**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO**

LUIZ LUCIANO FALCONI SOBRINHO

**Influência dos receptores NMDA e de vias glutamatérgicas do córtex cingulado anterior
na modulação do comportamento de defesa e da antinocicepção induzida pelo medo
evocados por doador de óxido nítrico microinjetado no hipotálamo anterior**

**Ribeirão Preto-SP
2019**

LUIZ LUCIANO FALCONI SOBRINHO

Influência dos receptores NMDA e de vias glutamatérgicas do córtex cingulado anterior na modulação do comportamento de defesa e da antinocicepção induzida pelo medo evocados por doador de óxido nítrico microinjetado no hipotálamo anterior

Versão Original

Tese apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Neurologia

Subárea: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Ribeirão Preto-SP
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

FICHA CATALOGRÁFICA

FALCONI-SOBRINHO, L.L.

Influência dos receptores NMDA e de vias glutamatérgicas do córtex cingulado anterior na modulação do comportamento de defesa e da antinocicepção induzida pelo medo evocados por doador de óxido nítrico microinjetado no hipotálamo anterior. Ribeirão Preto, 2019.

135 f.

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Coimbra, Norberto Cysne

1. Córtex cingulado anterior. 2. Hipotálamo. 3. Comportamento de defesa. 4. Antinocicepção. 5. Vias glutamatérgicas. 6. Óxido nítrico.

Nome: FALCONI-SOBRINHO, L.L.

TÍTULO: Influência dos receptores NMDA e de vias glutamatérgicas do córtex cingulado anterior na modulação do comportamento de defesa e da antinocicepção induzida pelo medo evocados por doador de óxido nítrico microinjetado no hipotálamo anterior

Tese apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Saúde – Neurologia.

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento _____	Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra, meu mestre e amigo, por me conferir a oportunidade de fazer parte de sua equipe de pesquisa, na qual vivenciei os melhores momentos de minha carreira. Durante esses anos de aprendizado, tive o privilégio de compartilhar de seus conhecimentos científicos e de vida, principalmente, em nossas conversas ao final de cada dia. Espero, que possamos perpetuar nossa parceria profissional e a amizade.

Aos meus amigos de laboratório (Asmat, Audrey, Camila, Farhad, Guilherme, Ivair, Joyce, Juliana, Marcelo, Priscila, Rafael, Raimundo, Rebecca, Renato, Rithiele, Tatiana Maurin, Tati Felippotti e Yara) que de alguma forma fizeram parte de minha trajetória acadêmica.

Ao meu grande amigo Ricardo, pelo companheirismo e por ter me auxiliado nas primeiras etapas da minha vida acadêmica. Nossa amizade, que alcançou os vinte anos, será eterna.

Ao meu amigo Tayllon, vulgo Guaxupé que, entre aulas, conversas científicas, congressos e publicações, tornou-se o meu maior parceiro de pesquisa. Desenvolvemos juntos nosso conhecimento científico e, não menos importante, uma amizade sincera.

Aos técnicos de laboratório (Daoud, Eleni, Tadeu e Vani), pelo apoio nos procedimentos morfológicos.

Em especial:

À minha querida mãe Elisabeth, que jamais mediu esforços para me ajudar e, com o seu amor incondicional, foi imprescindível para a realização dessa importante etapa da minha vida. Tudo o que sou devo a você, minha mãe. Ao meu pai, que sempre me apoiou e garantiu todo o suporte para a minha formação. À minha namorada e companheira Ana, por compreender que cientista não tem horário, por me incentivar e sempre acreditar no sucesso de meu trabalho. Amo todos vocês.

Ao CNPq e a FAPESP, pelo suporte financeiro.

RESUMO

FALCONI-SOBRINHO, L.L. Influência dos receptores NMDA e de vias glutamatérgicas do córtex cingulado anterior na modulação do comportamento de defesa e da antinocicepção induzida pelo medo evocados por doador de óxido nítrico microinjetado no hipotálamo anterior. 2019. 135. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Tem sido estabelecido que um desequilíbrio excitatório no hipotálamo de roedores, causado por estimulação química local, provoca respostas defensivas relacionadas com o medo, como reações de fuga e de “congelamento”, e antinocicepção. No entanto, há uma escassez de estudos mostrando a participação do núcleo hipotalâmico anterior (HA) na geração dessas respostas defensivas. Há evidências de que doadores de óxido nítrico (NO), quando microinjetados em estruturas límbicas e paralímbicas, podem evocar respostas defensivas relacionadas com o medo, e essa neuromodulação nitrérgica envolvida na geração do medo pode ser mediada pelo sistema glutamatérgico. Além disso, recentes estudos realizados por nossa equipe demonstraram que respostas comportamentais e antinociceptivas organizadas no hipotálamo posterior podem ser moduladas por neurônios glutamatérgicos do córtex “pré-frontal” medial, como aqueles localizados no córtex cingulado anterior (CCA). No entanto, faltam estudos que demonstrem a participação do CCA no controle de respostas defensivas relacionadas com o medo incondicionado, organizadas pelo HA. Para investigar a influência do sistema glutamatérgico nos mecanismos nitrérgicos que geram as respostas defensivas relacionadas com o medo organizadas por neurônios do HA, o presente estudo avaliou os efeitos do doador de NO SIN-1 administrado no HA de camundongos em diferentes doses (75, 150 e 300 nmol/0,1 µL). Em seguida, investigamos os efeitos do pré-tratamento no HA com o AP-7, um antagonista seletivo de receptores do tipo NMDA, nas doses de 0,02, 0,2 e 2,0 nmol/0,1 µL, sobre os efeitos comportamentais e antinociceptivos evocados pela administração intra-HA de SIN-1. Além disso, para compreender melhor a mediação cortical das respostas defensivas organizadas no hipotálamo, foram realizados estudos morfológicos para revelar vias glutamatérgicas que conectem o CCA ao HA, e abordagens farmacológicas para investigar os efeitos da ativação de neurônios do CCA por microinjeções intra-Cg1 de NMDA em diferentes doses (0,1, 1,0 e 10 nmol). Nossos dados demonstraram que a dose de 300 nmol de SIN-1 foi a mais efetiva em causar comportamentos defensivos do tipo pânico, os quais foram seguidos por antinocicepção. Além disso, os comportamentos de defesa e a antinocicepção induzidos por SIN-1, foram inibidos pelo pré-tratamento do HA com AP-7, sugerindo que os efeitos panicogênicos e antinociceptivos evocados por microinjeções intra-HA de SIN-1 dependem da ativação do receptor NMDA. No estudo morfológico, microinjeções de um neurotraçador no Cg1 revelaram fibras axônicas marcadas com vesículas sinápticas glutamatérgicas no pericário do HA. E, por fim, a ativação do CCA com NMDA aumentou o comportamento de fuga não orientada e reduziu o “congelamento” e a antinocicepção organizados por neurônios do HA, sugerindo que vias glutamatérgicas do CCA modulam as reações defensivas do tipo pânico organizadas por neurônios do HA, e sua ativação promove pronocicepção.

Palavras-chave: Antinocicepção induzida pelo medo. Comportamento de defesa. Córtex cingulado anterior. Hipotálamo anterior. Receptores NMDA. Óxido nítrico.

ABSTRACT

FALCONI-SOBRINHO, L. L. **Influence of NMDA receptors and glutamatergic pathways from anterior cingulate cortex in the modulation of defensive behaviour and fear-induced antinociception evoked by nitric oxide donor microinjected into the anterior hypothalamus.** 2019. 135f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

It has been established that an excitatory imbalance in the hypothalamus of rodents caused by local chemical stimulation provokes fear-related defensive responses, such as escape and freezing reactions, and antinociception. However, there is a shortage of studies showing the participation of the anterior hypothalamic (AH) nucleus in the generation of these defensive responses. There is evidence that nitric oxide (NO) donors, when microinjected into limbic and paralimbic structures, may evoke fear-related defensive responses, and that nitrgic neuromodulation involved in genesis of fear can be mediated by the glutamatergic system. In addition, recent studies performed by our team have demonstrated that behavioural and antinociceptive responses organised in the posterior hypothalamus can be modulated by glutamatergic neurons of the medial “prefrontal” cortex, such as those located in the anterior cingulate cortex (ACC). However, there is a lack of studies showing the participation of the ACC in the control of unconditioned fear-related defensive responses organised in the AH. To investigate the influence of the glutamatergic system on the nitrgic mechanisms that generate the fear-related defensive responses organised by AH neurons, the present study investigated the effects of the NO donor SIN-1 administered in the AH of mice at different doses (75, 150 and 300 nmol/0.1 µL). Then, we investigated the effects of AH pretreatment with the NMDA receptor selective antagonist AP-7 at different doses (0.02, 0.2 and 2.0 nmol/0.1) on behavioural and antinociceptive effects evoked by the intra-AH administration of SIN-1. In addition, to better understand cortical mediation of defensive responses organised by hypothalamic neurons, morphological studies have been performed to reveal glutamatergic pathways that connect ACC to AH and, through pharmacological approaches, to investigate the effects of ACC neurons activation by intra-Cg1 microinjections of NMDA at different doses (0.1, 1.0 and 10 nmol). Our findings demonstrated that the highest dose (300 nmol) of SIN-1 was the most effective in causing panic-like defensive behaviours, which were followed by antinociception. In addition, the SIN-1-induced antinociception and defensive behaviours were inhibited by pretreatment of AH with AP-7, suggesting that the panicogenic and antinociceptive effects evoked by intra-AH microinjections of SIN-1 depend on the activation of NMDA receptor. In the morphological study, microinjections of a neurotracer in the Cg1 of the ACC revealed axonal fibres labelled with glutamatergic synaptic vesicles in the AH perikarya. Finally, the activation of ACC neurons increased the non-oriented escape behaviour, and reduced the freezing and antinociception organised by HA neurons, suggesting that glutamatergic pathways of the ACC modulate panic-like defensive reactions organised by AH neurons, and its activation promotes pronociception.

Keywords: Antinociception induced by fear. Anterior cingulate cortex. Defensive behaviour. Anterior hypothalamus. NMDA receptors. Nitric oxide.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
AP	ântero-posterior
BDA	amina dextrana
CA ²⁺	cálcio
CCA	córtex cingulado anterior
CDME	corno dorsal da medula espinal
Cg1	região do córtex cingulado anterior
CI	colículo inferior
Cl ⁻	cloreto
CoCl ₂	cloreto de cobalto
CRF	fator de liberação de corticotropina
CRFr1	fator de liberação de corticotropina tipo 1 (CRFr1)
CPFM	córtex “pré-frontal” medial
CS	colículo superior
DL-AP-7 ou AP-7	ácido DL-2-amino-7-fosfono-heptanoico
dmHVM	divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial
DV	dorsoventral
EPM	erro padrão da média
<i>FPS</i>	<i>fear-potentiated startle</i>
GABA _A	receptor do ácido gama-aminobutírico, do tipo A
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
HA	hipotálamo anterior
HM	hipotálamo medial
HVM	hipotálamo ventromedial
HDM	hipotálamo dorsomedial
HL	hipotálamo lateral
HP	hipotálamo posterior
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
K ⁺	potássio
LB	linha de base
LC	<i>locus coeruleus</i>

L-GLU	glutamato
LRC	limiar de retirada de cauda
mGluR	receptores metabotrópicos
min	minuto
ML	médio lateral
NaCl	cloreto de sódio
NDR	núcleo dorsal da rafe
NMDA	(N-metil-D-aspartato)
nmol	nanomol
NO	óxido nítrico
NOC-9	6-(2-Hidroxi-1-metil-2-nitroso-hidrazina)-N-metil-1-hexanamina
NOS	enzima de síntese de óxido nítrico
NOSn	enzima de síntese de óxido nítrico neuronal
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>PBS</i>	<i>phosphate-buffered saline</i>
PMd	núcleo pré-mamilar dorsal
Sal	salina fisiológica
SCP	substância cinzenta periaquedutal
SCPd	substância cinzenta periaquedutal dorsal
SCPv	substância cinzenta periaquedutal ventral
sGC	enzima guanilato ciclase solúvel
SIN-1	metabólito ativo da molsidomina
SNC	sistema nervoso central
TP	transtorno do pânico
VGluT2	transportador vesicular de glutamato
μL	microlitro

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Transtorno do Pânico.....	13
1.2 Comportamento defensivo e o hipotálamo.....	14
1.3 Antinocicepção induzida pelo medo	19
1.3.1 Vias ascendentes da dor	20
1.3.2 Vias descendentes da dor	23
1.4 Sistemas glutamatérgico e o nitrérgico.....	26
1.4.1 Glutamato/receptores NMDA	26
1.4.2 Óxido Nítrico.....	28
1.5 Córtex Cingulado Anterior.....	30
1.6 Hipótese.....	34
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Aprovação ética.....	38
3.2 Animais	38
3.3 Procedimentos experimentais	38
3.3.1 Experimento 1: microinjeção do doador de NO SIN-1 no hipotálamo anterior.....	38
3.3.2 Experimento 2: pré-tratamento do hipotálamo anterior com o antagonista dos receptores de NMDA	39
3.3.3 Experimento 3: microinjeção do agonista dos receptores de NMDA no CCA	40
3.3.4 Experimento 4: Neurotraçamento de vias que conectam o córtex cingulado anterior ao hipotálamo anterior.....	40
3.4 Análise experimental.....	42
3.4.1 Avaliação comportamental.....	42
3.4.1 Mensuração do limiar nociceptivo	43
3.5 Drogas	44
3.6 Histologia	44
3.7 Análise estatística	45
4 RESULTADOS	33
4.1 Experimento 1	47
4.1.1 Localização dos sítios de microinjeção	47
4.1.2 Efeitos das doses crescentes do doador de óxido nítrico SIN-1 microinjetado no hipotálamo anterior sobre as respostas defensivas relacionadas com o medo	47
4.2 Experimento 2	51

4.2.1 Localização dos sítios de microinjeção	51
4.2.2 Efeitos do pré-tratamento no hipotálamo anterior com AP-7 sobre o comportamento de defesa e a antinocicepção induzida pelo medo, evocados por microinjeções intra-HA de SIN-1	51
4.3 Experimento 3	56
4.3.1 Localização dos sítios de microinjeção	56
4.3.2 Efeitos da ativação do córtex cingulado anterior com doses crescentes de NMDA sobre as respostas defensivas relacionadas com o medo, evocadas por microinjeções de SIN-1 no hipotálamo anterior.....	56
4.4 Experimento 4	61
4.4.1 Neurotraçamento de vias que conectam o cortex cingulado anterior ao hipotálamo anterior	61
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXO	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transtorno do Pânico

Com o transcorrer da evolução, aumentou a pressão do ambiente sobre as espécies, incitando entre elas, uma competição pela sobrevivência. É concebível que, na medida em que cresce a complexidade do ambiente, aumenta a necessidade de cada ser vivo implementar novas estratégias comportamentais que favoreçam a sua própria integridade e a conservação da espécie. Nesse processo evolutivo e competitivo, os sistemas neurais, então, passam a ter um papel fundamental para a sobrevivência das espécies, proporcionando a elas maior capacidade adaptativa. Nesse contexto, cresce o repertório comportamental das espécies, surgindo padrões reacionais defensivos de aproximação ou de retirada frente aos diferentes estímulos aversivos (ALCOCK, 2011; FANSELOW, 1994). Porém, em nossa espécie, alguns desses estímulos aversivos parecem não ter uma finalidade positiva, ocasionando o surgimento de transtornos psiquiátricos, como a ansiedade, a qual impede o indivíduo de se adaptar a determinados tipos de ambientes e situações. Segundo Yerkes e Dodson (1908), a ansiedade é considerada essencial para a sobrevivência, uma vez que pode evitar possíveis danos ao organismo em situações de perigo, inclusive, promovendo uma melhora no desempenho do indivíduo em atividades motoras e cognitivas. Porém, esse aumento no desempenho, tem um teto, e a partir de certa intensidade, a ansiedade não aumenta mais a performance, passando a ser prejudicial ao indivíduo. Nesse momento, surgem os transtornos de ansiedade que estão entre os distúrbios psiquiátricos mais prevalentes na população global. Novos dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que a ansiedade atinge cerca de 3,6 da população mundial. No continente americano esse transtorno psiquiátrico alcança maiores proporções e atinge cerca de 5,6% da população, com destaque para o Brasil, no qual a ansiedade está presente em 9,3% da população, o maior número de casos de ansiedade entre todos os países do mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Dentre os diferentes tipos de transtornos de ansiedade, destacamos o de pânico, conhecido como “síndrome do pânico”, que previamente recebeu diferentes terminologias, como, por exemplo, a “síndrome da Costa” ou “síndrome do coração irritável”, denominados por Jacob Mendes da Costa (1871), após ter observado sintomas clínicos, como palpitação e dor torácica, em soldados durante a guerra (WOOLEY, 1982); a “síndrome do esforço”, a qual representava a resposta forçada de um indivíduo exposto ao esforço físico moderado (NIXON, 1993); a “astenia neurocirculatória”, proposta por Oppenheimer em 1918, o que denotava um quadro clínico caracterizado por dispneia, palpitação, dores no peito e de cabeça, tontura e “nervosismo” (OPPENHEIMER, 1942) e o

termo anteriormente mais reconhecido, a “neurose de ansiedade”, proposto por Sigmund Freud (1894), atribuída por o indivíduo apresentar “ataques de ansiedade” (VIANA, 2010).

Atualmente, o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais DSM-V da Associação Psiquiátrica Americana (2013) define o transtorno de pânico (TP) como um transtorno de ansiedade, caracterizado por ataques de pânico, definidos como episódios recorrentes e inesperados de medo, terror, desconforto ou apreensão intensos geralmente associados a um sentimento de morte ou de perigo iminente com uma necessidade imediata de fuga daquela dada situação. Durante esses ataques, o indivíduo pode apresentar sintomas, tais como falta de ar, palpitações, tremores, sudorese, calafrios ou ondas de calor e parestesias, dor ou desconforto torácico, asfixia ou sufocação e medo de morte ou de enlouquecer ou, ainda, de perder o autocontrole. Comumente, o indivíduo com TP apresenta agorafobia, que é o medo de lugares ou situações em que ele possa sentir-se desprotegido ou dos quais não possa evadir-se com facilidade, como, por exemplo, estar em espaços abertos, estar em lugares fechados ou estar entre uma multidão. Essas situações quase sempre induzem medo ou ansiedade e com frequência são evitadas por indivíduos com pânico. Na população em geral dos Estados Unidos e em vários países europeus, a estimativa para o TP é de 2 a 3%, ao passo que, em países latino-americanos a taxa de incidência é menor, 0,1 a 0,8%. Porém, os índices epidemiológicos aumentam quando assinalamos apenas indivíduos que experimentaram um ataque de pânico, 11,2% da população americana, números que não parecem diferir significativamente da população latino-americana.

Diante desses dados preocupantes, é fato que o TP pode ser considerado um problema de saúde pública, o que justifica a importância de estudos que oportunizem um maior entendimento acerca dessa doença.

1.2 Comportamento defensivo e o hipotálamo

O medo presente no TP pode ser considerado como um desencadeador do comportamento defensivo que representa uma parte inata do instinto de sobrevivência da espécie, onde o indivíduo protege-se contra situações aversivas e ameaçadoras. Nesse sentido, o estado emocional do medo é manifestado por meio de respostas adaptativas frente ao risco de perigo iminente ou potencial (MISSLIN, 2003; MOBBS et al., 2007). Apesar do perfil comportamental característico no TP ser exclusivamente humano, animais expostos a condições aversivas podem exibir reações comportamentais que são correlatas a um ataque de pânico

(CANTERAS; GRAEFF, 2014; COIMBRA et al., 2017; SCHENBERG et al., 2001). Em roedores, a presença de estímulos aversivos, tais como ambientes desconhecidos, a silhueta de predadores, expressões emocionais que indicam raiva e ameaça de ataque, odor ou ruídos de um predador, vocalizações ameaçadoras de animais que tenham adquirido significado de advertência por precederem consistentemente a ocorrência de estímulos nocivos e dolorosos, evoca um medo inato, caracterizado por uma variedade de respostas defensivas, como a esquiva inibitória (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; GRAY; MCNAUGHTON, 2000), o “congelamento”, um tipo de imobilidade defensiva (MCCLELLAND; COLMAN 1967, MARTINEZ et al., 2008, PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018), a imobilidade tônica (MENESCAL-de-OLIVEIRA; HOFFMANN, 1993; FERREIRA; MENESCAL-de-OLIVEIRA, 2009), e a fuga expressa por corrida e por saltos (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; ALMADA; COIMBRA, 2015). Ademais, essas respostas comportamentais defensivas relacionadas com o medo são acompanhadas de alterações neurovegetativas, tais como aumento da pressão arterial, taquicardia, taquipneia (KEIM; SHEKAR, 1996), piloereção, micção e defecção (SCHIMITEL et al., 2012; BLANCHARD; TAKAHASHI, 1988).

O conjunto dessas respostas defensivas desencadeadas por roedores quando analisadas, abre a possibilidade de compreender mais claramente as bases anatômicas e neuroquímicas envolvidas no processamento do medo. Para isso, modelos animais de medo vêm sendo utilizados por diversos grupos de pesquisa para o estudo dos mecanismos e dos substratos neurais que geram e regulam um ataque de pânico, como, por exemplo, modelos experimentais etológicos de medo baseado na interação presa *versus* predador, que permitem recriar uma situação ambiental de provável ocorrência real de aversão, para gerar nos roedores reações defensivas inatas desencadeadas pela ativação de diferentes estruturas límbicas (CANTERAS et al., 1997; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018). Os modelos experimentais etológicos baseados no confronto entre presa e predador, como roedor *versus* gato ou roedor *versus* serpente, permitem avaliar com mais especificidade a importância de estruturas que organizam o comportamento de defesa, haja vista a escolha da estratégia defensiva por roedores frente a ameaças reais ou potenciais que depende de alguns fatores críticos, como a natureza do estímulo, as características do ambiente, a existência ou não de uma rota de fuga, a distância do estímulo aversivo e a experiência prévia com esse estímulo (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; CANTERAS et al., 1997; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018; GRAY AND MCNAUGHTON, 2000).

Em situações onde o risco de perigo é potencial, o animal exhibe uma reação exploratória cautelosa, denominado de avaliação de risco (*risk assessment behaviour*). Nessas

situações, ocorrem comportamentos exploratórios cuidadosos, com posturas e movimentos corporais que possibilitam a aproximação e a avaliação da possível ameaça (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). Tais estratégias estariam relacionadas à ansiedade em seres humanos e moduladas pelo complexo amigdalóide e o sistema septo-hipocampal (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012). Já em situações onde a ameaça é distal, porém o perigo é real, a reação típica apresentada pelos roedores é de “congelamento” acompanhada por pelo menos duas das seguintes reações autonômicas: micção, defecção, piloereção e/ou exoftalmia (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). Os substratos neurais que compreendem tais reações, são o complexo amigdalóide e a substância cinzenta periaquedutal ventral (SCPv), as quais estão relacionadas com o medo (GRAEFF, 1981; GRAEFF; GUIMARÃES, 2012,). Por outro lado, em situações ameaçadoras onde o risco de perigo é proximal e real, o animal apresenta posturas e vocalizações ameaçadoras, além de poder optar pela fuga, a qual é modulada pela (SCPd), ou a luta defensiva, comportamento inerente ao hipotálamo. Essas reações se relacionam com raiva e pânico (ADAMS; 2006; BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; GRAEFF; GUIMARÃES, 2012). Além disso, outros estudos sugeriram que o hipotálamo também estaria estreitamente envolvido no processamento de respostas de fuga. Porém, os comportamentos de fuga relacionados ao medo incondicionado recrutados por neurônios hipotalâmicos, seriam desencadeados em situações de ameaça distal (GRAEFF, 2011; GRAY; MCNAUGHTON, 2000). Dessa maneira, as reações comportamentais defensivas exibidas por roedores, consideradas correlatas àquelas exibidas por um indivíduo que experimenta um ataque de pânico, recrutam neurônios hipotalâmicos e mesencefálicos.

O hipotálamo, uma das estruturas-alvo de nossa investigação, vem sendo considerado parte do substrato neural crítico para o estudo dos mecanismos que geram o ataque de pânico (SHEKHAR, 1994; SHEKHAR; DIMICCO, 1987; FALCONI-SOBRINHO et al., 2017a,b). Dentre os núcleos hipotalâmicos, o hipotálamo anterior (HA), a divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial (dmHVM) e o núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) formam o sistema defensivo hipotalâmico medial, descrito por Canteras em 2002. Esse autor sugeriu que esse circuito diencefálico, englobando redes neurais hipotalâmicas que traçam uma suposta trajetória do medo, participaria da elaboração dos estados aversivos relacionados com o medo eliciado pela presença de predadores. Por meio da exposição de presas a predadores, mais precisamente, experimentos que confrontavam ratos com um de seus predadores naturais, o gato, ou a exposição ao odor do predador, o Dr. Canteras e sua equipe observaram um aumento na expressão da proteína Fos, uma proteína sugestiva de ativação neuronal, na dmHVM, no PMd, assim como no HA. Corroborando esses achados, recentes estudos realizados por nosso grupo

de pesquisa demonstrou, por meio de técnicas imuno-histoquímicas para marcação da proteína Fos, uma ativação neuronal nesses mesmos núcleos hipotalâmicos, destacando-se o HA, de roedores após desencadearem comportamentos defensivos de fuga e de “congelamento” quando confrontados com serpentes, em um modelo experimental de medo incondicionado (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018). De fato, esses achados, quando tomados em conjunto, evidenciam que neurônios do HA estão envolvidos na organização de comportamentos defensivos antipredatórios (CANTERAS et al., 1997; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018), incluindo aqueles considerados do tipo pânico (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018). Apesar desses estudos evidenciarem o envolvimento do hipotálamo anterior, como sendo um gerador de comportamentos de defesa, há uma escassez de trabalhos demonstrando os mecanismos neuronais envolvidos na geração desses comportamentos defensivos e as características comportamentais organizados por neurônios localizados no HA, sobretudo aqueles evocados após a estimulação química desse mesmo núcleo hipotalâmico.

