



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

**EVIDÊNCIA DE UM SISTEMA DE ALARME DE
SUFOCAMENTO NA MATÉRIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSAL DE RATOS: EFEITOS DO
ISOLAMENTO NEONATAL E DE TRATAMENTOS COM
PANICOLÍTICOS CLINICAMENTE EFICAZES**

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

Fagna Giacomini Schimitel

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Vitória, ES

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Vitória, 24 de Setembro de 2014.

Schimitel, Fagna Giacomini

Evidência de um sistema de alarme de sufocamento na matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos: efeitos do isolamento neonatal e de tratamentos com pânicoclínicos clinicamente eficazes.

Schimitel, F.G. – Vitória, 2014.

Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. Luiz C. Schenberg

1. Transtorno do Pânico, 2. Matéria Cinzenta Periaquedutal, 3. Dióxido de Carbono, 4. Cianeto de Potássio, 5. Isolamento Neonatal, 6. Fluoxetina, 7. Clonazepam.

**EVIDÊNCIA DE UM SISTEMA DE ALARME DE SUFOCAMENTO NA MATÉRIA
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL DE RATOS: EFEITOS DO
ISOLAMENTO NEONATAL E DE TRATAMENTOS COM PANICOLÍTICOS
CLINICAMENTE EFICAZES.**

Fagna Giacomini Schimitel

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de
Doutora em Ciências Fisiológicas.**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg – Orientador, UFES

Profa. Dra. Ester Miyuki Nakamura Palacios – UFES

Profa. Dra. Maria Carmem Viana - UFES

Prof. Dr. Helio Zangrossi – FMRP-USP

Profa. Dra. Deborah Suchecki - UNIFESP

Coordenadora do PPGCF – Profa. Dra. Ivanita Stefanon

Vitória, 24 de setembro de 2014

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar o meu caminho;

aos meus pais, Marlene e Jovelino, pela dedicação de toda vida;

ao meu orientador, Professor Doutor Luiz Carlos Schenberg, por esses muitos anos de aprendizado;

ao meu amor, Anderson, pelo companheirismo, carinho, paciência e por todo amor;

aos Professores Doutores Ester Miyuki Nakamura Palacios, Maria Carmem Viana, Helio Zangrossi e Deborah Suchecki por terem aceitado ao nosso convite e por tornarem essa defesa mais rica em conhecimento;

aos meus sobrinhos e afilhados, Guilherme, Lucca, Clara, Marcelo e Mateus, pela alegria de ser tia;

aos meus irmãos e cunhados, Fabio e Fabiane, Kenya e Carlyson, pelo prazer de viver em família;

às minhas grandes amigas de laboratório e de vida Cláudia Janaína e Jeyce, por terem estado comigo nos bons e maus momentos da rotina do laboratório e por toda ajuda dada; Cláudia essa tese também é sua!!!

Ao Matiello, pelas grandes ajudas nos momentos que precisem me ausentar;

Aos companheiros de laboratório, pelas trocas de experiência e conselhos;

às minhas amigas: Luciana, Miriam, Lorena e Renata por tantas alegrias em tão pouco tempo;

à Isabela, Aline e Poliana pela colaboração com as fêmeas ...

... agradeço a todos vocês por terem acreditado em mim, até mesmo nos momentos em que eu mesma duvidava.

Muito obrigada!!!

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

ABREVIATURAS

AP – ataques de pânico

ASI – ansiedade de separação na infância

Ca²⁺ - cálcio

CCK – colecistocinina

CEUA – comitê de ética no uso de animais

CO₂ – dióxido de carbono

Cov – covariância

CTR – controle

DE₅₀ – dose efetiva 50

DEF – defecação

DM – depressão maior

DSM – Manual Diagnóstico e Estatístico de Desordens Mentais

EP – erro padrão

E.V. – endovenoso

EXO – exoftalmia

GABA – ácido gama aminobutírico

GLP – galope

H⁺ - ácido

HDM – hipotálamo dorsomedial

5HT - serotonina

I₅₀ – intensidade 50

IC – intervalo de confiança

I.M. – intramuscular

IMO – imobilidade

I.P. – intraperitoneal

ISN – isolamento social neonatal

K⁺ - potássio

KCN – cianeto de potássio

LC – lócus cerúleo

M_{50} – mediana

MCPA – matéria cinzenta periaquedutal

MCPAd – matéria cinzenta periaquedutal dorsal

MCPAdl – matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral

MCPAdm – matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial

MCPAl – matéria cinzenta periaquedutal lateral

MCPAvl – matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral

Mg^{2+} - magnésio

MIC – micção

NaCl – cloreto de sódio

NS – não-separado

NTS – núcleo do trato solitário

P – pos-natal

PCO_2 – pressão parcial de dióxido de carbono no sangue

PO_2 – pressão parcial de oxigênio no sangue

SLT – salto

SP - separado

TAG – transtorno de ansiedade generalizada

TEP – tomografia por emissão positrônica

pH – potencial hidrogeniônico

TASK – tandem acid sensitive potassium channel

TP – transtorno do pânico

TRT – trote

Var – variância

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	4
REVISÃO: ATAQUES DE PÂNICO E ALARME DE SUFOCAMENTO.....	7
1 Transtorno do Pânico.....	8
1.1 <i>Teoria do Alarme Falso de Sufocamento</i>	13
2 Comorbidade dos Transtornos Ansiosos e Depressivos.....	15
3 Modelos Animais.....	17
4 Referências.....	22
RESULTADOS EXPERIMENTAIS 1.....	32
1 OBJETO GERAL.....	33
2 OBJETOS ESPECIFICOS.....	33
3 IINTRODUÇÃO.....	34
4 MATERIAIS E METODOS.....	38
4.1 <i>Animais</i>	39
4.2 <i>Canulação da Veia Jugular</i>	39
4.3 <i>Tratamentos Medicamentosos</i>	40
4.4 <i>Registros Comportamentais</i>	40
4.5 <i>Análise Estatística</i>	42
5 RESULTADOS.....	43
5.1 Efeitos dos Tratamentos Agudo e Crônico com Salina.....	44
5.2 Efeitos do Tratamento Agudo com Clonazepam sobre os Comportamentos de Fuga Produzidos pelo KCN.....	44
5.3 Efeitos do Tratamento Crônico com Fluoxetina sobre os Comportamentos de Fuga Produzidos pelo KCN.....	45
6 DISCUSSÃO.....	47
7 REFERÊNCIAS.....	51
RESULTADOS EXPERIMENTAIS 2.....	59

1	OBJETO GERAL.....	60
2	OBJETOS ESPECIFICOS.....	60
3	IINTRODUÇÃO.....	61
4	MATERIAIS E METODOS.....	66
	4.1 <i>Animais</i>	67
	4.2 <i>Procedimentos</i>	67
	4.3 <i>Isolamento Materno Neonatal</i>	68
	4.4 <i>Ovarectomia</i>	68
	4.5 <i>Eletrodo</i>	69
	4.6 <i>Implantação dos eletrodos</i>	69
	4.7 <i>Canulação da veia jugular</i>	70
	4.8 <i>Protocolo experimental</i>	71
	4.9 <i>Registros Comportamentais</i>	72
	4.10 <i>Histologia</i>	74
	4.11 <i>Análise Estatística</i>	75
5	RESULTADOS.....	78
	5.1 Efeitos do Sexo e Isolamento Sobre os Limiares das Respostas Defensivas a Estimulação Elétrica da MCPAd em Ar Ambiente.....	79
	5.2 Efeitos do CO ₂ Sobre os Limiares dos Comportamentos de Defesa Induzidos por Estimulação Elétrica da MCPAd.....	80
	5.3 Efeitos Comportamentos da Exposição ao CO ₂ (8% e 13%), Sexo e Isolamento Materno Sobre a Duração da Resposta de Fuga ao KCN.....	82
6	DISCUSSÃO.....	84
7	REFERÊNCIAS.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Efeitos agudos do clonazepam sobre a duração das respostas de fuga produzidas por injeções endovenosas de KCN.....	45
2	Efeitos crônicos da fluoxetina sobre a duração das respostas de fuga produzidas por injeções endovenosas de KCN.....	46
3	Efeitos percentuais do CO ₂ sobre os limiares medianos das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPAd.....	81
4	Efeitos do CO ₂ , sexo e isolamento maternal sobre a duração das respostas de fuga à injeção endovenosa de KCN.....	79

ÍNDICE DE TABELAS

1	Efeitos das administrações agudas e crônicas de clonazepam e fluoxetina, respectivamente, sobre a duração (s) dos comportamentos de fuga induzidos por injeção intravenosa <i>in bolus</i> de KCN 80 µg.....	44
2	Limiares medianos das respotas de defesa à estimulação da MCPAd de ratos machos ou de fêmeas ovariectomizadas, submetidos ou não ao isolamento social neonatal.....	79

RESUMO

Dispneia, “fome por ar” e desejo de fuga são sintomas dos ataques de pânico do tipo respiratório. Os pacientes com esse tipo de pânico também apresentam anormalidades respiratórias basais e um alto índice de doenças respiratórias comórbidas. Os ataques de pânico são precipitados pela infusão de lactato de sódio (0,5 M, E.V.) ou inalação de dióxido de carbono (CO₂ 5%) em pacientes com transtorno de pânico. Contudo, estes agentes são inócuos em indivíduos saudáveis. Outros estudos mostraram que os pacientes de pânico são igualmente responsivos a hipóxia. Estas e outras observações levaram Klein (Arch Gen Psychiat, 50: 306, 1993) a sugerir que o pânico clínico é uma falha de um sistema de alarme de sufocamento. Em ratos, a hipóxia citotóxica em células quimiorreceptoras causada por injeções intravenosas de cianeto de potássio (KCN) produz comportamentos de fuga de curta duração que lembram ataques de pânico. Os comportamentos de fuga produzidos pelo KCN são bloqueados tanto por desnervação de células quimiorreceptoras quanto por lesão da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPAd), o provável substrato do pânico, visto que os comportamentos de defesa produzidos pela estimulação da MCPAd têm sido propostos como modelos de ataque de pânico. Dados clínicos sugerem também que ansiedade de separação na infância (ASI) e a depressão maior (DM) predis põem ao transtorno do pânico (TP). Portanto, este estudo analisou a duração dos comportamentos de fuga produzidos pelo KCN após tratamentos agudos e crônicos com clonazepam (0.01-0.3 mg/kg, i.p.) e fluoxetina (1-4 mg/kg/dia/21 dias, i.p.), respectivamente, em ratos intactos. Além de verificar os efeitos comportamentais do CO₂ e KCN, tanto isoladamente quanto combinados à estimulação da MCPAd em ratos machos e fêmeas que sofreram isolamento

neonatal. Em ratos machos, o isolamento causou reduções significativas dos limiares medianos de galope e micção. Em geral, as fêmeas ovariectomizadas apresentaram limiares maiores que aqueles dos machos, isolados ou não isolados. Já o CO₂, produziu aumentos dose-dependentes dos limiares medianos das respostas de imobilidade, exoftalmia, trote, galope e saltos. Contudo, as ratas foram menos sensíveis a estes efeitos. Em relação aos panicolíticos, observou-se que os comportamentos de fuga produzidos por KCN são atenuados tanto por tratamento agudo com clonazepam quanto por tratamento crônico com fluoxetina. Estes resultados apóiam o envolvimento da MCPAd em um mecanismo de alarme de sufocamento.

Palavras-chave: Transtorno do pânico, Matéria Cinzenta Periaquedutal, Dióxido de Carbono, Cianeto de Potássio, Isolamento Neonatal, Fluoxetina, Clonazepam.

ABSTRACT

Dyspnoea, 'hunger for air' and urge to flee are the cardinal symptoms of respiratory-type panic attacks. Patients also show baseline respiratory abnormalities and a higher rate of comorbid and antecedent respiratory diseases. Panic attacks are also precipitated by both the infusion of 0.5 M sodium lactate and the inhalation of 5-7% CO₂ in predisposed patients but not in healthy volunteers or patients without panic disorder. Further studies showed that panic patients are also hyperresponsive to hypoxia. These and other observations led Klein (Arch Gen Psychiat, 50: 306, 1993) to suggest that clinical panic is the misfiring of a suffocation alarm system. In rats, cytotoxic hypoxia of chemoreceptor cells by intravenous injections of potassium cyanide (KCN) produces short-lasting flight behaviors reminiscent of panic attacks. KCN-induced flight behaviors are blocked both by denervation of chemoreceptor cells and lesion of dorsal periaqueductal gray matter, a likely substrate of panic, given that the defensive behaviors produced by stimulation of dorsal periaqueductal gray matter have been proposed as models of panic attack. Clinical data also suggest that separation anxiety in childhood and major depression predispose to panic disorder. Therefore, this study analyzed the duration of escape behavior produced by KCN after acute and chronic treatment with clonazepam (0.01-0.3 mg / kg, ip) and fluoxetine (1-4 mg / kg / day / 21 days, ip), respectively in intact rats. In addition to checking the behavior effects of CO₂ and KCN, either alone or combined with dorsal periaqueductal gray matter stimulation of male and female who suffered isolation neonatal rats. In male rats, the isolation caused significant reductions in median thresholds of galloping and urination. In general, ovariectomized showed greater than those of males, isolated or not isolated thresholds. Already CO₂, produced

dose-dependent increases in responses median of immobility, exophthalmos, trotting, galloping and jumping thresholds. However, females rats were less sensitive to these effects. In relation to panicolitics, it was observed that the behaviors of escape produced by KCN are both attenuated by acute treatment with clonazepam and by chronic treatment with fluoxetine. These results support the involvement of MCPAd on a suffocation alarm mechanism.

Keywords: Panic Disorder, Periaqueductal Gray Matter, Carbone Dioxide, Potassium Cyanide, Defensive Behaviors, Electrical Stimulation.

REVISÃO

ATAQUES DE PÂNICO E ALARME DE SUFOCAMENTO

1. TRANSTORNO DO PÂNICO

Os fundamentos da nosologia contemporânea dos transtornos de ansiedade podem ser encontrados na classificação original das 'neuroses de ansiedade' (*Angstneurose*) de Sigmund Freud. Ele distinguiu estes transtornos da depressão maior e de uma ampla variedade de condições mal definidas denominadas à época de 'neuroastenias'. De fato, em escritos tão precoces quanto os '*Estudos Seleccionados sobre a Histeria*' (1895), Freud já distinguia duas síndromes fundamentais, quais sejam, a 'expectativa ansiosa' (*Angstliche*), que ele considerava a forma predominante do transtorno de ansiedade, e uma síndrome menos freqüente, porém igualmente importante, que ele denominou 'ataque de ansiedade' (*Angstanfall*). De acordo com sua descrição, a expectativa ansiosa era '*um quantum de ansiedade livre e flutuante que controlava a escolha das idéias por antecipação*'. Em contraste, no ataque de ansiedade esta '*irrompia repentinamente na consciência sem ter sido eliciada por qualquer idéia*'. Freud ressaltou que estes ataques podiam manifestar-se tanto como '*um sentimento puro de ansiedade*' quanto pela combinação da ansiedade com '*a interpretação mais próxima do término da vida, tal como a idéia de morte súbita ou da perda da razão*', ou combinada a '*alguma parestesia . [ou]... distúrbio de uma ou mais funções somáticas, tais como a respiração, atividade cardíaca, inervação vasomotora e atividade glandular*'. Freud distinguiu estes ataques das fobias, do

transtorno obsessivo-compulsivo (*'neurose obsessiva'*) e do transtorno de estresse pós-traumático (*'neurose comum'*), entre outras condições. A *'expectativa ansiosa'* e o *'ataque de ansiedade'* são praticamente idênticos aos diagnósticos contemporâneos do transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e transtorno do pânico (TP), respectivamente (APA, 1994).

