



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VIVIANE BATISTA ESTRADA

**PARTICIPAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO
NORADRENÉRGICA NA SUBSTÂNCIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSAL NA MODULAÇÃO DA
ANSIEDADE EM RATOS EXPOSTOS AO LABIRINTO EM T-
ELEVADO**

Londrina
2015

VIVIANE BATISTA ESTRADA

**PARTICIPAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO
NORADRENÉRGICA NA SUBSTÂNCIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSAL NA MODULAÇÃO DA
ANSIEDADE EM RATOS EXPOSTOS AO LABIRINTO EM T-
ELEVADO**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, associada à Universidade Estadual de Londrina-PR, como requisito para a obtenção do título de mestre em ciências fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gislaine Garcia Pelosi Gomes.

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

E82p Estrada, Viviane Batista.
Participação da neurotransmissão noradrenérgica na Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal na modulação da ansiedade em ratos expostos ao labirinto em T-Elevado / Viviane Batista Estrada. – Londrina, 2015.
39 f. : il.

Orientadora: Gislaine Garcia Pelosi Gomes.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Noradrenalina – Teses. 2. Ansiedade – Teses. 3. Pânico – Teses. 4. Sistema nervoso central – Teses. 5. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Gomes, Gislaine Garcia Pelosi. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Sociedade Brasileira de Fisiologia. IV. Título.

CDU 612: 616.89-008.441

VIVIANE BATISTA ESTRADA

**PARTICIPAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO NORADRENÉRGICA NA
SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL NA
MODULAÇÃO DA ANSIEDADE EM RATOS EXPOSTOS AO
LABIRINTO EM T-ELEVADO**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, associada à Universidade Estadual de Londrina-PR, como requisito para a obtenção do título de mestre em ciências fisiológicas.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Gislaine Garcia Pelosi
Gomes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^{fa}. Dr^a. Daniele Cristina de Aguiar
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Prof^{fa}. Dr^a Karen Barros Parron Fernandes
Universidade do Norte do Paraná – UNOPAR

Londrina, 09 de março de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais
Atílio Estrada e Marina Batista
Estrada (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos a DEUS por propiciar tantas oportunidades e por colocar em meu caminho pessoas amigas e preciosas.

Aos meus pais, Atílio meu maior incentivador e Marina (*in memoriam*) pelo esforço para que este dia acontecesse.

A meu querido esposo, Diego, por seu companheirismo, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor.

A meus irmãos e cunhadas por estarem sempre ao meu lado.

A minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Gislaine Garcia Pelosi Gomes pela constante e valiosa orientação neste trabalho, pela sua paciência, confiança, incentivo e amizade.

Aos meus colegas de laboratório pela grande ajuda na realização dos experimentos e pelas brincadeiras que tornaram mais leve meu trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina e a CAPES pela concessão de bolsas que possibilitou a realização deste trabalho.

Estrada, Viviane Batista. **Participação da neurotransmissão noradrenérgica na Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal na modulação da ansiedade em ratos expostos ao Labirinto em T-Elevado**. 2015. 39 f. Dissertação (Mestrado em Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015

RESUMO

Dentre os transtornos de ansiedade, o pânico e a ansiedade generalizada têm alta prevalência ao longo da vida. A Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal (SCPd) está envolvida na modulação de respostas comportamentais e, embora apresente terminais noradrenérgicos, poucos estudos têm investigado o papel da noradrenalina (NA) nessa estrutura frente a modulação da ansiedade. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da microinjeção de NA e antagonistas não seletivo β -adrenérgico e seletivos $\alpha 1$ e $\alpha 2$ -adrenérgico (propranolol, WB4101 ou RX821002, respectivamente) na SCPd de ratos submetidos ao Labirinto em T Elevado (LTE). Ratos Wistar foram submetidos à implantação de cânula-guia na SCPd destinada a microinjeções de NA (3, 15, ou 45 nmol/50nl), dos antagonistas noradrenérgicos nas doses de 4, 8, 12nmol/50nl ou de líquido cefalorraquidiano artificial. A administração de NA e dos antagonistas de receptores $\alpha 2$ e β -adrenérgicos intra SCPD diminuiu o comportamento de esquiva inibitória no LTE sugerindo um efeito ansiolítico, sem alterar a fuga. Além disso, a microinjeção de NA e dos antagonistas não modificaram a atividade exploratória geral dos animais submetidos ao teste de campo aberto, indicando que o resultado ansiolítico não é decorrente de um aumento da atividade exploratória. Os resultados sugerem o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica na SCPd com a modulação do comportamento de ansiedade em animais submetidos ao LTE.

Palavras-chave: Noradrenalina. Substância cinzenta periaquedutal. Labirinto em T elevado. Ansiedade. Pânico.

Estrada, Viviane Batista. **Participação da neurotransmissão noradrenérgica na Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal na modulação da ansiedade em ratos expostos ao Labirinto em T-Elevado**. 2015. 39 p. Dissertation (Mestrado em Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – State University of Londrina, Londrina, 2015

ABSTRACT

Among anxiety disorders, panic and generalized anxiety have a high prevalence throughout life. The dorsal periaqueductal gray matter (dPAG) is involved in the modulation of behavioral responses, and despite displaying noradrenergic terminals, few studies have investigated the role of noradrenaline (NA) in that structure on anxiety modulation. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of microinjection of NA and non-selective β -adrenergic antagonists and selective α_1 and α_2 -adrenergic (propranolol, WB4101 or RX821002, respectively) in the dPAG of rats submitted to Elevated t-maze (ETM). Rats were subjected to the implantation of the cannula guide intended to dPAG NA microinjection (3, 15, or 45 nmol / 50NL) of noradrenergic antagonists in doses of 4, 8, 12nmol/50NL or artificial cerebrospinal fluid. The administration of NA and α_2 receptor antagonists and β -adrenergic intra dPAG decreased the inhibitory avoidance behavior in ETM suggesting an anxiolytic effect without changing leak. In addition, microinjection of NA and antagonists did not change the general exploratory activity of the animals submitted to the open field test, indicating that the anxiolytic result is not due to an increase in exploration activity. The results suggest the involvement of noradrenergic neurotransmission in dPAG with the modulation of anxiety behavior in animals with ETM.

Keywords: Norepinephrine. Periaqueductal gray. Elevated t-maze. Anxiety. Panic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Labirinto em T-Elevado.....	15
Figura 2 – Campo Aberto.....	15
Figura 3 – Desenho experimental	18
Figura 4 – Etapas da avaliação comportamental no Labirinto em T-Elevado	18
Figura 5 – Local da Microinjeção na Substancia Cinzenta Periaquedutal Dorsal	20
Figura 6 – Efeito (Média±EPM) na latência (s) da esQUIVA inibitória (A) e fuga (B) após a microinjeção de doses crescentes (3, 15 ou 45 nmol/50nL) de noradrenalina na SCPd de ratos (n=9/grupo) submetidos ao LTE. *p<0,05, quando comparado com o grupo de controle (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni)	22
Figura 7 – Efeito (Média±EPM) na latência (s) da esQUIVA inibitória (A) e fuga (B) após a microinjeção de doses crescentes (4, 8 ou 12 nmol/50nL) do antagonista β -noradrenérgico propranolol na SCPd de ratos (n=9/grupo) submetidos ao LTE. *p<0,05, quando comparado com o grupo de controle (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni).....	24
Figura 8 – Efeito (Média±EPM) na latência (s) da esQUIVA inibitória (A) e fuga (B) após a microinjeção de doses crescentes (4, 8 ou 12 nmol/50nL) do antagonista α_1 -noradrenérgico WB4101 na SCPd de ratos (n=9/grupo) submetidos ao LTE. p>0,05, quando comparado com o grupo de controle (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni).....	26
Figura 9 – Efeito (Média±EPM) na latência (s) da esQUIVA inibitória (A) e fuga (B) após a microinjeção de doses crescentes (4, 8 ou 12 nmol/50nL) do antagonista α_2 -noradrenérgico RX821002 na SCPd de ratos (n=7-9/grupo) submetidos ao LTE. *p<0,05, quando comparado com o grupo de controle (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni).....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade locomotora do rato no campo aberto	22
Tabela 2 - Atividade locomotora do rato no campo aberto	25
Tabela 3 - Atividade locomotora do rato no campo aberto	27
Tabela 4 - Atividade locomotora do rato no campo aberto	28

SUMÁRIO

1	Introdução	9
2	Objetivos	13
3	Métodos	14
	<i>Animais</i>	14
	<i>Drogas</i>	14
	<i>Aparatos utilizados</i>	14
	<i>Cirurgia Estereotáxica para implantação de cânula-guia</i>	16
	<i>Habituação</i>	16
	<i>Exposição prévia ao braço aberto do LTE</i>	16
	<i>Microinjeção de drogas na substância cinzenta periaquedutal dorsal</i>	17
	<i>Avaliação no LTE</i>	17
	<i>Avaliação no campo aberto</i>	17
	Protocolos experimentais	18
	<i>Protocolo 1. Efeito da microinjeção de noradrenalina na SCPd na resposta comportamental de ratos expostos ao LTE</i>	18
	<i>Histologia</i>	19
	<i>Análise estatística</i>	20
4	Resultados	21
	<i>Efeito da microinjeção de noradrenalina na SCPd na resposta comportamental de ratos expostos ao LTE</i>	21
	<i>Efeito da microinjeção dos antagonistas noradrenérgicos na SCPd na resposta comportamental de ratos expostos ao teste do LTE</i>	23
5	Discussão	29
6	Conclusão	33
	REFERÊNCIAS	34

1 Introdução

A ansiedade é um estado emocional subjetivamente vivenciado como desconfortável e não prazeroso gerado nas reações de defesa ocasionadas frente a estímulos ou condições indesejáveis que normalmente se encontram presentes no meio em que vivemos. É uma emoção básica presente desde a infância e adolescência que tipicamente não é patológica, mas indispensável a sobrevivência (PINE et al., 2009)

Em níveis apropriados, a ansiedade é importante para a motivação e desempenho do indivíduo ativando e mobilizando o organismo à sua adaptação ao ambiente (PRATT, 1992; GRAEFF, 1994, 1999). O limite entre o que se denomina ansiedade normal e patológica é muitas vezes difícil de determinar. Sabe-se que a ansiedade torna-se patológica quando a resposta ao estímulo recebido torna-se exagerada e irracional interferindo no funcionamento do indivíduo e perturbando acentuadamente o seu desempenho nas atividades do cotidiano (PRATT, 1992; GRAEFF, 1994, 1999).