Além dos modelos experimentais etológicos de medo baseado na interação presa *versus* predador, os modelos animais de estimulação química de estruturas encefálicas, vêm sendo bastante utilizados para o estudo das reações emocionais relacionados com o medo, e permitem também avaliar com mais singularidade a participação de cada estrutura límbica ou paralímbica no controle do comportamento. Por exemplo, o bloqueio de receptores GABAérgicos por meio de microinjeções de bicuculina, um antagonista dos receptores GABA_A, seja em estruturas que integram o teto mesencefálico, como a substância cinzenta periaquedutal (SCP) e os corpos quadrigêmeos, formados pelos colículos superiores (CS) e inferiores (CI) (COIMBRA et al., 2006), seja em estruturas diencefálicas, como os núcleos hipotalâmicos medial (de FREITAS et al., 2014, di SCALA; SCHIMITT; KARLI, 1984), dorsomedial (BIAGIONI et al., 2013), ventromedial (dos ANJOS-GARCIA et al., 2017; FREITAS et al., 2009) e o posterior (FALCONI-SOBRINHO et al., 2017a,b; SHEKHAR; DiMICCO, 1987), evoca comportamentos defensivos do tipo pânico, por exercer um controle inibitório tônico sobre esses substratos neurais. de Freitas et al. (2014), demonstraram que a microinjeção de bicuculina no hipotálamo medial (HM) de ratos, evoca reações defensivas de fuga e de “congelamento”. Essas mesmas reações, que são consideradas comportamentos defensivos do tipo pânico (BORELLI et al., 2004; URIBE-MARIÑO et al., 2012), também foram observadas após microinjeções de bicuculina tanto no hipotálamo ventromedial (HVM) (FREITAS et al., 2009), quanto no hipotálamo dorsomedial (HDM) (BIAGIONI et al., 2013) de ratos. Por outro lado, estudos recentes realizados por nossa equipe (Falconi-Sobrinho et al., 2017a,b), demonstraram que ratos que receberam microinjeções do mesmo antagonista dos

receptores GABA_A, a bicuculina, no hipotálamo posterior (HP), apesar de desencadearem um número expressivo de reações de fuga, as quais foram expressas por saltos intercalados com corrida, não exibiram comportamentos de “congelamento”, sugerindo que neurônios GABAérgicos do HP são altamente recrutados e, predominantemente, elaboram comportamentos mais vigorosos, e relacionados com a atividade locomotora. Além das abordagens farmacológicas intra-hipotalâmicas promoverem efeitos variados sobre as respostas defensivas organizadas no HP (Falconi-Sobrinho et al., 2017a,b), e sobre aquelas elaboradas por neurônios localizados em núcleos hipotalâmicos mais mediais, há estudos que sugerem diferenças comportamentais elaboradas pelo hipotálamo daquelas organizadas por estruturas mesencefálicas, quando essas estruturas são estimuladas quimicamente. Os comportamentos defensivos do tipo pânico elicitados por estimulação química da SPC (COIMBRA et al., 2006; ULLAH et al., 2015, 2017) e do CI (da SILVA SOARES et al., 2019), com o aminoácido excitatório N-metil D-Aspartato (NMDA), têm sido descritos como explosivos e não direcionados, enquanto as respostas comportamentais eliciadas por núcleos hipotalâmicos caracterizam-se por um número expressivo de fuga, porém mais elaborada (dos ANJOS-GARCIA et al., 2017; FALCONI-SOBRINHO et al., 2017a,b; FREITAS et al., 2009; ULLAH et al., 2017). Por exemplo, os saltos evocados pela estimulação hipotalâmica são comumente verticais (FALCONI-SOBRINHO et al., 2017a,b), ou seja, direcionados para uma possível saída do ambiente aversivo, ao passo que aqueles elicitados por estimulação química de neurônios da SCP (COIMBRA et al., 2006) são caracterizados por saltos na horizontal. Além disso, Ullah et al. (2015), utilizando um aparato experimental (arena poligonal, a qual é provida de uma toca “*safe place*”) que permite discriminar os diferentes comportamentos de fuga, demonstraram que os ratos que receberam microinjeções de NMDA no HVM exibiram um comportamento de fuga orientada e direcionada para a toca, enquanto, aqueles animais que receberam microinjeções de NMDA na SCP desencadearam reações de fuga não orientada, mais “explosiva” e não direcionada para a toca. Nesse sentido, o envolvimento de estruturas do teto mesencefálico na geração e elaboração do medo pode ser crucial para a execução de respostas rápidas e eficientes de defesa; primeiramente, engajando o animal em um comportamento de fuga explosiva e, em seguida, após a ativação do hipotálamo, a elaboração de um comportamento mais organizado e direcionado para um local de abrigo (MCNALLY et al., 2004; COIMBRA et al., 2006; ULLAH et al., 2015).

Além de constituir-se um dos principais substratos neurais responsáveis pela geração de comportamentos defensivos, o hipotálamo encontra-se, ainda, diretamente

envolvido com o controle de processos nociceptivos, incluindo aqueles que estão relacionados com as emoções, como a antinocicepção induzida pelo medo.

1.3 Antinocicepção induzida pelo medo

É bem estabelecido na literatura que comportamentos defensivos, incluindo aqueles considerados do tipo pânico (COIMBRA et al., 2017), são acompanhados por uma resposta antinociceptiva induzida pelo medo, um fenômeno de supressão de dor também considerado uma resposta instintiva defensiva e adaptativa (BOLLES; FANSELOW, 1980; COIMBRA et al., 2017), que se torna essencial para a sobrevivência do animal quando este enfrenta uma situação aversiva, por exemplo, quando exposto à presença do predador, a um ambiente hostil ou à determinada circunstância de perigo, que seja indispensável evocar mecanismos de defesa, seja ele de fuga ou mesmo de dominância (COIMBRA et al., 2017).

Nesse sentido, se a resposta comportamental de defesa frente a situações aversivas abrange uma redução da sensibilidade a impulsos nociceptivos, ou seja, uma diminuição na percepção da dor, é procedente que o sistema de inibição de dor seja positivamente recrutado; caso contrário, o animal poderia adquirir, devido ao sofrimento, um comportamento de recuperação induzido pela dor, ao invés de exibir uma postura defensiva, induzida pelo medo, para preservação de sua integridade física.

Bolles e Fanselow (1980) sugeriram uma teoria para elucidar a relação entre o comportamento de medo e o de dor, denominado modelo perceptivo-defensivo-recuperativo. A fase recuperativa induzida pela dor seria responsável pelo restabelecimento do indivíduo que sofrera uma lesão, diferente da fase defensiva, onde ocorre a reação do estímulo aversivo seguida de antinocicepção. Dessa forma, diante da necessidade do indivíduo de se defender de um determinado estímulo nocivo, a dor não favorece a sua reação, tornando-se prejudicial ao desencadeamento de uma resposta de defesa, devendo, portanto, ser suprimida (BRANDÃO, 2012). Esse processo de supressão de dor relacionado com o medo é desencadeado por ativação de vias descendentes inibitórias de dor que se originam no córtex, no hipotálamo ou no teto mesencefálico, de onde se destaca a SCP, e terminam na medula espinal, bloqueando a transmissão dos estímulos nociceptivos pela via sensorio-discriminativa ascendente (AIMONE et al., 1988; BUTLER; FINN, 2009; MILLAN, 2002).

Para compreendemos melhor como se dá esse controle nociceptivo de cima para baixo por neurônios que integram o sistema modulatório descendente de dor, é essencial, que

reportemos o processo de condução ascendente do sinal nociceptivo, o qual se inicia na periferia, detectado por terminações livres e é conduzido para a medula espinhal a partir da qual alcança estruturas supraespinais.

1.3.1 Vias ascendentes da dor

A dor é referida como dor nociceptiva quando eliciada pela ativação de receptores sensoriais especializados, denominados de nociceptores (MILLAN, 1999). Após sua ativação por estímulos nocivos, os nociceptores transmitem impulsos nervosos da periferia para a medula espinhal por meio de fibras sensoriais nociceptivas, as quais, quando sensibilizadas, podem promover a liberação de diferentes mediadores químicos, como a bradicinina, histamina, serotonina, metabólitos do ácido araquidônico, ATP, adenosina, citocinas, aminoácidos excitatórios, substância P, neurotrofinas, opioides, somatostatina, acetilcolina, entre outros mediadores. Estes mediadores químicos interagem com nociceptores específicos culminando na propagação do sinal nociceptivo por alteração na permeabilidade da membrana da fibra nervosa, gerando o potencial de ação (FURST, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001).

As fibras nervosas dos neurônios sensitivos podem ser caracterizadas tanto por seus aspectos estruturais (mielinizadas ou não mielinizadas) quanto por sua responsividade a diferentes estímulos nocivos (mecânicos, térmicos e/ou químicos). As fibras A δ , possuem axônios finamente mielinizados, com o diâmetro de 1 a 5 μ m e velocidade de condução na faixa de 5 a 30 m/s e são ativadas por estímulos térmicos (42°C a 52°C) ou mecânicos intensos. Esse tipo de fibra de condução rápida está relacionado à dor inicial aguda, também chamada de primária (MILLAN, 1999). As fibras C, por sua vez, não mielinizadas e mais finas que as fibras A, têm uma condução mais lenta do impulso doloroso (0,5 a 2 m/s) e está relacionada à dor menos localizada, mais prolongada, do tipo crônica também reportada como secundária. Esse tipo de fibra polimodal responde a estímulos térmicos (45°C), mecânicos e químicos (MILLAN, 1999; MACHADO, 2000).

A sensação dolorosa (e de temperatura) dá-se principalmente através de duas vias, das quais os impulsos de dor chegam a estruturas supraespinais: uma via filogeneticamente mais recente, denominada de neoespinotalâmica (Figura 1), e outra filogeneticamente mais antiga, a paleoespinotalâmica, formadas pelo trato espinotalâmico lateral e o trato espinorreticulotalâmico, respectivamente.

Na via neoespinotalâmica, as fibras aferentes primárias penetram no neuroeixo pela divisão lateral da raiz dorsal do nervo espinal, bifurcam-se em dois ramos formando o fascículo dorso-lateral, terminando ambas na substância cinzenta do corno posterior da medula espinal, principalmente na lâmina I de Rexed, onde os neurônios secundários estão em sua grande maioria localizados (MILLAN, 2002; MACHADO, 2000).

As sinapses medulares ocorrem na substância cinzenta da medula espinal, a qual é dividida em dez lâminas, sendo que as lâminas de I a VI compõem o corno dorsal da medula espinal. Os corpos celulares secundários localizam-se na lâmina I (zona marginal), lâmina II (substância gelatinosa) e V (camada profunda) (ALMEIDA et al., 2004). As fibras finas do neurônio sensitivo primário geralmente terminam nas camadas mais superficiais e as fibras mais grossas na camada mais profunda (WILLIS; WESTLUND, 1997; MILLAN, 2002). As fibras A δ fazem sinapse com neurônios secundários das lâminas I, II e V, ao passo que as fibras C, fazem sinapse com neurônios da lâmina II (BESSON; CHAOUCH, 1987; RIEDEL; NEECK, 2001). Esse último tipo de fibra é característico da via paleoespinotalâmica.

Os neurônios secundários na via neoespinotalâmica cruzam o plano mediano, alcançam o funículo lateral do lado oposto, inflectem-se cranialmente, constituindo o trato espino-talâmico lateral. Em nível de bulbo, as fibras desse trato se unem com as do trato espino-talâmico anterior para constituir o lemnisco espinhal, que termina no tálamo dorsal fazendo sinapse com os neurônios terciários que, por sua vez, enviam os impulsos à área somestésica do córtex cerebral (MACHADO, 2000).

Na via paleoespinotalâmica, as fibras aferentes primárias penetram na medula espinal, semelhantemente à via neoespinotalâmica. Neurônios secundários localizam-se principalmente na lâmina V de Rexed, dirigem-se ao funículo lateral do mesmo lado e do lado oposto, inflectem-se cranialmente para constituir o trato espinorreticular que, por sua vez, juntamente com o trato espino-talâmico lateral, ascendem à medula espinal até fazerem sinapses como neurônios terciários em vários níveis da formação reticular e também com os núcleos intralaminares do tálamo dorsal e, em seguida, dirigem-se para o córtex cerebral somestésico (MACHADO, 2000).

Outra via ascendente de dor conhecida é a espino-mesencefálica, a qual se projeta diretamente da medula espinal ao mesencéfalo (HYLDEN et al., 1985), incluindo a formação reticular mesencefálica e a substância cinzenta periaquedutal.

Considerando o componente trigeminal do sistema ântero-lateral, o primeiro neurônio encontra-se no gânglio semilunar de Gasser, projetando-se para o núcleo espinal do nervo trigêmeo, cujos neurônios secundários cruzam o plano mediano, formando o lemnisco

trigeminal, que se destina ao núcleo arqueado (núcleo ventral pósteromedial) do tálamo dorsal, cujos neurônios terciários projetam-se para o terço inferior do giro pós-central do neocórtex por meio da *corona radiata* (MACHADO, 2000).

Figura 1. Representação esquemática da via espinotalâmica, envolvida na percepção de dor (e temperatura). Os neurônios aferentes primários (constituídos pelo ramo periférico e pelo ramo central) fazem conexão com o segundo neurônio no corno dorsal da medula espinal (em nível lombar e cervical) que, por sua vez, envia projeções para o núcleo ventral pósterolateral do tálamo dorsal que se conecta com o córtex somatossensorial, sendo, assim, processado o estímulo nociceptivo em dor (PURVES et al., 2001).

1.3.2 Vias descendentes da dor

O processo antinociceptivo tem sido caracterizado pela inibição da propagação dos potenciais de ação gerados por estímulos nociceptivos periféricos, por exemplo, no corno dorsal da medula espinal (CDME). Estruturas supraespinais, como a SCP, o núcleo magno da rafe, o núcleo gigantocelular, o núcleo paragigantocelular, parte alfa, e o núcleo paragigantocelular lateral vêm sendo sugeridas como importantes regiões envolvidas na modulação da dor, em virtude de suas projeções diretas ao CDME (BASBAUM; FIELDS, 1984). A SCP foi umas das primeiras regiões a serem exploradas nesse sentido (REYNOLDS, 1969; RHODES, 1979). Evidências mostram que processos antinociceptivos podem ser gerados em todas as regiões da SCP (RHODES, 1979). Alguns pesquisadores apontam a região ventro-lateral da SCP, como sendo a mais efetiva em produzir antinocicepção (GEBHART; TOLEIKIS, 1978), ao lado de sítios localizados nas colunas dorsomedial e dorsolateral (COIMBRA; BRANDÃO, 1993; 1997). Nesse sentido, alguns trabalhos mostraram que a estimulação elétrica da SCP promovia antinocicepção que fora precedida por reações comportamentais de fuga explosiva (FARDIN et al., 1984; LOVICK, 1990).

Não obstante, outras estruturas não menos importantes, localizadas no tronco encefálico, como o *locus coeruleus* (LC) e o núcleo dorsal da rafe (NDR), vêm sendo sugeridas como regiões participativas no controle descendente inibitório da dor (BASBAUM; FIELDS, 1984).

Estudos neuroanatômicos, realizados através do neurotraçamento retrógrado no CDME, mostraram projeções noradrenérgicas provenientes do LC (KWIAT; BASBAUM, 1992), as quais modulam a entrada do impulso nociceptivo no neuroeixo, através de suas conexões descendentes com os interneurônios opióides, presentes nas proximidades da primeira sinapse da via ascendente (MILLAN, 2002).

Outros estudos mostraram que abordagens farmacológicas do NDR com antagonistas 5HT₂ diminuíram a resposta antinociceptiva induzida pelo medo (BIAGIONI et al., 2013). Essa região mesencefálica se projeta para o núcleo magno da rafe, pelo qual fibras serotoninérgicas descendem para a substância gelatinosa do CDME. Essas vias podem se projetar sobre interneurônios que, por sua vez, hiperpolarizam os neurônios responsáveis pela transmissão da mensagem nociceptiva no CDME (BASBAUM; FIELDS, 1984).

A participação de outras estruturas supraespinais, como o córtex cerebral, o tálamo e o hipotálamo no processo modulatório da dor também tem sido alvo de estudos realizados por vários grupos de pesquisa. Embora essas estruturas mais rostrais sejam frequentemente mais

estimuladas, há evidências de que a antinocicepção produzida nessas regiões é transmitida via SCP (RHODES, 1979). Além da SCP receber projeções do córtex somatossensorial, do córtex límbico e do hipotálamo, outras estruturas do bulbo rostral e ponte, como os núcleos da rafe e o *LC* podem também agir como um relé para projeções descendentes modulatórias de dor antes de alcançar o CDME. Os efeitos antinociceptivos ocorrem por meio da interface de cada um desses núcleos com o CDME (PURVES et al., 2001), conforme mostrado na figura 2.

Na década de 80, trabalhos realizados por Aimone e Gebhart (1987; 1988), sugeriram que o hipotálamo lateral (HL) estaria envolvido com o sistema descendente de inibição de dor. Após estimularem eletricamente essa estrutura, os animais responderam com um aumento na latência de retirada de cauda (antinocicepção), aferida por meio do teste de retirada de cauda. Em outra abordagem na mesma estrutura, outros pesquisadores observaram que a estimulação elétrica do hipotálamo lateral causava antinocicepção, curiosamente, precedida por reações de salto (MAYER & LIEBESKIND, 1974), o que sugere uma antinocicepção que segue o comportamento defensivo de fuga.

Nosso grupo de pesquisa tem proposto que neurônios localizados em outros núcleos hipotalâmicos também estariam envolvidos na modulação descendente de processos nociceptivos, sobretudo aqueles relacionados com as emoções. Tanto o HM quanto o HP parecem recrutar neurônios mesencefálicos para a organização de pelo menos parte da antinocicepção induzida por respostas defensivas do tipo pânico, evocadas pela estimulação química de tais núcleos hipotalâmicos de roedores (BIAGIONI, SILVA; COIMBRA, 2012; FALCONI-SOBRINHO et al., 2017a,b). Apesar de neurônios localizados em diferentes divisões hipotalâmicas, como no HM, no HL e no HP, estarem envolvidos com a ativação de vias descendentes inibitórias de dor, há uma falta de estudos que investiguem a participação de neurônios hipotalâmicos mais rostrais, como aqueles localizados no HA, na organização de mecanismos de supressão da dor.

Figura 2. Representação esquemática do sistema descendente que modula a transmissão ascendente da informação nociceptiva. A via ascendente de percepção da dor (em azul) e a via descendente (em vermelho) encontram-se aqui representadas. Na via ascendente espinotalâmica, o neurônio aferente primário se conecta com o segundo neurônio no corno posterior da medula espinhal, enviando projeções para o núcleo ventral póstero-lateral do tálamo e, posteriormente, ao córtex somatossensorial, regiões na quais é processada a dor. A via descendente, proveniente do córtex somatossensorial, córtex límbico e/ou do hipotálamo, projeta-se para a substância cinzenta periaquedutal, para os núcleos da rafe, e para outros núcleos da medula oblonga rostro-ventral e ponte. Os efeitos antinociceptivos ocorrem por meio da interface de cada um desses núcleos com o corno dorsal da medula espinhal (PURVES et al., 2001).

1.4 Sistemas glutamatérgico e o nitrérgico

Atualmente, vem sendo investigado o papel de diferentes neurotransmissores e neuromoduladores excitatórios na mediação de respostas defensivas relacionadas com o medo, como em reações comportamentais defensivas e na antinocicepção induzida pelo medo (FALCONI-SOBRINHO et al., 2017a,b; de FREITAS et al, 2014, MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006). Dentre eles destacam-se o glutamato (L-GLU), o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos (FLECK et al., 1993; KHODOROV, 2004), encontrado em grandes concentrações no cérebro (LAURENCE et al., 2012), e o óxido nítrico (NO), um gás solúvel, sintetizado por diferentes células, incluindo as neurônicas (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; KNOWLES; MONCADA, 1994).

1.4.1 Glutamato/receptores NMDA

O glutamato comporta duas famílias de receptores glutamatérgicos: os receptores metabotrópicos (mGluR) e os ionotrópicos (HOLLMANN; HEINEMANN 1994; KEMP & MCKERNAN 2002; JINGAMI et al., 2003). Os receptores ionotrópicos consistem no AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico), no cainato e no NMDA (N-metil-D-aspartato) (HOLLMANN & HEINEMANN 1994; KEMP & MCKERNAN 2002), esse último, objeto de nosso estudo.

Quando um receptor ionotrópico é ativado, abre-se um canal que permite a entrada, na célula, de íons Na^+ , K^+ , ou Cl^- . Precedente à ligação com seus receptores, o glutamato é sintetizado através de duas vias: uma delas ocorre a partir do α -cetoglutarato, formado no ciclo de Krebs, onde a esse composto é adicionado um grupamento amino oriundo de outros aminoácidos através de enzimas transaminases, ou seja, é transaminado em glutamato, e a outra via de síntese glutamatérgica depende da glutamina. O glutamato é desaminado para gerar glutamina, pela ação da enzima glutamina sintetase que converte o glutamato em glutamina, a qual é reciclada para nova conversão em glutamato (HASSEL; DINGLELINE et al., 2006).

A liberação de glutamato pode ocorrer tanto por células neuroniais, quanto por células gliais (SUDHOF, 2004). O glutamato é liberado por exocitose das vesículas através de mecanismos dependentes de Ca^{2+} e, mediante a despolarização do neurônio pré-sináptico, o glutamato é liberado na fenda sináptica. Uma vez liberado na fenda sináptica, o glutamato ligar-se-á tanto nos seus receptores quanto nos seus transportadores. A ligação ao transportador conduzirá esse neurotransmissor a um processo de reciclagem, para que ele seja utilizado

novamente em resposta a um potencial de ação por um neurônio glutamatérgico e também regulará sua concentração no meio extracelular. Já a sua ligação aos receptores desencadeará cascatas intracelulares que se reproduzirão em respostas celulares. É importante mencionar que grande parte do glutamato que chega ao meio extracelular é de origem citoplasmática, ou seja, não vesicular, e esta liberação ocorre por mecanismos independentes do influxo de Ca^{2+} (SUDHOF, 1995).

Comumente, o término da ativação dos receptores glutamatérgicos ocorre através de recaptação, difusão do neurotransmissor para fora da fenda sináptica ou dessensibilização do receptor.

Há estudos demonstrando que a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA tanto no hipotálamo, quanto na SCP (ULLAH et al., 2015, 2017), por microinjeções de NMDA, evocam comportamentos defensivos do tipo pânico, expresso por reações de fuga e de “congelamento”. Por outro lado, o bloqueio desse tipo de receptor glutamatérgico, por microinjeções de antagonistas dos receptores NMDA, atenua os comportamentos defensivos organizados por neurônios localizados nessas mesmas estruturas (AGUIAR; GUIMARÃES, 2009; de FREITAS et al., 2014; FALCONI-SOBRINHO et al., 2017a). Além disso, outros trabalhos demonstraram que roedores que receberam microinjeções de NMDA no teto do mesencéfalo, mais precisamente na SCP (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006) e no CI (da SILVA SOARES-JR et al., 2019), além de exibirem comportamentos defensivos do tipo pânico, tiveram um aumento no limiar nociceptivo. Efeito oposto sobre a antinocicepção induzida pelo medo organizada por neurônios mesencefálicos, foi observado por Falconi-Sobrinho et al. (2017a), quando ratos receberam injeções de LY235959, um antagonista dos receptores de NMDA, no HP. De fato, esses achados tomados em conjunto, demonstram que a ativação do receptor de NMDA por administrações intra-hipotalâmicas ou intramesencefálicas de NMDA, causa um efeito pró-aversivo e antinociceptivo, e o bloqueio desse tipo de receptor glutamatérgico por antagonistas de NMDA, um efeito antiaversivo e pró-nociceptivo, por aumentar ou reduzir, respectivamente, a neurotransmissão glutamatérgica. A importância da atividade glutamatérgica, sobretudo de receptores do tipo NMDA, na modulação de respostas defensivas relacionadas com o medo, vai além, quando, consideramos sua interação com outros sistemas neuromodulatórios, como o nitrérgico.

1.4.2 Óxido Nítrico

O NO é responsável por uma variedade de fenômenos fisiológicos, sendo essencial para diferentes sistemas, inclusive para o SNC. Esse mediador gasoso, é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS), a partir da reação de biossíntese do aminoácido semiessencial L-arginina em L-citrulina (GARTHWAITE et al., 1989; GUIX et al., 2005). Existem três diferentes isoformas de NOS; a NOSe ou NOS do tipo III, identificada no endotélio vascular, a qual é expressa em resposta a liberação de acetilcolina, a NOSi ou NOS do tipo II, uma forma da enzima induzida pelo estímulo imunológico e inflamatório, desencadeados pela ativação de citocinas, macrófagos e hepatócitos e, por fim, aquela encontrada nas células neuronais, a enzima óxido nítrico sintetase (NOSn) neuronal ou NOS tipo I. A ativação da enzima NOSn é dependente da interação com a calmodulina que, por sua vez, é controlada pelos níveis de cálcio dependente da atividade de receptores glutamatérgicos (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; KNOWLES; MONCADA, 1994). O Ca^{2+} liberado no terminal pós-sináptico liga-se à calmodulina, esse complexo Ca^{2+} /calmodulina ativa proteínas cinases e liga-se à enzima NOSn. Essa ligação ativa a enzima NOSn que catalisa a oxidação de L-arginina para L-citrulina e NO. Uma vez sintetizado no terminal pós-sináptico, o NO deixa o neurônio pós-sináptico por difusão direta pela membrana celular e pode assumir um papel como mensageiro retrógrado, ou seja, difundindo-se do neurônio pós-sináptico para o pré-sináptico, ativando, assim, a enzima guanilato-ciclase solúvel (*sGC*) em terminais pré-sinápticos que, por sua vez, facilita a ativação do monofosfato cíclico de guanosina (*GMPc*) ligado ao glutamato (BREDT; SNYDER, 1989; KNOWLES et al., 1989), o qual será liberado na fenda sináptica. Uma vez liberado na fenda sináptica, esse neurotransmissor excitatório liga-se aos receptores do tipo NMDA que, por sua vez, promovem um influxo de cálcio no terminal pós-sináptico da célula, ativando a enzima NOSn para a produção de NO. Nesse ciclo de retroalimentação, o NO tem sido considerado uma importante molécula mensageira que pode facilitar a liberação de glutamato no SNC por meio de mecanismos retrógrados (LAGATTA et al., 2018; MONTAGUE et al., 1994; XU et al., 2007), ao passo que o glutamato pode influenciar a atividade nitrérgica por ativar receptores de NMDA (MOREIRA; MOLCHANOV; GUIMARAES, 2004), conforme ilustrado na figura 3.