Presumivelmente, a herança clínica de Freud foi, em grande medida, esquecida após o divórcio profundo entre psicanálise e medicina. Assim, enquanto os transtornos de ansiedade continuaram a ser diagnosticados como neuroastenias até meados do século passado, o TP recebeu uma variedade enorme de nomes, incluindo neurose de ansiedade, reação de ansiedade, neuroastenia, astenia neurocirculatória, neurose vasomotora, taquicardia nervosa, síndrome de esforço, síndrome de Da Costa, coração de soldado e coração irritável, entre outros (Pitts e McClure, 1967). Este cenário começou a alterar-se após a publicação do estudo influente de Donald Klein (1964) mostrando que o TAG e o TP respondiam a classes diferentes de drogas. Klein mostrou que enquanto a *'expectativa ansiosa'* era tratada por ansiolíticos (barbitúricos, meprobamato e clordiazepóxido) e doses baixas de sedativos (fenotiazinas), os ataques de pânico eram tratados pela administração crônica do antidepressivo tricíclico imipramina.

Ao redor da mesma época, Pitts e McClure (1967) demonstraram que os ataques de pânico tinham *'marcadores fisiológicos'*, uma vez que eles podiam ser precipitados pela infusão endovenosa de lactato de sódio em pacientes predispostos aos ataques espontâneos de pânico, mas não em voluntários normais. Na realidade, Cohen e White (1951) já haviam mostrado que

os ataques de pânico podiam ser precipitados por hiperventilação a 5% de dióxido de carbono (CO₂), mas não no exercício ou na ventilação ambiente (Klein, 1993b). Posteriormente, mostrou-se que a ioimbina, um antagonista alfa-2 adrenérgico, também induz pânico em mais de dois terços dos pacientes de TP, principalmente após administração endovenosa (Charney et al., 1984). Contudo, a infusão de ioimbina também provocou o aumento da ansiedade em pessoas normais, tal como ocorre com a cafeína, colecistocinina (CCK) e inúmeras drogas com ação panicogênica (Klein, 1993b).

Os ataques de pânico são episódios agudos de medo, ou sensação similar, que ocorrem de forma recorrente e na ausência de qualquer ameaça identificável. Eles caracterizam-se por uma experiência súbita de intenso estresse, pensamentos catastróficos e ansiedade severa, que se desenvolvem rapidamente, atingindo um pico em aproximadamente 10 min. Os principais sintomas dos ataques de pânico na clínica são taquicardia (Freedman et al., 1985; Stein et al., 1992; Reclin et al., 1994), alterações cardíacas e respiratórias (Goetz et al., 1994), dificuldade em respirar, sensação de sufocamento, dor no tórax, suor, vertigem, tremores, desejo de fuga e sensação de morte iminente. Em alguns relatos inclui-se o receio de não poder controlar os esfíncteres vesical e anal (Cassano e Savino, 1993; Goetz et al, 1994). A descrição clínica de Freud para o “ataque de ansiedade” já incluía 10 dos 13 sintomas necessários para o diagnóstico do TP quando este foi introduzido no Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais (DSM-III-R) (Frances et al, 1993). Neste, o TP é definido como a ocorrência de quatro ataques espontâneos em quatro semanas ou um ataque seguido pelo receio de novos ataques ao longo de quatro semanas.

Também ficou estabelecida a distinção entre ataques completos, com mais de quatro sintomas (entre 12 ou 13 sintomas característicos), ou ataques limitados, com número inferior de sintomas. Por sua vez, os AP situacionais estão relacionados à expectativa do paciente de desenvolver sintomas que se assemelham aos dos AP em um determinado local ou contexto. Essa ansiedade é gradual, até que o indivíduo se confronte com a situação temida e ocorra um AP (Gentil, 1988).

O TP pode acarretar em enorme prejuízo aos indivíduos, principalmente, se for acompanhado de agorafobia, limitando as atividades sociais e profissionais de forma parcial ou completa. Devido à ausência de explicação dos sintomas e às frequentes consultas e exames médicos, geralmente negativos, os AP também desenvolvem insegurança e perda da autoestima, com grande desconforto físico e emocional. Com um custo social elevado, estimativas europeias avaliam que 7,5% a 10% da população adulta, entre 20 e 30 anos, terão AP ocasionais e 2% a 5% desenvolverão o TP, isto é, AP recorrentes com graves limitações do desempenho social e familiar do indivíduo (Goodwin et al., 2004).

A partir desses e de outros fatos, duas teorias foram propostas para esclarecer as bases neurais do TP: A primeira delas, proposta por Deakin & Graeff (1991), baseia-se na prescrição dos inibidores de recaptção da serotonina (5HT) para uma ampla gama de transtornos psiquiátricos, incluindo o TAG e o TP, mas também, o transtorno obsessivo compulsivo e a depressão. Brevemente, a teoria propõe que a 5HT facilita a ansiedade por uma ação na amígdala, mas inibe os ataques de pânico por uma ação na matéria cinzenta periaquedutal (MCPA). Adicionalmente, propõe que a depressão ocorre pela subregulação de receptores

5HT_{1A} do hipocampo, produzindo uma disfunção no 'sistema de resiliência' que tem por função separar as tarefas do dia-a-dia dos eventos aversivos. Segundo a teoria de Deakin & Graeff (1991), a MCPA seria um centro de coordenação de reflexos defensivos a predadores ou outros estímulos nocivos, como dor ou anóxia. Esta teoria sugere que os ataques de pânico são estados similares ao medo a uma ameaça proximal, tal como a reação da presa face ao predador. A teoria também sugere a evolução do sistema serotoninérgico como um sistema especializado no controle de situações aversivas. A segunda teoria, proposta por Klein (1993a, b), baseia-se nas características clínicas dos ataques de pânico e na sensibilidade exagerada dos pacientes de pânico ao CO₂ e lactato. A teoria postula que os ataques de pânico seriam devidos ao disparo inadequado de um sistema de alarme de sufocamento, produzindo os ataques espontâneos em ambiente, ou ataques induzidos por infusão de lactato ou concentrações moderadas de CO₂. Devido à alta comorbidade dos ataques de pânico com ansiedade de separação, Klein e Preter (2007) propuseram recentemente que o elo comum entre asfixia e relações parentais reside nos mecanismos opióides endógenos. Contudo, Shekhar e colaboradores (1996) apresentaram evidências que o hipotálamo dorsomedial (HDM) seja o responsável pelo desencadeamento dos ataques de pânico ao lactato. Eles sugeriram que a disfunção crônica da neurotransmissão GABAérgica do HDM é responsável pelo TP, uma vez que simula parte de seus aspectos comportamentais, cardiovasculares e respiratórios. É importante notar, no entanto, que os comportamentos analisados por Shekhar são modelos mais adequados do TAG que do TP.

1.1 Teoria do Alarme Falso de Sufocamento

Em uma revisão abrangente, Klein (1993b) examinou inúmeras condições que facilitam ou inibem os ataques de pânico, desde o CO_2 e lactato a doenças raras como a 'maldição de Ondine' (hipoventilação congênita), na qual os indivíduos são incapazes de detectar o aumento da PCO_2 durante o sono. Klein (1993b) examinou o transtorno do pânico quanto à sintomatologia e estímulos desencadeadores, hiperventilação dos pacientes, assim como na histeria de massa, no pânico durante o relaxamento e sono, no transtorno pré-menstrual, gravidez, parto, doença pulmonar, ansiedade de separação e farmacoterapia. Klein (1993a, b) sugeriu a existência de um sistema de alarme de sufocamento e que a hipersensibilidade ao CO_2 apresentada pelos pacientes de pânico seria devida a uma interpretação fisiológica incorreta deste sistema, o qual dispararia de forma não-adaptativa, produzindo um alarme falso de sufocamento.

Esta possibilidade passou a ser aventada após a demonstração de Pitts e McClure (1967) e de outros autores que os ataques de pânico podem ser precipitados pela infusão endovenosa de lactato de sódio em pacientes que apresentam ataques de pânico espontâneos, mas não em pessoas normais. A injeção de lactato produz alcalose metabólica periférica acompanhada por hipercapnia cerebral e acidose respiratória. A fisiologia ensina que temos de respirar menos na vigência de alcalose metabólica, numa tentativa de reduzir o pH pela retenção de CO_2 . Contudo, observa-se hiperventilação na infusão de lactato, tanto em pacientes de pânico quanto em indivíduos saudáveis. Embora o lactato não atravesse a barreira hemato-encefálica, o CO_2 , seu metabólito final, atravessa. Esta possibilidade é consistente com a observação de que a infusão de lactato

promove o aumento no fluxo cerebral (Reiman et al., 1989), um achado notável em vista das poucas substâncias que têm este efeito além do CO_2 (Klein, 1993a). Portanto, postulou-se inicialmente que o lactato produzia um estado de hipercapnia central que desencadeava o ataque de pânico. Contudo, demonstrou-se posteriormente que o d-lactato, um isômero que não é metabolizado em mamíferos, também produz ataques de pânico. Para explicar este fenômeno, Klein (1993a,b) sugeriu que o sistema de alarme de sufocamento não diferencia os isômeros pois jamais foi exposto ao d-lactato no curso da evolução. Klein (1993a,b) propôs, portanto, que o sistema de alarme de sufocamento pode ser deflagrado tanto pelo CO_2 quanto pelo lactato, diretamente. Corroborando esta hipótese, Johnson e colaboradores (2008) mostraram que o lactato atravessa as áreas pérvias da barreira hematoencefálica localizadas nas regiões periventriculares (organum vasculosum lamina terminalis, órgão subfornicial, área póstrema). Adicionalmente, o lactato de sódio racêmico é um indutor mais potente de pânico que o CO_2 ou o bicarbonato de sódio (metabólito intermediário do lactato). É possível que esta diferença de potência seja devida ao fato do lactato racêmico induzir pânico por dois mecanismos, quais sejam, conversão do lactato a CO_2 e efeito farmacológico direto de estimulante da respiração (Klein, 1993a).

Dispnéia, respiração rápida e hiperventilação são as manifestações respiratórias relatadas com maior frequência por pacientes com TP. Portanto, Klein (1993a) propôs que o ataque de pânico é constituído de três etapas: a primeira é o disparo do sistema de alarme de sufocamento, provocando a sensação de falta de ar e aumento do volume corrente, como se houvesse havido um aumento da PCO_2 . Se o sistema continua recebendo sinais de asfixia, ocorre a

segunda etapa, desencadeando as respostas comportamentais de um ataque de pânico. Por fim; a terceira etapa consiste num aumento na frequência respiratória que persiste mesmo após o término dos eventos comportamentais do ataque de pânico (Klein, 1993a).

Alguns estudos apresentaram evidências da hipersensibilidade fisiológica dos pacientes de pânico ao CO₂ (Gorman et al., 1988; Fishman, 1994; Pain et al., 1988). Assim, comparados aos controles saudáveis e aos pacientes que não responderam ao CO₂, pacientes que tiveram ataques de pânico induzidos por CO₂ apresentaram aumentos maiores do volume corrente respiratório durante a inalação do gás antes do ataque de pânico (Gorman et al., 1988). Embora estes resultados não tenham sido corroborados por outros pesquisadores (Woods et al., 1986; Roth et al., 1992), estudos posteriores mostraram que pacientes tratados com pânicolíticos, tanto serotoninérgicos como noradrenérgicos, são menos sensíveis ao CO₂ que os pacientes não-tratados (Gorman et al., 1997).

2 COMORBIDADE DOS TRANSTORNOS ANSIOSOS E DEPRESSIVOS

Nas últimas décadas, pesquisas epidemiológicas revelaram que os transtornos do humor e da ansiedade apresentam alta comorbidade. Estes estudos proporcionaram uma compreensão mais profunda da correlação e do curso desses transtornos, bem como do seu prognóstico (Brown e Barlow, 1992; Kessler et al., 1994; Dunner, 2001; Goodwin, 2002). Por exemplo, em um estudo epidemiológico de *follow-up*, 41% dos pacientes com TP apresentaram crises depressivas no mesmo ano e 79% nos 10 anos seguintes (Angst e Wicki, 1993). Pacientes com transtornos comórbidos de depressão e ansiedade também

apresentam sintomas mais severos e prognósticos menos favoráveis, exigindo tratamentos mais precoces e um número maior de hospitalizações. Estes pacientes também apresentam um risco maior de suicídio que aqueles com transtornos isolados (Coryell et al., 1988; Fawcett, 1992; Lecrubier, 1998; Lecrubier e Ustün, 1998; Johnson e Lydiard, 1998; Kaufman e Charney, 2000; Kinley et al., 2011). A Ansiedade de Separação na Infância (ASI) também parece predispor o indivíduo ao desenvolvimento de diversas psicopatologias na vida adulta, em particular, a Depressão Maior e o TP (Klein, 1993b; Blandim et al., 1994; Lipsitz et al., 1994; Canetti et al., 1997; Manicavasagar, 1998; Fava e Kendler, 2000; Heim e Nemeroff, 2001; Biederman et al., 2004; Doerfler et al., 2008; Klauke et al., 2010; Mroczkowski et al., 2011). De fato, Klein e Fink (1962) propuseram uma patofisiologia de desenvolvimento individual que relaciona ASI com TP e agorafobia na vida adulta, uma vez que 50% dos pacientes agorafóbicos relataram ASI severa que muitas vezes impediu o comparecimento à escola. Kagan e colaboradores (1988) observaram que ao longo da vida dos pacientes com TP desenvolvem-se, primeiro, a ASI, seguida de fobia social na adolescência e TP na idade adulta. A eficácia do panicolítico imipramina na terapia da ASI confirmou estas proposições (Bernstein et al., 2000; Gittelman-Klein and Klein, 1973). Estas observações, juntamente com as abordagens etológicas de ansiedade (Bowlby, 1983), impulsionaram o desenvolvimento da classificação contemporânea dos transtornos de ansiedade.

A ansiedade de separação também parece estar relacionada ao estresse familiar e início precoce do TP (Battaglia et al., 1995). Pacientes comórbidos para vários transtornos de ansiedade também fazem relatos

frequentes de ASI (Lipsitz et al., 1994). Contudo, as afirmações de que ASI predispõe vários transtornos de ansiedade com a mesma probabilidade (Van der Molen et al., 1989) pode ser devida a um diagnóstico ambíguo de ataques de pânico com sintomas limitados ou à inconsistência dos métodos de entrevista (Preter e Klein, 2008). Não obstante, o aumento da incidência do TP foi um achado significativo no único estudo controlado de longo prazo, duplo-cego, com entrevistas clínicas de crianças com ASI e fobia escolar (Klein, 1995). O início dos ataques de pânico também é frequentemente precipitado pela separação, perda social ou luto (Klein e Fink, 1962; Faravelli e Pallanti, 1989; Kraunonem et al., 2000; Klein, 1993b; Milrod et al., 2004).

Por outro lado, Pine e colaboradores (2000; 2005) observaram uma relação entre a desregulação respiratória e os transtornos de ansiedade na infância. A hipersensibilidade respiratória à inalação de uma mistura de 5% de CO₂ foi significativamente maior nas crianças com ASI e, em menor grau, TAG, que naquelas com fobia social. Estes dados estão de acordo com a hipótese ampliada do alarme falso de sufocamento (Preter e Klein, 2008; Preter et al., 2011), na qual o TP e a ASI estão relacionados a uma anormalidade dos mecanismos opióides que regularia tanto os mecanismos respiratórios quanto as relações parentais, respectivamente.

