

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCar/UNESP**

**O PAPEL DOS RECEPTORES GABA_A-BENZODIAZEPÍNICOS DA
AMÍDALA NA MODULAÇÃO DA ANTINOCICEPÇÃO E DE
COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO TESTE DE EXPOSIÇÃO AO RATO**

Cilene Aparecida Barbalho Girotti

**São Carlos – SP
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCar/UNESP**

**O PAPEL DOS RECEPTORES GABA_A-BENZODIAZEPÍNICOS DA
AMÍDALA NA MODULAÇÃO DA ANTINOCICEPÇÃO E DE
COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO TESTE DE EXPOSIÇÃO AO RATO**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora : Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

São Carlos – SP
2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B228pg

Barbalho-Girotti, Cilene Aparecida.

O papel dos receptores GABA_A-benzodiazepínicos da amígdala na modulação da antinocicepção e de comportamentos defensivos em camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato / Cilene Aparecida Barbalho Girotti. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

104 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Neurologia. 2. Amígdala. 3. Midazolam. 4. Flumazenil. 5. Teste de exposição ao rato. 6. Antinocicepção. I. Título.

CDD: 616.8 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Tese de Doutorado de Cilene Aparecida Barbalho Girotti

Dia 13/12/2012

Prof^ª. Dr^ª. Azair Liane Matos do Canto de Souza..... *Azair Liane Matos do Canto de Souza*

Prof. Dr. Eduardo F. Carvalho Netto..... *Eduardo F. Carvalho Netto*

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani..... *Carlos Cesar Crestani*

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase..... *Luiz Fernando Takase*

Prof^ª. Dr^ª. Christie Ramos Andrade Leite Panissi..... *Christie Ramos Andrade Leite Panissi*

Aos meus pais Antonio e Aparecida por serem simplesmente tudo e um pouco mais pra mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus; por me dar o dom da vida e saúde para realizar mais um dos meus sonhos. E por ajudar-me a me reerguer após as quedas e assim me fazer entender que elas são apenas uma pausa antes das grandes recompensas.

À professora Azair, pela orientação, amizade, oportunidade, confiança, incentivo e pela sua contribuição científica. Através de você cheguei até aqui!!. Muito obrigada por tudo.

À banca de qualificação, Prof^a. Dra. Débora Simões Colombari, Prof^a. Dra. Carina Andrade e ao Prof. Dr. Eduardo Ferreira Carvalho Netto pelas importantes sugestões na elaboração desse trabalho.

À banca examinadora, pela atenção dispensada para a leitura desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, pela sua atenção e disposição em me ajudar a qualquer momento.

À técnica do laboratório de Psicologia da Aprendizagem da UFSCar, Lara Maria Silveira, pelo auxílio técnico e pela amizade.

Aos amigos do laboratório Gabriel, Vanessa, Daniela, Bárbara, Kelly, Carol, Lucas, Vinícius, Rimenez, Fernanda, Lígia, Elke, Marília, Luciana e Vitor sempre presentes nos momentos bons ou difíceis;

Aos meus pais, pelo apoio incondicional em todas as escolhas da minha vida;

Aos meus irmãos, Sérgio, Cibele e César pela amizade fraterna, apoio incondicional, que tanto me incentivou ao longo dessa caminhada.

Ao meu marido Marcos por me ajudar sempre que preciso, por ser meu amigo e parceiro sempre, em todos os momentos da minha vida sejam eles alegres ou tristes.

Ao meu filho Vinícius que me traz muitas alegrias e que me ensina que a verdadeira felicidade desta vida está nas coisas mais simples. Te Amo Vi.

Ao Alexandre pela competência profissional na secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas;

Á coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida durante a realização desse estudo.

Aos funcionários da Biblioteca da UFSCar, pela disponibilidade e apoio.

De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando,

A certeza de que é preciso continuar e

A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar

Por isso devemos...

Fazer da interrupção um caminho novo,

Da queda um passo de dança,

Do medo uma escada,

Do sonho uma ponte,

Da procura um encontro,

E assim terá valido a pena existir!

Fernando Sabino

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
1. As Reações de Defesa e sua Relação com a Ansiedade e Medo.....	12
2. Teste de Exposição ao Rato.....	17
3. Conceitos de Dor e Antinocicepção.....	20
4. Neurofisiologia da Nocicepção.....	27
5. Antinocicepção Induzida por Estímulos Ambientais Aversivos.....	33
6. Amígdala.....	36
OBJETIVOS	40
MATERIAL E MÉTODOS	42
1. Sujeitos.....	43
2. Drogas.....	43
3. Cirurgia e Administração Intracerebral.....	44
4. Equipamentos.....	45
5. Procedimento Geral	46
5.1 Teste de Exposição ao Rato.....	46
5.2 Teste de Nocicepção.....	46
6. Experimento 1.....	47

7. Experimento 2.....	48
8. Análise Comportamental.....	46
9. Histologia.....	49
10. Análise Estatística.....	49
RESULTADOS.....	50
1. Experimento 1: Efeitos do midazolam em camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato.....	52
1.1 Teste de Contorções	52
1.2 Medidas Convencionais.....	55
1.2.1 Respostas de Fuga.....	55
1.3 Medidas Etológicas.....	57
1.4 Medida de Esquiva.....	62
2. Experimento 2: Efeitos da microinjeção combinada de midazolam e flumazenil.....	63
2.1 Teste de Contorções	63
2.2 Medidas Convencionais.....	66
2.2.1 Respostas de Fuga.....	67
2.3 Medidas Etológicas.....	68
2.4 Medida de Esquiva.....	73
DISCUSÃO.....	75
CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

RESUMO

Modelos animais têm sido amplamente utilizados para investigar a neurobiologia da ansiedade, medo, bem como, para avaliar a antinocicepção induzida pela ansiedade/medo. Neste sentido, o teste de exposição ao rato promove na presa (camundongo) intensa resposta defensiva, esquiva e antinocicepção. Vários trabalhos têm demonstrado que agonistas dos receptores GABAA-Benzodiazepínicos, como por exemplo, o midazolam injetado na amígdala, pode modular este tipo de antinocicepção induzida pela ansiedade/medo e as reações de defesa em roedores. Entretanto, permanece desconhecido o papel dos receptores GABAA-benzodiazepínicos da amígdala na modulação da antinocicepção induzida em camundongos pelo teste de exposição ao rato. Para isso utilizamos camundongos machos, da linhagem Suíço Albino (n= 6-11/grupo), com implantação de cânulas guia na amígdala. Após a recuperação da cirurgia e administração dos respectivos fármacos, os animais receberam injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%, 0,1 ml/10g peso) e foram submetidos ao teste de exposição ao rato. O aparato consiste de uma caixa retangular de madeira (59 x 29 x 18 cm), dividida em três compartimentos, sendo o lado A: local de alojamento do rato (20 x 29 x 18 cm); o lado B: área para exploração pelo camundongo (29 x 29 x 18 cm), separada do compartimento A por uma grade de arame, e lado C: área de fuga do camundongo (10 x 29 x 18 cm). O registro do número total de contorções abdominais e das contorções desprotegidas foi utilizado como índice nociceptivo. As medidas de ansiedade/medo utilizadas foram a latência de fuga para a área protegida, o total de entradas (TE), as porcentagens de entradas (%EP) e de tempo gasto no compartimento protegido (%TP), os comportamentos de levantar e o contato com a grade. Os resultados foram avaliados pela análise de variância de dois fatores, fator 1 [tipo de exposição (rato de brinquedo ou rato)] e fator 2 (tratamento). Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Os camundongos foram distribuídos em dois experimentos. No Experimento 1, a administração intra-amígdala de midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1 μ L) aumentou o número total de contorções e as contorções desprotegidas em camundongos submetidos ao teste de exposição de rato. Para as medidas de avaliação de risco, o midazolam aumentou o tempo e a frequência de esticar, contado com a grade e a frequência de levantar desprotegido. No Experimento 2, os camundongos receberam injeção combinada de veículo+salina, salina+midazolam (30 nmol/0,1 μ L), flumazenil (2,0 nmol/0,1 μ L)+veículo e flumazenil (2,0 nmol/0,1 μ L)+midazolam (30 nmol/0,1 μ L). A injeção combinada de salina e midazolam (30 nmol) promoveu aumento da nocicepção e efeito ansiolítico, semelhante ao descrito no Experimento 1. Entretanto, a injeção combinada de flumazenil (2,0 nmol) e midazolam (30 nmol) reverteu o efeito ansiolítico e nociceptivo produzido pelo midazolam em camundongos expostos ao rato. Este estudo mostrou que o modelo de exposição da presa (camundongo) ao predador (rato) foi eficiente em promover antinocicepção e aumento de comportamentos de defesa no camundongo. A ativação dos receptores GABAA-benzodiazepínicos da amígdala produziu efeito ansiolítico e intensificou a resposta nociceptiva em camundongos. Estes resultados sugerem que os receptores GABAA da amígdala são recrutados para modular em conjunto, a antinocicepção e os comportamentos emocionais de camundongos quando expostos a um predador natural (rato).

Palavras Chaves: amígdala, midazolam, flumazenil, teste de exposição ao rato, antinocicepção, ansiedade

ABSTRACT

Animal models have been widely used to investigate the neurobiology of anxiety, fear and to evaluate the antinociception-induced by anxiety/fear. In this sense, the mice (prey) exposed to a predator (rat) exhibit intense defensive response, avoidance and antinociception. Several studies have demonstrated that intra-amygdala injection of midazolam, agonist of GABAA-benzodiazepine, can modulate antinociception-induced by anxiety/fear and defense reactions in rodents. However, it remains unknown what role of GABAA-benzodiazepine receptors in amygdala modulation of antinociception induced in mice exposed to a predator (rat). For this adult male Swiss mice (n= 6-11/group) received intra-amygdala injection of drugs followed by intraperitoneal (i.p.) injection of acetic acid 0.6%, 0.1 ml/10g weight (a nociceptive stimulus that induces abdominal writhes, Writhing test) and were exposed to a Long Evans rat (R) or to a toy rat (TR). The exposure cage was divided into 3 compartments [side A: home cage (protected compartment, 10 x 29 x 18 cm), side B: surface (unprotected compartment, 29 x 29 x 18 cm) and side C: the predator compartment (20 x 29 x 18 cm), which was separated from the surface with a wire mesh]. Mice had free access between the home cage and surface area through a door (5 x 8 cm). The following measures were recorded: (a) nociceptive response (total number of writhes and unprotected writhes) and (b) defensive behavior [total entries in surface (TE), % entries and % time spent in the protected area (%PE and %PT), stretched-attend postures (SAP), unprotected rear (UR) and time spent in contact with wire mesh. The results were analyzed by two-way analyses of variance (ANOVA), factor 1 [exposure (toy rat or rat)] and factor 2 (treatment), followed by Duncan's multiple range test as necessary. P values $p \leq 0.05$ were considered significant. The mice were divided into two experiments. Experiment 1, the exposure of mice to the rat reduced the nociceptive response (total number of writhes and unprotected writhes) and TE, SAP, UR and time spent in contact with wire mesh, while increased the %PE and %PT in intra-amygdala saline-injected mice. Intra-amygdala injection of midazolam (3.0 and 30 nmol/0.1 μ l) increased the nociceptive response (total number of writhes and unprotected writhes) and TE, SAP, UR and time spent in contact with wire mesh and decreased %PE and %PT in animals exposed to the rat. In Experiment 2, mice received combined intra-amygdala injection of flumazenil, antagonist of benzodiazepine receptor (saline + 2.0 nmol/0.1 μ l) and midazolam (saline + 30 nmol/0.1 μ l) on behavior of mice exposed to the rat. Midazolam alone (saline + 30 nmol) replicated the results obtained in Experiment 1. However, flumazenil (2.0 nmol) antagonized the effects of midazolam on nociception and on defensive behavior of mice. The exposure of mice to a predator (rat) elicits defensive response as well as attenuates nociceptive response. Activation of GABAA-benzodiazepine receptors within the amygdala produced anxiolytic-like effects and intensified the nociceptive response in mice. These results suggest that the GABAA receptors located within the amygdala are recruited to modulate both antinociception and emotional behavior of mice front a natural predator (rat).

Key words: amygdala, midazolam, flumazenil, rat exposure test, antinociception, anxiety

INTRODUÇÃO

1. As Reações de Defesa e sua Relação com Ansiedade e Medo

A ansiedade e o medo são condições afetivas de complicada delimitação teórica, a ansiedade ou angústia é um antigo assunto de interesse do pensamento ocidental, com profundas origens tanto na tradição médica como na tradição filosófica (Pereira, 1997) O medo e a ansiedade são estados emocionais correlatos, qualificados subjetivamente como desagradáveis, e que são acompanhados por sentimentos de apreensão e insegurança, além de um conjunto de alterações fisiológicas e comportamentais (NUTT, 1990). Lader (1981) atribui como causa principal da ansiedade a antecipação de um perigo, porém com ausência de reconhecimento de uma ameaça real ou, quando existente, a resposta à ameaça torna-se desproporcional à intensidade da emoção.

Graeff (1990) cita como uma das raízes principais da ansiedade o sentimento de medo, por ser encontrado em praticamente todas as espécies e que tem como função sinalizar e preparar o organismo para situações de ameaça ou perigo. A diferença entre os dois estados emocionais pode ser caracterizada em relação aos estímulos ou situações que os desencadeiam, de forma que o medo surgiria diante de situações claras e evidentes de perigo, enquanto a ansiedade seria desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, vago e incerto (BLANCHARD et al., 1990).

Os estudos dos processos emocionais tais como ansiedade e medo ganharam maior atenção a partir do trabalho de Charles Darwin publicado no livro *The Expression of Emotions in Man and Animals* 1972 (DARWIN, 1972 apud ZANGROSSI JÚNIOR; GRAEFF, 2004). Neste contexto, o homem, tendo os animais como seus ancestrais, compartilha com estes suas emoções básicas. De acordo com essa perspectiva, o medo e a ansiedade são emoções que apresentam claro valor adaptativo, e que se originam nas reações de defesa que os animais exibem diante de ameaças que podem comprometer sua integridade física ou a própria sobrevivência (DEAKIN e GRAEFF, 1991).

Neste sentido, quando os estímulos aversivos estão associados a eventos dolorosos, os animais respondem com comportamentos defensivos e inibição da dor (BOLLES; FANSELOW, 1980). É importante salientar que os mecanismos neurobiológicos envolvidos nas respostas comportamentais de defesa que os animais exibem frente a estímulos ameaçadores tais como, a antinocicepção induzida pelo medo/ansiedade, ainda não estão bem esclarecidos.

Esta forma de analgesia temporária vem sendo amplamente pesquisada, tanto para investigar a neurobiologia das emoções como para selecionar drogas que sejam mais eficientes no tratamento de dor em humanos (FRAZER e HARRIS, 1967; TABER, 1974). Neste contexto, outros estudos também têm demonstrado que a exposição do camundongo (presa) ao rato (predador natural) também promove respostas características de medo na presa (BLANCHARD et al., 2004). Além disso, pode produzir antinocicepção em camundongos fêmeas expostos ao predador (PEIXOTO et al., 2009).

Embora a capacidade de sentir dor seja tão importante quanto à capacidade de sentir medo, pois também motiva respostas de defesa, os mecanismos de dor podem ser sobrepostos pela resposta comportamental de defesa (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BAPTISTA et al., 2009). Nesta linha de raciocínio, interromper a fonte de ameaça parece ser uma forma prioritária de resposta (CARVALHO-NETO & NUNES-DE-SOUZA., 2007).

Blanchard e colaboradores (1997, 2001) relata que a escolha de uma estratégia comportamental adequada depende de vários fatores, como as características do ambiente (rota de fuga ou não), distância do estímulo ameaçador, experiência prévia ao estímulo ou ambiente e a posição do indivíduo na hierarquia do grupo. Assim, os transtornos de ansiedade reconhecidos na clínica poderiam ter sua etiologia em alterações nos sistemas cerebrais que controlam tais estratégias de defesa. Dentre os diferentes circuitos que modulam tais transtornos, cabe destaque ao sistema encefálico de defesa e ao sistema de inibição comportamental. Os primeiros estudos sobre as reações de defesa tiveram início com os trabalhos de estimulação cerebral

desenvolvidos por W. R. Hess e M. Brügger (1943), os quais demonstraram que a estimulação elétrica do hipotálamo medial em gatos eliciou respostas defensivas de luta e fuga, acompanhadas por alterações neurovegetativas.

Assim, o hipotálamo medial, a amígdala e a substância cinzenta periaquedutal (SCP) foram agrupados hierarquicamente compondo o sistema encefálico de defesa (para revisão ver, DEAKIN; GRAEFF, 1991; BRANDÃO et al., 2003; HETEM; GRAEFF, 2003).

O sistema de inibição comportamental foi proposto inicialmente nos anos 60 por Jeffrey Gray, o qual postulava que a ansiedade seria derivada da ativação deste sistema encefálico por determinadas classes de estímulos ambientais (sinais de punição ou frustração, estímulos ameaçadores inatos e novidade), resultando na inibição comportamental, e, aumento da vigilância e atenção em animais de laboratório (GRAY, 1982). Este autor, concluiu então, após vasta revisão da literatura, que as alterações comportamentais produzidas por lesão do sistema septo-hipocampal eram as que mais se aproximavam das produzidas por substâncias ansiolíticas clássicas, tais como os benzodiazepínicos (GRAY, 1982). Neste sentido, Gray propôs que o sistema septo-hipocampal seria o principal substrato neural do sistema de inibição comportamental e que as drogas ansiolíticas aliviariam a ansiedade porque prejudicariam o seu funcionamento (GRAY, 1982; GRAY 2000).

Considerando as variações entre as espécies, o perigo ou a ameaça podem ser representados por predadores ou por estímulos associados a estes, como contextos ambientais, detecção sensorial ou nociceptiva ou pelo ataque ou confronto direto intra ou interespecífico. Assim, os animais procuram responder com estratégias comportamentais básicas como: fuga, imobilização, ataque defensivo e submissão (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004).

Baseado no contexto acima, Robert e Caroline Blanchard, estudando as respostas defensivas comportamentais de roedores, especialmente ratos e camundongos, em confronto com o seu predador, classificaram o tipo de estratégia defensiva adotada de acordo com o nível de ameaça

potencial ou real, distal ou proximal (BLANCHARD et al., 1988; BLANCHARD et al., 1997). No primeiro nível, as estratégias observadas foram comportamentos exploratórios cautelosos e hesitantes, usando posturas e movimentos do corpo que possibilitam a aproximação e a investigação da possível ameaça denominados de comportamentos de avaliação de risco. Em um segundo nível, foi observado fuga (quando possível) ou imobilidade (na impossibilidade de fuga), e em caso de contato inevitável, o ataque defensivo (BLANCHARD et al., 1997)

Assim, os pesquisadores sugeriram que quando o estímulo ou a situação ameaçadora é real, como a presença do predador, os comportamentos desencadeados de luta ou fuga seriam representativos de medo, enquanto a ansiedade seria desencadeada por estímulos ou situações apenas potencialmente ameaçadoras, como o odor do predador, e estratégias comportamentais de avaliação de risco (BLANCHARD et al., 1993).

A essa análise etoexperimental Gray e McNaughton (2000) adicionaram componentes da teoria da aprendizagem, incluindo estímulos condicionados que sinalizam punição ou falta de recompensa (frustração), como eliciadores de ansiedade. Esses autores também realçam a importância da existência do conflito esquiva-aproximação e da direção da resposta para a distinção entre medo e ansiedade.

Assim, quando a situação permite aproximação em direção ao estímulo aversivo, os comportamentos observados de avaliação de risco e inibição comportamental estariam relacionados à ansiedade. Por outro lado, quando a situação oferece somente estratégias de defesa do tipo esquiva ativa ou fuga, os comportamentos estariam relacionados ao medo. Diferente da ansiedade, o medo tende a mover o animal (ou sujeito) para longe da fonte de perigo, e envolve comportamentos como luta, fuga e imobilidade (MCNAUGHTON e CORR, 2004).

Além disso, GRAY e McNAUGHTON (2000) também realçam a importância da existência do conflito esquiva-aproximação e da direção da resposta para a distinção entre medo e

ansiedade. Assim, quando a situação permite aproximação em direção ao estímulo aversivo, os comportamentos observados de avaliação de risco e inibição comportamental estariam relacionados à ansiedade. Por outro lado, quando a situação oferece somente estratégias de defesa do tipo esquiva ativa e fuga, os comportamentos estariam relacionados ao medo. Esses autores ainda ressaltam a importância dos efeitos de determinados fármacos na diferenciação do medo e da ansiedade: comportamentos relacionados ao medo, tais como fuga e luta são insensíveis a compostos ansiolíticos clinicamente testados, como, por exemplo, os benzodiazepínicos, enquanto aqueles relacionados à ansiedade (avaliação de risco) são sensíveis a essas drogas (para revisão, ver GRAY & McNAUGHTON., 2000).

Com o objetivo de revisar e expandir os conceitos da teoria de Gray e McNaughton (2000), McNaughton e Corr (2004) postularam que as estruturas que comandam as reações de defesa implicadas na ansiedade e no medo estão sujeitas a organização e hierarquia funcional (do córtex ao tronco encefálico), ditada pelo conflito aproximação-esquiva e pela distância da fonte de perigo (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988; BLANCHARD et al., 1993). Desta forma, comportamentos relacionados à ansiedade seriam organizados e expressados principalmente por estruturas prosencefálicas como o córtex, sistema septo-hipocampal e amígdala, embora estruturas anatomicamente mais caudais como a substância cinzenta periaquedutal e o hipotálamo também participam do controle de tais comportamentos.

Funcionalmente, a substância cinzenta periaquedutal (SCP) é o principal componente encefálico envolvido nos circuitos responsáveis pelas respostas defensivas em relação ao medo, elaborando ações reflexas e autonômicas incondicionadas ao medo como fuga ou luta (BANDLER et al., 2000). A estimulação (elétrica ou química) desta estrutura ocasiona respostas aversivas tanto em humanos quanto em animais (BANDLER et al., 2000, BLANCHARD et al., 2001), resposta essa similar ao ataque do pânico. A amígdala, por sua vez, está relacionada em grande número das respostas emocionais, dando um caráter cognitivo às reações desencadeadas

pela SCP (MORGANE et al., 2005). De fato, estudos mostram que além de controlar fundamentalmente comportamentos relacionados ao medo (HUNSPERGER, RW, 1956), a substância cinzenta periaquedutal participa da elaboração e expressão de comportamentos relacionados à ansiedade, tais como esquiva e avaliação de risco (MAGOUN et al., 1937; BANDLER et al., 1991; CAROBREZ et al., 2001; BERTOGLIO et al., 2005).

2. Teste de Exposição ao Rato

Nos últimos anos o estudo do comportamento defensivo de animais de laboratório como ratos e camundongo, promoveu um avanço significativo no entendimento das bases neurais relacionadas aos estados emocionais de medo e ansiedade (MARKS, 1987; BLANCHARD et al., 1988; CARVALHO-NETTO & NUNES-DE-SOUZA 2004a). Os estudos, farmacológico e comportamental, em roedores têm sugerido que a resposta de avaliação de risco apresentada por estes roedores frente a uma ameaça potencial, e a resposta de fuga que exibem diante de um perigo proximal, podem estar relacionadas ao transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e ao transtorno de pânico, respectivamente (GRAY & McNAUGHTON, 2000; GRAEFF & ZANGORSSI, 2002; BLANCHARD et al., 2003; CARVALHO-NETTO & NUNES-DE-SOUZA 2004a). Entretanto, diante do confronto com o predador, ratos e camundongos de laboratório demonstram diferenças relevantes nas suas respostas defensivas (BLANCHARD et al., 1997; 1998; 2001; CARVALHO-NETTO & NUNES-DE-SOUZA 2004a; CARVALHO-NETTO & NUNES-DE-SOUZA, 2006). Uma das principais diferenças é o comportamento de avaliação de risco (orientação e aproximação frente à ameaça) que é mais frequentemente observado em camundongos do que em ratos. Segundo Blanchard e colaboradores (2001), esse comportamento é mais exibido por camundongos, inclusive em situações altamente ameaçadoras, como na presença proximal de um predador (gato ou rato). Esse comportamento

não é tão observado em ratos, que em situações ameaçadoras exibem o comportamento de imobilidade. Baseando-se no fato de que os camundongos apresentam níveis expressivos de avaliação de risco, os quais segundo Gray & Mcnaughton (2000) tem relação com os processos ansiosos, a utilização dessa espécie parece ser uma ferramenta de elevada importância na investigação da neurobiologia da ansiedade e também do medo.

Algumas explicações para essas diferenças comportamentais entre ratos e camundongos foram propostas por Blanchard e colaboradores (2001). Devido ao tamanho reduzido (10 vezes menor que o rato), o camundongo é facilmente manipulado pela cauda, o que dificulta o ataque defensivo (mordidas) por parte desse animal, além disso, esses ataques (mordidas) causam menor grau de ferimento do que aquelas exibidas por ratos que na maioria das vezes são sacrificados (BLANCHARD et al., 1997; 1998; 2001; CARVALHO-NETTO & NUNES-DE-SOUZA 2004a; CARVALHO-NETTO & NUNES-DE-SOUZA, 2006). Foi observado que os comportamentos defensivos de camundongos de laboratório diante da aproximação do predador, principalmente a fuga e o congelamento, foram considerados de menor intensidade que os exibidos por camundongos selvagens, essas diferenças não foram tão expressivas quanto aquelas observados por ratos (BLANCHARD et al., 1998).