Quando um animal se depara com uma ameaça ao seu bem estar, à sua integridade física ou até mesmo à sua sobrevivência, ele apresenta uma série de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam as reações de defesa (GRAEF; ZANGROSSI JR., 2002). Dependendo do nível de ameaça percebido (potencial, distal ou proximal) diferentes estratégias de defesa são realizadas (esquiva, fuga ou luta) e moduladas por diferentes áreas cerebrais. Disfunções nos sistemas cerebrais que regulam essas reações de defesa possivelmente levariam aos transtornos de ansiedade (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; GRAY; MCNAUGHTON, 2000).

Na tentativa de melhor entender este estado emocional, propostas associando reações específicas de defesa a determinados distúrbios de ansiedade reconhecidos clinicamente, tais como, a ansiedade generalizada e o distúrbio do pânico (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD et al., 1993; GRAY; MCNAUGHTON, 2000; BLANCHARD et al., 2001; GRAEFF; ZANGROSSI JR., 2002).

Os diferentes transtornos de ansiedade apresentam características comuns que seriam o medo excessivo e irracional. De acordo com a DSM-V, os transtornos de ansiedade incluem diagnósticos de agorafobia, transtorno de ansiedade social (fobia social), fobias específicas, transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e transtorno do pânico (TP) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Os transtornos de ansiedade estão associados a um índice de morbidade relativamente alta e a elevados custos individuais e sociais sendo a prevalência na população geral de TAG e TP de 3-5% e 2-5%, respectivamente (KESSLER et al., 2010).

Na neurobiologia da ansiedade, vias cerebrais como septo-hipocampal formam o chamado Sistema de Inibição Comportamental (SIC), o qual visa à aproximação do estímulo ameaçador - avaliação de risco (MCNAUGHTON; GRAY, 2000). Vias serotoninérgicas ascendentes do núcleo mediano da rafe (NMR) que se projetam para estas regiões estariam implicadas na gênese da inibição comportamental (AVANZI; BRANDÃO, 2001). O septo e o hipocampo também recebem aferências noradrenérgicas provenientes do locus coeruleus na ponte (KIM; FANSELOW, 1992). Segundo Davis, (1986) a NA também está envolvido no mecanismo neural do medo condicionado, ou seja, pode estar envolvida com o SIC.

O Hipotálamo medial, a SCPd, os colículos superior e inferior são estruturas do Sistema Cerebral Aversivo (SCA), conjunto de estruturas que modulam comportamentos relacionados ao medo, os quais buscam evitar ou afastar o animal da ameaça (fuga e luta). A ativação desse sistema por estimulação da NA vinda do locus coeruleus (LC) está relacionada a ataques de pânico. Ao lado disto, mecanismos serotoninérgicos vindos do NMR também modulam o funcionamento SCA, só que de maneira fásica (GRAEFF, 2002). Este sistema está sob a influência inibitória tônica do GABA. A amígdala parece integrar os dois sistemas (GRAEFF, 1990; BRANDÃO et al., 1999)

Neurotransmissores noradrenérgicos apresentam um papel relevante nos distúrbios de ansiedade (BREMNER et al., 1996; PELOSI et al., 2009b). Antidepressivos tricíclicos, inibidores da monoamina oxidase (MAO) e inibidores seletivos da recaptção de NA, que facilitam a atividade noradrenérgica, são utilizados no tratamento dos transtornos de ansiedade (BRUNELLO et al., 2003; KLEIN, 1964; YAMADA; YASUHARA, 2004).

A NA é um importante neurotransmissor central e periférico. No sistema nervoso central (SNC), os neurônios noradrenérgicos estão organizados em 7 grupos de células de A1 a A7 e estão localizados na região pontina e bulbar (DAHLSTRÖM; FUXE, 1964).

O grupo A6 é conhecido como LC, que em latim significa “lugar celeste”, devido à pigmentação azulada de suas células em cortes frescos, É o núcleo noradrenérgico mais importante com aferências para várias estruturas, incluindo a SCPd, e localizado bilateralmente no assoalho do quarto ventrículo na parte rostral da p (NIEUWENHUYIS, 1985).

Assim que a NA é liberada na fenda sináptica, ela interage com receptores específicos, chamados de adrenoreceptores, que são classificados nos tipos alfa- e beta-adrenérgicos (α , β) e respectivos subtipos (α 1A-B,D; α 2A-C; β 1-3) (ANAND; CHARNEY, 2000).

Os receptores α 1 e β -adrenérgicos estão localizados principalmente nos neurônios pós-sinápticos e são acoplados a uma proteína G excitatória, enquanto que os receptores α 2-adrenérgicos são autoreceptores, com ação principal de controlar a neurotransmissão pré ou pós-sinápticamente, inibindo o sistema noradrenérgico e reduzindo o nível de liberação de noradrenalina (JI et al. 2008; RANG et al., 2007).

A substância cinzenta periaquedutal (SCP), estrutura mesencefálica que circunda o aqueduto cerebral é subdividida anatômica e funcionalmente ao longo do eixo rostrocaudal em quatro colunas longitudinais paralelas ao aqueduto: a dorsomedial (SCPdm), a dorsolateral (SCPdl), a lateral (SCP_l) e a ventrolateral (SCPvl) (BANDLER et al., 1991). Sendo que a SCPd compreende a SCPdm e a SCPdl, regiões importantes no processamento do medo e ansiedade (BEHBEHANI, 1995).

A SCP recebe vias noradrenérgicas do LC e está envolvida na integração de respostas comportamentais e autonômicas das reações defensivas como fuga e esquiva inibitória, que são relacionadas com o pânico e a ansiedade generalizada, respectivamente (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; SCHENBERG et al., 2001; SULLIVAN et al., 1999). Estudos histoquímicos e farmacológicos evidenciaram terminais noradrenérgicos na SCP de ratos (FUXE, 1965). Trabalhos posteriores utilizando imuno-histoquímica constataram a presença da enzima tirozina-hidroxilase, responsável pela síntese de catecolaminas na SCP (KITAHAMA et al., 1988; PEARSON J, GOLDSTEIN M, 1979). Além disso, uma análise de diversas regiões cerebrais usando a técnica de hibridação *in situ* e estudos farmacológicos constataram a presença de receptores α -adrenérgicos e β -adrenérgicos na SCP (WANAKA, KIYAMA et al., 1989; JIANG, CHANDLER et al., 1992; NICHOLAS, PIERIBONE et al., 1993; PIERIBONE, NICHOLAS et al., 1994; BEHBEHANI, 1995; PASCHALIS, CHURCHILL et al., 2009).

A estimulação elétrica da SCPd é utilizada como modelo de pânico, já que sua estimulação causou comportamento relacionado a este distúrbio tanto em humanos, como em roedores (JENCK; MOREAU; MARTIN, 1995; NASHOLD JR; WILSON; SLAUGHTER, 1969).

Objetivando analisar a neurotransmissão intra SCPd frente à ansiedade, Pelosi e colaboradores (2009) estudaram no labirinto em cruz elevado (LCE), modelo vastamente utilizado para estudo da ansiedade generalizada (PELLOW et al., 1985; ZANGROSSI;

GRAEFF, 1997), o efeito da administração de NA. Os autores observaram um efeito ansiolítico nos ratos submetidos ao LCE, sugerindo uma modulação do sistema noradrenérgico na SCPd sobre o comportamento de ansiedade.

Vários modelos comportamentais são utilizados para o estudo da neurobiologia da ansiedade generalizada e do pânico, dentre eles, podemos citar o Labirinto em T-Elevado (LTE), derivado LCE, que pode gerar dois tipos de comportamentos defensivos em um mesmo animal: a esquiva inibitória e a fuga (GRAEFF, NETTO, AND ZANGROSSI, 1998; ZANGROSSI AND GRAEFF, 1997). Devido às exposições repetidas ao LTE o animal aprende a esquivar-se do braço aberto, num comportamento conhecido como resposta condicionada de medo, fazendo com que as medidas de latência sejam crescentes (GRAEFF; VIANA; TOMAZ, 1993; VIANA; TOMAZ; GRAEFF, 1994; ZANGROSSI; GRAEFF, 1997)

Diante da relevância em se compreender a neurobiologia da ansiedade e do escasso conhecimento a respeito do papel da NA nessa condição, o presente estudo objetiva-se a avaliar o papel da neurotransmissão noradrenérgica na SCPd frente a comportamentos defensivos de fuga e esquiva inibitória no LTE.

2 Objetivos

O presente estudo objetivou-se a avaliar:

1. O efeito da administração de noradrenalina na SCPd de animais expostos ao LTE;
2. O efeito do bloqueio de receptores noradrenérgicos na mediação das respostas comportamentais causadas pela exposição ao LTE.

3 Métodos

Animais

Foram utilizados ratos Wistar, com peso corporal de 240-250g (n= 134) no início das sessões experimentais, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (Paraná, Brasil). Os animais foram alojados na quantidade de 5 (cinco) por caixa de polipropileno (38 x 32 x 18 cm) em sala com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e programa de iluminação artificial ativado (luzes acesas às 7h e apagadas às 19h). Os animais receberam água e comida *ad libitum* durante todo o experimento. Os procedimentos foram realizados com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (nº15126.2013.99). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento do animal.

