 0,05$ ] e a esQUIVA 2 [ $F(3,29) = 6,57$ ;  $p < 0,01$ ].

O teste *post hoc* mostrou que o tratamento com noradrenalina prejudicou a esQUIVA inibitória 1 ( $p < 0,05$ ) e a esQUIVA inibitória 2 ( $p < 0,01$ ) em comparação com o grupo Salina/Salina. O pré-tratamento, per se, com o propranolol não alterou o

comportamento dos animais ( $p > 0,05$ ) quando comparado ao grupo Salina/Salina. No entanto, o propranolol foi capaz de atenuar o efeito do tipo ansiolítico da noradrenalina na esquiva inibitória 1, pois não houve diferença entre o grupo Salina/Salina e o grupo Propranolol/NA ( $p > 0,05$ ). Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo Salina/NA e o grupo Propranolol/NA ( $p > 0,05$ ).

Em relação à resposta de fuga (figura 7B), a ANOVA de uma via revelou que o pré-tratamento com propranolol sobre a injeção de NA não alterou as três tentativas de fuga no LTE {Fuga 1:  $[F(3,29) = 0,34; p > 0,05]$ ; [Fuga 2:  $[F(3,29) = 0,14; p > 0,05]$ ; Fuga 3:  $[F(3,29) = 1,65; p > 0,05]$ .

A tabela 4 mostra que o pré-tratamento com propranolol não alterou a atividade locomotora dos animais que receberam NA quando comparado com o grupo Salina/Salina  $[F(3,29) = 1,46; p > 0,05]$ .



**Figura 7:** Efeito (média  $\pm$  EPM) da injeção intra-SCPD de propranolol ou salina 10 minutos antes da injeção intra-SCPD de NA na dose de 60 nmoles ou salina sobre as respostas de esquiva inibitória (A) e fuga (B) no LTE. Grupos: Salina/Salina (n = 8); Salina/NA (n = 9); Propranolol/Salina (n = 8); Propranolol/NA (n = 8). \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Salina/Salina na respectiva esquiva (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

**Tabela 4:** Efeito (média  $\pm$  EPM) da injeção prévia intra-SCPD de propranolol ou salina sobre o número de cruzamentos no campo aberto de animais que receberam a injeção intra-SCPD de salina ou noradrenalina

Tratamento	Número de cruzamentos
Salina/Salina	44,88 $\pm$ 1,85
Salina/NA	47,11 $\pm$ 3,04
Propranolol/Salina	46,00 $\pm$ 4,52
Propranolol/NA	38,13 $\pm$ 3,40

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, testamos a hipótese de que a noradrenalina injetada intra-SCPD teria um efeito do tipo ansiolítico e/ou panicolítico em animais expostos ao LTE. Inicialmente, investigamos se a administração intra-SCPD de noradrenalina nas doses de 10, 30 ou 60 nmoles (experimento 1) teria efeito sobre as respostas de esquiva inibitória e fuga no LTE.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que as drogas utilizadas não alteraram a atividade locomotora dos animais medida no teste do campo aberto. Este dado indica que os efeitos observados no LTE não sejam devidos à ação inespecífica das drogas utilizadas sobre a atividade locomotora dos animais.

O experimento 1 mostra que a noradrenalina na dose de 60 nmoles/0,1µL prejudicou a aquisição da esquiva inibitória dos braços abertos, sugerindo um efeito do tipo ansiolítico. Esses resultados estão de acordo com observações prévias de Pelosi e colaboradores (2009) que a injeção de noradrenalina diretamente na SCPD induz um efeito do tipo ansiolítico em modelos animais de conflito. Mais especificamente, foi mostrado que a administração intra-SCPD de noradrenalina aumentou tanto o número de entradas quanto o tempo de permanência nos braços abertos em animais submetidos ao Labirinto em cruz elevado (LCE). Em adição, a administração intra-SCPD de noradrenalina aumentou o número de lambidas punidas em comparação ao grupo controle no teste de conflito de Vogel, indicando, também, um efeito do tipo ansiolítico. Cabe mencionar, que esse efeito não foi derivado de uma possível ação analgésica da noradrenalina sobre o beber punido nem resultante de um aumento do estímulo de beber água nos animais submetidos ao teste (PELOSI et al., 2009).