Yang e colaboradores (2004), demonstraram que quando a presa (ex. camundongo) pode decidir entre aproximar-se ou afastar-se do predador (ex. rato), possibilita a expressão de diferentes comportamentos defensivos, tais como, esquiva, congelamento, avaliação de risco e ocultação defensiva. Resultados recentes têm mostrado que o tratamento sistêmico com diazepam, agonista benzodiazepínico, e a buspirona, agonista serotoninérgico dos receptores 5-HT_{1A}, diminuem comportamentos como avaliação de risco e esquiva do predador, (BLANCHARD et al., 2004).

Diante das evidências acima, tem sido sugerido que o camundongo é uma espécie adequada para o estudo dos comportamentos defensivos exibidos diante da ameaça proximal (tais como

fuga e luta), relacionados ao medo, como também àqueles relacionados à ameaça potencial (avaliação de risco) relacionados à ansiedade (BLANCHARD et al., 1997; 1998; 2001; 2003; CARVALHO-NETTO & NUNES-DE-SOUZA, 2004a).

Neste sentido, o teste de exposição ao rato é um modelo animal de ansiedade proposto por Yang e colaboradores (2004), que se baseia na interação entre presa-predador. Quando confrontados com ratos, camundongos selvagens ou de laboratório exibem claras respostas defensivas (BLANCHARD et al., 1998). Fortalecendo esta hipótese dados da literatura apontam que ratos são predadores naturais de camundongos tanto na natureza (ANISMAN et al., 2001).

O aparato consiste em uma caixa de acrílico dividida em dois compartimentos, sendo o predador confinado em um lado e, separados por uma tela, a presa do outro lado pode explorar livremente a área adjacente (superfície) ou esquivar-se em uma toca que é interligada ao compartimento da presa através de um túnel. Diferentemente do modelo Bateria de Testes de Defesa para Camundongos (*Mouse Defense Test Battery*), no qual um camundongo é perseguido por um predador (rato anestesiado manualmente conduzido por um experimentador) o modelo do teste de exposição ao rato permite que a presa escolha afastar-se ou aproximar-se do predador, e se destaca pela marcante avaliação de risco exibida pelos camundongos, sobretudo no túnel (BLANCHARD et al., 2004; BENJAMINI & GUIMARÃES, 2006).

A exposição de camundongos a ratos aumenta os níveis circulantes de corticosterona e resulta em maior expressão de proteína c-Fos (um marcador de atividade neuronal) em estruturas hipotalâmicas claramente envolvidas com a ameaça predatória (CARVALHO-NETTO & NUNES-DE-SOUZA., 2007; MARTINEZ et al., 2008; NUNES-DE-SOUZA et al., 2010). Foi também demonstrado a participação dos receptores de CRF (Fator Liberador de Corticotropina) (CARVALHO-NETTO & NUNES-DE-SOUZA., 2007; LITVIN et al., 2007), e do sistema glutamato-óxido nítrico da SCP (CARVALHO-NETTO & NUNES-DE-SOUZA., 2007), nas respostas defensivas de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato. Entretanto, um

recente trabalho conduzido em nosso laboratório mostrou que a injeção de midazolam no hipocampo ventral e produziu efeito ansiolítico em camundongos no teste de exposição ao rato (FACHINI e CANTO-DE-SOUZA, 2011). Assim, além de eliciar ansiedade/medo, a exposição de camundongos ao predador também elicia antinocicepção, conforme foi demonstrado em estudo realizado recentemente por REIS e CANTO-de-SOUZA (2011). Neste estudo a exposição de camundongos ao predador (rato) produziu redução das medidas de nocicepção em animais com constrição do nervo ciático (CNC), e o agonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, injetado na substância cinzenta periaquedutal ventral produziu efeito ansiolítico nos camundongos com CNC, sem alterar os índices de nocicepção no teste de exposição ao rato.

3. Conceitos de Dor e Antinocicepção

A palavra dor pode ser utilizada para descrever uma variedade de sensações, e aspectos emocionais, associadas a um tipo de injúria sofrida em decorrência de um ferimento, ou até sensações anormais derivadas de síndromes neuropáticas (CERVERÓ, 2000). De acordo com a Associação Internacional de Estudos para a Dor (IASP) “A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano potencial de fato, ou ainda, descrita em termos que sugerem tal dano” (IASP, 2007).

Neste contexto Brandão (2004) sugere que a dor, assim como outras respostas de defesa, são estados fisiológicos expressos que se aproximam do máximo necessário para a proteção do organismo. Entretanto, em alguns casos, a dor perdura por tempo excessivamente longo e passa a desencadear sofrimento desnecessário, muitas vezes prejudicial ao organismo. O primeiro caso corresponde à dor aguda, e o segundo, à dor crônica. Em geral a dor crônica indica doença (dor

patológica) e não tem o caráter protetor da dor aguda (PRADO, 2005) a qual cessa com a recuperação da injúria.

Para o diagnóstico de dor crônica, é necessário que haja pelo menos seis meses de preocupação com a dor e a inexistência de uma patologia orgânica evidente ou estímulo externo responsável pela dor nesse período (IASP, 2007). A dor crônica pode ocorrer como consequência de doenças estruturais ou funcionais da maioria dos órgãos do corpo ou na ausência de detecção de qualquer injúria neuronal perceptível (MILLAN, 1999).

Ainda, no que diz respeito a diferenças entre a dor aguda e crônica, ambas possuem os componentes fásico e tônico. O componente fásico é caracterizado pelo rápido início da dor, ao passo que o componente tônico compreende a fase insidiosa e persistente. O componente tônico tem a função de induzir o repouso, cuidados e proteção da área lesada a fim de promover a recuperação do dano. Todavia, em casos de dor crônica, o componente tônico pode persistir mesmo após ter ocorrido à cura da injúria (BRANDÃO, 2004).

A sensibilidade à dor pode variar muito em diferentes grupos socioculturais, bem como em função do estado emocional ou das circunstâncias em que a lesão ocorre. Exemplos clássicos incluem soldados que mesmo seriamente feridos em combate, relatam pouca ou nenhuma dor enquanto estão na batalha, ou ainda, atletas que frequentemente não detectam injúrias sofridas enquanto estão competindo (PRADO 1999, BASBAUM & JESSEL, 2000).

Segundo Brandão (2004), a dor é uma experiência universal da espécie humana, todos sabem o que significa apesar de não haver uma definição satisfatória. A transmissão do estímulo doloroso pela medula espinhal é modulada por estruturas supraespinhais como o *locus cerúleos* (LC), bulbo rostral ventromedial (BRV) e substância cinzenta periaquedutal (SUZUKI et al., 2004; VANEGAS e SCHAIBLE, 2004).

As vias ascendentes da condução dolorosa até estruturas superiores do sistema nervoso central (SNC) são identificadas como: paleoespinotalâmica, que possui forte conotação afetiva

(sofrimento), motivando reações defensivas e a via neoespinalâmica, que apresenta velocidade de condução mais rápida, projetando-se para o tálamo ventral póstero-lateral e córtex sensorial somático I e II (WILLIS et al., 1979).

O controle central inibitório descendente é um importante mecanismo, em que, a partir da interação entre processos induzidos por estímulos nociceptivos e por estímulos de medo, podem levar à inibição da nocicepção, que corresponde à analgesia (MILLAN, 1999). A substância cinzenta periaquedutal recebe fibras aferentes de neurônios nociceptivos da medula espinhal e envia projeções para núcleos talâmicos que processam a dor, e mantém ainda relações recíprocas com a amígdala que por sua vez, possui a capacidade de modular a resposta defensiva (BLANDLER; KEAY, 1996). Deste modo lesões nesta estrutura, alteram o estado de medo e ansiedade produzidos por estimulação elétrica ou química (BEHBEHANI, 1995).

Dependendo do tipo de estímulo doloroso, diferentes mecanismos fisiológicos são ativados. Estudos anteriores demonstraram que a aplicação de substâncias irritantes no peritônio de roedores provoca resposta nociceptiva que pode ser modulada por agonistas de receptores opióides μ (mi) e κ (kappa) (TYERS, 1980; ABBOTT et al., 1986). Este modelo, conhecido como teste de contorções abdominais, foi inicialmente empregado por Vanderwende e Margolin (1956) e permite medir a dor através da contagem do número de contorções abdominais induzidas por estímulos químicos. Este teste de nocicepção tem como maior vantagem o possível emprego durante a exposição a uma situação ameaçadora (como a exposição da presa ao predador).

A dor originada em estruturas somáticas profundas (músculos e articulações) e em estruturas viscerais, ativa a coluna ventrolateral da SCP, promovendo analgesia opióide (TESKEY e KAVALIERS, 1995), enquanto que a dor evocada pela estimulação cutânea e superficial é capaz de ativar a coluna dorsolateral da SCP, gerando analgesia não-opiódide (KEY e BANDLER, 2000). Com relação à analgesia não-opióide, evidências mostram que determinadas situações

aversivas inibem a dor através de mecanismos mediados por receptores benzodiazepínicos e/ou serotoninérgicos (RODGERS, et al 1995; CANTO-DE-SOUZA et al., 1997, 1998). Como estes mecanismos também atuam na modulação de estados emocionais sugere-se que alguns tipos de analgesia não-opióide podem estar relacionados com mecanismos de ansiedade (RODGERS et al., 1990; RODGERS et al., 1997; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; OLIVIER et al., 2000).

Embora tenha sido demonstrada a existência de uma relação recíproca entre dor e distúrbios afetivos em modelos animais (BOCCALON et al., 2006; NARITA et al., 2006; BENBOUZID et al., 2007; HASNIE et al., 2007), a influência da nocicepção sobre o processo de ansiedade, depressão e medo permanece controversa na literatura. Assim, a proposta inicial de que o medo inibe a dor foi realizada por Bolles e Fanselow (1980), e esta inibição parece estar relacionada a mecanismos analgésicos endógenos envolvendo as endorfinas. Com a caracterização dos opióides endógenos, muitos modelos animais vêm sendo desenvolvidos e adaptados para o estudo da antinocicepção induzida pela resposta defensiva, com o objetivo principal de selecionar drogas analgésicas que se mostrem mais potentes para o tratamento da dor em humanos (FRAZER e HARRIS, 1967; TABER, 1974).

Ao lado das respostas fisiológicas e comportamentais defensivas, estudos anteriores demonstraram que a exposição de camundongos ao LCE (labirinto em cruz elevado) também induz antinocicepção (LEE e RODGERS, 1990; CONCEIÇÃO et al., 1992; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; MENDES-GOMES e NUNES-DE-SOUZA, 2005). Na tentativa de esclarecer os mecanismos relacionados à ansiedade, diversos trabalhos demonstraram que, a administração de benzodiazepínicos e de outros compostos ansiolíticos como a buspirona, um agonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, aumentam a porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos do labirinto em roedores (DE-SOUZA et al., 1998; GRIEBEL et al., 2000; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; ROSA et al., 2000; ALBRECHET-SOUZA et al., 2005), desinibindo o comportamento de esquiva dos braços abertos. De maneira semelhante, o

flumazenil (antagonista dos receptores GABA_A-BDZ) provocou efeitos ansiolíticos em voluntários sadios submetidos em testes de ansiedade (KAPCZINSKI et al 1994). Entretanto, alguns trabalhos também vêm apresentando efeitos controversos do flumazenil tais como, ansiolíticos (MOY et al., 1997 e BELZUNG et al., 2001; BARBALHO et al., 2009), ansiogênicos (POKK et al., 1997 e SAVIC et al., 2006) e ausência de efeitos (SCHIMIDT et al., 1998 e DALVI e RODGERS, 1999, BARBALHO et al., 2009) em ratos e camundongos submetidos ao LCE.

Além disso, Jiménez-Velázquez e colaboradores (2008), objetivando esclarecer o papel dos receptores GABA_A na modulação dos estímulos nociceptivos induzidos pela injeção intra-articular de ácido úrico em ratos, mostrou que o efeito antinociceptivo produzido pelo tratamento sistêmico com diazepam é bloqueado pela administração intraperitoneal de flumazenil (HUNKELER et al., 1981).

Outra classe de ansiolíticos que é objeto estudo de diversos trabalhos, tanto na modulação da nocicepção quanto da ansiedade, são os compostos envolvidos na neurotransmissão serotoninérgica. A serotonina (5-hitroxitriptamina ou 5-HT) é um neurotransmissor com diversas funções cerebrais (FELDBERG e MYERS, 1964), entretanto, o papel da serotonina na modulação dos estados de ansiedade pode estar relacionado ao tipo de estímulo aversivo (condicionado ou incondicionado), além do sítio de ação no sistema nervoso central (DEAKIN e GRAEFF, 1991; HANDLEY, 1995; GRAEFF et al., 1997). Em 1991, Deakin e Graeff propuseram a teoria do papel dual da serotonina na ansiedade. Segundo estes autores, a serotonina pode atuar facilitando o comportamento defensivo, ou inibindo-o, dependendo dos sítios e dos subtipos de receptores serotoninérgicos que atuam no sistema nervoso central.

Alguns resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa têm demonstrado o complexo papel da modulação da ansiedade, em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado, após administração de agonistas e antagonistas dos subtipos de receptores serotoninérgicos, em

diferentes estruturas do SNC (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; CANTO-DE-SOUZA et al., 2002; NUNES-DE-SOUZA et al., 2002; CORNÉLIO e NUNES DE SOUZA, 2007; FACHINI e CANTO-DE-SOUZA, 2007; NUNES-DE-SOUZA et al., 2008). NUNES-DE-SOUZA e colaboradores (2000) demonstraram que a injeção de 8-OH-DPAT (receptor agonista 5-HT_{1A}) intra-amídala não é capaz de promover antinocicepção em camundongos confinados aos braços abertos do LCE.

A amídala é amplamente reconhecida por seu papel na regulação do comportamento emocional (KUHAR, 1986) e sabe-se que ela é um importante sitio para a ação dos benzodiazepínicos (THOMAS et al., 1985; BARBALHO et al., 2009). Ela está relacionada ao medo condicionado, e sua estimulação elicia respostas de medo e ansiedade (NIEMINEM et al., 1992), enquanto que lesões nesta estrutura reduzem comportamentos relacionados à ansiedade (TREIT et al., 1993). A amídala foi um dos primeiros sítios neurais no qual lesões resultaram em uma diminuição de resposta de defesa de ratos expostos ao predador (BLANCHARD et al., 1971).

Foi demonstrado que a administração de antagonistas serotoninérgicos tais como o ondansetron e o tropisetron na amídala, produziu efeito ansiolítico em ratos avaliados tanto no teste de interação social (HIGGINS et al., 1991) como no labirinto em cruz elevado (MENDES-GOMES & NUNES-DE-SOUZA, 2009), evidenciando um efeito inibitório destes compostos.

O complexo papel da serotonina tanto na modulação da ansiedade, como sobre a nocicepção (ARDID et al., 2001), pode ser decorrente da interação da neurotransmissão gabaérgica e serotoninérgica. Neste sentido, a antinocicepção induzida pela estimulação elétrica da SCP, e avaliada pelo teste de retirada da cauda, foi inibida pela administração de midazolam e cetanserina em ratos, demonstrando que esta antinocicepção pode ser modulada por mecanismos GABA-benzodiazepínicos e serotoninérgicos, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2006). Esta co-modulação corrobora á trabalhos recentes, com o uso de técnicas imunohistoquímicas, que

demonstraram a existência de uma grande proporção de neurônios gabaérgicos que expressam receptores 5-HT₂ (GRIFFITNS e LOVICK, 2002).

Vários trabalhos têm apresentado um intrigante aspecto relacionado ao perfil comportamental e a sensibilidade de roedores a drogas ansiolíticas em exposições subsequentes ao aparato. Assim, uma única experiência ao LCE reduz significativamente a exploração nos braços abertos em uma segunda exposição (GRIEBEL et al., 1997; GONZALES e FILE, 1997; RODGERS et al., 1997b).

As possíveis hipóteses levantadas para explicar a perda do efeito dos benzodiazepínicos estão relacionadas principalmente à: diminuição do conflito fuga/aproximação, mudança celular na transmissão GABA-BDZ, e o papel da consolidação da memória quanto ao aparato (ANDREATINI et al., 2003). Outra possibilidade levantada é a que mudança na natureza da ansiedade (estado fóbito) causaria a liberação de agonistas inversos endógenos que podem dessensibilizando receptores BZDs (GONZALES e FILE, 1997; BARBALHO et al., 2009). Desta forma a insensibilidade dos roedores aos efeitos das drogas ansiolíticas na reexposição poderia ser explicada por esse conjunto de hipóteses (para revisão ver, CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005).

Esse fenômeno conhecido como “*One Trial Tolerance*” (OTT) (File, et al 1993), também é observado na clínica com o uso de drogas GABA-benzodiazepínicas (GUIMARÃES, 1989; GRAEFF, 1999) e tem sido estudado em nosso e em outros laboratórios (HANDLEY e MITHANI, 1984; GONZALES e FILE, 1997; RODGERS, et al 1997b; HOLMES e RODGERS, 1999, BELZUNG e GRIEBEL, 2001; CRUZ-MORALEZ, et al 2002; FRUSSA-FILHO e RIBEIRO, 2002; CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005; REIS e CANTO-DE-SOUZA, 2008; BARBALHO et al., 2009). Desta forma a insensibilidade dos roedores aos efeitos das drogas ansiolíticas na reexposição poderia ser explicada por esse conjunto de hipóteses.

Na tentativa de avaliar a participação de mecanismos GABA-Benzodiazepínicos na antinocicepção induzida pela reexposição ao LCE, trabalho realizado por ALBRECHET-

SOUZA et al., (2005) mostrou que a administração sistêmica de midazolam antes da segunda exposição não alterou a resposta nociceptiva em ratos. Embora tenham também confirmado que ambas as exposições não produziram antinocicepção avaliada pelo teste de retirada da cauda.

Recentes trabalhos do nosso laboratório mostraram que o confinamento aos braços abertos do LCE promoveu diminuição no número de contorções abdominais, e que esta antinocicepção é revertida pela injeção de midazolam na amígdala de camundongos (BAPTISTA et al., 2009), o que confirmou resultados anteriores (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000).

BAPTISTA e colaboradores (2009) também demonstraram que o confinamento prévio aos braços abertos do LCE, 24 horas antes da reexposição ao aparato e ao teste de contorções abdominais, não atenuou a antinocicepção induzida pela ansiedade em camundongos, assim como a administração sistêmica e intra-amígdala de midazolam também não foi capaz de reverter estas respostas.

4. Neurofisiologia da Nocicepção

Uma das funções do sistema nervoso é fornecer informação ao organismo sobre a ocorrência ou a ameaça de uma lesão real ou potencial. Neste sentido, fibras sensoriais especializadas fornecem informação ao sistema nervoso central (SNC) sobre o ambiente e também sobre o estado do organismo em si (MEYER et al., 2006). No caso das informações nociceptivas, a informação é veiculada através de um sistema sensorial específico. Para isso, existem receptores e vias aferentes da dor específicos para todos os estímulos capazes de ultrapassar os limites fisiológicos e provocar lesão do organismo (LENT, 2001). Desta forma, a informação dolorosa é detectada por receptores funcionalmente diferenciados e que estão localizados nas terminações das fibras nervosas, os chamados nociceptores.

Os nociceptores estão amplamente distribuídos na pele, mucosas, vísceras, músculos, periósteo e articulações (MILLAN 199; PRADO, 2005; BRANDÃO, 2004). Estes, por sua vez, são diferenciados devido ao fato de que respondem a múltiplas formas de estímulos que produzem lesão, tais como estímulos mecânicos, térmicos e químicos, e fornecem informação ao SNC considerando a localização e intensidade do estímulo nocivo (MEYER et al., 2006).

A lesão ou irritação na pele ou em tecidos subcutâneos como articulações e músculos resulta na liberação de vários mediadores químicos, tais como, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, serotonina, histamina, substância P, tromboxanas, fator ativador de plaqueta, adenosina, trifosfato de adenosina (ATP), prótons e radicais livres. Estas substâncias medeiam ou facilitam a ativação direta dos nociceptores, enquanto outras agem indiretamente via células inflamatórias que liberam agentes algogênicos e desencadeiam a resposta inflamatória. Outros mediadores levam a uma sensibilização da resposta dos nociceptores a estímulos naturais e, assim, exercem um papel na hiperalgesia primária (MEYER et al., 2006).

Os nociceptores são porções terminais dos axônios de neurônios sensoriais cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios sensitivos espinhais ou do nervo trigêmeo (BRANDÃO, 2004). A estimulação periférica de intensidade suficiente ativa os nociceptores e, então, são gerados potenciais de ação que percorrem toda extensão do neurônio aferente primário. Esses neurônios, denominados neurônios aferentes primários ou neurônios de primeira ordem, além do ramo periférico, possuem um ramo central, que adentra o corno dorsal da medula espinal pela raiz dorsal e posteriormente o tronco encefálico (PRADO, 2005), como ilustra a figura 1.

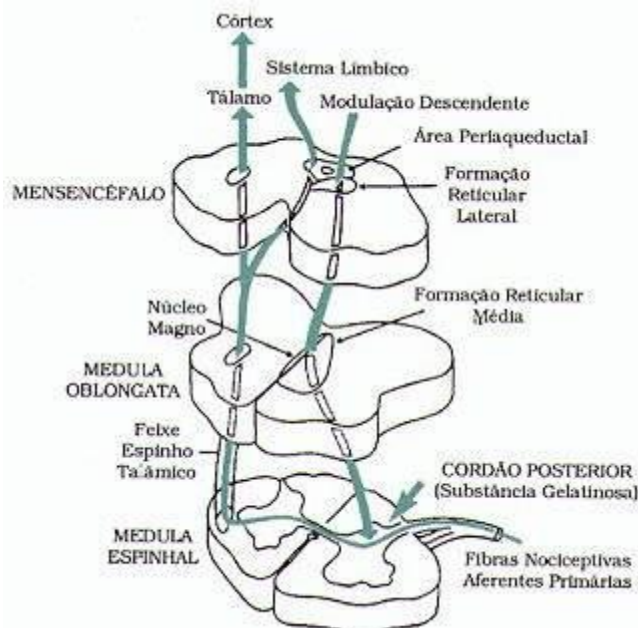


Figura 1: Esquema da condução do estímulo doloroso.
 Fonte: www.psicoforum.br.tripod.com

As fibras do neurônio de primeira ordem variam quanto ao grau de mielinização e à velocidade de condução de estímulos. São reconhecidas as fibras A delta ($A\delta$) mielinizadas, de maior calibre (2-6 μ m de diâmetro), responsáveis pela condução rápida de sinais nociceptivos (12-30m/s), e as fibras C que são amielínicas e de menor calibre (0,4 - 1,2 μ m de diâmetro), responsáveis pela condução lenta da dor (0,5-2m/s) (PRADO, 2005; MILLAN, 1999). Cerca de 60 a 70 % das fibras aferentes sensoriais são do tipo C. A ativação da fibra $A\delta$ provoca uma sensação de dor cortante e bem localizada enquanto a ativação de fibras C promove uma sensação de dor em queimação, mais intensa e sem localização precisa (LE BARS et al., 2001).

No corno dorsal da medula espinhal, os neurônios de primeira ordem estabelecem sinapses com neurônios de segunda ordem. Este é o local da primeira sinapse para as vias ascendentes que transmitem a informação sensorial nociva ao encéfalo que, por sua vez, processa a percepção consciente de dor (TODD; KOERBER, 2006).

Rexed (1952) dividiu a matéria cinzenta da medula espinhal do gato em dez lâminas paralelas (REXED, 1952 apud MILLAN, 1999). Tal divisão foi definida de acordo com diferenças no tamanho e densidade de vesículas de neurônios. O uso deste esquema tem sido

extensivo à organização anatômica da medula espinhal em várias outras espécies tais como humanos, macacos e roedores (TODD; KOERBER, 2006). O corno dorsal da medula espinhal compreende as lâminas I e II, III e IV, V e VI. A lâmina VII corresponde à matéria cinzenta intermediária, as lâminas VIII e IX compreendem o corno ventral medial e lateral., respectivamente, enquanto a lâmina X é a região que circunda o canal central da medula espinhal. As duas lâminas superficiais I e II juntamente com as lâminas profundas, V e VI, e a lâmina X, constituem as regiões implicadas na recepção, processamento e transmissão da informação nociceptiva (MILLAN, 1999). No corno dorsal da medula espinhal, a passagem de impulsos nociceptivos do aferente primário para o neurônio de segunda ordem ocorre através da liberação local de diversas substâncias envolvidas na transmissão central e modulação da informação nociceptiva.

Após sinapse no corno dorsal da medula espinhal, os axônios das células de segunda ordem transpõem a linha média para chegar ao fascículo espinhal ventrolateral (anterolateral no humano) contralateral. Todavia, alguns axônios ascendem pelo fascículo ventrolateral ipsilateral (MILLAN 1999, PRADO, 2005; BRANDÃO, 2004).