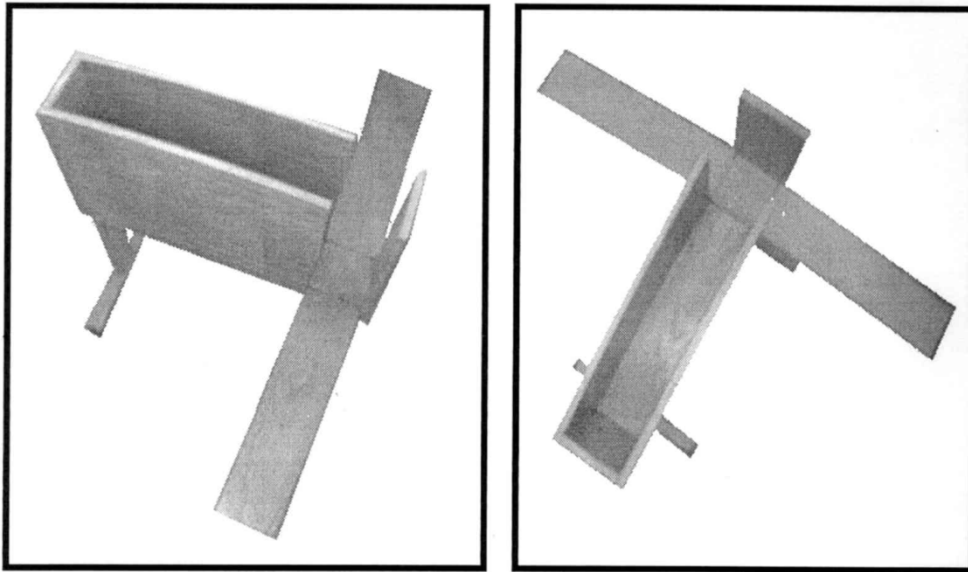
Drogas

Cloreto de noradrenalina (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) nas doses de 3, 15 e 45nmol/50nl (Pelosi 2009); Antagonistas: WB4101, antagonista seletivo para receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos, e RX821002, antagonista seletivo para receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos, (TOCRIS, Westwoods Business Park Ellisville, St. Louis, Missouri, EUA); Propranolol, antagonista não-seletivo para receptores β -adrenérgicos (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) ambos nas doses de 4, 8 e 12nmol/50nl (Dados não publicados); Veículo: líquido cefalorraquidiano artificial (NaCl 100mM; Na_3PO_4 2mM; KCl 2,5mM; MgCl_2 1,0mM; NaHCO_3 27mM; CaCl_2 2,5mM; pH=7,4) no qual a NA e os antagonistas foram dissolvidos; Anestésicos: Tribromo-cloro-etanol (AldrichChemicalCo. Inc., Milwaukee, EUA, 250 mg / kg intraperitoneal) e Uretana (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA, 1.25 g / kg intraperitoneal); Antibiótico: estreptomicinas e penicilinas (Pentabiótico, Fontoura-Wyeth, São Paulo, Brazil, 80.000 UI, intramuscular); Anti-inflamatório: flunixinina meglumina (Banamine, Schering Plough, New Jersey, EUA, 2,5 mg/kg, subcutâneo).

Aparatos utilizados

LTE: É constituído por três braços de madeira de mesmas dimensões (50 cm de comprimento por 10 cm de largura), elevados 50 cm em relação ao solo (Figura 1). Um dos braços é circundado por paredes laterais (40 cm de altura) e está disposto perpendicularmente à dois outros braços que permanecem desprovidos de paredes. Para evitar a queda dos animais, os braços abertos são delimitados por uma proteção de 1 cm de altura (Graeff, Viana et al. 1993).

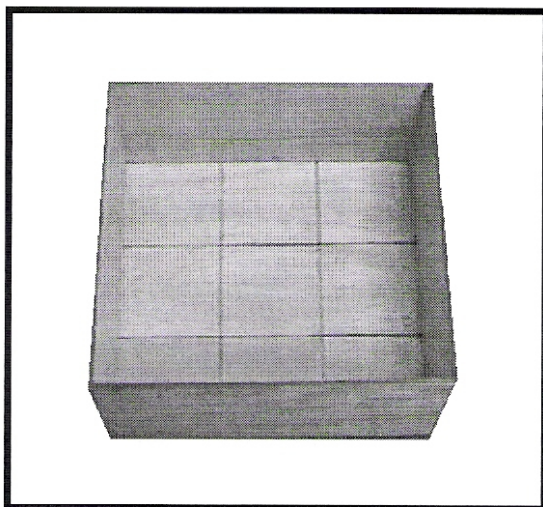
Figura 1 - Labirinto em T elevado.



Campo aberto: Arena de madeira medindo 60 x 60 cm (Figura 2) com 30 cm de altura e com nove quadrados demarcados (20 x 20 cm).

A luminosidade medida tanto no labirinto, como na arena foi de 60 lux. O experimento foi realizado de acordo com o protocolo do LTE. (PINHEIRO et al., 2007; TEIXEIRA; ZANGROSSI; GRAEFF, 2000; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014). Os testes foram feitos entre 8:00 e 13:00h.

Figura 2 - Campo aberto



Cirurgia Estereotáxica para implantação de cânula-guia

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol 2,5% (i.p., AldrichChemicalCo. Inc., Milwaukee, USA) e fixado em um estereotáxico (Insigth, Ribeirão Preto, BR). Após anestesia subcutânea no couro cabeludo do rato com xilocaína com vasoconstritor à 2%, o crânio foi exposto cirurgicamente e uma cânula guia de aço inoxidável (23G; 11mm de comprimento) foi implantada. As coordenadas estereotáxicas para implantação da cânula guia na SCPd foram selecionados a partir dos atlas do cérebro de Paxinos e Watson (2007): Ântero posterior= + 2,7mm em relação à linha interaural; lateral= + 2,5mm em relação à sutura sagital; vertical= - 4,7mm em relação à estrutura óssea da calota craniana; Incisivo, - 3,2; torre inclinada lateralmente em 26°. A cânula foi fixada ao crânio por um parafuso previamente implantado na calota craniana e por uma prótese de resina acrílica autopolimerizável (Simplex, DFL Ind. Com., Brasil). Um mandril de 0,2mm de diâmetro foi introduzido na cânula para evitar a obstrução da mesma durante o período de recuperação.

Como medida profilática, ao final da cirurgia, os animais receberam uma injeção intramuscular de 0,2 ml de pentabiótico veterinário (Pentabiotico®, Fontoura-Wyeth, SP, Brasil, 80.000 UI, intramuscular) e de analgésico não esteroide, flunixinina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brasil, 2,5 mg/kg, subcutâneo).

Depois da cirurgia, os animais foram levados ao biotério para recuperação por um período de sete dias antes de serem submetidos aos testes experimentais.

Habituação

No quarto e quinto dias depois do implante das cânulas guias, os animais foram habituados (figura 3). Nesses dias, os animais foram transferidos para a sala em que o teste do LTE foi realizado. Nesta sala, cada animal, foi submetido ao manuseio do experimentador, uma vez ao dia, sempre no período da tarde, com duração de cinco minutos.

Exposição prévia ao braço aberto do LTE

No dia seguinte a última sessão de habituação (figura 3), todos os animais foram deixados individualmente, por trinta minutos, em um dos braços abertos do LTE. Os braços abertos foram separados dos demais por uma parede de madeira, disposta na linha de separação entre a área central do labirinto e a porção proximal do braço aberto. Este procedimento potencializa o comportamento de fuga por reduzir respostas comportamentais à novidade, tais como a exploração e a inibição do comportamento (TEIXEIRA et al., 2000).

Microinjeção de drogas na substância cinzenta periaquedutal dorsal.

As injeções intra SCPd foram realizadas com uma agulha de injeção (185µm de diâmetro externo, 33G) introduzida através da cânula guia até que sua ponta estivesse 1mm abaixo da extremidade final da cânula. Um volume foi injetado utilizando uma microseringa operada à mão de 1 µL (KH7001, Hamilton Co., EUA) conectada a agulha de injeção por um segmento de tubo de polietileno I.D 0.28mm (Clay Adams, EUA). O volume injetado foi controlado checando o movimento de uma bolha de ar dentro do tubo de polietileno.

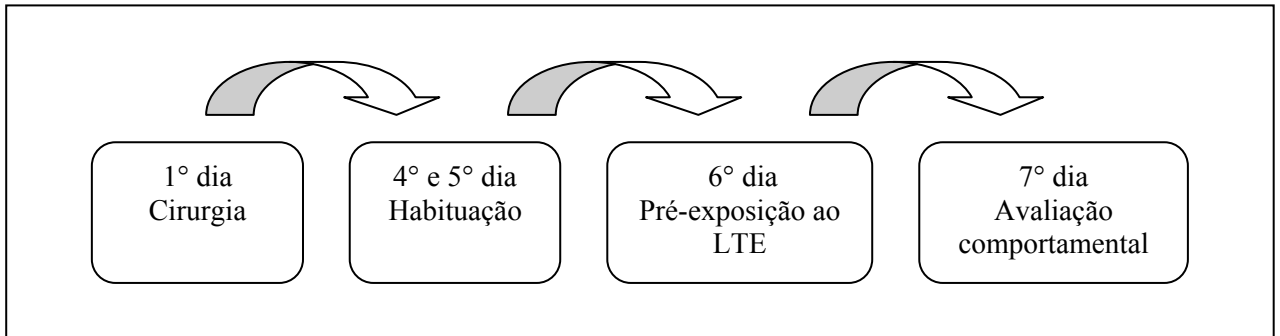
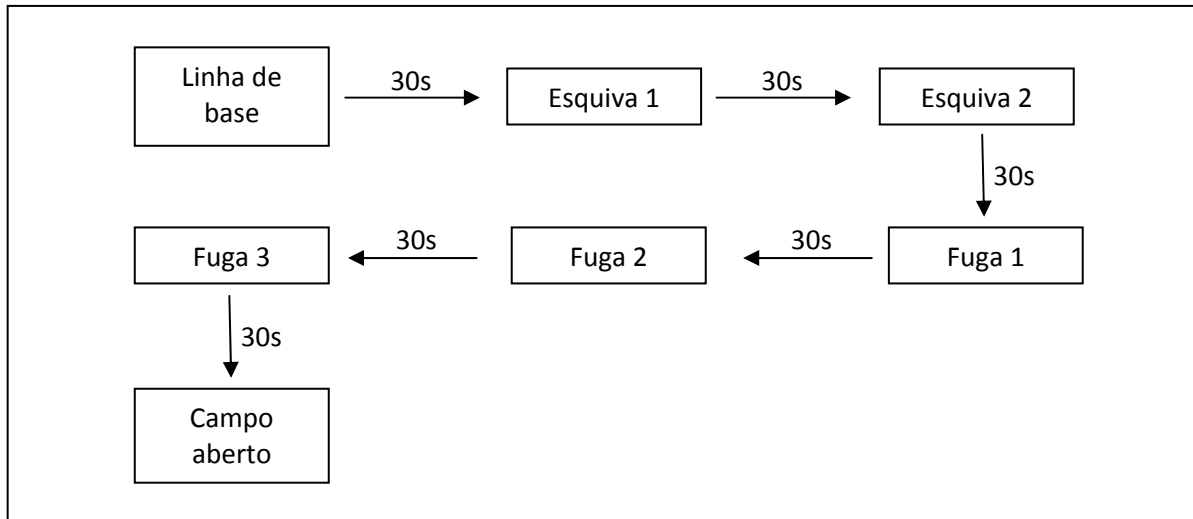
Avaliação no LTE

O teste no LTE foi iniciado pela tomada da esquiva inibitória (figura 4). Para verificar este comportamento, cada animal foi colocado na extremidade distal do braço fechado e foi medida a latência gasta pelo mesmo para sair deste braço com as quatro patas (Linha de base). A mesma medida foi tomada por mais duas vezes com intervalos de trinta segundos entre elas (Esquiva 1 e Esquiva 2), quando o animal voltou para uma caixa individual de acrílico. O tempo máximo de permanência do animal neste braço, em cada uma das tomadas de esquiva foi de cinco minutos. Depois deste período, o animal foi retirado pelo experimentador e colocado em sua caixa para dar continuidade ao teste.

