



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CAMILA BIESDORF DE ALMEIDA**

**PAPEL DOS RECEPTORES KAPPA OPIOIDES E SUA INTERAÇÃO  
COM RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> NO TESTE DA ESTIMULAÇÃO  
ELÉTRICA NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL  
DE RATOS**

**MARINGÁ**

**2014**

Camilla Biesdorf de Almeida	Papel do receptores kappa opioides e sua interação com receptores 5-HT1A no teste da estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal de ratos	Mestrado PCF-UEM 2014
--------------------------------	--	-----------------------------

CAMILA BIESDORF DE ALMEIDA

**PAPEL DOS RECEPTORES KAPPA OPIOIDES E SUA INTERAÇÃO  
COM RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> NO TESTE DA ESTIMULAÇÃO  
ELÉTRICA NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL  
DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Ciências Farmacêuticas (área de concentração – Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elisabeth Aparecida Audi

**MARINGÁ  
2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

A447p Almeida, Camila Biesdorf de  
Papel dos receptores Kappa Opioides e sua  
interação com receptores 5-HT<sub>1A</sub> no teste da  
estimulação elétrica na substância cinzenta  
periaquedutal dorsal de ratos / Camila Biesdorf de  
Almeida. -- Maringá, 2014.  
39 f. : il., figs., tabs.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabeth Aparecida Audi.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento  
de Farmacologia e Terapêutica, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

1. Transtorno do pânico. 2. SCPd. 3. Opióide. 4.  
Serotonina. I. Audi, Elisabeth Aparecida, orient.  
II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de  
Ciências da Saúde. Departamento de Farmacologia e  
Terapêutica. Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas. III. Título.

CDD 21.ed. 616.85223

AHS

**CAMILA BIESDORF DE ALMEIDA**

**PAPEL DOS RECEPTORES KAPPA OPIÓIDES E SUA INTERAÇÃO  
COM RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> NO TESTE DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA  
NA SCPD DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2014

**BANCA EXAMINADORA**



Dra. Elisabeth Aparecida Audi



Dr. Roberto Barbosa Bazotte



Dr. Wilson Alves do Prado

## ***DEDICATÓRIA***

Dedico este trabalho à Deus, aos meus pais, que foram meus primeiros mestres e às minhas irmãs pelo apoio em todos os momentos

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por sempre me iluminar e me mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais, Jair e Cleci, por serem o meu porto seguro, por todo carinho, apoio, incentivo e dedicação em todos os momentos da minha vida. Sem eles não teria chegado até aqui.

Às minhas irmãs, Carla e Jeane, pelo companheirismo, momentos de alegria e diversão e que mesmo perto ou longe me deram todo apoio e incentivo.

À minha orientadora, Prof. Dra. Elisabeth Aparecida Audi, pela orientação. Obrigada pela contribuição na minha formação profissional.

Aos professores Dr. Roberto Barbosa Bazotte e Dr. Wilson Alves do Prado, por aceitarem participar da banca de defesa dessa dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo a pesquisa.

Aos colegas de laboratório, Camila, Marcel, Jhonatan e Mariana que estiveram presentes na realização deste trabalho.

Ao técnico de laboratório, Marcos, e à auxiliar, "Soli", pelo apoio técnico.

À Helena e demais funcionários, bem como a todos os professores, e alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que contribuíram com o trabalho.

À minha amiga, Taiana, pela amizade e companheirismo desde o primeiro dia de aula da graduação, por me ouvir, pelos conselhos e pela parceria.

**ALMEIDA, CB 2014. Papel dos receptores kappa opioides e sua interação com receptores 5-HT<sub>1A</sub> no teste da estimulação elétrica na substância cinzenta periaquedutal dorsal de ratos. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 39p.**

## **RESUMO**

O transtorno do pânico é caracterizado por episódios repetidos de ataques de pânico (APs), seguido de ansiedade crônica. Indivíduos que são susceptíveis aos APs, apresentam deficiência nos mecanismos serotoninérgicos e opioides endógenos e a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) tem papel primordial na regulação destes ataques. Estudos indicam que receptores 5-HT<sub>1A</sub> estão envolvidos na regulação do comportamento defensivo organizado nesta estrutura cerebral. Além disso, tem-se mostrado que a ativação de receptores kappa ( $\kappa$ ) opioides da SCPd promove efeito aversivo. O objetivo deste trabalho foi verificar o envolvimento de receptores  $\kappa$  e sua interação com receptores 5-HT<sub>1A</sub> localizados nessa região cerebral, em ratos submetidos ao teste da estimulação elétrica na SCPd, um modelo animal para o estudo da fisiopatologia e do tratamento do transtorno do pânico. Ratos Wistar foram microinjetados (0,2  $\mu$ L/120s) intra-SCPd com o antagonista  $\kappa$ , Nor-BNI (3,4 e 6,8 nmol) ou com o agonista 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OHDPAT (0,8 e 1,6 nmol), bem como pela associação de Nor-BNI (3,4 nmol) com 8-OHDPAT (0,8 nmol) e submetidos ao teste da estimulação elétrica, no qual se mediu a intensidade da corrente elétrica capaz de provocar comportamento de fuga (limiar de fuga) antes e depois da administração das drogas para a verificação de possíveis efeitos. As doses mais altas do Nor-BNI (6,8 nmol) e do 8-OHDPAT (1,6 nmol) promoveram aumentos nos limiares de fuga, indicativo de efeito panicolítico. A associação de doses subefetivas de Nor-BNI (3,4 nmol) e do 8-OHDPAT (0,8 nmol) mostrou aumento do limiar de fuga estatisticamente significativo quando comparados ao grupo controle, indicativo de efeito panicolítico. Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de um fator seguido pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. Estes resultados mostram que os receptores  $\kappa$  estão envolvidos na aversão e que atuam de forma cooperativa com receptores 5-HT<sub>1A</sub> na regulação de respostas de fuga eliciadas por estimulação elétrica da SCPd.

Palavras-chave: Transtorno do pânico, SCPd, opioide, serotonina.



**ALMEIDA, CB 2014. Role of kappa opioid receptors and their interaction with 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the electrical stimulation test in the dorsal periaqueductal gray of rats. Master Degree, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 39p.**

#### **ABSTRACT**

Panic disorder (PD) is characterized by repeated occurrence of spontaneous panic attacks (PAs), followed by chronic anxiety. The susceptibility to PA in PD patients is due to a deficient serotonergic and opioidergic mechanism and the dorsal periaqueductal gray (DPAG) assumes a pivotal role in the regulation of PAs. Studies show that 5-HT<sub>1A</sub> receptors are involved in the regulation of defensive behavior in this cerebral area. Furthermore, the activation of kappa ( $\kappa$ ) opioid receptors of the DPAG promote aversive effects. The aim of this study was verify the involvement of  $\kappa$  receptors and their interaction with 5-HT<sub>1A</sub> receptors placed in this cerebral area, in rats submitted to electrical stimulation test in the DPAG, an animal model that studies the pathophysiology and treatment of PD. Male Wistar rats were microinjected (0.2  $\mu$ L/120s) into DPAG with the  $\kappa$ -opioid antagonist Nor-BNI (3.4 and 6.8 nmol) or 5-HT<sub>1A</sub> agonist, 8-OHDPAT (0.8 and 1.6 nmol), as well the association of Nor-BNI (3.4 nmol) with 8-OHDPAT (0.8 nmol) and submitted to electrical stimulation test, which was measured the intensity of electrical that evoked escape behavior (escape threshold) before and after the drugs treatment to investigate possible effects. The higher doses of Nor-BNI (6.8 nmol) and of 8-OHDPAT (1.6 nmol) promoted increase on the threshold escape, indicative panicolytic-like effect. The association of ineffective doses of the Nor-BNI (3.4 nmol) with 8-OHDPAT (0.8 nmol), also showed increase on the threshold escape statistically significant when compared to control group. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the post hoc Duncan's test. These results show that the  $\kappa$  receptors are involved in aversion and act cooperatively with 5-HT<sub>1A</sub> receptors on the regulation of escape responses promoted by DPAG electrical stimulation.

Keywords: Panic disorder, DPAG, opioid, serotonin.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação das subdivisões da SCP.....14
- Figura 2:** Efeito da microinjeção intra-SCPd (0,2 µl/120s) do antagonista específico κ opioide, Nor-BNI (3,4 e 6,8 nmol), sobre a variação do limiar de fuga em ratos submetidos ao teste de estimulação elétrica da SCPd. n = 5-10, \*p<0,01 comparado ao grupo salina.....25
- Figura 3:** Efeito da microinjeção intra-SCPd (0,2 µl/120s) do agonista serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OHDPAT (0,8 e 1,6 nmol), sobre a variação do limiar de fuga em ratos submetidos ao teste de estimulação elétrica da SCPd. n = 5-7, \*p<0,01 comparado ao grupo salina.....26
- Figura 4:** Efeito da microinjeção intra-SCPd (0,2 µl/120s) do antagonista específico κ opioide, Nor-BNI (3,4 nmol), 10 min. antes da microinjeção intra-SCPd do agonista serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OHDPAT (0,8 nmol), sobre a variação do limiar de fuga em ratos submetidos ao teste de estimulação elétrica da SCPd. n = 5-7, \*p<0,01 comparado ao grupo salina.....27