Figura 3. Complexo glutamato/receptor NMDA e óxido nítrico (LAGATTA et al., 2018, modificado)

Há evidências do envolvimento de NO na geração de reações comportamentais relacionadas com o medo inato, organizadas por estruturas límbicas e paralímbicas de roedores. Aguiar e Guimarães (2009), por meio de técnicas imuno-histoquímicas demonstraram em cortes longitudinais do hipotálamo e do teto do mesencefalo de ratos, um aumento na marcação de neurônios contendo NOSn, após esses roedores exibirem comportamentos defensivos quando confrontados com um predador natural, o gato. Nesse mesmo trabalho, em outros grupos de animais que também foram expostos ao gato, houve uma atenuação das respostas comportamentais, e também uma diminuição na atividade nitrérgica, a qual foi expressa por uma redução na marcação de neurônios contendo NOSn, no PMd e na SCP, quando esses roedores foram pré-tratados com microinjeções intra-hipotalâmicas ou intramesencefálicas, respectivamente, de inibidores da sintetase de óxido nítrico. Outros estudos, utilizando modelo animal de medo baseado na estimulação química do teto mesencefálico, demonstraram que microinjeções de doadores de NO SIN-1 (MOREIRA; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2004) ou NOC-9 (BRAGA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2009) na SCP evocaram comportamentos defensivos de fuga, expresso por saltos e pelo aumento da distância percorrida. Além disso, essas reações defensivas induzidas por doadores de NO microinjetados na SCP de ratos, foram atenuadas quando esses animais foram pré-tratados nessa mesma estrutura mesencefálica, com antagonistas glutamatérgicos do tipo NMDA.

SIN-1, um metabólito ativo da molsidomina (de ARAÚJO MOREIRA; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2003; MOREIRA; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2004), e o NOC-9 6-(2-Hidroxi-1-metil-2-nitroso-hidrazina)-N-metil-1-hexanamina (BRAGA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2009), tem sido utilizados para induzir comportamentos defensivos em roedores, para o estudo dos mecanismos nitrérgicos envolvidos no processamento do medo, e os antagonistas glutamatérgicos do tipo NMDA, parece ser uma ferramenta farmacológica relevante na mediação desses mecanismos excitatórios.

Assim, a atividade nitrérgica parece sofrer uma influência glutamatérgica, conforme demonstrado em estudos explorando mecanismos excitatórios no mesencéfalo de ratos. Porém, há uma falta de estudos demonstrando a participação do sistema glutamatérgico, sobretudo dos receptores NMDA, na atividade nitrérgica, envolvida na geração das respostas defensivas do tipo pânico e antinociceptivas, organizadas por neurônios hipotalâmicos, como aqueles localizados no HA.

Além de receber uma influência de conexões intrínsecas excitatórias envolvidas na geração e controle das respostas defensivas relacionadas com o medo, recentes descobertas realizadas por nosso grupo, demonstraram que o hipotálamo recebe importantes projeções glutamatérgicas oriundas de regiões límbicas do córtex “pré-frontal” medial, como aquelas que se originam no córtex cingulado anterior, que estão envolvidas na modulação de comportamentos defensivos do tipo pânico e da antinocicepção induzida pelo medo (FALCONI-SOBRINHO et al., 2017a,b).

1.5 Córtex Cingulado Anterior

Broca, em 1878, descreveu o grande lobo límbico como uma faixa larga de tecido cerebral envolvendo o corpo caloso, que compreendia parte do prosencéfalo anterior. A parte dorsal do grande lobo límbico de Broca foi chamada de “córtex cingulado”, que compreende o giro do cíngulo, por formar um cíngulo ou cinturão ao redor do corpo caloso. Outro importante estudioso que contribuiu para um maior entendimento sobre o córtex límbico foi James Papez, quem, em 1937, propôs um circuito neural que mediava as emoções, hoje denominado de “circuito de Papez”, no qual o giro do cíngulo fora considerado uma região límbica receptiva para experiências emocionais como resultado de impulsos neuroniais provenientes do núcleo anterior do tálamo dorsal, que recebe aferências no núcleo mamilar do hipotálamo. Em 1945, Smith estudou o giro do cíngulo de macacos e descobriu que a estimulação elétrica de sua porção anterior, correspondente à área de Brodmann 24, provocava mudanças na frequência cardíaca, pressão arterial e respiração, bem como vocalizações e expressões faciais. Não menos importante, foram as inúmeras contribuições proporcionadas por MacLean, a partir de 1949, que desenvolveu o conceito de evolução do cérebro de vertebrados, no qual sugeriu que os cérebros de mamíferos evoluíram como uma série de conchas concêntricas, onde a mais interna foi denominada de paleo-mamífero e incluía o giro do cíngulo, e a mais externa de neomammaliano, a qual compreendia outras regiões do neocórtex (MacLean, 1989). Anos mais

tarde, Sanides (1970) desenvolveu um esquema evolutivo, no qual sugeriu que o córtex do giro do cíngulo tinha uma estrutura laminar mais primitiva do que o neocórtex e o precedia na evolução.

Atualmente, o giro do cíngulo vem sendo investigado com base em suas diferentes divisões anatômicas e funcionais. O córtex cingulado anterior (CCA), localizado na região rostromedial do córtex do lobo frontal, chamado de córtex “pré-frontal” medial (CPFM), além de estar envolvido com o processamento de diferentes funções cognitivas, como, por exemplo, o aprendizado, a memória e a tomada de decisão (VOGT, 2004), habilidades essenciais para a nossa sobrevivência, tem sido proposto desempenhar um papel relevante na modulação das respostas comportamentais relacionados a estímulos emocionais negativos, como aqueles considerados aversivos, que geram ansiedade e medo.

Para entender melhor a rede neural límbica envolvida na gênese e na regulação de transtornos de ansiedade, como o do pânico, estudos clínicos têm destacado a importância do papel do CPFM, destacando-se o CCA, no processamento de respostas emocionais relacionadas com o medo. Por exemplo, Mobbs et al. (2007) utilizaram a técnica de ressonância magnética funcional (*fMRI*, da sigla em inglês) para investigar a organização da rede neural envolvida nas reações adaptativas de antecipação e de esquiva ativa frente a uma situação aversiva que gerava medo. Por meio de um modelo de iminência espacial de ameaça que promove um paradigma de esquiva ativa, no qual os voluntários, através de um labirinto virtual, eram perseguidos por um predador virtual, foi observado uma ativação do CCA, áreas de Brodmann 24 e 32, desses indivíduos quando a ameaça permanecia distal. Por outro lado, quão mais próxima se encontrava a ameaça, maior era a atividade da SCP. Dessa forma, considerando que o CCA é previamente recrutado em situações de perigo distal, os neurônios dessa área cortical podem desempenhar um papel crítico na tomada de decisões para estratégias de defesa como fugir (fuga) ou evitar (esquiva inibitória), ao passo que em situações de perigo mais proximais são os neurônios mesencefálicos que parecem ser mais intensamente recrutados.

A complexidade funcional do CCA está estreitamente correlacionada com a sua composição anatômica e conectiva, demonstrando que essa região cortical não tem uma contribuição uniforme para as funções cerebrais. Além das conhecidas áreas de Brodmann 24 e 32 que compreendem parte do córtex límbico, de acordo com Etkin, Egner e Kalisch (2011) *apud* Vogt, Berger e Derbyshire (2003), subdivisões funcionais do CCA podem ser encontradas entre a sua porção rostral, compreendendo as áreas pré-genual “*pregenual (pgACC)*” e subgenual “*subgenual (sgACC)*” 24a, 24b, 24c, 25, 32 e 33 e porção dorsal “*dorsal ACC (dACC)*”, dividida em uma sub-região mais anterior (*adACC*), e outra mais posterior (*pdACC*),

sendo constituídas pelas áreas 24a', 24b', 24c', 24', 32' e 33 (figura 4). No geral, apesar das porções rostral e dorsal do CCA integrarem o córtex límbico, a subdivisão mais posterior do CCA “*pdACC*” vem sendo sugerida para estar preferencialmente envolvida nos ajustes “*top-down*” de respostas emocionais (MANSOURI; TANAKA; BUCKLEY, 2009). Além disso, as funções do CCA no processamento das emoções dependem também de sua rede neural conectiva, como, por exemplo, projeções aferentes que recebe da formação hipocampal (ALMADA et al., 2015) ou do complexo amigdalóide (FILLINGER et al., 2017), ou das projeções eferentes que enviam para a SCP (COUTINHO; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2010), o complexo amigdalóide (JHANG et al., 2018) e o hipotálamo (FALCONI-SOBRINHO et al., 2017a,b).

Figura 4. Representação esquemática de sub-regiões do córtex cingulado anterior e do córtex “pré-frontal” envolvidas no controle das emoções. Área ventromedial do córtex “pré-frontal” (vmPFC); área rostromedial do córtex “pré-frontal” (rmPFC); área dorsomedial do córtex “pré-frontal” (dmPFC), áreas subgenual (sgACC) e pré-genual (pgACC) do CCA, áreas ânterodorsal (adACC) e pósterodorsal (pdACC) do CCA e, mais cranialmente, a área motora suplementar (SMA/presmaSMA) (ETKIN; EGNER; KALISCH, 2011).

É bem estabelecido na literatura que o CCA está envolvido na expressão do medo condicionado (para revisão, *vide* DEVINSKY; MORRELL, VOGT, 1995; ALMADA; ALBRECHET-SOUZA; BRANDÃO, 2013; ALMADA; COIMBRA; BRANDÃO, 2015), como, por exemplo, por meio de aferentes GABAérgicos provenientes do hipocampo dorsal. Almada et al. (2013) demonstraram, por meio de imuno-histoquímica, uma profusa marcação de proteína Fos no CCA de ratos expostos ao medo contextual após esses animais exibirem um aumento do *fear-potentiated startle (FPS)* e do “congelamento”. Além disso, esses autores demonstraram que infusões de muscimol, um agonista dos receptores GABA_A, no hipocampo dorsal reduziu tanto a marcação da proteína Fos no CCA, quanto os comportamentos defensivos de *FPS* e de “congelamento”. Em um segundo estudo, Almada et al. (2015) demonstraram que tratamento da região Cg1 com o mesmo agonista GABAérgico foi capaz também de reduzir os comportamentos de *FPS* e de “congelamento” em ratos submetidos a um modelo de medo condicionado. De fato, esses estudos ressaltam a relevância da rede neural conectada com CCA, na neurobiologia do medo condicionado.

Apesar do papel do CCA na modulação do medo condicionado ser bem consolidado, recentes descobertas realizadas por nosso grupo, demonstraram que neurônios glutamatérgicos do CCA que se projetam para o hipotálamo, estão envolvidos no controle de respostas defensivas relacionados com o medo incondicionado. Falconi-Sobrinho et al. (2017a), por meio de técnicas morfológicas, demonstraram vias glutamatérgicas que conectam o CCA com o HP de ratos. Microinjeções de um neurotraçador anterógrado no Cg1, uma região do CCA, marcou fibras axônicas com botões terminais imunorreativos para vesículas sinápticas glutamatérgicas localizadas no HP. Para tanto, transportadores vesiculares de glutamato (VGluT2) foram utilizados para caracterizar seletivamente vias glutamatérgicas no HP provenientes do CCA. Nesse mesmo trabalho, por meio de abordagens farmacológicas, esses autores demonstraram que a diminuição da atividade do CCA, causadas por meio de microinjeções intra-Cg1 de lidocaína, ou da atividade de terminais glutamatérgicos no HP, oriundos de vias eferentes glutamatérgicas do CCA, por administração de antagonistas dos receptores glutamatérgicos no HP, atenuam tanto o comportamento de defesa expresso por corrida e por salto, quanto a antinocicepção induzida pelo medo, evocados por estimulação química de neurônios do HP. Corroborando esses dados, um segundo estudo, publicado por Falconi-Sobrinho et al. (2017b), demonstrou que a diminuição da atividade de vias eferentes glutamatérgicas do CCA para o HP, por microinjeções intra-Cg1 de LY235959, um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, prejudicou as respostas defensivas de fuga e antinociceptivas organizadas no HP. Esses resultados, quando tomados em conjunto,

evidenciam que neurônios do CCA que se projetam para o HP modulam os comportamentos defensivos do tipo pânico e a antinociceção induzida pelo medo incondicionado.

Assim, além de regular os comportamentos defensivos do tipo pânico gerados em estruturas subcorticais, como o hipotálamo, o CCA, por meio de mecanismos glutamatérgicos também tem sido implicado no controle *top-down* de processos nociceptivos relacionado com as emoções, como, por exemplo, a antinociceção induzida pelo medo (BUTLER; FINN, 2009). Outros trabalhos também sugerem que neurônios glutamatérgicos do CCA estão envolvidos na modulação descendente nociceptiva. A estimulação elétrica ou ativação química do receptor mGluR nas regiões Cg1 e Cg2 do CCA diminui a latência de retirada de pata e de cauda nas respostas a estimulação por calor (CALEJESAN; KIM; ZHUO, 2000; ZHANG; ZHANG; ZHAO, 2005).

Tendo em vista evidências que propõem que a diminuição da atividade do glutamato no hipotálamo, por bloqueio de receptores do tipo NMDA locais ou por diminuição da atividade de vias glutamatérgicas provenientes do córtex límbico, atenuam as respostas defensivas comportamentais e antinociceptivas, e que esse neurotransmissor excitatório pode interagir com outros neuromoduladores, como o óxido nítrico, para modular essas respostas relacionadas com o medo, estudos mais aprofundados explorando essa rede neural excitatória límbica envolvida na modulação de respostas defensivas parecem pertinentes para uma maior compreensão dos mecanismos e os substratos neurais, envolvidos no processamento do medo.

1.6 Hipótese

Considerando o papel panicolítico dos antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e a sua participação na atividade nitrérgica envolvida na geração de respostas defensivas, bem como o envolvimento do CCA na modulação das respostas comportamentais e antinociceptivas organizadas por neurônios diencefálicos, a hipótese do presente trabalho é que o bloqueio dos receptores do tipo NMDA no HA atenua o comportamento defensivo e a antinociceção induzidos por microinjeções de SIN-1 nesse mesmo núcleo hipotalâmico. Além disso, espera-se que o aumento da atividade de vias glutamatérgicas do CCA para o HA, por meio da ativação de receptores do tipo NMDA na região Cg1 do CCA, aumente essas respostas defensivas relacionadas com o medo, organizadas por neurônios do HA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a influência da neurotransmissão glutamatérgica hipotalâmica e do córtex cingulado anterior em mecanismos nitrérgicos do hipotálamo anterior, envolvidos na geração de respostas defensivas relacionadas com o medo incondicionado.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o efeito da microinjeção de doses crescentes do doador de óxido nítrico SIN-1 (75, 150, 300 nmol/0,1 µL), administrado no hipotálamo anterior, na geração de respostas defensivas relacionadas com o medo;
- Estudar o efeito do bloqueio de receptores do tipo NMDA no HA, por meio de microinjeção local de doses crescentes (0,02, 0,2 e 2,0 nmol/0,1 µL) de AP-7, um antagonista seletivo de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, sobre os comportamentos de defesa e a antinocicepção induzida pelo medo, evocados por estimulação química do HA com SIN-1;
- Estudar o efeito da ativação de vias glutamatérgicas que se originam no córtex cingulado anterior, por meio de microinjeção de doses crescentes de NMDA (0,1, 1,0 e 10 nmol/0,1 µL) na região Cg1 do CCA, sobre os comportamento de defesa e da antinocicepção induzida pelo medo, evocados por estimulação química do HA com SIN-1;
- Estudar a anatomia conectiva do córtex cingulado anterior com o HA, utilizando microinjeções de um neurotraçador anterógrado (BDA; peso molecular 10000), no CCA, seguindo-se reações imuno-histoquímicas para o transportador vesicular de glutamato (VGluT2) no HA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aprovação ética

Todos os ensaios experimentais foram conduzidos em estrita consistência com a Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (processo 187/2015), a qual cumpre os princípios de ética para pesquisa animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEUA-FMRP-USP) em 29/2/2016.

3.2 Animais

Foram submetidos aos testes experimentais, camundongos (*Mus musculus*; *Rodentia*, *Muridae*) de linhagem C57BL/6, machos, com idade de 10-12 semanas, pesando 30-35 g. O número (N) total de camundongos foi de 146, dos quais 28 foram utilizados para o experimento 1, 51 para o experimento 2, 64 para o experimento 3 e 3 para o experimento 4. Os roedores foram procedentes do biotério de criação de animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Durante o período de habituação, os animais (n = 8 por grupo) ficaram acondicionados em uma arena poligonal sob ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes ligadas às 7h), e com temperatura entre 22-23°C, sendo-lhes permitido livre acesso à comida e água. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1 Experimento 1: microinjeção do doador de NO SIN-1 no hipotálamo anterior

Os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal com solução de 100 mg/kg de cetamina (ketamine Agener, União Química Farmacêutica Nacional, São Paulo, Brasil) e 10 mg/kg de xilasina (Calmium, União Química Farmacêutica Nacional, São Paulo, Brasil), e posicionados em um aparelho estereotáxico (David Kopf, EUA), onde suas cabeças foram fixadas pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Uma cânula guia de aço inoxidável (diâmetro externo = 0,6 mm; diâmetro interno = 0,4 mm) foi implantada no diencéfalo e direcionada a 1 mm acima do HA, segundo coordenadas ântero-posterior (AP) = -0,70 mm, médiolateral (ML) = -0,6 mm e dorsoventral (DV) = -4,0mm, obtidas no atlas estereotáxico do encéfalo de camundongos de Paxinos e Franklin (2001). Depois de implantada, a cânula-guia

foi fixada na calvária por uma prótese de acrílico autopolimerizável e selada com um mandril para evitar obstruções e a entrada de impurezas. Após a cirurgia estereotáxica, cada camundongo foi tratado com uma injeção intramuscular do antibiótico penicilina G-benzatina (120.000 U.I.), seguindo-se uma injeção, por via subcutânea, do analgésico e anti-inflamatório não esteroide flunixinina meglumina (2,5 mg/kg) (Schering-Plough, São Paulo, SP, Brasil).

Em seguida, os camundongos foram colocados em uma arena poligonal e mantidos por 3 dias para habituação. Durante o período de habituação, os animais tiveram livre acesso à comida e água. No final do período de habituação, cada animal foi submetido a três medidas da latência de retirada de cauda para determinar o limiar nociceptivo de linha de base. No dia seguinte, grupos independentes de animais foram aleatoriamente designados para receber microinjeções intra-HA de veículo (salina fisiológica) ou do doador de NO SIN-1 em diferentes doses (75, 150 e 300 nmol/0,1 µL). A administração de SIN-1 ou de salina foram realizadas por meio de agulha gengival (0,3 mm OD; 1 mm mais longa do que a cânula-guia), a qual foi direcionada para o HA. A agulha gengival foi conectada a um tubo de polietileno (PE-10) que foi acoplado a uma seringa de 5 µL (Hamilton, Reno, NV, EUA) conectada a uma bomba de infusão (Stoelting, Kiel, WI, EUA). Após o final de cada injeção, a agulha dental foi mantida no encefálo por 15 segundos para evitar o refluxo da droga. Em seguida, os camundongos foram colocados na arena poligonal e as respostas comportamentais foram analisadas de forma quantitativa a cada minuto por 10 minutos. Depois dos 10 min de testes comportamentais, o limiar nociceptivo foi aferido em intervalos de 10 min durante 60 min.

3.3.2 Experimento 2: pré-tratamento do hipotálamo anterior com o antagonista dos receptores de NMDA

Os procedimentos cirúrgicos e pós-operatórios até o dia do teste experimental foram os mesmos dos grupos de animais submetidos ao experimento 1. No dia do teste, cada animal foi tratado com microinjeções de salina (0.9% NaCl/0,1 µL) ou de AP7, um antagonista de receptores do tipo NMDA, nas doses de 0,02, 0,2 ou 2,0 nmol/0,1 µL, no HA, seguindo-se, após 10 minutos, microinjeções de salina ou de SIN-1 (300 nmol/0,1 µL) no mesmo núcleo hipotalâmico. Após a administração intra-HA de veículo ou de SIN-1, os comportamentos exibidos na arena poligonal por cada camundongo foram analisados de forma quantitativa por 10 min e, imediatamente após os testes comportamentais, o limiar nociceptivo foi mensurado em intervalos de 10 min por 60 min, conforme descrito no experimento anterior.

3.3.3 Experimento 3: microinjeção do agonista dos receptores de NMDA no CCA

Após anestesiados, cada animal foi fixado a um aparelho estereotático, conforme descrito anteriormente. Em seguida, uma cânula-guia foi implantada no córtex e outra, no diencéfalo, visando 0,5 e 1 mm acima do CCA, região Cg1, e do HA, respectivamente. As seguintes coordenadas foram utilizadas para o CCA, região Cg1, e para o HA: AP: 0,26 mm e -0,70 mm, ML: -0,3 mm e -0,6 mm, e DV: -1,0 mm e -4,0 mm, respectivamente. As coordenadas utilizadas foram baseadas no Atlas de Paxinos e Franklin (2001) e o bregma foi usado como referência. Depois de implantadas, cada cânula-guia foi fixada na calvária por uma prótese de acrílico autopolimerizável e selada com um mandril para evitar obstruções e a entrada de impurezas. Após a cirurgia estereotática, os camundongos foram colocados em uma arena poligonal e mantidos por 3 dias para habituação. Durante o período de habituação, os animais tiveram livre acesso à comida e água. No final do período de habituação, cada animal foi submetido a três medidas da latência de retirada de cauda para determinar o limiar nociceptivo da linha de base. No dia seguinte, grupos independentes de animais foram pré-tratados com microinjeções de salina ou de NMDA em diferentes doses (0,1, 1,0 ou 10 nmol/0,1 µL) na região Cg1 do CCA, seguindo-se, após 10 minutos, microinjeções de veículo ou SIN-1 (300 nmol) no HA. As microinjeções de droga ou de salina foram realizadas por meio de uma agulha gengival (0,3 mm OD; 0,5 e 1 mm mais longa do que as cânulas-guia implantadas no o Cg1 e para o HA, respectivamente). A agulha gengival foi conectada a um tubo de polietileno (PE-10) que foi acoplado a uma seringa de 5 µL (Hamilton, Reno, NV, EUA), conectada a uma bomba de infusão (Stoelting, Kiel, WI, EUA). Após o final de cada injeção, a agulha gengival foi mantida no encefálo por 15 segundos para evitar o refluxo da droga. Após a microinjeção intra-hipotalâmica de veículo ou de SIN-1, os camundongos foram colocados na arena poligonal e as respostas comportamentais foram analisadas de forma quantitativa a cada minuto por 10 min. Depois dos 10 min de testes comportamentais, o limiar nociceptivo foi mensurado em intervalos de 10 min durante 60 min.

3.3.4 Experimento 4: Neurotraçamento de vias que conectam o córtex cingulado anterior ao hipotálamo anterior

Os camundongos foram anestesiados e fixados em um aparelho estereotático, conforme descrito nos experimentos anteriores. O neurotraçador de captação e transporte anterógrado biodextrana (BDA) (peso molecular 10.000) conjugado com fluoresceína foi

depositado no CCA, por meio de uma agulha gengival introduzida e direcionada para a região Cg1, segundo coordenadas AP: 0,26 mm, ML: -0,3 mm e DV: -1,5 mm, obtidas no Atlas de Paxinos e Franklin (2001). A agulha gengival foi acoplada a um tubo de polietileno (PE10), que foi conectado a uma seringa de 5 µL Hamilton (Hamilton, Reno, NV, EUA) posicionada em uma bomba de infusão (Stoelting, Kiel, WI, EUA). O neurotraçador foi injetado em um volume de 0,1 µL por 1 minuto e, após a sua infusão, a agulha gengival foi mantida na região cortical-alvo por mais 2 minutos para permitir a difusão local do neurotraçador. Completado o procedimento de microinjeção, a agulha gengival foi removida e a pele suturada. Durante o período pós-operatório, foi empregado antibioticoterapia, onde cada camundongo foi tratado com uma injeção intramuscular do antibiótico penicilina G-benzatina (120.000 U.I.), seguindo-se injeção, por via subcutânea, do analgésico e anti-inflamatório não esteroide flunixin meglumina (2,5 mg/kg) (Schering-Plough, São Paulo, SP, Brasil).

Após dez dias da administração de BDA no CCA, os camundongos foram anestesiados com 100 mg/kg de cetamina (ketamine Agener, União Química Farmacêutica Nacional, São Paulo, Brasil) e 10 mg/kg de xilasina (Calmium, União Química Farmacêutica Nacional, São Paulo, Brasil) e, em seguida, perfundidos por via intracardíaca com salina tamponada, seguida por paraformaldeído a 4% (PFA, Sigma) dissolvido em tampão fosfato a 0,1 M (pH 7,4). Após a perfusão, o cérebro foi removido, pós-fixado em PFA por 4 h, e transferido para 10% e 20% de sacarose dissolvida em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,3, a 4°C, por pelo menos 12 horas em cada solução, para crioproteção. O tecido nervoso foi imerso em 2-metilbutano (Sigma), embebido em Tissue Tek e congelado em gelo seco (30 s). Após o congelamento da amostra biológica, o prosencefalo foi seccionado (20 µm de espessura) utilizando um criostato (CM 1950, Leica, Wetzlar, Alemanha) a 20° C e depositado em lâminas de vidro silanizadas. Após este procedimento, o córtex cingulado anterior foi observado sob a microscopia de fluorescência (AxioImager Z1 com APOTOME, Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Em seguida, as seções do hipotálamo anterior foram incubadas com anticorpo primário (transportador monoclonal de glutamato anti-vesicular 2 - VGLUT2) de camundongo (Merck, Alemanha) (procedimento omitido em grupos controles), após o ensaio de titulação. Os cérebros foram lavados com 0,1 M de PBS três vezes durante 10 min cada e depois incubados com anticorpos secundários (Invitrogen, CA, USA, EUA) durante 2 horas, no escuro, e novamente lavados três vezes com PBS a 0,1 M por 10 min cada lavagem. Ao final desse procedimento, as lâminas foram recobertas com ProLong DAPI (*Life Technologies*, Eugene,

OR, EUA) e as secções histológicas foram analisadas por microscopia de fluorescência (AxioImager Z1 com APOTOME, Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

3.4 Análise experimental

3.4.1 Avaliação comportamental

As reações comportamentais exibidas pelos camundongos foram registradas por 10 minutos usando uma câmera de vídeo (Handycam, Sony Corporation, Osaki, Shinagawa-ku, Tóquio, Japão). Para a análise comportamental foi considerado o número e a duração dos comportamentos de “congelamento” e de fuga, e o número de cruzamentos. O “congelamento” foi caracterizado por imobilidade defensiva por pelo menos 6 segundos acompanhado por uma das seguintes reações autonômicas: defecação, exoftalmia e/ou micção (COIMBRA et al., 2017; URIBE-MARIÑO et al., 2012). As reações de fuga foram classificadas como orientada e não orientada, as quais foram registradas quando os animais corriam ou saltavam em direção às escadas e/ou para a toca e corriam e saltavam em uma direção oposta a esses lugares seguros, respectivamente (ALMADA et al., 2015). Tanto o “congelamento”, quanto a fuga são reações defensivas consideradas comportamentos do tipo pânico (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; BORELLI et al., 2004; SCHENBERG et al., 2001; SHEKHAR, 1994). No experimento 4, devido à hipótese de que a ativação do CCA poderia provocar um efeito pró-aversivo, foi incluída na avaliação comportamental, a quantificação do número de cruzamento, o qual foi considerado neste trabalho como uma medida quantitativa do comportamento de fuga (dos ANJOS-GARCIA et al., 2017, FALCONI-SOBRINHO et al., 2017a,b). Por cruzamento considerou-se a passagem do animal pelos limites de um quadrante do assoalho da arena para outro compartimento, levando em consideração o posicionamento das quatro patas em um único quadrante.