Trinta segundos após o término da tomada da Esquiva 2, foi avaliado o comportamento de fuga. Para isso, cada animal foi colocado na extremidade do mesmo braço aberto ao qual este animal foi exposto previamente no dia anterior, e foi medido o tempo gasto para a saída deste braço com as quatro patas (Fuga 1). A latência de saída de um dos braços abertos foi medida por mais duas vezes (Fuga 2 e Fuga 3) com intervalos de trinta segundos entre elas sendo que, neste intervalo, o animal permaneceu na caixa de acrílico. Posteriormente ao teste de cada animal, o labirinto foi limpo com álcool a 70%.

Avaliação no campo aberto

Trinta segundos após a tomada da Fuga 3, cada animal foi colocado individualmente no centro de campo aberto para observação da atividade locomotora. Durante 5 minutos foi registrado o número de quadrados percorridos pelo animal. Depois do teste de cada animal, o campo aberto foi limpo com álcool a 20%.

Figura 3 - Desenho experimental**Figura 4** - Etapas da avaliação comportamental no LTE

Protocolos experimentais

Protocolo 1. Efeito da microinjeção de noradrenalina na SCPd na resposta comportamental de ratos expostos ao LTE

Em um primeiro momento objetivamos avaliar o efeito da microinjeção de NA na SCPd sobre a resposta comportamental do animal no LTE e, dessa forma, verificar se a neurotransmissão noradrenérgica local possui um papel fásico nas reações defensivas evocadas pela exposição do animal ao teste do LCE.

No dia do teste comportamental, os animais receberam a injeção de doses crescentes (3, 15 e 45 nmol/50nL) de NA ou de líquido cefalorraquidiano artificial (50nL) na SCPd e imediatamente após foram colocados no LTE. Cada animal recebeu apenas uma microinjeção de NA.

Protocolo 2: Efeito da microinjeção de antagonistas de receptores adrenérgicos na SCPd na resposta comportamental de ratos expostos ao LTE

O objetivo foi avaliar o efeito da microinjeção de antagonistas de receptores adrenérgicos ($\alpha 1$, $\alpha 2$ ou β -adrenérgicos) na SCPd sobre a resposta comportamental do animal no LTE e, dessa forma, verificar se a neurotransmissão noradrenérgica local possui um papel tônico nas reações defensivas evocadas pela exposição do animal ao teste. No dia do experimento comportamental, os animais receberam a injeção de doses crescentes (4, 8, ou 12 nmol/50nL) de antagonistas preferencialmente seletivos para os receptores $\alpha 1$, WB4101, e $\alpha 2$, RX821002, e não seletivo para receptores β -adrenérgicos, propranolol, ou de líquido cefalorraquidiano artificial (50nL) na SCPd e após 2 minutos foram colocados no labirinto. (SHIBASAKI et. al. 2015). Cada animal recebeu apenas uma microinjeção do antagonista.

Histologia

Após o fim do experimento, os animais foram anestesiados com Uretana 1.25 g/kg (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA.) e 50nl de azul de Evans 1% foram injetados intra SCPd afim de marcar o local da microinjeção (Figura 5). O tórax foi cirurgicamente aberto, a aorta descendente foi ocluída, o átrio direito cortado, e o cérebro foi perfundido com 0,9% de NaCl seguida por formalina a 10% através do ventrículo esquerdo. O cérebro foi retirado e armazenado e cortados posteriormente em seções de 40 mm de espessura em criostato (CM1900; Leica, Wetzlar, Alemanha). As fatias cerebrais foram coradas com 0,5% de cresyl violeta para análise de microscopia de luz.

Os locais das microinjeções foram identificados com o auxílio do atlas de cérebro de rato (PAXINOS; WATSON, 2007).

Figura 5 - Fotomicrografia representativa do local da microinjeção na SCPd.



Análise estatística

Análise de variância ANOVA de duas vias com medidas repetidas, foi utilizado para avaliar a latência de esquiva e fuga, tendo os grupos (doses) como fator independente e as tentativas (linha de base, esquiva 1 e 2 ou fuga 1 a 3) como fator dependente, quando apropriado ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni foi utilizado.

O número de cruzamentos durante o campo aberto foi analisado para cada animal pelo teste estatístico ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni. Os dados foram expressos como Média \pm EPM. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

4 Resultados

Efeito da microinjeção de noradrenalina na SCPd na resposta comportamental de ratos expostos ao LTE

Figura 6A. O efeito da administração de noradrenalina intra SCPd sobre o comportamento da esQUIVA INIBITÓRIA. A ANOVA de medidas repetidas mostra diferença ao longo das tentativas [$F(2,62)= 24.43$; $p<0.05$]. Além disso, houve efeito do tratamento [$F(3,31)= 4.56$; $p<0.05$] e da interação entre os fatores [$F(6,62)= 4,71$; $p<0.05$]. A análise post-hoc indica que NA 45nmol/50nl intra SCPd diminuiu significativamente a latência na esQUIVAS 2 em relação ao grupo controle ($p<0.05$) indicando um efeito ansiolítico-simile.

Figura 6B. O efeito da administração de noradrenalina sobre o comportamento de fuga. A ANOVA de medidas repetidas mostra efeito da tentativa [$F(2,62)= 6.46$; $p<0.05$], porém sem efeito do tratamento [$F(3,31)= 1.43$; $p>0.05$] e da interação entre estes dois fatores [$F(6, 62)= 1,0$; $p>0,05$]. A análise post-hoc não indica diferenças na administração de NA em nenhuma das doses (3, 15 e 45nmol/50nl) em relação ao grupo controle ($p>0,05$), assim como no teste de campo aberto ($p>0,05$). (Tabela 1)

Figura 6 - Efeito (Média±EPM) na latência (s) da esQUIVA inibitória (A) e fuga (B) após a microinjeção de doses crescentes (3, 15 ou 45 nmol/50nL) de noradrenalina na SCPd de ratos (n=9/grupo) submetidos ao LTE. *p<0,05, quando comparado com o grupo de controle (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni).

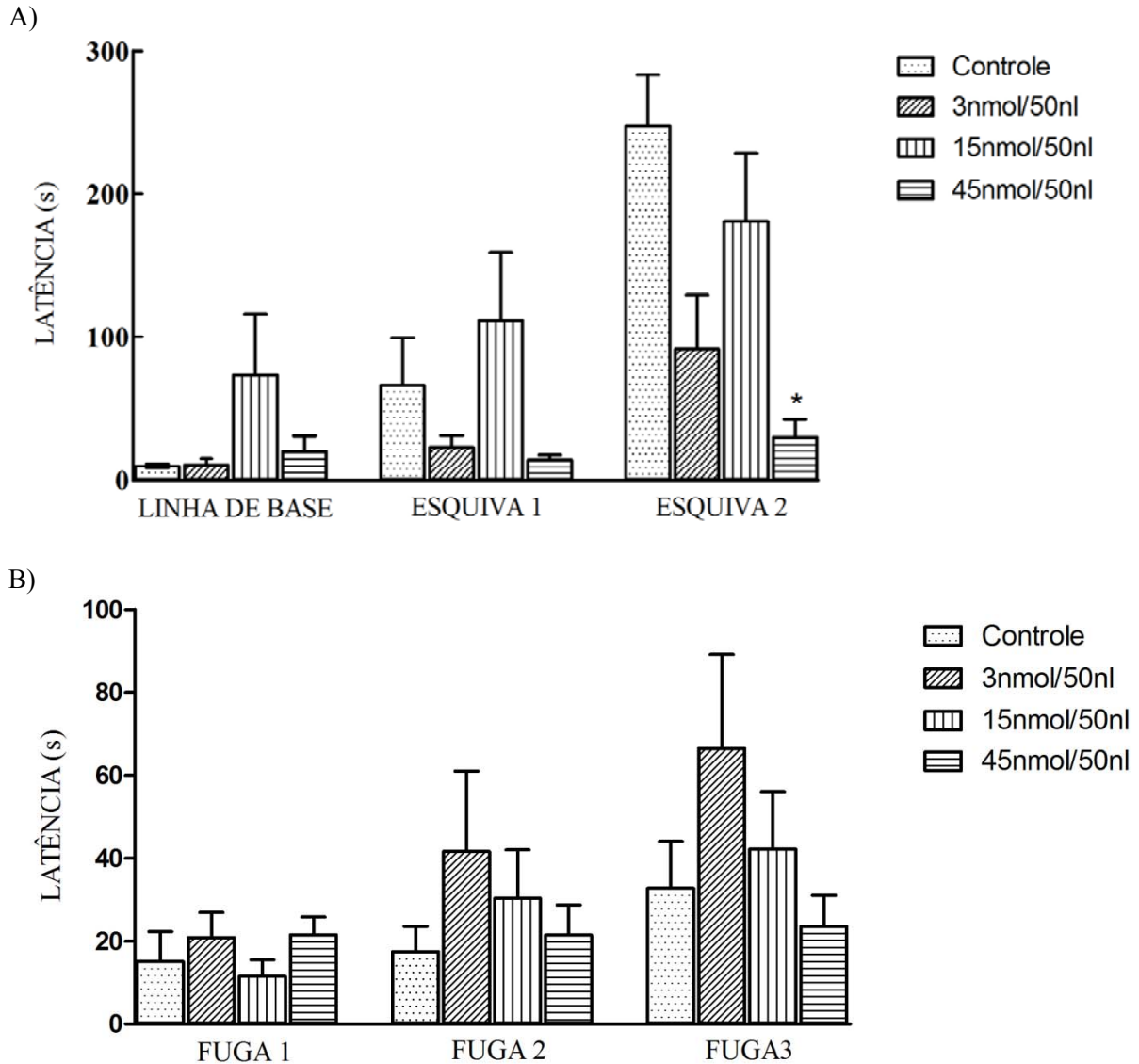


Tabela 1 - Atividade locomotora do rato no campo aberto.