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT – Serotonina

8-OHDPAT - 8-hidroxi-*N,N*-dipropil-2-aminotetralina

5-MeODMT - 5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina

ANOVA – Análise de Variância

AP – Ataque de Pânico

ISRS – Inibidor Seletivo de Recaptação de Serotonina

LTE - Labirinto em T Elevado

NDR – Núcleo Dorsal da Rafe

Nor-BNI - Nor-binaltorfimina

pCPA – para-clorofenilalanina

SCPd – Substância Cinzenta Periaquedutal dorsal

TAG – Transtorno da Ansiedade Generalizada

TP – Transtorno do Pânico

TOC – Transtorno Obsessivo-Compulsivo

U50488H - (-)-trans-(1S,2S)-U-50488 hidrato hidrocloreídrico

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
3.1.	ANIMAIS.....	20
3.2.	DROGAS.....	20
3.3.	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA IMPLANTAÇÃO DO QUIMITRODO .....	20
3.4.	MICROINJEÇÃO DE DROGAS .....	21
3.5.	TESTE DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA.....	21
3.5.2.	Arena para estimulação elétrica .....	22
3.5.3.	Procedimento Experimental.....	22
3.5.4.	Determinação do limiar de fuga basal (pré-droga).....	22
3.5.5.	Determinação do limiar de fuga pós-droga .....	23
3.6.	TRATAMENTO.....	23
3.6.1.	Experimento 1: avaliação do efeito de Nor-BNI e 8-OHDPAT na SCPd em ratos submetidos ao teste da estimulação elétrica .....	23
3.6.2.	Experimento 2 : Avaliação da associação de doses subefetivas de Nor-BNI e 8-OHDPAT na SCPd de ratos submetidos ao teste da estimulação elétrica .	24
3.7.	ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	24
3.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
4.1.	EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NOR-BNI E 8-OHDPAT NA SCPd EM RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA.....	25
4.2.	EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE DOSES SUBEFETIVAS DE NOR-BNI E 8-OHDPAT NA SCPd DE RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA.....	26
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>31</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>32</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O medo faz parte de um complexo de comportamentos inatos espécie-específicos, fundamental para a sobrevivência dos indivíduos na natureza. Do ponto de vista biológico a ansiedade possui suas raízes nas reações de defesa dos animais, verificadas em respostas aos perigos comumente encontrados no ambiente em que vivem. Assim, quando um animal confronta-se com uma ameaça ao seu bem estar, à sua integridade física ou a sua própria sobrevivência, ele apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de medo. Tal ameaça pode ser representada por um estímulo inato, como um predador ou um agressor da mesma espécie, ou por estímulos neutros, que por associação repetida com estímulos dolorosos ou outras sensações igualmente desagradáveis adquirem propriedades aversivas condicionadas (GRAEFF; BRANDÃO, 1999).

De acordo com a classificação do Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV, 2000), os transtornos de ansiedade podem ser classificados como um grupo de patologias distintas, cada qual com seus sintomas predominantes e formas de tratamentos específicos. Dentre elas estão o transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno do pânico (TP), transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), transtorno do estresse pós-traumático e fobias.

O transtorno do pânico é essencialmente caracterizado por recorrentes e inesperados ataques de pânico (APs), que são seguidos por um mês ou mais de preocupação persistente sobre ter novos ataques, preocupação com as consequências destes ataques, bem como com as alterações comportamentais relacionados a estes ataques (ASSOCIAÇÃO PSIQUIÁTRICA AMERICANA, 2002).

Os APs são definidos como um período de medo intenso ou desconforto em que pelo menos quatro dos seguintes sintomas estão presentes: palpitações, taquicardia, sudorese, tremores, sensações de falta de ar ou sufocamento, dores ou desconforto no peito, náuseas ou desconfortos abdominais, tonturas, medo de perder o controle, medo de morrer, dormência ou formigamento e calafrios ou ondas de calor (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2006).

Independente do tipo de transtorno, pacientes com transtornos de ansiedade apresentam declínio do desempenho na área profissional, social, no relacionamento familiar e conjugal e representam maior risco de dependência emocional, operacional e econômica. Os pacientes podem apresentar mais de um tipo de transtorno de ansiedade concomitantemente, além de transtornos de personalidade, estados depressivos e abuso de substâncias (REGIER e col., 1998).

No Brasil, poucos estudos mostram dados epidemiológicos sobre o perfil de morbidades psiquiátricas. Segundo uma pesquisa, constatou-se as seguintes estimativas de prevalência para transtornos de ansiedade: 4,2% para TAG, 1,6% para TP, 2,1% para agorafobia, 4,8% para fobia simples, 3,5% para fobia social e 0,3% para TOC em indivíduos do estado de São Paulo (ANDRADE e col., 2002).

Estudos epidemiológicos realizados a nível mundial indicam que a prevalência do TP, ao longo da vida, situa-se entre 1,5 e 3,5% (com ou sem agorafobia), alcançando uma prevalência anual entre 1 e 2% (ASSOCIAÇÃO PSIQUIÁTRICA AMERICANA, 2002). Outro estudo realizado na cidade de São Paulo encontrou uma prevalência de 1,6% para o TP ao longo da vida e de 1% em um ano (MARI e col., 2006).

O TP é cerca de duas vezes mais comum em mulheres e, geralmente, se inicia no final da adolescência ou no início da vida adulta, com média de aparecimento entre os 20 e 30 anos; raramente, há casos de aparecimento na infância (ROSENBERG e col., 1991; KESSLER e col., 2006).

Assim, os diferentes transtornos de ansiedade são identificados como algumas das causas mais freqüentes na procura de auxílio médico e psiquiátrico (LAWLOR; LAZARE, 1989). A alta prevalência dos transtornos de ansiedade torna este grupo de patologias um problema de saúde pública, prejudicando a qualidade de vida da população e gerando custos sociais diretos e indiretos bastante elevados (MANSION e col., 1993; BERNIK; MINNUTTENTAG, 2004).

Neste contexto, compreender os processos biológicos envolvidos nos transtornos de ansiedade representa um desafio para o campo da neurociência, o que tem levado ao crescente número de estudos para se entender os mecanismos neurais responsáveis pela origem e manutenção dos transtornos ansiosos.

Os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRSs) são os fármacos de primeira escolha no tratamento dos transtornos da ansiedade, incluindo o TAG e TP, porém eles apresentam muitas limitações. Dentre estas limitações estão a resistência em 20% dos pacientes e a resposta inadequada em aproximadamente 60% dos mesmos (KELLER, 2005), assim como a demora no aparecimento do efeito clínico e a piora inicial dos sintomas de ansiedade observada em pacientes com TP (BALDESSARINI, 2006).

Portanto, existe um grande interesse em melhorar a resposta terapêutica aos antidepressivos por meio da utilização de novas estratégias de tratamentos e identificação de outros sistemas de neurotransmissores e receptores, como os opioides, que possam estar relacionados à etiologia e ao tratamento dos distúrbios de ansiedade e depressão.

Diversos estudos sobre a neurobiologia do medo e da ansiedade demonstraram que a natureza das respostas de medo em animais expostos a situações ameaçadoras depende da intensidade e da distância do estímulo aversivo. Para Robert e Caroline Blanchard, o que

determina o grau de ameaça do estímulo é a distância entre roedor e o estímulo ameaçador, no caso o predador. Assim, os níveis de ameaça podem ser potencial, distal e proximal (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD e col., 2001).

O primeiro nível de ameaça (potencial) é caracterizado pela incerteza da existência de perigo, como por exemplo, quando o animal está em um novo ambiente, em algum local onde a presença do predador já tenha sido detectada ou diante da apresentação de estímulos associados a este, como objetos impregnados com o seu odor. Em resposta ao perigo potencial ou incerto, o animal apresenta o padrão comportamental de avaliação de risco, composto por repetidas tentativas de aproximação, seguidas de esquiva ao estímulo ameaçador. Durante a avaliação de risco, o rato, por exemplo, mantém o corpo estendido, o abdômen rente ao chão e a cabeça direcionada à fonte de perigo (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD e col., 2001).

O segundo nível de ameaça (distal) ocorre quando o perigo é real, mas se apresenta à certa distância, ou seja, quando o predador está presente e já foi detectado pela presa, mas está a uma distância segura e ainda não iniciou o ataque predatório. Nessa situação, o animal tende a permanecer imóvel, no estado de congelamento, diminuindo assim a probabilidade de ser identificado pelo predador e garantindo um menor risco a sua sobrevivência (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD e col., 2001).

Já o terceiro nível de ameaça (proximal) é caracterizado pela aproximação do predador a uma distância crítica da presa, ou até em contato com seu corpo. Assim, o animal se defende com a fuga ou com a luta. Quando possível, a fuga é a resposta predominante, mas se existem condições para um ataque ao oponente, a agressão defensiva é a resposta prevalente (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD e col., 2001).

As diferenças entre medo e ansiedade vão além dos aspectos comportamentais. As respostas de avaliação de risco e esquiva inibitória, adotadas no primeiro nível de ameaça, são diminuídas pela administração de drogas ansiolíticas utilizadas clinicamente no tratamento das desordens de ansiedade generalizada como o diazepam e a buspirona (GRAY; McNAUGHTON, 2000; BLANCHARD e col., 2003). Já as respostas de fuga, emitidas no terceiro nível, são resistentes a estas drogas ansiolíticas, mas sensíveis a drogas antidepressivas como a fluoxetina, empregadas no tratamento do transtorno do pânico (SCHENBERG e col., 2001; ZANOVELI e col., 2007; 2010).

Dessa maneira, existe uma relação entre os níveis de ameaça, estratégias comportamentais e transtornos específicos de ansiedade. Por exemplo, enquanto as respostas de esquiva inibitória e de avaliação de risco estariam relacionadas a transtorno de ansiedade generalizada, a resposta de fuga estaria relacionada ao transtorno do pânico (DEAKIN; GRAEFF, 1991; GRAEFF e col., 1993; GRAEFF, 2004). Assim, tem sido possível

encontrar relação entre esses transtornos psiquiátricos e respostas defensivas que os animais apresentam quando são confrontados a situações aversivas.

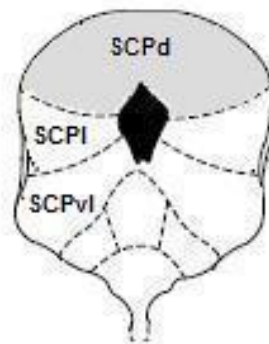
Além disso, os substratos neurais envolvidos nos níveis de ameaça parecem ser distintos. Quando a ameaça é distal, ocorre a ativação de centros mais rostrais coordenando as respostas, como o córtex do cíngulo (estrutura superior do cérebro). Já quando há a evitação ou esquiva defensiva (medo), o controle fica a cargo da amígdala e do cíngulo anterior e a aproximação defensiva (ansiedade) ocorre quando uma forte tendência de gratificação entra em conflito com a evitação (elevados índices de avaliação de risco) sendo regulada pelo sistema septo-hipocampal e cíngulo posterior (MEZZASALAM e col., 2004).

Quanto ao terceiro nível de ameaça (proximal), o principal substrato neural parece ser a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), pois a estimulação elétrica aplicada nesta região, elicia reações de defesa como a fuga ou luta (GRAEFF, 2003).