3 MODELOS ANIMAIS

Embora a MCPA não é necessária para a ritmogênese respiratória, a estimulação dessa estrutura é conhecida há muito tempo pelos seus efeitos proeminentes sobre a respiração. De fato, no primeiro estudo publicado com a

técnica de estimulação elétrica da MCPA, Sachs (1911) relatou que dentre todas as regiões estimuladas do tálamo e mesencéfalo, a MCPA foi a região que produziu as respostas respiratórias mais pronunciada, sendo *“indubitavelmente ... um centro respiratório”*. Estas observações pioneiras foram corroboradas pelo extenso mapeamento das respostas respiratórias induzidas por estimulação elétrica do tronco cerebral (Kabat, 1936). Mais recentemente, Hayward e colaboradores (2003) mostraram que a estimulação química da MCPA afeta predominantemente a frequência respiratória, reduzindo a duração tanto da inspiração quanto da expiração. Estes efeitos foram provavelmente mediados por projeções excitatórias da MCPAd para a área parabraquial (centro pneumotáxico). De fato, enquanto o grupo respiratório ventral do bulbo é reconhecido por sua influência no volume corrente, o centro pneumotáxico controla predominantemente a frequência respiratória (Cohen, 1979). Na verdade, Hayward e Castellanos (2003) mostraram que a estimulação química da MCPA produz um aumento seletivo da imunoreatividade para a proteína c-fos no núcleo parabraquial lateral. Entretanto, as microinjeções neste núcleo com muscimol (5 mM), um agonista de receptores GABA-A, produziu uma atenuação acentuada da resposta respiratória evocada pela estimulação da MCPAd (-90%) e frequência cardíaca (-72%), enquanto a resposta pressora foi menos atenuada (-57%). O bloqueio bilateral dos receptores glutamatérgicos do núcleo parabraquial lateral também produziu uma atenuação acentuada dos aumentos da frequência respiratória (-65%) e cardíaca (-53%) evocados pela estimulação da MCPAd, mas uma redução apenas modesta na resposta pressora (-34%). Estes resultados apóiam a função importante do núcleo parabraquial lateral nos componentes respiratórios e cardíacos dos

comportamentos de defesa induzidos pela estimulação da MCPAd (Hayward et al., 2004; Zhang et al., 2007). A covariação das respostas rítmicas respiratórias e cardíacas é mais provavelmente devida aos efeitos inibitórios bastante conhecidos da atividade respiratória central sobre os motoneurônios cardíacos vagais (Lopes e Palmer, 1978).

A despeito das evidências mencionadas que implicam a MCPA, a área parabraquial lateral, o LC e o hipotálamo posterior no sistema de alarme de sufocamento, os pacientes de pânico poderiam apresentar uma disfunção respiratória em qualquer nível dos circuitos respiratórios, incluindo os quimiorreceptores centrais e periféricos. Embora o papel das informações periféricas nos comportamentos defensivos permaneça incerto, estudos em gatos decerebrados sugeriram há muito tempo que a ativação dos barorreceptores inibe os comportamentos de falsa-ira (Bartorelli et al., 1960), enquanto a ativação dos quimiorreceptores têm um efeito facilitador (Bizzi et al., 1961). De fato, Franchini e Krieger (1993) mostraram que a estimulação seletiva dos quimiorreceptores carotídeos com doses subletais de cianeto de potássio (KCN) (30 µg/Kg) produz comportamentos defensivos que se assemelham aos evocados pela estimulação elétrica ou química da MCPAdl. O envolvimento dos quimiorreceptores arteriais na resposta ao KCN foi claramente demonstrado pela ausência das respostas respiratórias induzidas pelo KCN em ratos com desnervação sino-aórtica. Os autores também mencionam que a desnervação aboliu os efeitos comportamentais. Reciprocamente, Hilton e Joels (1965) já haviam mostrado que a estimulação elétrica das áreas de defesa da MCPA e hipotálamo facilita as respostas ventilatórias ao KCN e dinitrofenol. De fato, Hayward e colaboradores

(2002) mostraram que enquanto a estimulação dos quimiorreceptores carotídeos induz a expressão de proteína c-fos em toda extensão das colunas dorsais da MCPA, a estimulação dos barorreceptores marcou somente os distritos caudais das colunas dorsomedial e lateral. Este padrão é similar àquele induzido por hipóxia sistêmica (Berquin et al., 2000). Finalmente, como Hayward e colaboradores (2002) conduziram seus experimentos em ratos anestesiados com uretana, seus resultados dificilmente poderiam ser secundários a alterações do estado emocional. Conseqüentemente, estes dados sugerem a sensibilidade seletiva da MCPAd à hipóxia. Adicionalmente, Hayward e colaboradores (2002) mostraram que menos de 10% dos neurônios da MCPA caudal que expressaram c-fos após injeções de KCN foram retrogradamente marcados com injeções na região A5 da ponte que medeia o componente pressor do reflexo quimiorreceptor (Guyenet e Koshiya, 1995). Em geral, estes resultados apoiam a facilitação pelos quimiorreceptores dos comportamentos defensivos mediados pela MCPAd e vice-versa, a facilitação pela MCPAd da resposta ventilatória do reflexo quimiorreceptor.

As respostas cardiovasculares e respiratórias evocadas pela MCPAd têm sido classicamente associadas aos ajustes autonômicos nos comportamentos defensivos (Carobrez et al., 1983; Schenberg et al., 1983; Lovick, 1992; Bandler et al., 1994). Os efeitos da estimulação da MCPAd sobre a respiração foram estudados em maior detalhe por Paydarphar e Eldridge (1987). Estes autores examinaram a facilitação induzida pela MCPAd da atividade do nervo frênico em gatos adultos anestesiados por uretana-cloralose que foram submetidos a vagotomia e desnervação sino-aórtica e mantidos em PCO_2 constante (30-35 Torr)

por meio de um ventilador servo-controlado. Estes autores mostraram que a estimulação elétrica da MCPAd com intensidades supralimíares produz apneusis inspiratória. Entretanto, estimulações breves (1 s) com estímulos limiares aplicados em tempos variados do ciclo respiratório invariavelmente reiniciou o ciclo tanto na fase inspiratória ou expiratória. Depois de reiniciado, o ritmo respiratório apresentou cofase constante, ou seja, o intervalo entre o ciclo reinicializado e o começo do próximo ciclo respiratório. Houve, no entanto, um estímulo único (singularidade do oscilador respiratório) que resultou numa cofase de duração imprevisível (duração aleatória da cofase). Esta seria a resposta esperada na dispnéia, o primeiro sintoma do ataque de pânico (Klein, 1993b; Preter e Klein, 2007). Além disso, apesar do ritmo respiratório freqüentemente reiniciar com fases inspiratória e expiratória normais após cofases imprevisíveis, Paydarphar e Eldridge (1987) mostraram em um gato anestesiado com pentobarbital que os estímulos aplicados em intervalos críticos e intensidades apropriadas resultaram numa apneusis inspiratória com duração equivalente a 3 ciclos respiratórios. Este padrão de resposta é similar àquele observado depois da lesão do centro pneumotáxico (Cohen, 1979). Estes dados mostram que as estimulações sutis da MCPAd são capazes de produzir episódios prolongados de dispnéia, que são típicos dos ataques de pânico.

Portanto, este estudo tem por objetivo corroborar a existência de um sistema de alarme de sufocamento na matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos, demonstrando os efeitos do isolamento neonatal e a eficácia dos panicolíticos clonazem e fluoxetina nos modelos experimentais de estimulação elétrica e hipóxia citotóxica por injeção de cianeto de potássio, respectivamente.

4. REFERÊNCIAS

- APA (1994) Diagnostic and statistical manual for mental disorders (DSM-IV). American Psychiatric Association Press, Washington DC.
- Angst J and Wick W (1993). The epidemiology of frequent and less frequent panic attacks. In: SA Montgomery (Ed.), Psychopharmacology of Panic. New York: Oxford University Press, p. 7-24.
- Bandler R, Shipley MT (1994) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? Trends in Neuroscience 17: 379-389.
- Bartorelli C, Bizzi E, Libretti A, Zanchetti A (1960) Inhibitory control of sinocarotid pressoreceptive afferents on hypothalamic autonomic activity and sham rage behavior. Arch Ital Biol 98: 308-326.
- Battaglia M, Bertella S, Politi E, Bernardeschi L, Perna G, Gabriele A, Bellodi L (1995). Age at onset of panic disorder: influence of familial liability to the disease and of childhood separation anxiety disorder. Am J Psychiatry 152: 1362-1364.
- Bernstein GA, Borchardt CM, Perwien AR, Crosby RD, Kushner MG, Thuras PD, Last CG (2000). Imipramine plus cognitive-behavioral therapy in the treatment of school refusal. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 39: 276-283.
- Berquin P, Bodineau L, Gros F, Larnicol N (2000) Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adults rats. Brain Res 857: 30-40.

- Biederman J, Petty C, Faraone SV, Hirshfeld-Becker D, Pollack MH, Henin A, Gilbert J, Rosenbaum JF (2004). Moderating effects of major depression on patterns of comorbidity in patients with panic disorder. *Psychiatry Research* 126: 143-149.
- Bizzi E, Libretti A, Malliani A, Zanchetti A (1961) Reflex chemoceptive excitation of diencephalic sham rage behavior. *Am J Physiol* 200: 923-926.
- Blandin N, Parquet PJ, Bailly D (1994). Separation anxiety. Theoretical considerations. *Encephale* 20: 121-129.
- Bowlby J (1983). *Attachment and Loss*. 2ⁿ Edition, New York: Basic Books.
- Brown TA and Barlow DH (1992). Comorbidity among anxiety disorders: implications for treatment and DSM-IV. *J Consult Clin Psychol* 60: 835-844.
- Canetti L, Bachar E, Galili-Weisstub E, De-Nour AK, Shalev AY (1997). Parental bonding and mental health in adolescence. *Adolescence* 32: 381-394.
- Carobrez AP, Schenberg LC, Graeff FG (1983) Neuroeffector mechanisms of the defense reaction in the rat. *Physiol Behav* 31:439-444.
- Cassano GB; Savino M (1993) Symptomatology of panic disorder: an attempt to define the panic-agoraphobic spectrum phenomenology. In: *The psychopharmacology of panic* (Montgomery SA), Oxford University Press, New York, 38-57.
- Charney DS, Heninger GR, Breier A (1984) Noradrenergic function in panic anxiety: effects of yohimbine in health subjects and patients with panic disorder. *Arch Gen Psychiat* 41:751-763.

- Cohen MI (1979) Neurogenesis of the respiratory rhythm in the mammal. *Physiol Rev* 59: 1105-1173.
- Cohen ME, White PD (1951) Life situations, emotions and neurocirculatory asthenia (anxiety neurosis, neurasthenia, effort syndrome). *Proceedings Association Res Nervous Mental Disease*. 13: 335-357.
- Coryell W, Endicott J, Andreasen NC, Keller MB, Clayton PJ, Hirschfeld RM, Scheftner WA, Winokur G (1988). Depression and panic attacks: the significance of overlap as reflected in follow-up and family study data. *Am J Psychiatry* 145: 293-300.
- Deakin JFW, Graeff FG (1991) 5-HT and mechanisms of defense. *J Psychopharmacol* 5: 305-315.
- Doerfler LA, Toscano PFJr, Connor DF (2008). Separation anxiety and panic disorder in clinically referred youth. *J Anxiety Disord* 22: 602-611.
- Dunner DL (2001). Management of anxiety disorders: the added challenge of comorbidity. *Depress Anxiety* 13: 57-71.
- Fava M and Kendler KS (2000). Major depressive disorder. *Neuron* 28: 335– 341.
- Fawcett J. (1992). Suicide risk factors in depressive disorders and in panic disorder. *J Clin Psychiatry* 53: 9-13.
- Fishman SM, Carr DB, Beckett A, Rosenbaum JF (1994) Hypercapnic ventilatory response in patients with panic disorder before and after alprazolam treatment and in pre-and postmenstrual women. *J Psychiatr Res* 28: 165-170.

- Frances A, Miele GM, Widiger TA, Pincus HA, Manning D, Davis WW (1993) The classification of panic disorders: from Freud to DSM-IV. *J Psychiat Res* 27:3-10.
- Franchini KG, Krieger EM (1993) Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *J Auton Nerv Syst* 42: 63-70.
- Freedman RR, Ianni P, Ettedgui E, Puthezhath N (1985) Ambulatory monitoring of panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 42: 244-248.
- Freud S (1895) On the right to separate from neurasthenia a definite symptom-complex as 'anxiety neurosis' (Angstneurose). In: *The major works of Sigmund Freud, great books of western world Encyclopedia Britannica*, London, 1978.
- Gentil V (1988) The aversive system, 5-HT and panic attacks. In: *Animal Models of Psychiatric Disorders* (Simon P, Soubrié P, Wildlocher D, ed), Karger, Basel 142-145.
- Gittelman-Klein R and Klein DF (1973). School phobia: diagnostic considerations in the light of imipramine effects. *J Nerv Ment Dis* 156: 199-215.
- Goetz RR, Klein DF, Gorman JM (1994) Consistencies between recalled panic and lactate-induced panic. *Anxiety* 1: 31-36.
- Goodwin, R.D., 2002. Anxiety disorders and the onset of depression among adults in the community. *Psychological Medicine* 32, 1121–1124.
- Goodwin, R.D., Lieb, R., Hoefler, M., Pfister, H., Bittner, A., Beesdo, K., Wittchen, H.-U., 2004. Panic attack as a risk factor for severe psychopathology. *The American Journal of Psychiatry* 161, 2207–2214.

- Gorman JM, Fyer MR, Goetz R, Askanazi J, Liebowitz MR, Fyer AJ, Kinney J, Klein DF (1988) Ventilatory physiology of patients with panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 45(1): 31-39 [erratum in: *Arch Gen Psychiatry* (1991) 48(2):181].
- Gorman JM, Browne ST, Papp LA, Martinez J, Welkowitz L, Coplan JD, Goetz RR, Kent J, Klein DF (1997) Effect of antipanic treatment on response to carbon dioxide. *Biol Psychiatry* 42(11): 982-991.
- Guyenet PG, Koshiya N (1995) Working model of the sympathetic chemoreflex in rats. *Clinical and Experimental Hypertension* 17: 167-179.
- Hayward LF, Von Reitzentstein M (2002) c-Fos expression in the midbrain periaqueductal gray after chemoreceptor and baroreceptor activation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 283: H1975-H1984.
- Hayward LF, Castellanos M (2003) Increased c-fos expression in select lateral parabrachial subnuclei following chemical versus electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray in rats. *Brain Res* 974: 153-166.
- Hayward LF, Castellanos M, Davenport PW (2004) Parabrachial neurons mediate dorsal periaqueductal gray evoked respiratory responses in the rat. *J Applied Physiology* 96: 1146-1154.
- Heim C and Nemeroff CB (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 49: 1023-1039.
- Hilton SM, Joels N (1965) Facilitation of chemoreceptor reflexes during the defense reaction. *J Physiol* 176: 20-22.

- Johnson MR and Lydiard RB (1998). Comorbidity of major depression and panic disorder. *J Clin Psychol* 54: 201-210.
- Johnson PL, Truitt WA, Fitz SD, Lowry CA, Shekhar A (2008) Neural pathways underlying lactate-induced panic. *Neuropsychopharmacology* 33: 2093-2107.
- Kabat H (1936) Electrical stimulation of points in the forebrain and midbrain: the resultant alterations in respiration. *J Comp Neurol* 64: 187-208.
- Kagan J, Reznick JS, Snidman N, Gibbons J, Johnson MO (1988). Childhood derivatives of inhibition and lack of inhibition to the unfamiliar. *Child Development* 59: 1580-1589.
- Kaufman J and Charney D (2000). Comorbidity of mood and anxiety disorders. *Depress Anxiety* 12: 69-76.
- Kessler RC, McGonagle KA, Zhao S, Nelson CB, Hughes M, Eshleman S, Wittchen HU, Kendler KS (1994). Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 51: 8-19.
- Kinley DJ, Walker JR, Murray W, Enns MW, Sareen J (2011). Panic attacks as a risk for later psychopathology: results from a nationally representative survey. *Depress Anxiety* 0: 1-8.
- Klauke B, Deckert J, Reif A, Pauli P, Domschke K (2010). Life events in panic disorder – an update on “candidate stressors”. *Depress Anxiety* 27: 716-730.
- Klein DF (1964) Delineation of two drug-responsive anxiety syndromes. *Psychopharmacology* 5: 397-408.