O aparato experimental para o teste comportamental consiste em uma arena poligonal confeccionada com acrílico transparente ($140 \times 62 \times 50$ cm), comportando uma caixa de abrigo de acrílico preto (toca; $26 \times 18 \times 13$ cm), e duas plataformas de acrílico translúcido com uma pequena escada de acesso ($17 \times 10 \times 27$ cm), uma posicionada no canto ao lado da caixa de abrigo e uma outra na parede lateral da arena. O piso da arena é feito de uma plataforma acrílica transparente, dividido em 20 retângulos iguais (largura de 4,2 mm) marcados por linhas

vermelhas, e colocado sobre uma placa retangular de aço inoxidável (ALMADA; COIMBRA, 2015; ALMADA et al., 2015), conforme demonstrado na figura 5.

Figura 5. Desenho representativo do aparato experimental comportamental

3.4.1 Mensuração do limiar nociceptivo

Após o final da habituação e antes do teste comportamental, uma linha de base (LB) para cada animal foi formada para aquisição do limiar nociceptivo basal. A LB foi formada pela média de três latências de retirada de cauda (LRC), tomadas em intervalos de 5 min entre elas (COIMBRA et al., 2006; FALCONI-SOBRINHO et al., 2017a,b). Todos os animais, imediatamente após o término do teste comportamental, foram submetidos ao teste de retirada de cauda. Cada animal foi colocado em uma cela de contenção com paredes de acrílico, e tiveram a cauda posicionada sobre o sensor de uma fonte de calor (analgesímetro para o teste de retirada de cauda; Oficinas de Precisão; FMRP-USP) (figura 6), cuja elevação progressiva de calorimetria era automaticamente interrompida, logo que o animal retirasse a cauda do dispositivo. O limiar nociceptivo foi mensurado em intervalos de 10 minutos durante 60 minutos.

Figura 6. Algesímetro utilizado para o teste de retirada de cauda.

3.5 Drogas

Experimento 1: os camundongos receberam microinjeções do doador de NO SIN-1 (cloridrato de linsidomina; Tocris Biosciences, Bristol, Reino Unido) nas doses de 75, 150 (LISBOA; GUIMARÃES, 2012) e 300 nmol/0,1 μ L (de OLIVEIRA; del BEL; GUIMARÃES, 2000) ou salina fisiológica (0,9% NaCl /0,1 μ L) no hipotálamo anterior.

Experimento 2: os camundongos foram tratados com microinjeções de DL-AP7 (AP-7); Ácido DL-2-amino-7-fosfono-heptanoico, um antagonista seletivo para os receptores glutamatérgicos do tipo N-metil D-Aspartato (NMDA; Tocris Bioscience, Avonmouth, Bristol, UK), nas doses de 0,02, 0,2 ou 2,0 nmol/0,1 μ L (AGUIAR; GUIMARÃES, 2011) ou de salina fisiológica (0,9% NaCl/0,1 μ L) no HA, seguido, após 10 minutos, da administração do doador de NO SIN-1 na dose de 300 nmol//0,1 μ L ou de salina fisiológica (0,9% NaCl /0,1 μ L) nesse mesmo núcleo hipotalâmico.

Experimento 3: os camundongos foram tratados com microinjeções de NMDA, um aminoácido excitatório, N-metil D-Aspartato (NMDA; Sigma/Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), nas doses de 0,1, 1,0 (ULLAH et al., 2017) e 10 nmol/0,1 μ L ou salina fisiológica (0,9% NaCl/0,1 μ L) no CCA, região Cg1, seguido, após 10 minutos, da administração do doador de NO SIN-1 na dose de 300 nmol//0,1 μ L ou salina fisiológica (0,9% NaCl /0,1 μ L) no HA.

Experimento 4: os camundongos receberam microinjeções de um neurotraçador anterógrado fluorescente, o BDA conjugado com fluoresceína (peso molecular 10.000; Eugene, Oregon, USA) na região Cg1 do CCA, em um volume de 0,1 μ L. O traçador foi dissolvido em 0,01 M de solução salina tamponada com fosfato “phosphate-buffered saline” (PBS), com pH 7,4.

3.6 Histologia

Após a finalização dos testes comportamentais e nociceptivos, os animais foram profundamente anestesiados com 100 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilasina, seguindo-se uma incisão no tórax, com exposição do mediastino. O próximo passo foi clampear a aorta descendente torácica, libertando o coração do envoltório pericárdico para o puncionamento do ventrículo esquerdo por meio de um equipo sanguíneo conectado a uma seringa de 60 mL, e foi feita uma incisão no átrio direito, quando então os encéfalos foram perfundidos com solução salina a 0,9 %, seguida por solução tamponada de paraformaldeído a 4 % por meio de uma bomba de perfusão (Master Flex[®] L/S[™]), em um volume suficiente para fixar os tecidos ($\pm$ 40

ml). Em seguida, os encéfalos foram retirados e mantidos no paraformaldeído a 4% durante pelo menos 4 horas, seguindo-se sacarose a 10% e 20% durante pelo menos 12 h em cada solução. Após esse procedimento, os tecidos neurais foram imersos em 2-metilbutano (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), congelados em gelo seco (30 s), embebidos em Tissue Tek e cortados em um criostato (CM 1950, Leica), obtendo-se secções seriadas de 40 µm de espessura. Os cortes foram adequadamente montados em lâminas gelatinizadas; posteriormente desidratadas, diafanizadas e coradas com hematoxilina/eosina em um sistema motorizado de coloração de lâminas (Autostainer LX, Leica, Alemanha). Em seguida, foram analisadas ao microscópio de luz (AxioImager Z1, Zeiss, Alemanha), e os sítios de microinjeção de drogas foram assinalados em diagramas modificados do Atlas de Paxinos e Franklin (2001).

3.7 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. O *software* GraphPad Prism versão 7.0 foi utilizado para as análises estatísticas. A análise de variância de uma via (*ANOVA*) seguida pelo teste de *post hoc* de Newman-Keuls foi utilizada para analisar os dados comportamentais relacionados aos estudos do experimento 1, uma vez que todos os grupos passaram pelo teste de normalidade. Por outro lado, os grupos de animais que compreenderam o experimento 2 não passaram no teste de normalidade. Dessa maneira, os comportamentos analisados pertencentes a essa série de experimentos foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn.

A análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*) seguida do teste *post hoc* de Tukey foi utilizada para analisar os dados dos estudos comportamentais referentes ao experimento 3.

Todos os dados dos testes de retirada de cauda para mensuração do limiar nociceptivo, os quais foram recolhidos imediatamente após o final do teste comportamental, foram submetidos à análise de variância de duas vias para medidas repetidas *ANOVA* (*RM-ANOVA*) seguido do teste *post hoc* de Tukey.

Os dados que seguiram uma distribuição normal foram representados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), e os dados que não seguiram uma distribuição de Gauss, foram representados como mediana. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativa quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1

4.1.1 Localização dos sítios de microinjeção

A figura 7 apresenta os diagramas representativos dos sítios de microinjeção de salina fisiológica ou de SIN-1 em diferentes doses no hipotálamo anterior dos camundongos submetidos ao experimento 1.

Figura 7. Representação diagramática de secções coronais do prosencéfalo de camundongos C57BL/6 ilustrando os sítios de microinjeções de salina fisiológica (○) e SIN-1 nas doses de 75 (■), 150 (▲) and 300 (●) nmol/0.1 μL no hipotálamo anterior. As imagens são retratadas em ilustrações modificadas do atlas de Paxinos e Franklin (2001).

4.1.2 Efeitos das doses crescentes do doador de óxido nítrico SIN-1 microinjetado no hipotálamo anterior sobre as respostas defensivas relacionadas com o medo

De acordo com a análise de variância de uma via, houve um efeito significativo do tratamento tanto no número ($F_{3,24} = 15,23$; $p < 0,001$), quanto na duração ($F_{3,24} = 22,87$, $p < 0,001$) do comportamento de “congelamento”. De acordo com o teste *post hoc* de Newman-Keuls, os grupos que receberam o tratamento no hipotálamo anterior com o doador de óxido nítrico SIN-1 nas doses de 150 e 300 nmol exibiram reações de “congelamento” ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, considerando o número de eventos comportamentais) e ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente, considerando a duração da resposta de “congelamento”), em comparação com os grupos tratados com salina ou SIN-1 (75 nmol). Além disso, o efeito da

dose mais alta de SIN-1 foi significativamente diferente da dose intermediária, tanto no número ($p < 0,05$), quanto na duração ($p < 0,001$) de “congelamento” conforme mostrado na figura 8A e B.

No que se refere aos comportamentos de fuga, houve efeito significativo do tratamento intra-HA com SIN-1 tanto no número ($F_{3,24} = 10,24$, $p < 0,001$) e na duração ($F_{3,24} = 8,88$, $p < 0,001$) das reações de fuga orientada, quanto no número ($F_{3,24} = 5,381$, $p < 0,001$) e na duração ($F_{3,24} = 6,623$, $p < 0,001$) das reações de fuga não orientada, de acordo com a análise de variância de uma via. O tratamento intra-HA com SIN-1 nas doses de 75, 150 e 300 nmol causou efeito dose-dependente, representado pelo aumento do número (teste *post hoc* de Newman-Keuls; $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) e da duração (teste *post hoc* de Newman-Keuls; $p < 0,001$, $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) das reações de fuga orientada, como mostrado na figura 8C e D. Além disso, de acordo com o teste *post hoc* de Newman Keuls, houve uma diferença significativa entre os efeitos do tratamento intra-HA com SIN-1 nas doses de 75 e 300 nmol no número ($p < 0,05$) de reações de fuga orientada (Figura 1C). Embora as diferentes doses de SIN-1 microinjetadas no HA tenha causado reações de fuga não orientada, de acordo com a análise de variância de uma via, apenas as doses mais altas de SIN-1 (150 e 300 nmol) causaram um aumento significativamente diferente no número (teste *post hoc* de Newman-Keuls; $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) e na duração (teste *post hoc* de Newman-Keuls; $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) das reações de fuga não orientada quando comparadas com aquelas exibidas pelo grupo controle, tratado com salina fisiológica, como mostrado na figura 8E e F.

Figura 8. Efeito das microinjeções de salina fisiológica (Sal) ou do doador de óxido nítrico SIN-1 (75, 150 e 300 nmol/0,1 μ L) no hipotálamo anterior de camundongos sobre o número (A) e a duração (B) das respostas de “congelamento”, o número (C) e a duração (D) das reações de fuga orientada, e o número (E) e a duração (F) das reações de fuga não orientada. Os dados apresentam a média $\pm$ EPM (gráficos de pontos de dispersão; cada ponto representa uma resposta por animal); $n = 7$ por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparados com o grupo controle tratado com Sal; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ comparados com o grupo tratado com SIN-1 (75 nmol); # $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ comparados com o grupo tratado com SIN-1 (150 nmol), de acordo com a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

Os comportamentos defensivos evocados pela ativação de neurônios do HA por meio de microinjeções locais de SIN-1 foram seguidos por uma resposta antinociceptiva induzida pelo medo incondicionado. De acordo com a análise de variância de duas vias para medidas repetidas, houve um efeito estatisticamente significativo do tratamento ($F_{9,60} = 46,4$, $p < 0,001$) e do tempo ($F_{3,180} = 65,68$, $p < 0,001$), bem como da interação tratamento *versus* tempo ($F_{27,180} = 14,19$, $p < 0,001$).

O grupo de roedores que receberam microinjeções intra-HA de SIN-1 nas doses mais altas exibiram uma resposta antinociceptiva com duração de 20 minutos após o final dos comportamentos defensivos do tipo pânico, ao passo que os grupos que receberam o tratamento com SIN-1 na dose mais baixa (75 nmol) tiveram um aumento na latência de retirada de cauda apenas no tempo zero, quando comparados ao grupo controle que recebeu o tratamento com o salina (teste *post hoc* de Tukey; $p < 0,05$). Ademais, a duração da resposta antinociceptiva desencadeada pelos animais tratados com microinjeções de SIN-1 nas doses mais altas (150 e 300 nmol) foi diferente daquela desencadeada pelos camundongos tratados com SIN-1 na dose de 75 nmol, no tempo 0 até 20 minutos após o término do teste comportamental (teste *post hoc* de Tukey; $p < 0,05$), conforme demonstrado na figura 9.

Figura 9. Efeito das microinjeções de salina fisiológica (Sal) ou do doador de óxido nítrico SIN-1 (75, 150 e 300 nmol/0,1 μ L) no hipotálamo anterior de camundongos sobre o limiar nociceptivo. Os dados apresentam a média $\pm$ EPM, $n = 7$ por grupo. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle tratado com Sal; # $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com SIN-1 (75 nmol), de acordo com a ANOVA de duas vias para múltiplas comparações (RM-ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. LB representa o limiar nociceptivo basal.

4.2 Experimento 2

4.2.1 Localização dos sítios de microinjeção

A figura 10 apresenta os diagramas representativos dos sítios de microinjeção de drogas ou de salina fisiológica no hipotálamo anterior dos camundongos submetidos ao experimento 2. Os sítios de microinjeção foram definidos de acordo com o atlas extereotáxico de Paxinos e Franklin (2001).

Figura 10. Representação diagramática de secções coronais do prosencéfalo de camundongos C57BL/6 ilustrando os sítios de microinjeções intra-HA de salina + salina (○), AP-7 nas doses de 0,02 (□), 0,2 (△) e 2,0 (◇) nmol/0,1 µL + salina, salina + SIN-1 (●) e AP-7 nas doses de 0,02 (■), 0,2 (▲) e 2,0 (◆) nmol/0,1 µL + SIN-1. Fotomicrografia de uma secção coronal do diencefalo (canto inferior direito da foto) de um camundongo, mostrando um sítio representativo de microinjeção de droga no hipotálamo anterior (bregma -0,82 mm; barra de escala 200 µm), corado com hematoxilina e eosina.

4.2.2 Efeitos do pré-tratamento no hipotálamo anterior com AP-7 sobre o comportamento de defesa e a antinocicepção induzida pelo medo, evocados por microinjeções intra-HA de SIN-1

Similar aos efeitos pró-aversivos observados na primeira série de experimentos, microinjeções no HA com o doador de NO SIN-1 na dose de 300 nmol induziu comportamentos de “congelamento” e de fuga orientada e não orientada. Além disso, essas reações defensivas do tipo pânico induzidas pela administração intra-HA de SIN-1 foram atenuadas ou inibidas pelo bloqueio dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA por meio de microinjeções de AP-7 nesse mesmo núcleo hipotalâmico, conforme mostrado na figura 11A a F.

De acordo com o teste de Kruskal-Wallis, houve um efeito significativo do tratamento no número ($F_{8,52} = 46,04$, $p < 0,001$) e na duração ($F_{8,52} = 44,34$, $p < 0,001$) das reações de “congelamento”. As microinjeções intra-HA de SIN-1 prededidas pela administração local de salina evocou reações de “congelamento”, o que foi demonstrado pelo aumento do número e da duração de “congelamento” (teste *post hoc* de Dunn; $p < 0,05$ and $p < 0,05$, respectivamente) quando comparado ao grupo controle, tratado com salina + salina. Porém, o pré-tratamento do HA com a maior dose de AP-7 (2,0 nmol) inibiu as reações de “congelamento” evocadas pela administração de SIN-1 no HA ($p < 0,05$ para o número e para a duração), de acordo com o teste *post hoc* de Dunn. Além disso, o comportamento do grupo tratado com 2,0 nmol de AP-7 + SIN-1 foi diferente daquele apresentado pelo grupo tratado com 0,02 nmol de AP-7 + SIN-1 ($p < 0,01$ para o número e $p < 0,05$ para a duração de congelamento), de acordo com o teste *post hoc* de Dunn, conforme mostrado na figura 11A e B.

Em relação ao comportamento de fuga, houve um efeito significativo do tratamento no número ($F_{8,52} = 44,98$, $p < 0,001$ e $F_{8,52} = 45,54$, $p < 0,001$) e na duração ($F_{8,52} = 44,57$, $p < 0,001$ e $F_{8,52} = 43,83$, $p < 0,001$) das reações defensivas de fuga orientada e não orientada, respectivamente. O grupo de animais que receberam o tratamento no HA com salina + SIN-1 desencadeou um número expressivo de fuga, demonstrado pelo aumento do número e da duração de fuga orientada e não orientada (teste *post hoc* de Dunn; $p < 0,01$ em todos os casos) quando comparados com o grupo de roedores que recebeu o tratamento com salina + salina no HA. O pré-tratamento do HA com a dose mais alta (2,0 nmol) de AP-7 aboliu ambos os comportamentos de fuga (teste *post hoc* de Dunn; $p < 0,01$ em todos os casos). Além disso, o comportamento do grupo que foi pré-tratado com a dose de 2,0 nmol de AP-7 foi diferente daquele apresentado pelo grupo que recebeu a dose de 0,02 nmol tanto considerando o número ($p < 0,05$), como a duração ($p < 0,05$) das reações de fuga orientada, quanto o número ($p < 0,01$), como a duração ($p < 0,01$) da fuga não orientada, de acordo com o teste *post hoc* de Dunn. Porém, não houve diferença significativa entre as doses de 0,2 e de 2,0 nmol nas reações de fuga, de acordo com o teste *post-hoc* de Dunn ($p > 0,5$ em todos os casos), como mostrado na figura 11C a F.

Figura 11. Efeito das microinjeções de salina fisiológica (Sal) ou de AP-7 (0,02, 0,2 e 2,0 nmol/0,1 µL), seguidas por salina ou por SIN-1 (300 nmol), no hipotálamo anterior de camundongos sobre o número (A) e a duração (B) das respostas de “congelamento”, o número (C) e a duração (D) das reações de fuga orientada, e o número (E), a duração (F) das reações de fuga não orientada. Os dados apresentam a mediana (gráfico de pontos de dispersão; cada ponto representa uma resposta por animal); $n = 6$ a 8 por grupo. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ comparados com o grupo tratado com Sal + Sal; + $p < 0,05$ e ++ $p < 0,01$ comparados com grupo tratado com Sal + SIN-1; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ comparados com o grupo tratado com AP-7 (0,02) + SIN-1; – $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com AP-7 (0,2 nmol) + SIN-1, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn).

Os comportamentos defensivos evocados pela ativação de neurônios do HA por meio de microinjeções locais de SIN-1 foram seguidos por uma resposta antinociceptiva induzida pelo medo incondicionado. De acordo com a análise de variância de duas vias para medidas repetidas, houve um efeito significativo do tratamento ($F_{5,30} = 19,89$, $p < 0,001$) e do tempo ($F_{9,270} = 64,03$, $p < 0,001$), bem como da interação tratamento *versus* tempo ($F_{45,270} = 13,17$, $p < 0,001$).

Os animais que exibiram comportamentos do tipo pânico apresentaram um aumento na latência de retirada de cauda quando comparados ao grupo controle (sal + sal), 0, 10 e 20 minutos após o final dos comportamentos defensivos, de acordo com o teste *post hoc* de Tukey; $p < 0,05$. O pré-tratamento intra-HA com as doses mais altas (0,2 and 2,0 nmol) de AP-7 reduziu e bloqueou, respectivamente, a resposta antinociceptiva nessa mesma janela de tempo, quando comparado com o tratamento do HA com salina + SIN-1 ($p < 0,05$ em ambos os casos). Quando comparado com a dose de 0,02 nmol de AP7 + SIN-1, tanto a dose de 0,2, quanto a de 2,0 nmol atenuaram a antinocicepção nos mesmos tempos, 0-20 minutos após o final do teste comportamental. Além disso, não houve diferença significativa entre os tratamentos com AP-7 (0,02 nmol) + SIN-1 e com salina + SIN-1 ($p > 0,05$). Por fim, as microinjeções intra-HA de AP-7 na dose de 2,0 nmol seguido pela administração local de SIN-1 causaram efeitos diferentes daquelas causadas por microinjeções intra-HA de AP-7 na dose de 0,2 nmol + SIN-1, nos tempos 0 e 10 minutos ($p < 0,05$) após o final dos comportamentos defensivos do tipo pânico, conforme mostrado na figura 12.

Figura 12. Efeito das microinjeções de salina fisiológica (Sal) ou de AP-7 (0,02, 0,2 e 2,0 nmol/0,1 μ L), seguidas de salina ou de SIN-1 (300 nmol/0,1 μ L), no hipotálamo anterior de camundongos sobre o limiar nociceptivo. Os dados apresentam a média $\pm$ EPM, $n = 6$ a 8 por grupo. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle, tratado com Sal + Sal; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo tratado com Sal + SIN-1; + $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com AP-7 (0,02) + SIN-1; - $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com AP-7 (0,2 nmol) + SIN-1 (de acordo com RM-ANOVA two-way seguido pelos testes post hoc de Tukey). LB representa o limiar nociceptivo basal.

4.3 Experimento 3

4.3.1 Localização dos sítios de microinjeção

A figura 13 apresenta os diagramas representativos dos sítios de microinjeção de droga ou de salina fisiológica no córtex cingulado anterior e no hipotálamo anterior dos camundongos submetidos ao experimento 3. Os sítios de microinjeção foram definidos de acordo com o atlas estereotático de Paxinos e Franklin (2001). Embora os sítios de microinjeção de droga tenham sido ilustrados no diagrama do lado oposto daqueles sítios representativos ilustrados nos experimentos anteriores, todos os animais do estudo receberam as microinjeções de drogas no mesmo hemisfério (direito).

Figura 13. Representação diagramática de secções coronais do prosencéfalo de camundongos C57BL/6 ilustrando os sítios de microinjeções de salina (Cg1) + salina (HA) (○), NMDA (Cg1) nas doses de 0.1 (□), 1,0 (Δ) e 10 (◇) nmol/0.1 μL + salina (HA), salina (Cg1) + SIN-1 (HA) (●) e NMDA (Cg1) nas doses de 0.1 (■), 1,0 (▲) e 10 (◆) nmol/0.1 μL + SIN-1 (HA), referentes aos estudos do experimento 3. Fotomicrografias de secções coronais do prosencéfalo de camundongo, mostrando (canto superior esquerdo da foto) um sítio representativo de microinjeção de droga no córtex cingulado anterior, região Cg1 (bregma -0,26 mm; barra de escala 20 μm), e outro (canto inferior esquerdo da foto) no hipotálamo anterior (bregma -0,70 mm; barra de escala 20 μm), corados com hematoxilina e eosina.

4.3.2 Efeitos da ativação do córtex cingulado anterior com doses crescentes de NMDA sobre as respostas defensivas relacionadas com o medo, evocadas por microinjeções de SIN-1 no hipotálamo anterior

De acordo com a análise de variância de duas vias, houve efeito significativo do tratamento intra-HA ($F_{1,56} = 162,9$; $p < 0,001$), mas não houve efeito do pré-tratamento do Cg1

($F_{3,56} = 0,7241$; $p > 0,05$), e da interação entre eles ($F_{3,56} = 0,7241$; $p > 0,05$), relacionados ao número de “congelamento”, como mostrado na figura 13A. Porém, houve um efeito estatisticamente significativo dos tratamentos do Cg1 ($F_{3,56} = 5,597$; $p < 0,01$) e do HA ($F_{1,56} = 20,12$; $p < 0,001$), bem como uma interação entre eles ($F_{3,56} = 5,597$; $p < 0,01$), na duração de “congelamento”, conforme mostrado na figura 14B. O grupo de animais que receberam microinjeções intra-HA de SIN-1 precedidas pela administração de salina fisiológica no Cg1, exibiram reações de “congelamento” quando comparado ao grupo controle que recebeu salina no Cg1 + salina no HA (teste *post hoc* de Tukey; $p < 0,001$ para o número e para a duração de “congelamento”), como mostrado na figura 14A, B. O pré-tratamento intra-Cg1 nas diferentes doses de NMDA não causou um efeito estatisticamente diferente no número de “congelamento” induzido por microinjeções de SIN-1 no HA (teste *post hoc* de Tukey; $p < 0,05$), como mostrado na figura 13A. Porém, o tratamento com as maiores doses de NMDA (1,0 e 10 nmol) foi capaz de atenuar a duração das reações de “congelamento” ($p < 0,01$ and $p < 0,001$, respectivamente), quando comparado ao tratamento intra-Cg1 com salina, seguido por SIN-1 microinjetado no HA, de acordo com o teste *post hoc* de Tukey, conforme mostrado na figura 14B.

De acordo com a análise de variância de duas vias, houve efeito significativo do tratamento intra-HA ($F_{1,56} = 201,6$; $p < 0,001$ e $F_{1,56} = 227$; $p < 0,001$), mas não houve efeito do pré-tratamento do Cg1 ($F_{3,56} = 0,4869$; $p > 0,05$ and $F_{3,56} = 1,069$; $p > 0,05$) e da interação entre eles ($F_{3,56} = 0,4869$; $p > 0,05$ and $F_{3,56} = 1,069$; $p > 0,05$), nem no número, nem na duração de fuga orientada, respectivamente, como mostrado na figura 14C e D.

Em relação ao número de reações de fuga não orientada, houve um efeito significativo do tratamento intra-HA ($F_{1,56} = 150$; $p < 0,001$), mas não houve efeito significativo, nem do pré-tratamento ($F_{3,56} = 1,766$; $p > 0,05$), nem da interação entre eles ($F_{3,56} = 1,766$; $p > 0,05$), como mostrado na figura 13E. Porém, a análise de variância de duas vias, revelou um efeito significativo dos tratamentos do Cg1 ($F_{3,56} = 5,358$; $p < 0,01$) e do HA ($F_{1,56} = 179,3$; $p < 0,001$), e da interação entre eles ($F_{3,56} = 5,358$; $p < 0,01$), como mostrado na figura 14F.