Grupo	n° de linhas cruzadas
Controle	47,7 ± 4,6
NA 3nmols/50nl	60,1 ± 8,1
NA 15nmols/50nl	51,6 ± 3,1
NA 45nmols/50nl	46,6 ± 2,5

Dados representados como Média ± EPM; p>0,05

Efeito da microinjeção dos antagonistas noradrenérgicos na SCPd na resposta comportamental de ratos expostos ao teste do LTE

Figura 7A. O efeito da administração de Propranolol intra SCPd sobre o comportamento da esQUIVA inibitória. A ANOVA de medidas repetidas mostra diferença ao longo das tentativas [$F(2, 64) = 31,1$ $p < 0,05$], do tratamento [$F(3, 32) = 3,64$ $p < 0,05$] e da interação entre os fatores [$F(6, 64) = 4,36$ $p < 0,05$]. A análise post-hoc indica que Propranolol na dose de 12nmol/50nl intra SCPd diminuiu significativamente a latência na esQUIVA 2 em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) indicando um efeito ansiolítico-simile.

Figura 7B. O efeito da administração Propranolol intra SCPd sobre o comportamento de fuga. A ANOVA de medidas repetidas mostra efeito da tentativa [$F(2, 64) = 8,06$; $p < 0,05$], porém sem efeito do tratamento [$F(3, 32) = 0,58$; $p > 0,05$] e na interação entre estes dois fatores [$F(6, 64) = 0,14$; $p > 0,05$]. A análise post-hoc não indica diferenças na administração de Propranolol em nenhuma das doses (4, 8 e 12nmol/50nl) em relação ao grupo controle ($p > 0,05$), assim como no teste de campo aberto ($p > 0,05$). (Tabela 2)

Figura 7 - Efeito (Média±EPM) na latência (s) da esquiwa inibitória (A) e fuga (B) após a microinjeção de doses crescentes (4, 8 ou 12 nmol/50nL) do antagonista β -noradrenérgico propranolol na SCPd de ratos (n=9/grupo) submetidos ao LTE. *p<0,05, quando comparado com o grupo de controle (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni).

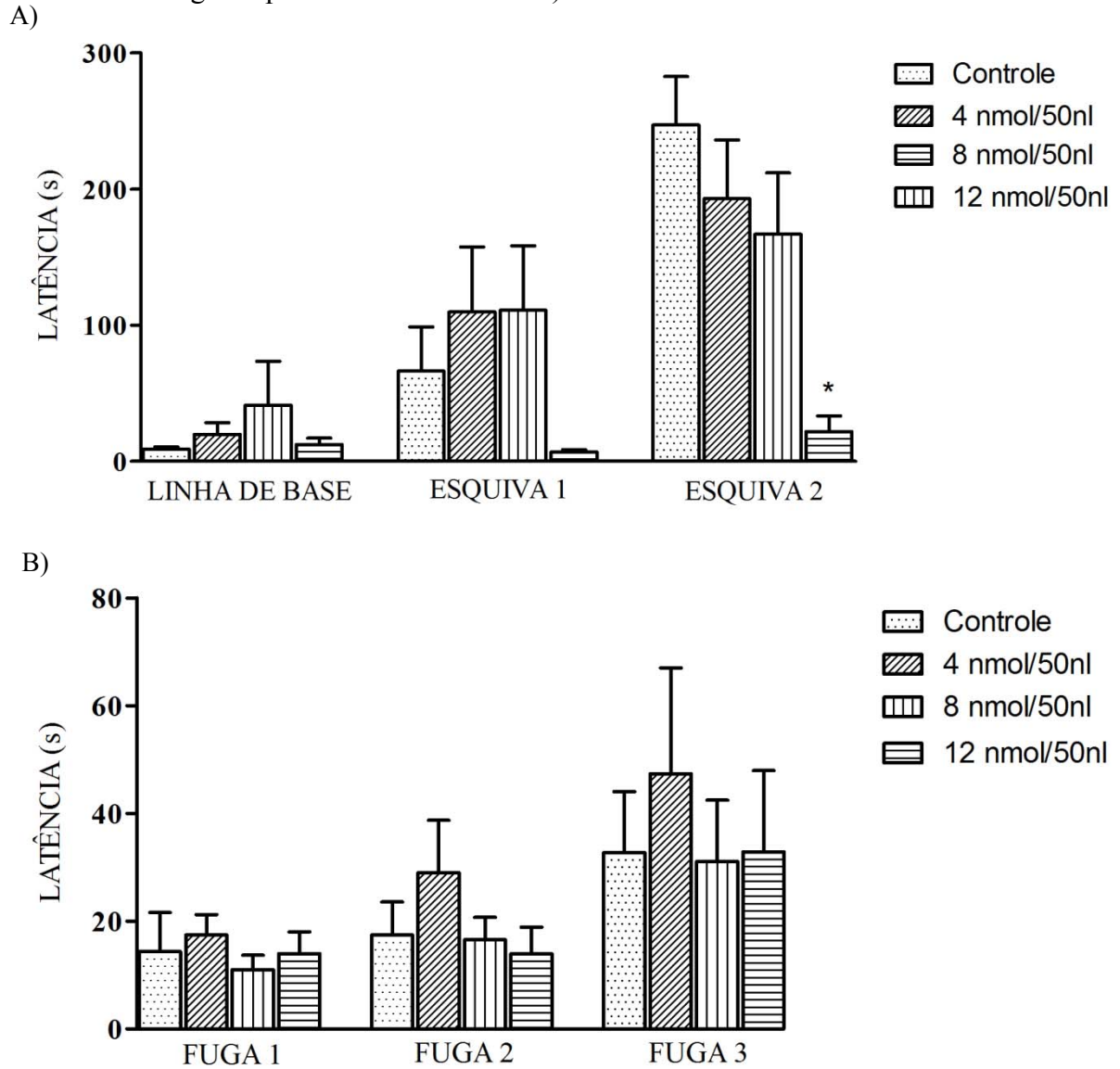


Tabela 2 - Atividade locomotora do rato no campo aberto.

Grupo	n° de linhas cruzadas
Controle	50,5 ± 3,8
Propranolol 4 nmol/50nl	42,1 ± 4,5
Propranolol 15 nmol/50nl	43,1 ± 3,7
Propranolol 45 nmol/50nl	47,1 ± 6,8

Dados representados como Média ± EPM; $p > 0,05$

Figura 8A. O efeito da administração de WB4101 intra SCPd sobre o comportamento da esQUIVA inibitória. A ANOVA de medidas repetidas mostra diferença ao longo das tentativas [$F(2, 54) = 30,16$; $p < 0,05$], mas não do tratamento [$F(3, 27) = 2,18$; $p > 0,05$] e da interação entre os fatores [$F(6, 54) = 1,44$ $p > 0,05$]. A análise post-hoc não indicou diferença entre grupo WB4101 e o grupo controle ($p > 0,05$).

Figura 8B. O efeito da administração de WB4101 intra SCPd sobre o comportamento de fuga. A ANOVA de medidas repetidas mostra diferença ao longo das tentativas [$F(2, 54) = 3,72$; $p > 0,05$], mas não do tratamento [$F(3, 27) = 0,68$; $p > 0,05$] e da interação entre os fatores [$F(6, 54) = 0,76$ $p > 0,05$]. A análise post-hoc não indicou diferença entre grupo WB4101, em nenhuma das doses, e o grupo controle ($p > 0,05$), assim como no teste de campo aberto ($p > 0,05$). (Tabela 3)

Figura 8 - Efeito (Média±EPM) na latência (s) da esquiiva inibitória (A) e fuga (B) após a microinjeção de doses crescentes (4, 8 ou 12 nmol/50nL) do antagonista α_1 -noradrenérgico WB4101 na SCPd de ratos (n=9/grupo) submetidos ao LTE. $p>0,05$, quando comparado com o grupo de controle (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni).