Além disso, dados não publicados de nosso laboratório reforçam o efeito do tipo ansiolítico da noradrenalina administrada na SCPD. Assim, foi mostrado que a noradrenalina aumenta o número de transições no teste Claro/escuro, um modelo animal de ansiedade desenvolvido por Crawley e Goodwin (1980) que tem como princípio o conflito entre a propensão do animal em explorar um espaço desconhecido e estar num ambiente iluminado que tem propriedades aversivas sobre o comportamento do roedor. Esses pesquisadores mostraram que drogas de eficácia clínica comprovada no tratamento da ansiedade, como os benzodiazepínicos clonazepam e clordiazepóxido, aumentam o número de transições entre o compartimento escuro e o iluminado.

Diferentemente da esQUIVA inibitória, ainda no experimento 1, não foram observadas alterações em relação a resposta de fuga dos animais que receberam injeção intra-SCPD de noradrenalina em comparação ao grupo salina. Essa ausência de efeito da noradrenalina sobre a resposta de fuga também foi observada por Estrada e colaboradores (2016) em animais expostos ao LTE. Estes resultados indicam que o sistema noradrenérgico da SCPD não participa da resposta de fuga no LTE, sugerindo que outros sistemas de neurotransmissores atuem modulando essa resposta nesse modelo animal. Na mesma direção, Müller (2010) mostrou que a administração sistêmica do antagonista seletivo de receptores alfa-2 adrenérgicos ioimbina facilitou as respostas de imobilidade, trote e galope (respostas do repertório etológico do animal experimental no modelo de estimulação elétrica da SCPD consideradas como fuga do animal), sugerindo um efeito do tipo panicogênico. Porém, quando administrada diretamente na SCPD, a ioimbina não apresentou o mesmo efeito, sugerindo que o efeito da administração sistêmica seja mediado por áreas distintas a SCPD.

Em continuidade aos efeitos da noradrenalina, estudos anteriores de eletrofisiologia realizados por Jiang e colaboradores (1992) mostraram que a administração *in vitro* de adrenalina sobre 150 neurônios da substância cinzenta periaquedutal (SCP) gerou respostas excitatórias em 35% (52 células) e inibitórias em 45% (68 células) das células testadas, além de não gerar respostas em 20% delas. Além disso, utilizando uma solução de salina modificada com magnésio (bloqueando a liberação sináptica) esses autores mostraram que o efeito inibitório da adrenalina foi mediado por mecanismos pré e pós-sinápticos, enquanto o efeito excitatório estaria relacionado a um mecanismo pós-sináptico. Essa sugestão deriva da observação de que 50% (7/14) das células que foram inibidas pela adrenalina apresentaram uma resposta inibitória antes e após a infusão da salina modificada, enquanto que 75% (6/8) dos neurônios que foram excitados pela adrenalina mostraram a resposta excitatória antes e após a infusão da salina modificada com magnésio. Semelhantemente, Vaughan e colaboradores (1996) mostraram que a noradrenalina teve o mesmo efeito sobre os neurônios em cortes histológicos da SCP, onde houve despolarização em 66% dos neurônios testados e hiperpolarização em 33% deles. Esses efeitos produzidos pela noradrenalina, semelhante a adrenalina, foram igualmente distribuídos na SCPD.