Muitas estruturas cerebrais que modulam reações de defesa mostram envolvimento na fisiopatologia do TP, como amígdala, hipocampo e a substância cinzenta periaquedutal dorsal (GRAEFF; DEL-BEN, 2008)

Embora os três componentes deste sistema trabalhem juntos para gerar o comportamento defensivo, estas estruturas provavelmente exercem diferentes funções. Neste ponto, Fanselow (1991) tem sugerido que a amígdala sintetiza estímulos provenientes do meio ambiente e então sinaliza à substância cinzenta periaquedutal (SCP) o grau de ameaça que ele representa ao organismo. Esta, por sua vez, selecionaria, organizaria e executaria o comportamento apropriado e as reações defensivas neurovegetativas (GRAEFF, 2002).

A SCP é uma estrutura cerebral localizada no mesencéfalo, margeando o aqueduto cerebral. Quatro principais subdivisões são aceitas de existir na SCP e são designadas de colunas: dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral (BLANDER e col., 1991; CARRIVE, 1993; BLANDLER; SHIPLEY, 1994).



**Figura 1:** Representação das subdivisões da SCP. Distância de -7,64 mm do bregma. SCPd: SCP dorsal; SCPI: SCP lateral; SCPvl: SCP ventrolateral.

Fonte: Adaptado de Paxinos e Watson (2005).



Tem-se sugerido que a coluna ventrolateral medeia resposta de congelamento condicionado. A coluna lateral está relacionada ao comportamento de fuga vigorosa, respostas motoras e autonômicas (VIANNA e col., 2001).

Muitos estudos têm demonstrado o envolvimento da SCPd na coordenação dos diferentes aspectos da reação de defesa. Estimulações elétricas dessa estrutura eliciam respostas aversivas incondicionadas associadas com alterações autonômicas e sensoriais que ocorrem para dar suporte a comportamentos motores relacionados ao medo (BRANDÃO e col., 1982; 1990; 1999; LEÃO-BORGES e col., 1988; GRAEFF, 1990; COIMBRA; BRANDÃO, 1997; VIANNA e col., 2001).

Os modelos animais são amplamente utilizados em pesquisas biomédicas, pois possuem a capacidade de simular processos humanos fisiológicos e patológicos. Estes modelos contribuem para o entendimento de doenças humanas, contribuindo assim para o desenvolvimento de novas opções de tratamento terapêutico (TEXEIRA; QUEVEDO, 2013).

Modelos animais de desordens psiquiátricas visam reproduzir características observadas em desordens psiquiátricas de humanos em animais de laboratório, correlacionando alterações comportamentais e fisiológicas com estados emocionais específicos, a etiologia das doenças e reposta dos tratamentos farmacológicos. Estes modelos têm contribuído significativamente para a descoberta de novos tratamentos farmacológicos, bem como na compreensão da neurobiologia de doenças psiquiátricas (CAMPOS e col., 2013).

No entanto, modelos animais de ansiedade não objetivam replicar todas as características e sintomas de um transtorno de ansiedade específico, mas sim gerar um estado de ansiedade que possa ser relacionado a este distúrbio (CAMPOS e col., 2013).

Grande parte dos avanços na compreensão dos mecanismos neuroanatômicos e neuro-humorais dos transtornos da ansiedade vêm sendo obtidos a partir de estudos com estimulação elétrica (COIMBRA e col., 1998; EICHENBERGER e col., 2002; OSAKI e col., 2003; RIBEIRO e col., 2005;) ou química (BRANDÃO e col., 1988; 2008; CARDOSO e col., 1994; EICHENBERGER e col., 2002) de estruturas encefálicas específicas.

A estimulação elétrica e química da SCPd de animais experimentais elicia respostas associadas ao pânico, tais como comportamentos de defesa que geralmente seguem uma hierarquia de respostas, caracterizada por alerta (interrupção da atividade exploratória ou do repouso) seguido por congelamento (imobilidade defensiva, em que o animal fica praticamente imóvel e pode apresentar exoftalmia, piloereção e arqueamento do dorso) e fuga (saltos e galopes) (FERNANDEZ DE MOLINA; HUNSPERGER, 1959; MELLO e col., 1992; COIMBRA e col., 1996; 1998).

Adicionalmente, a estimulação elétrica da SCPd de humanos causa sentimentos de intenso medo e também alterações neurovegetativas, que são similares aos sintomas de APs observados em pacientes com TP (NASHOLD e col., 1969; 1974; YOUNG, 1989) como congelamento, luta ou fuga, acompanhada de alterações cardiovasculares, semelhantes às aquelas observadas em situações altamente aversivas, como um confronto com o predador (OLDS; OLDS, 1962; SCHUTZ e col., 1985; JENCK e col., 1995; SCHENBERG e col., 2001).

Diante da similaridade entre as respostas comportamentais e autonômicas induzidas pela estimulação da SCPd e os sintomas de APs, sugere-se que a SCPd está envolvida com o TP em humanos e que a estimulação elétrica desta região em animais pode ser considerada um modelo de ataque de pânico (GRAEFF, 1990; JENCK e col., 1995; LOVICK, 2000; SCHENBERG e col., 2001; GRAEFF E ZANGROSSI, 2002).

Nos primeiros estudos com este modelo, foi verificado que tanto o inibidor da síntese de serotonina (5-HT), para-clorofenilalanina (pCPA) (KISER; LEBOVITZ, 1975), como o antagonista serotoninérgico não seletivo, ciproheptadina (SCHENBERG; GRAEFF, 1978), facilitavam a resposta de fuga, indicando um efeito pró-aversivo. Por outro lado, a potencialização da neurotransmissão serotoninérgica prejudicava esta mesma resposta, indicando efeito antiaversivo (KISER e col., 1978).

Outras evidências mostraram ainda que a injeção de 5-HT ou do agonista não seletivo de receptores serotoninérgicos, 5-metoxi-N-N-dimetiltriptamina (5-MeODMT), diretamente na SCPd aumentava o limiar de corrente elétrica necessário para induzir fuga nos animais, indicando a inibição desta resposta (SCHÜTZ e col., 1985).

Evidências aparentemente contraditórias de que a 5-HT aumenta a ansiedade atuando na amígdala e diminui o medo atuando na SCPd, levaram Deakin e Graeff (1991) a propor uma teoria na qual as diferentes vias serotoninérgicas que inervam estas estruturas seriam responsáveis pela elaboração de comportamentos defensivos associados à ansiedade generalizada e ao pânico.

Tanto a amígdala como a SCPd são inervados por fibras serotoninérgicas provenientes do núcleo dorsal da rafe (NDR) através dos tratos prosencefálico e periventricular. De acordo com Deakin e Graeff (1991), a via prosencefálica, que inerva a amígdala facilitaria os comportamentos expressos em resposta a perigos potenciais ou distais como, por exemplo, a esquiva inibitória. Por outro lado, a via periventricular, que inerva a SCPd, inibiria reações de fuga e luta em resposta ao perigo proximal.

De acordo com a teoria de Deakin e Graeff (1991), diante de estímulos aversivos estas vias serotoninérgicas seriam ativadas, ocasionando o aumento da liberação de 5-HT tanto na amígdala como na SCPd e a ativação destas vias modularia a expressão de diferentes respostas comportamentais defensivas. Na amígdala, a 5-HT facilitaria a esquiva

comportamental frente a perigos potenciais e distais, enquanto que na SCPd, o aumento da concentração de 5-HT inibiria a resposta de fuga em resposta a ameaças proximais. Deste modo, a 5-HT exerceria um papel dual, facilitando a ansiedade por agir na amígdala, mas inibindo o pânico através de ações da SCPd (GRAEFF; ZANGROSSI, 2002).

Assim, sugere-se que paciente com TP tem uma deficiência da inibição serotoninérgica de neurônios localizados na SCPd, que modula reações de defesa (GRAEFF, 2012).

A liberação de 5-HT em terminais nervosos que chegam à amígdala, oriundas do NDR, promove aumento da ansiedade generalizada condicionada ou antecipatória, provavelmente ao agir em receptores 5-HT<sub>2</sub>, especialmente 5-HT<sub>2C</sub> (VICENTE; ZANGROSSI, 2011), enquanto a liberação de 5-HT de terminais que partem do NDR e inervam a SCPd inibe o medo incondicionado (pânico), com provável envolvimento dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> (JACOB e col., 2002; ZANOVELI e col., 2003; BORTOLI e col., 2006).

Os receptores 5-HT<sub>1A</sub> foram os primeiros subtipos de receptores serotoninérgicos a serem seqüenciados. Eles funcionam como autorreceptores somatodendríticos nos núcleos da rafe e como receptores pós-sinápticos nos terminais nervosos. As mais altas densidades destes receptores são encontradas em estruturas límbicas como o hipocampo, córtex entorrinal e septo, além de núcleos mediano e dorsal da rafe, e as mais baixas densidades são observadas em áreas extrapiramidais como o gânglio basal, substância negra e cerebelo. A localização dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> nas áreas que compõem o sistema límbico sugere que este subtipo de receptor está envolvido na modulação da emoção, assim como na patogênese da ansiedade, depressão, doenças que afetam o movimento e distúrbios alimentares, se tornando um alvo importante para a ação terapêutica de drogas (DE VRY, 1995; NOGUEIRA; GRAEFF, 1995; INOUE e col., 1996; BARNES; SHARP, 1999; POPOVA, 2004).

Estudos também sugerem o envolvimento de mecanismos opioides na modulação das reações aversivas na SCPd (COIMBRA e col., 1996; COIMBRA; BRANDÃO, 1997; COIMBRA e col., 2000). Nessa região do cérebro, estão presentes receptores opioides Mu ( $\mu$ ), Kappa ( $\kappa$ ) e Delta ( $\delta$ ), porém há predominância dos receptores  $\mu$ , cuja ativação promove efeitos antiaversivos e antinociceptivos e dos receptores  $\kappa$ , cuja estimulação está relacionada à promoção de efeitos aversivos (MANSOUR e col., 1987; MOTTA e col., 1995; MORGAN e col., 1998).

A conexão entre opioides e TP tem se baseado na teoria da falsa sufocação, na qual o ataque de pânico ocorre quando há uma interpretação errônea do detector de CO<sub>2</sub> do organismo, que ativa o alarme de sufocação, produzindo sintomas de APs (KLEIN, 1993).