De um ponto de vista neuroanatômico, dois tipos de vias ascendentes podem ser reconhecidas: vias monossinápticas e polissinápticas. As vias monossinápticas projetam diretamente para estruturas encefálicas superiores e compreendem os tratos espinotalâmico, espinomesencefálico, espinoparabraquial, espino-hipotalâmico e o espinorreticular (MILLAN, 1999). Uma parte do trato espinorreticular projeta para a formação reticular lateral, um núcleo pré-cerebelar envolvido no controle motor. A outra porção desse trato projeta para a formação reticular pontinobulbar medial e de lá para circuitos tálamo-corticais (TEXEIRA, 2006; MILLAN, 1999).

A via espinomesencefálica possui um trato espino-anular que se projeta para a substância cinzenta periaquedutal (SCP) e o trato espino-tectal que se dirige principalmente para as camadas

profundas do colículo superior. O principal alvo do trato espinomesencefálico é a área parabraquial da ponte, uma região importante na integração das respostas cardiovasculares, autonômicas e motivacionais à dor (MILLAN, 1999; TODD, 2006). Outras duas vias específicas que se projetam para a área parabraquial são as vias espinoparabraquio-hipotalâmica e espinoparabraquio-amidalóide, respectivamente, conforme as projeções subsequentes das duas subpopulações de neurônios do núcleo parabraquial (PRADO 2005; TEXEIRA 2006). Além disso, neurônios individuais da área parabraquial podem prover axônios a ambos os locais tálamo e medula espinhal destacando seu papel integrativo na transmissão sensorial (PRADO, 2005).

As vias polissinápticas possuem uma estação relé de neurônios de segunda ordem no trajeto para os centros superiores. As duas rotas mais importantes são o trato espinocervical que projeta para o núcleo cervical lateral no nível C1-C3, e a via da coluna dorsal pós-sináptica (ou sistema lemniscal), que projeta para os núcleos cuneiforme (dos segmentos torácico e cervical) e grácil (dos segmentos lombo-sacrais), núcleos da coluna dorsal do bulbo caudal (TODD, 2006).

Desta forma, podemos dizer que há um padrão complexo e interativo de inervação múltipla direta e indireta do tálamo, mesencéfalo, sistema límbico, córtex, formação reticular e várias outras estruturas encefálicas através de múltiplas vias ascendentes. Estas regiões supraespinhais estão interligadas e também interagem com mecanismos de modulação descendente carregada para o corno dorsal da medula espinhal (MILLAN, 1999).

O estudo sobre o controle descendente da nocicepção começou com Melzack e Wall (1965) quando eles observaram que estruturas no tronco encefálico inibem tonicamente neurônios nociceptivos na medula espinhal.

A substância cinzenta periaquedutal foi a primeira estrutura a ser relacionada à modulação da dor (REYNOLDS, 1969; MAYER et al., 1971). Durante a estimulação desta estrutura, os

animais permanecem em estado de alerta e ativos, entretanto, as respostas a estímulos nocivos, incluindo orientação, vocalização e fuga, não estão presentes (FIELDS et al., 2006).

Pesquisas subsequentes demonstraram que a SCP faz parte de um circuito do SNC que modula a transmissão nociceptiva em nível medular. Em animais, a estimulação da SCP inibe reflexos provocados por estímulos dolorosos, tais como retirada da cauda ou retirada da pata. Além disso, neurônios nociceptivos na medula espinhal são seletivamente inibidos pela estimulação da SCP, e lesões do funículo dorsolateral da medula espinhal reverte à inibição causada por estimulação desta estrutura sobre neurônios do corno dorsal nociceptivos e respostas reflexas a estímulos nociceptivos (FIELDS et al., 2006). A SCP integra aferências do telencéfalo límbico e diencefalo com aferências nociceptivas ascendentes do corno dorsal (BANDLER; KEAY, 1996).

A amígdala, que recebe a entrada massiva de projeções de ambos, hipocampo e neocórtex, é outra grande fonte de aferência para a SCP. Foi demonstrado que a antinocicepção resultante da microinjeção de agonistas opióides na amígdala é bloqueada por inativação com lidocaína, ou injeção de antagonista opióide na SCP (HELMSTETTER et al., 1998; PAVLOVIC et al., 1996). O núcleo basolateral da amígdala recebe considerável aferência cortical. Este núcleo envia projeções para o núcleo central da amígdala que, por sua vez, envia um número considerável de projeções para a SCP (RIZVI et al., 1991). Cabe ressaltar ainda que o núcleo central da amígdala também recebe a entrada nociceptiva, diretamente da medula espinhal e indiretamente da lâmina I (GAURIAU e BERNARD, 2002).

Outra estrutura relacionada à modulação da dor é o núcleo accumbens, que está localizado no estriado ventromedial (GEAR et al., 1999). Este núcleo recebe uma projeção maior da amígdala basolateral e não tem projeção direta para a SCP, mas projeta-se para o hipotálamo lateral e para a amígdala, que por sua vez, envia projeções para a SCP (ZAHM et al., 1999). Outra grande fonte diencefálica de aferentes para a SCP é o hipotálamo (BANDLER; KEAY, 1996).

Tem sido demonstrado que a estimulação elétrica ou microinjeção opióide em algumas regiões do hipotálamo produz antinocicepção (HOLDEN et al., 2002).

As maiores entradas do tronco cerebral para a SCP provêm do núcleo cuneiforme. A SCP também é reciprocamente conectada com o bulbo rostral ventromedial (BRV). O BRV compreende o núcleo magno da rafe na linha média e a formação reticular adjacente que se situa ventralmente ao núcleo reticular gigantocelular. A estimulação elétrica ou a microinjeção de aminoácidos excitatórios no BRV produz analgesia e inibe respostas neuronais do corno dorsal ao estímulo nocivo (FIELDS et al., 1991). A SCP e o núcleo cuneiforme adjacente são as maiores fontes de entradas para o BVR (FIELDS et al., 2006).

5. Antinocicepção induzida por estímulos ambientais aversivos

A exposição de animais a situações ameaçadoras, de natureza inata ou aprendida, resulta em um repertório de comportamentos defensivos espécie-específicos, alterações autonômicas e inibição da dor, sendo esse conjunto de reações de alta relevância para a sobrevivência de uma espécie (DEAKIN; GRAEFF, 1991).

Bolles e Fanselow (1980) argumentaram que comportamentos defensivos e respostas nociceptivas são atividades incompatíveis, uma vez que os cuidados dispensados à recuperação da injúria sofrida prejudicariam a exibição de respostas defensivas apropriadas. Com efeito, uma série de estudos tem demonstrado que o sistema antinociceptivo pode ser ativado por uma variedade de estímulos nociceptivos externos ou ambientais, exercendo importante função no controle de comportamentos defensivos e afetivos (FANSELOW, 1991; FARDIN et al., 1984; TERMAN et al., 1984; WATKINS et al., 1982). Por exemplo, ratos expostos à presença de um

gato exibem resposta antinociceptiva detectada pelos testes de retirada da cauda (FANSELOW, 1991) e formalina (LESTER; FANSELOW, 1985).

A antinocicepção induzida por estímulos ambientais tem sido uma das mais estudadas, sendo o LCE um dos modelos utilizado para avaliar a influência do medo sobre a nocicepção em roedores (LEE; RODGERS, 1990, 1991; TAUKULIS; GOGGIN, 1990, RODGERS et al., 1992; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000). O teste é baseado na aversão natural de roedores a espaços abertos e tem sido amplamente usado para estudar ansiedade e sua modulação pelo tratamento com drogas (para revisão olhar, CAROBREZ e BERTÓGLIO, 2005).

Tem sido demonstrado que o confinamento no braço aberto do LCE provoca reações defensivas caracterizadas por imobilidade, aumento nos níveis de corticosterona plasmática, defecação (PELLOW et al., 1985) e antinocicepção (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000), quando comparado ao confinamento nos braços fechados, sugerindo ser a exposição um fato estressante. Com relação à inibição da resposta nociceptiva, Lee e Rodgers (1990) foram os primeiros a demonstrar que a exposição à LCE resulta em antinocicepção, conforme avaliado pela elevação da latência de retirada da cauda (tail flick test). Esse tipo de analgesia parece ser mediado por mecanismos não opióides, uma vez que não é bloqueado por naltrexona e não apresenta tolerância cruzada com morfina (LEE e RODGERS, 1990). Porém, pode ser bloqueada pelo pré-tratamento com ansiolíticos com ação em receptores benzodiazepínicos (RODGERS et al., 1992) e serotoninérgicos para o subtipo de receptores 5-HT_{1A} (LEE e RODGERS, 1991).

Em relação a modulação dos sítios benzodiazepínicos no receptor GABA_A, foi demonstrado que o midazolam (agonista pleno de receptores benzodiazepínicos) atenuou a ansiedade no teste do LCE e bloqueou completamente a resposta antinociceptiva em animais confinados no braço aberto do aparato. Neste mesmo estudo, foi demonstrado ainda que a antinocicepção induzida pelo confinamento no braço aberto do aparato é insensível ao tratamento sistêmico com naloxona (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000).

Em outro trabalho, Mendes-Gomes & Nunes-de-Souza (2005), demonstraram que camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado todo aberto (quatro braços abertos), gastam menos tempo lambendo a pata injetada com formalina, quando comparados aos grupos expostos ao labirinto em cruz elevado padrão e ao labirinto em cruz elevado fechado (quatro braços fechados). Neste mesmo sentido, Baptista e colaboradores (2009) mostraram que o confinamento prévio aos braços abertos do LCE, 24 horas antes da reexposição ao aparato e ao teste de contorções abdominais, não atenuou a antinocicepção induzida pela ansiedade em camundongos. Assim como, a administração sistêmica e intra amídala do midazolam também não foram capazes de reverter esse quadro.

Diante do exposto, podemos observar que a antinocicepção induzida pelo LCE depende do grau de aversão do teste. É importante ressaltar ainda que exposições a situações aversivas podem provocar uma série de respostas coordenadas (referidas como “respostas ao estresse”) como alterações comportamentais, ativação autonômica e a secreção de hormônios tais como hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e cortisol/corticosterona (VAN DE KAR et al., 1999).

Além disso, foi demonstrado que corticosterona modula nocicepção e ansiedade/ medo. Por exemplo, aumento dos níveis de corticosterona plasmática está correlacionado com o aumento no limiar de sensibilidade à dor em ratos expostos à estimulação elétrica na cauda (BOGDANOV et al., 2000; BOGDANOV. et al., 2003).

Os mecanismos envolvidos na inibição da dor por estímulos estressores, como o LCE, são pouco conhecidos, entretanto, tem sido demonstrado, que na analgesia induzida pelo estresse, existe diferenças entre os sexos no que diz respeito à magnitude de analgesia apresentada por machos e fêmeas expostos à mesma condição de estresse. Por exemplo, Vendruscolo e colaboradores (2004) demonstraram que ratas espontaneamente hipertensas submetidas a um estresse de nado forçado por três minutos exibiram maior percentagem de analgesia induzida por estresse quando comparadas aos machos dos respectivos grupos. Recentemente, também foi

demonstrado que a exposição de camundongos fêmeas ao rato, no teste de exposição presa-predador, produziu aumento da antinocicepção, avaliada pelo teste de contorções abdominais, e a avaliação da fase do ciclo estral mostrou que a maioria dos animais estava na fase do ciclo conhecida como diestro (PEIXOTO e CANTO-DE-SOUZA, 2008). Nesta fase do ciclo os animais estão mais sensíveis ao estímulo aversivo e com mais ansiedade/medo (MARCONDES et al., 2001).

Ainda em relação ao modelo presa-predador, foi verificado que a SCP é uma das estruturas que modula a antinocicepção induzida em camundongos após a submissão ao teste de exposição ao rato, e avaliada pelo teste de CNC (REIS e CANTO-DE-SOUZA, 2001). *Porém, até o momento nenhum estudo investigou se a amígdala interfere na modulação da antinocicepção induzida em camundongos após a submissão ao teste de exposição ao rato e avaliada pelo teste de contorções abdominais.*

6. Amígdala

A amígdala, identificada por Budach no início do século IX (para revisão, ver SAH et al., 2003), é uma estrutura em forma de amêndoa localizada no lobo temporal. Inicialmente, ela foi descrita como um grupo de células que atualmente é denominado complexo basolateral. Por conseguinte, um grande número de estruturas que circundam o complexo basolateral foi sendo identificado em muitas espécies, formando hoje o que se conhece como complexo amidalóide (SAH et al., 2003).

O complexo amidalóide compreende 13 núcleos, com amplas conexões internucleares e intranucleares. Estes núcleos e subnúcleos são classificados com base na organização citoarquitetônica, histoquímica e conexões realizadas (PITKÄNEN, 1995; PARE, 2004).

Conforme a nomenclatura utilizada por Pare e colaboradores (2004), os núcleos da amígdala são divididos em três grupos: 1) o grupo profundo ou basolateral que abrange o núcleo lateral, núcleo basal e núcleo lateral secundário; 2) o grupo superficial ou cortical, que contém os núcleos corticais e o núcleo do trato olfatório lateral; 3) o grupo centromedial, composto dos núcleos medial e central. Além disso, há um grupo de núcleos separados que não pode ser classificado em um desses três grupos e que envolve as massas celulares intercaladas e a área amígdala-hipocampal.

Dentro do contexto funcional postula-se que a amígdala trabalhe como interface entre os sistemas sensoriais, que conduzem a informação sobre os estímulos, condicionado e incondicionado até seus núcleos lateral e basolateral, e as regiões subcorticais, que controlam a expressão das respostas condicionadas motoras e autonômicas. O núcleo central parece ser a via da informação processada na amígdala, e suas diferentes projeções eferentes podem mediar componentes distintos da reação de medo (LEDOUX et al., 1992).

Assim, McNaughton e Corr (2004) propõem que, em ambas as situações de ansiedade e medo, a amígdala é uma estrutura alvo de estímulos ameaçadores e é o local onde o sistema septo-hipocampal age para aumentar o valor emocional de tais estímulos, elevando assim a inibição comportamental. Lesões na amígdala mudam extensivamente a forma com que os animais reagem frente ao perigo. Neste sentido lesões na amígdala (retirada) em macacos, os tornam hiporesponsivos a cobras e outros estímulos ameaçadores (LEDOUX, 1998), bem como a lesão em ratos abole quase que por completo a resposta defensiva frente a predadores, como o gato (CANTERAS, 2003). Além disto, a amígdala não apenas detecta e organiza as respostas ao perigo, mas também é o centro de aprendizagem para novas ameaças (LEDOUX 1992; LABAR, 1996). Dado seu papel importante na mediação das respostas de defesa, a amígdala representa também um alvo potencial para agentes farmacológicos (CAHILL e MCGAUGH, 1998; CANTO-DE-SOUZA et al., 2000; SANDFORD et al., 2000).

Um dos principais receptores encontrados na amígdala é o GABA (ácido gama-aminobutírico), que é o principal neurotransmissor inibitório atuando no SNC (MILLAN, 2003). Com receptores do tipo GABA_A e GABA_B, o receptor GABA_A, presente no SNC, é uma estrutura pentamérica, formando um canal central para íons cloreto, que com sua entrada, promovem a inibição sináptica rápida na atividade das correntes pós-sinápticas inibitórias através da hiperpolarização neuronal (MODY et al, 1994;. FARRANT e NUSSER, 2005). Também é o local de ação de várias drogas como os benzodiazepínicos, barbitúricos, neuroesteróides e anestésicos (COYNE et al., 2007). O receptor GABA_A é formado pela união de cinco subunidades selecionadas de famílias diferentes (α 1-6, 1-3 β , γ 1-3, π , θ , ϵ e δ), (BARNARD et al., 1998;. SIEGHART e SPERK, 2002) que são distribuídos de forma heterogênea em todo o cérebro (WISDEN et al, 1992), compondo os receptores GABA_A com subtipos distintos (MCKERNAN e WHITING, 1996).

Neste sentido, muitos estudos têm demonstrado que a administração de agonistas benzodiazepínicos na amígdala de roedores pode reduzir a ansiedade gerada por diferentes modelos animais (HODGES et al., 1987; DAVIS et al., 1992; PESOLD e TREIT, 1995; GONZALEZ et al., 1997; ZANGROSSI et al., 1999). Alguns desses estudos têm implicado os núcleos, central e basolateral da amígdala com os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos (PESOLD e TREIT, 1995; ZANGROSSI et al., 1999). Estudos utilizando o LCE como modelo de ansiedade tem demonstrado que a administração de agonistas dos receptores GABA_A-BDZs na amígdala produz efeitos ansiolíticos (FILE e GONZALEZ, 1998), e ausência de efeitos em ratos (GREEN e VALE, 1992; PESOLD et al., 1994; PESOLD e TREIT, 1995). Já em camundongos, foi observado o efeito ansiolítico do midazolam microinjetado na amígdala de animais expostos ao labirinto em cruz elevado (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000).

Nós recentemente demonstramos que infusões de midazolam e flumazenil (antagonista benzodiazepínico) na amígdala, diminuíram os níveis de ansiedade em camundongos reexpostos ao LCE (BARBALHO et al., 2009).

Entretanto, permanece desconhecido o papel dos receptores GABA-Benzodiazepínicos da amígdala na modulação da antinocicepção induzida em camundongos após a submissão ao teste de exposição ao rato.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar o papel dos receptores GABA-Benzodiazepínicos da amígdala, na modulação da antinocicepção produzida pela exposição de camundongos ao seu predador natural, o rato.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Experimento 1. Avaliar o efeito do midazolam, agonista benzodiazepínico, microinjetado na amígdala de camundongos expostos ao modelo presa-predador para registro da ansiedade e da antinocicepção induzida pelo teste de contorções abdominais.
- Experimento 2. Avaliar o efeito da injeção combinada de midazolam e flumazenil (antagonista benzodiazepínico) microinjetado na amígdala de camundongos expostos ao modelo presa-predador para registro da ansiedade e da antinocicepção induzida pelo teste de contorções abdominais.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Sujeitos

Foram utilizados camundongos da cepa Suíço-albino, machos, pesando 25-30 gramas (g), provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os animais foram agrupados em gaiolas coletivas (41 x 34 x 16 cm, 10 por gaiola), mantidos em condições controladas de temperatura (24 ± 1 °C), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo claro/escuro de 12 horas, luzes acessas às 07h00 horas), e livre acesso ao alimento e água, exceto durante as breves sessões de teste.

Os procedimentos deste estudo foram realizados de acordo com os preceitos da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC) para o trabalho com animais de laboratório e aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal de São Carlos (042/2009).

2. Drogas

Midazolam (MDZ; 3,0 e 30 nmol/0,1µl/lado; Roche, Brasil) foi dissolvido em 0,9% de solução salina estéril, a qual foi utilizada como solução controle. Para o estudo com injeção combinada foi utilizado flumazenil (FMZ) (Ro 15-1788) na dose de 2,0 nmol/0,1 µl (Sigma), dissolvido em veículo (salina e Tween 80 a 20%), a qual foi utilizada como solução controle.

Os ratos utilizados nos experimentos receberam apomorfina (Siegfried Zofinger, Swtzerland) dissolvida em salina (NaCl 0,9%) utilizada para manter os ratos Long-Evans em atividade uniforme durante as sessões de teste. A droga foi administrada (via subcutânea) na dose de 3,0 mg/Kg quinze minutos antes do início do teste.

As doses de midazolam e flumazenil foram baseadas em estudos prévios (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BAPTISTA et al., 2009; BARBALHO et al., 2009).

3. Cirurgia e administração intracerebral de drogas

Os camundongos receberam implantação craniana de cânula-guia (25-gauge) de 7 mm de comprimento, bilateralmente. Após anestesia com solução de cetamina (100mg/Kg) e xilasina (10mg/Kg) i.p. (MESSIER et al., 1999), os animais foram posicionados em um estereotáxico (Insight E FF- 333, Insight Equipamentos, Brasil) para realização do procedimento cirúrgico.

As cânulas foram fixadas no crânio do camundongo com cimento acrílico auto polimerizante clássico (JET). As coordenadas estereotáxicas (Insight EFF-333 - Equipamentos Científicos Ltda, Brasil) para implantação das cânulas-guia, definidas pelo Atlas de Franklin e Paxinos (1997), foram: antero-posterior ao bregma = -0,8 mm; lateral à linha média = $\pm 2,7$ mm e ventral a superfície do crânio = -2,0 mm. Os mandris, os quais foram removidos imediatamente antes do procedimento de microinjeção, foram inseridos dentro das cânulas-guia para evitar problemas com obstrução e para reduzir contaminação. A analgesia pós-operatória foi realizada durante 3 dias adicionando paracetamol (200mg/ml) à água dos animais em uma razão de 0,2 ml de paracetamol para 250ml de água (concentração final: 0,16mg/ml).

Durante o procedimento de injeção (teste), as agulhas de injeção (33-gauge) foram inseridas dentro das cânulas-guia para a infusão de soluções na amígdala. As agulhas de injeção foram conectadas, por meio de tubos de polietileno (PE-10), a duas microseringas Hamilton de 10 μ l. Uma bomba de infusão (BI 2000, Insight Equipamentos Científicos Ltda, Brasil) foi programada para injetar bilateralmente 0,1 μ L de solução durante um período de 60 segundos.

O procedimento de microinjeção consistiu na remoção dos mandris, inserção das agulhas de injeção, injeção da solução por 60 segundos, permanência das agulhas de injeção por 90 segundos após o término das injeções e inserção dos mandris enquanto o animal era contido de

maneira confortável pelo pesquisador, manualmente. O movimento de uma pequena bolha de ar nos tubos de polietileno antes, durante e depois da injeção confirmou o fluxo da solução (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000).

4. Equipamento

Foi utilizada uma caixa retangular de madeira (59 x 29 x 18 cm), modificada de Beijamini e Guimarães (2006). A caixa foi dividida em três compartimentos, sendo: lado A - local de alojamento do rato (20 x 29 x 18 cm); lado B – área de exploração do camundongo (29 x 29 x 18 cm), separada do compartimento A por uma grade de arame; e lado C - área protegida do camundongo (10 x 29 x 18 cm).

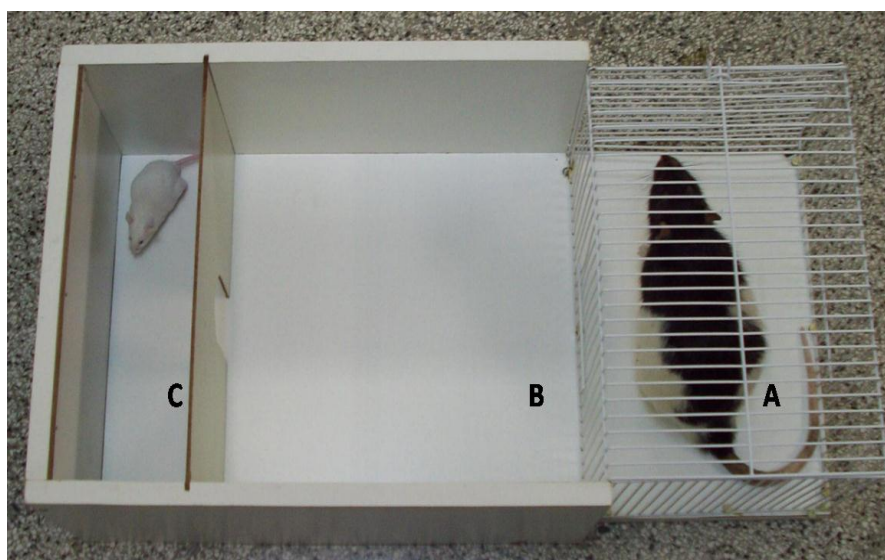


Figura 2: Teste de exposição ao rato modificado de Beijamini e Guimarães (2006).

5. Procedimento Geral

5.1 Teste de exposição ao rato

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: (i) o grupo exposto ao rato de verdade; um rato adulto macho, da linhagem Evans Long, pesando 250 a 350 g, foi colocado sobre o lado A do aparelho, depois de receber uma injeção de apomorfina (3,0 mg/kg, sc) e os camundongos foram colocados individualmente no lado B, (ii) o grupo exposto ao rato brinquedo; o procedimento foi exatamente o mesmo descrito acima, exceto que um rato de brinquedo foi colocado sobre o lado A do aparato. As sessões tiveram duração de 10 minutos.

A habituação e o teste foram conduzidos sob iluminação de 70 lux. O aparato foi limpo com álcool a 20% entre cada sujeito experimental e com álcool a 70% no final da habituação e das sessões de teste. Todas as sessões foram filmadas com uma câmera conectada a um sistema de monitor e DVD colocados em uma sala adjacente.

5.2 Teste de nocicepção

A nocicepção foi avaliada pelo teste de contorções abdominais descrito por Vanderwende e Margolin (1956), que observaram “severas contrações da musculatura abdominal acompanhada por contorções que se estendem por todo o corpo e para os membros traseiros”. Outros autores (SIEGMUND et al., 1957; BENTLEY et al., 1983) também utilizaram este modelo para o estudo de drogas. Neste estudo as contorções foram induzidas pela injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético a 0,6% (10ml/kg). Caso não houvesse contorção por um período de 5 minutos após a injeção de ácido acético (i.p) o animal era descartado do experimento.