As microinjeções intra-HA de SIN-1, precedidas pela administração de salina fisiológica no Cg1, evocaram reações de fuga orientada e não orientada (teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,001$ em ambos os casos), e também causaram um efeito significativo na duração de ambos comportamentos de fuga (teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,001$ em ambos os casos), em comparação ao tratamento do Cg1 com salina seguido por injeções de salina no HA (Fig. 13C a F). Além disso, o pré-tratamento do Cg1 com as diferentes doses de NMDA não causou efeito significativo nem no número e na duração das reações de fuga orientada, nem no número de

fuga não orientada (teste *post hoc* de Tukey, $p > 0,05$ em todos os casos). No entanto, o tratamento com a maior dose (10 nmol) de NMDA no Cg1, seguido da injeção intra-HA de SIN-1, foi capaz de aumentar a duração das reações comportamentais de fuga não orientada quando comparada com o tratamento com salina no Cg1, seguido da administração de SIN-1 no há, e com o tratamento do Cg1 com a dose de 1,0 nmol de NMDA, seguido da administração de SIN-1 no HA ($p < 0,01$), como mostrado na Figura 14C a F.

De acordo com a análise de variância de duas vias, houve efeito significativo do tratamento do Cg1 ($F_{3,56} = 38,28$; $p < 0,001$) e do HA ($F_{1,56} = 124,8$; $p < 0,001$), e da interação entre eles ($F_{3,56} = 19,11$; $p < 0,001$) no que se refere ao número de cruzamentos. O pré-tratamento do Cg1 com salina, seguido por microinjeções de SIN-1 no HA, não foi capaz de aumentar o número (teste *post hoc* de Tukey; $p > 0,05$) de cruzamentos quando comparado com o grupo controle, tratado com salina no Cg1, seguida por SIN-1 no HA. Porém, o número de cruzamentos exibidos pelos camundongos foi maior quando esses animais receberam microinjeções intra-Cg1 de NMDA antes da administração de SIN-1 no HA. As doses mais altas (1,0 e 10 nmol) de NMDA foram capazes de aumentar o número de cruzamentos quando comparados aos grupos de animais que receberam salina no Cg1, seguido por SIN-1 no HA, e salina no Cg1, seguida de salina no HA (teste *post hoc* de Tukey; $p < 0,001$ and $p < 0,001$, respectivamente). Ademais, os camundongos que foram pré-tratados com NMDA na dose de 10 nmol exibiram mais cruzamentos do que aqueles animais que receberam a dose intermediária da mesma droga (teste *post hoc* de Tukey; $p < 0,05$), como mostrado na figura 14G.

Figura 14. Efeito das microinjeções de salina fisiológica (Sal) ou de NMDA (0,1, 1,0 e 10 nmol/0,1 μ L) na região Cg1 do córtex cingulado anterior, seguidas de salina ou de SIN-1 (300 nmol/0,1 μ L), no hipotálamo anterior de camundongos sobre o o número (A) e a duração (B) das respostas de “congelamento”, o número (C) e a duração (D) das reações de fuga orientada, o número (E) e a duração (F) das reações de fuga não orientada e o número (G) de cruzamentos. Os dados apresentam a mediana (gráfico de pontos de dispersão; cada ponto representa uma resposta por animal); $n = 8$ por grupo; *** $p < 0,001$ comparado com o grupo tratado com Sal no Cg1 + Sal no HA; ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ comparados com o grupo Sal no Cg1 + SIN-1 no HA; # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ comparados com NMDA (0,1 nmol) no Cg1 + SIN-1 no HA; ~ $p < 0,01$ e ~ ~ $p < 0,01$ comparados com NMDA (1,0 nmol) no Cg1 + SIN-1 no HA, de acordo com a ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

De acordo com a análise de variância de duas vias para medidas repetidas, houve um efeito significativo do tratamento ($F_{7,56} = 56,58, p < 0,001$) e do tempo ($F_{9,504} = 119,6, p < 0,001$), bem como um efeito significativo da interação tratamento *versus* tempo ($F_{63,504} = 24,38, p < 0,001$). Animais que receberam microinjeções intra-HA de SIN-1, precedidas pela administração de salina fisiológica no Cg1, exibiram reações defensivas relacionadas com o medo que, por sua vez, aumentou a latência de retirada de cauda até 20 minutos após o final desses comportamentos de defesa, quando comparados com aqueles animais que receberam microinjeções de salina no Cg1, seguidas pela administração de salina no HA (teste *post hoc* de Tukey; $p < 0,05$). A resposta antinociceptiva induzida pelo medo foi atenuada pela ativação dos receptores NMDA do Cg1 por meio de microinjeções de NMDA (1,0 e 10 nmol) nos mesmos tempos (0-20 min após o final dos comportamentos defensivos), de acordo com o teste *post hoc* Tukey ($p < 0,05$ em ambos os casos). Além disso, quando comparado com o grupo controle, que recebeu microinjeções de salina no Cg1, seguidas pela administração de salina no HA, o grupo que recebeu microinjeções das doses mais altas (1,0 e 10 nmol) de NMDA no Cg1, seguidas pela administração de salina no HA, apresentaram uma diminuição na latência de retirada de cauda por 10 minutos e por 20 minutos, respectivamente, após o final dos comportamentos defensivos do tipo pânico (teste *post hoc* de Tukey; $p < 0,05$ em ambos os casos), como mostrado na figura 15.

Figura 15. Efeito das microinjeções de salina fisiológica (Sal) ou de NMDA (0,1, 1,0 e 10 nmol/0,1 μ L) na região Cg1 do córtex cingulado anterior, seguidas de salina ou de SIN-1 (300 nmol/0,1 μ L) no hipotálamo anterior de camundongos sobre o limiar nociceptivo. Os dados apresentam a média $\pm$ EPM, $n = 8$ por grupo; * $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com Sal no Cg1 + Sal no HA; + $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com Sal no Cg1 + SIN-1 no HA; # $p < 0,05$ comprado com o grupo tratado com NMDA (0,1 nmol) no Cg1 + SIN no HA, de acordo com a RM-ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. LB representa o limiar nociceptivo basal.

4.4 Experimento 4

4.4.1 Neurotraçamento de vias que conectam o cortex cingulado anterior ao hipotálamo anterior

A microinjeção do traçador do trato neural BDA fluorescente anterógrado (peso molecular 10000) conjugado com fluoresceína, na região Cg1 da divisão dorsal do córtex cingulado anterior, visando o estudo neuroanatômico de conexões córtico-hipotalâmicas (figura 16A-C), mostrou vias eferentes glutamatérgicas que se originam na região Cg1 do CCA e que se projetam ipsilateralmente para o hipotálamo anterior. Vesículas sinápticas glutamatérgicas em terminais pré-sinápticos de vias provenientes do CCA foram encontradas no hipotálamo anterior (figura 16E-G).

Figura 16. Fotomicrografias de uma secção transversal do córtex cingulado anterior de camundongos C57BL/6, mostrando, em (A), a microinjeção do neurotraçador anterógrado amina dextrana (BDA; 10000 MW) conjugado com fluoresceína na região Cg1 do CCA, em (B), coloração do núcleo das células com DAPI em azul, e, em (C), imagens sobrepostas. Fotomicrografias de uma secção transversal do hipotálamo anterior de um camundongo C57BL/6, mostrando, em (D), coloração do núcleo das células com DAPI em azul, em (E), fibras córtico-hipotalâmicas marcadas com BDA (cabeças de setas abertas) e sinalizadas em verde, em (F), imunomarcção de vesículas sinápticas glutamatérgicas (setas brancas abertas) marcadas em vermelho e (G) BDA marcando fibras córtico-hipotalâmicas (cabeça de seta aberta) e imagens sobrepostas mostrando terminais axônicos marcados com vesículas sinápticas glutamatérgicas (cabeças de setas fechadas) distribuídas no HA, em torno de pericários. A barra de escala representa 200 μm em A-C e 20 μm em D-G.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou os efeitos de doses crescentes do doador de NO, SIN-1, microinjetado no hipotálamo anterior de camundongos, sobre respostas defensivas relacionadas com o medo incondicionado. Em seguida, investigamos os efeitos do pré-tratamento intra-HA com AP-7, um antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, em três diferentes doses, sobre as respostas defensivas evocadas pela administração de SIN-1 no mesmo núcleo hipotalâmico. Além disso, por meio da ativação de neurônios da região dorsal do córtex cingulado anterior, investigamos a participação dessa estrutura cortical límbica na modulação de reações comportamentais e de processos antinociceptivos relacionadas com o medo, organizados por neurônios do HA.

A ativação de neurônios do HA por microinjeções locais de SIN-1 evocou comportamentos defensivos de “congelamento” e de fuga orientada e não orientada. Além disso, esses comportamentos defensivos do tipo pânico, eliciados por microinjeções intra-hipotalâmicas de SIN-1, foram seguidos por uma resposta antinociceptiva relacionada com o medo. Essas reações defensivas do tipo pânico foram exibidas um minuto após os animais receberem a microinjeção de SIN-1 no HA. Embora todos os doadores de NO produzam uma atividade excitatória relacionada à atividade nitrérgica, as vias geradoras de NO diferem entre cada composto. Há evidências de que o SIN-1 produz uma liberação lenta de NO envolvendo a formação do composto intermediário SIN-1C, ou seja, o SIN-1 é convertido em SIN-1A que, então, decompõe-se em NO e SIN-1C (FEELISH; OSTROWSKI; NOACK, 1989; SOUTHAM; GARTHWAITE, 1991). Esse processo demanda oxigênio e está associado a uma formação de agentes oxidantes que poderiam reduzir a meia-vida do NO formado (FEELISH; OSTROWSKI; NOACK, 1989). Dessa forma, este aumento na latência das reações comportamentais do tipo ataque de pânico induzidas por SIN-1 poderia ser um resultado da liberação lenta de NO, promovida por esse tipo de doador.

Nós observamos que os comportamentos defensivos de fuga orientada e não orientada exibidos por camundongos que receberam microinjeções intra-HA nas doses mais altas de SIN-1 foram caracterizados por corridas intercaladas com saltos, ao passo que os animais que receberam a dose mais baixa da droga desencadearam apenas reações de corrida. Apesar das características dos comportamentos de fuga desencadeados pelos roedores que receberam doses mais altas de SIN-1 serem diferentes daquelas exibidas por animais que receberam a dose mais baixa de SIN-1, ambas as reações de fuga foram precedidas por eventos de alerta (dados não mostrados). Porém, somente as doses mais altas de SIN-1 foram capazes de evocar reações de “congelamento”, as quais foram desencadeadas entre os eventos de alerta (atenção defensiva) e de fuga, e também após o final do comportamento de fuga. Esses

resultados demonstram que doses mais altas de SIN-1 provocam um padrão comportamental defensivo progressivo, caracterizado, em seu início, por alerta, seguido por “congelamento” e por fuga, e finalizado com reações de “congelamento”.

Estudos prévios relataram reações defensivas semelhantes, em resposta à ativação de neurônios excitatórios, como por exemplo, os glutamatérgicos, por injeções de NMDA em outras divisões do hipotálamo de roedores (ULLAH et al., 2015; 2017). Esses autores demonstraram que a divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial, quando estimulada quimicamente por altas doses de NMDA, evoca comportamentos do tipo pânico, expressos por “congelamento” e por fuga. Outras evidências demonstraram que a administração de doadores de NO no HA facilita a liberação local de glutamato endógeno (PRAST et al., 1996) e, conforme observado em nosso estudo, provoca comportamentos defensivos do tipo pânico em camundongos. Nesse sentido, podemos arguir que a liberação de glutamato, induzida pela ativação nitrérgica no HA, poderia estar contribuindo para o desencadeamento dos comportamentos defensivos do tipo pânico, como o de “congelamento” e o de fuga.

Além das reações defensivas de “congelamento” e de fuga exibidas pelos camundongos tratados com SIN-1 no HA, nossos resultados mostraram claramente que esses mesmos roedores tiveram um aumento temporário no limiar nociceptivo, mensurado por meio do teste de retirada de cauda realizado após o teste comportamental. A antinocicepção induzida pelo medo tem sido considerada uma resposta defensiva adaptativa, caracterizada por um aumento do limiar nociceptivo que acompanha as reações comportamentais de defesa. Quando os animais vivenciam uma situação aversiva e/ou ameaçadora, esse fenômeno defensivo de supressão de dor, que é ativado pelo recrutamento de neurônios do sistema endógeno de modulação da dor, é desencadeado (BOLLES; FANSELOW, 1980; COIMBRA et al., 2006; 2017). Essa resposta antinociceptiva instintiva pode proporcionar maior chance para a sobrevivência do animal que está exposto a uma situação de perigo, levando o mesmo a evitar um comportamento de recuperação, induzido pela dor (BOLLES; FANSELOW, 1980).

No entanto, não devemos descartar a possibilidade de que esse efeito antinociceptivo tenha sido, pelo menos em parte, resultado da infusão intra-HA de SIN-1. As manipulações farmacológicas associadas à variação biológica no desempenho comportamental, poderiam contribuir para o disparo de uma resposta antinociceptiva, uma vez que comportamentos defensivos relacionados com o medo podem liberar determinados neurotransmissores e hormônios que contribuem para esse fenômeno analgésico. A diminuição da inibição GABAérgica ou um aumento na atividade glutamatérgica de estruturas límbicas e paralímbicas, como hipotálamo e a SCP, respectivamente, por exemplo, podem ativar o sistema

descendente de modulação de dor que inibe neurônios nociceptivos localizados no corno dorsal da medula espinal, resultando em uma inibição da informação sensorial que ascende para estruturas superiores (FALCONI-SOBRINHO et al., 2017a,b; JONES; GEBHART, 1988). Além da influência de aminoácidos excitatórios e de neurotransmissores inibitórios sobre mecanismos nociceptivos, estudos recentes mostraram que a liberação do fator liberador de corticotropina (CRF), por meio de microinjeções de um doador de NO na SCP de camundongos, contribui para desencadear uma resposta analgésica, uma vez que o bloqueio do fator de liberação de corticotropina do tipo 1 (CRFr1) atenuou os efeitos antinociceptivos evocados por injeções intra-SCP do doador de NO NOC-9 (MIGUEL; GOMES; NUNES-de-SOUZA, 2012). Importante ressaltar que o CRF pode induzir a liberação de glutamato (SKÓRZEWSKA et al., 2009), um neurotransmissor que desempenha um papel crítico nos mecanismos de controle da dor (JONES; GEBHART, 1988; BUTLER; FINN, 2009).

Quando a injeção intra-HA de SIN-1 foi precedida pela microinjeção local de AP-7, os comportamentos defensivos do tipo pânico foram inibidos, dependendo da dose administrada de AP-7. Embora a menor dose de AP-7 microinjetada no HA não tenha exercido qualquer efeito antiaversivo e a dose intermediária apenas demonstrou uma tendência em atenuar os comportamentos de fuga, a dose mais alta de AP-7 aboliu tanto os comportamentos de “congelamento”, quanto aqueles de fuga orientada e não orientada, o que demonstra claramente um efeito panicolítico dose-dependente desse antagonista dos receptores do tipo NMDA. Além disso, o bloqueio dos receptores do tipo NMDA com a dose mais alta de AP-7, também foi capaz de atenuar a antinocicepção induzida pelo medo.

O NO induzido por microinjeções intra-HA de SIN-1, possivelmente, modula a liberação pré-sináptica de glutamato. O glutamato, quando liberado na fenda sináptica, liga-se aos receptores do tipo NMDA, promovendo um influxo de Na^+ e de Ca^{2+} para o interior da célula pós-sináptica, além de desencadear uma cascata de eventos intracelulares (MORI; MISHINA, 1995), incluindo a ativação da óxido nítrico sintetase (NOS), uma enzima que produz NO (GARTHWAITE et al., 1989). Esses mecanismos intracelulares promovem maior despolarização celular (MORI; MISHINA, 1995), o que pode desencadear uma variedade de respostas defensivas relacionadas com o medo (CARVALHO-NETTO et al., 2009; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006; ULLAH et al., 2015; 2017). Nesse sentido, é provável que a inibição e a atenuação dos efeitos panicogênicos e antinociceptivos, respectivamente, provocados pela administração intra-HA de SIN-1, tenha ocorrido devido a uma diminuição da atividade glutamatérgica resultante do bloqueio dos receptores do tipo NMDA por microinjeções de AP-7 no HA. Assim, nossos dados sugerem que o sistema glutamatérgico

desempenha um papel crítico na organização de respostas defensivas relacionadas com o medo, induzidas por NO, por recrutar receptores do tipo NMDA localizados no núcleo hipotalâmico anterior (Figura 17).

Figura 17. Representação esquemática sugerindo o papel modulatório exercido pelos receptores NMDA no HA sobre as respostas comportamentais defensivas e antinociceptivas relacionadas com o medo, induzidas por microinjeções locais do doador de óxido nítrico (NO) SIN-1. O NO induzido por SIN-1 possivelmente modula a liberação pré-sináptica do glutamato. Uma vez liberado da fenda sináptica, o glutamato liga-se aos receptores NMDA (+) promovendo um influxo de Na^+ e de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico (MORI; MISHINA, 1995), contribuindo para o desencadeamento de respostas defensivas relacionadas ao medo. Por sua vez, o bloqueio dos receptores NMDA (×) por meio do pré-tratamento do HA com AP-7 inibe os efeitos pró-aversivos e a antinocicepção induzida pelo medo incondicionado, evocados por microinjeções de SIN-1 no HA.

Corroborando esses achados, há estudos demonstrando que os receptores do tipo NMDA localizados no núcleo hipotalâmico posterior, quando bloqueados, também atenuam os comportamentos de fuga do tipo ataque de pânico e a antinocicepção que segue esses comportamentos de defesa (FALCONI-SOBRINHO et al., 2017a). Esses autores demonstraram que infusões de um antagonista competitivo dos receptores do tipo NMDA, o LY235959, no HP, foi capaz de diminuir as reações de corrida e inibir as de saltos, bem como atenuar a resposta antinociceptiva induzida pelo medo. Com efeito, a diminuição da atividade

glutamatérgica no hipotálamo por microinjeções de antagonistas dos receptores do tipo NMDA promove efeitos antiaversivos.

No presente trabalho, além de demonstrarmos uma influência glutamatérgica hipotalâmica relevante, por meio do bloqueio de receptores do tipo NMDA, na modulação de respostas defensivas relacionadas com o medo, induzidas por microinjeções de um doador de óxido nítrico no HA, parte de nossos achados sugere que tanto as reações defensivas do tipo pânico, quanto as alterações nociceptivas desencadeadas por ativação do HA, podem ser moduladas por neurônios corticais glutamatérgicos de longa projeção que se direcionam para o hipotálamo anterior.

Como descrito anteriormente, o glutamato liberado na fenda sináptica liga-se aos receptores do tipo NMDA que promovem para o interior do neurônio pós-sináptico um influxo de cálcio (MORI; MISHINA, 1995) que, por sua vez, é essencial para o mecanismo de síntese de NO (GARTHWAITE et al., 1989). Considerando que a liberação de glutamato no HA, devido ao aumento da atividade de projeções glutamatérgicas do CCA, por microinjeções intra-Cg1 de NMDA, influencia a atividade nitrérgica do HA, envolvida na geração dos comportamentos defensivos do tipo pânico, espera-se que esses animais exibam reações defensivas mais intensas, como a fuga não orientada. Segundo Gray e McNaughton (2000), essa estratégia defensiva exibida por roedores seria desencadeada em situações onde o perigo está próximo, nas quais há pouco tempo para análise da situação.

Nossos resultados demonstraram pela primeira vez que o pré-tratamento do Cg1 com a dose de 10 nmol de NMDA exacerba o comportamento de fuga evocado pela administração intra-HA de SIN-1, devido ao aumento da atividade de projeções glutamatérgicas do CCA para o HA. Além da ativação de neurônios glutamatérgicos do CCA por microinjeções intra-Cg1 de NMDA intensificar os comportamentos de fuga não orientada evocados pela administração de SIN-1 no HA de camundongos, a ativação de neurônios corticais também foi capaz de produzir um aumento significativo na distância percorrida por esses animais, um comportamento que foi caracterizado pelo aumento no número de cruzamentos. Porém, a ativação do CCA com NMDA, seguida da administração de salina fisiológica no AH, não causou comportamentos defensivos do tipo pânico, ou seja, o NMDA *per se* não foi capaz de provocar uma resposta pró-aversiva, mas influenciou os comportamentos defensivos exibidos pelos camundongos que receberam microinjeções intra-HA de SIN-1. O aumento da distância percorrida pelos animais que foram pré-tratados com NMDA (1 e 10 nmol) reforça a hipótese de que a liberação de glutamato no HA, devido à ativação de vias eferentes glutamatérgicas córtico-hipotalâmicas, provoca um efeito pró-aversivo sobre os comportamentos de fuga

induzidos por infusão de SIN-1 no HA. Esses dados sugerem que vias glutamatérgicas CCA-HA desempenham um papel relevante na modulação dos comportamentos defensivos de fuga do tipo pânico organizados no HA.

Essas evidências foram reforçadas por nossos resultados morfológicos que demonstraram fibras marcadas com vesículas sinápticas glutamatérgicas no HA, provenientes de neurônios do CCA, após o depósito de um neurotraçador anterógrado fluorescente no Cg1. Embora a dimensão projectiva do CCA para o HA pareça ser moderada, essas conexões fornecem um substrato neural para a influência exercida por neurônios glutamatérgicos de longa projeção que alcançam o HA sobre os comportamentos de defesa.

Apesar de provocar um efeito pró-aversivo sobre as reações de fuga, o aumento da atividade do CCA pela ativação dos receptores do tipo NMDA no Cg1 promoveu efeito oposto sobre as reações de “congelamento” organizadas por neurônios do HA. A redução da duração de “congelamento” pelo pré-tratamento da região Cg1 do CCA, com NMDA (1 e 10 nmol), foi um resultado inesperado. Uma hipótese é de que vias glutamatérgicas oriundas no giro do cíngulo poderiam estar influenciando outras estruturas límbicas que se conectam com o hipotálamo; por exemplo, o complexo amigdalóide, que também recebe projeções do CCA (BUCHANAN et al., 1994; JHANG et al., 2018) e conecta-se com o hipotálamo anterior (PETROVICH; RISOLD; SWANSON, 1996). Há evidências de que a fotoativação optogenética de vias glutamatérgicas do CCA que se projetam para o complexo amigdalóide inibe as reações de “congelamento” desencadeadas por camundongos expostos ao odor de predadores (JHANG et al., 2018). Por outro lado, esses autores demonstraram que a inativação optogenética do CCA aumenta as respostas de “congelamento” de camundongos submetidos ao mesmo teste. Assim, embora seja provável que os efeitos comportamentais das microinjeções intra-Cg1 de NMDA em nosso estudo sejam, pelo menos em parte, mediados por vias diretas que conectam o CCA ao HA, o CCA se projeta para diferentes estruturas e pode estar regulando esses comportamentos mediante outros circuitos límbicos. Sabe-se que o CCA pode desempenhar um papel crítico na tomada de decisões para estratégias defensivas, tais como fugir (fuga) de uma situação aversiva ou evitar (esquiva inibitória) um estímulo de natureza aversiva, uma vez que esta estrutura cortical é ativada em situações de ameaça distal (MOBBS et al., 2007). Nesse sentido, podemos argumentar que a ativação do CCA pode promover uma interrupção mais precoce da reação de “congelamento” para obter uma possível resposta de fuga quando o animal está exposto a uma situação de perigo. Além disso, há evidências sugerindo que o CCA envia densas projeções para a SCP (SHIPLEY et al., 1991; FILLINGER et al., 2018), proporcionando uma importante fonte de glutamato para o SCPd

(BEITZ; WILLIAMS, 1991), uma região do teto mesencefálico tipicamente envolvida na elaboração das respostas defensivas relacionadas com o medo incondicionado (BRANDÃO et al., 1999), e sugerida como uma estrutura que medeia comportamentos de “congelamento” evocados após a estimulação química hipotalâmica com NMDA (ULLAH et al., 2015).

Coutinho e Menescal-de-Oliveira (2010) demonstraram que a infusão de aminoácidos excitatórios na região dorsal do CCA diminui o comportamento de imobilidade organizados por neurônios da SCPd de cobaias “*Cavia Porcellus*”. Outros autores têm sugerido que o comportamento de “congelamento”, evocado por estimulação química hipotalâmica com NMDA, ocorre devido ao recrutamento de neurônios da SCPd, uma vez que o pré-tratamento da SCPd com cloreto de cobalto (CoCl_2), um bloqueador não seletivo de contatos sinápticos, aboliu as reações defensivas de “congelamento”, mas não aquelas de fuga não orientada induzidas por microinjeções intra-hipotalâmicas de NMDA (ULLAH et al., 2015). Dessa forma, é possível que a SCP seja uma interface para as vias glutamatérgicas que regulam os comportamentos defensivos de “congelamento” desencadeados após estimulação química hipotalâmica.

Além de exercer um controle sobre os comportamentos defensivos do tipo pânico organizados no HA neurônios da região Cg1 do CCA parecem exercer um controle sobre as respostas antinociceptivas induzidas pelo medo incondicionado.

Trabalhos publicados por nosso grupo demonstraram que esse tipo de resposta analgésica relacionada com o medo evocado por estimulação química tanto do hipotálamo medial (de FREITAS et al., 2014), quanto do hipotálamo posterior (FALCONI-SOBRINHO et al., 2017a,b), podem ser mediadas por diferentes regiões do córtex límbico. Neurônios localizados no CPFM, incluindo aqueles da região Cg1 do CCA, são capazes de codificar a intensidade do estímulo nociceptivo (ZHANG et al., 2005) e estão envolvidos no fenômeno de supressão de dor relacionada às emoções (FALCONI-SOBRINHO et al., 2017a,b; BUTLER; FINN, 2009). Segundo Falconi-Sobrinho et al. (2017a, b), a diminuição da atividade excitatória do CCA por microinjeções de lidocaína ou de antagonistas de receptores do tipo NMDA atenua a antinocicepção induzida pelo medo incondicionado, desencadeada pela estimulação química de neurônios do PH. Esses autores demonstraram que a diminuição da antinocicepção pela redução da atividade das vias eferentes glutamatérgicas Cg1-PH está correlacionada com a diminuição dos comportamentos defensivos, uma vez que a redução das reações de fuga foi seguida por uma diminuição da antinocicepção. Contudo, os resultados do presente estudo demonstram uma dissociação entre os efeitos pró-aversivos e nociceptivos causados por microinjeções intra-Cg1 de NMDA, posto que o tratamento do CCA com NMDA na dose de 1

ou 10 nmol diminuiu as latências de retirada da cauda tanto do grupo de camundongos tratado no HA com SIN-1, quanto daquele que recebeu solução de salina fisiológica no mesmo núcleo hipotalâmico. Esses resultados sugerem que a ativação do CCA por altas doses de NMDA, ao invés de ativar sistemas antinociceptivos endógenos, causa um efeito pró-nociceptivo/facilitatório de conexões descendentes facilitatórias da dor. É sabido que a facilitação descendente para entradas sensoriais pode aumentar a percepção dos estímulos sensoriais periféricos (BLISS et al., 2016).