- Klein DF (1993a) Panic may be a misfiring suffocation alarm. In: *The psychopharmacology of panic* (Montgomery SA). Oxford University Press, New York, 67-73.
- Klein DF (1993b) False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. *Arch Gen Psychiatry* 50: 306-317.
- Klein R (1995). Is panic disorder associated with childhood separation anxiety disorder. *Clin Neuropsychopharmacology* 18 (Suppl 2):7-14.
- Klein DF and Fink M (1962). Psychiatric patterns to imipramine. *Am J Psychiat* 119: 432-438.
- Kaunonen, M., Päivi, A.K., Paunonen, M., Erjanti, H., 2000. Death in the Finnish family: experiences of spousal bereavement. *International Journal of Nursing Practice* 6, 127–134.
- Lecrubier Y (1998). The impact of comorbidity on the treatment of panic disorder. *J Clin Psychiatry*. 59 (Suppl 8): 11-14.
- Lecrubier Y and Ustün TB (1998). Panic and depression: a worldwide primary care perspective. *Int Clin Psychopharmacol* 13 (Suppl 4): S7-11.
- Lipsitz JD, Martin LY, Mannuzza S, Chapman TF, Liebowitz MR, Klein DF, Fyer AJ (1994). Childhood separation anxiety disorder in patients with adult anxiety disorders. *Am J Psychiatry* 151: 927-929.
- Lopes OU, Palmer JF (1978) Mechanisms of hypothalamic control of cardiac component of sinus nerve reflex. *Quart J Exp Physiol* 63: 231-254.
- Lovick TA (1992) Inhibitory modulation of the cardiovascular defence response by the ventrolateral periaqueductal grey matter in rats. *Experimental Brain Res* 89: 133-139.

- Manicavasagar V, Silove D, Hadzi-Pavlovic D (1998). Subpopulations of early separation anxiety: relevance to risk of adult anxiety disorders. *J Affect Disorders* 48: 181-190.
- Milrod B, Leon AC, Shear MK (2004). Can interpersonal loss precipitate panic disorder? *Am J Psychiatry* 161: 758-759.
- Mroczkowski MM, Goes FS, Riddle MA, Grados MA, Bienvenu OJ, Greenberg BD, Fyer AJ, McCracken JT, Rauch SL, Murphy DL, Knowles JA, Piacentini J, Cullen B, Rasmussen SA, Geller DA, Pauls DL, Liang KY, Nestadt G, Samuels JF (2011). Separation anxiety disorder in OCD. *Depress Anxiety* 28: 256-262.
- Pain MCF, Biddle N, Tiller JWG (1988) Panic disorder, the ventilatory response to carbon dioxide and respiratory variables. *Psychosom Med* 50: 541-548.
- Paydarfar D, Eldridge FL (1987) Phase resetting and dysrhythmic responses of the respiratory oscillator. *Am J Physiol* 252:55-62.
- Pine DS, Klein RG, Coplan JD, Papp LA, Hoven CW, Martinez J, Kovalenko P, Mandell DJ, Moreau D, Klein DF, Gorman JM (2000). Differential carbon dioxide sensitivity in childhood anxiety disorders and nonill comparison group. *Arch Gen Psychiatry* 57: 960-967.
- Pine DS, Klein RG, Roberson-Nay R, Mannuzza S, Moulton JL 3rd, Woldehawariat G, Guardino M (2005). Response to 5% carbon dioxide in children and adolescents: relationship to panic disorder in parents and anxiety disorders in subjects. *Arch Gen Psychiatry* 62: 73-80.
- Pitts FN, McClure JN (1967) Lactate metabolism in anxiety neurosis. *New Engl J Med* 277: 1329-1336.

- Preter M, Klein DF (2008) Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*.
- Preter M, Lee SH, Petkova E, Vannucci M, Kim S, Klein DF (2011). Controlled cross-over study in normal subjects of naloxone-preceding-lactate infusions, respiratory and subjective responses: relationship to endogenous opioid system, suffocation false alarm theory and childhood parental loss. *Psychol Med* 41: 385-393.
- Rechlin T; Weis M; Spitzer A; Kaschka WP (1994) Are affective disorders associated with alterations of heart rate variability? *J Affect Disord* 32: 271-275.
- Reiman EM, Raichle ME, Robins E, Mintun MA, Fusselman MJ, Fox PT (1989) Neuroanatomical correlates of lactate-induced anxiety attack. *Arch Gen Psychiatry* 46: 493-500.
- Roth WT, Margraf J, Ehlers A, Taylor CB, Maddock RJ, Davies S (1992) Stress test reactivity in panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 49: 301-310.
- Sachs E (1911) On the relation of the optic thalamus to respiration, circulation, temperature, and the spleen. *J Exp Med* 14: 408-440.
- Schenberg LC, De Aguiar JC, Graeff FG (1983) GABA modulation of the defense reaction induced by brain electrical stimulation. *Physiol Behav* 31: 429-437.
- Shekhar A, Keim SR, Simon JR, McBride WJ (1996) Dorsomedial hypothalamic GABA dysfunction produces physiological arousal following sodium lactate infusions. *Pharmacol Biochem Behav* 55: 249-256.

- Stein MB, Tancer ME, Uhde TW (1992) Heart rate and plasma norepinephrine responsivity to orthostatic challenge in anxiety disorders. Comparison of patients with panic disorder and social phobia and normal control subjects. *Arch Gen Psychiatry* 49: 311-317.
- Van der Molen GM, Van den Hout MA, Van Dieren AC, Griez E (1989). Childhood separation anxiety and adult-onset panic disorders. *J Anxiety Disord* 3: 97-106.
- Woods SW, Charney DS, Lake J, Goodman WR, Redmond DE, Heninger GR (1986) Carbon dioxide sensitivity in panic anxiety. *Arch Gen Psychiatry* 43: 900-909.
- Zhang W, Hayward LF, Davenport PW (2007) Respiratory responses elicited by rostral versus caudal dorsal periaqueductal gray stimulation in rats. *Auton Neurosci* 134: 45-54.

RESULTADOS EXPERIMENTAIS 1

**EVIDÊNCIA DE UM SISTEMA DE ALARME DE SUFOCAMENTO
SENSÍVEL A TRATAMENTOS PANICOLÍTICOS CLINICAMENTE
EFICAZES: CLONAZEPAM E FLUOXETINA.**

1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo verificou se o modelo de ataques de pânico por infusão de KCN é sensível à hipercapnia e a panicolíticos utilizados na clínica: Clonazepam e Fluoxetina.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar os efeitos do tratamento agudo com Clonazepam sobre os comportamentos de fuga induzidos por injeções endovenosas de KCN.
2. Verificar os efeitos do tratamento crônico com Fluoxetina sobre os comportamentos de fuga induzidos por injeções endovenosas de KCN.

3 INTRODUÇÃO

Donald Klein (1993) sugeriu que o pânico clínico está ligado ao medo de asfixia produzido pelo disparo de um sistema de alarme de sufocamento. Isso resultaria em uma dispnéia súbita seguida de uma breve hiperventilação, pânico, e vontade de fugir. Klein (1993) argumenta que a hipótese do alarme falso de sufocamento é uma explicação consistente com a hipersensibilidade dos pacientes de pânico para 0,5 M de lactato de sódio e 5-7% de CO₂, de ataques de pânico durante o relaxamento, sono e de mulheres com doença disfórica pré-menstrual na fase lútea tardia, nas quais a respiração é deprimida e, inversamente, de redução de pânico durante a gravidez, parto e lactação em que a respiração é aumentada. De fato, ataques de pânico induzidos por 5-7% de CO₂ e por lactato continuam a ser os melhores modelos de pânico clínico, na medida em que eles não são precipitados em indivíduos saudáveis (Pitts e McClure, 1967; Klein, 1993) ou em pacientes com transtorno obsessivo-compulsivo (Griez e Schruers, 1998), fobia social (Liebowitz *et al.*, 1985b) e transtorno de ansiedade generalizada (Lapierre *et al.*, 1984). Além disso, enquanto o pânico induzido por lactato e CO₂ é bloqueado pelo tratamento crônico com antidepressivos tricíclicos (Rifkin *et al.*, 1981; Liebowitz *et al.*, 1985a; Woods *et al.*, 1990; Yeragani *et al.*, 1988; Gorman *et al.*, 1997), os ataques de pânico precipitados em voluntários sadios por β -carbolina e ioimbina são bloqueados por baixas doses de diazepam, mas não por tricíclicos (Dorow *et al.*, 1983; Klein, 1993). Mais recentemente, Beck e colaboradores (1999) mostraram que pacientes de pânico também são sensíveis a hypoxia. Devido ao fato da Síndrome do Pânico ser altamente comórbida com a Ansiedade de Separação na Infância, Preter e Klein (2008) expandiram a Teoria

do Alarme Falso de Sufocamento sugerindo que os ataques de pânico são resultado da disfunção de mecanismos opioidérgicos comuns a ambos os sistemas de alarme de sufocamento e de separação.

Por outro lado, estimulações elétricas e químicas da Matéria Cinzenta Periaquedutal (MCPA) produzem comportamentos defensivos em animais (Bittencourt *et al.*, 2004; Schenberg *et al.*, 2005) e sintomas e sensações aversivas em humanos (Nashold *et al.*, 1969; Young, 1989) que têm sido propostos como modelos de ataques de pânico (Deakin e Graeff, 1991; Jenck *et al.*, 1995; Schenberg *et al.*, 2001). Estas respostas semelhantes ao pânico são mais facilmente obtidas pela estimulação das colunas dorsomedial (MCPAdm), dorsolateral (MCPAdl), e lateral (MCPAl) da MCPA, geralmente denominadas de MCPA dorsal (MCPAd) (Keay e Bandler, 2004). Além disso, indivíduos que sofreram estimulações na MCPAd relataram sintomas de sufocamento semelhantes ao pânico (Nashold *et al.*, 1969; Kumar *et al.*, 1997). Notavelmente, Schimitel e colaboradores (2012) mostraram que a hipóxia citotóxica produzida por injeções intravenosas de baixas doses de cianeto de potássio (KCN) em ratos produz comportamentos defensivos semelhantes ao pânico que são bloqueados por lesões restritas à MCPAd. Adicionalmente, comportamentos semelhantes ao pânico produzidas por injeções de KCN são potencializadas por pré-exposição ao CO₂ a 8% e 13%. Portanto, Schimitel e colaboradores (2012) concluíram que a MCPAd abriga um sistema de alarme de sufocamento sensível à hipóxia, sendo que sua ativação em humanos pode desencadear um ataque de pânico espontâneo e tornar o indivíduo hiperresponsivo ao CO₂.

Pelo fato dos comportamentos defensivos produzidos pela MCPAd de ratos serem atenuados por clonazepam e fluoxetine em doses e regimes semelhantes aos utilizados na terapia da Síndrome de Pânico (Jenck et al., 1995; Schenberg et al., 2001; Vargas e Schenberg, 2001), o presente estudo examinou se os comportamentos semelhantes ao pânico produzidos pelo KCN são da mesma forma, reduzidos por tratamentos clinicamente eficazes com clonazepam e fluoxetine.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos albinos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) (n = 92), 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 maravalha. Os ratos tinham livre acesso à água e comida e eram mantidos em ambiente com ciclo de iluminação de 12 h (luzes acessas às 6:00 h) e temperatura controlada (20-25°C). Os experimentos e cuidados com os animais foram realizados de acordo com o National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications N° 80-23, 1996) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais desta universidade (CEUA-UFES, N° 079/2012).

4.2 CANULAÇÃO DA VEIA JUGULAR

Os animais eram anestesiados com cetamina (100 mg/kg, I.P.) e xilazina (10 mg/kg, I.P.) e colocados em posição supina numa mesa cirúrgica com os membros fixados. Em seguida, realizava-se uma tricotomia ao nível do pescoço, do lado direito do animal. Uma incisão de aproximadamente 1,5 cm permitia a localização e acesso à veia jugular externa. Após a dissecação e isolamento do vaso, realizava-se um pequeno orifício na veia para introdução de um cateter de silastic preenchido com solução de salina e heparina (5.000 UI/0,25

ml, Cristália, São Paulo, SP). O cateter era, então, conduzido até o átrio direito e fixado com linha de algodão. Por fim, a extremidade livre do cateter era conduzida por meio de um trocáter sob a pele da região dorsal e exposta ao nível da nuca. Após a sutura das incisões, os animais eram mantidos numa placa aquecida à 30°C até a recuperação da anestesia.

4.3 TRATAMENTOS MEDICAMENTOSOS

Os tratamentos medicamentosos eram baseados nas doses orais clinicamente eficazes para ambos clonazepam (Pollack et al., 1987; Tesar et al., 1987, 1991) e fluoxetina (Gorman et al., 1987). O clonazepam (0,01; 0,03; 0,1 e 0,3 mg/kg, n=12) era injetado intraperitonealmente 30 minutos antes da injeção intravenosa *in bolus* de KCN (80 µg/0,1 ml). A fluoxetina (1, 2 ou 4 mg/kg/dia, i.p., n=10) era injetada diariamente por 21 dias. No final do tratamento, os ratos eram implantados com um cateter intra-atrial 24 horas depois, eram injetados com KCN. Os ratos controles foram similarmente tratados com salina (1 mg/kg i.p.) e KCN.

4.4 REGISTROS COMPORTAMENTAIS

Para as injeções de KCN, os animais eram colocados numa arena de acrílico transparente, com 60 cm de altura e diâmetro, situada numa sala com som atenuado e temperatura controlada (23-25 °C). Após um período de habituação de

10 min, o KCN era administrado por meio de uma cânula de polietileno (PE10, Clay Adams, EUA) de 80 cm de comprimento, suspensa sobre a arena, permitindo a livre movimentação do animal. Os ratos eram administrados com uma dose de KCN 80 μ g (0,1 ml). Os comportamentos de fuga eram identificados conforme o Etograma de Bittencourt et al., 2004, conforme descrito abaixo:

Trote (TRT) – Locomoção rápida do animal ao longo do perímetro da arena (peritaxia) mantendo o padrão da marcha.

Galope (GLP) – Locomoção muito rápida ao longo do perímetro da arena, alternando movimentos de apoio e projeção dos membros anteriores e posteriores.

Saltos (SLT) – Impulso vertical ou oblíquo em direção à borda da arena.

Estes comportamentos eram produzidos imediatamente após a injeção de KCN e duravam não mais que 10 s. Apesar de não registrados, a fuga era acompanhada de exoftalmia (abertura ocular completa) e notável aumento na respiração. Os comportamentos eram filmados para posterior análise da duração da fuga com o auxílio de um cronômetro, por um único experimentador (F.G.S.). As medidas são a duração total das respostas de fuga observadas logo após a injeção (ou seja, predominantemente trote, menos frequentemente galope e, raramente, salto). Ao término desse experimento os animais eram sacrificados com uma sobredose de hidrato de cloral.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A duração do comportamento de fuga produzido pelo KCN foi avaliada por ANOVA de 1 via para Teste-T de Students, seguida de teste de Bonferroni para $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa estatístico SAS (Statistical Analysis System, Cary, USA).

5 RESULTADOS

5.1 EFEITOS DOS TRATAMENTOS AGUDO E CRÔNICO COM SALINA

A duração do comportamento de fuga produzido pelo KCN foi significativamente aumentada em ratos tratados durante 21 dias com salina em relação ao grupo injetado agudamente ($3,2 \pm 0,78$ vs $5,6 \pm 0,65$ s, respectively, $\Delta=74\%$, $t_{18}=2,35$; $P<0,03$) (Figuras 1-2 e Tabela 1).

5.2 EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM CLONAZEPAM SOBRE OS COMPORTAMENTOS DE FUGA PRODUZIDOS PELO KCN.

O clonazepam produziu reduções dose-dependentes significativas na duração do comportamento de fuga produzido pelo KCN ($F_{4,47}= 5,20$; $P< 0,001$) em relação aos ratos tratados com salina (Fig. 1, Tab. 1). Em particular, a fuga produzida pelo KCN foi significativamente atenuada pelas doses de clonazepam de 0,03 mg/kg ($\Delta = -74\%$, $t_{18}= 3,5$; $P< 0,001$), 0,1 mg/kg ($\Delta = -68\%$, $t_{18}= 3,3$; $P< 0,005$) e 0,3 mg ($\Delta= -74\%$, $t_{20}= 3,7$; $P< 0,001$).

Tabela 1. Efeitos das administrações agudas e crônicas de clonazepam e fluoxetina, respectivamente, sobre a duração (s) dos comportamentos de fuga induzidos por injeção intravenosa *in bolus* de KCN 80 μ g. Os valores são as medias (\pm EPM) de 10-12 ratos. * $P<0,05$, diferença significante para ratos tratados com salina (critério de 5% de Bonferroni).