Adicionalmente a esta teoria, Preter e Klein (2008) propuseram que pacientes com TP apresentam uma deficiência do mecanismo opioide, o qual tem a função de controlar o início de AP.

Esta teoria se confirma com estudos que mostram que a infusão de lactato, um agente panicogênico, induz o AP em pacientes com TP, mas não em pacientes saudáveis, enquanto o pré-tratamento com o antagonista inespecífico de receptores opioides, naloxona, torna tanto indivíduos saudáveis quanto pacientes com pânico, susceptíveis ao AP induzido por lactato (SINHA e col., 2007; PRETER e col., 2011).

O sistema opioide tem sido implicado no mecanismo de ação de drogas antidepressivas, particularmente aquelas que aumentam a neurotransmissão de 5-HT como os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRSs) (BERROCOSO e col., 2009), já que a associação de doses subefetivas de ISRS e agonista opioide, fluoxetina e codeína, promove uma potencialização do efeito antidepressivo (BERROCOSO; MICO, 2009). Assim, o efeito sinérgico do ISRS e opioide sugere a existência de uma interação farmacológica entre 5-HT e opioides.

Além disso, estudos realizados em nosso laboratório, evidenciaram que a administração prévia de naloxona, intra-SCPd, antagonizou o efeito anti-fuga do 8-OHDPAT, também injetada intra-SCPd. Estes resultados indicaram que o subtipo de receptor 5-HT<sub>1A</sub> está envolvido na interação entre 5-HT e peptídeos opioides endógenos na SCPd, que regulam comportamento de fuga. Ainda neste mesmo trabalho, foi demonstrado que a associação de doses subefetivas de morfina e 5-HT promoveu um efeito anti-fuga no teste do LTE (RONCON e col., 2013).

Assim, dando continuidade a estudos conduzidos em nosso laboratório, que avaliam a interação do sistema opioide e 5-HT na SCPd, o objetivo deste trabalho foi verificar o envolvimento de receptores  $\kappa$  opioides localizados na SCPd e sua interação com receptores 5-HT<sub>1A</sub> no pânico promovido pela estimulação elétrica dessa região cerebral.

## 2. OBJETIVOS

- 1- Avaliar o papel específico dos receptores opioides  $\kappa$  na SCPd em ratos submetidos à estimulação elétrica, por meio da microinjeção de antagonista específico  $\kappa$  opioide, Nor-BNI, intra-SCPd;
- 2- Avaliar a interação entre sistema serotoninérgico e opioide na SCPd em ratos submetidos à estimulação elétrica, através da associação de microinjeções de doses subefetivas do antagonista específico de receptores  $\kappa$  opioide, Nor-BNI, com agonista específico de receptor 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OHDPAT, intra-SCPd;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando inicialmente 230-250 g (Biotério central, Universidade Estadual de Maringá-UEM). Os animais foram mantidos no biotério do laboratório de Neuropsicofarmacologia sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e iluminação (ciclo claro-escuro de 12 horas), com livre acesso à água e ração durante todo o experimento. Os animais submetidos aos testes comportamentais foram alojados em grupos de cinco animais por gaiola. Os experimentos foram realizados entre 08:00 e 12:00 h. Todos os procedimentos experimentais adotados foram submetidos à análise e aprovação pelo comitê de ética da UEM (Parecer nº 028/2013) e seguiram as normas recomendadas como princípios dos guias internacionais para a pesquisa biomédica que envolve animais experimentais (CIMS), Genebra, 1985.

#### 3.2. DROGAS

As drogas utilizadas foram: Nor-binaltorfimina (Nor-BNI, antagonista  $\kappa$ , Sigma), 8-hidroxi-*N,N*-dipropil-2-aminotetralina (8-OHDPAT, agonista 5-HT<sub>1A</sub>, Sigma), solubilizadas em salina estéril (0,9 %). Os animais do grupo controle foram tratados com salina estéril (0,9%, veículo).

#### 3.3. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA IMPLANTAÇÃO DO QUIMITRODO

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação do quimitrodo na SCPd de acordo com os parâmetros obtidos do atlas de cérebro de ratos Paxinos e Watson (2005). A cirurgia foi realizada 6 dias antes da realização dos testes.

Os animais foram anestesiados com xilazina (12 mg/kg) e quetamina (70 mg/kg), por via intramuscular. Após a indução anestésica, foi realizada a tricotomia dos pêlos da cabeça e em seguida os animais foram então adaptados a um aparelho estereotáxico (David-Kopf, EUA), com a barra dos incisivos 2,5 mm abaixo da linha interaural e a seguir, na região da incisão foi administrado, por via subcutânea, o anestésico local cloridrato de lidocaína associado a um vasoconstritor, atropina (Bravet, Bravet Ltda). Poucos minutos após, foi realizada uma incisão longitudinal, a fim de expor o crânio.

Na seqüência, dois orifícios foram perfurados para a introdução de parafusos de aço inoxidável. Estes parafusos serviram como âncora da prótese de acrílico a ser disposta no

crânio do animal. Outro orifício foi perfurado para a introdução do quimitrodo a uma distância de 1,9 mm lateralmente ao lambda, a uma profundidade de 5,2 mm a partir da superfície craniana e inclinação de 22° em relação ao plano sagital, evitando-se, assim a perfuração do seio venoso. Após o implante, o quimitrodo foi fixado à calota craniana por meio de resina acrílica (JET). Finalmente, foi introduzido pela cânula-guia um mandril de aço inoxidável, de mesmo comprimento, para evitar possíveis entupimentos da cânula. Após o procedimento cirúrgico, uma associação antibiótica de amplo espectro (Pentabiótico, Fontoura-Wyeth-Brasil) foi administrada (0,25 mL/animal, via intramuscular) a fim de prevenir possíveis infecções. Além disso, neste mesmo período, foi administrado por via subcutânea (2,5 mg/mL/kg) o agente analgésico com atividade antiinflamatória e antipirética, flunixinina meglumina (Banamine, Schering-Plough S/A-Brasil)

Após a cirurgia, os animais foram levados ao biotério do laboratório, onde permaneceram até a realização do teste comportamental.

#### 3.4. MICROINJEÇÃO DE DROGAS

Seis dias após a cirurgia, as microinjeções de 8-OHDPAT, Nor-BNI ou veículo foram realizados com o auxílio de uma agulha Mizzy conectada a uma microseringa Hamilton de 10 µl por meio de um tubo de polietileno (PE-10). A agulha foi introduzida no interior da cânula-guia (14 mm) e ultrapassou a cânula em 1,0 mm de forma a atingir SCPd. As microinjeções foram feitas com o auxílio de uma bomba de infusão, em tempo e volume constantes (0,2 µl/120s), permanecendo a agulha por 60 s adicionais no sítio intracerebral, para evitar refluxo da solução injetada e permitir uma melhor difusão da droga.

#### 3.5. TESTE DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA

##### 3.5.1. Quimitrodo

O quimitrodo consiste de um eletrodo conectado a uma cânula-guia que foi construída a partir de uma agulha hipodérmica comercial, possuindo 13,0 mm de comprimento e 0,6 mm de diâmetro externo. A mesma teve em seu interior um mandril de aço de 0,3 mm de diâmetro e 13,0 mm de comprimento que a manteve desobstruída. Este mandril foi retirado da cânula-guia apenas durante a sessão experimental. O eletrodo, por sua vez, foi confeccionado a partir de um fio de aço inoxidável flexível, de 250 µm de diâmetro, isolado em toda sua extensão, exceto nas seções transversas das extremidades. Um segmento desse fio foi soldado a um pino inoxidável e colado paralelamente à metade distal de uma cânula-guia, ultrapassando-a em 1 mm. A extremidade proximal do eletrodo foi soldada a

um pino de aço que juntamente com a extremidade superior da cânula-guia constituem os pólos de estimulação. A estimulação elétrica do tecido cerebral ocorria a partir da secção transversa distal do eletrodo.

### **3.5.2. Arena para estimulação elétrica**

A estimulação elétrica da SCPd foi realizada em uma arena de acrílico (25,5 cm de diâmetro na base, 40 cm de diâmetro na borda e 36 cm de altura), com serragem em seu assoalho para reproduzir as condições da gaiola-viveiro do animal. Uma tela de *nylon* disposta na parte superior da cuba impediu que os animais saltassem para fora da área de teste durante as sessões de estimulação elétrica. A tela de *nylon* possui uma abertura em seu centro, que permitiu a passagem de um conector elétrico giratório de teflon ligado a dois canais de saídas. A primeira saída estava ligada a um estimulador, que gerou corrente senoidal de 60 Hz e corrente constante (Marseillan, 1977). A corrente elétrica aplicada foi monitorada por meio de um osciloscópio (Pantec – 5205 – 10mHz) ligado em paralelo ao aparelho estimulador. A segunda saída foi conectada a um cabo flexível, que se encaixou ao eletrodo fixado ao crânio do animal, permitindo a passagem de corrente elétrica para a SCPd. Este aparato permitiu a livre movimentação do animal na cuba.

### **3.5.3. Procedimento Experimental**

Os animais foram manipulados gentilmente por 10 minutos 48h e 24h antes da realização do teste comportamental, sendo 5 minutos no colo do administrador e 5 minutos na caixa de acrílico.

Seis dias após a cirurgia foram iniciadas as sessões de estimulação elétrica visando à determinação do limiar de fuga de cada animal. Primeiramente, o mandril foi retirado da cânula-guia e a seguir, uma simulação de microinjeção foi realizada, a fim de igualar as condições experimentais de pré e pós-injeção de droga. Em seguida, o cabo flexível foi conectado ao quimitrodo e o animal foi colocado na cuba por 5 minutos para adaptar-se às condições experimentais. Após este tempo, foi iniciada a determinação dos limiares aversivos, por meio da estimulação da SCPd.

### **3.5.4. Determinação do limiar de fuga basal (pré-droga)**

A determinação dos limiares de fuga (limiar aversivo) foi iniciada com a apresentação de um estímulo elétrico com intensidade de 20  $\mu$ A. A corrente elétrica foi monitorada pico-



pico por meio de um osciloscópio. O tempo de cada estímulo elétrico foi de 10 s, seguidos de intervalos de 10 s.