Em relação ao possível efeito do tipo ansiogênico da noradrenalina sugerido por Cecchi e colaboradores (2002a a 2002b), os resultados da participação do sistema noradrenérgico tanto na região central da amígdala quanto na porção lateral do núcleo leito da estria terminal (NLET) nos modelos de ansiedade utilizados (teste de interação social e LCE) só foram observados nos grupos submetidos ao estresse de imobilização, uma vez que a administração de antagonistas seletivos alfa-1, beta-1 e beta2-adrenérgicos não alteraram o comportamento dos animais submetidos aos

modelos de ansiedade sem o estresse de imobilização em comparação ao grupo controle. Esses autores também observaram que o estresse de imobilização causou um aumento na concentração plasmática do hormônio adrenocorticotrófico (*Adrenocorticotropic hormone* – ACTH) e de noradrenalina extracelular do NLET quantificada por microdiálise. A administração do antagonista seletivo alfa1-adrenérgico benoxatian reduziu a liberação do ACTH quando administrado na porção lateral do NLET, sugerindo uma participação do sistema noradrenérgico dessa estrutura na modulação do eixo HPA. Porém, o mesmo efeito não foi observado após a administração do benoxatian na porção central da amígdala ou da injeção de uma associação dos antagonistas beta1-adrenérgico betaxolol e beta2-adrenérgico ICI 118,551 na porção lateral do NLET. Isso reforça a hipótese que a noradrenalina pode atuar de forma distinta em diferentes estruturas relacionadas à ansiedade e por mecanismos e receptores específicos.

Em seguida, objetivando verificar a participação dos tipos de receptores noradrenérgicos no efeito do tipo ansiolítico da noradrenalina no presente estudo, realizamos um pré-tratamento intra-SCPD com os antagonistas não seletivos alfa-adrenérgico fentolamina e beta-adrenérgico propranolol nos experimentos 2 e 3, respectivamente. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com a fentolamina, em uma dose que por si não teve efeito, atenuou o efeito do tipo ansiolítico da noradrenalina, visto que, não houve diferença estatística entre os grupos Salina/NA e Fentolamina/NA. Semelhantemente, o pré-tratamento com o propranolol também atenuou o efeito do tipo ansiolítico da noradrenalina. Assim, de uma forma interessante, nossos resultados sugerem a possível participação de receptores alfa e beta-adrenérgicos dos neurônios da SCPD no efeito da noradrenalina injetada intra-SCPD sobre a resposta de esquiva no LTE.



A participação dos receptores alfa e beta-adrenérgicos no efeito do tipo ansiogênico da noradrenalina foi observada em estudos anteriores, onde a administração do antagonista seletivo alfa-1 noradrenérgico benoxatian ou de uma mistura de antagonistas seletivos beta-1 e beta-2, betaxolol e ICI 118,551 respectivamente, atenuaram o efeito do tipo ansiogênico da noradrenalina, aumentando a exploração dos braços abertos no LCE em comparação ao grupo veículo (CECCHI et al., 2002b). Cabe aqui lembrar que esse efeito dos antagonistas foi observado apenas nos grupos que passaram pelo estresse de imobilização.

De forma semelhante, Hott e colaboradores (2012) observaram uma participação dos dois tipos de receptores, alfa e beta-adrenérgicos, na expressão do medo condicionado contextual, visto que, a administração intra-NLET de fentolamina e propranolol reduziram o *freezing* e as respostas autonômicas eliciadas pelo modelo animal utilizado.

Nossos resultados não mostraram efeito da administração intra-SCPD dos antagonistas por si, sugerindo que a neurotransmissão noradrenérgica na SCPD não estaria envolvida na expressão das respostas de esquiva inibitória e fuga no LTE. Contudo, quando a noradrenalina é administrada diretamente na SCPD promove um prejuízo na aquisição da esquiva inibitória que foi atenuado pelos antagonistas alfa e beta-noradrenérgicos. Essa observação também foi realizada por Soares e Zangrossi (2004) em relação a administração intra-SCPD de antagonistas seletivos para receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>-2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>. Os antagonistas não foram capazes de por si apresentarem efeitos sobre o comportamento dos animais no LTE, mas foram capazes de bloquear os efeitos do tipo ansiogênico e panicolítico da serotonina administrada intra-SCPD.