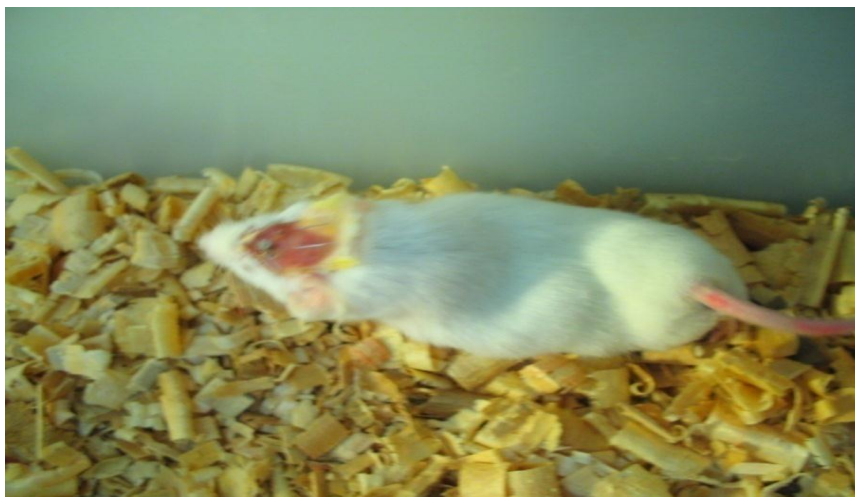


Figura 3: Contorções abdominais descritas por Vanderwende e Margolin (1956).

6. Experimento 1. Avaliação da injeção de salina ou midazolam (3,0 e 30nmol/0,1µl) intra-amídala em camundongos expostos ao rato: avaliação da antinocicepção e ansiedade.

O experimento consistiu em duas etapas, descritas a seguir:

Habituação: Os animais foram expostos ao lado B (área de exploração) do aparato e tiveram acesso ao lado C (área protegida) por 10 minutos. A exposição foi repetida por três dias consecutivos, sendo que no lado A do aparato havia um rato de brinquedo.

Teste: no quarto dia, os animais foram transportados para a sala experimental e separados em dois grupos: presença do rato de brinquedo e presença do rato de verdade. Cada animal recebeu injeção bilateral de salina ou midazolam intra-amídala nas doses de 3,0 ou 30 nmol/0,1µl. Cinco minutos após a microinjeção, os animais receberam injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% (0,1 ml/10g de peso). Após o início das contorções cada animal foi colocado individualmente no lado B do aparato na presença do rato de brinquedo ou do rato de verdade, e foi permitido a exploração livremente do aparato por 10 minutos. Os comportamentos relacionados à nocicepção e ansiedade foram registrados.

7. Experimento 2. Avaliação da injeção combinada de midazolam (30nmol/0,1µl) e flumazenil (2,0 nmol/0,1µl) intra-amídala em camundongos expostos ao rato: avaliação da antinocicepção e ansiedade.

Os grupos formados foram: salina+veículo (S+V), salina + midazolam 30 (S+MDZ 30), veículo + flumazenil 2,0 (V+FMZ 2,0), e midazolam 30 + flumazenil 2,0 (MDZ 30+FMZ 2,0). Três minutos após a primeira injeção foi realizada a segunda microinjeção na amídala e após cinco minutos, os animais receberam injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% (0,1 ml/10g de peso), e expostos ao rato, conforme descrito para o Experimento 1.

8. Análise Comportamental

Os comportamentos foram avaliados através da análise das imagens gravadas, por um observador treinado e cego ao tratamento, utilizando o programa de análise etológica X-Plo-Rat, (BECERRA-GARCIA et al., 2005). A análise das contorções abdominais foi realizada pela contagem do número de contorções abdominais em ambos os lados do aparato (SIEGMUND et al., 1957; BENTLEY et al., 1983).

A análise comportamental consistiu na avaliação e contagem de medidas espaço-temporais (YANG et al., 2004; BENJAMINI & GUIMARÃES, 2006) divididas em:

Medidas Convencionais: Frequência de entradas e tempo de permanência na área desprotegida (lado B), e frequência de entradas e tempo de permanência na área protegida (do lado C), bem como a latência inicial de fuga da área de exploração para à área protegida.

Medidas Etológicas: Frequência de levantamentos (*Rearing*; elevação do corpo sobre as patas traseiras), posturas de esticar o corpo para a área desprotegida e protegida (*stretched attend postures*, *SAP*); movimentos que consistem em esticar o corpo e retrá-lo à posição original sem

ocorrência de locomoção); e o tempo de contato com a grade de arame (*wire mesh contact*; quando o animal entra em contato com a grade de arame com ou sem saltos ou escaladas).

9. Histologia

Após o término dos experimentos os animais receberam uma dose de anestésico três vezes maior que a utilizada para a anestesia solução de [cetamina (100mg/kg) e xilasina (10mg/kg) i.p.), imediatamente após os animais receberam injeção de 0,1 µL de uma solução de 1% de azul de metileno, conforme o procedimento descrito acima para a injeção de drogas. Em seguida os animais foram decapitados, seus encéfalos foram removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina a 10% para, posteriormente, sofrerem secções coronais de 80 micrômetros (µm) ao longo do trajeto das cânulas, utilizando um criostato (ANCAP-300). As secções foram inspecionadas através de um microscópio (Olympus B202) e a visualização da dispersão do azul de metileno indicou os locais das injeções. Os animais cujas injeções não atingiram a amígdala foram excluídos da análise estatística.

10. Análise Estatística

Os resultados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de dois fatores (fator 1: condição) e (fator 2: tratamento). Quando apropriado, os resultados foram submetidos ao teste de comparações múltiplas de Duncan. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

A análise histológica confirmou que para o Experimento 1, 48 camundongos receberam canulação bilateral na amígdala (Figura 2, A e B), sendo que, 21 (n= 7/grupo) camundongos foram utilizados para investigar os efeitos do midazolam (0, 3,0 e 30 nmol/0,1µL) intra-amígdala 0,1µL em camundongos expostos ao rato de brinquedo. Vinte e sete (n= 7-11/grupo) camundongos foram utilizados para investigar os efeitos do midazolam (0, 3,0 ou 30 nmol/0,1µL) intra-amígdala 0,1µL em camundongos expostos ao rato.

A análise histológica confirmou que para o Experimento 2, 47 camundongos apresentaram canulação positiva na amígdala, sendo que 23 camundongos foram utilizados para investigar os efeitos da injeção combinada de midazolam e flumazenil em camundongos expostos ao rato de brinquedo e 24 camundongos foram utilizados para investigar efeitos da injeção combinada de midazolam (0, 30 nmol/0,1µL) e flumazenil (0, 2,0 nmol/0,1µL) em camundongos expostos ao rato. Os seguintes grupos foram formados: Veículo + Salina (V+S) (n=6); Salina + Midazolam 30 nmol (S+MDZ 30) (n=6); Veículo + Flumazenil 2,0 nmol (V+FMZ 2,0) (n=6); e Flumazenil 2,0 nmol + Midazolam 30 nmol (FMZ+MDZ) (n=6).

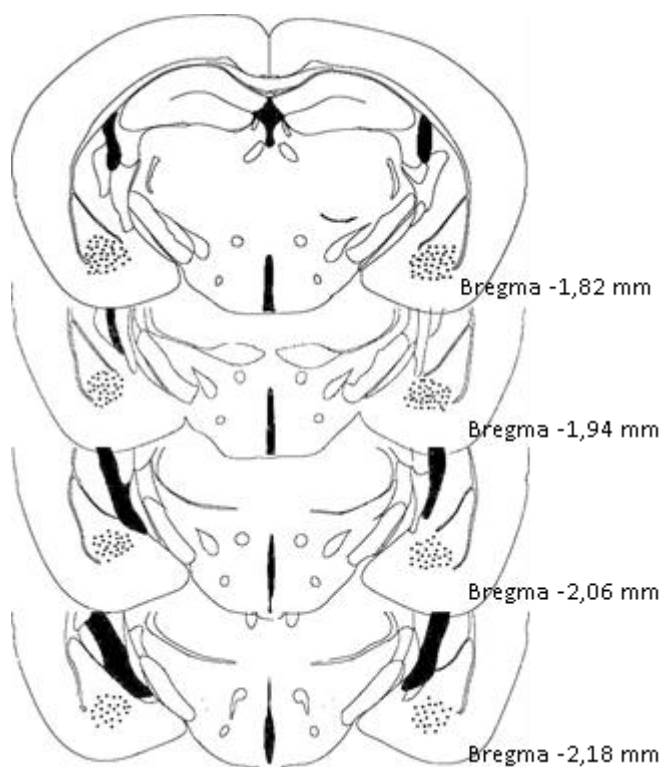


Figura 4. (A) Representação esquemática dos resultados histológicos de acordo com o Atlas de Franklin e Paxinos (2001). O número de pontos é inferior ao número total de animais devido à sobreposição

1. Experimento 1. Efeitos do midazolam em camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato.

1.1 Teste de Contorções

A análise de variância de dois fatores (ANOVA) revelou efeitos significativos para os fatores exposição (rato de brinquedo ou rato) ($F(1,35) = 5,00$; $P < 0,05$), tratamento ($F(2,35) = 9,21$; $P < 0,001$) e interação entre os fatores exposição x tratamento ($F(2,35) = 4,48$; $P < 0,05$). O teste post hoc indicou que a exposição ao rato promoveu diminuição do número total de contorções nos animais tratados com salina, enquanto aumentou nos animais tratados com midazolam (30 nmol) intra-amídala, quando comparados ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. As comparações post-hoc mostraram que ambas as doses de midazolam (3,0 e 30 nmol) aumentaram o número total de contorções para os camundongos expostos ao rato, As duas

doses de midazolam não produziram alteração na nocicepção avaliada nos camundongos expostos ao rato de brinquedo (Figura 5A). Para Figura 5B, a ANOVA não mostrou efeito significativo para o fator exposição (rato de brinquedo ou rato) ($F(1,35) = 1,55$; $P > 0,05$), porém apresentou efeito significativo para os fatores tratamento ($F(2,35) = 25,94$; $P < 0,05$) e interação entre tratamento x exposição ($F(2,35) = 10,82$; $P < 0,001$).

Apesar de a ANOVA ter mostrado ausência de efeito para o fator exposição, como ocorreu interação entre os fatores realizamos o post hoc para a exposição. O teste de Duncan indicou que a exposição ao rato promoveu diminuição do número de contorções desprotegidas nos animais tratados com salina, enquanto aumentou nos animais tratados com midazolam (30 nmol) intramíndala, quando comparados ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. O post hoc demonstrou que ambas as doses de midazolam (3,0 and 30 nmol) aumentaram as contorções desprotegidas em camundongos expostos ao rato quando comparado ao seu respectivo grupo salina.

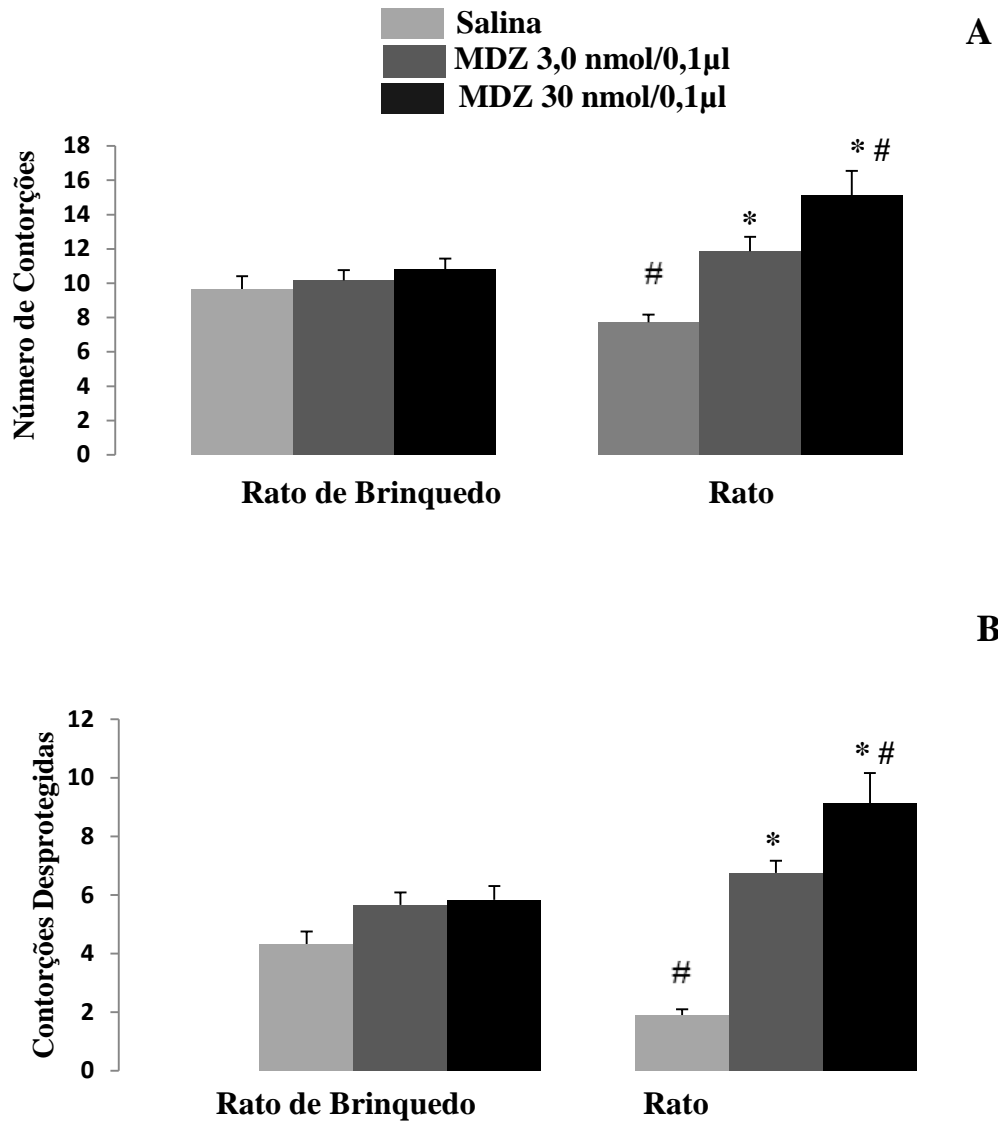


Fig. 5A. Número de contorções. Efeitos das injeções de midazolam (0, 3,0 e 30 nmol/0,1µL) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato. n= 7-11. As barras representam a média + E.P.M. * $P < 0,05$ comparado ao grupo salina exposto ao rato. # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo rato brincado.

Fig. 5B. Contorções desprotegidas. Efeitos das injeções de midazolam (0, 3,0 e 30 nmol/0,1µL) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato. n= 7-11. As barras representam a média + E.P.M. * $P < 0,05$ comparado ao grupo salina exposto ao rato. # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo rato brincado.

1.2 Medidas convencionais

1.2.1 Respostas de fuga

Para a latência de fuga como mostra a Figura 6 a ANOVA não revelou efeitos significativos para o fator exposição (rato de brinquedo ou rato) ($F(1,35) = 0,30$; $P > 0,05$), mas apresentou efeito significativo para o fator tratamento ($F(2, 35) = 209,31$; $P < 0,0001$) e para o fator interação entre exposição x tratamento ($F(2,35) = 35,64$; $P < 0,0001$) para a latência inicial de fuga para a área protegida (lado C).

Embora a ANOVA não tenha mostrado valores significativos para o tipo de exposição, o teste de Duncan indicou que a latência de fuga inicial foi significativamente menor nos camundongos expostos ao rato para animais tratados com salina e midazolam (3,0 nmol) enquanto que a dose de 30 nmol aumentou a latência de fuga. O teste de Duncan revelou ainda que, ambas as doses de midazolam (3,0 e 30 nmol) aumentaram a latência de fuga independente do estímulo em camundongos expostos ao rato de brinquedo ou ao rato.

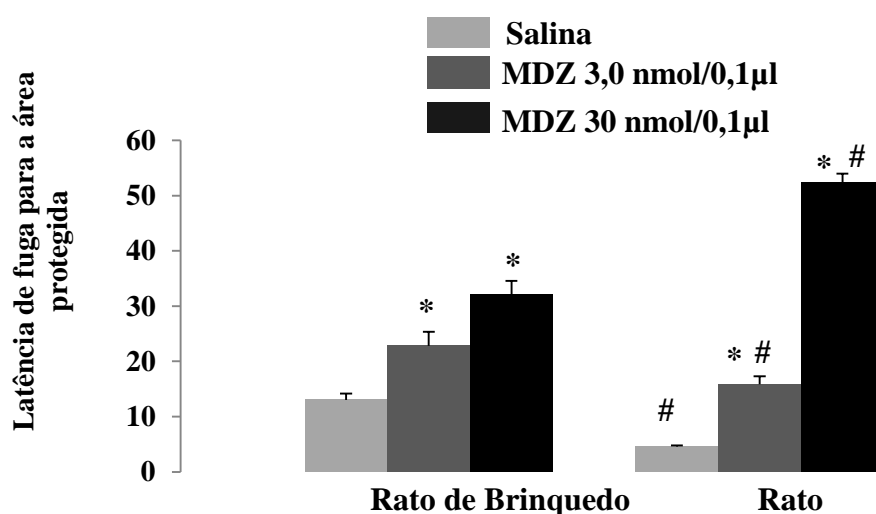


Fig. 6. Latência de fuga para a área protegida. Efeitos das injeções de midazolam (0, 3,0 e 30 nmol/0,1µL) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato. $n = 7-11$. As barras representam a média + EPM. * $P < 0,05$ comparado ao grupo salina exposto ao rato. # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo do rato de brinquedo.

A Figura 7A mostra os efeitos da injeção de midazolam na amígdala de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato sobre a frequência na área protegida. A ANOVA não revelou efeito significativo para o fator exposição (rato de brinquedo ou rato) ($F(1,35) = 0,08$; $P > 0,05$) e para o fator interação entre exposição x tratamento ($F(2,35) = 0,59$; $P > 0,05$), mas apresentou efeito significativo para o fator tratamento ($F(2,35) = 19,73$; $P < 0,05$) e para a frequência de entradas na área protegida. O teste de Duncan mostrou que em ambas as doses de midazolam diminuíram a frequência de entradas na área protegida para os camundongos expostos ao rato, entretanto apenas a dose de 30 nmol de midazolam reduziu este comportamento em camundongos expostos ao rato de brinquedo.

Para a Figura 7B, a ANOVA revelou efeitos significativos para os fatores exposição (rato de brinquedo ou rato) ($F(1,35) = 5,46$; $P < 0,05$), tratamento ($F(2,35) = 78,80$; $P < 0,0001$) e interação entre exposição x tratamento ($F(2,35) = 9,36$; $P < 0,0001$) para o tempo gasto na área protegida. O teste de Duncan mostrou que os camundongos expostos ao rato aumentaram o tempo gasto na área protegida do aparato quando comparados ao grupo salina dos camundongos expostos ao rato de brinquedo. No entanto, ambas as doses de midazolam diminuíram o tempo gasto no compartimento protegido para camundongos expostos ao rato de brinquedo e ao rato, quando comparado com o seu respectivo grupo salina.

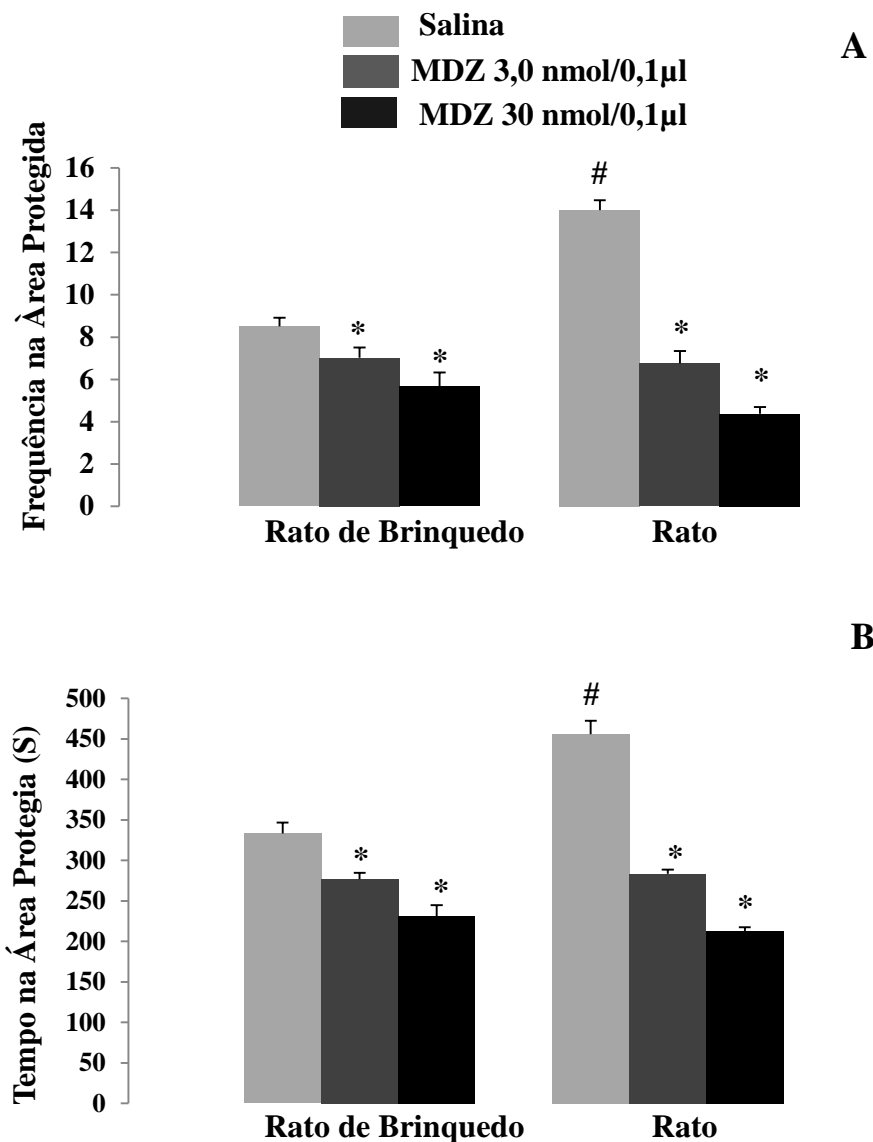


Fig. 7A. Frequência de entradas na área protegida. Efeitos das injeções de midazolam (0, 3,0 e 30 nmol/0,1µL) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato. n= 7-11. As barras representam a média ± E.P.M. *P <0,05 comparado ao grupo salina. #P <0,05 comparado ao respectivo grupo rato de brinquedo.

Fig. 7B. Tempo Protegido. Efeitos das injeções de midazolam (0, 3,0 e 30 nmol) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato. n= 7-11. As barras representam a média ± E.P.M. *P <0,05 comparado ao grupo salina. #P <0,05 comparado ao respectivo grupo rato de brinquedo.

1.3 Medidas Etológicas

Em relação às medidas etológicas a ANOVA indicou efeito significativo para os fatores exposição (rato de brinquedo ou rato) ($F(1,35) = 47,72$; $P < 0,05$) e tratamento ($F(2,35) = 30,67$; $P < 0,0001$), mas nenhum efeito para a interação entre exposição x tratamento) ($F(2,35) = 29,51$;

$P > 0,05$), para o total de esticar. O teste de Duncan mostrou diminuição do total esticar para os animais tratados com salina e expostos ao rato, quando comparados com o grupo salina exposto ao rato de brinquedo. No entanto, ambas as doses de midazolam aumentaram o total de esticar para os camundongos expostos ao rato, quando comparados ao respectivo grupo salina exposto ao rato de brinquedo (ver Figura 8A).

Para Figura 8B, a ANOVA indicou efeito significativo para o fator tratamento ($F(2,35) = 33,84$; $P < 0,0001$), mas nenhum efeito para os fatores exposição (rato de brinquedo ou rato) ($F(1,35) = 1,31$; $P > 0,05$) e interação entre exposição x tratamento ($F(2,35) = 1,32$; $P > 0,05$), para a porcentagem de esticar protegido. O teste Duncan mostrou que ambas as doses de midazolam diminuíram a % esticar protegido para os camundongos expostos tanto ao rato de brinquedo como ao rato, quando comparados aos seus respectivos grupos salina.