Assim, a manipulação farmacológica de áreas límbicas do CPFM de roedores, explorando a participação de vias eferentes do CCA para o hipotálamo, utilizando modelos animais de medo, proporciona uma melhor compreensão dos circuitos *top-down* envolvidos nos mecanismos de sensibilização central.

Com base nas abordagens farmacológicas utilizadas no presente trabalho explorando mecanismos excitatórios, demonstramos um papel relevante desempenhado por neurônios do HA na elaboração do comportamento defensivo do tipo ataque de pânico e da antinocicepção induzida pelo medo incondicionado. Além disso, nossos resultados sugerem que os efeitos panicogênicos e antinociceptivos provocados por microinjeções intra-HA do doador de NO SIN-1 dependem da ativação do receptor NMDA hipotalâmico. Por fim, o presente estudo demonstrou que a ativação do CCA aumenta os comportamentos defensivos de fuga e reduz o “congelamento” e a antinocicepção organizados pelos neurônios do HA, sugerindo que vias glutamatérgicas que se projetam do CCA para o HA modulam reações defensivas do tipo pânico organizadas nesse mesmo núcleo hipotalâmico, e sua ativação promove pró-nocicepção.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados obtidos no presente estudo sugerem que:

- A estimulação química do hipotálamo anterior com o doador de óxido nítrico SIN-1 em diferentes doses (75, 150 e 300 nmol) evoca comportamentos defensivos do tipo pânico. Porém, apenas as doses mais altas de SIN-1 são capazes de desencadear uma resposta antinociceptiva relacionada com o medo. Além disso, entre as diferentes doses utilizadas no presente trabalho, a de 300 nmol é a mais efetiva em eliciar comportamentos de “congelamento” no HA.
- Os efeitos panicogênicos e antinociceptivos evocados por microinjeções de SIN-1 no hipotálamo anterior dependem da ativação de receptores do tipo NMDA, uma vez que o bloqueio desse tipo de receptor glutamatérgico com o AP-7 foi capaz de inibir os comportamentos defensivos do tipo pânico e a antinocicepção que segue esses comportamentos relacionados com o medo, organizados no HA.
- A ativação da região Cg1 na divisão mais dorsal do córtex cingulado anterior por microinjeções locais de NMDA exacerbam os comportamentos defensivos de fuga induzidos pela administração do doador de óxido nítrico SIN-1 no hipotálamo anterior, sugerindo que eferentes glutamatérgicos do CCA para o HA modulam reações defensivas do tipo pânico organizadas no HA.
- A ativação de receptores do tipo NMDA na região Cg1 do CCA promove pró-nocicepção em camundongos, inclusive quando esses animais exibem um comportamento de medo por ativação nitrérgica no hipotálamo anterior, visto que as doses mais altas de NMDA (1 e 10 nmol) *per se* reduziram o limiar nociceptivo basal e diminuíram a antinocicepção induzida pelo medo evocada por infusões de SIN-1 no HA.
- A região dorsal do córtex cingulado anterior parece exercer um papel relevante na modulação dos comportamentos de defesa e de processos nociceptivos organizados por neurônios localizados na região mais rostral do hipotálamo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS¹

- ADAMS, D. B. Brain mechanisms of aggressive behavior: an updated review. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 30, n. 3, p. 304-18, 2006.
- AGUIAR, D. C.; GUIMARAES, F. S. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 11, p. 2418-29, 2009.
- AGUIAR, D. C.; GUIMARAES, F. S. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 11, p. 2418-29, 2009.
- AIMONE, L. D.; GEBHART, G. F. Spinal monoamine mediation of stimulation-produced antinociception from the lateral hypothalamus. **Brain Res**, v. 403, n. 2, p. 290-300, 1987.
- AIMONE, L. D.; GEBHART, G. F. Serotonin and/or an excitatory amino acid in the medial medulla mediates stimulation-produced antinociception from the lateral hypothalamus in the rat. **Brain Res**, v. 450, n. 1-2, p. 170-80, 1988.
- ALCOCK, J. **Comportamento Animal: Uma abordagem evolutiva**. 9ª Edição, Porto Alegre. Editora: Artmed, 2011
- ALMADA, R. C. et al. Endocannabinoid signaling mechanisms in the substantia nigra pars reticulata modulate GABAergic nigroreticular pathways in mice threatened by urutu-cruzeiro venomous pit viper. **Neuroscience**, v. 303, p. 503-14, 2015.
- ALMADA, R. C.; ALBRECHET-SOUZA, L.; BRANDAO, M. L. Further evidence for involvement of the dorsal hippocampus serotonergic and gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic pathways in the expression of contextual fear conditioning in rats. **J Psychopharmacol**, v. 27, n. 12, p. 1160-8, 2013.
- ALMADA, R. C.; COIMBRA, N. C. Recruitment of striatonigral disinhibitory and nigroreticular inhibitory GABAergic pathways during the organization of defensive behavior by mice in a dangerous environment with the venomous snake *Bothrops alternatus* (Reptilia, Viperidae). **Synapse**, v. 69, n. 6, p. 299-313, 2015.
- ALMADA, R. C.; COIMBRA, N. C.; BRANDAO, M. L. Medial prefrontal cortex serotonergic and GABAergic mechanisms modulate the expression of contextual fear: intratelencephalic pathways and differential involvement of cortical subregions. **Neuroscience**, v. 284, p. 988-97, 2015.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**, v. 12, p. 1-2, 2004.
- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annu Rev Neurosci**, v. 7, p. 309-38, 1984.

¹De Acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

BEITZ, A. J.; WILLIAMS, F. G. Localization of Putative Amino Acid Transmitters in the PAG and their Relationship to the PAG-Raphe Magnus Pathway. In: DEPAULIS, A. e BANDLER, R. (Ed.). **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical, and Neurochemical Organization**. Boston, MA: Springer US, 1991.

BESSON, J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol Rev**, v. 67, n. 1, p. 67-186, 1987.

BIAGIONI, A. F. et al. Serotonergic neural links from the dorsal raphe nucleus modulate defensive behaviours organised by the dorsomedial hypothalamus and the elaboration of fear-induced antinociception via locus coeruleus pathways. **Neuropharmacology**, v. 67, p. 379-94, 2013.

BIAGIONI, A. F.; SILVA, J. A.; COIMBRA, N. C. Panic-like defensive behavior but not fear-induced antinociception is differently organized by dorsomedial and posterior hypothalamic nuclei of *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 4, p. 328-36, 2012.

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

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 3, p. 205-18, 2001.

BLANCHARD, D. C.; TAKAHASHI, S. N. No change in intermale aggression after amygdala lesions which reduce freezing. **Physiol Behav**, v. 42, n. 6, p. 613-6, 1988.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 13, n. 14, p. S3-14, 1989.

BLISS, T. V. et al. Synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex in acute and chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 17, n. 8, p. 485-96, 2016.

BOLLES RC, FANSELOW MS. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. **Behav. Brain Sci.** 3:291, 1980

BORELLI, K. G. et al. Effects of acute and chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 77, n. 3, p. 557-66, 2004.

BRAGA, A. A.; AGUIAR, D. C.; GUIMARAES, F. S. NOC-9, a selective nitric oxide donor, induces flight reactions in the dorsolateral periaqueductal gray of rats by activating soluble guanylate cyclase. **Neurosci Lett**, v. 459, n. 2, p. 79-83, 2009.

BRANDÃO, M. L. et al. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 6, p. 863-75, 1999.

BRANDÃO, M. L. **Psicofisiologia**, 4ª Edição. Rio de Janeiro: Atheneu, 2019.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

- BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 22, p. 9030-3, 1989.
- BROCA, P. 1878. Anatomie comparée des circonvolutions cérébrales: le grande lobe limbique. **Rev Anthropol**, 1: 385–498.
- BUCHANAN, S. L. et al. Efferent connections of the medial prefrontal cortex in the rabbit. **Exp Brain Res**, v. 100, n. 3, p. 469-83, 1994.
- BUTLER, R. K.; FINN, D. P. Stress-induced analgesia. **Prog Neurobiol**, v. 88, n. 3, p. 184-202, 2009.
- CALEJESAN, A. A.; KIM, S. J.; ZHUO, M. Descending facilitatory modulation of a behavioral nociceptive response by stimulation in the adult rat anterior cingulate cortex. **Eur J Pain**, v. 4, n. 1, p. 83-96, 2000.
- CANTERAS, N. S. et al. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. **Brain Res Bull**, v. 44, n. 3, p. 297-305, 1997.
- CANTERAS, N. S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 71, n. 3, p. 481-91, 2002.
- CANTERAS, N. S.; GRAEFF, F. G. Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: implications for panic disorder. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 3, p. 352-64, 2014.
- CARVALHO-NETTO, E. F. et al. Role of glutamate NMDA receptors and nitric oxide located within the periaqueductal gray on defensive behaviors in mice confronted by predator. **Psychopharmacology**, v. 204, n. 4, p. 617-25, 2009.
- COIMBRA, N. C. et al. Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. **Exp Neurol**, v. 197, n. 1, p. 93-112, 2006.
- COIMBRA, N. C. et al. Opioid neurotransmission modulates defensive behavior and fear-induced antinociception in dangerous environments. **Neuroscience**, v. 354, p. 178-195, 2017.
- COIMBRA, N. C.; BRANDAO, M. L. Effects of 5-HT₂ receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. **Behav Brain Res**, v. 87, n. 1, p. 97-103, 1997.
- COIMBRA, N. C.; BRANDAO, M. L. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. **Behav Brain Res**, v. 59, n. 1-2, p. 131-9, 1993.
- COUTINHO, M. R.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Role of homocysteic acid in the guinea pig (*Cavia porcellus*) anterior cingulate cortex in tonic immobility and the influence of NMDA receptors on the dorsal PAG. **Behav Brain Res**, v. 208, n. 1, p. 237-42, 2010.

¹De Acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

DA SILVA SOARES, R., JR. et al. 5-Hydroxytryptamine 2A receptors of the dorsal raphe nucleus modulate panic-like behaviours and mediate fear-induced antinociception elicited by neuronal activation in the central nucleus of the inferior colliculus. **Behav Brain Res**, v. 358, p. 71-81, 2019.

DE ARAUJO MOREIRA, F.; MOLCHANOV, M. L.; GUIMARAES, F. S. Flight reactions to nitric oxide in the inferior colliculus of rats depend on NMDA receptor activation. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 76, n. 1, p. 35-41, 2003.

DE FREITAS, R. L. et al. NMDA and AMPA/kainate glutamatergic receptors in the prelimbic medial prefrontal cortex modulate the elaborated defensive behavior and innate fear-induced antinociception elicited by GABAA receptor blockade in the medial hypothalamus. **Cereb Cortex**, v. 24, n. 6, p. 1518-28, 2014.

DE OLIVEIRA, R. W.; DEL BEL, E. A.; GUIMARAES, F. S. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Brain Res Bull**, v. 51, n. 6, p. 457-64, 2000.

DISCALA, G.; SCHMITT, P.; KARLI, P. Flight induced by infusion of bicuculline methiodide into periventricular structures. **Brain Res**, v. 309, n. 2, p. 199-208, 1984.

DOS ANJOS-GARCIA, T. et al. CB1 cannabinoid receptor-mediated anandamide signalling reduces the defensive behaviour evoked through GABAA receptor blockade in the dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus. **Neuropharmacology**, v. 113, n. Pt A, p. 156-166, 2017.

DSM-V. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. American Psychiatric Association Fifth Edition, 2013.

DUSSE, L.M.S.A.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab**, Brazil, v.39, p. 343-5-, 2003.

FALCONI-SOBRINHO, L. L. et al. Unravelling cortico-hypothalamic pathways regulating unconditioned fear-induced antinociception and defensive behaviours. **Neuropharmacology**, v. 113, n. Pt A, p. 367-385, 2017a.

FALCONI-SOBRINHO, L. L. et al. Decrease in NMDA receptor-signalling activity in the anterior cingulate cortex diminishes defensive behaviour and unconditioned fear-induced antinociception elicited by GABAergic tonic inhibition impairment in the posterior hypothalamus. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 27, n. 11, p. 1120-1131, 2017b.

FANSELOW, M. S. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. **Psychon Bull Rev**, v. 1, n. 4, p. 429-38, 1994.

FARDIN, V.; OLIVERAS, 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, n. 1-2, p. 105-23, 1984.

FARIA, M. P. et al. Anxiety-like responses induced by nitric oxide within the BNST in mice: Role of CRF1 and NMDA receptors. **Horm Behav**, v. 79, p. 74-83, 2016.

¹De Acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

- FEELISCH, M.; OSTROWSKI, J.; NOACK, E. On the mechanism of NO release from sydnonimines. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 14, n. 11, p. S13-22, 1989.
- FERREIRA, M. D.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Role of dorsal raphe nucleus 5-HT(1A) and 5-HT₂ receptors in tonic immobility modulation in guinea pigs. **Brain Res**, v. 18, p. 69-76, 2009.
- FLECK, M. W. et al. Aspartate and glutamate mediate excitatory synaptic transmission in area CA1 of the hippocampus. **J Neurosci**, v. 13, n. 9, p. 3944-55, 1993.
- FREITAS, R. L. et al. GABA(A) receptor blockade in dorsomedial and ventromedial nuclei of the hypothalamus evokes panic-like elaborated defensive behaviour followed by innate fear-induced antinociception. **Brain Res**, v. 11, p. 118-31, 2009.
- FILLINGER, C. et al. Afferents to anterior cingulate areas 24a and 24b and midcingulate areas 24a' and 24b' in the mouse. **Brain Struct Funct**, v. 222, n. 3, p. 1509-1532, 2017.
- FILLINGER, C. et al. Efferents of anterior cingulate areas 24a and 24b and midcingulate areas 24a' and 24b' in the mouse. **Brain Struct Funct**, v. 223, n. 4, p. 1747-1778, 2018.
- FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res Bull**, v. 48, n. 2, p. 129-41, 1999.
- GARTHWAITE, J. et al. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **Eur J Pharmacol**, v. 172, n. 4-5, p. 413-6, 1989.
- GEBHART, G. F.; TOLEIKIS, J. R. An evaluation of stimulation-produced analgesia in the cat. **Exp Neurol**, v. 62, n. 3, p. 570-9, 1978.
- GRAEFF, F. G. Minor tranquilizers and brain defense systems. **Braz J Med Biol Res**, v. 14, n. 4-5, p. 239-65, 1981.
- GRAEFF, F.G. & GUIMARÃES F.S. **Fundamentos da Psicofarmacologia**. 4ª Edição. São Paulo: Atheneu, 2012.
- GRAY, J.A., MCNAUGHTON, N. The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry in to the Functions of the Septo-hippocampal System, 2nd Edition. Oxford University Press, Oxford. (2000)
- GUIX, F. X. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog Neurobiol**, v. 76, n. 2, p. 126-52, 2005.
- HASSEL, B.; DINGLEDINE R. IN: SIEGEL, G.J.; ALBERS, R.W.; BRANDY, S.T. PINCE, D.L. Basic Neurochemistry.Molecular, Cellular and Medical Aspects.7a edição. Elsevier. p. 267-290, (2006).
- HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. **Annu Rev Neurosci**, v. 17, p. 31-108, 1994.

¹De Acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

HYLDEN, J. L. et al. Spinal lamina I neurons projecting to the parabrachial area of the cat midbrain. **Brain Res**, v. 336, n. 1, p. 195-8, 1985.

JHANG, J. et al. Anterior cingulate cortex and its input to the basolateral amygdala control innate fear response. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 018-05090, 2018.

JINGAMI, H.; NAKANISHI, S.; MORIKAWA, K. Structure of the metabotropic glutamate receptor. **Curr Opin Neurobiol**, v. 13, n. 3, p. 271-8, 2003.

JONES, S. L.; GEBHART, G. F. Inhibition of spinal nociceptive transmission from the midbrain, pons and medulla in the rat: activation of descending inhibition by morphine, glutamate and electrical stimulation. **Brain Res**, v. 460, n. 2, p. 281-96, 1988.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, 2001.

KEIM, S. R.; SHEKHAR, A. The effects of GABAA receptor blockade in the dorsomedial hypothalamic nucleus on corticotrophin (ACTH) and corticosterone secretion in male rats. **Brain Res**, v. 739, n. 1-2, p. 46-51, 1996.

KEMP, J. A.; MCKERNAN, R. M. NMDA receptor pathways as drug targets. **Nat Neurosci**, v. 5, n. 42, 2002.

KHODOROV, B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 86, n. 2, p. 279-351, 2004.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem J**, v. 298, n. Pt 2, p. 249-58, 1994.

KWIAT, G. C.; BASBAUM, A. I. The origin of brainstem noradrenergic and serotonergic projections to the spinal cord dorsal horn in the rat. **Somatosens Mot Res**, v. 9, n. 2, p. 157-73, 1992.

LAGATTA, D. C. et al. Medial prefrontal cortex TRPV1 and CB1 receptors modulate cardiac baroreflex activity by regulating the NMDA receptor/nitric oxide pathway. **Pflugers Arch**, v. 470, n. 10, p. 1521-1542, 2018.

LAURENCE, L. BRUNTON; BRUCE, A. CHABNER; KNOLLMANN, B. **As bases farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**, 12ª Edição. Editora: Mcgraw-Hi. A Neurotransmissão e Sistema Nervoso Central (Perry B. Molinoff). Cap. 14; 379, (2012).

LISBOA, S. F.; GUIMARAES, F. S. Differential role of CB1 and TRPV1 receptors on anandamide modulation of defensive responses induced by nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 8, p. 2455-62, 2012.

LOVICK, T. A. Selective modulation of the cardiovascular response but not the antinociception evoked from the dorsal PAG, by 5-HT in the ventrolateral medulla. **Pflugers Arch**, v. 416, n. 1-2, p. 222-4, 1990.

¹De Acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

MACHADO, A.B.M. **Neuroanatomia Funcional**. Editora: Ateneu, 2º ed. Cap.29 pag. 287-307, 2000.

MARTINEZ, R. C. et al. Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. **Behav Brain Res**, v. 192, n. 2, p. 185-90, 2008.

MAYER, D. J.; LIEBESKIND, J. C. Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain: an anatomical and behavioral analysis. **Brain Res**, v. 68, n. 1, p. 73-93, 1974.

MACLEAN, P. *The Triune Brain in Evolution*. Plenum. New York, 1989.

MCCLELLAND, W. J.; COLMAN, F. D. Activity and different types of electric shock stimuli. **Psychonomic Science**, v. 7, n. 11, p. 391-392, 1967.

MCNALLY, G. P.; PIGG, M.; WEIDEMANN, G. Opioid receptors in the midbrain periaqueductal gray regulate extinction of pavlovian fear conditioning. **J Neurosci**, v. 24, n. 31, p. 6912-9, 2004.

MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L.; HOFFMANN, A. The parabrachial region as a possible region modulating simultaneously pain and tonic immobility. **Behav Brain Res**, v. 56, n. 2, p. 127-32, 1993.

MIGUEL, T. T.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. **Brain Res**, v. 3, n. 1, p. 42-8, 2006.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.

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

MISSLIN, R. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. **Neurophysiol Clin**, v. 33, n. 2, p. 55-66, 2003.

MOBBS, D. et al. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. **Science**, v. 317, n. 5841, p. 1079-83, 2007.

MONTAGUE, P. R. et al. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. **Science**, v. 263, n. 5149, p. 973-7, 1994.

MOREIRA, F. A.; MOLCHANOV, M. L.; GUIMARAES, F. S. Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**, v. 171, n. 2, p. 199-203, 2004.

MORI, H.; MISHINA, M. Structure and function of the NMDA receptor channel. **Neuropharmacology**, v. 34, n. 10, p. 1219-37, 1995.

MANSOURI, F. A.; TANAKA, K.; BUCKLEY, M. J. Conflict-induced behavioural adjustment: a clue to the executive functions of the prefrontal cortex. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 2, p. 141-52, 2009.

¹De Acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

NIXON, P. G. The grey area of effort syndrome and hyperventilation: from Thomas Lewis to today. **J R Coll Physicians Lond**, v. 27, n. 4, p. 377-83, 1993.

OPPENHEIMER, B. S. Neurocirculatory Asthenia and Related Problems in Military Medicine. **Bull N Y Acad Med**, v. 18, n. 6, p. 367-82, 1942.

PAPEZ, J. 1937. A proposed mechanism of emotion. **Arch. Neurol. Psychiatry** 38: 725–743.

PASCHOALIN-MAURIN, T. et al. The Rodent-versus-wild Snake Paradigm as a Model for Studying Anxiety- and Panic-like Behaviors: Face, Construct and Predictive Validities. **Neuroscience**, v. 369, p. 336-349, 2018.

PAXINOS G; FRANKLIN K.B.J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**, San Diego, Elsevier Academic Press, 2001.

PETROVICH, G. D.; RISOLD, P. Y.; SWANSON, L. W. Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. **J Comp Neurol**, v. 374, n. 3, p. 387-420, 1996.

PRAST, H. et al. Modulation of histamine release in the hypothalamus by nitric oxide. **Inflamm Res**, v. 46, n. 1, p. S41-2, 1997.

PURVES, D.; AUGUSTINE G.; FITZPATRICK D.; LAWRENCE K.; ANTHONY-SAMUEL L.; MCNAMARA J.; MARK W.; **Neuroscience**. 2ªEd., 2001.

REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v. 164, n. 3878, p. 444-5, 1969.

RHODES, D. L. Periventricular system lesions and stimulation-produced analgesia. **Pain**, v. 7, n. 1, p. 51-63, 1979.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z Rheumatol**, v. 60, n. 6, p. 404-15, 2001.

SANIDES, F. **Functional architecture of motor and sensory cortices in primates in the light of a new concept of neocortex evolution**. In the Primate Brain. C.R. Noback & W. Montagna, Eds.: 137–208. Appleton-Century-Crofts. New York, 1970.

SCHENBERG, L. C. et al. Modeling panic attacks. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 7-8, p. 647-59, 2001.

SCHIMITTEL, F. G. et al. Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. **Neuroscience**, v. 200, p. 59-73, 2012.

SHEKHAR, A. Effects of treatment with imipramine and clonazepam on an animal model of panic disorder. **Biol Psychiatry**, v. 36, n. 11, p. 748-58, 1994.

¹De Acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

SHEKHAR, A.; DIMICCO, J. A. Defense reaction elicited by injection of GABA antagonists and synthesis inhibitors into the posterior hypothalamus in rats. **Neuropharmacology**, v. 26, n. 5, p. 407-17, 1987.

SHIPLEY, M. T. et al. Topographical Specificity of Forebrain Inputs to the Midbrain Periaqueductal Gray: Evidence for Discrete Longitudinally Organized Input Columns. In: DEPAULIS, A. e BANDLER, R. (Ed.). **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical, and Neurochemical Organization**. Boston, MA: Springer US, 1991.

SKORZEWSKA, A. et al. The effect of CRF and alpha-helical CRF (9-41) on rat fear responses and amino acids release in the central nucleus of the amygdala. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 2, p. 148-56, 2009.

SOUTHAM, E.; GARTHWAITE, J. Intercellular action of nitric oxide in adult rat cerebellar slices. **Neuroreport**, v. 2, n. 11, p. 658-60, 1991.

SUDHOF, T. C. The synaptic vesicle cycle: **Annu Rev Neurosci**, v. 27, p. 509-47, 2004.

SUDHOF, T. C. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. **Nature**, v. 375, n. 6533, p. 645-53, 1995.

ULLAH, F. et al. Connexions between the dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal grey matter are critical in the elaboration of hypothalamically mediated panic-like behaviour. **Behav Brain Res**, v. 319, p. 135-147, 2017.

ULLAH, F. et al. Relevance of dorsomedial hypothalamus, dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal gray matter in the organization of freezing or oriented and non-oriented escape emotional behaviors. **Behav Brain Res**, v. 293, p. 143-52, 2015.

URIBE-MARINO, A. et al. Anti-aversive effects of cannabidiol on innate fear-induced behaviors evoked by an ethological model of panic attacks based on a prey vs the wild snake *Epicrates cenchria crassus* confrontation paradigm. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 2, p. 412-21, 2012.

VIANA, M.B.; FREUD.; DARWIN: **ANSIEDADE COMO SINAL, UMA RESPOSTA ADAPTATIVA AO PERIGO**. *Natureza Humana* 12(1): 163-196, 2010.

VOGT, B. A.; BERGER, G. R.; DERBYSHIRE, S. W. Structural and functional dichotomy of human midcingulate cortex. **Eur J Neurosci**, v. 18, n. 11, p. 3134-44, 2003.

VOGT, B.A. Cingulate gyrus. In *The Human Nervous System* (2nd edn) (Paxinos, G.; Mai, J.K., eds.), pp. 915–949, Elsevier (2004).

WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. **J Clin Neurophysiol**, v. 14, n. 1, p. 2-31, 1997.

WOOLEY, C. F. Jacob Mendez DaCosta: medical teacher, clinician, and clinical investigator. **Am J Cardiol**, v. 50, n. 5, p. 1145-8, 1982.

¹De Acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and other common mental disorders: global health estimates**. World Health Organization, 2017.

XU, L. et al. Nitric oxide (NO) serves as a retrograde messenger to activate neuronal NO synthase in the spinal cord via NMDA receptors. **Nitric Oxide**, v. 17, n. 1, p. 18-24, 2007.

YERKES R. M.; DODSON J. D. (1908). The Relation of Strength of Stimulus to Rapidity of Habitformation. **J Comp Neurol**, 18, 459-482.

ZHANG, L.; ZHANG, Y.; ZHAO, Z. Q. Anterior cingulate cortex contributes to the descending facilitatory modulation of pain via dorsal reticular nucleus. **Eur J Neurosci**, v. 22, n. 5, p. 1141-8, 2005.