Com base nos resultados encontrados em nosso estudo pode-se observar também o papel modulatório da SCPD nos comportamentos defensivos relacionados com o TAG. Como dito anteriormente, essa estrutura mesencefálica é largamente relacionada com o TP e atualmente tem sido implicada também no TAG. A administração de 5-HT na SCPD facilitou a aquisição da esquiva inibitória, o que sugere um efeito do tipo ansiogênico para esse neurotransmissor, além de demonstrar a participação dessa estrutura mesencefálica na modulação da resposta de esquiva inibitória e, assim, no TAG (ZANOVELI et al., 2003). Conforme McNaughton e Cor (2004) e Graeff e Guimarães (2012) a SCPD, assim como a amígdala, o córtex pré-frontal e a porção medial do hipotálamo, participa tanto da resposta de fuga (relacionando-se com o TP) quanto na esquiva inibitória (relacionando-se com TAG). Porém, sua participação seria maior na resposta de fuga do que na esquiva inibitória, onde poderia estar relacionada com a quiescência defensiva, entendida como uma postura de baixa movimentação do animal, semelhante ao *freenzing*, mas posturalmente distinto desse comportamento em situações ambientais desfavoráveis geradas em níveis elevados de ansiedade (MCNAUGHTON e COR, 2004).

Em conjunto, os resultados do presente estudo sugerem um envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica na SCPD, via receptores alfa e beta-adrenérgicos, em reações defensivas associadas com o TAG, mas não com o TP em animais submetidos ao LTE. Os resultados obtidos nesse trabalho fortalecem outros estudos relacionados à participação da noradrenalina na ansiedade. Para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no efeito da noradrenalina serão necessários outros estudos visando determinar quais subtipos de receptores

adrenérgicos estão mediando a ação desse neurotransmissor na SCPD sobre as respostas de esquiva inibitória e fuga no LTE.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. H. F.; RESSTEL, L. B. M.; CORREA, F. M. A.; CRESTANI, C. C. Bed nucleus of the stria terminalis  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptors differentially modulate the cardiovascular responses to exercise in rats. **Neuroscience**. 177: 74-83, 2011.

American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition. Arlington, VA, **American Psychiatric Association**, 2013.

BANDLER, R.; CARRIVE, P.; DEPAULIS, A. Introduction: emerging principles of organization of the midbrain periaqueductal gray matter. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization. New York. **Plenus Press**, 1991, p. 1-8.

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

BERRIDGE, C. W.; WATERHOUSE, B. D. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. **Brain Research Reviews**. 42: 33-84, 2003.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu. Rev. Psychol.** 39: 43-68, 1988.

BLANCHARD, R. J.; *et al.* Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav. Brain Res.** 21(6): 783-789, 1997.

BRANDÃO, M. L. As bases biológicas do comportamento: introdução à neurociência. São Paulo. **Editores pedagógica e universitária**. 2004. Pag....

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. **Behavioral brain research**. 58 (1-2): 27-47, 1993.

CECCHI, M.; KHOSHBOUEI, H.; MORILAK, D. A. Modulatory effects of norepinephrine, acting on alpha 1 receptors in the central nucleus of the amygdala, on behavioral and neuroendocrine responses to acute immobilization stress. **Neuropharmacology**. 43: 1139-1147, 2002a.

CECCHI, M.; KHOSHBOUEI, H.; MORILAK, D. A. Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. **Neuroscience**. 112 (1): 13-21, 2002b.

CHARNEY, D. S.; WOODS, S. W.; HENINGER, G. R. Neurobiological mechanisms of panic anxiety: biochemical and behavioral correlates of yohimbine-induced panic attacks. **Am. J. Psychiatry**. 144 (8): 1030-1060, 1987.

CLARK, D. M. A cognitive approach to panic. **Behav. Res. Ther.** 24 (4): 461-470, 1986.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology, biochemistry & behavioral**. 13: 167-170, 1980.

CRESTANI, C. C.; ALVES, F. H. F.; CORRÊA, F. M. A. Both  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ -adrenoceptors mediate the cardiovascular responses to noradrenaline microinjected into the bed nucleus of the stria terminalis of rats. **British journal of pharmacology**. 153: 583-590, 2008.