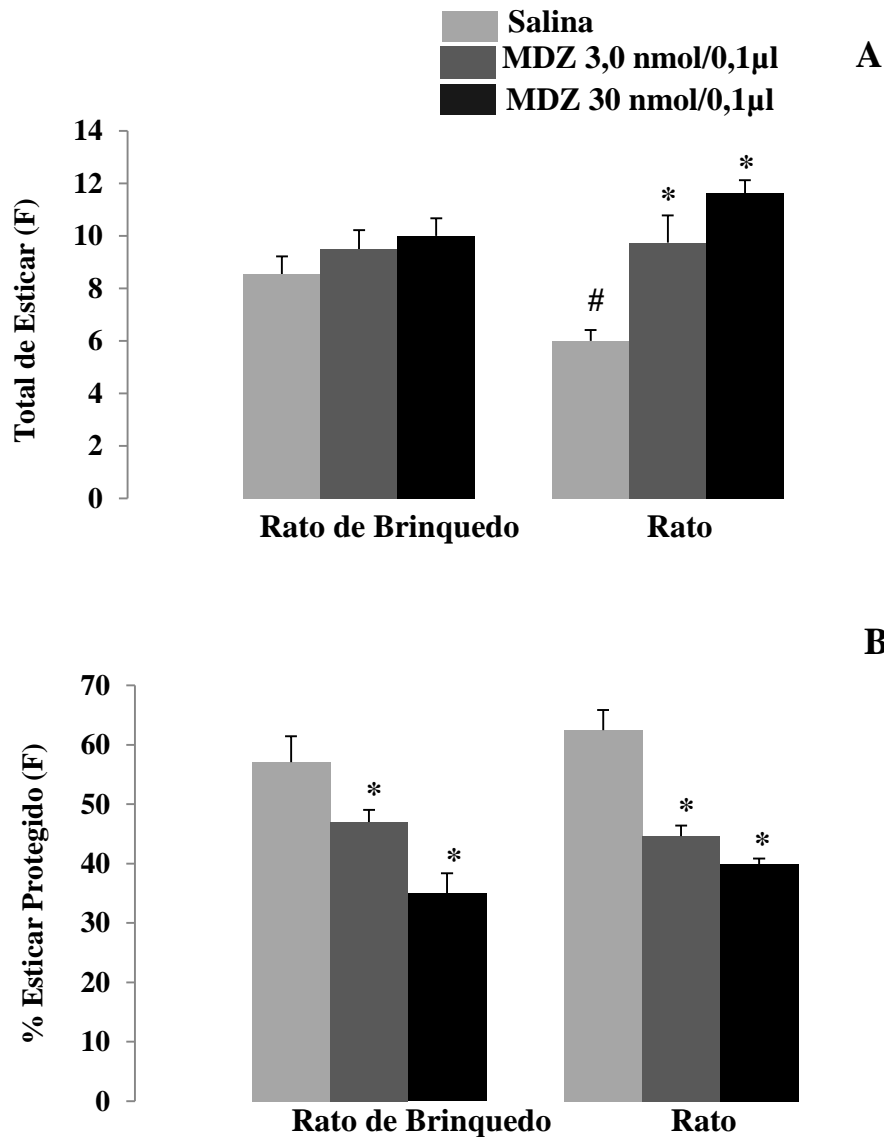


Fig 8A. Total de Esticar. Efeitos das injeções de midazolam (0, 3,0 e 30 nmol/0,1µL) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato. n= 7-11. As barras representam a média ± E.P.M. *P <0,05 comparado ao grupo salina. #P <0,05 comparado ao respectivo grupo rato de brinquedo.

Fig. 8B. %Esticar Protegido (F). Efeitos das injeções de midazolam (0, 3,0 e 30 nmol/0,1µL) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato. n= 7-11. As barras representam a média ± E.P.M. *P <0,05 comparado grupo salina. #P <0,05 versus respectivo grupo rato de brinquedo.

Para o tempo total de esticar como mostra a Figura 9A, a ANOVA revelou efeitos significativos para os fatores exposição ($F(1,35) = 22,44$; $P < 0,0001$) e interação entre exposição x tratamento ($F(2,35) = 7,35$; $P < 0,01$), sem efeito significativo para o fator tratamento ($F(2,35) = 1,29$; $P > 0,05$).

O post hoc mostrou que o tempo de esticar foi significativamente menor no grupo salina exposto ao rato quando comparado ao respectivo grupo rato de brinquedo. Embora a ANOVA

não tenha mostrado valores significativos para o tratamento, como ocorreu efeito significativo da interação, realizamos o teste de Duncan. Este indicou que ambas as doses de midazolam (3,0 e 30 nmol) aumentaram o tempo de esticar em camundongos expostos a rato de brinquedo e ao rato.

Para a Figura 9B, a estatística indicou efeito significativo para o fator tratamento ($F(2,35) = 20,29$; $P < 0,0001$), sem alterar os fatores exposição (brinquedo rato ou rato) ($F(1,35) = 1,71$; $P > 0,05$) e interação entre exposição x tratamento ($F(2,35) = 2,48$; $P > 0,05$), para a porcentagem do tempo de esticar protegido. O teste de Duncan mostrou que ambas as doses de midazolam diminuíram a % do tempo de esticar protegido para camundongos expostos ao rato.

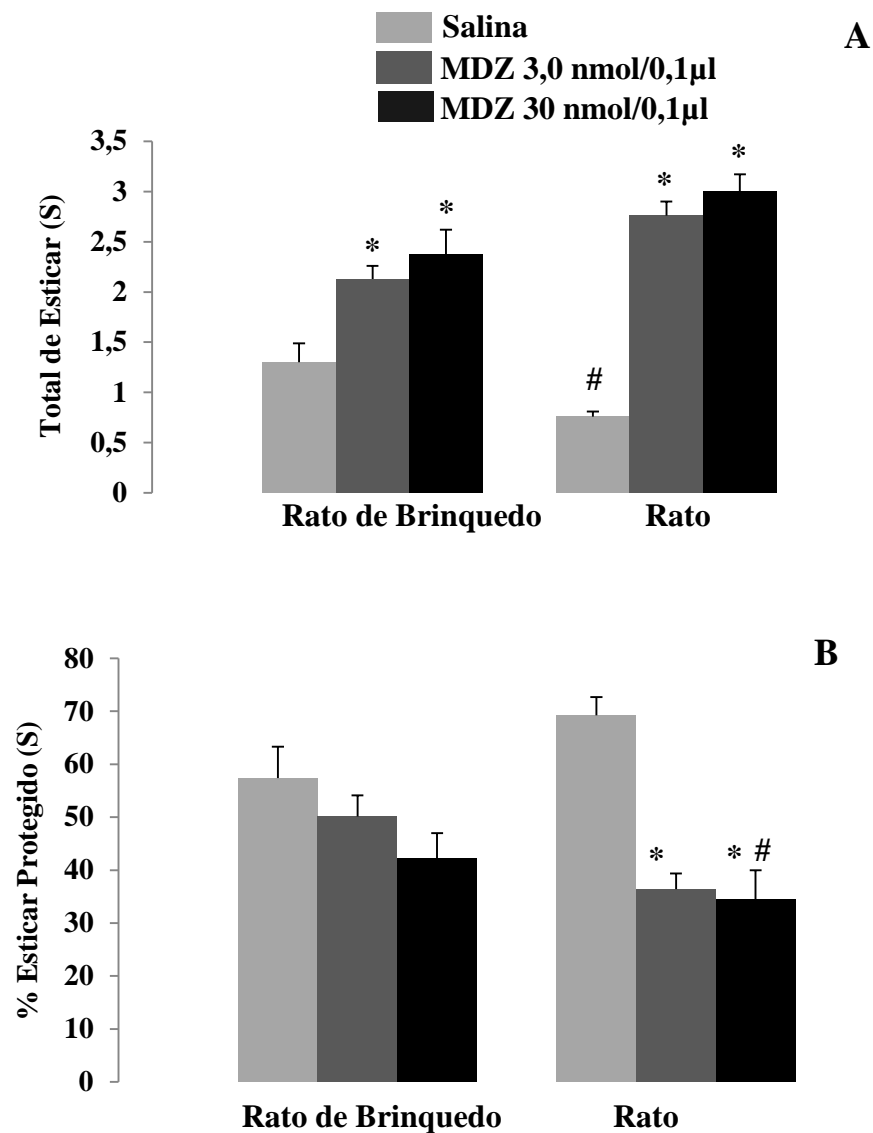


Fig 9A. Total de Esticar (S). Efeitos das injeções de midazolam (0, 3,0 e 30 nmol/0,1µL) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato n= 7-11. As barras representam a média ± E.P.M. *P <0,05 comparado ao grupo salina. #P <0,05 comparado ao respectivo grupo rato de brinquedo.

Fig. 9B. %Esticar Protegido (S). Efeitos das injeções de midazolam (0, 3,0 e 30 nmol/0,1µL) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato n= 7-11. As barras representam a média ± E.P.M. *P <0,05 comparado ao grupo salina. #P <0,05 versus respectivo grupo rato de brinquedo.

Como mostra a Figura 10, a ANOVA indicou efeito significativo para os fatores exposição (rato brinquedo ou rato) ($F(1,35) = 10,24$; $P < 0,01$) e tratamento ($F(2,35) = 8,44$; $P < 0,01$), mas não mostrou efeito significativo para o fator interação entre exposição x tratamento ($F(2,35) = 0,55$; $P > 0,05$), para o levantar desprotegido.

O teste de Duncan mostrou que os camundongos expostos ao rato diminuíram o levantar desprotegido quando comparado ao grupo tratado com salina e expostos ao rato de brinquedo. No entanto, ambas as doses de midazolam aumentaram o levantar desprotegido para camundongos expostos ao rato em comparação com o respectivo grupo salina.

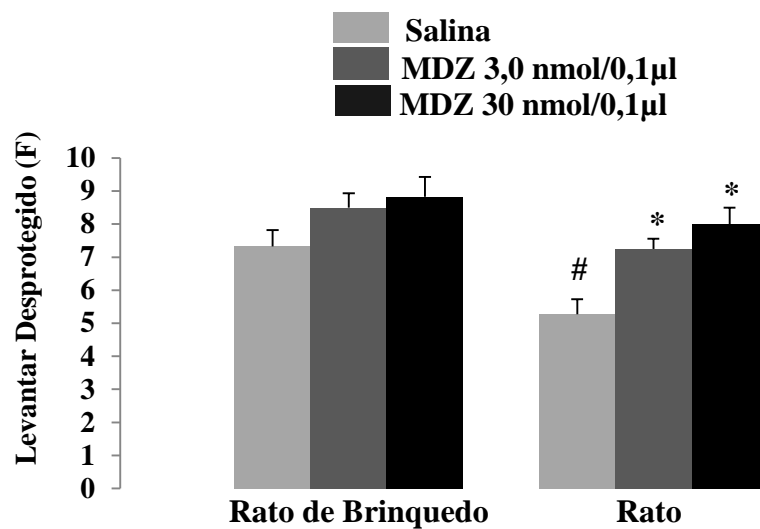


Fig 10. Levantar Desprotegido (F). Efeitos das injeções de midazolam (0, 3,0 e 30 nmol/0,1µL) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato. n= 7-11. As barras representam a média \pm E.P.M. *P <0,05 comparado ao grupo salina. #P <0,05 comparado ao respectivo grupo rato de brinquedo.

1.4 Medida de Esquiva

Foi observado efeito significativo para os fatores tratamento ($F(2,35) = 306,74$; $P < 0,001$) e interação entre exposição x tratamento ($F(2,35) = 4,29$; $P < 0,05$), mas não mostrou efeito significativo para o fator exposição (rato de brinquedo ou rato) ($F(1,35) = 0,49$; $P > 0,05$), em relação ao contato com a grade de arame (ver Figura 11).

Embora a ANOVA não tenha mostrado valores significativos para a exposição, ocorreu efeito significativo dos fatores tratamento e interação. Assim realizamos o teste de Duncan. Este indicou que os camundongos expostos ao rato diminuíram o contato com a grade em comparação

aos animais expostos ao rato de brinquedo, para animais tratados com salina. No entanto, ambas as doses de midazolam aumentaram o contato com a grade para camundongos expostos ao rato de brinquedo ou ao rato, em comparação os respectivos grupo salina.

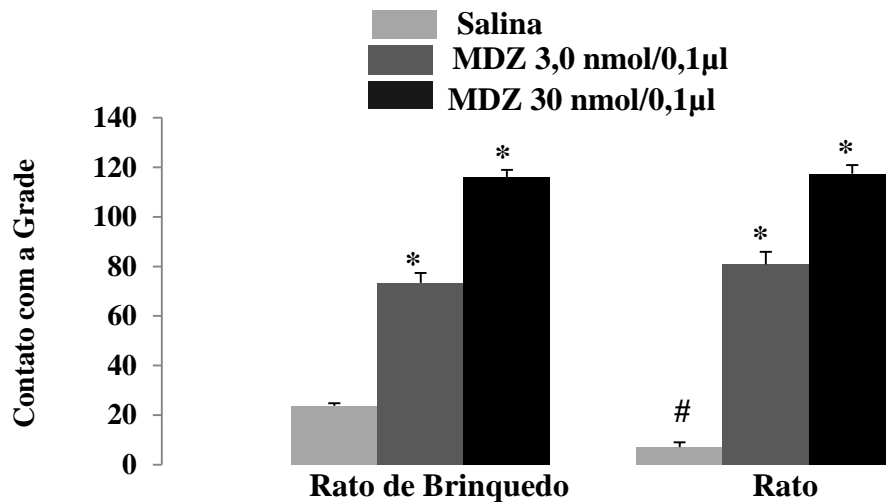


Fig 11. Contato com a grade de arame. Efeitos das injeções de midazolam (0, 3,0 e 30 nmol/0,1µL) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato. n= 7-11. As barras representam a média ± E.P.M. *P <0,05 comparado ao grupo salina. #P <0,05 comparado ao respectivo grupo rato de brinquedo.

2. Experimento 2. Efeitos da microinjeção combinada de midazolam e flumazenil microinjetado na amígdala de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato.

2.1 Teste de Contorções

Em relação ao teste de contorções no Experimento 2, a ANOVA revelou efeitos significativos para os fatores exposição (rato de brinquedo ou rato) ($F(1,38) = 0,66$; $P < 0,0001$), tratamento ($F(3,38) = 26,58$; $P < 0,0001$) e interação entre os fatores exposição x tratamento ($F(3,38) = 19,31$; $P < 0,05$).

O teste post hoc indicou que a exposição ao rato promoveu diminuição do número total de contorções nos animais tratados com veículo e salina (V+S), flumazenil e veículo (FMZ 2,0 nmol+veículo) e flumazenil e midazolam (FMZ 2,0 nmol+MDZ 30nmol), enquanto aumentou nos animais tratados com salina e midazolam (salina+MDZ 30 nmol) intra-amígdala, quando

comparados ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. A análise mostrou que a injeção combinada de midazolam e salina (MDZ 30nmol+salina) aumentou o número total de contorções em camundongos expostos ao rato, quando comparado com o seu respectivo grupo controle (V+S).

O teste de Duncan indicou que o tratamento com flumazenil e veículo (FMZ 2,0 nmol+veículo) não alterou o número de contorções por si só, entretanto reverteu o aumento de contorções induzidas pelo midazolam com o tratamento combinado, flumazenil e midazolam (FMZ 2,0 nmol+MDZ 30 nmol), olhar Figura 12A.

Para Figura 12 B, a ANOVA mostrou efeitos significativos para os fatores exposição (rato de brinquedo ou rato) ($F(1,38) = 25,21$; $P < 0,05$), tratamento ($F(3,38) = 52,13$; $P < 0,001$) e interação entre fatores tratamento x exposição ($F(3,38) = 33,04$; $P < 0,001$).

O teste post hoc indicou que a exposição ao rato promoveu diminuição do número de contorções desprotegidas nos animais tratados com veículo e salina (V+S), flumazenil e veículo (FMZ 2,0 nmol+veículo) e flumazenil e midazolam (FMZ 2,0 nmol+MDZ 30 nmol), enquanto aumentou nos animais tratados com salina e midazolam (salina+ MDZ 30 nmol) intra-amídala, quando comparados ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. A análise mostrou que a injeção combinada de salina e midazolam (salina + MDZ 30 nmol) aumentou, enquanto o flumazenil (FMZ 2,0 nmol+Veículo) não alterou o número de contorções desprotegidas, apenas para os animais expostos ao rato quando comparados a seu grupo controle (V+S). No entanto, a injeção combinada de flumazenil e midazolam (FMZ 2,0 nmol+ MDZ 30 nmol) reverteu o aumento das contorções desprotegidas induzida pelo midazolam.

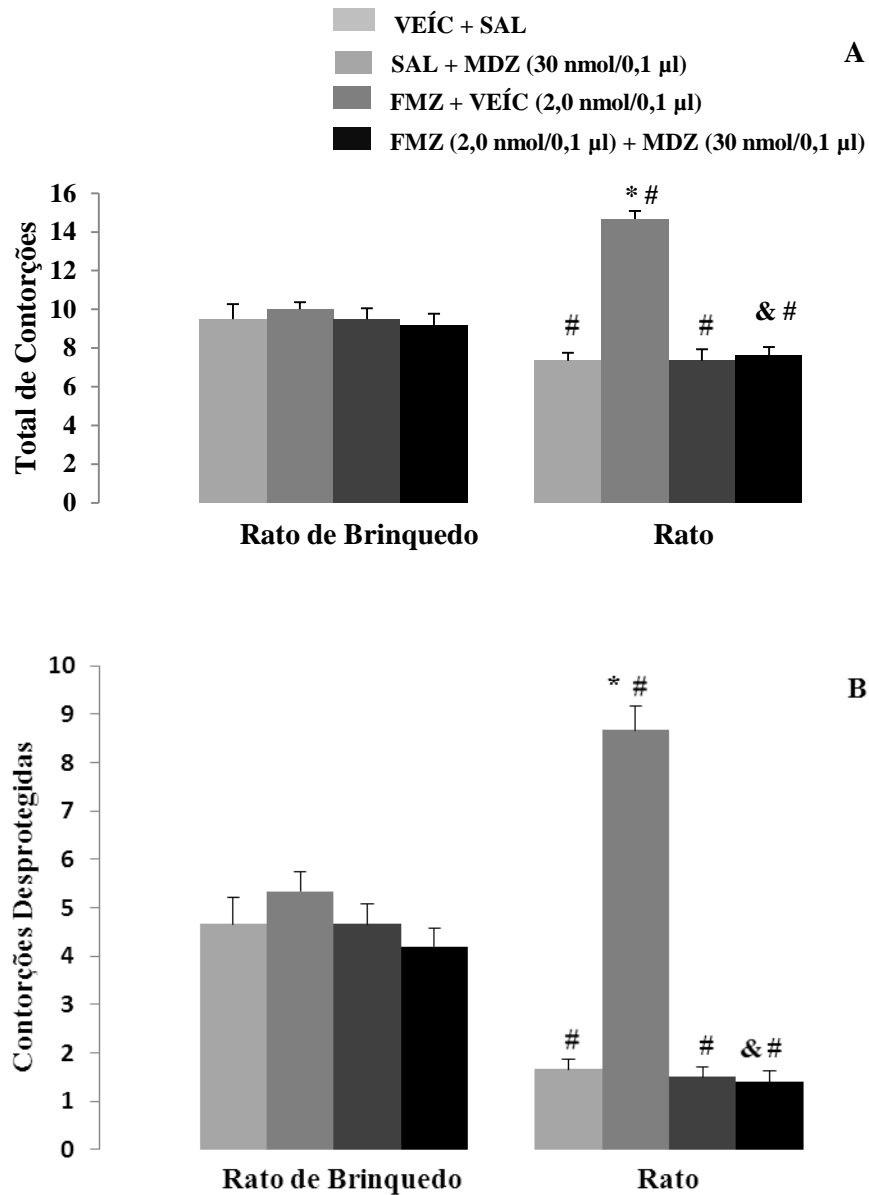


Fig. 12A. Número de contorções. Efeitos da injeção combinada de veículo e salina (VEÍC+SAL), salina e midazolam (SAL+MDZ30nmol), flumazenil e veículo (FMZ 2,0 nmol+VEÍC), flumazenil + midazolam (FMZ 2,0 nmol+MDZ30 nmol) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato. n= 6. As barras representam a média \pm E.P.M. *P <0,05 comparado ao respectivo grupo veículo e salina (VEÍC+SAL). #P <0,05 comparado ao respectivo grupo rato de brinquedo. &P <0,05 comparado ao respectivo grupo salina+ midazolam.

Fig. 12B. Contorções desprotegidas. *P <0,05 comparado ao grupo salina+ veículo. #P <0,05 comparado ao respectivo grupo rato brinquedo. &P <0,05 comparado ao respectivo grupo salina+ midazolam.

2.2 Medidas Convencionais

2.2.1 Respostas de fuga

Para a latência inicial de fuga como mostra a Figura 13 a ANOVA revelou efeitos estatisticamente significativos para o fator exposição (rato de brinquedo ou um rato) ($F(1,38) = 7,03$; $P < 0,0001$), fator tratamento ($F(3,38) = 67,81$; $P < 0,05$) e para o fator interação (exposição x tratamento) ($F(3,38) = 63,62$; $P < 0,0001$) para a latência inicial de fuga para a área protegida (lado C).

O teste de Duncan indicou que a latência de fuga inicial foi significativamente menor nos camundongos expostos ao rato e tratados com veículo + salina e midazolam e flumazenil + veículo enquanto que a microinjeção de midazolam + salina aumentou a latência de fuga e que este efeito revertido pela microinjeção de flumazenil + midazolam. O teste de Duncan revelou ainda que, o midazolam aumentou a latência de fuga independente do estímulo, ou seja, em camundongos expostos ao rato de brinquedo ou ao rato.

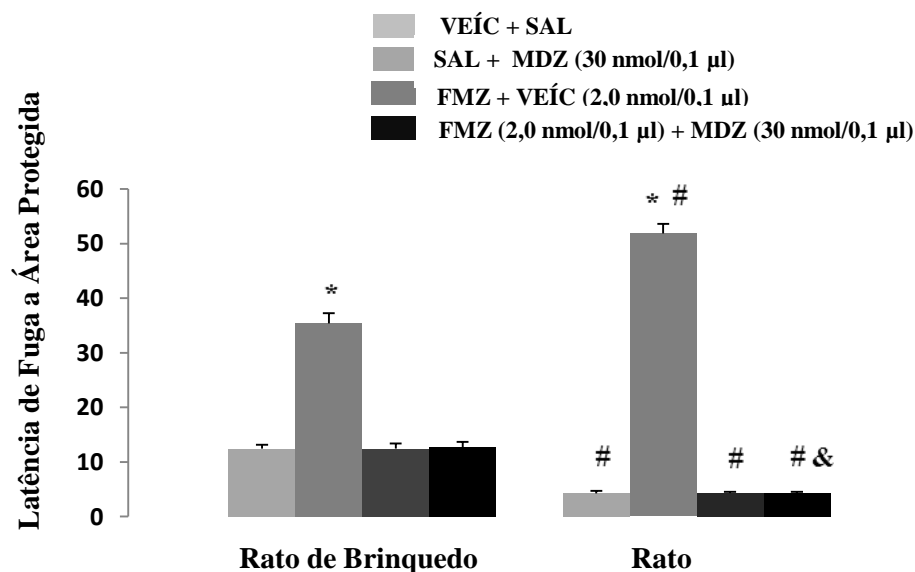


Fig. 13. Latência de Fuga. Efeitos da injeção combinada de VEÍC + SAL, SAL + MDZ (30 nmol/0,1 µL), FMZ (2,0 nmol/0,1 µL) + VEÍC, FMZ (2,0 nmol/0,1 µL) + MDZ (30 nmol/0,1 µL) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato. $n = 6$. As barras representam a média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ comparado ao grupo salina+ veículo. # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo rato brinquedo. & $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo salina+ midazolam.

A figura 14A mostra os efeitos da injeção combinada de flumazenil + midazolam na amígdala de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato sobre a frequência na área protegida. A ANOVA não revelou nenhum efeito estatisticamente significativo para o fator exposição (rato de brinquedo ou rato) ($F(1,38) = 1,63, P > 0,05$) e para o fator interação (exposição x tratamento) ($F(3,38) = 0,91, P > 0,05$), mas apresentou efeito significativo para o fator tratamento ($F(3,38) = 21,49, P < 0,001$) para a frequência de entradas na área protegida. O teste de Duncan mostrou que a injeção combinada de midazolam + salina diminuiu a frequência de entradas na área protegida para os camundongos expostos ao rato de brinquedo e ao rato, entretanto, a injeção combinada de flumazenil + midazolam reverteu esse efeito. Embora ANOVA não tenha mostrado valores significativos para o tipo de exposição (rato de brinquedo ou rato), o teste de Duncan indicou que os animais que receberam a injeção combinada de salina+ veículo e foram expostos ao rato tiveram uma frequência na área protegida maior quando comparado ao respectivo grupo no rato de brinquedo.

Em relação ao tempo gasto na área protegida a ANOVA revelou efeitos estatisticamente significativos para o fator exposição (rato de brinquedo ou rato) ($F(1,38) = 26,97, P < 0,0001$), e para o fator de tratamento ($F(3,38) = 42,69, P < 0,0001$) e para o fator interação (exposição x tratamento) ($F(3,38) = 4,44, P < 0,0001$) para o tempo gasto na área protegida. O teste de Duncan indicou que os camundongos expostos ao rato que receberam a injeção combinada de salina+veículo aumentaram o tempo gasto na área protegida do aparato quando comparado ao respectivo grupo no rato de brinquedo. Além disso, a análise estatística mostrou que a injeção combinada de midazolam + salina diminuiu o tempo gasto no compartimento protegido para camundongos expostos ao rato de brinquedo e ao rato, quando comparado com o seu respectivo grupo controle, entretanto, este efeito foi revertido pela injeção combinada de flumazenil + midazolam como mostra a figura. 14B.