¹De Acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

ANEXO

Journal of Psychopharmacology
2018, Vol. 32(6) 711–722
© The Author(s) 2018
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0269881118769061
journals.sagepub.com/home/jop

The Nitric Oxide Donor SIN-1-Produced Panic-Like Behaviour And Fear-Induced Antinociception Are Modulated By NMDA Receptors In The Anterior Hypothalamus

Luiz Luciano Falconi-Sobrinho^{1,2,3} and Norberto Cysne Coimbra^{1,2,3}

Abstract

Background: An excitatory imbalance in the hypothalamus of rodents caused by local chemical stimulation elicits fear-related defensive reactions such as escape and freezing. In addition, these panic attack-like defensive reactions induced by hypothalamic neurons may cause antinociception. However, there is a shortage of studies showing the participation of the anterior hypothalamic nucleus in these adaptive defensive mechanisms. Nitric oxide (NO) donors have been shown to evoke fear-related defensive responses when microinjected into paralimbic and limbic structures, and this excitatory neuromodulation can recruit the glutamatergic system.

Aims: The aim of this work was to investigate the influence of the glutamatergic system in the nitrgic effects on fear-related defensive responses organised by anterior hypothalamic neurons.

Methods: The present study evaluates the effects of the molsidomine active metabolite SIN-1 NO donor administered into the anterior hypothalamus (AH) of mice at different concentrations (75, 150 and 300 nmol/0.1 µL). Then, we investigated the effects of pre-treatment of the AH with AP-7 (an *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-selective antagonist; 0.02, 0.2 and 2 nmol/0.1 µL) on the behavioural and antinociceptive effects provoked by AH chemical stimulation with SIN-1 microinjections.

Results: The 300 nmol dose of SIN-1 was the most effective at causing panic-like defensive behaviours followed by a significant antinociceptive response. In addition, both of these effects were attenuated or inhibited by AH pre-treatment with AP-7.

Conclusions: These findings suggest that the panicogenic and antinociceptive effects evoked by intra-AH microinjections of SIN-1 depend on NMDA receptor activation.

Keywords

Anterior hypothalamus, defensive behaviour, fear-induced antinociception, glutamate, nitric oxide, NMDA receptors

Introduction

The anterior hypothalamus (AH) is a diencephalic region considered to be a part of the hypothalamic defensive system and is proposed to play a critical role in anti-predatory defensive reactions (Canteras, 2002; Canteras et al., 1997). Some studies using immunohistochemical techniques have shown an increase in the expression of the Fos protein in this hypothalamic nucleus of rodents upon exposure to a natural predator (Canteras et al., 1997; Martinez et al., 2008; Paschoalin-Maurin et al., 2018). However, there is little evidence showing the defensive behavioural pattern evoked by local chemical stimulation in the AH. Activation of excitatory neurons in limbic and paralimbic structures by microinjections of excitatory neuromodulators, nitric oxide (NO) donors (Faria et al., 2016; Moreira et al., 2004), or NMDA (*N*-methyl-D-aspartic acid) receptor agonist (Ullah et al., 2015) causes fear-related defensive reactions, which are considered panic attack-like behaviours. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS), an enzyme responsible for the synthesis of NO, and glutamate are found in the AH of rodents (Edelmann et al., 2007; Shioda et al., 2012), and both NO and glutamate interact to result in neuronal activation (Prast et al., 1996) in different neural networks.

The binding of glutamate, the main neurotransmitter mediating excitatory transmission in the central nervous system

(CNS) (Catena-Dell'Osso et al., 2013), to NMDA receptors promotes a calcium influx that activates nNOS (Garthwaite et al., 1989). Once synthesised at the post-synaptic terminal, NO can assume the role of a retrograde messenger targeting the presynaptic terminal, thereby activating the soluble guanylate cyclase (sGC) enzyme that facilitates activation of glutamate-linked cyclic guanosine monophosphate (cGMP) (Bredt and Snyder, 1989; Knowles et al., 1989). Thus, NO has been considered an important messenger molecule that may facilitate glutamate release in the CNS through feedback mechanisms (Montague et al., 1994).

¹Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Brazil

²NAP-USP-Neurobiology of Emotions Research Centre, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Brazil

³Behavioural Neurosciences Institute, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Corresponding author:

Norberto Cysne Coimbra, Laboratório de Neuroanatomia & Neuropsicobiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Avenida Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, 14049-900 São Paulo, Brazil.
Email: nccoimbra@fmrp.usp.br

Among the glutamatergic receptors that have been proposed to be involved in the regulation of NO levels, the NMDA receptor has been suggested to play a key role in hypothalamic defensive reactions and fear-induced antinociception. Recent studies have shown that NMDA receptor blockade in other hypothalamic nuclei, such as the dorsal premammillary (Aguar and Guimarães, 2011) and the posterior (PH) nuclei (Falconi-Sobrinho et al., 2017b), reduces escape reactions triggered by hypothalamic neurons. In addition, the antinociceptive response that followed the PH-mediated defensive behaviours was also attenuated by local NMDA receptor blockade (Falconi-Sobrinho et al., 2017b). Fear-induced antinociception occurs by activation of the endogenous pain modulatory system and can originate from hypothalamic neurons (Biagioni et al., 2013; for review see Butler and Finn, 2009). Other studies using intra-mesencephalic pharmacological approaches have shown that the NMDA receptor can mediate fear-related defensive responses evoked by local microinjection of the NO donor SIN-1, an active metabolite of molsidomine. For example, the blockade of NMDA receptors in both periaqueductal grey (PAG) matter and the inferior colliculus was able to impair the jumping reaction and locomotor activity (distance moved), respectively, induced by SIN-1 microinjected in these same midbrain tectum structures (de Araújo Moreira et al., 2003; Moreira et al., 2004). In fact, the NMDA receptor seems to influence the nitrgic effect on mesencephalic defensive behaviours. However, there is a lack of studies showing the influence of the glutamatergic system on the nitrgic effect, both in fear-related behaviours and in the antinociceptive mechanisms organised by AH neurons.

The aim of the present study was to investigate the role of NMDA receptors in the control of panic-like defensive behaviour and unconditioned fear-induced antinociception evoked by microinjections of the NO donor SIN-1 in the AH. The hypothesis of the present work was that AH pre-treatment with the NMDA receptor selective antagonist AP-7 (2-amino-7-phosphonoheptanoic acid) at different concentrations would impair both the fear-related defensive behavior and antinociceptive responses elicited by the NO donor SIN-1 microinjected into the AH.

Material and methods

Animals

Male C57BL/6 mice (10–12 weeks, weighing 30–35 g, $N = 79$; $n = 7$ per group for experiment 1 and $n = 6–8$ for experiment 2) from the animal facility of Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP) were studied. The mice were kept five to a cage and were habituated in the experimental room for at least 48 h prior to the experiments with free access to water and food. The enclosure was maintained under a 12/12-h light/dark cycle (lights on from 7 am to 7 pm) and at a constant room temperature of $23 \pm 1^\circ\text{C}$. All efforts were made to minimise animal suffering. The experiments were performed in accordance with the recommendations of the Commission of Ethics in Animal Experimentation of the FMRP-USP (process 187/2015), which is consistent with the ethical principles in animal research adopted by the National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and were approved by the Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) on 29/2/2016.

Stereotaxic surgery

Animals underwent deep anaesthesia with 100 mg/kg ketamine (Ketamine Agener, União Química Farmacêutica Nacional, São Paulo, Brazil) and 10 mg/kg xylazine (Calmium, União Química Farmacêutica Nacional, São Paulo, Brazil) and were fixed in a stereotaxic frame (David Kopf, USA). A stainless-steel guide cannula (outer diameter 0.6 mm, inner diameter 0.4 mm) was implanted in the diencephalon, targeting 1 mm above the AH. The following coordinates, based on the Paxinos and Franklin (2001) mouse brain in stereotaxic coordinates atlas and using bregma as the reference, were used for the AH: anteroposterior: -0.70 mm; mediolateral: -0.6 mm; and dorsoventral: -4.0 mm. The guide cannula was fixed to the skull using acrylic resin. At the end of the surgery, each guide cannula was sealed with a stainless-steel wire to protect it from obstruction. After stereotaxic surgery, each mouse was treated with an intramuscular injection of penicillin G-benzathine (120,000 UI; 0.1 mL) followed by subcutaneous injection of the non-steroidal analgesic and anti-inflammatory flunixin meglumine (2.5 mg/kg) (Schering-Plough, São Paulo, SP, Brazil). After surgery, the rodents were allowed to recover for 4 days before the behavioural tests.

Experiment 1: microinjection of an NO donor into the AH

After stereotaxic surgery, the mice were placed in a polygonal arena and maintained there for habituation with free access to food and water for 3 days. At the end of the habituation period, each animal was submitted to three measures of control tail-flick latencies to determine the baseline nociceptive threshold. On the next day, independent groups of mice were randomly assigned to receive microinjections of vehicle (0.9% NaCl/0.1 μL) or the NO donor SIN-1 at different concentrations (75, 150 and 300 nmol/0.1 μL) into the AH using a dental needle (0.3 mm OD) 1 mm longer than the guide cannula aimed at the AH. The drug or vehicle were injected through a polyethylene tube (PE-10) in a volume of 0.1 μL for 30 s using a 5 μL syringe (Hamilton, Reno, NV, USA) connected to an infusion pump (Stoelting, Kiel, WI, USA). To prevent reflux, the dental needle was left in place for 15 s after the end of each injection.

After the intra-AH administrations of SIN-1, mice were placed in a polygonal arena and behavioural responses were quantitatively analysed every minute for 10 min. To perform the behavioural test, a quadrangular transparent acrylic arena ($140 \times 62 \times 50$ cm³; polygonal arena) was used. The floor of the quadrangular arena was made of a transparent acrylic platform, placed on a rectangular stainless-steel plaque below the arena. The arena was divided by red lines into 20 equal rectangles (4.2 mm width; Pritt mark-it). In the arena, there was a shelter box (black acrylic; $10 \times 7 \times 5$ cm³) and two stairs with a small platform (safe places) (Almada and Coimbra, 2015; Almada et al., 2015). After 10 min of the behavioural tests, the nociceptive threshold was measured at 10 min intervals for 60 min.

Experiment 2: microinjection of an NMDA receptor antagonist into the AH

The postoperative procedures until the day of the experiment were the same as those for the animal groups submitted to

experiment 1. On the day of the experiment, each animal was pre-treated with microinjections of 0.02, 0.2 or 2 nmol/0.1 μ L DL-AP7 or vehicle (0.9% NaCl/0.1 μ L) into the AH. Ten minutes later, 300 nmol of the NO donor SIN-1 or vehicle was microinjected into the AH as described in the previous experiment. After the intra-AH administration of the NO donor or vehicle, the defensive responses displayed by mice in the arena were quantitatively analysed for 10 min, and immediately after the behavioural tests, the nociceptive threshold was measured at 10-min intervals for 60 min.

Behavioural tests

The behavioural reactions displayed by mice were recorded for 10 min using a video camera (Handycam, Sony Corporation, Osaka, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan). Behavioural defensive reactions were quantified by measuring the number and duration of freezing events characterised by defensive immobility for at least 6 s followed by an autonomic reaction, such as defecation, exophthalmia, and/or micturition (Coimbra et al., 2017; Uribe-Mariño et al., 2012). Escape behaviour was expressed as the number and duration of oriented escape or non-oriented escape responses, which were defined as running and jumping towards the stairs and/or the burrow or running and jumping in a direction in the arena other than towards the stairs and/or the burrow, respectively (Almada et al., 2015). Both freezing and escape defensive behaviour are typically considered panic-like behaviours (Blanchard et al., 2001; Borelli et al., 2004; Schenberg et al., 2001; Shekhar, 1994).

Nociceptive testing

The nociception thresholds of the experimental animals were compared using the tail-flick test. Each animal was placed in a restraining apparatus (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil) with acrylic walls, and its tail was placed on a heating sensor (tail-flick Analgesia Instrument; FMRP-USP Precision Workshop facilities, Ribeirão Preto, SP, Brazil). The amount of heat applied to the tail was increased until the animal removed its tail from the apparatus. The coil (Ni/Cr alloy; 26.04 cm in length $\times$ 0.02 cm in diameter) began at room temperature (approximately 20°C), and then current was applied to increase the coil temperature at a rate of 9°C/s (Falconi-Sobrinho et al., 2017a). Small adjustments in the current intensity were made, if necessary, at the beginning of the experiment (baseline records) to obtain three consecutive tail-flick latencies between 2.5 and 3.5 s. If the animal did not remove its tail from the heater within 6 s, the apparatus was turned off to prevent damage to the skin. Three baseline measurements of control tail-flick latencies were made at 5-min intervals. In the experiment, tail-flick latencies were measured at 10 min intervals for 60 min immediately after the defensive behaviour observation.

Drugs

Experiment 1. The NO donor SIN-1 (3-morpholiniosydnonimine hydrochloride; Tocris Biosciences, Bristol, United Kingdom) at 75, 150 (Lisboa and Guimarães, 2012) or 300 nmol/0.1 μ L (de Oliveira et al., 2000) or saline (0.9% NaCl/0.1 μ L) was microinjected into the AH.

Experiment 2. The NO donor SIN-1 at 300 nmol/0.1 μ L or saline (0.9% NaCl/0.1 μ L) was microinjected into the AH following the local microinjection of 0.02, 0.2 (Faria et al., 2016) or 2 nmol/0.1 μ L (Aguilar and Guimarães, 2011) DL-AP7 (DL-2-amino-7-phosphonoheptanoic acid; Tocris Bioscience, Avonmouth, Bristol, UK) or saline (0.9% NaCl/0.1 μ L). The drugs were dissolved in physiological saline shortly before each central microinjection.

Histology

Upon completion of the behavioural experiments, the animals were anaesthetised with 100 mg/kg ketamine (Ketamina®) and 10 mg/kg xylazine (Dopaser®) and perfused through the left cardiac ventricle using an infusion pump (Master Flex® L/S TM, Vernon Hills, IL, USA). The thoracic descending aorta was clamped, the pericardial heart wrap was released to allow perfusion through left ventricle, and blood was washed out with Tyrode buffer (40 mL at 4°C). The animal was then perfused with 200 mL ice-cold 4% (w/v) paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.3) for 15 min at a pressure of 50 mmHg. The brain was quickly removed, maintained in 4% paraformaldehyde for at least 4 h, and then immersed in a 20% sucrose solution for 24 h followed by a 10% sucrose solution for another 24 h. Tissue pieces were immersed in 2-methylbutane (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), frozen on dry ice (30 min), embedded in Tissue Tek, and cut on a cryostat (CM 1950, Leica, Mannheim, Germany). The slices were then mounted on glass slides that were coated with chrome alum gelatine to prevent detachment and stained in a robotic autostainer (CV 5030 Leica Autostainer) with haematoxylin-eosin. The sections were viewed under a motorised photomicroscope (Axiolmager Z1, Zeiss, Oberkochen, Germany), and the positions of the tips of the guide cannulae and injector needle were localised according to the Paxinos and Franklin (2001) mouse brain in stereotaxic coordinates atlas.

Statistical analysis

All data were submitted to Shapiro-Wilk's test of normality. GraphPad Prism version 7.0 was used for statistical analyses. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls' post hoc tests were used to analyse data related to behavioural studies of experiment 1, since all groups passed the normality test ($n = 7$ mice per group) per group. On the other hand, the groups of animals that comprise experiment 2 did not pass the normality test. Thus, the number and duration of the panic-like defensive behaviours for experiment 2 were analysed by Kruskal-Wallis non-parametric test followed by Dunn's post hoc test ($n = 6-8$ mice per group). Data from the nociceptive threshold experiments collected immediately after the end of the defensive behaviour were submitted to a repeated measures two-way ANOVA (RM-ANOVA) followed by Tukey's post hoc test. Data normally distributed were represented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). We represented data that do not follow a Gaussian distribution as median. In all cases, differences were considered significant when $p < 0.05$.

The nociceptive threshold recorded immediately after the defensive behaviour (t_0) and the sum of the number of defensive behaviours (freezing and oriented/non-oriented escape) were

used to perform a linear regression analysis to study the correlation between panic attack-like defensive behaviours and antinociception.

Results

Experiment 1: effect of increasing doses of intra-AH NO donor (SIN-1) on behavioural reactions and fear-induced antinociception

Behavioural reactions. According to the one-way ANOVA followed by a Newman–Keuls post hoc test, there was a significant effect of treatment on the number ($F_{3,24} = 15.23, p < 0.001$) and duration ($F_{3,24} = 22.87, p < 0.001$) of freezing events. Intra-AH treatment with the NO donor SIN-1 at 150 and 300 nmol evoked freezing reactions ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively, considering the number of events and ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively, considering the duration of freezing response) compared to vehicle- and SIN-1 (75 nmol)-treated groups. In addition, the effect of the highest dose of SIN-1 was significantly different from the intermediate dose on both the number $p < 0.05$ and duration ($p < 0.001$) of freezing events; see Figure 1(a) and (b).

Regarding escape behaviour, there was a significant effect of SIN-1 treatment on the number ($F_{3,24} = 10.24, p < 0.001$) and duration ($F_{3,24} = 8.88, p < 0.001$) of oriented escape reactions and on the number ($F_{3,24} = 5.381, p < 0.001$) and duration ($F_{3,24} = 6.623, p < 0.001$) of non-oriented escape reactions, according to one-way ANOVA. Intra-AH treatment with SIN-1 at 75, 150 and 300 nmol caused a dose-dependent effect, increasing the number (Newman–Keuls post hoc test; $p < 0.05, p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) and duration (Newman–Keuls post hoc test; $p < 0.001, p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively) of oriented escape behaviour responses; see Figure 1(c) and (d). In addition, there was a significant difference between the effects of intra-AH treatment with SIN-1 at 75 and 300 nmol on the number of oriented escape behaviour responses (Newman–Keuls post hoc test; $p < 0.05$, Figure 1(c)). Although microinjections of SIN-1 in the AH at different doses elicited escape reactions, according to one-way ANOVA, only the highest doses of SIN-1 (150 and 300 nmol) significantly increased the number (Newman–Keuls post hoc test; $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively) and duration (Newman–Keuls post hoc test; $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) of non-oriented escape behaviour responses when compared with those exhibited by the vehicle-treated control group; see Figure 1(e) and (f).

Antinociceptive response. The defensive behaviours that were evoked by the activation of the AH with the NO donor SIN-1 were followed by a fear-related antinociceptive response. According to the two-way RM-ANOVA, there were statistically significant effects of treatment ($F_{9,60} = 46.4, p < 0.001$) and time ($F_{3,180} = 65.68, p < 0.001$) as well as an interaction between treatment and time ($F_{27,180} = 14.19, p < 0.001$). The group of rodents that received intra-AH microinjections of SIN-1 at the highest doses exhibited an antinociceptive response from zero to 20 min after the panic-like defensive behaviours, while the group that received SIN-1 at the lowest dose (75 nmol) had an increase in tail withdrawal latency only at t_0 compared to the vehicle-control group (Tukey's post hoc tests; $p < 0.05$). In addition, the unconditioned fear-induced antinociception displayed by animals

treated with intra-AH microinjections of SIN-1 at the highest doses (150 and 300 nmol) were significantly different from that displayed by mice treated with SIN-1 at 75 nmol from 0 to 20 min (Tukey's post hoc tests; $p < 0.05$); see Figure 2(a).

In addition, a significant positive correlation was observed between the panic-like defensive behaviours and antinociception ($r^2 = 0.867$; $df_{1,2} = 13.03$; $p < 0.05$); see Figure 2(b).

Experiment 2: effect of AH pre-treatment with AP-7 on the panic-like defensive behaviour and fear-induced antinociception elicited by AH microinjections of the NO donor SIN-1 at the highest dose

Behavioural reactions. Similar to the first set of experiments, AH treatment with 300 nmol SIN-1 induced freezing and oriented/non-oriented escape behaviours. In addition, these panic-like defensive reactions induced by intra-AH SIN-1 injections were attenuated or inhibited by NMDA receptor blockade through microinjections of AP-7 in the same hypothalamic nucleus; see Figure 3(a)–(f).

According to the Kruskal–Wallis test, there was a significant effect of treatment on the number ($F_{8,52} = 46.04, p < 0.001$) and duration ($F_{8,52} = 44.34, p < 0.001$) of freezing events. The intra-AH SIN-1 microinjections preceded by local administration of saline evoked freezing, with these mice exhibiting more freezing events and a longer freezing duration (Dunn's post hoc test; $p < 0.05$ and $p < 0.05$, respectively) than the vehicle + vehicle-treated control group. However, pre-treatment of the AH with 2 nmol AP-7 inhibited the freezing behaviours (according to Dunn's post hoc test; $p < 0.05$ to number and duration). In addition, 2 nmol + SIN-1-treated group was different from those 0.02 nmol + SIN-1-treated ($p < 0.01$ to number and $p < 0.05$ to duration) and 0.2 nmol + SIN-1-treated group ($p < 0.05$ to number and duration of freezing events), according to Dunn's post hoc test; see Figure 3(a) and (b).

Regarding escape behaviour, there was a significant effect of treatment on the number ($F_{8,52} = 44.98, p < 0.001$) and duration ($F_{8,52} = 44.57, p < 0.001$) of oriented escape responses and on the number ($F_{8,52} = 45.54, p < 0.001$) and duration ($F_{8,52} = 43.83, p < 0.001$) of non-oriented escape responses. The vehicle + SIN-1-treated group displayed a greater number and duration of both oriented and non-oriented escape reactions (Dunn's post hoc test; $P < 0.01$ in all cases) than the vehicle + vehicle-treated control group. Pre-treatment of the AH with AP-7 at the highest dose abolished both oriented and non-oriented escape behaviour (Dunn's post hoc test; $p < 0.01$ in all cases). In addition, intra-AH treatment with AP-7 2 nmol was different from the 0.02 nmol + SIN-1-treated on both the number ($p < 0.05$) and duration ($p < 0.05$) of oriented escape, and the number ($p < 0.01$) and duration ($p < 0.01$) of non-oriented escape, according to Dunn's post hoc test. However, there was no statistically significant difference between the 0.2 and 2 nmol doses of AP-7 in escape panic-like reactions (Newman–Keuls post hoc test; $p > 0.5$ in all cases); see Figure 3(c) to (f).

Antinociceptive response. SIN-1 microinjected into the AH induced panic-like defensive behaviour that were followed by antinociception. According to a two-way RM-ANOVA, there

Figure 1. Effect of central microinjection of SIN-1 (75, 150 and 300 nmol/0.1 µL) or vehicle (NaCl 0.9%/0.1 µL) into the anterior hypothalamus (AH) of mice on the number and duration of freezing responses (a, b), number and duration of oriented escape responses (c, d) and number and duration of non-oriented escape responses (e, f). Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM) (scatter dot plot; each dot representing one response per animal); $n = 7$ per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with the vehicle (veh)-treated control group. + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ and +++ $p < 0.001$ compared with the SIN-1 at 75 nmol-treated group. # $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ compared with the SIN-1 at 150 nmol-treated group (according to one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc tests).

were statistically significant effects of treatment ($F_{5,30} = 19.89$, $p < 0.001$) and time ($F_{9,270} = 64.03$, $p < 0.001$) as well as an interaction between treatment and time ($F_{45,270} = 13.17$, $p < 0.001$). The panic-like behaviours were followed by significantly longer tail-flick latencies from 0 to 20 min after escape behaviour than those exhibited by the vehicle-treated control group (Tukey's post hoc tests; $p < 0.05$). When compared to AH vehicle + SIN-1 treatment, the blockade of AH NMDA receptors through local administration of AP-7 at the higher doses (0.2 and 2 nmol) reduced the

antinociceptive response recorded immediately after panic-like defensive behaviour and lasting 20 min ($p < 0.05$ in both cases). In addition, when compared with AP-7 (0.02) + SIN-1 treatment, these both doses of AP-7 attenuated the antinociception in the same time-window. There were no significant differences between AP-7 (0.02 nmol) + SIN-1 and vehicle + SIN-1 treatments ($p > 0.05$). Intra-AH microinjections of AP-7 in a dose of 2 nmol followed by SIN-1 microinjection in the AH caused significantly different effects from those caused by AP-7 (0.2 nmol)

Figure 2. (a) Effect of central microinjection of SIN-1 (75, 150 and 300 nmol/0.1 μ L) or vehicle (NaCl 0.9%/0.1 μ L) into the anterior hypothalamus (AH) of mice on nociceptive thresholds; $n = 7$ per group. Data are represented as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). * $p < 0.05$ compared with the vehicle (veh)-treated control group. # $p < 0.05$ compared with the 75 nmol SIN-1-treated group (according to two-way RM-ANOVA followed by Tukey's post hoc tests). (b) Linear regression curve showing the correlation between panic-like defensive behaviour and antinociception after the intra-AH microinjections of the NO donor SIN-1 (75, 150 and 300 nmol) or vehicle into the AH.

+ SIN-1 intra-hypothalamic treatment at time 0 and 10 min ($p < 0.05$) after panic-like defensive behaviour; see Figure 4(a).

In addition, a significant positive correlation was observed between panic-like defensive behaviours and unconditioned fear-induced antinociception ($r^2 = 0.9742$; $df_{1,6} = 226.8$; $p < 0.05$); see Figure 4(b).

Histology. Histologically confirmed sites of the SIN-1 (75, 150 and 300 nmol) or vehicle microinjections into the AH corresponding to experiment 1 (Figure 5(a)) and sites of the intra-AH microinjections of vehicle or AP-7 (0.02, 0.2 and 2 nmol) followed by vehicle or SIN-1 (300 nmol) from experiment 2 (Figure 5(b)) are shown in schematic drawings of coronal sections of the C57BL/6 mouse brain. The number of points illustrated in the figure is less than the total number of mice because of overlapping microinjection sites.

Discussion

The present work investigated the effects of microinjections of the NO donor SIN-1 into the AH of mice on behavioural reactions and unconditioned fear-induced antinociception. Then, we studied the effects of AH NMDA receptor blockade through local microinjections of three different doses of AP-7, an NMDA receptor antagonist, on the fear-related responses evoked by SIN-1 microinjection into the same hypothalamic nucleus. Intra-AH injections of the SIN-1 evoked escape behaviour expressed by running interspersed with jumps at the highest doses and only running at the lowest dose. These defensive escape reactions, which are thought to be akin to panic attack behavioural responses (Schenberg et al., 2001; Shekhar, 1994), were preceded by alertness reactions (data not shown) and freezing events. Panic-like freezing reactions were also exhibited by the animals at the end of the escape behaviour. Curiously, although the lower dose of the

Figure 3. Effect of central microinjections of AP-7 (0.02, 0.2 and 2 nmol/0.1 μ L) or vehicle (NaCl 0.9%/0.1 μ L) into the anterior hypothalamus (AH) of mice on the number and duration of freezing responses (a, b), number and duration of oriented escape responses (c, d) and number and duration of non-oriented escape responses (e, f) induced by the intra-AH microinjection of 300 nmol SIN-1 or vehicle. Data are represented as median (scatter dot plot; each dot representing one response per animal); $n = 6-8$ per group. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ compared with the vehicle (Veh) + 300 nmol SIN-1-treated group. + $p < 0.05$ and ++ $p < 0.01$ compared with the Veh + SIN-1-treated group. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ compared with the 0.02 nmol AP-7 + 300 nmol SIN-1-treated group. - $p < 0.05$ compared with the 0.2 nmol AP-7 + 300 nmol SIN-1-treated group (according to Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc tests).