Salina (aguda)	Clonazepam (mg/kg, i.p.)				Salina (crônica)	Fluoxetina (mg/kg/dia, 21 dias, i.p.)		
	0,01	0,03	0,1	0,3		1	2	4
$3,2 \pm 0,8$	$2,3 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,3^*$	$1,0 \pm 0,3^*$	$0,8 \pm 0,3^*$	$5,6 \pm 0,7$	$4,1 \pm 0,4^*$	$2,0 \pm 0,3^*$	$1,8 \pm 0,3^*$

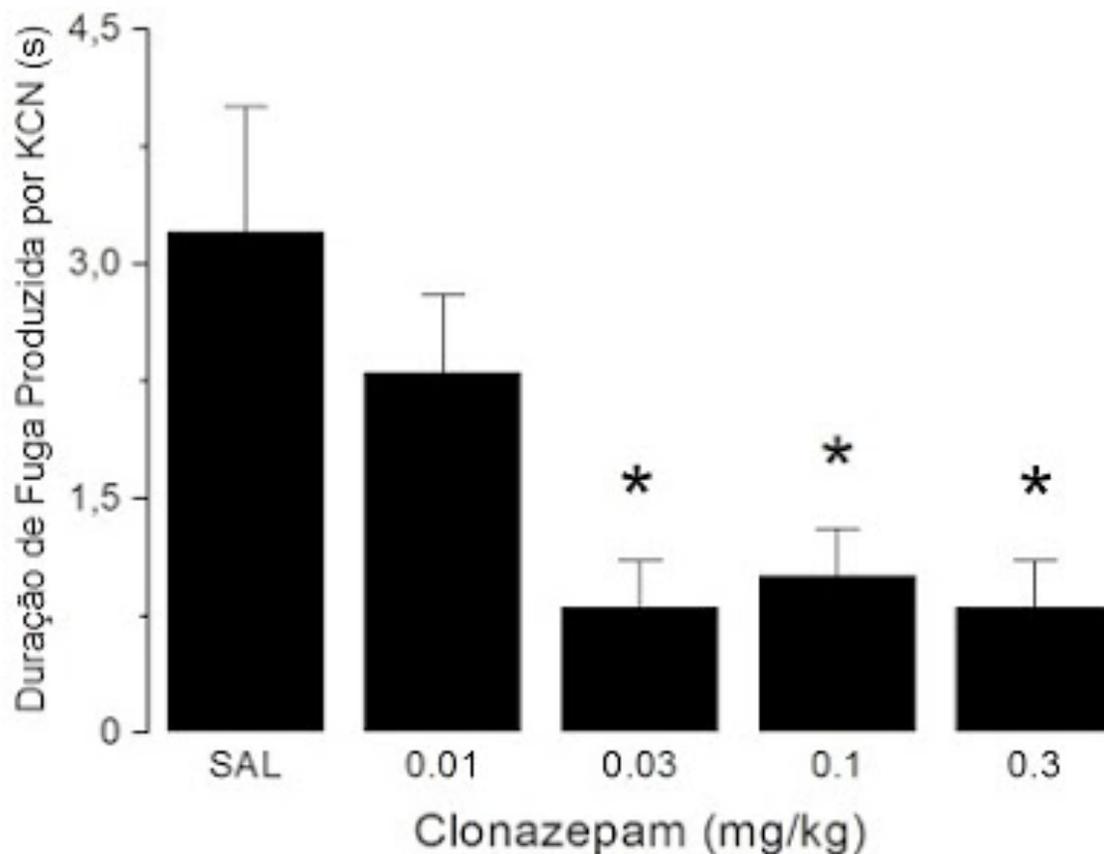


Figura 1. Efeitos agudos do Clonazepam sobre a duração das respostas de fuga (média±EPM) produzidas por injeções endovenosas de cianeto de potássio (80 µg). * diferença significativa de ratos tratados com salina (SAL) (Critério de Bonferroni para 5%, Teste-t de Student monocaudal). Abreviaturas: KCN – cianeto de potássio, SAL - salina.

5.3 EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM FLUOXETINA SOBRE OS COMPORTAMENTOS DE FUGA PRODUZIDOS PELO KCN.

Comparados aos ratos tratados cronicamente com salina, os comportamentos de fuga produzidos pelo KCN também foram significativamente atenuados de forma dose-dependente pela administração crônica de fluoxetina

($F_{3,36} = 17,34$; $P < 0,0001$) (Fig.2, Tabela 1). Portanto, a duração da fuga produzida pelo KCN foi significativamente reduzida pelos tratamentos crônicos com fluoxetina nas doses de 1 mg/kg ($\Delta = -27\%$, $t_{18} = 2,5$; $P < 0,01$), 2 mg/kg ($\Delta = -64\%$, $t_{18} = 5,9$; $P < 0,0001$) e 4 mg/kg ($\Delta = -67,5\%$, $t_{18} = 6,2$; $P < 0,0001$).

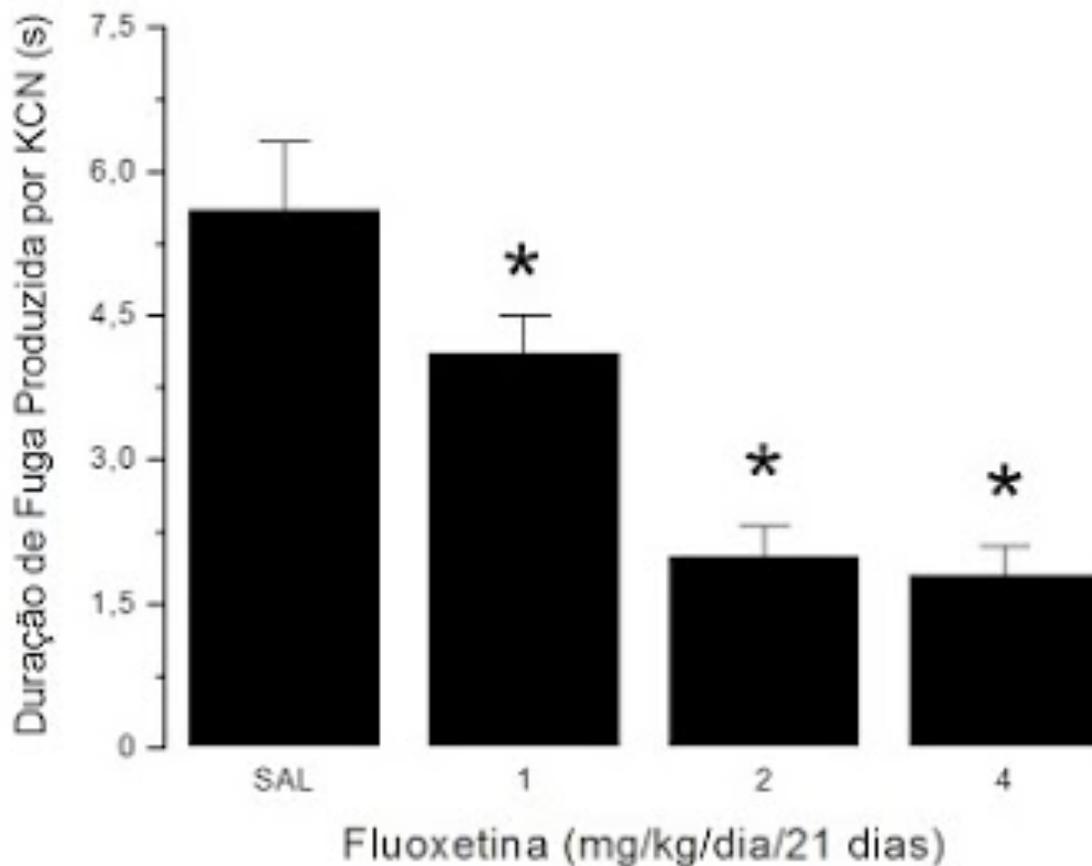


Figura 2. Efeitos crônicos da Fluoxetina sobre a duração das respostas de fuga (média±EPM) produzidas por injeções endovenosas de cianeto de potássio (80 µg). * diferença significativa de ratos tratados com salina (SAL) (Critério de Bonferroni para 5%, Teste-t de Student monocaudal). Abreviaturas: KCN – cianeto de potássio, SAL - salina.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que injeções agudas de clonazepam produzem uma atenuação significativa dose-dependente dos comportamentos de fuga produzidos por KCN em ratos. Vale ressaltar que a menor dose eficaz de clonazepam (0,03 mg/kg) foi similar à dose terapêutica oral para a síndrome do pânico (1,9 – 2,4 mg/dia) (Pollack et al., 1987; Tesar et al., 1987, 1991), apesar da via intraperitoneal e o metabolismo mais elevado do rato. Embora não possamos descartar os efeitos sedativos e relaxantes musculares conhecidos de longa data do clonazepam (Haefely et al., 1981; Tesar et al., 1991), os comportamentos de fuga produzidos pelo KCN também foram atenuados por fluoxetina administrada durante 3 semanas, em doses clinicamente eficazes, sendo este fármaco desprovido de ambos os efeitos sedativos e relaxantes musculares. Por outro lado, o tratamento crônico com solução salina produziu um aumento significativo na duração da fuga em relação ao grupo tratado de forma aguda. Por conseguinte, a atenuação dos comportamentos de fuga produzidos pelo KCN por ação da fluoxetina não pode ser atribuída à manipulação diária de ratos. Em geral, estes dados apóiam os comportamentos defensivos produzidos pelo KCN como um modelo de ataques de pânico do tipo respiratório.

Por sua vez, as evidências sugerem que comportamentos semelhantes ao pânico produzidos KCN são mediados pela MCPAd (Schimitel et al., 2012). Além disso, estudos anteriores mostraram que a estimulação elétrica da MCPAd produz comportamentos semelhantes ao pânico que são atenuados pela administração diária de fluoxetina 1mg/kg durante 3 semanas (Vargas e Schenberg, 2001;. Schenberg et al, 2001). Na clínica, os ataques de pânico são

reduzidos ou mesmo suprimidos após 6 ou 7 semanas de tratamentos com fluoxetina (Gorman et al., 1987).

Por outro lado, estudos clínicos e epidemiológicos sugerem a existência de dois tipos de ataques de pânico: respiratório e não-respiratório (Nardi *et al.*, 2003; Roberson-Nay *et al.*, 2010). Evidências crescentes sugerem ainda que a MCPAd é crucial nas respostas semelhantes ao pânico em ratos para ambos, ao predador (Canteras e Goto, 1999) e à hipóxia (Schimitel et al, 2012;. Casanova et al, 2013.). Além disso, um artigo recente relatou o efeito panicogênico do CO₂ a 35% em pacientes que são insensíveis ao medo devido a Doença de Urbach-Wiethe, nestes indivíduos aparecem extensas calcificações bilaterais da amígdala (Feinstein et al., 2013). Assim, os últimos autores concluíram que os ataques de pânico são provavelmente mediados 'no tronco cerebral ', apoiando a mediação do pânico pela MCPAd. Com efeito, os dados de imuno-histoquímica c-fos demonstraram que a MCPAd é marcadamente ativada tanto em ratos anestesiados injetados com KCN (Hayward e von Reitzenstein, 2002) quanto em ratos acordados que mostraram reações de escape a 8% de hipoxia (Casanova et al., 2013). Estes estudos apoiam Schimitel e colaboradores (2012) quanto ao fato de ambos os pânicos não-respiratório (predador) e respiratório (sufocamento) serem mediados pela MCPAdI e MCPAdII respectivamente. Com efeito, enquanto a MCPAdI parece ser uma 'coluna exteroceptiva' que processa as informações de odor e visual-acústica do hipotálamo medial (Canteras et al, 1997; Dielenberg et al, 2001) e colículo superior (King et ai, 1996; Redgrave e Dean, 1991; Bittencourt et al, 2005; Schenberg et al,

2005), respectivamente, a MCPAI parece ser uma "coluna interoceptiva" que estabelece a maioria das ligações com o bulbo, incluindo aferentes a partir do núcleo do tracto solitário e eferentes para motoneurónios respiratórios do núcleo retroambíguos (Holstege, 1991; Gerrits e Holstege, 1996;. Holstege et al, 1997). No entanto, ambas colunas projetam-se para os neurónios relacionados a fuga do núcleo cuneiforme (Keay e Bandler, 2004). Portanto, o padrão respiratório da MCPAdI (hiperventilação) e MCPAI (apneusis / dispneia) (Subramanian et al, 2008) pode corresponder a pânico distintos para ameaça proximal (Deakin e Graeff, 1991; Mobbs et al, 2007) e sufocamento (Klein, 1993), respectivamente. No entanto, embora o KCN active tanto a MCPAdI quanto a MCPAI (Hayward e von Reitzenstein, 2002), o CO₂ activa somente a MCPAI (Berquin et al, 2000; Teppema et al, 1997). Portanto, as evidências sugerem que o sistema de alarme de sufocamento esteja na MCPAI.

Em todo caso, a sensibilidade dos comportamentos semelhantes ao pânico produzidos pelo KCN aos panicolíticos clinicamente eficazes, administrados em doses e esquemas semelhantes aos da terapia da síndrome do pânico, fornece mais evidências à teoria do alarme falso de sufocamento para a síndrome do pânico (Klein, 1993).

7 REFERÊNCIAS

- Beck JG, Ohtake PJ, Shipherd JC (1999), Exaggerated anxiety is not unique to CO₂ in panic disorder: a comparison of hypercapnic and hypoxic challenges. *J Abnorm Psychol* 108: 473-482.
- Berquin P, Bodineau L, Gros F, Larnicol N (2000). Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adult rats. *Brain Res.* 857, 30-40.
- Bittencourt AS, Carobrez AP, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC (2004), Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *J Neuroscience* 125: 71-89.
- Canteras NS, Chiavegatto S, Ribeiro do Valle LE, Swanson LW (1997), Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res Bull* 44(3): 297-305.
- Canteras NS, Goto M (1999), Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a nature predator. *Neuroreport* 5(10): 413-418.
- Casanova JP, Contreras M, Moya EA, Torrealba F, Iturriaga R (2013), Effect of insular cortex inactivation on autonomic and behavioral responses to acute hypoxia in conscious rats. *Behavioural Brain Res* 253:60-67.
- Deakin JFW, Graeff FG (1991), 5-HT and mechanisms of defense. *J Psychopharmacol* 5: 305-315.

- Dielenberg RA, Hunt GE, McGregor IS (2001), "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience*. 104: 1085-1097.
- Dorow R, Horowski R, Paschelke G, Amin M (1983), Severe anxiety induced by FG 7142, a beta-carboline ligand for benzodiazepine receptors. *Lancet* 2:98-99.
- Feinstein JS, Buzza C, Hurlemann R, Follmer RL, Dahdaleh NS, Coryell WH, Welsh MJ, Tranel D, Wemmie JA (2013), Fear and panic in humans with bilateral amygdala damage. *Nat Neurosci* 16(3): 270-272.
- Gerrits PO, Holstege G (1996), Pontine and medullary projections to the nucleus retroambiguus: a wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase and autoradiographic tracing study in the cat. *J. Comp Neurol*. 373: 173-185.
- Gorman JM, Browne ST, Papp LA, Martinez J, Welkowitz L, Coplan JD, Goetz RR, Kent J, Klein DF (1997), Effect of antipanic treatment on response to carbon dioxide. *Biol Psychiatry* 42: 982-991.
- Gorman JM, Liebowitz MR, Fyer AJ, Goetz D, Campeas RB, Fyer MR, Davies SO, Klein DF (1987), An open trial of fluoxetine in the treatment of panic attacks. *J Clin Psychopharmacol* 5: 329-332.
- Griez E, Schruers K (1998), Experimental pathophysiology of panic. *J Psychosom Res* 45:493-503.
- Haefely W, Pieri L, Polc P, Schaffner R (1981), General pharmacology and neuropharmacology of benzodiazepine derivatives. In: *Handbook of*

experimental pharmacology (Hoffmeister F, Stille G, eds), pp 13-262.
Berlin: Springer.