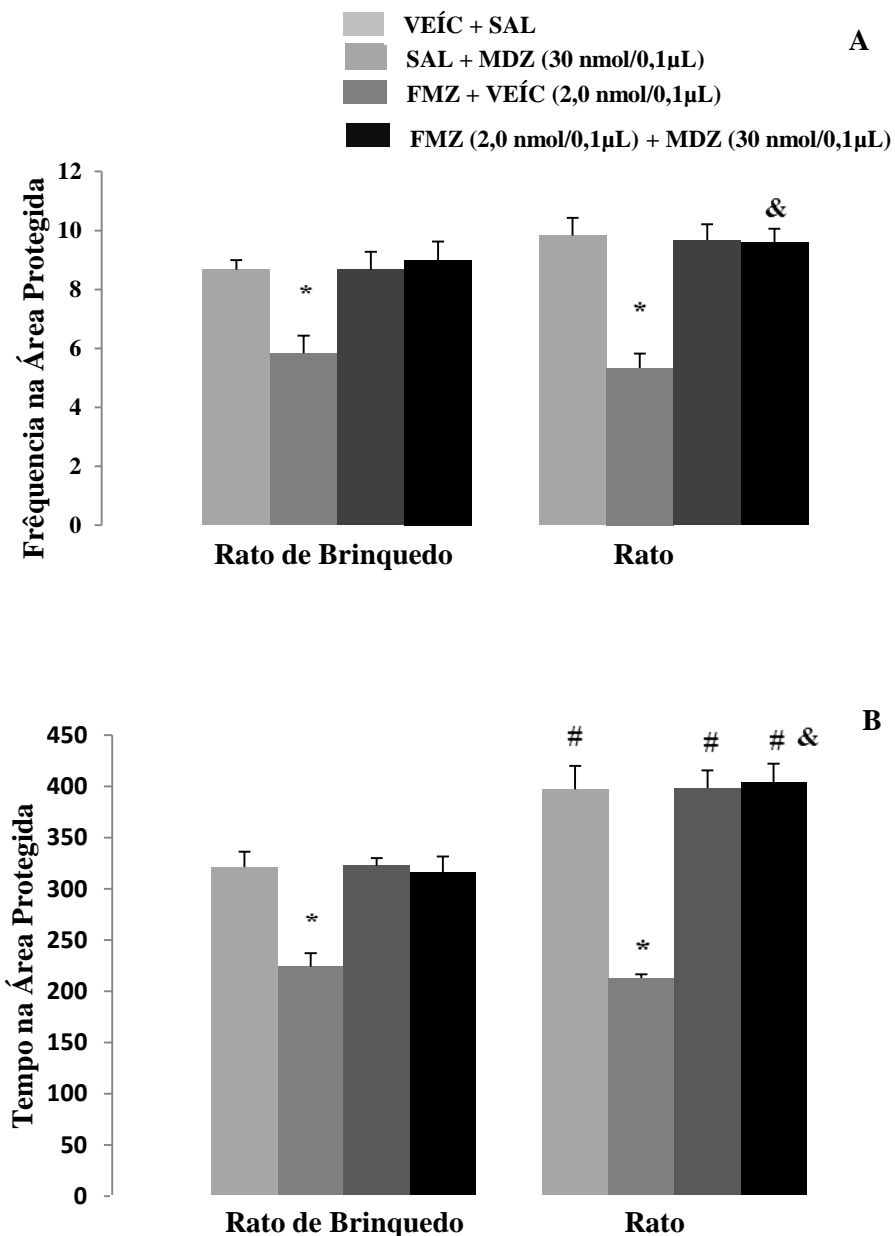


Fig. 14A. Frequência Protegida. Efeitos da injeção combinada de VEÍC + SAL, SAL + MDZ (30 nmol/0,1µL), FMZ (2,0 nmol/0,1µL) + VEÍC, FMZ (2,0 nmol/0,1µL) + MDZ (30 nmol/0,1µL) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato. n= 6. As barras representam a média ± E.P.M. *P <0,05 comparado ao grupo salina+ veículo. #P <0,05 comparado ao respectivo grupo rato brincado. &P <0,05 comparado ao respectivo grupo salina+ midazolam.

Fig. 14B. Tempo Protegido. *P <0,05 comparado ao grupo salina+ veículo. #P <0,05 versus respectivo grupo rato brincado. &P <0,05 comparado ao respectivo grupo salina + midazolam.

2.3 Medidas Etológicas

Em relação às medidas etológicas a ANOVA indicou um efeito significativo para o fator exposição (rato de brincado ou rato) ($F(1,38) = 32,92$, $P < 0,0001$), fator tratamento ($F(3,38) =$

6,58, $P < 0,0001$), mas nenhum efeito para a interação (exposição x tratamento) ($F(3,38) = 0,39$, $P > 0,05$), para o total de esticar. O teste de Duncan mostrou que o grupo veículo + salina exposto ao rato diminuiu o total esticar quando comparado com o grupo veículo + salina exposto ao rato de brinquedo. No entanto, os animais que receberam midazolam + salina aumentaram o total de esticar para os camundongos expostos ao rato em relação ao seu respectivo grupo salina + veículo, porém, esse efeito foi revertido pela injeção combinada de flumazenil + midazolam como mostra a figura 15A.

Para Figura 15B, ANOVA indicou um efeito significativo para o fator exposição (rato de brinquedo ou rato) ($F(1,38) = 6,35$, $P < 0,0001$), para o fator tratamento ($F(3,38) = 12,26$, $P < 0,0001$), mas não mostrou efeito para o fator interação (tipo de exposição x tratamento) ($F(3,38) = 0,72$, $P > 0,05$) para as % esticar protegidos. A análise estatística revelou que os animais que receberam a injeção combinada de veículo + salina e foram expostos ao rato tiveram um aumento na % esticar protegido quando comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo

O teste Duncan mostrou também que a injeção combinada de midazolam + salina diminuiu a % esticar protegido para camundongos expostos ao rato de brinquedo e ao rato em comparação com os seus respectivos grupos veículo + salina, entretanto esse efeito foi revertido pela injeção combinada de flumazenil + midazolam.

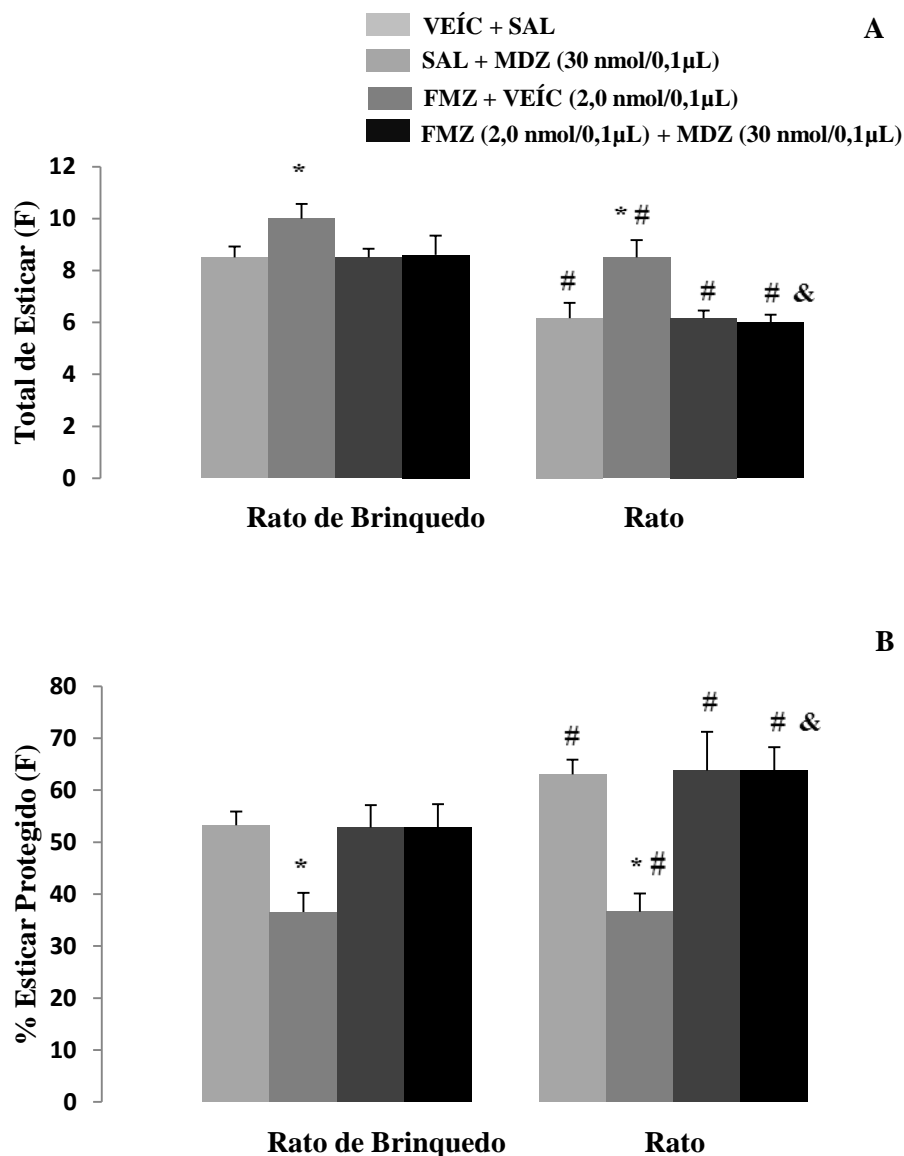


Fig. 15A. Total de Esticar. Efeitos da injeção combinada de VEÍC + SAL, SAL + MDZ (30 nmol/0,1µL), FMZ (2,0 nmol/0,1 µL) + VEÍC, FMZ (2,0 nmol/0,1 µL) + MDZ (30 nmol/0,1µL) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato. n= 6. As barras representam a média ± E.P.M. *P <0,05 comparado ao grupo salina+ veículo. #P <0,05 comparado ao respectivo grupo rato brincado. &P <0,05 comparado ao respectivo grupo salina+ midazolam.

Fig. 15B. % Esticar Protegido. *P <0,05 comparado grupo salina+ veículo. #P <0,05 comparado respectivo grupo rato brincado. &P <0,05 comparado ao respectivo grupo salina+ midazolam.

Para o tempo total de esticar como mostra a figura 16A, a ANOVA revelou efeitos estatisticamente significativos para o fator exposição ($F(1,38) = 25,80, P < 0,0001$) e tratamento ($F(3,38) = 18,16, P < 0,0001$), mas não houve efeito significativo para o fator interação ($F(3,38) = 0,43, P > 0,05$). O teste de Duncan mostrou que o tempo de esticar foi significativamente menor no grupo veículo + salina dos camundongos expostos ao rato quando comparado ao respectivo

grupo no rato de brinquedo. O teste Duncan indicou também que a injeção combinada de midazolam + salina aumentou o tempo de esticar em camundongos expostos tanto ao rato de brinquedo como ao rato, entretanto esse efeito foi revertido pela injeção combinada de flumazenil + midazolam.

A análise estatística indicou também um efeito significativo para o fator tratamento ($F(3,38) = 56,33$, $P < 0,0001$), e para o fator interação (exposição x tratamento) ($F(3,38) = 59,63$, $P < 0,05$), mas não mostrou efeito para o fator exposição (rato de brinquedo ou rato) ($F(1,38) = 1,60$, $P > 0,05$) para a % do tempo de esticar protegido como mostra a figura 16B. A análise de comparações múltiplas Duncan mostrou que a injeção de midazolam + salina diminuiu a % do tempo de esticar protegido para camundongos expostos ao rato de brinquedo e ao rato de verdade, mas esse efeito foi revertido pela injeção combinada de flumazenil + midazolam.

A análise estatística mostrou também que o grupo que recebeu midazolam + salina e foi exposto ao rato teve uma % do tempo de esticar protegido bem menor quando comparado ao respectivo grupo no rato de brinquedo. Efeito semelhante também foi observado no grupo tratado com flumazenil + veículo exposto ao rato como podemos observar na figura 15 B.

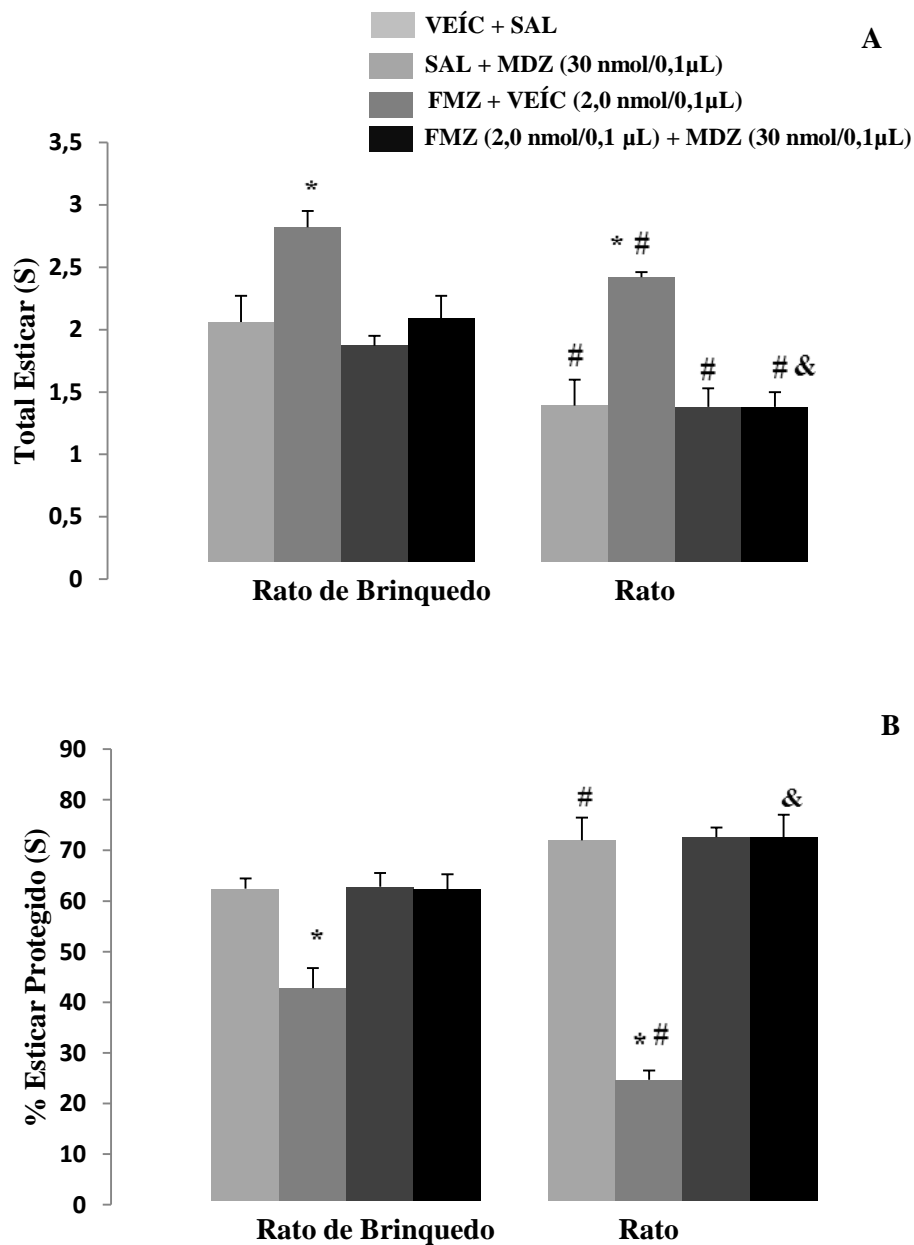


Fig. 16A. Total de Esticar (S). Efeitos da injeção combinada de VEÍC + SAL, SAL + MDZ (30nmol/0,1µL), FMZ (2,0 nmol/0,1 µL) + VEÍC, FMZ (2,0 nmol/0,1 µL) + MDZ (30 nmol/0,1µL) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato. n= 6. As barras representam a média ± E.P.M. *P <0,05 comparado ao grupo salina+ veículo. #P <0,05 comparado ao respectivo grupo rato brincado. &P <0,05 comparado ao respectivo grupo salina+ midazolam.

Fig. 16B. % Esticar Protegido (F). *P <0,05 comparado grupo salina+ veículo. #P <0,05 comparado respectivo grupo rato brincado. &P <0,05 comparado ao respectivo grupo salina + midazolam.

Em relação ao levantar desprotegido como mostra a figura 17 a ANOVA indicou um efeito significativo para o fator exposição (rato brincado ou rato) ($F(1,38) = 23,77$ $P < 0,0001$), tratamento ($F(3,38) = 12,05$ $P < 0,0001$), mas não mostrou efeito significativo para o fator interação (exposição x tratamento) ($F(3,38) = 0,70$, $P > 0,05$). O teste de Duncan mostrou que os

camundongos que receberam veículo + salina e foram expostos ao rato diminuíram o levantar desprotegido quando comparado ao respectivo grupo no rato de brinquedo. No entanto, a injeção de midazolam + salina aumentou o levantar desprotegido para camundongos expostos ao rato de brinquedo e ao rato em comparação com o seu respectivo grupo salina, entretanto, a injeção combinada de flumazenil + midazolam reverteu esse efeito.

Além disso, a análise estatística mostrou que os animais tratados com flumazenil + veículo e expostos ao rato tiveram um levantar desprotegido menor quando comparado ao respectivo grupo no rato de brinquedo.

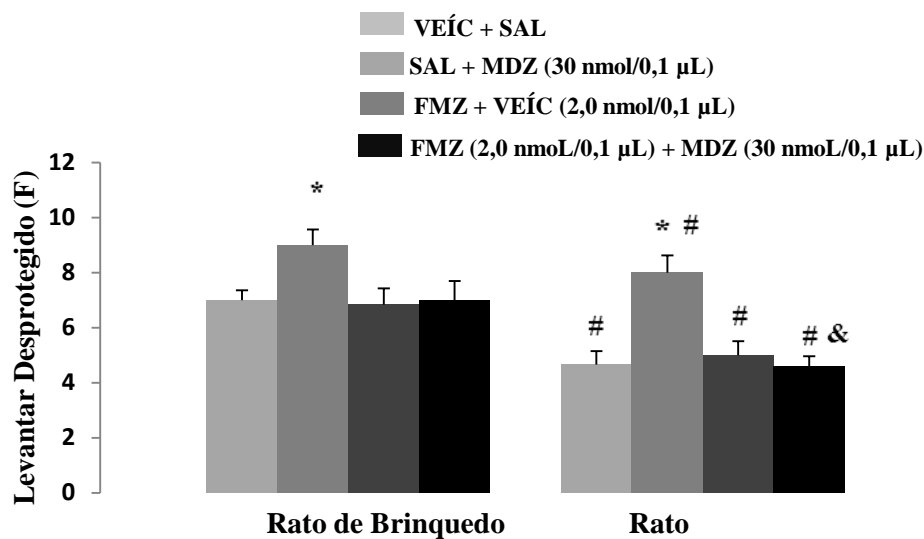


Fig. 17. Levantar Desprotegido. Efeitos da injeção combinada de VEÍC + SAL, SAL + MDZ (30nmol/0,1µL), FMZ (2,0 nmol/0,1 µL) + VEÍC, FMZ (2,0 nmol/0,1 µL) + MDZ (30 nmol/0,1µL) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato. n= 6. As barras representam a média ± E.P.M. *P <0,05 comparado ao grupo salina+ veículo. #P <0,05 comparado ao respectivo grupo rato brinquedo. &P <0,05 comparado ao respectivo grupo salina+ midazolam.

2.4 Medida de Esquiva

Foi observado um efeito significativo para o fator exposição (rato de brinquedo ou rato) ($F(1,38) = 72,82$, $P < 0,0001$) e para o fator tratamento ($F(3,38) = 589,59$, $P < 0,0001$), mas não

mostrou efeito significativo para o fator interação ($F(3,38) = 0,29, P > 0,05$), em relação ao contato com a grade de arame como podemos observar na figura 18. O teste de Duncan mostrou que os camundongos expostos ao rato que receberam a injeção combinada de veículo + salina diminuíram o contato com a grade em comparação aos animais expostos ao rato de brinquedo. No entanto, Os animais tratados com midazolam + salina aumentaram o contato com a grade para camundongos expostos ao rato de brinquedo ou ao rato em comparação aos respectivos grupos salina, porém, esse efeito foi revertido pela injeção combinada de flumazenil + midazolam.

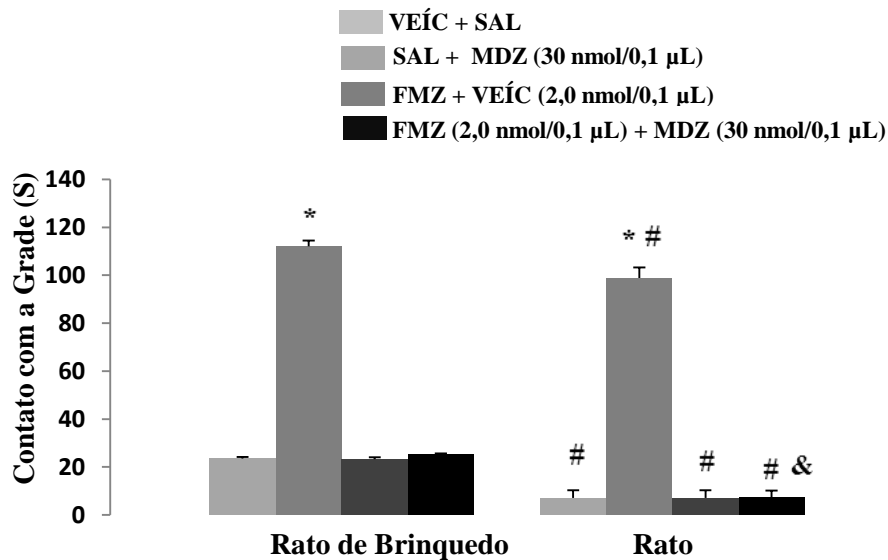


Fig. 18. Contato com a Grade. Efeitos da injeção combinada de VEÍC + SAL, SAL + MDZ (30nmol/0,1µL), FMZ (2,0 nmol/0,1µL) + VEÍC, FMZ (2,0 nmol/0,1µL) + MDZ (30 nmol/0,1µL) na amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao rato. $n = 6$. As barras representam a média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ comparado ao grupo salina+ veículo. # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo rato brinquedo. & $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo salina+ midazolam.

A análise estatística mostrou também que os animais que receberam a injeção combinada de flumazenil + veículo e foram expostos ao rato tiveram um tempo de contato com a grade bem menor quando comparado ao respectivo grupo no rato de brinquedo (ver figura 18).

Este estudo mostrou com os Experimentos 1 e 2, que a exposição de camundongos ao seu predador natural (o rato) produziu antinocicepção avaliada pelo teste de contorções abdominais. No Experimento 1, a administração intra-amídala de midazolam, nas doses de 3,0 e 30 (nmol) em camundongos submetidos ao teste de exposição de rato, produziu aumento no número de contorções abdominais, sugerindo reversão da antinocicepção por este agonista benzodiazepínico. Este efeito também foi observado pela injeção combinada de salina e midazolam (30 nmol) no Experimento 2.

Nossos resultados (Experimento 1) mostraram que ambas as doses de midazolam intra-amídala aumentaram os seguintes comportamentos: latência de fuga, total esticar, o tempo total de esticadas, tempo de contato com a grade de arame, resultados estes que também foram obtidos com a injeção combinada de salina e midazolam (Experimento 2). O efeito do midazolam intra-amídala, foi completamente bloqueado pela administração do flumazenil (2,0 nmol) (Experimento 2).

O efeito antinociceptivo obtido neste estudo corrobora estudos prévios da literatura em que a exposição da presa ao seu predador produz inibição da nocicepção (BOLLES E FANSELOW, 1980). A antinocicepção induzida pelo medo já foi discutida e pode ser considerada como uma parte integrante das reações de defesa, e parece estar relacionada com mecanismos analgésicos envolvendo as endorfinas endógenas (BOLLES E FANSELOW, 1980).

Neste sentido, trabalhos anteriores mostraram efeito antinociceptivo em camundongos (CONCEIÇÃO et al, 1992; LEE e RODGERS, 1990; MENDES-GOMES e NUNES-DE-SOUZA, 2005. NUNES-DE-SOUZA et al, 2000) e em ratos (CORNÉLIO e NUNES-DE-SOUZA, 2009) especialmente quando a nocicepção é avaliada por meio do teste de contorções abdominais. No entanto, nenhum dos estudos citados acima avaliou o envolvimento da amídala na antinocicepção induzida pela exposição da presa ao seu predador.

Desta maneira, foi sugerido por McNaughton e Corr (2004) que, em ambas as situações de ansiedade e medo, a amígdala é uma das estruturas cerebrais alvo de estímulos ameaçadores, detectando e organizando as respostas de perigo, atuando também como um centro de aprendizagem para novas ameaças (LEDOUX 1992, 1998; LABAR, 1996). Neste sentido, muitos estudos têm demonstrado que a administração de agonistas benzodiazepínicos na amígdala de roedores podem reduzir a ansiedade gerada por diferentes modelos animais (HODGES et al, 1987, DAVIS et al, 1992., PESOLD e TREIT, 1995, GONZALEZ et al, 1997 ; ZANGROSSI e GRAEFF, 1999).