Após cada intervalo, um novo estímulo, 4  $\mu\text{A}$  maior que o precedente, foi aplicado ao animal, até a obtenção do comportamento de fuga, caracterizado por saltos e corridas. O limiar de fuga foi considerado como a menor intensidade de corrente elétrica capaz de induzir fuga por três tentativas consecutivas. Caso não fosse observada a fuga até a intensidade de corrente elétrica de 152  $\mu\text{A}$ , o animal era excluído do experimento. Uma vez determinado o limiar basal, grupos independentes de animais foram utilizados para avaliar o efeito da administração intra-SCPd de drogas.

### **3.5.5. Determinação do limiar de fuga pós-droga**

Após a verificação do limiar basal de fuga, os animais foram colocados novamente na caixa de acrílico por mais 10 min., em seguida foi feita a administração das drogas intra-SCPd e foi aguardado entre 10-20 min. para avaliação do limiar pós-droga, dependendo da droga a ser administrada. O limiar basal pós-droga foi determinado pela passagem de corrente elétrica, do mesmo modo anteriormente descrito, até que o animal tenha evocado o comportamento de fuga caracterizado por saltos e corridas.

Quando estes comportamentos foram observados, a aplicação de estimulação elétrica na SCPd foi interrompida pelo experimentador. O limiar de fuga pós-droga foi definido como a menor intensidade de corrente capaz de evocar em três ensaios sucessivos o comportamento de fuga no animal. Os efeitos da droga foram determinados como a diferença entre os limiares basais e pós-droga, um aumento deste valor foi considerado como um efeito panicolítico.

## **3.6. TRATAMENTO**

### **3.6.1. Experimento 1: Avaliação do efeito de Nor-BNI e 8-OHDPAT na SCPd em ratos submetidos ao teste da estimulação elétrica**

Dez minutos após a determinação do limiar de fuga basal, foi administrado intra-SCPd Nor-BNI, o antagonista seletivo k (3,4 nmol e 6,8 nmol/0,2 $\mu\text{l}$ /120s) (doses baseadas em trabalho realizado por OSAKI e col., 2003; ROSS e col., 2009) ou o agonista seletivo para receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OHDPAT (0,8 e 1,6 nmol/0,2 $\mu\text{l}$ /120s) (doses baseadas em estudos prévios realizados por De BORTOLI e col., 2006; RONCON e col., 2013). Após 20

min. (Nor-BNI) ou 10 min. (8-OHDPAT) os animais foram submetidos ao teste de estimulação elétrica para avaliação do limiar pós-droga.

### **3.6.2. Experimento 2 : Avaliação da associação de doses subefetivas de Nor-BNI e 8-OHDPAT na SCPd de ratos submetidos ao teste da estimulação elétrica**

Dez minutos após a determinação do limiar de fuga basal, foi administrado intra-SCPd Nor-BNI (3,4 nmol/0,2µl/120s), e 10 min. após foi administrado, intra-SCPd, o 8-OHDPAT (0,8 nmol/0,2µl/120s) (doses subefetivas confirmadas em nosso laboratório). Após outros 10 min., os animais foram submetidos ao teste de estimulação elétrica para avaliação do limiar pós-droga.

## **3.7. ANÁLISE HISTOLÓGICA**

Para verificar a posição exata do quimitrodo e da estimulação no teste da estimulação elétrica, os animais foram anestesiados com tiopental para realização da perfusão transcardíaca com solução salina, seguida de formol 10%, após o término dos experimentos. Os encéfalos foram retirados e mantidos em formol 10% por no mínimo 5 dias. Após este período, foram congelados e então foram realizadas secções coronais de 60 µm de espessura, com o auxílio de um micrótomo de congelamento. Os cortes foram preparados em lâminas de microscopia previamente gelatinizadas, e posteriormente foram corados com vermelho neutro para visualização em microscópio óptico do local das microinjeções e da estimulação. Só foram considerados, na análise estatística, animais no qual a agulha de microinjeção e estimulação estavam localizadas exatamente no local desejado (SCPd).

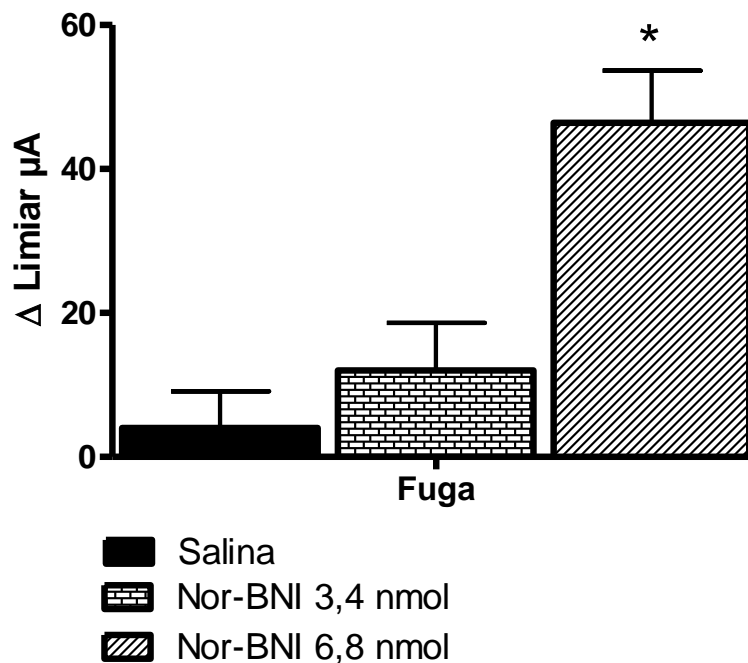
## **3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram analisados pela análise de variância (ANOVA de um fator), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Duncan, que foi utilizado como análise pós-teste. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para valores de  $p \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NOR-BNI E 8-OHDPAT NA SCPd EM RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA

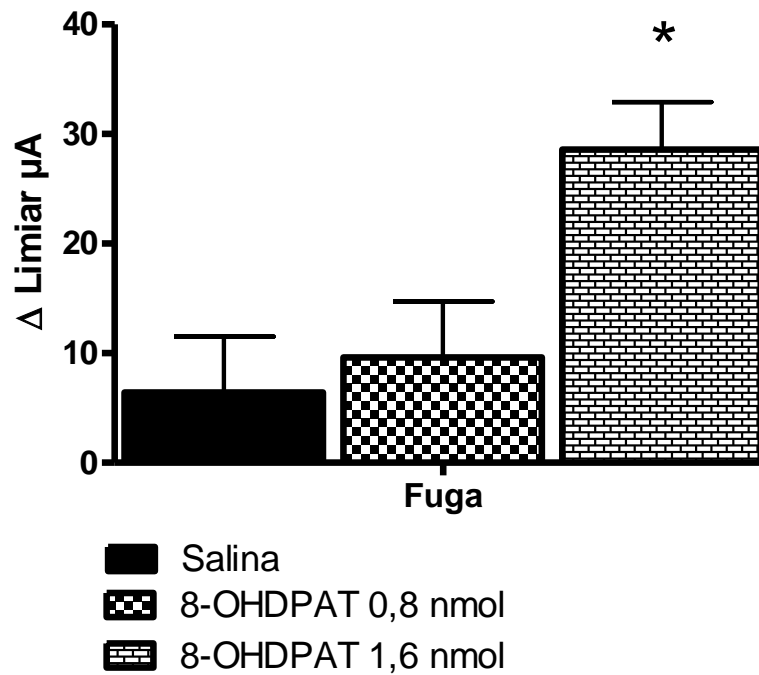
A figura 2 ilustra os resultados observados após a microinjeção de diferentes doses (3,4 e 6,8 nmol) de Nor-BNI intra-SCPd em ratos submetidos ao teste da estimulação elétrica da SCPd.



**Figura 2:** Efeito da microinjeção intra-SCPd (0,2 μl/120s) do antagonista específico κ opioide, Nor-BNI (3,4 e 6,8 nmol), sobre a variação do limiar de fuga em ratos submetidos ao teste de estimulação elétrica da SCPd. n= 5-10, \*p<0,01 comparado ao grupo salina.

Na análise do limiar de fuga, ANOVA de um fator mostrou efeito significativo [ $F_{(1,18)}=11,64$ ,  $p<0,01$ ] e a análise pós-teste utilizando teste de comparações múltiplas de Duncan mostrou aumento significativo na variação do limiar de fuga no tratamento com Nor-BNI 6,8 nmol ( $p<0,01$ ) quando comparados ao grupo controle, indicando um efeito panicolítico.

Na figura 3, observa-se os resultados obtidos após a microinjeção de diferentes doses (0,8 e 1,6 nmol) de 8-OHDPAT intra-SCPd em ratos submetidos ao teste da estimulação elétrica da SCPd.

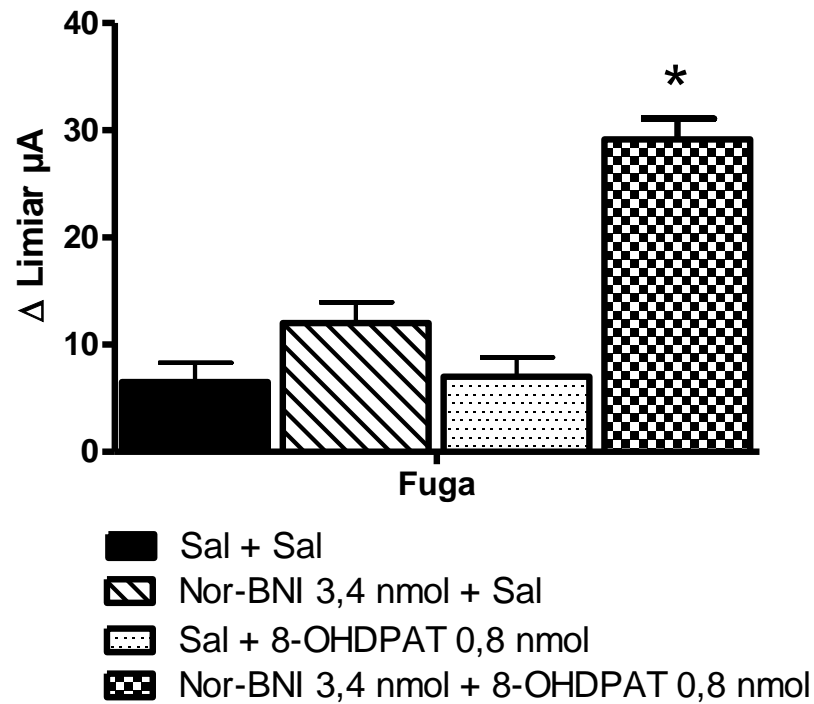


**Figura 3:** Efeito da microinjeção intra-SCPd (0,2  $\mu\text{l}/120\text{s}$ ) do agonista serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OHDPAT (0,8 e 1,6 nmol), sobre a variação do limiar de fuga em ratos submetidos ao teste de estimulação elétrica da SCPd. n= 5-7, \*p<0,01 comparado ao grupo salina.