Hayward LF, von Reitzentstein M (2002), c-Fos expression in the midbrain periaqueductal gray after chemoreceptor and baroreceptor activation. *Am J Physiol Heart Circ* 283: H1975-H1984.

Holstege G (1991), Descending pathways from the periaqueductal gray and adjacent areas. In *The midbrain periaqueductal gray matter. Functional, anatomical and neurochemical organization* (Depaulis A, Bandler R, eds), pp 239-265. New York: Plenum Press.

Holstege G, Kerstens L, Moes MC, Vanderhorst VG (1997), Evidence for a periaqueductal gray-nucleus retroambiguus-spinal cord pathway in the rat. *Neuroscience* 80: 587-598.

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: 181-191.

Keay KA, Bandler R (2004), Periaqueductal Gray. In: *The Rat Nervous System* (Paxinos G, ed.), pp. 243-257. San Diego: Elsevier.

King SM, Shehab S, Dean P, Redgrave P (1996), Differential expression of fos-like immunoreactivity in the descending projections of superior colliculus after electrical stimulation in the rat. *Behav Brain Res* 78: 131-145.

Klein DF (1993), False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. *Arch Gen Psychiatry* 50: 306-317.

- Kumar K, Toth C, Nath RK (1997), Deep brain stimulation for intractable pain: a 15-year experience. *Neurosurgery* 40: 736-46.
- Lapierre YD, Knott VJ, Gray R (1984), Psychophysiological correlates of sodium lactate. *Psychopharmacol Bull* 20:50-57.
- Liebowitz MR, Fyer AJ, Gorman JM, Dillon D, Davies S, Stein JM, Cohen BS, Klein DF (1985a), Specificity of lactate infusions in social phobia versus panic disorders. *Am J Psychiatry* 142:947-950.
- Liebowitz MR, Gorman JM, Fyer AJ, Levitt M, Dillon D, Levy G, Appleby IL, Anderson S, Palij M, Davies SO (1985b), Lactate provocation of panic attacks. II. Biochemical and physiological findings. *Arch Gen Psychiatry* 42:709-719.
- Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ, Frith CD (2007), When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science*. 317: 1079-1083.
- Nashold BS, Wilson WP, Slaughter DG (1969), Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man, *J Neurosurg* 30:14-24.
- Nardi AE, Nascimento I, Valença AM, Lopes FL, Mezzasalma MA, Zin WA, Versiani M (2003). Respiratory panic disorder subtype: acute and long-term response to nortriptyline, a noradrenergic tricyclic antidepressant. *Psychiatry Res*. 120: 283-293.
- Pitts FN, McClure JN (1967), Lactate metabolism in anxiety neurosis. *New Engl J Med* 277: 1329-1336. *Psychopharmacol Bulletin* 23(1): 141-144.

- Pollack MH, Rosenbaum JF, Tesar GE, Herman JB, Sachs GS (1987), Clonazepam in the treatment of panic disorder and agoraphobia.
- Preter M, Klein DF (2008), Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32: 603-612.
- Redgrave P, Dean P (1991), Does the PAG learn about emergencies from the superior colliculus? In: Depaulis, A., Bandler, R. (Eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter*, vol. 213. Plenum Press, New York, pp. 199-209.
- Rifkin A, Klein DF, Dillon D, Levitt M (1981), Blockade by imipramine or desipramine of panic induced by sodium lactate. *Am J Psychiatry* 138:676-677.
- Roberson-Nay R, Kendler KS (2011). Panic disorder and its subtypes: a comprehensive analysis of panic symptom heterogeneity using epidemiological and treatment seeking samples. *Psychol. Med.* 41: 2411-2421.
- Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré EC, Vargas LC (2001), Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 647-659.
- Schenberg LC, Póvoa RMF, Costa ALP, Caldellas AV, Tufik S, Bittencourt AS (2005), Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1279-1298.

- Schimitel FG, Almeida GM, Pitol DN, Armini RS, Tufik S, Schenberg LC (2012), Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience* 200:59-73.
- Subramanian HH, Balnave RJ, Holstege G (2008), The midbrain periaqueductal gray control of respiration. *J Neurosci* 28:12274-12283.
- Teppema, LJ, Veening, JG, Kranenburg, A, Dahan, A, Berkenbosch, A, Olivier, C. (1997). Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *J. Comp Neurol.* 388, 169-190.
- Tesar GE, Rosenbaum JF, Pollack MH, Herman JB, Sachs GS, Mahoney EM, Cohen LS, McNamara M, Goldstein S (1987), Clonazepam versus alprazolam in the treatment of panic disorder: interim analysis of data from a prospective, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry* 48: 16-19.
- Tesar GE, Rosenbaum JF, Pollack MH, Otto MW, Sachs GS, Herman JB, Cohen LS, Spier SA (1991), Double-blind, placebo-controlled comparison of clonazepam and alprazolam for panic disorder. *J Clin Psychiatry* 52: 69-76.
- Vargas LC, Schenberg LC (2001), Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 155: 260-268.

Wong DT, Bymaster FP (1981) Subsensitivity of serotonin receptors after long-term treatment of rats with fluoxetine. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 32: 41-51.

Woods SW, Charney DS, Delgado PL, Heninger GR (1990), The effect of long-term imipramine treatment on carbon dioxide-induced anxiety in panic disorder patients. *J Clin Psychiatry* 51:505-507.

Yeragani VK, Pohl R, Balon R, Rainey JM, Berchou R, Ortiz A (1988), Sodium lactate infusion after treatment with tricyclic antidepressants: behavioral and physiological findings. *Biol Psychiat* 24:767-774.

Young RF (1989), Brain and spinal stimulation: how and to whom! *Clin. Neurosurg.* 35: 429-447.

RESULTADOS EXPERIMENTAIS 2

**EFEITOS DO DIÓXIDO DE CARBONO SOBRE OS LIMIARES DAS
RESPOSTAS DE DEFESA INDUZIDAS PELA ESTIMULAÇÃO
ELÉTRICA DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL E
DE INJEÇÕES DE CIANETO DE POTÁSSIO EM RATOS QUE
SOFRERAM ISOLAMENTO NEONATAL.**

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo verificou se os modelos de ataques de pânico por injeção de KCN e estimulação da MCPAd são sensíveis à hipercapnia em ratos machos e fêmeas que sofreram isolamento neonatal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar os efeitos do dióxido de carbono (CO₂) sobre os limiares dos comportamentos de defesa induzidos por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos controles ou submetidos ao isolamento social neonatal (ISN).
3. Verificar as respostas de fuga à hipóxia induzida por doses subletais de cianeto de potássio, associada ou não à administração de CO₂, em ratos controles ou submetidos ao ISN.

3 INTRODUÇÃO

A Síndrome do pânico é um transtorno de ansiedade relativamente comum, com prevalência estimada entre 1% e 3% da população em geral (Brown and Barlow, 1992; Frank *et al.*, 2002; Kaufman and Charney, 2000). Estudos epidemiológicos demonstram que a ocorrência deste transtorno é 2 a 4 vezes maior em mulheres (Eaton *et al.*, 1994; Joyce *et al.*, 1989). O sintoma principal desta condição é o ataque espontâneo de pânico (AP), que pode ocorrer várias vezes ao dia ou somente algumas vezes ao ano (Mezzasalma *et al.*, 2004). Os AP são definidos no DSM-IV como um período discreto de desconforto ou medo intensos acompanhados por pelo menos 4 dos seguintes sintomas: palpitações, tremores, suores, aumento da frequência respiratória, sensação de sufocamento, medo de morrer e medo de perder a razão. Contudo, Klein (1993a,b) sugere que os sintomas cardinais dos AP sejam dispnéia, pânico, desejo de fuga e hiperventilação.

Atualmente, o TP é considerado como uma síndrome distinta tanto do transtorno de ansiedade generalizada (TAG) quanto dos outros transtornos de ansiedade (APA, 1994). Contudo, os pacientes com TP também se queixam freqüentemente de “ansiedade antecipatória”, isto é, do medo antecipado de desamparo na eventualidade de um AP, uma condição que pode agravar-se em “agorafobia” incapacitante. Adicionalmente, os AP apresentam alta comorbidade com depressão e ansiedade de separação, estados relacionados à sensação de desamparo e, indiretamente, à agorafobia (Cassano *et al.*, 1989; Klein, 1993b; Blandin *et al.*, 1994; Gorman, 1996; Gorman e Coplan, 1996; Johnson e Lydiard, 1998; Ballenger, 1998; Dunner, 1998, 2001; Kaufman e Charney, 2000).

Adicionalmente, vários estudos indicam a existência de uma forte correlação entre eventos traumáticos da infância e anormalidades comportamentais e neuroendócrinas na vida adulta (Kendler *et al.*, 1992; Furukawa *et al.*, 1999). Crianças que sofreram abusos físicos ou sexuais, ou que foram negligenciadas pelos pais, ou ainda, que vivenciaram experiências de divórcio ou privação dos cuidados maternos, podem tornar-se mais susceptíveis às psicopatologias (Bowby, 1973; Manicavasagar *et al.*, 1998; Rinne *et al.*, 2000; Heim e Nemeroff, 2001; Teicher *et al.*, 2003; Preter e Klein, 2008).

Embora a etiologia dos transtornos da ansiedade e, em particular, do transtorno do pânico (TP), seja complexa e envolva a interação de fatores biológicos e ambientais (Klauke *et al.* 2010), a ansiedade de separação na infância (ASI) parece predispor os indivíduos ao TP e à agorafobia na vida adulta (Klein e Fink, 1962; Mattis e Ollendick, 1997; Preter e Klein, 2008). De fato, segundo Rachel Klein (1995), o aumento da frequência de TP na idade adulta foi o único achado significativo no único estudo controlado de *follow-up* com entrevistas clínicas de crianças com ASI comprovada pela presença de “fobia escolar severa”.

Tanto a infusão de lactato de sódio (0,5 M, E.V.) quanto a inalação de dióxido de carbono (CO₂ 5%) precipitam ataques de pânico em pacientes predispostos a estes ataques, sendo inócuos em indivíduos sadios (Pitts e McClure, 1967; Klein, 1993a,b; Preter e Klein, 2007). Adicionalmente, pacientes com transtorno de pânico (TP) apresentam respiração irregular, incluindo hiperventilação (Klein, 1993). O TP também apresenta alta comorbidade com doenças respiratórias, tais como a asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (Preter e Klein, 2007). Pacientes que apresentam ataques de pânico ao CO₂ são,

no entanto, um subconjunto dos pacientes que respondem ao lactato (Klein, 1993b).

A dificuldade de interpretação dos estudos clínicos constitui um forte ensejo para o desenvolvimento de um modelo experimental de ataque de pânico em animais. Neste sentido, as respostas à estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) têm sido propostas como um modelo experimental de ataque de pânico (Gentil, 1988; Deakin e Graeff, 1991; Jenck et al., 1995; Schenberg et al., 2001). De fato, Nashold e colaboradores (1969) mostraram que a estimulação intracraniana do teto do mesencéfalo de humanos produz ansiedade, pânico, terror e sentimentos de morte iminente acompanhados por sinais neurológicos e respostas viscerais que reproduzem os sintomas cardinais dos ataques de pânico. A localização dos eletrodos por raio-X mostrou que os sítios eficazes encontravam-se na metade dorsal da MCPA (MCPAd).

Em ratos, a estimulação da MCPAd com estímulos de baixa magnitude produz uma reação de imobilidade tensa e exoftalmia. Em contraste, estímulos mais intensos produzem comportamento de fuga compreendendo galopes e saltos (Bittencourt et al., 2004; Schenberg et al., 2005). Mais importante, a resposta de galope foi seletivamente atenuada por antidepressivos em doses e regime de administração similares aos empregados na terapia do TP (Schenberg et al., 2001, 2002; Vargas e Schenberg, 2001). Conseqüentemente, o galope foi sugerido como a resposta mais representativa dos ataques de pânico (Schenberg et al., 2001).

Por outro lado, estudos com imunistoquímica da proteína c-fos mostraram que a atividade da MCPA de ratos e gatos é alterada na hipóxia,

hipercapnia ou hipóxia hipercápica (Teppema et al., 1997; Berquin et al., 2000). Em adição, Hayward e Von Reitzenstein (2002) verificaram que o KCN ativa a MCPAd, indicando a participação desta estrutura nos respostas, tanto comportamentais quanto viscerais, à hipóxia. Contudo, enquanto o KCN produz a ativação da MCPAd, o CO₂ ativa os distritos caudais da MCPA ventrolateral (MCPAvl). Estes dados sugerem que a MCPA possa ser o monitor de sufocamento que é disparado erroneamente durante os ataques de pânico (Klein, 1993b; Preter e Klein, 2007). Conseqüentemente, o presente estudo examinou os efeitos comportamentais da inalação de CO₂ anteriormente à estimulação elétrica da MCPAd.e à infusão de KCN, um modelo de hipóxia citotóxica (Sato et al., 1991; Barros et al., 2002), em ratos adultos, machos e fêmeas, que foram submetidos à privação materna parcial (3 h) durante o período de amamentação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Ratas Wistar prenhes, nulíparas, fornecidas pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas foram mantidas numa sala com temperatura controlada de aproximadamente 23 °C e ciclo claro-escuro (12 X 12 h, luzes acesas às 6:00 h). As ratas foram alojadas individualmente em gaiolas de polietileno medindo 49 cm x 34 cm x 16 cm (caixa ninho), com água e comida à vontade. No 1º dia pós-natal (P1) foi feita a sexagem para a padronização das ninhadas (máximo de 8 animais). Os procedimentos foram aprovados e realizados de acordo com o comitê de ética no uso de animais (CEUA-UFES PROTOCOLO 079/2012).

4.2 PROCEDIMENTOS

Neste estudo foram utilizados 80 animais, dos quais 40 foram submetidos a separação materna, grupo separado (SP) e 40 permaneceram com suas mães, grupo não separado (NS), de P2 a P21. Em P50, as fêmeas foram submetidas a ovariectomia, para remoção dos efeitos da variação hormonal, e a partir de P60 os animais foram submetidos à cirurgia de implantação de eletrodos na MCPAd. Os ratos foram submetidos à estimulação elétrica e injeções endovenosas de KCN, na presença e ausência de 8% e 13% de CO₂. Por fim, todos os ratos foram perfundidos para a retirada dos cérebros para análise microscópica. Nas fêmeas, retirou-se o útero para a medida da massa.

4.3 ISOLAMENTO MATERNO NEONATAL

Em P2, os filhotes eram marcados no dorso com uma caneta dermográfica (Texta Fineline 700) para a distinção dos grupos SP e NS, sempre da mesma prole. Durante o procedimento de separação maternal, os ratos SP eram acomodados individualmente em caixas de separação (30 x 20 x 13 cm) e os ratos NS eram transportados com a mãe para uma nova caixa ninho, doravante chamada caixa controle. Adicionalmente, o cheiro e a comunicação com a mãe eram atenuados colocando-se as caixas de separação em um compartimento fechado (49 x 66 x 96 cm) com uma pequena abertura para ventilação (10 x 10 cm).

O isolamento maternal foi realizado por 3 horas, entre 12 h e 16 h, de P2 a P21. Ao término das sessões de separação, os animais retornavam para a caixa ninho. O grupo NS foi manipulado de forma semelhante durante todo o processo com as mães para a caixa controle e o retorno para a caixa ninho. Após o desmame, os ratos SP e NS eram alojados em suas respectivas gaiolas, em grupos de 2 a 4 animais, com água e comida *ad libitum*.

4.4 OVARECTOMIA

As fêmeas em P50 eram anestesiadas com cetamina (100 mg/kg i.p., Vetbrands) e xilazina (10 mg/kg i.p., Vetbrands). A ovariectomia era realizada bilateralmente. A cirurgia consistia de uma incisão perpendicular de 1 a 1,5 cm na pele entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha mediana, seguida de outra

incisão na camada muscular para exposição da cavidade peritoneal. Posteriormente era realizada a ligadura da tuba uterina e remoção dos ovários. A cavidade peritoneal era então suturada e limpa. Ao final, realizava-se o tratamento profilático com 24.000 UI de penicilina-G benzatina (i.m.) e eram mantidos em placa aquecida à 30° C até a recuperação, em seguida eram colocados em gaiolas individuais.