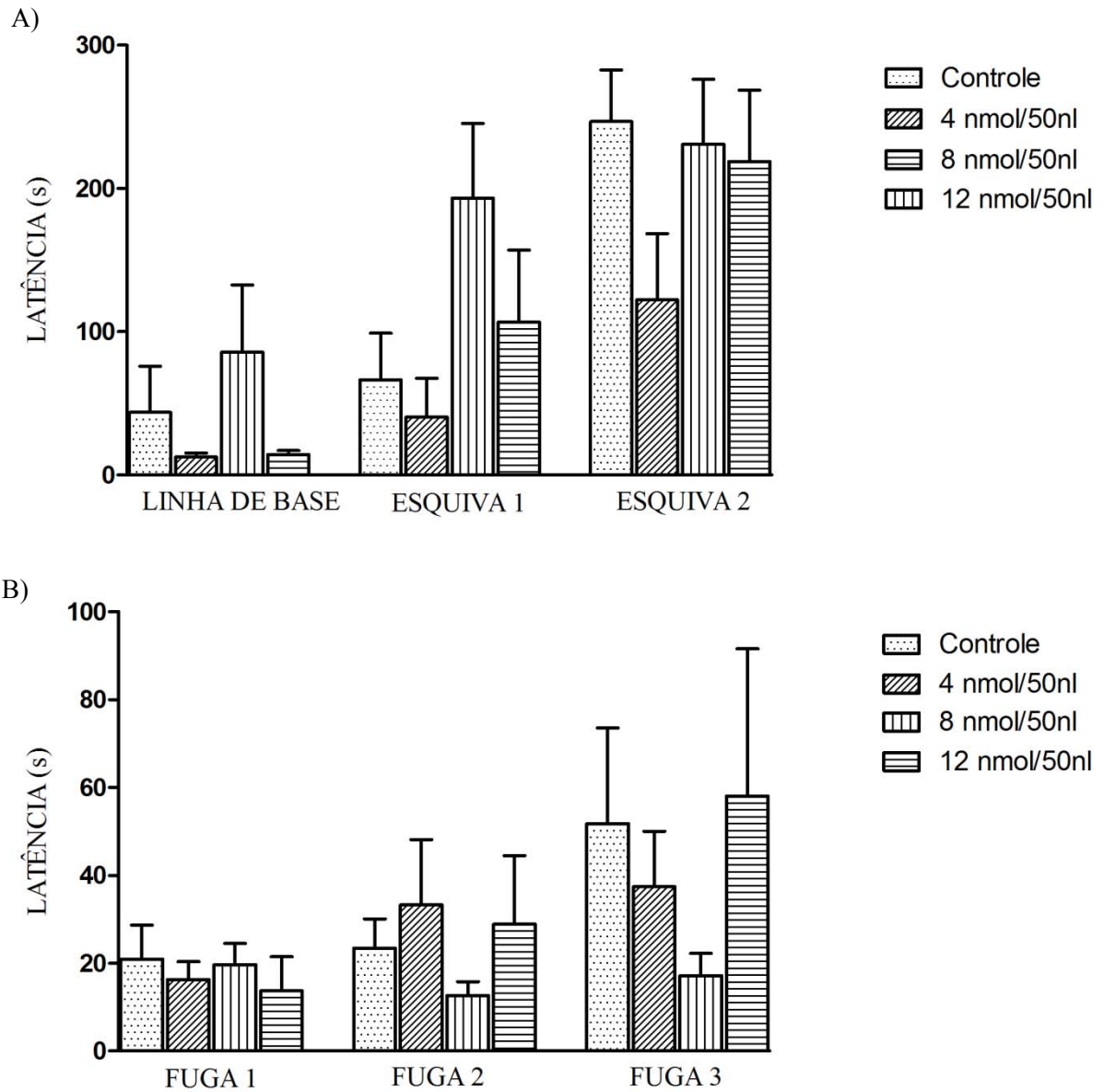


Tabela 3 - Atividade locomotora do rato no campo aberto.

Grupo	n° de linhas cruzadas
Controle	48 ± 5,7
WB 4 nmol/50nl	52 ± 4,2
WB 15 nmol/50nl	36,7 ± 4,8
WB 45 nmol/50nl	43,4 ± 6,6

Dados representados como Média ± EPM; p>0,05

Figura 9A. O efeito da administração de RX821002 intra SCPd sobre o comportamento da esquiava inibitória. A ANOVA de medidas repetidas mostra diferença ao longo das tentativas [F (2, 56)= 37,62; p<0,05], do tratamento [F (3, 28) = 4,87; p<0,05] e da interação entre os fatores [F (6, 56) = 3,49; p<0,05). A análise post-hoc indica que RX821002 na dose de 12nmol/50nl intra SCPd diminuiu significativamente a latência na esquivas 2 em relação ao grupo controle (p<0,05) indicando um efeito ansiolítico-simile.

Figura 9B. O efeito da administração de RX821002 intra SCPd sobre o comportamento de fuga. A ANOVA de medidas repetidas mostra diferença ao longo das tentativas [F (2, 56)= 5,83;p>0,05], mas não no tratamento [F(3, 28) = 0,66; p>0,05] ou interação entre os fatores [F(6, 56)= 0,71; p>0,05]. A análise post-hoc não indicou diferença entre grupo RX821002, em nenhuma das doses, e o grupo controle (p>0,05), assim como no teste de campo aberto (p>0,05). (Tabela 4)

Figura 9 - Efeito (Média±EPM) na latência (s) da esquiwa inibitória (A) e fuga (B) após a microinjeção de doses crescentes (4, 8 ou 12 nmol/50nL) do antagonista α_2 -noradrenérgico RX821002 na SCPd de ratos (n=7-9/grupo) submetidos ao LTE. *p<0,05, quando comparado com o grupo de controle (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni).

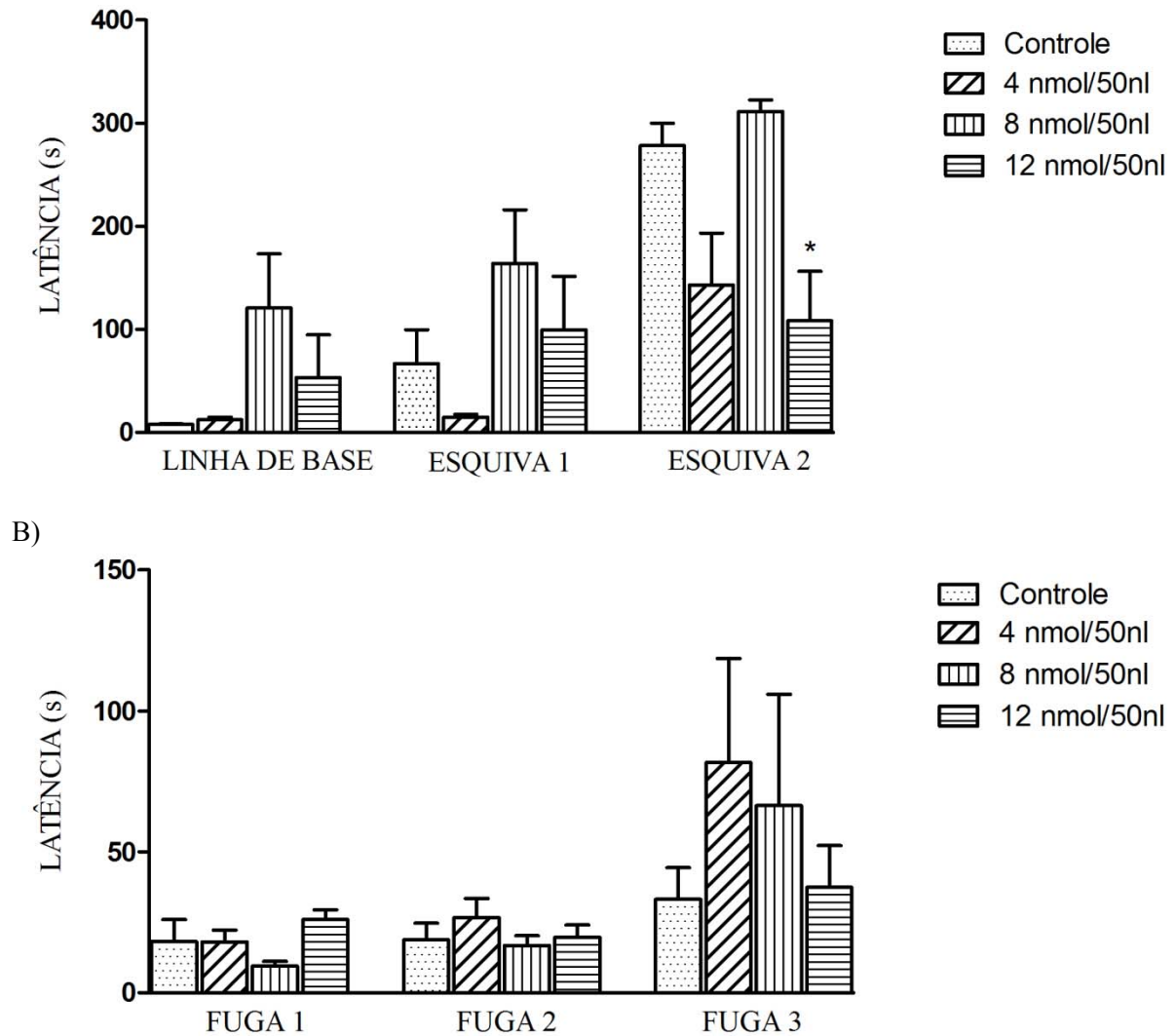


Tabela 4 - Atividade locomotora do rato no campo aberto.

Grupo	n° de linhas cruzadas
Controle	42,11 ± 4,8
RX 4 nmol/50nl	49,6 ± 3,9
RX 15 nmol/50nl	36,6 ± 4,8
RX 45 nmol/50nl	43,4 ± 6,6

Dados representados como Média ± EPM; p>0,05

5 Discussão

No primeiro momento investigamos o efeito da administração de NA na SCPd sobre a exposição de ratos no LTE. A microinjeção de NA intra SCPd diminuiu a latência de saída do braço fechado do LTE sugerindo um efeito ansiolítico, sem alterar o pânico.

Durante a avaliação do efeito de antagonistas noradrenérgicos frente à exposição de ratos ao LTE, o antagonismo de receptor $\alpha 1$ -adrenérgico não alterou as medidas de esquiva inibitória nem as de fuga, sugerindo que este receptor não tenha um papel tônico na modulação comportamental de ratos expostos ao LTE.

Por outro lado, a administração de antagonistas $\alpha 2$ e β -adrenérgicos diminuíram o tempo de esquiva inibitória sugerindo um efeito ansiolítico, sem alterar o pânico o que indica que esses receptores estariam modulando de forma tônica o comportamento de ratos frente a exposição ao LTE.

Nossos dados corroboram com dados prévios do laboratório em que a NA nessa região também causou efeito ansiolítico-símile em animais em dois testes distintos: o LCE, que avalia o comportamento defensivo gerado pelo medo nos braços abertos, um estímulo inato e não condicionado e o teste do lambert punido, que é baseado no medo condicionado do animal a um estímulo neutro. (PELOSI et al., 2009b).

O efeito ansiolítico evidenciado no presente estudo não é devido a uma interferência motora, pois não foi observada diferença estatística entres os grupos no número de cruzamentos nos quadrantes do campo aberto pelo animal.

Há relatos que sugerem que o sistema noradrenérgico desempenhe um papel importante na fisiopatologia das desordens de ansiedade (SULLIVAN et al., 1999). Alguns medicamentos considerados eficientes nos transtornos de ansiedade, como antidepressivos tricíclicos e inibidores da MAO, atuam, em parte, por facilitar os efeitos da noradrenalina (KLEIN; FINK, 1962; KLEIN, 1964; YAMADA; YASUHARA, 2004).

O tratamento com inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina (ISRN) mostrou ter um efeito ansiolítico no teste do LCE (LAPMANEE et al., 2012; VINADER-CAEROLS et al., 2006).