Na análise do limiar de fuga, ANOVA de um fator mostrou efeito significativo [ $F_{(1,14)}=6,71$ ,  $p<0,01$ ] e a análise pós-teste utilizando teste de comparações múltiplas de Duncan mostrou aumento significativo na variação do limiar de fuga no tratamento com 8-OHDPAT 1,6 nmol ( $p<0,01$ ) quando comparados ao grupo controle, indicativo de efeito panicolítico.

#### 4.2. EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE DOSES SUBEFETIVAS DE NOR-BNI E 8-OHDPAT NA SCPd DE RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA

Na figura 4, observa-se os resultados obtidos após a microinjeção associada de doses subefetivas de Nor-BNI (3,4 nmol) e 8-OHDPAT (0,8 nmol) intra-SCPd em ratos submetidos ao teste da estimulação elétrica da SCPd.



**Figura 4:** Efeito da microinjeção intra-SCPd (0,2 $\mu\text{l}$ /120s) do antagonista específico  $\kappa$  opioide, Nor-BNI (3,4 nmol), 10 min. antes da microinjeção intra-SCPd do agonista serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OHDPAT (0,8 nmol), sobre a variação do limiar de fuga em ratos submetidos ao teste de estimulação elétrica da SCPd. n= 5-7, \*p<0,01 comparado ao grupo salina.

Na análise do limiar de fuga, ANOVA de um fator mostrou efeito significativo [ $F_{(1,26)}=31,07$ ,  $p<0,01$ ] e a análise pós-teste utilizando teste de comparações múltiplas de Duncan mostrou aumento significativo na variação do limiar de fuga no tratamento com associação de Nor-BNI 3,4 nmol e 8-OHDPAT 0,8 nmol ( $p<0,01$ ) quando comparados ao grupo controle, indicativo de efeito panicolítico.

## 5. DISCUSSÃO

A investigação de aspectos modulatórios, exercidos por mecanismos opioides e serotoninérgicos, tem sido foco de atenção de pesquisas com o objetivo de esclarecer a neurotransmissão que modulam o sistema aversivo no mesencéfalo dorsal (EICHENBERGER e col., 2002; OSAKI e col., 2003).

Evidências mostram que indivíduos com deficiência nos mecanismos serotoninérgicos e opioide são susceptíveis ao aparecimento de ataques de pânico e que a SCPd assume um papel primordial na regulação destes ataques (GRAEFF, 2012).

Porém, estudos ainda são necessários para estabelecer os diferentes tipos de receptores opioides envolvidos no pânico e sua interação com receptores 5-HT<sub>1A</sub> na SCPd (GRAEFF, 2012).

Assim, em continuidade aos estudos conduzidos em nosso laboratório, que avaliam a interação do sistema opioide e 5-HT na SCPd, o presente trabalho foi realizado com o intuito de verificar a participação de receptores  $\kappa$  opioides e sua interação com receptores 5-HT<sub>1A</sub> na SCPd em ratos submetidos ao teste da estimulação elétrica, um modelo animal para o estudo da fisiopatologia e do tratamento do transtorno do pânico.

Sabe-se que pequenas doses de morfina microinjetadas na SCPd atenuam, de uma forma dependente da dose, as respostas defensivas obtidas através de estimulação elétrica dessa estrutura (JENCK e col., 1983; 1986; BRANDÃO e col., 1985; 1990).

Trabalhos realizados posteriormente mostraram que a administração de baixas doses de morfina na SCPd, causam efeitos antiaversivos, enquanto altas doses de morfina provocam efeitos pró-aversivos no teste do labirinto em cruz elevado, o que sugere envolvimento de diferentes subtipos de receptores ou de mecanismos de ação no sistema aversivo (MOTTA; BRANDÃO, 1993).

Os efeitos antiaversivos da morfina parecem ser mediados por mecanismos opioides, já que a naloxona, um antagonista opioide não seletivo, mas com predominante afinidade por receptores  $\mu$ , inibiu esse efeito na SCPd. Enquanto que os efeitos pró-aversivos de alta dose de morfina não foram afetados pelo bloqueio de receptores  $\mu$ , mas foram mimetizados por agonista opioide  $\kappa$ . Além disso, Nor-BNI, um antagonista  $\kappa$  opioide, inibiu o efeito ansiogênico produzido pela microinjeção de altas doses de morfina na SCPd (NOBRE e col., 2000).

O tratamento com Nor-BNI, intra-SCPd, em ratos submetidos ao teste da estimulação elétrica na SCPd, mostrou aumento do limiar de fuga, indicando um efeito panicolítico e confirmando que o bloqueio de receptores  $\kappa$  opioides, promove efeitos antiaversivos.

Nossos resultados estão de acordo com estudos previamente realizados, já que se tem demonstrado que os efeitos antiaversivos produzidos pela microinjeção intra-SCPd de baixas doses de opioides são mediados pela ativação de receptores  $\mu$  opioides, enquanto que os efeitos aversivos de altas doses ocorrem, provavelmente, devido à ativação de receptores  $\kappa$  opioides (BECHARA; VAN DER, 1985; MUCHA; HERZ, 1985; BALS-KUBIK e col., 1989; MOTTA e col., 1995; ANSELONI e col., 1999; NOBRE e col., 2000; SANTE e col., 2000;).

De acordo com estas evidências, resultados mostram que a microinjeção intra-SCPd de U50488H, um agonista  $\kappa$  opioide, produziu efeito ansiogênico em ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado e que este efeito se deve, provavelmente, à ativação de receptores  $\kappa$  opioides, já que foi inibido pelo antagonista Nor-BNI (MOTTA e col., 1995).

No presente estudo também foi realizado a microinjeção, intra-SCPd de ratos, do agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OHDPAT, que provocou aumento dos limiares de fuga determinados pela estimulação elétrica da SCPd, mostrando um efeito panicolítico.

Estes resultados confirmam as evidências do envolvimento de receptores 5-HT<sub>1A</sub> na modulação da ação antiaversiva da 5-HT na SCPd (BEHBEHANI e col., 1993; NOGUEIRA E GRAEFF, 1995; BECKETT; MARSDEN, 1997).

A 5-HT desempenha um papel inibitório no sistema cerebral aversivo. Vários estudos têm apontado para um papel antiaversivo da 5-HT na SCPd, através de estudos de efeitos de microinjeções de agonistas e antagonistas sobre os limiares aversivos determinados por estimulação elétrica dessa região (SCHUTZ e col., 1985; BECKETT e col., 1992).

Sabe-se que esta modulação exercida pela 5-HT sobre o comportamento defensivo induzido por estimulação elétrica da SCPd acontece de forma fásica, o que implica em um controle inibitório somente em presença do estímulo aversivo ou do estímulo estressante (GRAEFF e col. 1993; GRAEFF, 2002; 2004; BRANDÃO e col., 2003).

Evidencia-se que receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> medeiam a ação inibitória da 5-HT no comportamento de fuga no teste do LTE (ZANOVELI e col., 2003; SOARES; ZANGROSSI, 2004).

Já que, a administração intra-SCPd do agonista 5-HT<sub>1A</sub> 8-OHDPAT e BAY-R1532, bem como de DOI (agonista preferencial 5-HT<sub>2A</sub>) diminuiu a aversão gerada por estimulação elétrica dessa estrutura. Os efeitos de 8-OHDPAT e BAY-R-1532 foram bloqueados pelo pré-tratamento intra-SCPd com NAN-190 (antagonista preferencial 5-HT<sub>1A</sub>). Por outro lado, o efeito do DOI foi bloqueado pela espiperona (antagonista preferencial 5-HT<sub>2A</sub>). Baseado nestes resultados, os autores sugeriram que os receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> atuam de forma cooperativa na regulação das respostas de fuga eliciadas por estimulação da SCPd (POPOVA e col., 1998; JACOB e col., 2002; SCHENBERG e col., 2001).

Os receptores dos peptídeos opioides endógenos estão anatomicamente localizados em posições estratégicas para controlar as respostas expressivas de medo e ansiedade, que reconhecidamente estão relacionadas aos transtornos da ansiedade (COLASANTI e col., 2011).

Pesquisas mostram que peptídeos opioides endógenos, indiretamente estimulam a liberação de 5-HT em áreas cerebrais como amígdala, hipocampo, córtex frontal (TAO; AUERBACH, 1995) e que, diferentes tipos de receptores opioides regulam a liberação de 5-HT pelos núcleos da rafe (TAO; AUERBACH, 2002), assim, a 5-HT liberada é controlada pela ativação de receptores opioides (ZANGEN e col., 1999). Além disso, estudos sugerem que a liberação de opioide endógenos é também controlada por ativação de 5-HT (SAPUN e col., 1981).

Roncon e colaboradores (2012) evidenciaram que a naloxona, bloqueia os efeitos panicolíticos produzidos pela fluoxetina, após tratamento por via intraperitoneal durante 21 dias e após sua administração intra-SCPd, sugerindo-se que o efeito panicolítico da fluoxetina é dependente de opioides endógenos que atuam na SCPd. E ainda, o pré-tratamento com naloxona, bloqueou o efeito panicolítico produzido pela 5-HT no teste do LTE, ambos microinjetados intra-SCPd, mostrando que a ação inibitória da 5-HT sobre neurônios localizados na SCPd é mediada por peptídeos opioides endógenos.

Demonstrou-se também que receptores  $\mu$  opioides interagem com receptores 5-HT<sub>1A</sub>, já que CTOP, um antagonista  $\mu$  opioide, antagonizou o efeito anti-fuga do 8-OHDPAT e, a administração combinada de doses subefetivas do agonista 5-HT<sub>1A</sub> com o agonista  $\mu$  opioide, DAMGO, aumentaram significativamente a latência de fuga no teste do LTE, o qual indica um efeito panicolítico (RONCON e col., 2013).