4.5 ELETRODO

Os eletrodos eram confeccionados com um fio de aço inoxidável (Califórnia Fine Wire Company, Grover City, CA, EUA) de 250 µm de diâmetro externo e isolado em toda extensão, exceto na secção transversal de sua extremidade. Um outro fio de aço inoxidável, não isolado, servia como eletrodo indiferente. Os eletrodos eram soldados a um soquete de circuito integrado (Celis, BCPT 50, São Paulo, SP, Brasil).

4.6 IMPLANTAÇÃO DOS ELETRODOS

Os animais eram anestesiados com cetamina (100 mg/kg i.p., Vetbrands) e xilazina (10 mg/kg i.p., Vetbrands) e fixados num aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, EUA) com o bregma e lambda no mesmo plano. A perda de temperatura corporal era minimizada envolvendo-se o animal com uma manta. Após a infusão subcutânea com 0,2 ml Lidocaína (1%, CEME,

São Paulo,SP) e a exposição da calota craniana à altura do lambda, procedia-se à raspagem, limpeza e secagem da área. Em seguida, eram feitos 4 orifícios com o auxílio de uma broca odontológica, 2 nos ossos parietais e 2 no interparietal, para fixação de pequenos parafusos de aço inoxidável que serviam de âncora para a prótese cirúrgica. O eletrodo era implantado no lado direito, obliquamente (15°) nas coordenadas: ântero-posterior = 7,8 mm; lateral = 2,0 mm e vertical = 5,0 mm a partir do bregma. A resistência à penetração do eletrodo era reduzida por meio de uma pequena incisão na dura-máter, realizada com o auxílio de uma agulha hipodérmica. Após a implantação do eletrodo ativo, o eletrodo indiferente era soldado a um dos parafusos e o campo cirúrgico era preenchido com resina acrílica autopolimerizável (JET, São Paulo, BRI) para formar uma prótese sólida. Um tubo plástico com 2,0 cm de altura e 1,0 cm de diâmetro ao redor da região cirúrgica servia de proteção do eletrodo. Ao término da cirurgia os animais receberam tratamento profilático com 24.000 UI de penicilina-G benzatina (I.M.) e eram mantidos em placa aquecida à 30° C até a recuperação.

4.7 CANULAÇÃO DA VEIA JUGULAR

Os animais eram anestesiados com cetamina (100 mg/kg i.p., Vetbrands) e xilazina (10 mg/kg i.p., Vetbrands) e colocados em posição supina numa mesa cirúrgica com os membros fixados. Em seguida, realizava-se uma tricotomia ao nível do pescoço, do lado direito do animal. Uma incisão de aproximadamente 1,5 cm permitia a localização e acesso à veia jugular externa.

Após a dissecação e isolamento do vaso, realizava-se um pequeno orifício na veia para introdução de um cateter de silastic preenchido com solução de salina e heparina (5.000 UI/0,25 ml, Cristália, São Paulo, SP). O cateter era, então, conduzido até o átrio direito e fixado com linha de algodão. Por fim, a extremidade livre do cateter era conduzida por meio de um trocáter sob a pele da região dorsal e exposta ao nível da nuca. Após a sutura das incisões, os animais eram mantidos numa placa aquecida à 30°C até a recuperação da anestesia.

4.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Experimento 1: Efeitos do CO₂ sobre os limiares dos comportamentos de defesa induzidos por estimulação elétrica da MCPAd. Dez dias após a cirurgia de implantação do eletrodo, os ratos (n=80) eram colocados numa câmara gasosa situada numa sala com som atenuado e temperatura controlada (23-25°C) e conectados a um estimulador de onda senoidal (60 Hz) de corrente constante (FDV, Ribeirão Preto, SP, BR). Os estímulos eram monitorados através de um osciloscópio (Hitachi-Denshi, Malásia) e aplicados por meio de um conector giratório de mercúrio que permitia a livre movimentação dos animais. Após um período de habituação de 10 min, os ratos eram submetidos a sessões de estimulação em ar ambiente ou após a administração de CO₂ 8% e 13%. As sessões eram realizadas em intervalos de 24 h, segundo um desenho balanceado. Estímulos de 30 s de duração eram aplicados em intensidades crescentes, em passos de 5 μ A, até a produção das respostas de galope e/ou

salto, ou até corrente máxima de 80 μ A. O intervalo entre estímulos foi de 2 min até a apresentação da primeira resposta de defesa e, subsequentemente, de 5 min. Após o término de cada estímulo, o sistema de exaustão era acionado para renovação do ar.

Experimento 2: Efeitos comportamentais da administração endovenosa de KCN e exposição ao CO₂ a 8% e 13%. No dia seguinte à cirurgia de implantação da cânula jugular, os animais (n=40) eram colocados numa arena de acrílico transparente, com 60 cm de altura e diâmetro, situada numa sala com som atenuado e temperatura controlada (23-25 °C). Após um período de habituação de 10 min, o KCN era administrado por meio de uma cânula de polietileno (PE10, Clay Adams, EUA) de 80 cm de comprimento que permitia a livre movimentação do animal. Os ratos eram administrados diariamente com uma única dose de KCN 40 μ g (0,1 ml) em ar ambiente, CO₂ 8% e 13%, num intervalo de 24 horas, segundo desenho balanceado. Os comportamentos eram filmados para análise posterior. Ao término desse experimento os animais eram perfundidos com salina e formaldeído para preparação de lâminas histológicas do cérebro.

4.9 REGISTROS COMPORTAMENTAIS

Os comportamentos dos animais eram avaliados por observação direta do experimentador, posicionado a aproximadamente 50 cm da câmara de gás ou da arena de estimulação. As respostas limiáres, isto é, aquelas emitidas com as menores intensidades de corrente eram registradas de modo binário,

como ‘emitidas’ ou ‘não’, independentemente de sua frequência ou duração durante a estimulação elétrica. Os comportamentos defensivos foram identificados de acordo com o etograma abaixo (Bittencourt et al., 2004).

- 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 (IMO) – 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 (TRT) – Locomoção rápida do animal ao longo do perímetro da arena (peritaxia) mantendo o padrão da marcha.

Galope (GLP) – Locomoção muito rápida ao longo do perímetro da arena, alternando movimentos de apoio e projeção dos membros anteriores e posteriores.

Saltos (SLT) – Impulso vertical ou oblíquo em direção à borda da arena.

Exoftalmia (EXO) – Abertura máxima dos olhos que assume a forma esférica e cor brilhante, presumivelmente, devida a uma maior entrada de luz.

Defecação (DEF) – Eliminação de fezes.

Micção (MIC) – Eliminação de urina.

4.10 HISTOLOGIA

Ao término da estimulação química com KCN os animais eram anestesiados por via intraperitoneal com sobredose hidrato de cloral (800 mg/kg) e perfundidos por via intracardíaca por meio de uma bomba peristáltica (Masterflex CE, Barrington, IL, EUA), com 200 ml de solução salina (NaCl 0,9%) seguidos por 200 ml de solução de formaldeído (10%). Os ratos eram decapitados e as cabeças

eram armazenadas em formaldeído por, no mínimo, 5 dias, para a moldagem do trato do eletrodo. Em seguida, os cérebros eram removidos e mantidos em solução de formaldeído por mais 5 dias. Após isto, os cérebros eram preparados em blocos mesencefálicos, posicionados no criostato (Leica CM1850, Wetzlar, Germany) e seccionados em cortes de 40 µm de espessura. Os cortes eram então estendidos em lâminas gelatinizadas, desidratados, corados com vermelho neutron e montados com DPX (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, EUA). Os sítios das estimulações foram identificados, fotografados por microscopia de baixo aumento (Leica DM2500 acoplado a uma câmera DFC 300 FX, Wetzlar, Germany), e registrados em diagramas coronais do encéfalo do rato do atlas de Paxinos e Watson (1998).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Determinação das curvas de resposta à estimulação elétrica: As curvas intensidade foram obtidas pelo ajuste logístico das freqüências acumuladas das respostas limiares em função do logaritmo da intensidade de corrente 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 j ésima curva da estimulação da MCPAD (comparação entre as curvas controle, CO₂ 8% e CO₂ 13%). Ajustes logísticos significantes foram avaliados pelo χ^2 de Wald ($\chi^2_w = [\beta/EP]^2$), onde EP 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 modelos reduzidos ($k-r$ parâmetros), proporcionando valores de χ^2 com r graus de liberdade (χ^2_r). Os χ^2_r testes gerais de locação e paralelismo, 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. O ajuste por máxima verossimilhança foi realizado pelo procedimento “Logistic” do programa SAS (SAS®, Cary, EUA).

As medianas ($M_{50} = I_{50}$ ou DE_{50}) assim como seus respectivos erros padrões (EP) e o intervalo de confiança (IC95%) foram computados pelas fórmulas que se seguem:

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

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

$$\text{EP}\{\text{Log}(M_{50})\} = \{[\text{Var}(\alpha) - 2(\alpha/\beta)\text{Cov}(\alpha, \beta) + (\alpha/\beta)^2\text{Var}(\beta)] / \beta^2\}^{1/2}$$

$$\text{EP}(M_{50}) = M_{50}\{\text{EP}[\text{Log}(M_{50})]\}$$

$$\text{IC95\%}(M_{50}) = M_{50} \pm 1,96\{\text{EP}(M_{50})\}$$

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 (2003).

Análise dos efeitos da injeção de KCN: os efeitos do KCN foram avaliados por análise de variância de 2 vias (sexo e privação), para medidas repetidas (ar ambiente, 8% e 13% de CO₂), seguida de teste de Bonferroni para $P < 0,05$.

5 RESULTADO

5.1 EFEITOS DO SEXO E ISOLAMENTO SOBRE OS LIMIARES DAS RESPOSTAS DEFENSIVAS À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MCPAd EM AR AMBIENTE.

Em ratos machos, a separação causou reduções significativas dos limiares medianos de galope e micção (Tabela 2). Em geral, as fêmeas ovariectomizadas apresentaram limiares maiores que aqueles dos machos, separados ou não separados.

Tabela 2. Limiares medianos das respostas de defesa ($I_{50} \pm EP$, μA) à estimulação da MCPAd de ratos machos ou de fêmeas ovariectomizadas, submetidos ou não ao isolamento social neonatal. *, + Valores significativamente diferentes dos ratos machos para uma mesma resposta, ou dos grupos não-separados, respectivamente (critério de 5% de Bonferroni para testes de qui-quadrado da razão de verossimilhanças das curvas de limiares).

	Sexo	Não-separado	Separado	
Imobilidade	M	22,5 ± 0,2	32,6 ± 0,2	
	F	27,3 ± 0,3	25,5 ± 0,2	*
Exoftalmia	M	17,8 ± 0,2	14,5 ± 0,4	
	F	18,4 ± 0,2	18,1 ± 0,2	
Trote	M	31,3 ± 0,2	27,9 ± 0,2	
	F	38,1 ± 0,2	35,2 ± 0,2	* *
Galope	M	37,5 ± 0,2	32,6 ± 0,2	+
	F	48,4 ± 0,2	44,2 ± 0,2	* *
Salto	M	55,2 ± 1,6	57,7 ± 0,9	
	F	61,4 ± 2,4	85,1 ± 4,6	*
Micção	M	232,8 ± 72	72,7 ± 9,2	+
	F	41,9 ± 0,1	44,4 ± 0,1	* *
Defecação	M	61,1 ± 7,7	64,6 ± 10	
	F	45,2 ± 0,3	59,0 ± 1,3	* *

Nos grupos não-separados, as fêmeas apresentaram limiares maiores para trote, galope e micção. Nos grupos separados, os limiares das fêmeas foram mais elevados para imobilidade, trote, galope e salto.

5.2 EFEITOS DO CO₂ SOBRE OS LIMIARES DOS COMPORTAMENTOS DE DEFESA INDUZIDOS POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MCPAd

Como o paralelismo das curvas de limiares não diferiu nem quanto ao sexo, nem quanto à separação materna, para uma dada resposta, somente serão apresentadas as diferenças de locação das curvas de limiares.

As curvas de limiares das fêmeas não-separadas somente diferiram para defecação ($\chi^2= 9,5$; 2 g.l.; $P<0,01$). Em contraste, as fêmeas separadas diferiram para imobilidade ($\chi^2= 14,6$; 2 g.l., $P<0,001$), defecação ($\chi^2= 48,5$; 2 g.l., $P<0,0001$), micção ($\chi^2= 6,4$; 2 g.l., $P<0,05$), trote ($\chi^2= 17,2$; 2 g.l., $P<0,0005$), galope ($\chi^2= 19,8$; 2 g.l., $P<0,0005$) e salto ($\chi^2= 17,6$; 2 g.l., $P<0,0005$).

Exceto pela resposta de salto, as curvas de limiares dos machos não-separados também diferiram para imobilidade ($\chi^2= 24,8$; 2 g.l., $P<0,0001$), exoftalmia ($\chi^2= 24,8$; 2 g.l., $P<0,0001$), defecação ($\chi^2= 37,7$; 2 g.l., $P<0,0001$), micção ($\chi^2= 65,8$; 2 g.l., $P<0,0001$), trote ($\chi^2= 31,5$; 2 g.l., $P<0,0001$) e galope ($\chi^2= 30,5$; 2 g.l., $P<0,0001$). De forma similar, machos separados apresentaram limiares significativamente diferentes para imobilidade ($\chi^2= 21,7$; 2 g.l., $P<0,0001$), exoftalmia ($\chi^2= 9,1$; 2 g.l., $P<0,01$), defecação ($\chi^2= 68,1$; 2 g.l., $P<0,0001$), micção

($\chi^2 = 30,7$; 2 g.l., $P < 0,0001$), trote ($\chi^2 = 23,0$; 2 g.l., $P < 0,0001$) e galope ($\chi^2 = 23,8$; 2 g.l., $P < 0,0001$).

As variações percentuais da I_{50} em relação aos limiares dos comportamentos de defesa em ar-ambiente estão ilustradas na Figura 3.

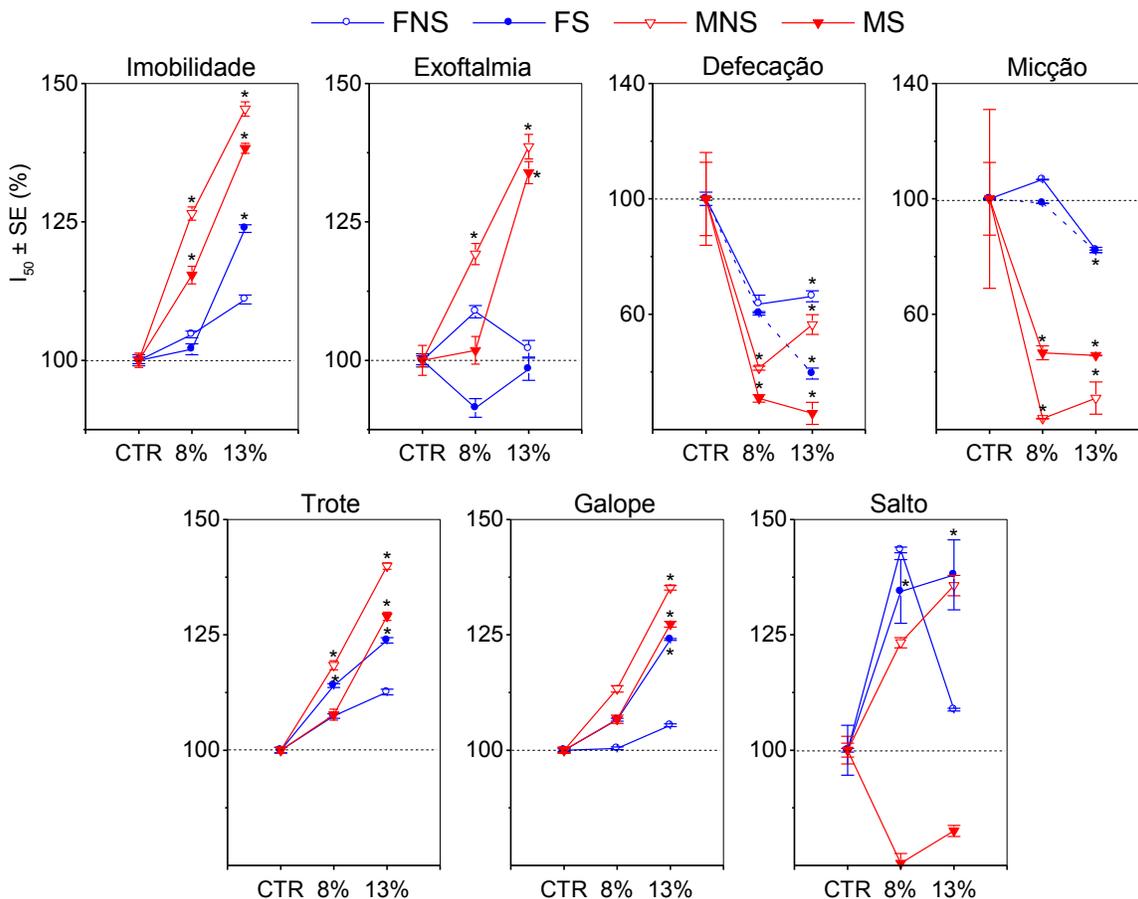


Figura 3. Efeitos percentuais do CO₂ sobre os limiares medianos (I_{50}) das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPAd. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle em ar ambiente (teste do χ^2 da razão de verossimilhanças, critério de Bonferroni para $P < 0,05$).