DARWIN, C. A expressão das emoções no homem e nos animais. São Paulo **Companhia das letras**, 2009.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. **Journal of psychopharmacology**. 5 (4): 305-315, 1991.

DE BORTOLI, V. C.; NOGUEIRA, R. L. Effects of fluoxetine and buspirone on the panicolytic-like response induced by the activation of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. **Psychopharmacology**. 183: 422-428.

DE OLIVEIRA, S. T.; DE BORTOLI, V. C.; ZANGROSSI, H. JR. Serotonin-2A receptor regulation of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray matter: the role of GABA. **Psychopharmacology**. 218(4): 725-732, 2011.

ESTRADA, V. B.; *et al.* Noradrenaline microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter causes anxiolytic-like effects in rats tested in the elevated T-maze. **Life sciences**. 152: 94-98, 2016.

FORTES, S.; *et al.* Nosological profile and prevalence of common mental disorders of patients seen at the Family Health Program (FHP) units in Petrópolis, Rio de Janeiro. **Revista brasileira de psiquiatria**. 30(1): 32-37, 2008.

FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. III. The monoamine nerve terminal. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie**. 65: 573-596, 1965.

FUXE, K.; HAMBERGER, B.; HÖKFELT, T. Distribution of noradrenaline nerve terminals in cortical areas of the rat. **Brain research**. 8: 125-131, 1968.

GOLAN, D. E. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. Rio de Janeiro. 2 ed. **Guanabara Koogan**, 2009.

GRAEFF, F. G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience and biobehavioral reviews**. 28 (3): 239-259, 2004.

GRAEFF, F. G.; DEL-BEN, C. Neurobiology of panic disorder: from animal models to brain neuroimaging. **Neuroscience and biobehavioral reviews**. 32 (7): 1326-1335, 2008.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. Fundamentos de psicofarmacologia. São Paulo. 2 ed. **Editora Atheneu**. 2012

GRAEFF, F. G.; HETEM, L. A. B. Transtornos de ansiedade. São Paulo. 2 ed. **Editora Atheneu**. 2012

GRAEFF, F. G.; NETTO, C. F.; ZANGROSSI JR, H. The elevated T-maze as an experimental of anxiety. **Neuroscience and behavioral reviews**. 23 (2): 237-246, 1998.

GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. Anxiolytic action on the behavioral inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **J. Affect. Disord.** 61(3): 161-176, 2000.

GRIEBEL, G.; HOLMES, A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. **Nature Reviews: Drug Discovery**. 12 (9): 667-687, 2013.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**. 327: 1-5, 1984.

HöKFELT, T.; FUXE, K.; GOLDSTEIN, M.; JOHANSSON, O. Immunohistochemical evidence for the existence of adrenaline neurons in the rat brain. **Brain research**. 66: 235-251, 1974.

JACOB, C.A.; CABRAL, A.H.; ALMEIDA, L.P.; MAGIEREK, V.; RAMOS, P.L.; ZANOVELI, J.M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; ZANGROSSI JR., H.; NOGUEIRA, R.L. Chronic imipramine enhances 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors-mediated inhibition

of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 72(4):761-766, 2002.

JENCK, F.; MOREAU, J.L.; MARTIN, J.R. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. **Psychiatry Res.**, 57(2):181-191, 1995.

JIANG, M.; *et al.* Actions of epinephrine on neurons in the rat midbrain periaqueductal gray maintained in vitro. **Brain research bulletin.** 29: 871-877, 1992.

KIM, J.; GORMAN, J. The psychobiology of anxiety. **Clinical neuroscience research.** 4: 335-347, 2005.

LOVICK, T.A. Panic disorder – a malfunction of multiple transmitter control systems within the midbrain periaqueductal gray matter. **Neuroscientist**, 6:48-59, 2000.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and behavioral reviews.** 28(3): 285-305, 2004.

MÜLLER, C. J. T. Efeitos da administração central e periférica de ligantes dos receptores alfa2-adrenérgicos sobre as respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaqueductal dorsal de ratos. Vitória. Dissertação de mestrado. **UFES.** 2010.