Com o propósito de verificar o envolvimento de subtipos de receptores opioides envolvidos nesta interação entre sistema serotoninérgico e opioide na SCPd no TP, o presente trabalho verificou o efeito da administração associada de doses subefetivas do antagonista específico  $\kappa$  opioide, Nor-BNI, com o agonista 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OHDPAT, ambos injetados intra-SCPd de ratos. Como resultado desta associação, obteve-se um aumento do limiar de fuga no teste da estimulação elétrica, indicativo de efeito panicolítico.

Estes resultados mostram que os receptores  $\kappa$  estão envolvido na aversão e que atuam de forma cooperativa com receptores 5-HT<sub>1A</sub> na regulação de respostas de fuga eliciadas por estimulação elétrica da SCPd.



## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que o bloqueio de receptores  $\kappa$  e a ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> da SCPd de ratos, através da microinjeção de Nor-BNI e 8-OHDPAT, respectivamente, provocaram um efeito panicolítico no teste da estimulação elétrica.

A associação das doses subefetivas de Nor-BNI e 8-OHDPAT provocaram um efeito antiaversivo no mesmo teste, sugerindo que existe uma interação entre os receptores opioides  $\kappa$  e serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> na regulação de respostas de fuga provocadas por estimulação elétrica da SCPd.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade L, Walters EE, Gentil V, LAURENTI R 2002. Prevalence of ICD-10 mental disorders in a catchment area in the city of São Paulo, Brazil. *Social and Psychiatry Epidemiology* 37: 316-25.
- Anseloni VC, Coimbra NC, Morato S, Brandão ML 1999. A comparative study of the effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray and nucleus accumbens of rats submitted to the elevated plus-maze test. *Experimental Brain Research* 129: 260–268.
- Associação Psiquiátrica Americana 2000. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4<sup>a</sup> ed, Text Revision. Washington, DC.
- Associação Psiquiátrica Americana 2002. *DSM-IV: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais*. 4a. ed., texto revisado. Porto Alegre: Artmed.
- American Psychiatric Association 2006. *Practice guidelines for treatment of psychiatric disorders: compendium 2006*. Arlington: American Psychiatric Association Press, p 945-1002.
- Baldessarini RJ 2006. Drug therapy of depression and anxiety disorders. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL *Goodman & Gilman's the pharmacologic basis of therapeutic*. 11th ed. New York: McGraw-Hill, p 445-449.
- Bals-Kubik R, Herz A, Shippenberg TS 1989. Evidence that the aversive effects of opioid antagonists and kappa-agonists are centrally mediated. *Psychopharmacology (Berlin)* 98: 203-206.
- Barnes NM, Sharp T 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38: 1083-1152.
- Bechara A, Van Der KD 1985. Opposite motivational effects of endogenous opioids in brain and periphery. *Nature* 314: 533-534.
- Beckett SRG, Lawrence AJ, Marsden CA, Marshal PW 1992. Attenuation of chemically induced defence response by 5-HT<sub>1</sub> receptor agonists administered into the periaqueductal gray. *Psychopharmacology* 108:110–114.
- Beckett S, Marsden CA 1997. The effect of central and systemic injection of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OHDPAT and the 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist WAY-100635 on periaqueductal grey-induced defence behavior. *Journal Psychopharmacology* 11(1): 35-40.
- Behbehani MM, Liu H, Jiang M, Pun RYK, Shipley MT 1993. Activation of serotonin<sub>1A</sub> receptors inhibits midbrain periaqueductal grey neurons of the rat. *Brain Research* 612: 56-60.
- Bernik AM, Minnuttentag NW 2004. Farmacoeconomia. In: Hetem LAB, Graeff FG *Transtornos de Ansiedade*. São Paulo: Editora Ateneu.
- Berrocoso E, Mico JA 2009. Cooperative opioid and serotonergic mechanisms generate superior antidepressant-like effects in amice model of depression. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 12: 1–12.

- Berrocoso E, Sanchez-Blazquez P, Garzon J, Mico JA 2009. Opiates as Antidepressants. *Current Pharmaceutical Design* 15: 1612-1622.
- Blanchard DC, Blanchard RJ 1988. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology* 39: 43-68.
- Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ 2001. Mouse Defense Behavioral: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience and Behavioral Reviews* 25: 205-218.
- Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ 2003. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *European Journal of Pharmacology* 463: 97-116.
- Bandler R, Carrive P, Depaulis A 1991. Emerging principles of organization of the midbrain periaqueductal gray matter. In: Depaulis A, Bandler R (eds) *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter Functional, Anatomical, and Neurochemical Organization*. New York: Plenum, p 1-8.
- Bandler R, Shipley MT 1994. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression. *Trends Neuroscience* 17(9): 379-389.
- Brandão ML, Aguiar JC, Graeff FG 1982. Gaba mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 16: 397-402.
- Brandão ML, Cabral AM, Vasquez EC, Schmitt P 1985. Chlordiazepoxide and morphine reduce pressor response to brain stimulation in awake rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 23:1069-1071.
- Brandão ML, Tomaz C, Borges PCL, Coimbra NC, Bagri A 1988. Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. *Physiology and Behaviour* 44: 361–365.
- Brandão ML, Coimbra NC, Leão-Borges PC 1990. Effects of morphine and midazolam on reactivity to peripheral noxious and central aversive stimuli. *Neuroscience Biobehavior Review* 14: 495-499.
- Brandão ML, Anseloni VZ, Pandóssio JE, De Araújo JE, Castilho VM 1999. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neuroscience Biobehavior Review* 2: 863-75.
- Brandão ML, Vianna DM, Masson S, Santos J 2003. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. *Revista Brasileira Psiquiatria* 25(2): 36-41.
- Brandão ML, Zanoveli JM, Ruiz-Martinez RC, Oliveira LC, Landeira-Fernandez J 2008. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. *Behavioural Brain Research* 188(1): 1–13.
- Campos AC, Fogaca MV, Aguiar DC, Guimaraes FS 2013. Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 35(2): S101-S111.
- Cardoso SH, Coimbra NC, Brandão ML 1994. Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. *Behavioural Brain Research* 63: 17.

Carrive NS 1993. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neural organization. *Behavioural Brain Research* 58(1-2): 27-47.

Coimbra NC, Eichenberger GCD, Gorchinski RT, Maissonette S 1996. Effects of the blockade of opioid receptor on defensive reactions elicited by electrical stimulation within the deep layers of the superior colliculus and DPAG. *Brain Research* 736: 348-352.

Coimbra NC, Brandão ML 1997. Effects of 5-HT<sub>2</sub> receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. *Behavioral Brain Research* 87: 97-103.

Coimbra NC, Kawasaki MC, Ciscato Jr JG, Cardoso SH, Corrêa SAL 1998. Nigrotectal pathway: Neuroanatomy and role on defensive behavior elicited by midbrain tectum stimulation. *Society for Neuroscience Abstract* 24: 1930.

Coimbra NC, Osaki MY, Eichenberger GCD, Ciscato JG Jr, Jucá CEB, Biojone CR 2000. Effects of opioid receptor blockade on defensive behavior elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior colliculus in *Rattus norvegicus*. *Psychopharmacology* 152: 422-430.

Colasanti A, Rabiner EA, Lingford-Hughes A, Nutt DJ 2011. Opioids and anxiety. *Journal of Psychopharmacology* 25: 1415-1433.

Deakin JWF, Graeff FG 1991. 5-HT and mechanisms of defence. *Journal of Psychopharmacology* 5(4): 305-315.

De Bortoli VC, Nogueira RL, Zangrossi H Jr 2006. Effects of fluoxetine and buspirone on the panicolytic-like response induced by the activation of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology* 183: 422- 428.

De Vry J 1995. 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists : recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology* 121: 1-26.

Eichenberger GCD, Ribeiro SJ, Osaki MY, Maruoka RY, Resende GCC, Castellán-Baldan L e col 2002. Neuroanatomical and psychopharmacological evidence for interaction between opioid and GABAergic neural pathways in the modulation of fear and defense elicited by electrical and chemical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray matter. *Neuropharmacology* 42: 48 – 59.

Fanselow MS 1991. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: Depaulis A, Bandler R (eds) *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter Functional, Anatomical, and Neurochemical Organization*. New York: Plenum, p 151-173.

Fernandez De Molina A, Hunsperger RW 1959. Central representation of affective reaction in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis and adjacent structures. *Journal of Physiology* 145: 251-265.

Graeff FG 1990. Brain defense systems and anxiety. In: Burrows GD, Roth M, Noyes JR *Handbook of anxiety: the Neurobiology of anxiety*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p 307–354.

Graeff FG, Viana MB, Tomaz C 1993. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 26: 67–70.

Graeff FG, Silveira MCL, Nogueira RL, Audi EA, Oliveira RMW 1993. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behavioural Brain Research* 58: 123-131.

Graeff FG, Brandão ML 1999. *Neurobiologia das Doenças Mentais*. São Paulo: Editora Lemos, p 188.

Graeff FG 2002. On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology* 163: 467-476.

Graeff FG, Zangrossi H Jr 2002. Animal models of anxiety disorders. In: D'haenem H, Den-Boer JA, Westenberg H, Willner P *Textbook of Biological Psychiatry Willey*. London, p 879-893.

Graeff FG 2003. Serotonina, material cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. *Revista Brasileira Psiquiatria* 25(2): 41-45.

Graeff FG 2004. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28: 239-259.

Graeff FG, Del-Ben CM 2008. Neurobiology of panic disorder: From animal models to brain neuroimaging. *Neuroscience e Biobehavioral Reviews* 32(7): 1326-1335.

Graeff FG 2012. New perspective on the pathophysiology of panic: merging serotonin and opioids in the periaqueductal gray. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 45: 366-375.

Gray JA, Mcnaughton N 2000. The neuropsychology of anxiety. *Oxford: Oxford University Press*.

Inoue T, Tsuchiya K, Koyama T 1996. Serotonergic activation reduces defensive freezing in the conditioned fear paradigm. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 53: 825-831.

Jacob CA, Cabral AHCL, Almeida LP, Magrerik V, Ramos PL, Zanoveli JM, Fernandez JL, Zangrossi H Jr, Nogueira RL 2002. Chronic imipramine enhances 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptor-mediated inhibition of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 72: 761-766.