Em geral, o CO₂ produziu aumentos dose-dependentes dos limiares medianos das respostas de imobilidade, exoftalmia, trote, galope e saltos e reduções dose-dependentes dos limiares de defecação e micção. Contudo, as ratas foram menos sensíveis a estes efeitos. Em particular, o CO₂ não teve efeito

algum nem nos limiares de exoftalmia, nem de micção das fêmeas. Adicionalmente, enquanto os limiares de imobilidade, trote e galope das fêmeas separadas foram significativamente aumentados na maior concentração de CO₂, estas respostas não foram alteradas nas fêmeas não-separadas. Portanto, as últimas respostas parecem ser especificamente facilitadas pela separação maternal em fêmeas. Curiosamente, a resposta de salto foi atenuada em todos os grupos exceto nos machos separados, nos quais ela foi facilitada, embora não significativamente, para ambas as concentrações de CO₂.

5.3 EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA EXPOSIÇÃO AO CO₂ (8% E 13%), SEXO E ISOLAMENTO MATERNO SOBRE A DURAÇÃO DA RESPOSTA DE FUGA AO KCN.

A ANOVA para medidas repetidas mostrou um efeito dose-dependente da concentração de CO₂ ($F_{2,36} = 24,3$; $P < 0,0001$). Não houve interações significantes entre as concentrações de CO₂ com sexo, isolamento maternal ou ambos.

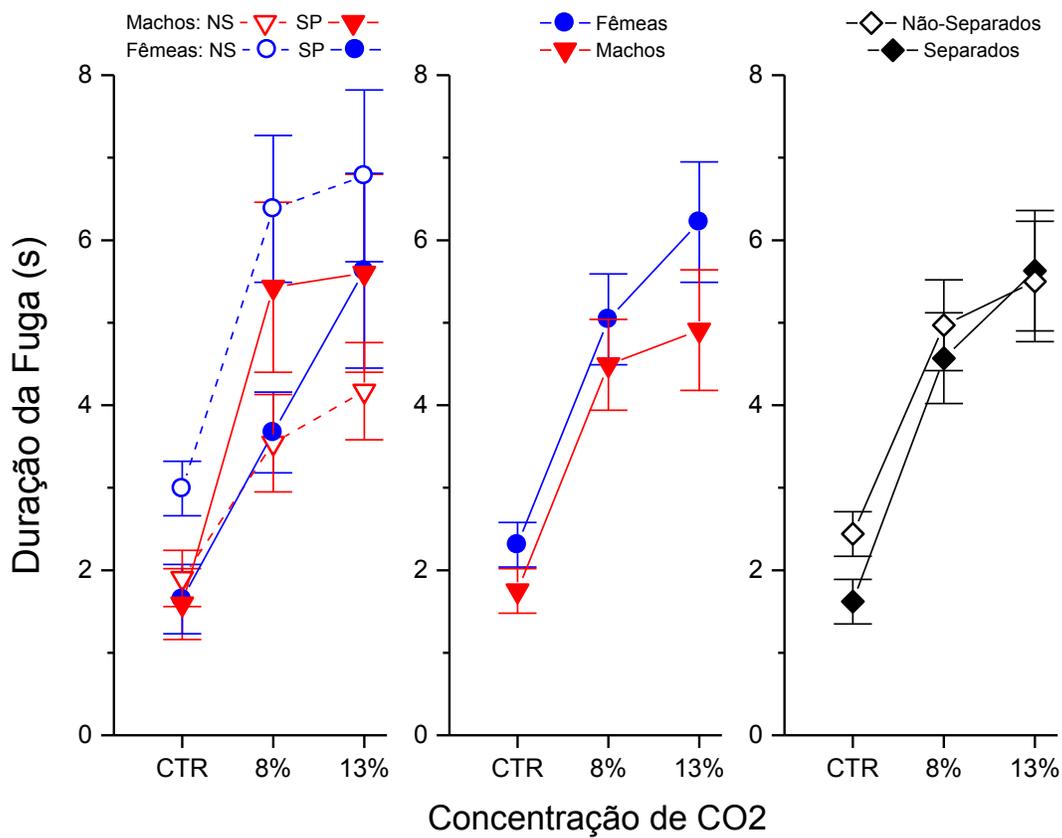


Figura 4. Efeitos do CO₂, sexo e isolamento maternal sobre a duração das respostas de fuga à injeção endovenosa de KCN. NS – não separado, SP – separado. O CO₂ apresentou efeitos dose-dependentes para todos os grupos.

6 DISCUSSÃO

Efeitos do isolamento social neonatal e do sexo sobre os limiares das respostas de defesa à estimulação elétrica da MCPD

O ISN causou uma redução significativa e bastante seletiva das respostas de galope e micção dos ratos machos. Este resultado é notável uma vez que o galope parece ser a resposta que melhor representa os ataques de pânico (Schenberg et al., 2001). Por outro lado, um estudo recente de Quintino-dos-Santos e colaboradores (2014) mostrou que o ISN facilita todas as respostas de defesa, exceto a defecação e micção. Os efeitos menores do presente estudo podem ser devidos tanto ao período vespertino da separação, quanto à técnica cirúrgica menos agressiva (sem trepanação). Se este for caso, o ISN interage com o estresse na vida adulta na facilitação dos ataques de pânico.

Em geral, as fêmeas ovariectomizadas apresentaram limiares de resposta significativamente maiores que os machos, tanto separados quanto não separados. Estes resultados sugerem que a maior incidência de pânico em mulheres é devida à ação dos hormônios sexuais, e não a diferenças estruturais dos sistemas cerebrais que medeiam os ataques de pânico,

Efeitos do CO₂ sobre os limiares das respostas de defesa à estimulação elétrica da MCPD

Comparados aos efeitos basais, o CO₂ teve efeitos diferenciados sobre as respostas de defesa, produzindo aumentos dose-dependentes dos limiares de imobilidade, exoftalmia, trote, galope e saltos e reduções dose-

dependentes dos limiares de defecação e micção. Estes resultados são similares aos observados anteriormente em ratos machos intactos e não-separados (Schimitel e col., 2012). Contudo, o presente estudo mostrou que as ratas foram menos sensíveis aos efeitos inibitórios do CO₂. Em particular, o CO₂ não apresentou efeitos inibitórios significantes nas respostas de trote e, mais notavelmente, de galope, das ratas não-separadas, que têm sido consideradas os comportamentos mais representativos dos ataques de pânico (Schenberg e col., 2001). ratas não-separadas não apresentaram. Adicionalmente, enquanto os limiares de imobilidade, trote e galope das fêmeas separadas foram significativamente aumentados na maior concentração de CO₂, estas respostas não foram alteradas nas fêmeas não-separadas. Portanto, as últimas respostas parecem ser especificamente facilitadas pela separação maternal em fêmeas. Curiosamente, a resposta de salto foi atenuada em todos os grupos exceto nos machos separados, nos quais ela foi facilitada, embora não significativamente, para ambas as concentrações de CO₂.

Efeitos comportamentais da exposição ao CO₂ (8% e 13%), sexo e separação materna sobre a duração da resposta de fuga ao KCN.

Os resultados mostraram um efeito dose-dependente da concentração de CO₂, este efeito é semelhante ao observado por Schimitel e colaboradores (2012), comprovando um aumento na duração da fuga ao KCN

quado associado à exposição prévia ao CO₂. Não houve interações significantes entre as concentrações de CO₂ com sexo, isolamento maternal ou ambos.

Portanto, estes estudos vem corroborar a existência de um alarme de sufocamento na MCPA que medeia os ataques de pânico em ratos.

7 REFERÊNCIAS

- APA (1994) Diagnostic and statistical manual for mental disorders (DSM-IV).
American Psychiatric Association Press, Washington DC.
- Ballenger JC (1998) Comorbidity of panic and depression: implications for clinical management. *Int. Clin. Psychopharm*, 13(Suppl 4), S13–S17.
- Barros RC, Bonagamba LG, Okamoto-Canesin RM, Branco LG, Machado BH (2002) Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Auton Neurosci* 97: 110-115.
- Berquin P, Bodineau L, Gros F, Larnicol N (2000) Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adults rats. *Brain Res* 857: 30-40.
- Bittencourt AS, Carobrez AP, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC (2004) Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *J Neuroscience* 125: 71-89.
- Blandin N, Parquet PJ, Bailly D (1994) Separation anxiety. Theoretical considerations. *Encephale* 20: 121-129.
- Bowlby J (1973) *Attachment and Loss*. 2nd ed. Basic Books, New York, NY.
- Brown TA and Barlow DH (1992). Comorbidity among anxiety disorders: implications for treatment and DSM-IV. *J Consult Clin Psychol* 60: 835-844.
- Cassano GB, Perugi G, Musetti L, Akiskal HS (1989). The nature of depression presenting concomitantly with panic disorder. *Comp Psychiatry* 30: 473-482.

- Collett D (2003) Modelling binary data. Chapman and Hall/CRC, Florida.
- Deakin JFW, Graeff FG (1991) 5-HT and mechanisms of defense. *J Psychopharmacol* 5: 305-315.
- Dunner DL (1998). The issue of comorbidity in the treatment of panic. *Int Clin Psychopharmacology* 13 Suppl 4: S19-24.
- Dunner DL (2001). Management of anxiety disorders: the added challenge of comorbidity. *Depress Anxiety* 13: 57-71.
- Eaton WW, Kessler RC, Wittchen HU, Magee WJ (1994). Panic and panic disorder in the United States. *Am J Psychiatry* 151: 413-20.
- Frank E, Cyranowski JM, Rucci P, Shear MK, Fagiolini A, Thase ME, Cassano GB, Grochocinski VJ, Kostelnik B, Kupfer DJ (2002). Clinical significance of lifetime panic spectrum symptoms in the treatment of patients with Bipolar I Disorder. *Arch Gen Psychiatry* 59: 905-911.
- Furukawa T, Yokouchi T, Hirai T, Kitamura T, Takahashi K (1999). Parental loss in childhood and social support in adulthood among psychiatric patients. *J Psychiat Res* 33: 165-169.
- Gentil V (1988) The aversive system, 5-HT and panic attacks. In: *Animal Models of Psychiatric Disorders* (Simon P, Soubrié P, Wildlocher D, ed), Karger, Basel 142-145.
- Gorman JM (1996) Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. *Depress. Anxiety*, 4, 160–168.
- Gorman JM & Coplan JD (1996) Comorbidity of depression and panic disorder. *J. Clin. Psychiat*, 57(Suppl 10), 34–41.

- Hayward LF, Von Reitzentstein M (2002) c-Fos expression in the midbrain periaqueductal gray after chemoreceptor and baroreceptor activation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 283: H1975-H1984.
- Heim C and Nemeroff CB (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 49: 1023-1039.
- 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: 181-191.
- Johnson MR and Lydiard RB (1998). Comorbidity of major depression and panic disorder. *J Clin Psychol* 54: 201-210.
- Joyce PR, Bushnell JA, Oakley-Browne MA, Wells JE, Hornblow AR (1989). The epidemiology of panic symptomatology and agoraphobic avoidance. *Compr Psychiatry* 30: 303-312.
- Kaufman J and Charney D (2000). Comorbidity of mood and anxiety disorders. *Depress Anxiety* 12: 69-76.
- Kendler KS, Neale MC, Kessler RC, Heath AC, Eaves LJ (1992). Childhood parental loss and adult psychopathology in women. A twin study perspective. *Arch Gen Psychiatry* 49: 109-116.
- Klauke B, Deckert J, Reif A, Pauli P, Domschke K (2010). Life events in panic disorder – an update on “candidate stressors”. *Depress Anxiety* 27: 716-730.

- Klein DF (1993a) Panic may be a misfiring suffocation alarm. In: The psychopharmacology of panic (Montgomery SA). Oxford University Press, New York, 67-73.
- Klein DF (1993b) False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. *Arch Gen Psychiatry* 50: 306-317.
- Klein DF and Fink M (1962). Psychiatric patterns to imipramine. *Am J Psychiat* 119: 432-438.
- Klein R (1995). Is panic disorder associated with childhood separation anxiety disorder. *Clin Neuropsychopharmacology* 18 (Suppl 2):7-14.
- Manicavasagar V, Silove D, Hadzi-Pavlovic D (1998). Subpopulations of early separation anxiety: relevance to risk of adult anxiety disorders. *J Affect Disorders* 48: 181-190.
- Mattis SG and Ollendick TH (1997). Children's cognitive responses to the somatic symptoms of panic. *J Abnorm Child Psychol* 25: 47-57.
- Mezzasalma MA, Valença AM, Lopes FL, Nascimento I, Zin WA, Nardi AE (2004). Neuroanatomy of panic disorder. *Rev Bras Psiquiatr* 26: 202-6.
- Overstreet DH (1993). The Flinders sensitive line rats: a genetic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 17: 51-68.
- Nashold Jr. BS, Wilson WP, Slaughter DG (1969) Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30: 14-24.
- Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. 2 ed, San Diego: Academic Press.

- Pitts FN, McClure JN (1967) Lactate metabolism in anxiety neurosis. *New Engl J Med* 277: 1329-1336.
- Preter M, Klein DF (2008) Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*.
- Quintino-dos-Santos JW, Muller CJT, Santos AMC, Tufik S, Rosa CA, Schenberg LC. (2013) Long-lasting marked inhibition of periaqueductal gray- evoked defensive behaviors in inescapably-shocked rats. *European Journal of Neuroscience* 38: 1-12.
- Rinne T, Westenberg HGM, den Boer JA, van den Brink W (2000). Serotonergic blunting to meta-chlorophenylpiperazine (m-CPP). highly correlates with sustained childhood abuse in impulsive and autoaggressive female borderline patients. *Biol Psychiatry* 47: 548-556.
- Sato M, Ikeda K, Yoshizaki K, Koyano H (1991) Response of cytosolic calcium to anoxia and cyanide in cultured glomus cells os newborn rabbit carotid body. *Brain Res* 551: 327-330
- Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré EC, Vargas LC (2001) Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 647-659.
- Schenberg LC, Capucho LB, Vatanabe RO, Vargas LC (2002) Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 159: 138-144.

Schenberg LC, Póvoa RMF, Costa ALP, Caldellas AV, Tufik S, Bittencourt AS (2005) Functional specializations within the tectum defense systems of the rat *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1279-1298.

Schimitel FG, Almeida GM, Pitol DN, Armini RS, Tufik S, Schenberg LC (2012), Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience* 200:59-73.

Teicher MH, Andersen SL, Polcari A, Anderson CM, Navalta CP, Kim DM (2003). The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 33-44.

Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A, Olivier C (1997) Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *J Comp Neurol* 388(2): 169-190.

Vargas LC, Schenberg LC (2001) Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 155: 260-268.