Baseado neste contexto, os estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que a administração intra-amígdala de midazolam (na dose de 30 nmol) em camundongos aumentou o número de contorções abdominais nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE) (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BAPTISTA et al., 2009), porém, estes estudos avaliaram a nocicepção, numa situação em que o animal não tinha a escolha de escapar do estímulo aversivo (braço aberto do LCE).

No presente estudo demonstramos o envolvimento da amígdala nas respostas de ansiedade e nocicepção avaliadas pela exposição do camundongo ao rato. Neste sentido, o nosso resultado corrobora estudo anterior onde foi avaliada a antinocicepção induzida pelo predador em camundongos, mas com administração do agonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, na SCPvl. Apesar do 8-OH-DPAT ter produzido efeito ansiolítico em camundongos expostos ao predador, a nocicepção induzida pela constrição do nervo ciático, não foi revertida (REIS e CANTO-DE-SOUZA, 2011). Em outro estudo, utilizando o modelo de exposição ao predador, foi verificado que o ondansetron foi capaz de reverter o efeito ansiolítico produzido pelo midazolam microinjetado no hipocampo ventral de camundongos expostos ao rato (FACHINI e CANTO-DE-SOUZA, 2011).

No entanto, resultados diferentes foram observados por outros autores ao usar modelos diferentes de ansiedade e nociceção. Albrechet-Souza et al., (2009) demonstraram que o midazolam não alterou a resposta nociceptiva avaliada no teste de retirada da cauda em ratos ingênuos e reexpostos ao labirinto em cruz elevado. Em outro estudo com camundongos, microinjeções de midazolam na substância cinzenta periaquedutal não induziu a antinociceção em animais expostos ao labirinto em cruz elevado aberto (LCEa) (MENDES-GOMES e NUNES-DE-SOUZA, 2005).

O efeito ansiolítico desse agonista benzodiazepínico (MURAI et al., 1994), intra-amígdala, mostrou ser seletivo uma vez que nenhuma das duas doses alteraram a atividade locomotora, medida pela frequência de entradas nos lados protegido e desprotegidos do aparato avaliadas nos Experimentos 1 e 2. Recentemente, nós mostramos o mesmo efeito seletivo do midazolam injetado na amígdala de camundongos ingênuos e reexpostos ao LCE (BARBALHO et al., 2009).

Alguns autores têm mostrado que os comportamentos de avaliação de risco são sensíveis à ação de drogas ansiolíticas (BLANCHARD et al., 2001; BARBALHO et al., 2009; FACHINI e CANTO-DE-SOUZA, 2011). Considerando que a avaliação de risco tem como função buscar informações sobre a fonte de perigo (para revisão ver BLANCHARD et al., 2001), com os resultados obtidos neste estudo sugeriram que a amígdala participa da modulação de comportamentos defensivos mais elaborados e orientados relacionados ao medo e a ansiedade.

Neste sentido, o tratamento com midazolam (3,0 ou 30 nmol) (Experimento 1) ou a dose (30 nmol, Experimento 2) intra-amígdala, produziu diminuição dos comportamentos de avaliação de risco e aumentou a latência de fuga do ambiente desprotegido para a área protegida, o que sugere um efeito ansiolítico deste agonista benzodiazepínico. Assim, os resultados obtidos nos Experimentos 1 e 2, em relação à avaliação de risco corroboram o efeito ansiolítico obtido por outros autores, com a administração sistêmica ou em estruturas do SNC de midazolam (GONZALEZ e FILE, 1997; MOTTA e BRANDÃO, 1993, RUSSO et al., 1993; GREEN e

VALE, 1992; ZANGROSSI e GRAEFF, 1994; GONZALEZ et al., 1998; MENARD e TREIT, 2001; PESOLD e TREIT, 1995; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; REIS e CANTO-DE-SOUZA, 2008; BARBALHO et al., 2009; REIS e CANTO-DE-SOUZA, 2011; FACHINI e CANTO-DE-SOUZA, 2011). Neste estudo, nós avaliamos as reações de defesa de camundongos expostos ao seu predador natural, o rato (RYLOV, 1985; DE CANTARAZO, 1988; NIKULINA, 1991; WUENSCH, 1992). Neste sentido, os nossos resultados mostraram que, para as medidas etológicas avaliadas, a frequência de esticar aumentou apenas para os camundongos expostos ao rato no Experimento 1, e para ambos os grupos no Experimento 2. Estes resultados corroboram com os de BLANCHARD e colaboradores (1997 e 2001), que mostram existir discrepância na emissão dos comportamentos relacionados a avaliação de risco (orientação e aproximação da ameaça), entre ratos e camundongos. Os autores argumentam que a avaliação de risco em camundongos é mais frequente que em ratos, sendo que estes por sua vez, exibem com frequência maior o comportamento de congelamento em situações de perigo ou ameaça (CARVALHO-NETTO et al., 2006 e 2007).

Resultados semelhantes ao nosso foi obtido por Yang e colaboradores (2006) onde a infusão do composto oCRF (agonista inespecífico de receptores CRF), intensificou de maneira consistente a maioria dos comportamentos defensivos expressados por camundongos na Bateria de Testes de Defesa para Camundongos (MDTB), por exemplo, durante o procedimento foram caracterizados aumentos nos comportamentos de avaliação de risco (esticar), congelamento, fuga, esquiva e saltos defensivos.

Diante do exposto acima, alguns autores sugerem a hipótese de que outros neurotransmissores além do NMDA, que tem sido amplamente estudado nas reações de defesa (CARVALHO-NETTO & NUNES-DE-SOUZA, 2000; CAROBREZ et al., 2001; BENJAMINI e GUIMARÃES, 2006) estejam participando da modulação das respostas defensivas, como a

ácido gama amino-butírico (GABA), serotonina, colecistoquinina, histamina e neuropeptídeos como os opióides e o fator liberador de corticotropina (CRF).

Baseado no fato, em que camundongos apresentam níveis expressivos de exibição do comportamento de avaliação de risco, o qual tem sido implicado nos processos ansiosos (CARVALHO-NETTO & NUNES-DE-SOUZA, 2004a; BLANCHARD et al., 2001 GRAY & MCNAUGHTON, 2000) a escolha pelo uso dessa espécie pode ser de elevada importância em investigações sobre a neurobiologia da ansiedade e do medo (CARVALHO-NETTO & NUNES-DE-SOUZA, 2004a), uma vez que ratos expostos a situações aversivas em diversos modelos exibem mais o comportamento de congelamento (BLANCHARD et al., 2001). Considerando que a avaliação de risco tem como função buscar informações sobre a fonte de perigo, (para revisão ver BLANCHARD et al., 2001) os nossos resultados sugerem que a amígdala esteja participando da modulação de comportamentos defensivos mais elaborados e orientados relacionados ao medo e a ansiedade em camundongos expostos ao rato. Essa hipótese é favorecida, pelos resultados obtidos em relação às medidas etológicas tais como, aumento no tempo de esticar desprotegido, produzido pelas duas doses de midazolam em ambos os grupos (rato de brinquedo e rato de verdade), como mostrado nos Experimentos 1 e 2.

Em relação ao contato com a grade, ocorreu aumento no contato com a grade de arame, nos dois grupos, exposto ao rato de brinquedo e ao rato, caracterizando um efeito ansiolítico clássico desse agonista benzodiazepínico (BARBALHO et al., 2009; BAPTISTA et al., 2009; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000). Entretanto esse efeito foi revertido pela injeção combinada de flumazenil e midazolam.

Os efeitos do flumazenil como antagonista dos receptores benzodiazepínicos é bem descrito na literatura e vários autores têm mostrado que a administração sistêmica ou central de flumazenil promove o bloqueio do efeito ansiolítico induzido por agonistas benzodiazepínicos em injeções combinadas (WANDA e FUKUDA, 1991; RUSSO et al., 1993; HOSOI et al., 1999;

BELZUNG et al, 2000; JARDIM E GUIMARÃES, 2001; REIS E CANTO-DE-SOUZA, 2008, BARBALHO et al., 2009), ou ausência de efeitos (RUSSO et al, 1993; GONZALEZ E FILE, 1997; BARBALHO et al., 2009) em diferentes modelos de ansiedade. Efeitos contraditórios também são obtidos com este antagonista, por exemplo, efeito ansiogênico (FILE et al, 1982; FILE e HITCHCOTT, 1990; NUTT et al, 1990; SAVIC et al, 2004) e ausência de efeitos (PELLOW e FILE, 1986; FILE et al., 1987; WADA et., al, 1991; REX et al., 1993; CHOPIN et al, 1993; BENJAMIN et al, 1990; RUSSO et al., 1993; SCHMIDT et al, 1998; DALVI e RODGERS, 1999; SAVIC et al., 2004;).

Corroborando com os achados da literatura descritos acima, o Experimentos 1 e 2 mostraram que a administração de midazolam na amígdala aumentou o número de contorções abdominais em camundongos expostos ao rato, e ao mesmo tempo produziu aumento no número e no tempo de esticar, seguido por um aumento na latência e no contato com a grade de arame. Este efeito do midazolam também foi observado após a injeção combinada (Experimento 2), e o mesmo foi revertido pelo flumazenil (flumazenil e midazolam) em uma dose que não apresentou efeito por si só (2,0 nmol), sugerindo assim, que a amígdala participa juntamente com estruturas mais caudais, como por exemplo, a substância cinzenta periaquedutal de comportamentos defensivos mais elaborados (para revisão ver MCNAUGHTON & CORR 2004).

Assim concluimos que a injeção de midazolam (duas doses), agonista dos receptores benzodiazepínicos, na amígdala de camundongos expostos ao rato produz efeito ansiolítico, e inibe a antinocicepção avaliada pelo teste de contorções abdominais, efeitos estes que são revertidos pela injeção local de flumazenil, antagonista desses receptores. Portanto, este estudo sugere que a ativação e o bloqueio dos receptores GABA_A-benzodiazepínicos da amígdala modulam em conjunto os comportamentos antinociceptivos como os mecanismos de defesa em camundongos expostos ao rato, conforme proposto por Bolles e Fanselow (1980).

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo concluímos:

- A exposição de camundongos ao predador natural (rato) promove aumento da ansiedade e antinocicepção.
- As doses de midazolam (3,0 e 30 nmol, Experimento 1) e a administração combinada de salina + midazolam (30 nmol, Experimento 2) na amígdala, promoveram efeito ansiolítico e reversão da antinocicepção em camundongos expostos ao rato.
- A administração prévia na amígdala de uma dose inativa de flumazenil (2,0 nmol) bloqueia o efeito ansiolítico e antinociceptivo induzido pelo midazolam microinjetado na amígdala.
- A amígdala está envolvida na modulação da dor no modelo de exposição ao rato.
- Sugerimos que a ativação dos receptores GABAA da amígdala são recrutados para modular a antinocicepção e as reações de defesa em camundongos expostos ao predador natural (rato).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B. J.; LIBMAN, R. B. A dose-ratio of mu and kappa in formalin and thermal pain. *Life Sci.*, 39, p. 2017-2024, 1986.

ALBRECHET-SOUZA, L.; OLIVEIRA, A. R.; DE LUCA, M. C. Z.; TOMAZINI, F. M.; SANTOS, N. R.; BRANDÃO, M. L. A comparative study with two types of elevated plus-maze (transparent vs. opaque walls) on the anxiolytic effects of midazolam, one-trial tolerance and fear-induced analgesia *Brain Res.* 29, p. 571-579, 2005.

ANISMAN H AND ZACHARKO RM. Multiple neurochemical and behavioural consequences of stressors: Implications for depression. In: *Psychopharmacology of anxiolytics and antidepressants*. Pergamon Press, New York, p.57-82, 1991.

ANDREATINI, R.; VITAL, M.A.B.F.; SANTOS, G.L.; The reinstatement of conflict reverses the one-trial tolerance to diazepam on elevated plusmaze. *Eur. Neuropsychol.* 13 (Suppl. 4), S378–S379, 2003.

ARDID, D.; ALLOUI, G.; BROUSSE, G.; JOURDAN, D.; PICARD, P.; DUBRAY, C.; ESCHALIER, A. Potentiation of the antinociceptive effect of clomipramine by a 5-HT_{1A} antagonist in neuropathic pain in rats. *British J. of Pharmacol.* 132: p.1118-1126, 2001.

BARBALHO, C.A., NUNES-DE-SOUZA, R.L., CANTO-DE-SOUZA, A. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: evidence for endogenous benzodiazepine inverse agonist release in elevated plus-maze exposed mice. *Brain Res.* 1267, 65–76, 2009.

BARDIN, L.; LAVARENNE, J.; ESCHALIER, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain.* 86: p.11-18, 2000.

BARNES, N.M.; SHARP, T.; A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacol.* 38, p.1083-1152. 1999.

BAPTISTA, D.; BUSSADORI, K.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Blockade of fear-induced antinociception with intra-amygdala infusion of midazolam: Influence of prior test experience. *Brain Res.*, 1294, 29-37, 2009.

BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. *Ann.Neurol.*, 4(5):451-62, 1978.

BAXTER, G.; KENNETT, G.; BLANEY, F.; BLACKBURN, T.; 5-HT₂ receptor subtypes: a family re-united? *Trend. Pharmacol. Sci* 16, p.105–110, 1995.

BEIJAMINI, V., & GUIMARÃES, F.S. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. *Behavioural Brain Research*, 170, 52-61, 2006.

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog. Neurobiol.*, New York, 46, p.575-605, 1995.

BENBOUZID, M.; PALLAGE, V.; RAJALU, M.; WALTISPERGER, E. DORIDOT, S.; POISBEAU, P.; FREUND-MERCIER, M.J.; BARROT, M. Sciatic nerve cuffing in mice: A model of sustained neuropathic pain. *Europ. J. of Pain*. Article in press, 2007.

BELZUNG; GRIEBEL, Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review, *Behav. Brain Res.* 125, p.141–149, 2001.

BERTOGLIO L.J.; ANZINI, C.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; CAROBREZ, A.P. Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteracts the anxiolytic response to midazolam on the elevated plus maze trial 2 in rats. *Behav Brain Res*, 162, (1), 99-107, 2005.

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

BLANCHARD, D.C., BLANCHARD, R.J., RODGERS, R.J. Pharmacological and Neural control of anti-predator defense in the rat. *Aggressive Behav.* 16, 165-176, 1990.

BLANCHARD, R.J., YUDKO, E.B., RODGERS, R.J., BLANCHARD, D.C. Defensive system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav Brain Res.* 58, 155-165, 1993.

BLANCHARD, R.J., GRIEBEL, G., HENRIE, J.A., BLANCHARD, D.C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neuroscience and Biobehav Rev.* 21, 783-789, 1997.

BLANCHARD, D.C, GRIEBEL, G., BLANCHARD, R.J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci and Biobehav Rev*, 25, 205-218, 2001.

BLANCHARD, DC., YANG, M., MARKHAN. C., BLANCHARD, RJ., GRIEBEL, G. Diazepam and buspirone effects in c57bl mice in the rat exposure test (ret). Program 784.32004. Abstract Vilwer Itinerary Plamer. Washington Society for Neuroscience, 2004.

BANDLER, R., CARRIVE, P., ZHANG, S.P. Integration of somatic autonomic reactions within the periaqueductal Gray: viscerotopic, somatotopic and functional organization. Progress in Brain Res, 87, 269-305, 1991.

BANDLER, R.; KEAY, K. A., FLOYD, N.; PRICE, J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. Passive emotional coping. Brain Research Bulletin. v.53, p. 95-104, 2000.

BAXTER, G., KENNETT, G., BLANEY, F.,BLACKBURN, T. 5-HT₂ receptor subtypes: a family re-united?. Trends Pharmacol Sci, 105, 105-110, 1995.

BECERRA-GARCIA, A.M., CARDENAS, F.R., MORATO, S. Effect of different illumination levels on the rat behavior in the elevated plus-maze. Physiol and Behav, 85, 265-270, 2005.

BENBOUZID, M.; PALLAGE, V.; RAJALU, M.; BARROTT,M. Sciatic nerve cuffing in mice: A model of sustained neuropathic pain. European Journal of Pain 2007.

BENTLEY GA, NEWTON SH, STARR J. Studies on the antinociceptive action of agonist drugs and their interaction with opioid mechanisms. Br J Pharmacol 79:125-134, 1983.

BELZUNG C, GRIEBEL G. Measuring normal and pathological anxious behaviour in mice. Behavioral Brain Research, 125:141–149; 2001.

BRANDÃO, M.L. As bases biológicas do comportamento: Introdução à neurociência. São Paulo: E.P.U. 2004.

BRANDÃO, M.L., VIANNA, D.M., MASSON, S., SANTOS, J. Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. Rev Bras Psiqu. 25 (Supl II), 36-41, 2003.

BOCCALON, S.; SCAGGIANTE, B.; PERISSIN, L. Anxiety stress and nociceptive responses in mice. Lif. Scie. 78: 1225 – 1230, 2006.

BOGDANOV, A. I.; YARUSHKINA, N. N. The relationship between analgesia and corticosteroid levels in rats. Neurosc Behav Physiol, v. 30, p. 487–9, 2000.

BOGDANOV, A.I.; YARUSHKINA, N.N. Mechanisms of the effects of adrenocorticotrophic hormone on pain sensitivity in rats. *Neurosc Behav Physiol*, v. 33p.795–8, 2003.

BOLLES, R. C.; FANSELOW, M. S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behav. Brain Sci.*, 3, p.291-322, 1980.

CAHILL L, MCGOUGH, J.L Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neuroscience*, 21: 294- 299, 1998.

CANTO-DE-SOUZA, A.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; PELÁ, I. R.; GRAEFF, F. G. High intensity social conflict in the Swiss albino mouse induces analgesia modulated by 5-HT1A receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 56 (3):481-486, 1997.

CANTO-DE-SOUZA, A.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; PELÁ, I.R.; GRAEFF, F.G. Involvement of the Midbrain Periaqueductal Gray 5-HT1A Receptors on Social Conflict Analgesia in Mice. *European Journal of Pharmacology*, 345(3):253-256, 1998.

CANTO-DE-SOUZA, A.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; RODGERS, R.J. Anxiolytic-like effect of WAY-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. *Brain Res.* 928, p.50-59, 2002.

CAROBREZ, A.P., TEIXEIRA, K.V., GRAEFF, F.G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neurosci Biobehav Rev*, 25 (7-8), 697-709, 2001.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior. The elevated plus-maze model 20 years. *Neurosc. and Biobehav. Rev.* 29, p.1193-1205, 2005.

CARVALHO-NETTO, E.F., & NUNES-DE-SOUZA, R.L. Use of elevated T-maze to study anxiety in mice. *Behavioural Brain Research*, 148, 119-132., 2004a.

CARVALHO-NETTO, E.F.; NUNES-de-SOUZA, R.L. Behavioral responses followed by chemical stimulation of the midbrain periaqueductal gray in mice. *Internal Behavioral Neurosc.* 13: 49, 2004b.

CARVALHO-NETTO, E.F., MARKHAM, C., BLANCHARD, D.C., NUNES-DE-SOUZA, R.L., BLANCHARD, R.J. Physical environment modulates the behavioral responses induced by

chemical stimulation of dorsal periaqueductal gray in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 85, 140-147, 2006.

CARVALHO-NETTO, E.F., LITVIN, Y., NUNES-DE-SOUZA, R.L., BLANCHARD, D. C., BLANCHARD, R. J. Effects of intra-PAG infusion of ovine CRF on defensive behaviors in Swiss-Webster mice. *Behavioural Brain Research*, 176, 222-229, 2007.

CERVERO, F. *Neurobiología del dolor*. *Rev Neurol*. 30(6) p.551-555, 2000.

CHOPIN P, BRILEY M. The benzodiazepine antagonist, flumazenil blocks the effects of CCK receptor agonist and antagonists in the plus maze. *Psychopharmacology*, 110: 409-414, 1993.

CONCEIÇÃO, I. M.; MAIOLINI Jr. M.; MATTIA, N.; VITAL, M. A.; SANTOS, B. R.; SMAILI, S.; FRUSSA-FILHO, R. Anxiety-induced antinociception in the mouse. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 25, p.831-834, 1992.

CORNÉLIO, A. M.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.* 178, (1), p.82-89, 2007.

COSTALL, B., NAYLOR, R.J. Anxiolytic effects of 5-HT₃ antagonists in animals. In: WILEY, J. 5-HT_{1A} agonists, 5-HT₃ antagonists and benzodiazepines: Their comparative behavioural pharmacology. Rodgers, R.J., Cooper, S.J. (eds). Chichester, 133-158, 1991.

COY, L. Characterization of the interaction between fenamates and hippocampal neuron GABA receptors: *Neurochem*, 51:440-446, 2007.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Bioch. Behav.*, 49, p.171-176, 1994.

CRUZ-MORALEZ, N. R.; SANTOS; BRANDÃO M. L. One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat, *Pharmacol. Bioch. Behav.* 72, p.973-978, 2002.

DARWIN, C. *A expressão das emoções no homem e nos animais*. São Paulo: Companhia das Letras, 2000.

DALVI, A.; RODGERS, R. J. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. *Psychopharmacol. (Berlim)*, 128, p.380-397, 1999.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety, *Trends Pharmacology Science*, 13: 35-41, 1992.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. *J. Psychopharmacol.*, 5, n. 4, p.305-315, 1991.

DE-SOUZA, M. M.; SCHENBERG, L. C.; CAROBREZ, A. P. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxiolytic drug effects on plus-maze performance. *Behav. Brain Res.* 90, p.157-165, 1998.

DUARTE, D. F. Uma Breve História do Ópio e dos Opióides. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 55, n. 1, p. 135-146, 2005.

FACHINI, G., CANTO-de-SOUZA, A. Efeito ansiogênico do ondasetron microinjetado no hipocampo ventral de camundongos. In: Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE. XXI Reunião Anual, Águas de Lindóia, SP, 2006.

FACHINI, G., CANTO-de-SOUZA, A. Efeito ansiogênico do ondasetron microinjetado no hipocampo ventral de camundongos. In: Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE. XXI Reunião Anual, Águas de Lindóia, SP, 2011.

FANSELOW, M. S., HELMSTETTER, F. J.; CALCAGNETTI, D. J. Parallels between the behavioral effects of DMCM and conditional fear stimuli. *Brain, emotion and cognition* pp. 187-206, 1991a.

FANSELOW M.S.; KIM J. J. The Benzodiazepine Inverse Agonist DMCM as an Unconditional Stimulus for Fear – Induced Analgesia: Implications for the role of GABAA receptors in fear-related behavior. *Behavioral Neuroscience*, 106: 2336-344, 1992.

FARRANT, M. NUSSER. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABAA receptors *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 215-229, 2005.

FARDIN, V.; OLIVEIRA, J. L.; BESSON, J. M. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. I. The production of behavioral side effects together with analgesia. *Brain Res.* v. 306, p. 105-123, 1984.

FELDBERG, W.; MYERS, R.D. Effects on temperature of amines injected into the cerebral ventricles. A new concept of temperature regulation. *J Physiol* 173: p.226-231, 1964.

FIELDS, H. L.; HEINRICHER, M. M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits., *Annual Review of Neuroscience*, v. 14, p. 219-245, 1991.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I.; HEINRICHER, M. M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Eds). *WALL and MELZACK'S Textbook of pain*. 5th ed. Elsevier: Churchill Livingstone; p.3-34, 2006.

FILE S.E, MABBUTT PS, HITCHOTT PK. Characterization of phenomenon of 'one-trial tolerance' to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, 102: 98–101. 1990.

FILE, S. E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: ELLIOTT, J. M.; HEAL, D. J.; MARSDEN, C. A. (eds). *Ex. App. to Anxiety and Depres.* J Wiley, Chichester, p. 25-44, 1992.

FILE, S.E; ZANGROSSI, H.J.;VIANA, M.; GRAEFF, F.G.Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacol.* 111 p.491-494, 1993.

FILE S.E, GONZALEZ LE, and GALLANT R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology*, 19:397–405, 1998.

FILE S.E. LISTER R.G, NUTT DJ. Intrinsic actions of benzodiazepine antagonists. *Neuroscience Letters*, 32: 165–168. 1982.

FRAZER, H.; HARRIS, L.S. Narcotic and narcotic antagonist analgesics. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 7, p. 277-300, 1967.

FRUSSA-FILHO; RIBEIRO, R. A. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is not due to acquisition of a phobic avoidance of open arms during initial exposure, *Life Sci.* 71, p.519–525, 2002.

GAURIAU, C.; BERNARD, J. F. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat, *Experimental Physiology*, v. 87, n. 2, p. 251-258, 2002.

GEAR, R.W.; ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. *J Neurosci.*, v. 19, n. 16, p. 7175-81,1999.

GOLDBERG, H.L., FINNERTY, R.J. The comparative efficacy of buspirone and diazepam in the treatment of anxiety. *Am J Psychiatric*, 136, 1184-1187, 1979.

GOMES, K.S., NUNES-DE-SOUZA, R.L. Implication of the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} (but not 5-HT_{2A}) receptors located within the periaqueductal gray in the elevated plus-maze test-retest paradigm in mice. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 33, 1261-1269, 2009.

GONZALEZ, L.E.; FILE, S.E. A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *J. Neurosci.* 17, p.1505-1511, 1997.