Jenck F, Schmitt P, Karli P 1983. Morphine applied to the mesencephalic central gray suppresses brain stimulation escape. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 19: 301-308.

Jenck F, Schmitt P, Karli P 1986. Morphine injected into the periaqueductal gray attenuates brain stimulation-induced effects: An intensity discrimination study. *Brain Research* 378: 274-284.

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 Research* 57: 181–191.

- Keller MB 2005. Issues in treatment-resistant depression. *Journal of Clinical Psychiatry* 66: 5-12.
- Kessler RC, Chiu WT, Jin R, Ruscio AM, Shear K, Walters EE 2006. The epidemiology of panic attacks, panic disorder, and agoraphobia in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of General Psychiatry* 63: 415-24.
- Kiser RS, Lebovitz RM 1975. Monoaminergic mechanism in aversive brain stimulation. *Physiology and Behavior* 15: 47-53.
- Kiser RS, German DC, Lebovitz RM 1978. Serotonergic reduction of dorsal central gray area stimulation-produced aversion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 9: 27-31.
- Klein DF 1993. False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions: an integrative hypothesis. *Archives of General Psychiatry* 50: 306-17.
- Lawlor T, Lazare A 1989. Anxiety. In: Lazare A *Outpatient psychiatry: Diagnosis and Treatment*. Baltimore: Wilians and Wilkins, p 246-251.
- Leão-Borges PC, Coimbra NC, Brandão ML 1988. Independence of aversive and pain mechanism in the dorsal periaqueductal gray matter of the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 21: 1027-1031.
- Lovick TA, Parry DM, Stezhka VV, Lumb BM 2000. Serotonergic transmission in the periaqueductal gray matter in relation to aversive behaviour: morphological evidence for direct modulatory effects on identified output neurons. *Neuroscience* 95: 763-772.
- Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ 1987. Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *Journal of Neuroscience* 7: 2445-2464.
- Mari JJ, Jorge MR, Kohn R 2006. Epidemiologia dos transtornos psiquiátricos em adultos. In: De Mello MF, de Mello AA, Kohn R *Epidemiologia da Saúde Mental no Brasil*. Porto Alegre: Artmed, p 119-42.
- Marseillan RF 1977. A solid state sine-wave stimulator. *Physiology and Behavior* 19: 39-40.
- Massion AO, Warshaw MG, Keller MB 1993. Quality of life and psychiatric morbidity in panic disorder and generalized anxiety disorder. *The American Journal of Psychiatry* 150: 600-607.
- Melo LL, Cardoso SH, Brandão ML 1992. Antiaversive action of benzodiazepines on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Physiology Behaviour* 51(3): 557-62.
- Mezzasalma MA, Valença AM, Lopes FL, Nascimento I, Zin WA 2004. Neuroanatomia do transtorno do pânico. *Revista Brasileira Psiquiatria* 26(3): 202-206.
- Morgan MM, Whitney PK, Gold MS 1998. Immobility and flight associated with antinociception produced by activation of the ventral and lateral/dorsal regions of the rat periaqueductal gray. *Brain Research* 804: 159-166.

Motta V, Brandão ML 1993. Aversive and antiaversive effects of morphine in the periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 44:119-125.

Motta V, Penha K, Brandão ML 1995. Effects of microinjections of  $\mu$  and  $\kappa$ -receptor agonists into the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the plus-maze test. *Psychopharmacology* 120: 470-474.

Mucha RF, Herz A 1985. Motivational properties of kappa and mu opioid receptor agonist studied with place and taste preference conditioning. *Psychopharmacology (Berlin)* 86: 274-280.

Nashold Jr BS, Wilson WP, Slaughter DG 1969. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *Journal of Neurosurgery* 30: 14-24.

Nashold Jr BS, Wilson WP, Slaughter DG 1974. The midbrain and pain. In: Bonica JJ *Advance Neurology*, 4<sup>th</sup>. New York: Raven Press, p 191–196.

Nobre MJ, Santos NR, Aguiar MS, Brandão ML 2000. Blockade of  $\mu$ - and activation of  $\kappa$ -opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray matter produce defensive behavior in rats tested in the elevated plus-maze. *European Journal of Pharmacology* 404: 145-151.

Nogueira RL, Graeff FG 1995. Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 52(1): 1-6.

Olds ME, Olds J 1962. Approach–escape interactions in rat brain. *American Journal of Physiology* 203: 803–810.

Osaki MY, Castellan-Baldan L, Calvo F, Carvalho AD, Felippotti TT, Oliveira R, Ubiali WA, Paschoalin-Maurin T, Elias-Filho DH, Motta V, Silva LA, Coimbra NC 2003. Neuroanatomical and neuropharmacological study of opioid pathways in the mesencephalic tectum: effect of  $\mu$ 1- and  $\kappa$ -opioid receptor blockade on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Research* 992: 179– 192.

Passchier J, Van Waarde A 2001. Visualisation of serotonin-1A (5-HT<sub>1A</sub>) receptors in the central nervous system. *European Journal of Nuclear Medicine* 28(1): 113-129.

Paxinos G, Watson C 2005. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.

Popova NK, Avgustinovich DF, Kolpakov VG, Plvsnina IZ 1998. Specific [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT Binding in Brain Regions of Rats Genetically Predisposed to Various Defense Behavior Strategies. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 59(4): 793-797.

Popova NK 2004. The role of brain serotonin in the expression of genetically determined defensive behavior. *Genetika* 40(6): 770-778.

Preter M, Klein DF 2008. Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 32: 603–612.

Preter M, Lee SH, Petkova E, Vannuccl 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. *Psychological Medicine* 41: 385–393.

Regier DA, Rae DS, Narrow WE, Koelber CT, Schatzberg AF 1998. Prevalence of anxiety disorders and their comorbidity with mood and addictive disorders. *British Journal of Psychiatry* 173: 24-28.

Ribeiro SJ, Ciscato Jr JG, De Oliveira R, De Oliveira RC, D'ângelo-Dias R, Carvalho AD, Felippotti TT, Rebouças ECC, Castellan-Baldan L, Hoffmann A, Corrêa SAL, Moreira JE, Coimbra NC 2005. Functional and ultrastructural neuroanatomy of interactive intratectal/tectonigral mesencephalic opioid inhibitory links and nigrotectal GABAergic pathways: Involvement of GABAA and m1-opioid receptors in the modulation of panic-like reactions elicited by electrical stimulation of the dorsal midbrain. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 30: 184–200.

Roncon CM, Biesdorf C, Santana RG, Zangrossi H Jr, Graeff FG, Audi EA 2012. The panicolytic-like effect of fluoxetine in the elevated T maze is mediated by serotonin-induced activation of endogenous opioids in the periaqueductal gray. *Journal of Psychopharmacology* 26(4): 525-531.

Roncon CM, Biesdorf C, Coimbra NC, Zangrossi H Jr, Graeff FG, Audi EA 2013. Cooperative regulation of anxiety and panic-related defensive behaviors in the rat periaqueductal grey matter by 5-HT1A and  $\mu$ -receptors. *Journal of Psychopharmacology* 27 (12): 1141-1148.

Rosenberg R, Ottosson JO, Bech P, Mellergard M, Rosenberg NK 1991. Validation criteria for panic disorder as a nosological entity. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 365: 7-17.

Ross J, Ávila MAV, Ruggiero RN, Nobre MJ, Brandão ML, Castilho VM 2009. The unconditioned fear produced by morphine withdrawal is regulated by  $\mu$ - and  $\kappa$ -opioid receptors in the midbrain tectum. *Behavioural Brain Research* 204: 140–146.

Sante AB, Nobre MJ, Brandão ML 2000. Place aversion induced by blockade of mu or activation of kappa opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray matter. *Behavioral Pharmacology* 11: 583–9.

Sapun DI, Farah JM, Mueller GP 1981. Evidence that a serotonergic mechanism stimulates the secretion of pituitary beta-endorphin-like immunoreactivity in the rat. *Endocrinology* 109: 421-426.

Schenberg LC, Graeff FG 1978. Role of periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 9: 287-295.

Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudre EC, Vargas LC 2001. Modeling panic attacks. *Neuroscience and Biobehavioral* 25: 647-659.

Schütz MTB, Aguiar JC, Graeff FG 1985. Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. *Psychopharmacology* 85: 340-345.

Sinha SS, Goetz RR, Klein DF 2007. Physiological and behavioral effects of naloxone and lactate in normal volunteers with relevance to the pathophysiology of panic disorder. *Psychiatry Research* 149: 309–314.



Soares VP, Zangrossi H Jr 2004. Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Research Bulletin* 64: 181-188.

Tao R, Auerbach SB 1995. Involvement of the dorsal raphe but not median raphe nucleus in morphine-induced increase in serotonin release in the forebrain. *Neuroscience* 68: 553-561.

Tao R, Auerbach SB 2002. Opioid Receptor Subtypes Differentially Modulate Serotonin Efflux in the Rat Central Nervous System. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 303: 549-556.

Teixeira AL, Quevedo J 2013. Animal models in psychiatry. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 35(2): S73-S74.

Vianna DML, Landeira-Fernandez J, Graeff FG, Brandão ML 2001. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. *Learning and Memory* 8: 164-169.

Vicente MA, Zangrossi H Jr 2011. Serotonin-2C receptors in the basolateral nucleus of the amygdala mediate the anxiogenic effect of acute imipramine and fluoxetine administration. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 14: 1-12.

Young RF 1989. Brain and spinal stimulation: how and to whom. *Clinical Neurosurgery* 35: 429-447.

Zangen A, Nakash R, Yadid G 1999. Serotonin-mediated increases in the extracellular levels of beta-endorphin in the arcuate nucleus and nucleus accumbens: a microdialysis study. *Journal of Neurochemistry* 73: 2569-2574.

Zanoveli JM, Nogueira RL, Zangrossi H Jr 2003. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. *European Journal of Pharmacology* 473: 153-161.

Zanoveli JM, Nogueira RL, Zangrossi H Jr 2007. Enhanced reactivity of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the rat dorsal periaqueductal gray matter after chronic treatment with fluoxetine and sertraline : evidence from the elevated T-maze. *Neuropharmacology* 52: 1188-1195.

Zanoveli JM, Pobbe RLH, De Bortoli VC, Carvalho MC, Brandão ML, Zangrossi H Jr 2010. Facilitation of 5-HT<sub>1A</sub>-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 13: 1079-1088.