NIEUWENHUYSS, RUDOLF. Chemoarchitecture of the Brain. Berlim. **Ed. Springer Verlag.** Pag. 7-44. 1985.

NARDI, A. E. Some notes on a historical perspective of panic disorder. **Jornal brasileiro de psiquiatria.** 55 (2): 154-160, 2006.

NASHOLD JR, B. S.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **Journal of neurosurgery.** 30: 14-24, 1969.



- NUTT, D. J. The pharmacology of human anxiety. **Pharmacology & therapeutics**, 47: 233-266, 1990.
- PAPAKOSTAS, Y. G.; *et al.* A historical inquiry into the appropriateness of the term 'panica disorder'. **History of psychiatry**. 14 (2): 195-204, 2003.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain: In stereotaxic coordinates. Londres. 6 ed. **Elsevier**. 2007.
- PELOSI, G. G.; *et al.* Anxiolytic-like effect of noradrenaline microinjection in the dorsal periaqueductal gray of rats. **Behavioral pharmacology**. 20 (3): 252-259, 2009.
- POLTRONIERI, S. C.; ZANGROSSI JR, H.; VIANA, M. B. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behavioral brain research**. 147: 185-192, 2003.
- PRATT, J. A. The neuroanatomical basis of anxiety. **Pharmacology & therapeutics**, 55: 149-181, 1992.
- RAMAGE-MORIN, P. L. Panic disorder and coping. Health reports / Statistics Canada, **Canadian Centre for Health Information**. 15: 31-43, 2004.
- REDMOND JR, D. E.; HUANG, Y. H.; SNYDER, D. R.; MASS, J. W. Behavioral effects of stimulation of the nucleus locus coeruleus in the stump-tailed monkey *Macaca arctoides*. **Brain research**. 116: 502-510, 1976.
- SCHENBERG, L.C.; VARGAS, L.C.; MEDEIROS, R.L.; MARQUES, T.A.; SILVA, S.R.; FRAIPONT, P.; TUFIK, S. Evaluation of the rat defense reaction as a model of panic attack in man: pharmacological and neuroendocrine evidence. **Int. J. Psychophysiol.**, 30:127-128, 1998.
- SCHENBERG, L. C.; BITTENCOURT, A. S.; SUDRÉ, E. C. M.; VARGAS, L. C. Modeling panic attacks. **Neuroscience and behavioural reviews**. 25: 647-659, 2001.

SHORTER, E. A history of Psychiatry: From the era of the asylum to the age of Prozac. Nova York: **John Wiley & Sons**. 1997.

SILVEIRA, M. C. L.; *et al.* Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. **Behavioral and brain research**. 126: 13-21, 2001.

SOARES, V. P.; ZANGROSSI JR, H. Involvement of 5-HT1A and 5-HT2 receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. **Brain Research**. 64: 181-188, 2004.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacology, biochemistry and behavioral**. 65 (4): 571-576, 2000.

VAUGHAN, C. W.; BANDLER, R.; CHRISTIE, M. J. Differential responses of lateral and ventrolateral rat periaqueductal grey neurones to noradrenaline *in vitro*. **The journal of physiology**. 490 (2): 373-381, 1996.

VERSTEEG, D. H. G.; *et al.* Regional concentrations of noradrenaline and dopamine in rat brain. **Brain research**. 113: 563-574, 1976.

VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: a new animal modelo of anxiety and memory. **Pharmacology, biochemistry and behavioral**. 49 (3): 549-554, 1994.

VIANA, M. B. Mudanças nos conceitos de ansiedade nos séculos XIX e XX: da “Angstneurose” ao DSM-IV. São Carlos. Tese de Doutorado. **UFSCar**. 2010.

ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain research bulletin**. 44 (1): 1-5, 1997.

ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. **Neuroscience and biobehavioral reviews**. 2014

ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI JR, H. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. **European journal of pharmacology.** 473: 153-161, 2003.