GRAEFF, F.G. Brain defence systems and anxiety. In: ROTH, M.; BURROWS, G.D.; NOYES, R. (ed). *Handbook of anxiety*, 3rd. ed., Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 307-354, 1990.

GRAEFF, F.G., VIANA, M.B., MORA, P.O. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci a Biobehav Rev*, 21 (6), 791-799, 1997.

GRAEFF, F. G. Medicamentos Ansiolíticos. IN: *Fundamentos de Psicofarmacologia*. Atheneu, São Paulo, 1999.

GRAY, J.A. (Ed.) *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. London: Oxford University Press, 1982.

GRAY, J.A., MCNAUGAHTON, N. *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. 2 nd ed. Oxford University Press, London, England, 2000.

GREEN S, VALE AL. Role of amygdaloid nuclei in the anxiolytic effects of benzodiazepines in rats. *Behavioral Pharmacology*, 3, 261-264, 1992.

GRIEBEL, G.; RODGERS, R.J.; PERRAULT, G.; SANGER, D.J. The effects of compounds varying in selectivity as 5-HT_{1A} receptor antagonists in three rat models of anxiety. *Neuropharmacol.* 39, 1848-1857, 2000.

GRIEBEL, G.; RODGERS, R. J.; PERRAULT, G.; SANGER, D. J. Risk assessment behaviour: Evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze. *Pharmacol. Bioch. Behav.* 57, p.817-827, 1997.

GRIFFITHS, J.L.; LOVICK, T.A. Co-localization of 5-HT_{2A} and GABA-immunoreactivity in neurones in the periaqueductal grey matter of the rat. *Neurosci. Lett.* 326, p.151-154, 2002.

GUIMARÃES, F. S. Medicamentos Hipnóticos. In: - Drogas Psicotrópicas e seu modo de ação. EPU, São Paulo, p.61-63, 1989.

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

HANDLEY, S. 5-Hidroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmacol Ther*, 66, 103-148, 1995.

HASNIE, F. S.; WALLACE V. C. J.; HEFNER, K.; HOLMES, A.; RICE, A. S. C. Mechanical and cold hypersensitivity in nerve-injured C57BL/6J mice is not associated with fear-avoidance- and depression-related behaviour. *Brit. Jou. of Anest.* 1 -7, 2007.

HELMSTETTER, F. J.; TERSHNER S. A.; POORE, L. H.; BELLGOWAN, P. S. Antinociception following opioid stimulation of the basolateral amygdala is expressed through the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Brain Research*, v. 779, n.1-2, p. 104-118, 1998.

HESS, W.R., BRÜGGER, M. Das subkortikale zentrum der affectiven abwerreaktion. *Helvetica Psysiol Pharmacol Act*, 1, 33-52, 1943.

HETEM, L.A.B., GRAEFF, F.G. (Ed.) *Transtornos de ansiedade*. São Paulo: Editora Atheneu, 191-205, 2003.

HIGGINS, S. T., DELANEY, D. D., BUDNEY, A. J., BICKEL, W. K., HUGHES, J. R., FOERG, F., A behavioral approach to achieving initial cocaine abstinence. *The American Journal of Psychiatry*, 148, 1218–1224, 1991.

HODGES, H, GREEN S, GLENN B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonirgic effects on punished responding but not on discrimination. *Psychopharmacology*. 92: 491-504, 1987.

HOGG, S. A review of the validity and reliability of the elevated plus-maze as a model of anxiety. *Pharm. Bioch. and Behav.* 54, p.21-30, 1996.

HOLDEN, J. E.; VAN POPPEL, A. Y.; THOMAS, S. Antinociception from lateral hypothalamic stimulation may be mediated by NK1 receptors in the A7 catecholamine cell group in rat, *Brain Research.*, v. 953, n. 1-2, 25, p. 195-204, 2002.

HOLMES, A.; RODGERS, R.J. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus maze. *Neurosc. and Biobehav. Rev.* 23, p.971-980, 1999.

HOSOI R, KOBAYASHI K, WATANABE Y, INOUE O. Discrepancy of benzodiazepine receptor occupancy between 3H-flumazenil and 125I-iomazenil in intact mouse brain. *Journal of Neural Transmission*, 106, 243-256. 1999.

HUNKELER W, MOHLER H, PIERI L, POLC P, BONETTI EP, CUMIN R, SCHAFFNER R AND HAEFELY W Selective antagonists of benzodiazepines. *Nature (Lond)* 290: 514–516, 1981.

HUNSPERGER RW. Affektreaktionen auf elektrische Reizung im Hirnstamm der Katze. *Helv Physiol Pharmacol Acta*, (1):70–92, 1956.

HUNT, S.; KOLTZENBURG M. *The Neurobiol. of Pain*. Oxford University, 2005.

JIMÉNEZ-VELÁZQUEZ, G.; LÓPEZ-MUÑOZ, F.J.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A. Participation of the GABA/benzodiazepine receptor and the NO-cyclicGMP pathway in the “antinociceptive-like effects” of diazepam. *Pharm. Bioch. and Beh.* 91, (1), p.128-133, 2008.

KAPCZINSKI F.; CURRAN, H.V.; GRAY, J.; LADER, M. Flumazenil has an anxiolytic effect in simulated stress. *Psychop.* 114. p.187-189, 1994.

KENNETT, G.A., PITTSWAY, K., BLACKBURN, T.P. Evidence that 5-HT_{2C} receptor antagonists are anxiolytic in the Geller-seifter model of anxiety. *Psychopharmacol*, 114, 90-96, 1994.

KEY, K.A.; LI, Q.F.; BANDLER, R. Muscle pain activates a direct projection from ventrolateral periaqueductal gray to rostral ventrolateral medulla in rats. *Neurosc. Let.* 290, p.157-160, 2000.

KUHAR, M.J., DESOUZA, E.B., AND UNNERSTALL, J.R. Neurotransmitter receptor mapping by autoradiography and other methods. *Annu. Rev. Neurosci.*, 9:27-59, 1986.

LABAR K S, LEDOUX J.E. Partial disruption of fear conditioning in rats with unilateral amygdala damage: correspondence with unilateral temporal lobectomy in humans. *Behavioral Neuroscience*, 110: 991-997, 1996.

LAINE, L.; BAPTISTA, D.; MARUCCI, F. A. F.; CANTO-DE-SOUZA, A. Administração de ondansetron na amígdala de camundongos produz efeito ansiolítico. In: I IBRO/LARC de Neurociências da América Latina, Caribe e Península Ibérica, 2008, Búzios.

LABAR K S, LEDOUX J.E. Partial disruption of fear conditioning in rats with unilateral amygdala damage: correspondence with unilateral temporal lobectomy in humans. *Behavioral Neuroscience*, 110: 991-997. 1996.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.*, v.53, p.597-652, 2001.

LEDOUX J E. Emotion and the amygdala. In J. P. Aggleton (Ed.), *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction*. New York: Wiley-Liss. pp. 339- 351, 1992.

LEDOUX J. Fear and the brain: where have we been and where are we going. *Biology Psychiatry*, 44; 1229-1238, 1998.

LEE, C., and RODGERS, R. J. Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: Influence of opiate receptor manipulations. *Psychop.* 102, p.507-513, 1990.

LEE, C.; RODGERS, R. J. Effects of buspirone on antinociceptive and behavioural responses to the elevated plus-maze in mice. *Behavioural pharmacology*, v. 2, p. 491-496, 1991.

LENT, ROBERTO. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências. Editora Atheneu, 2001.

LESTER, L. S.; FANSELOW, M. S. Exposure to a cat produces opioid analgesia in rats, *Behavioral Neuroscience*, v. 99, p. 756-759, 1985.

LITVIN J, CHEN X, KELEMAN S, ZHU S, AUTIERI M Expression and function of periostin-like factor in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292:C1672–1680, 2007.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychop.* 92, p.180-185, 1987.

MAGOUN, H.W., ATLAS, D., INGERSOLL, E.H., RANSOM, S.W. Associated facial, vocal and respiratory components of emotional expression: An experimental study. *J Neurol Psychopathol*, 17, 241-255, 1937.

MANNING, B. H.; MORGAN, M. J.; FRANKLIN, K. B. Morphine analgesia in the formalin test: evidence for forebrain and midbrain sites of action. *Neuroscience*, v. 63, n. 1, p. 289-294, 1994.

MARCONDES, F. K., MIGUEL, K., MELO, L. L. & SPADARI-BRATFISCH, R. C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.*, 74(4-5): 435-440, 2001.

MARKS, I.M. *Fears, phobia and rituals: panic, anxiety and their disorders*. New York: Oxford University Press, p.53-81, 1987.

MARTINEZ NJ, OW MC, BARRASA MI, HAMMELL M, SEQUERRA R, DOUCETTE-STAMM L, ROTH FP, AMBROS V, WALHOUT AJM A C. *C. elegans* genome-scale microRNA network contains composite feedback motifs with high flux capacity. *Genes Dev* 22: 2535–2549, 2008.

MCKERNAN RM & PJ WHITING. Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 19: 139-143, 1996.

MURAI T, KOSHIKAWA N, KANAYAMA T, TAKADA K, TOMYAMA K, KOBAYASHI M. Opposite effects of midazolam and beta-carboline-3-carboxylate ethyl ester on the release of dopamine from rat nucleus accumbens measured by in vivo microdialysis. *European Journal Pharmacology*, 11; 261 (1-2), 65-71, 1994.

MARUCCI, F.A.F., FACHINI, G., CANTO-DE-SOUZA, A. Agonista dos receptores 5-HT₃ produz efeito ansiogênico em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado. In: XIV CIC - Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar. São Carlos, SP, 2006.

MAYER, S. F.; SHERMAN, J. E.; LEWIS, J.W.; TERMAN, G.W; LIEBESKIN, J. C The opioid/nonopioid nature of stress-induced analgesia and learned helplessness. *J. Exp. Psychol.: Anim. Behav. Proc.*, v. 9, p. 80-90, 1971.

MCDONALD, A.J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol.*, 55, 257-332, 1998.

MCNAUGHTON. N.; CORR. P.G. A TWO – DIMENSIONAL NEUROPHYSIOLOGY OF DEFENSE: FEAR/ANXIETY AND DEFENSIVE DISTANCE. NEUROSCIBIOHAVIORAL REV. 28(3): 285-305, 2004.

MELZAC, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: new theory. Science, v. 150, n. 699, p. 971- 979, 1965.

MENARD, J., TREIT, D. The septum and hippocampus differentially mediate anxiolytic effects of R(+)-8-OH-DPAT. Behav Pharmacol, 9 (2), 93-101, 1998.

MENDES-GOMES, J.; NUNES-DE SOUZA, R.L. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. Brain Res. 1047, p.97-104, 2005.

MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N.; R AJA, S.N. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Eds). WALL and MELZACK'S Textbook of pain. 5th ed. Elsevier: Churchill Livingstone; p.3-34, 2006.

MESSIER, C., ÉMOND, S., ETHIER, K. New techniques in stereotaxic surgery and anesthesia in the mouse. Pharmacol Biochem Behav, 63 (2), 313-318, 1999.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. Prog. Neurobiol., v.57, p.1-164, 1999.

MILLAN, M.J; BROCCO, M. The Vogel conflict test; procedural aspects, gaminobutyric acid, glutamate and monoamine. European Jouenal of Pharmacology., v. 463, n. 1-3, p. 67-96, 2003.

MODY, L. Bridging the deft at GABA synapses in the brain. Trends in Neurosciencs, 17: 517-525, 1994.

MOY S; KNAPP D.J, CRISWELL H.E, BREESE G.R. Fumazenil blockade of anxiety following ethanol withdrawal in rats. Psychopharmacology (Berlin), 131: 354–360, 1997.

NARDI, A.E.; FIGUEIRA, I.; VERSIANI, M. Transtorno de ansiedade generalizada. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. Transtornos de ansiedade. São Paulo: Ed. Científica Nacional Ltda. p.336-338, 1997.

NARITA, M.; KANEKO, C.; MIYOSHI, K.; NAGUMO, Y.; KUZUMAKI, N.; NAKAJIMA, M.; NANJO K.; MATSUZAWA, K.; YAMAZAKI, M.; SUZUKI T. Chronic Pain Induces

Anxiety with Concomitant Changes Opioidergic Function in the Amygdala. *Neurops.* 31 p.739–750, 2006.

NASHOLD BS, OSTDAHL RH. Dorsal root entry zone lesions for Pain Relief. *J Neurosurg*; 51: 59-69, 1979.

NIEMINEN AL, GORES GJ, BOND JM, IMBERTI R, HERMAN B, AND LEMASTERS JJ. A novel cytotoxicity screening assay using a multiwell fluorescence scanner. *Toxicol Appl Pharmacol* 115:147–155, 1992.

NIC DHONNCHADHA, B. Á.; BOURIN, M.; HASCOËT, M. Anxiolytic-like effects of 5-HT₂ ligands on three mouse models of anxiety. *Behav. Brain Res.* 140. (1-2). p.203-214, 2003.

NOGUEIRA RL, GRAEFF FG. Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of aversion generated in the dorsal periaqueductal gray. *Pharmacol Biochem Behav* 52:1–6, 1995.

NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.L.M.; FORNARI,R.V.; COSTA, M.; PELÁ, I.R.; GRAEFF, F.G. Anxiety-induced antinocicepção in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. *Psychop.* 150,(3)p.300-310, 2000.

NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; RODGERS, R.J. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-1000635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. *Brain Res.* 927, p.87-96, 2002.

NUNES-DE-SOUZA, V.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; RODGERS, R. J.; CANTO-DE-SOUZA, A. 5-HT₂ receptor activation in the midbrain periaqueductal (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. *Behavioural Brain Research*, 187. 72-79, 2008.

NUTT D.J. The pharmacology of human anxiety. *Pharmacology and Therapeutics*, 47: 233-266, 1990.

OLIVEIRA L.C.; BROIZ, A.C.; MACEDO, C. E.; LANDEIRA-FERNANDEZ; BRANDÃO, M.L. 5-HT₂ receptor mechanisms of the dorsal periaqueductal gray in the conditioned and unconditioned fear in rats. *Psychop.* 191, p.253–262, 2007.

OLIVIER, B.; VAN WIJNGAARDEN I.; SOUDIJN W. 5-HT₃ receptor antagonists and anxiety; a preclinical and clinical review. *Europ. Neuropsychopharmacol.*, 10(2):77-95, 2000.

PARE D, QUIRK G.J, AND LEDOUX J.E. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiology* 92: 1-9, 2004.

PAVLOVIC, Z. W.; COOPER, M. L.; BODNAR, R. J. Opioid antagonists in the periaqueductal gray inhibit morphine and beta-endorphin analgesia elicited from the amygdala of rats. *Brain Res*, v. 741, n.1-2, p. 13-26, 1996.

PEIXOTO C.; BAPTISTA D.; CANTO-DE-SOUZA A. A antinocicepção induzida pelo medo em camundongos fêmeas é insensível ao tratamento com midazolam e sofre alterações durante o ciclo estral. In: XXIV FESBe , 2009, Águas de Lindóia.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosc. Meth.* 14, p.149-167, 1985.

PELLOW S, FILE SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: As novel test of anxiety in rat. *Pharmacology Biochemistry Behavioral*, 24: 525–529. 1986.

PESOLD C, TREIT D. The septum and amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Research*. 295-301, 1994.

PESOLD C, TREIT D. The septum and amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Research*, 638: 671, 213-221, 1995.

PEREIRA M.E.C. Mudanças no conceito de ansiedade. In: Hetem, LAB, Graeff FG. *Transtornos de Ansiedade*. São Paulo: Editora Científica Nacional Ltda, p. 13-47, 1997.

PITKÄNEN A, STEFANACCI L, FARB C.R, GO G.G, LEDOUX J.E, AND AMARAL D.G. Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the lateral nucleus. *J Comp Neural* 356: 288-310, 1995.

POKK, P.; ZHARKOVSKY, A.; The effects of flumazenil RO15-4513 and beta-CCM on the behaviour of control and stressed mice in the plus-maze test. *J Phys. Pharm.* 1 48. 253–261. 1997.

PRADO, W. A. Medicamentos analgésicos de ação central. In: GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. (Eds). *Fundamentos de Psicofarmacologia*, Atheneu: São Paulo, p.175-195, 1999.

PRADO, W. A. Medicamentos Analgésicos de Ação Central. In: GRAEFF, F. G; GUIMARÃES, F. S. Fundamentos de psicofarmacologia. São Paulo: Editora Atheneu., p. 175-195, 2005.

REIS, L. M.; CANTO-DE-SOUZA, A.. Intra-periaqueductal gray injections of midazolam fail to alter anxiety in plus-maze experienced mice. *Brain Res.* 1231, p.92-102, 2008.

REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science*, v.164, n.878, p.444-445, 1969.

REX A, MARSDEN C.A, FINK H. Effect of diazepam on cortical 5HT release and behaviour in the guinea pig on exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berlin)*, 110: 490–496. 1993.

REXED, B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 96:495-514, 1952.

RIZVI, T. A.; MURPHY, A.Z.; ENNIS, M.; BEHBEHANI, M. M.; SHIPLEY, M. T. Medial preoptic area afferents to periaqueductal gray medullo-output neurons: a combined Fos and tract tracing study. *J Neurosci.*, v. 16, n. 1, p.333-344, 1996.

RODGERS, R.J.; LEE, C.; SHEPHERD, J.K. Blockade of non-opioid analgesia in intruder mice by selective neuronal and non-neuronal benzodiazepine recognition site ligands. *Psychop.* 96, p. 45-54, 1988b.

RODGERS, R.J., COLE, J.C., COBAIN, M.R., DALY, P., DORAN, P.J., EELLS, J.R., WALLIS, P. Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS12066B, TFMPP a mCPP. *Behav Pharmacol*, 3, 621-634, 1992.

RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J.T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharm. Bioch. Behav.*, 52, p.297-303, 1995b.

RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J.T.; CARR, J.; HODGSON, T.P. Resistance of experientially-induced changes in murine plus-maze behaviour to altered retest conditions. *Beh. Brain Res.* 86, p.71-77, 1997b.

ROSA, V.P.; VANDRESSEN, N.; CALIXTO, A.V.; KOVALESKI, D.F.; FARIA, M.S. Temporal analysis of the rat's behavior in the plus-maze: effect of midazolam. *Pharm. Bioch. and Behav.* 67, p.177-182, 2000.

RUSSO A.S. GUIMARÃES FS, DE AGUIAR JC, GRAEFF FG. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal gray of rats in anxiety. *Psychopharmacology.* 401: 796-800, 1993.

RYLOV, A.L., 1985. Change of predatory interspecies aggression of males rats under food deprivation. *Zh Vyssh Nervn Deyat in I P Pavlova*, 35, 875-878.

SAH P, FABER E.S, LOPEZ D.A, POWER J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83: 803-834, 2003.

SAVIC´ M.M, OBRADOVIC D.I, UGRESVIC´ N.D, COOK J.M. Bidirectional effects of benzodiazepine binding site ligands in the passive avoidance task: differential antagonism by flumazenil and β -CCt. *Behavioral Brain Research*,158:293–300. 2004.

SALVIC´ M.M.; OBRADOVIC, D.I.; UGRESVIC´ N.D.; COOK, J.M. Benzodiazepine bindingsite inverse agonist and locomotor activity in rats: Bimodal and biphasic influence. *Pharm. Bioch. and Beh.* 84: p.35-42, 2006.

SANDFORD J.J, ARGYROPOULOS S.V, NUTT D.V. The psychobiology of anxiolytic drugs Part 1: basic neurobiology. *Pharmacology & Therapeutics*, 88: 197-212, 2000.

SIEGHART W & SPERK G. Subunit composition, distribution and function of GABAA receptor subtypes. *Curr. Top. Med Chem*; 2 795-816, 2002.

SIEGMUND E, CADMUS R, LU G. Method for the evaluation of both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proc Soc Exp Biol Med* 95: 728-729, 1957.

SHIMIDT-MUTTER, C.; PAIN, L.; SANDNER, G.; GOBAILLE, S.; MAITRE, M. The anxiolytic effect of γ -hidroxitutyrate, in elevated plus-maze is reversed by the benzodiazepine receptor antagonist flumazenil. *Eur. J. Pharm.* 342: p.21-27, 1998.

STEPHENS, D.N.; MELDRUM, B.S.; WEIDMANN, R.; SCHNEIDER, C.; GRUTZNER, M. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? *Psychop.* 90, p.166-169, 1986.

SUZUKI, R.; RAHAMAN, W.; HUNT, S.; DICKENSON, A. Descending facilitatory control of mechanically evoked responses is enhanced in deep dorsal horn neurons following peripheral nerve injury. *Brain Res.* 1019: p.68-76, 2004.

SYNDER, S.H. Opiates. In: *Drugs and the Brain*. New York, Scien. Amer. p. 28-59, 1986.

TABER, R.I. Predictive Value of Analgesic Assays in Mice and Rats. In: BRAUDE, M.C.; HARRIS, L.C.; MAY, I.L.; SMITH, J.P. e VILLAREUL, J.E. *Narc. Antag. Advanc. in Bioch. Pharm.* 8. Raven, New York, 1974.

TAUKULIS, H. K.; GOGGIN, C. E. Diazepam-stress interactions in the rat: effects on auto analgesia and a plus-maze model of anxiety. *Behavioral and neural biology*, v. 53,p. 216, 1990.

TERMAN, G. W.; SHAVIT, Y.; LEWIS, J. W.; CANNON, J. T.; LIEBESKIND, J. C. Intrinsic mechanisms of pain inhibition. Activation by stress. *Science*, v. 226, p. 1270-1277, 1984.

TESKEY, G.C.; KAVALIERS, M. Aggression, defeat and opioid activation in mice: Influences of social factors, sinze and territory. *Beh. Brain Res.* 23: p.77-84, 1995.

TEXEIRA, M.J. Fisiopatologia da dor aguda e crônica. In: *Texeira, Dor manual para o clínico*. São Paulo; Atheneu, p: 9-24, 2006.

THOMAS, H., FINK, H. SOHR, R., VOITS, M. Lesions of the median raphe nucleus : a combined behavioural and microdialysis study in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 65, 15-21, 1985.

TODD, A. J.; KOERBER, H.R. Neuroanatomical substrates of spinal nociception. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Eds). *WALL and MELZACK'S Textbook of pain*. 5th ed. Elsevier: Churchill Livingstone; p.3-34, 2006.

TSUCHIYA, T.; TAKEUCHI, T.; HAYASHIDA, K.; SHIMIZU, H.; ANDO, K. A.; TREIT, D., MENARD, J., ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 44, 463-469, 1993.

TYERS, M.B. A classification of opiate receptors that mediate antinociception in animals. *Br. J. Pharmacol.*, 69, p.503-512, 1980.

VAN DE KAR, L. D.; BLAIR, M. L. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol*, v. 20, p. 1-48, 1999.

VANDERWENDE, C.; MARGOLIN, S. Analgesic tests based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. *Fed. Proc.*, 15, p.494, 1956.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H-G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res. Rev.* 46: p.295-309, 2004.

VENDRUSCOLO, L. F.; PAMPLONA, F.A.; TAKAHASHI, R. N. Strain and sex differences in the expression of nociceptive behavior and stress-induced analgesia in rats. *Brain Res.*, 1030, n. 2, p. 277-283, 2004.

YANG, M., FARROKHI, C., VASCONCELLOS, A., BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, C. Central Infusion of ovine CRF (oCRF) potentiates defensive behaviors in CD-1 mice in the Mouse Defense Test Battery (MDTB). *Behavioral Brain Research.*, 171, 1-8, 2006.

YANG, M., AUGUSTSSON, H., MARKHAM, M.C., HUBBARD, D.T., WEBSTER, D., WALL, M.P., BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, C.C. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. *Physiology & Behavior.*, 81, 465-473, 2004.

WADA T, FUKUDA N. Effects of DN-2327, a new anxiolytic, diazepam and buspirone on exploratory activity i the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berlin)*, 104: 444–450. 1991.

WATKINS, L. R.; MAYER, D. J. Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems. *Science*, v. 216, p. 1185-1192, 1982.

WILLIS, W.D.; KENSHALO, D.R.; LEONARD, R.B. The cells of origin of the primate spinothalamic tract. *J. Comp. Neurol.*, 188, p.543-574, 1979.

WISDEN, W. The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat. telencephalon, diencephalon. *J. Neurosci* 12, 1040-1062, 1992.

WUENSCH, K.L. Fostering house mouse onto rats and deer mice. Effects on response to species odors. *Anim Learn Behavior.*, 20 : 253-258, 1992.

ZAHM, D. S.; JENSEN, S. L.; WILLIAMS, E. S.; MARTIN III, J. R. Direct comparison of projections from the central amygdaloid region and nucleus accumbens shell. *Eur J Neurosci.*, v. 11; n. 4; p. 1119-1126, 1999.

ZANGROSSI H J.R, GRAEFF F.G, VIANA B.M. Anxiolytic effect of intra amygdala injection of midazolam and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in the elevated T-maze. *Pharmacology Biochemistry Behavioral*, 1999.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F.G. Modelos Animais. In: HETEM, L. A. B; GRAEFF, F. G. Transtornos de ansiedade. São Paulo: Editora Atheneu, p.55-74, 2004.