Embora a NA seja conhecida por causar alterações autonômicas semelhantes às observadas durante comportamentos ansiosos, como a hipertensão arterial, e que a SCPd esteja envolvida com repostas cardiovasculares, pesquisas demonstraram que a resposta pressora causada pela microinjeção de NA na SCPd de ratos é devido a liberação de

vasopressina.e não decorrente de uma ativação simpática (PELOSI; CORRÊA, 2005; PELOSI et al., 2009a; RUTLEDGE; HOGAN, 2002).

Com relação ao antagonismo de receptores adrenérgicos, trabalho prévio do nosso laboratório demonstrou que o antagonismo de receptor α_2 e β -adrenérgico na SCPd causam um efeito ansiolítico similar no teste do LCE sugerindo um papel tônico desses receptores, sem alteração no antagonismo de α_1 (dados não publicados). Em adição, o bloqueio de receptor α_2 -adrenérgico reverteu o efeito ansiolítico causado pela microinjeção de NA na SCPd sugerindo que a resposta à NA na SCPd é mediada por esses receptores. Dessa forma, tais receptores estão envolvidos na modulação fásica e tônica dos efeitos comportamentais ao LTE. Outros trabalhos também demonstraram um efeito ansiolítico do propranolol administrado na SCPd de ratos avaliados no LCE, no entanto, o bloqueio de receptor $5HT_2$ reverteu o efeito ansiolítico, indicando que o resultado comportamental deve-se à transmissão serotoninérgica (AUDI, OLIVEIRA, AND GRAEFF, 1989; GRAEFF et al., 1990)

Em outras estruturas os efeitos dos receptores adrenérgicos são discrepantes. Na amígdala, foi observado aumento na expressão de receptor β_1 -adrenérgico em ratos com comportamentos relacionados à ansiedade sendo que antagonismo causou um efeito ansiolítico no teste do medo condicionado e no teste do LCE. (FU; LI; ZHAO, 2008).

Os receptores α_1 na amígdala estão implicados na indução de ansiedade e estresse já que seu antagonismo gerou uma resposta ansiolítica (MILLAN, 2003). O antagonismo de receptor α_1 por Prazosin administrado intra-peritonalmente causou efeito ansiolítico em ratos submetidos ao LCE (KOMAKI et al., 2014)

Com relação ao receptor pré-sináptico α_2 -adrenérgico, a microinjeção de Clonidina (agonista α_2 -adrenoceptores) no núcleo accumbens causou um efeito ansiolítico no LCE (KOCHENBORGER et al., 2012) e ansiogênico no núcleo mediano da rafe. (MANSUR et al., 2010). De acordo com alguns estudos, a síntese de 5-HT é inibida após a ativação de adrenoreceptores α_2 (YOSHIKAWA ET AL., 1992).

A injeção de guanfacina, agonista α_2a/d , no córtex pré-frontal de ratos, também aumentou os níveis de ansiedade avaliados no LCE (UZSOKI; TÓTH; HERNÁDI, 2011). Estudos em humanos e ratos demonstraram que o tratamento sistêmico com Iombina, um antagonista seletivo de receptores α_2 -adrenérgicos pré-sinápticos, aumentou a atividade noradrenérgica central geral, causando efeito ansiogênico (CHARNEY; HENINGER; REDMOND, 1983; JOHNSTON; FILE, 1989).

Embora tanto a administração de NA como de antagonistas noradrenérgicos na SCPd não terem causado alterações com relação ao comportamento de fuga o qual está relacionado ao pânico, a SCPd desempenha papel importante nestas respostas comportamentais.

Em humanos, a estimulação elétrica da SCPd é descrita como situação desagradável, caracterizada por sensação de morte iminente, sentimentos fortes de medo e várias mudanças autonômicas similar às que ocorrem durante um ataque de pânico (NASHOLD, WILSON et al., 1969). Já em ratos, esta estimulação está envolvida com a elaboração de comportamento defensivo como fuga e luta (BRANDÃO, DE AGUIAR, AND GRAEFF, 1982; VIANNA et al., 2001)

A estimulação química ou elétrica de outras estruturas encefálicas localizadas em posições mais rostrais, como amígdala e hipotálamo medial, também pode induzir reações defensivas. Entretanto, tais reações são permanentemente abolidas após a lesão da SCPd (HUNSPERGER, 1963). O contrário, no entanto, não é verdadeiro, uma vez que a ablação do telencéfalo ou lesões do hipotálamo medial não abolem as reações de defesa induzidas pela estimulação da SCPd (TOMAZ et al., 1988) sugerindo que essa região participa da integração final das respostas defensivas.

Relatos mostraram que agonistas de 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} injetados na SCPd inibiram a resposta de fuga gerada por estimulação elétrica desta estrutura. (DE BORTOLI; NOGUEIRA; ZANGROSSI, 2006; SCHÜTZ; DE AGUIAR; GRAEFF, 1985). Além disso, Roncon e cols. (2012) observaram que a administração sistêmica de fluoxetina ou intra SCPd de 5HT causou efeito panicolítico no LTE, porém, esse efeito foi revertido pela administração sistêmica ou intra SCPd de naloxone, um antagonista opióide, indicando que a ação antipânico da 5HT seria mediada pela ativação de opióides endógenos.

McNaughton e Corr (2004) argumentam que estruturas anatomicamente mais caudais, como a SCP e o hipotálamo, além de coordenarem e expressarem comportamentos do tipo fuga e luta, também participam juntamente com estruturas prosencefálicas tais como córtex pré-frontal, sistema septo-hipocampal e amígdala, do controle de comportamentos defensivos mais elaborados e orientados como a esquiva. Assim, estruturas que comandam as reações de defesa implicadas na ansiedade e no medo seriam igualmente organizadas numa hierarquia funcional (do córtex ao tronco encefálico), de modo que todas as estruturas envolvidas participam da modulação de todos os comportamentos. No presente estudo, nossos resultados mostraram que a SCPd participa durante uma reação de conflito, ou seja, ansiedade. Vários neurotransmissores são propostos como mediadores ou moduladores das respostas comportamentais organizadas e expressadas pela SCPd, dentre eles, 5HT, gaba, glutamato,

glicina, opióides, colecistoquinina, fator liberador de corticotropina, óxido nítrico (AGUIAR; BRANDÃO, 1996; BEIJAMINI; GUIMARÃES, 2006; BORELLI; BRANDÃO, 2008; MATHEUS; GUIMARÃES, 1997; NETTO; GUIMARÃES, 2004; TEIXEIRA; ZANGROSSI; GRAEFF, 2000). O presente estudo sugere que a NA também é um importante modulador na SCPd.

A SCPd pode não ser a via final de estímulos frente à esquivas inibitórias. A localização neuroanatômica e as abundantes conexões aferentes e eferentes favorecem a participação dessa região em vários sistemas ascendentes e descendentes (BEITZ, 1995; VIANNA; BRANDÃO, 2003), sendo considerada uma estrutura encefálica de alta complexidade. Todavia, os efeitos ansiolíticos observados após a administração de NA na SCPd podem ser devido a conexões com outras regiões tais como: colículo superior (EICHENBERGER et al., 2002), colículo inferior (MEININGER; POL; DERER, 1986), hipotálamo (MANTYH, 1983; SHIPLEY et al., 1991), complexo amigdalóide (RIZVI et al., 1991); e outras áreas límbicas (ENNIS; XU; RIZVI, 1997; SILLERY et al., 2005).

Em resumo, mesmo entre as limitações frente à pesquisa comportamental básica, o presente trabalho sugere que a neurotransmissão noradrenérgica na SCPd está envolvida com a modulação do comportamento de ansiedade, porém sem afetar o pânico. Assim, pode-se sugerir que a via noradrenérgica nessa região relaciona-se mais especificamente com vias neurais envolvidas na modulação da ansiedade generalizada. Todavia, ainda não sabemos a modulação noradrenérgica da SCPd em condição onde já exista um comportamento de ansiedade símile ou até mesmo um quadro clínico de ansiedade.

6 Conclusão

Em conjunto, nossos resultados demonstram que a neurotransmissão noradrenérgica na SCPd desenvolve um importante papel sobre a modulação da esquiva inibitória, mas sem alterar a fuga. Este dado assegura a relevância deste neurotransmissor na modulação dos distúrbios de ansiedade dando suporte para futuras pesquisas que visam à melhoria no tratamento da Ansiedade Generalizada.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, M. S.; BRANDÃO, M. L. Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of rats in the plus-maze test. **Physiology & behavior**, v. 60, n. 4, p. 1183–6, out. 1996.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition (DSM-5)**. p. 280, 2013.
- ANAND, A.; CHARNEY, D. S. **Norepinephrine dysfunction in depression** *Journal of Clinical Psychiatry*, 2000.
- AUDI, E. A.; DE-OLIVEIRA, C. E.; GRAEFF, F. G. Serotonergic mediation of the anxiolytic effect of intracerebrally injected propranolol measured in the elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, p. 699–701, 1989.
- AVANZI, V.; BRANDÃO, M. L. Activation of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in the median raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 126, p. 175–184, 2001.
- BEIJAMINI, V.; GUIMARÃES, F. S. Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. **Brain research bulletin**, v. 69, n. 4, p. 347–55, 28 abr. 2006.
- BEITZ, A. “Central Gray. In: Paxinos G. The human nervous system”. In: San Diego: ed. [s.l: s.n.]. p. 173–182.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual review of psychology**, v. 39, p. 43–68, 1988.
- BORELLI, K. G.; BRANDÃO, M. L. Effects of ovine CRF injections into the dorsomedial, dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray: a functional role for the dorsomedial column. **Hormones and behavior**, v. 53, n. 1, p. 40–50, jan. 2008.
- BRANDÃO, M.; DE AGUIAR, J.; GRAEFF, F. GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 16, n. 3, p. 397–402, mar. 1982.
- BREMNER JD, KRYSTAL JH, SOUTHWICK SM And CHARNEY DS. “Noradrenergic Mechanisms in Stress and Anxiety 2. Clinical studies” **Synapse** **23** (1) 39-51, 1996.
- BRUNELLO, N. et al. Noradrenaline in mood and anxiety disorders: basic and clinical studies. **International clinical psychopharmacology**, v. 18, p. 191–202, 2003.
- CHARNEY, D. S.; HENINGER, G. R.; REDMOND, D. E. Yohimbine induced anxiety and increased noradrenergic function in humans: Effects of diazepam and clonidine. **Life Sciences**, v. 33, n. 1, p. 19–29, 1983.

DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoaminecontaining neurons in the central nervous system. I- Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta Physiology Scand**, v. 62, n. 232, p. 1–55, 1964.

DARWIN, C. The Expression of the Emotions in Man and Animals. **The American Journal of the Medical Sciences**, 232, p. 477, 1872

DE BORTOLI, V. C.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H. Effects of fluoxetine and buspirone on the panicolytic-like response induced by the activation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. **Psychopharmacology**, v. 183, n. 4, p. 422–8, jan. 2006.

EICHENBERGER GCD, RIBEIRO SJ, OSAKI MY, MARUOKA MY, RESENDE GCC, CASTELLAN-BALDAN L, CORRÊA SAL, DA SILVA LA, AND COIMBRA NC. 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. **Neuropharmacology**, v. 42, n. 1, p. 48–59, jan. 2002.

ENNIS, M.; XU, S. J.; RIZVI, T. A. Discrete subregions of the rat midbrain periaqueductal gray project to nucleus ambiguus and the periambigular region. **Neuroscience**, v. 80, p. 829–845, 1997.

FU, A.; LI, X.; ZHAO, B. Role of beta1-adrenoceptor in the basolateral amygdala of rats with anxiety-like behavior. **Brain research**, v. 1211, p. 85–92, 23 maio 2008.

FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. **Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 65, n. 4, p. 573–596, 1965.

GRAEFF, F. G. et al. Behavioral effects of 5-HT receptor ligands in the aversive brain stimulation, elevated plus-maze and learned helplessness tests. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 14, p. 501–506, 1990.

GRAEFF, F. G. On serotonin and experimental anxiety. p. 467–476, 2002.

GRAEFF, F. G.; NETTO, C. F.; ZANGROSSI, H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 23, n. 2, p. 237–46, jan. 1998.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica [et al.]**, v. 26, n. 1, p. 67–70, jan. 1993.

HUNSPERGER, R. W. Affective behavior patterns elicited by electrical stimulation of the brain stem and forebrain. **Journal de physiologie**, v. 55, p. 45–98, jan. 1963.

JENCK, F.; MOREAU, J.-L.; MARTIN, J. R. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: Elements of face and predictive validity. **Psychiatry Research**, v. 57, n. 2, p. 181–191, jul. 1995.

JI, X.-H. et al. Pre- and postsynaptic beta-adrenergic activation enhances excitatory synaptic transmission in layer V/VI pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex of rats. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 18, p. 1506–1520, 2008.

JOHNSTON, A. L.; FILE, S. E. Yohimbine's anxiogenic action: Evidence for noradrenergic and dopaminergic sites. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 32, n. 1, p. 151–156, jan. 1989.

KESSLER, R. C. et al. Epidemiology of anxiety disorders. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 2010, p. 21–35, 2010.

KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science (New York, N.Y.)**, v. 256, p. 675–677, 1992.

KITAHAMA, K. et al. Immunohistochemistry of tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine N-methyltransferase in the human brain stem: Description of adrenergic perikarya and characterization of longitudinal catecholaminergic pathways. **Neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 97–111, abr. 1988.

KLEIN, D. F. Delineation of Two Drug-Responsive Anxiety Syndromes. **Psychopharmacologia**, v. 5, p. 397–408, 8 jun. 1964.

KLEIN, D. F.; FINK, M. Psychiatric reaction patterns to imipramine. **The American journal of psychiatry**, v. 119, p. 432–438, 1962.

KOCHENBORGER, L. et al. **Modulation of fear/anxiety responses, but not food intake, following α -adrenoceptor agonist microinjections in the nucleus accumbens shell of free-feeding rats** *Neuropharmacology. Anais...* 2012

KOMAKI, A. et al. Interaction between Antagonist of Cannabinoid Receptor and Antagonist of Adrenergic Receptor on Anxiety in Male Rat. **Basic Clin Neurosci.**, v. 5, n. 3, p. 218–24., 2014.

LAPMANEE, S. et al. Anxiolytic-like actions of reboxetine, venlafaxine and endurance swimming in stressed male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 231, n. 1, p. 20–28, 2012.

MANSUR, S. S. et al. Changes in food intake and anxiety-like behaviors after clonidine injected into the median raphe nucleus. **Behavioural Brain Research**, v. 212, p. 71–77, 2010.

MANTYH, P. W. Connections of midbrain periaqueductal gray in the monkey. I. Ascending efferent projections. **Journal of neurophysiology**, v. 49, p. 567–581, 1983.

MATHEUS, M. G.; GUIMARÃES, F. S. Antagonism of non-NMDA receptors in the dorsal periaqueductal grey induces anxiolytic effect in the elevated plus maze. **Psychopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 14–8, jul. 1997.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 28, n. 3, p. 285–305, maio 2004.

MCNAUGHTON, N.; GRAY, J. A. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **Journal of affective disorders**, v. 61, n. 3, p. 161–76, dez. 2000.

MEININGER, V.; POL, D.; DERER, P. The inferior colliculus of the mouse. A Nissl and Golgi study. **Neuroscience**, v. 17, p. 1159–1179, 1986.

MILLAN, M. J. **The neurobiology and control of anxious states** *Progress in Neurobiology*, 2003.

NASHOLD JR, B. S.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **Journal of neurosurgery**, v. 30, n. 1, p. 14–24, jan. 1969.

NETTO, C. F.; GUIMARÃES, F. S. Anxiogenic effect of cholecystokinin in the dorsal periaqueductal gray. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 1, p. 101–7, jan. 2004.

NIEUWENHUYS, R. Chemoarchitecture of the Brain. In: **Nieuwenhuys R Survey of Chemically Defined Cell Groups and Pathways**. Springer V ed. Berlin: [s.n.]. p. 7–44.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition. **Elsevier Academic Press**, v. 170, p. 547–612, 2007.

PEARSON J, GOLDSTEIN M, B. L. Tyrosine hydroxylase immunohistochemistry in human brain. **Brain Research**, v. 165, n. 2, p. 333–337, 1979.

PELLOW, S. et al. Validation of open " closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. v. 14, p. 149–167, 1985.

PELOSI, G.G.; CORRÊA, F. M. Cardiovascular effects of noradrenaline microinjected into the dorsal periaqueductal gray area of unanaesthetized rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 3188–3194, 2005.

PELOSI, G. G. et al. Autonomic Neuroscience : Basic and Clinical Paraventricular nucleus mediates pressor response to noradrenaline injection into the dorsal periaqueductal gray area. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 151, n. 2, p. 74–81, 2009a.

PELOSI, G. G. et al. Anxiolytic-like effect of noradrenaline microinjection into the dorsal periaqueductal gray of rats. **Behavioural pharmacology**, v. 20, n. 3, p. 252–9, maio 2009b.

PINE, D. S. et al. Challenges in developing novel treatments for childhood disorders: lessons from research on anxiety. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 34, p. 213–228, 2009.

PINHEIRO, S. H. et al. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 1, p. 71–85, mar. 2007.

RANG, H. P. . et al. **Farmacologia**. 6°. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

RIZVI, T. A. et al. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: Topography and reciprocity. **Journal of Comparative Neurology**, v. 303, p. 121–131, 1991.

RONCON, C. M. et al. The panicolytic-like effect of fluoxetine in the elevated T-maze is mediated by serotonin-induced activation of endogenous opioids in the dorsal periaqueductal grey. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 26, n. 4, p. 525–31, abr. 2012.

RUTLEDGE, T.; HOGAN, B. A quantitative review of prospective evidence linking psychological factors with hypertension development. **Psychosom Med**, v. 64, p. 758–766, 2002.

SHIBASAKI, Y. et al. Atomoxetine reverses locomotor hyperactivity, impaired novel object recognition, and prepulse inhibition impairment in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. **Neuroscience**. v 297, p. 95-104, 2015.

SCHENBERG, L. C. et al. Modeling panic attacks. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 25, n. 7-8, p. 647–59, dez. 2001.

SCHRAMM, N. L.; MCDONALD, M. P.; LIMBIRD, L. E. The α 2A-Adrenergic Receptor Plays a Protective Role in Mouse Behavioral Models of Depression and Anxiety. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 4875–4882, 2001.

SCHÜTZ, M. T. B.; DE AGUIAR, J. C.; GRAEFF, F. G. Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 340–345, mar. 1985.

SHIPLEY, M. T. et al. **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**. Boston, MA: Springer US, 1991.

SILLERY, E. et al. Connectivity of the human periventricular-periaqueductal gray region. **Journal of neurosurgery**, v. 103, p. 1030–1034, 2005.

SULLIVAN, G. M. et al. The noradrenergic system in pathological anxiety: a focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias. **Biological psychiatry**, v. 46, n. 9, p. 1205–18, 1 nov. 1999.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral Effects of Acute and Chronic Imipramine in the Elevated T-Maze Model of Anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 65, n. 4, p. 571–576, abr. 2000.

TOMAZ, C. et al. Flight behavior induced by microinjection of GABA antagonists into periventricular structures in detelencephalated rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 30, p. 337–342, 1988.

UZSOKI, B.; TÓTH, M.; HERNÁDI, I. Novelty response of rats determines the effect of prefrontal alpha-2 adrenoceptor modulation on anxiety. **Neuroscience Letters**, v. 499, p. 219–223, 2011.

VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 49, n. 3, p. 549–54, nov. 1994.

VIANNA, D. M. et al. Defensive freezing evoked by electrical stimulation of the periaqueductal gray: comparison between dorsolateral and ventrolateral regions. **Neuroreport**, v. 12, n. 18, p. 4109–12, 21 dez. 2001.

VIANNA, D. M. L.; BRANDÃO, M. L. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 36, n. 5, p. 557–66, maio 2003.

VINADER-CAEROLS, C. et al. Acute effects of maprotiline on learning , anxiety , activity and analgesia in male and female mice. p. 23–31, 2006.

YAMADA, M.; YASUHARA, H. **Clinical Pharmacology of MAO Inhibitors: Safety and Future NeuroToxicology**, 2004.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain research bulletin**, v. 44, n. 1, p. 1–5, jan. 1997.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, 21 mar. 2014.