SIN-1 microinjected into the AH also caused escape reactions, it was unable to provoke freezing, whereas increasing doses of the SIN-1 provoked a progressive defensive behavioural pattern. Interestingly, previous studies have reported similar defensive

reactions in response to activation with NMDA of another division of the hypothalamus of rats (Ullah et al., 2015). These authors suggested that the dorsomedial part of the ventromedial hypothalamus (dmVMH), when chemically stimulated by high doses of

Figure 4. (a) Effect of central microinjections of AP-7 (0.02, 0.2 and 2 nmol/0.1 μ L) or vehicle (NaCl 0.9%/0.1 μ L) into the anterior hypothalamus (AH) of mice on nociceptive thresholds; $n = 6-8$ per group. Data are represented as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). * $p < 0.05$ compared with the vehicle (veh)-treated control group. # $p < 0.05$ compared with the vehicle (veh) + 300 nmol SIN-1-treated group. + $p < 0.05$ compared with the 0.02 nmol AP-7 + 300 nmol SIN-1-treated control group. - $p < 0.05$ compared with the 0.2 nmol AP-7 + 300 nmol SIN-1-treated control group (according to two-way RM-ANOVA followed by Tukey's *post hoc* tests). (b) Linear regression curve showing the correlation between panic attack-like defensive behaviour and antinociception after the intra-AH microinjections of vehicle or AP-7 (0.02, 0.2 and 2 nmol/0.1 μ L) followed by vehicle or 300 nmol SIN-1 microinjected into the same structure.

NMDA, recruits midbrain tectum neurons that mediate freezing and more intense defensive behaviours such as non-oriented escape. In that same study, pre-treatment of the dorsal PAG matter (dPAG) with the non-selective blocker of synaptic contacts cobalt chloride (CoCl_2) abolished the freezing and non-oriented escape responses caused by intra-dmVMH microinjections of NMDA. However, these rats still exhibited oriented escape behaviour, demonstrating that panic-like behaviours, such as freezing and non-oriented escape, mediated by the activation of excitatory amino acids in more rostral hypothalamic nuclei depend on the recruitment of neurons from the dPAG. In addition, microinjections of NO donors in the AH facilitate local glutamate release (Prast et al., 1996). As previously stated, endogenous glutamate is released by activation of NO/cGMP signal transduction pathways (Bredt and Snyder, 1989). In this sense, NO-induced glutamate release in the AH, in addition to contributing to the triggering of

oriented escape behaviours, may also recruit neurons from the PAG responsible for the triggering of the freezing response.

Although all NO donors produce NO-related activity, NO-generating pathways differ for each compound. SIN-1 produces a slow NO release involving the formation of the intermediate compound SIN-1C that is to say SIN-1 is converted to SIN-1A, which then decomposes to NO and SIN-1C (Feelisch et al., 1989; Southam and Garthwaite, 1991). This process demands oxygen and is associated with a formation of oxidative agents that could reduce the half-life of NO formed (Feelisch et al., 1989). Corroborating the literature, our findings demonstrate that the action of SIN-1 in triggering panic attack-like defensive behaviours in mice seems to be somewhat slower than those exhibited by rodents that received, for example, DEA/NO (de Oliveira et al., 2000) an NO donor that releases NO more rapidly (Southam and Garthwaite, 1991). This increased latency

Figure 5. Diagrammatic representation of coronal sections of the C57BL/6 mouse brain illustrating (a) sites of intra-AH microinjections of vehicle (○) or SIN-1 at 75 (■), 150 (▲) and 300 (●) nmol/0.1 μ L, corresponding to experiment 1, and (b) sites of intra-AH microinjections of vehicle + vehicle (○), AP-7 at 0.02 (□), 0.2 (Δ) and 2 (◇) nmol/0.1 μ L + vehicle, vehicle + SIN-1 (●), AP-7 at 0.02 (■), 0.2 (▲) and 2 (◆) nmol/0.1 μ L + SIN-1, corresponding to experiment 2. The histologically confirmed microinjection sites are depicted on illustrations modified from the Paxinos and Franklin (2001) mouse brain in stereotaxic coordinates atlas. Photomicrograph of a diencephalic (bottom corner) coronal section of a mouse at bregma -0.82 mm, showing a representative site of central microinjections of drugs in the anterior hypothalamus. Scale bar: 200 μ m. Histological staining: haematoxylin and eosin.

of the SIN-1-induced panic attack-like behavioural reactions could be a result of the slow release of NO produced by this donor through the formation of the SIN-1C.

When SIN-1 injection was preceded by microinjection of AP-7 in the AH, the panic-like defensive behaviours were attenuated or inhibited depending on the administered AP-7 dose. Although the lower dose of AP-7 injected into the AH was unable to have an anti-aversive effect, the higher dose of AP-7 abolished the defensive reactions, clearly demonstrating a dose-dependent panicolytic effect of the NMDA receptor antagonist. In this sense, because AH NMDA receptor blockade was able to inhibit NO-induced unconditioned fear-like behaviours, our findings suggest that the glutamatergic system plays a critical role in the organisation of NO-induced escape defensive behaviour by recruiting NMDA receptors in the anterior hypothalamic nucleus (Figure 6).

In addition to the panicolytic effects produced by NMDA receptor blockade through intra-AH AP-7 microinjections on the NO-mediated hypothalamic escape behaviour, the present work also provided new evidence demonstrating that AH NMDA receptors are critically recruited to mediate NO-induced freezing behaviour.

Studies using animal models of anxiety such as the elevated plus-maze test (EPM) have demonstrated an anxiolytic effect of AP-7 in different structures related to emotions, such as the

bed nucleus of the stria terminalis (BNST) (Faria et al., 2016), PAG (Molchanov and Guimarães, 2002) and dmVMH (Jardim et al., 2005). Here, in the behavioural measure following intra-AH administration of vehicle, mice did not exhibit any defensive behavioural responses. Thus, this floor effect does not allow us to interpret whether NMDA receptor blockade alone has an anxiolytic effect in this paradigm. NO donors have been also implicated to study the modulation of anxiety-like behaviours. However, it seems to have controversial effects on this type of behavioural response. Studies by Li and Quock (2002) using the mouse light/dark exploration test have shown an increase in the time spent by mice in the light compartment after intracerebroventricular injection of SIN-1. On the other hand, intra-BNST (Faria et al., 2016) or intra-PAG (Miguel et al., 2012) injections of other NO donor, the NOC-9, decrease the time spent in open arms by mice exposed to the EPM (Faria et al., 2016).

Additionally, our results clearly showed that these NO-mediated defensive reactions organised by AH neurons were followed by a significant antinociceptive response. Unconditioned fear-induced antinociception has been considered an important defensive response characterised by an increase in the nociceptive threshold accompanying defensive behavioural reactions (Bolles and Fanselow, 1980; Coimbra et al., 2006, 2017). When animals experience a threatening situation, this defensive

Figure 6. Schematic diagram suggesting the modulatory role of NMDA receptors in the AH on fear-related behavioural and antinociceptive responses induced by local microinjections of the nitric oxide (NO) donor SIN-1. NO induced by SIN-1 possibly modulates the presynaptic release of glutamate. Once released from the synaptic cleft, glutamate binds to the NMDA receptor (+) promoting an influx of Na^+ and Ca^{2+} into the postsynaptic cell (Mori and Mishina, 1995) and contributing to the triggering of fear-related adaptive responses. In turn, the blockade of NMDA receptors ($\times$) by AP-7 in AH inhibits the proaversive effects and unconditioned fear-induced antinociception elicited by microinjections of SIN-1 in the anterior hypothalamus (AH).

phenomenon of pain suppression, which is activated by the recruitment of neurons from the endogenous pain modulatory system, is triggered (de Oliveira et al., 2017). This instinctive analgesic response may provide a greater chance of animal survival in a dangerous situation by leading to the avoidance of pain-induced recuperative behaviour (Coimbra et al., 2017).

However, we should not rule out the possibility that this analgesic effect was at least partially a result of intra-AH infusion of SIN-1. The combination of the pharmacological manipulation and differences in behavioural performance could contribute to the antinociceptive effects (e.g. fear-related defensive behaviours release neurotransmitters or hormones that contribute to the antinociceptive effects). For example, decreases in GABAergic inhibition or glutamatergic activation of limbic structures, such as the hypothalamus and PAG, can activate the endogenous pain modulatory system, which inhibits nociception-related neurons in dorsal horn of the spinal cord, resulting in an antinociceptive response (Falconi-Sobrinho et al., 2017a; Jones and Gebhart, 1988). Interestingly, corroborating our findings, the decrease of glutamatergic neurotransmission in telencephalic and diencephalic structures such as amygdala (Lee et al., 2001) and hypothalamus (Falconi-Sobrinho et al., 2017b) by local microinjection of NMDA receptor antagonists attenuates fear-related antinociceptive effects. In addition to the influence of excitatory amino acids on nociceptive mechanisms, recently published studies have suggested that the release of corticotropin-releasing factor (CRF) by microinjections of NO donor in the PAG of mice contributes to triggering an analgesic response, since that the blockade of corticotropin-releasing

factor type 1 receptor (CRF_1) attenuated antinociceptive effects evoked after injections of the NO donor NOC-9 within the PAG (Miguel et al., 2012). Finally, it is also important to point out that CRF can induce glutamate release (Skórzewska et al., 2009), which plays an important role in control mechanisms of pain (Jones and Gebhart, 1988; for a review, see Butler and Finn, 2009).

In the present work, the antinociceptive response that followed the panic attack-like defensive behaviours elicited by the enhancement of nitergic neuromodulators in the AH was reduced after local NMDA receptor blockade. Interestingly, control animals that received intra-AH treatment with AP-7 followed by physiological saline microinjections in the same hypothalamic nucleus did not show significant changes in the tail withdrawal latency recorded by the tail-flick test, suggesting that NMDA receptor blockade in the AH per se has no intrinsic effect on baseline nociceptive thresholds. Although pharmacological studies have shown a dissociation between defensive behaviour and antinociception elicited in hypothalamic nuclei (Biagioni et al., 2016; de Freitas et al., 2014), our findings suggest that the reduction in antinociception observed after NMDA receptor blockade is due to a lack of (or decrease in) panic-like defensive reactions and not to an AP-7 pre-treatment effect per se.

Finally, our findings were obtained with unilateral microinjections of drugs, a procedure that elicited and modulated adaptive behavioural responses. Indeed, it is surprising that both electrical and chemical unilateral stimulation of each key structure of the limbic system, such the amygdaloid complex, the hypothalamus and even dorsal midbrain outputs of the

encephalic aversion system (the PAG matter, the superior colliculus and the inferior colliculus) elicit robust defensive behavioural responses usually followed by unconditioned fear-induced antinociception (Coimbra et al., 2006; Coimbra and Brandão, 1997; Coimbra et al., 1992; de Oliveira et al., 2017; Falconi-Sobrinho et al., 2017a, 2017b; Leite-Panissi et al., 2003) similar to that displayed in the presence of predators (Coimbra et al., 2017). It seems that the encephalic aversion system and the hypothalamic defensive system act as a defence neural network, so that the activation of a given structure of this aversive stimulus-responsive neuronal network produces an adaptive defensive behaviour. We decided to reach a single limbic system nucleus situated in one side of the median line to preserve relevant connections involved in the defence neural network as previously demonstrated (Falconi-Sobrinho et al., 2017b; Ullah et al., 2017).

In conclusion, the pharmacological approaches used in the present work exploring excitatory mechanisms demonstrate a relevant role played by AH neurons in the elaboration of panic attack-like defensive behaviour and unconditioned fear-induced antinociception. In addition, our results suggest that the panicogenic effects provoked by intra-AH microinjections of the NO donor SIN-1 depend on hypothalamic NMDA receptor activation.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by FAPESP (grant numbers 2007/01174-1, 2012/03798-0 and 2017/11855-8) and CNPq (grant numbers 483763/2010-1 and 474853/2013-6). LL Falconi-Sobrinho was supported by FAPESP (MSc process 2013/10984-8) and CNPq (MSc fellowship process 134267/2013-3; ScD fellowship process 145258/2015-7). NC Coimbra is a researcher (level 1A) at CNPq (processes 301905/2010-0 and 301341/215-0).

References

- Aguilar DC and Guimarães FS (2011) Blockade of NMDA or NO in the dorsal premammillary nucleus attenuates defensive behaviors. *Physiol Behav* 103: 279–283.
- Almada RC and Coimbra NC (2015) Recruitment of striatonigral disinhibitory and nigroreticular inhibitory GABAergic pathways during the organization of defensive behavior by mice in a dangerous environment with the venomous snake *Bothrops alternatus* (Reptilia, Viperidae). *Synapse* 69: 299–313.
- Almada RC, Roncon CM, Elias-Filho DH, et al. (2015) Endocannabinoid signaling mechanisms in the substantia nigra pars reticulata modulate GABAergic nigroreticular pathways in mice threatened by urutu-cruzeiro venomous pit viper. *Neuroscience* 303: 503–514.
- Biagioni AF, de Freitas RL, da Silva JA, et al. (2013) Serotonergic neural links from the dorsal raphe nucleus modulate defensive behaviours organised by the dorsomedial hypothalamus and the elaboration of fear-induced antinociception via locus coeruleus pathways. *Neuropharmacology* 67: 379–394.
- Biagioni AF, de Oliveira RC, de Oliveira R, et al. (2016) 5-Hydroxytryptamine 1A receptors in the dorsomedial hypothalamus connected to dorsal raphe nucleus inputs modulate defensive behaviours and mediate innate fear-induced antinociception. *Eur Neuropsychopharmacol* 26: 532–545.
- Blanchard DC, Griebel G and Blanchard RJ (2001) Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 205–218.
- Bolles RC and Fanselow MS (1980) A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behav Brain Sci* 3: 291–301.
- Borelli KG, Nobre MJ, Brandão ML, et al. (2004) Effects of acute and chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter. *Pharmacol Biochem Behav* 77: 557–566.
- Bredt DS and Snyder SH (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9030–9033.
- Butler RK and Finn DP (2009) Stress-induced analgesia. *Prog Neurobiol* 88: 184–202.
- Canteras NS (2002) The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 481–491.
- Canteras NS, Chiavegatto S, Ribeiro do Valle LE, et al. (1997) Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res Bull* 44: 297–305.
- Catena-Dell'Osso M, Fagioli A, Rotella F, et al. (2013) Glutamate system as target for development of novel antidepressants. *CNS Spectr* 18: 188–198.
- Coimbra NC, Tomaz C and Brandão ML (1992) Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum. *Behav Brain Res* 50: 77–83.
- Coimbra NC and Brandão ML (1997) Effects of 5-HT₂ receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. *Behav Brain Res* 87: 97–103.
- Coimbra NC, Calvo F, Almada RC, et al. (2017) Opioid neurotransmission modulates defensive behavior and fear-induced antinociception in dangerous environments. *Neuroscience* 354: 178–195.
- Coimbra NC, de Oliveira R, de Freitas RL, et al. (2006) Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. *Exp Neurol* 197: 93–112.
- de Araújo Moreira F, Molchanov ML and Guimarães FS (2003) Flight reactions to nitric oxide in the inferior colliculus of rats depend on NMDA receptor activation. *Pharmacol Biochem Behav* 76: 35–41.
- de Freitas RL, Salgado-Rohner CJ, Biagioni AF, et al. (2014) NMDA and AMPA/kainate glutamatergic receptors in the prelimbic medial prefrontal cortex modulate the elaborated defensive behavior and innate fear-induced antinociception elicited by GABAA receptor blockade in the medial hypothalamus. *Cereb Cortex* 24: 1518–1528.
- de Oliveira R, de Oliveira RC, Falconi-Sobrinho LL, et al. (2017) 5-Hydroxytryptamine_{2A/2C} receptors of nucleus raphe magnus and gigantocellularis/paragigantocellularis pars alpha reticular nuclei modulate the unconditioned fear-induced antinociception evoked by electrical stimulation of deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal grey matter. *Behav Brain Res* 316: 294–304.
- de Oliveira RW, Del Bel EA and Guimarães FS (2000) Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Brain Res Bull* 51: 457–464.
- Edelmann M, Wolfe C, Scordalakes EM, et al. (2007) Neuronal nitric oxide synthase and calbindin delineate sex differences in the developing hypothalamus and preoptic area. *Dev Neurobiol* 67: 1371–1381.
- Falconi-Sobrinho LL, Anjos-Garcia T, de Oliveira R, et al. (2017a) Decrease in NMDA receptor-signaling activity in the anterior cingulate cortex

- diminishes defensive behaviour and unconditioned fear-induced antinociception elicited by GABAergic tonic inhibition impairment in the posterior hypothalamus. *Eur Neuropsychopharmacol* 27: 1120–1131.
- Falconi-Sobrinho LL, dos Anjos-Garcia T, Elias-Filho DH, et al. (2017b) Unravelling cortico-hypothalamic pathways regulating unconditioned fear-induced antinociception and defensive behaviours. *Neuropharmacology* 113: 367–385.
- Faria MP, Miguel TT, Gomes KS, et al. (2016) Anxiety-like responses induced by nitric oxide within the BNST in mice: role of CRF1 and NMDA receptors. *Horm Behav* 79: 74–83.
- Feelisch M, Ostrowski J and Noack E (1989) On the mechanism of NO release from sydnonimines. *J Cardiovasc Pharmacol* 14: S13–S22.
- Garthwaite J (1991) Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 14: 60–67.
- Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, et al. (1989) NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 172: 413–416.
- Jardim MC, Aguiar DC, Moreira FA, et al. (2005) Role of glutamate ionotropic and benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus on anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 82: 182–189.
- Jones SL and Gebhart GF (1988) Inhibition of spinal nociceptive transmission from the midbrain, pons and medulla in the rat: activation of descending inhibition by morphine, glutamate and electrical stimulation. *Brain Res* 460: 281–296.
- Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, et al. (1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5159–5162.
- Lee HJ, Choi J-S, Brown TH, et al. (2001) Amygdalar NMDA receptors are critical for the expression of multiple conditioned fear responses. *J Neurosci* 21: 4116–4124.
- Leite-Panissi CRA, Coimbra NC and Menescal-de-Oliveira L (2003) The cholinergic stimulation of the central amygdala modifying the tonic immobility response and antinociception in guinea pigs depends on the ventrolateral periaqueductal gray. *Brain Res Bull* 60: 167–178.
- Li S and Quock RM (2002) Effects of a nitric oxide donor on behavior and interaction with nitrous oxide in the mouse light/dark exploration test. *Eur J Pharmacol* 447: 75–78.
- Lisboa SF and Guimarães FS (2012) Differential role of CB1 and TRPV1 receptors on anandamide modulation of defensive responses induced by nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology* 62: 2455–2462.
- Martinez RCR, Carvalho-Netto EF, Amaral VCS, et al. (2008) Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. *Behav Brain Res* 192: 185–190.
- Miguel T, Gomes K and Nunes-de-Souza R (2012) Contrasting effects of nitric oxide and corticotropin-releasing factor within the dorsal periaqueductal gray on defensive behavior and nociception in mice. *Braz J Med Biol Res* 45: 299–307.
- Molchanov M and Guimarães F (2002) Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology* 160: 30–38.
- Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, et al. (1994) Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* 263: 973–977.
- Mori H and Mishina M (1995) Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34: 1219–1237.
- Moreira FA, Molchanov ML and Guimarães FS (2004) Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology* 171: 199–203.
- Paschoalin-Maurin T, Dos Anjos-Garcia T, Falconi-Sobrinho LL, et al. (2018) The Rodent-versus-wild Snake Paradigm as a Model for Studying Anxiety- and Panic-like Behaviors: Face, Construct and Predictive Validities. *Neuroscience* 369: 336–349.
- Paxinos G and Franklin KBJ (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press.
- Prast H, Lamberti C, Fischer H, et al. (1996) Nitric oxide influences the release of histamine and glutamate in the rat hypothalamus. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 354: 731–735.
- Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré ECM, et al. (2001) Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 647–659.
- Shekhar A (1994) Effects of treatment with imipramine and clonazepam on an animal model of panic disorder. *Biol Psychiatry* 36: 748–758.
- Shioda K, Nisijima K, Kasai M, et al. (2012) Risperidone attenuates the increase of extracellular nitric oxide and glutamate levels in serotonin syndrome animal models. *Neurosci Lett* 528: 22–26.
- Skórzewska A, Bidziński A, Hamed A, et al. (2009) The effect of CRF and α -helical CRF(9–41) on rat fear responses and amino acids release in the central nucleus of the amygdala. *Neuropharmacology* 57: 148–156.
- Southam E and Garthwaite J (1991) Intercellular action of nitric oxide in adult rat cerebellar slices. *Neuroreport* 2: 658–660.
- Ullah F, dos Anjos-Garcia T, dos Santos IR, et al. (2015) Relevance of dorsomedial hypothalamus, dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal gray matter in the organization of freezing or oriented and non-oriented escape emotional behaviors. *Behav Brain Res* 293: 143–152.
- Ullah F, dos Anjos-Garcia T, Mendes-Gomes J, et al. (2017) Connexions between the dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal grey matter are critical in the elaboration of hypothalamically mediated panic-like behaviour. *Behav Brain Res* 319: 135–147.
- Uribe-Mariño A, Francisco A, Castiblanco-Urbina M, et al. (2012) Anti-aversive effects of cannabidiol on innate fear-induced behaviors evoked by an ethological model of panic attacks based on a prey vs the wild snake *Epicrates cenchria crassus* confrontation paradigm. *Neuropsychopharmacology* 37: 412–421.

Manuscript Details

Manuscript number	PNP_2019_225
Title	Top-down control of anterior hypothalamus-mediated panic-like behaviour and fear-induced antinociception by anterior cingulate cortex neurons
Article type	Research Paper

Abstract

The medial “prefrontal” cortex (mPFC) has been proposed to regulate the unconditioned fear-related defensive responses organised by diencephalic neurons. It is known that an excitatory imbalance in the hypothalamus by local microinjections of the nitric oxide (NO) donor SIN-1, an active metabolite of molsidomine, provokes panic-like defensive reactions, which can be accompanied by an antinociceptive response. In addition, this hypothalamic nitroergic neuromodulation can be mediated by the glutamatergic system. In previous reports it was demonstrated that the anterior cingulate cortex (ACC), a limbic structure that comprises part of the mPFC, control, through glutamatergic pathways, defensive behaviours and fear-induced antinociception triggered by neurons located in the posterior hypothalamus. However, there is a lack of studies showing the participation of the ACC in the control of unconditioned fear-related defensive responses organised by anterior hypothalamus (AH) neurons. To understand this cortical mediation, it was characterised ACC-AH glutamatergic pathways and investigated the effects of ACC neurons chemical activation by intra-Cg1 microinjections of NMDA at different doses (0,1, 1 and 10 nmol) on panic-like defensive behaviour and fear-induced antinociception evoked by intra-AH administration of SIN-1 (300 nmol). Microinjections of a fluorescent anterograde neural tract tracer into the Cg1, showed glutamatergic vesicle-labelled axonal fibres in the AH perikarya. The activation of ACC with NMDA increased escape behaviour, but reduced freezing and antinociception organised by AH neurons. These findings suggest that glutamatergic pathways from ACC modulate panic-like defensive reactions organised by AH neurons, and its activation promotes pronociception.

Keywords	Anterior cingulate cortex; Anterior hypothalamus; Analgesia, Defensive behaviour; Nitric Oxide, NMDA receptors; Panic.
Taxonomy	Behavioral Neuroscience, Neural Basis of Emotion, Neuropharmacology, Comparative Neuroanatomy, Mental Disorder
Corresponding Author	NORBERTO CYSNE COIMBRA
Corresponding Author's Institution	University of são Paulo
Order of Authors	Luiz Luciano Falconi-Sobrinho, NORBERTO CYSNE COIMBRA
Suggested reviewers	Anantha Shekhar, Christopher Lowry, Regina Claudia Barbosa da Silva

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

COVER LETTER-PNBP.doc [Cover Letter]

Highlights.docx [Highlights]

Falconi-Sobrinho_and_Coimbra, 2019_Corrigido.docx [Manuscript File]

Figure 1.tif [Figure]

Figure 2.tif [Figure]

Figure 3.tif [Figure]

Figure 4.tif [Figure]

LLFalconi-Sobrinho_Ethical Statement.pdf [Ethical Statement]

NCCoimbra_Ethical Statement.pdf [Ethical Statement]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Laboratório de Neuroanatomia e Neuropsicobiologia – Dep^{to}. de Farmacologia
Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP
CEP 14049-900 - Telefone: (016) 3315-3116
E-mail: nccoimbr@fmrp.usp.br - Fac-simile: (016) 3315-3349.

Ribeirão Preto, March 18, 2019.

Dr. Louis Gendron Editor-in-Chief
Progress in Neuro-Psycopharmacology and Biological Psychiatry Office

Dear Dr. Drolet,

I am submitting to Progress in Neuro-Psycopharmacology and Biological Psychiatry the manuscript “Top-down control of anterior hypothalamus-mediated panic-like behaviour and fear-induced antinociception by anterior cingulate cortex neurons”, by Falconi-Sobrinho and Coimbra. There is a lack of studies showing the participation of the ACC in the control of unconditioned fear-related defensive responses organised by anterior hypothalamus (AH) neurons. To understand this cortical mediation, it was characterised ACC-AH glutamatergic pathways and investigated the effects of ACC neurons chemical activation by intra-Cg1 microinjections of NMDA at different doses (0,1, 1 and 10 nmol) on panic-like defensive behaviour and fear-induced antinociception evoked by intra-AH administration of SIN-1 (300 nmol). Microinjections of a fluorescent anterograde neural tract tracer into the Cg1, showed glutamatergic vesicle-labelled axonal fibres in the AH perikarya. The activation of ACC with NMDA increased escape behaviour, but reduced freezing and antinociception organised by AH neurons. These findings suggest that glutamatergic pathways from ACC modulate panic-like defensive reactions organised by

AH neurons, and its activation promotes pronociception. I also inform: (i) that the findings of this manuscript has not been previously published; (ii) it is not under consideration for publication elsewhere; (iii) all authors have read and approved the final version of this manuscript; (iv) all protocols used were in accordance to the rules for animal experimentation set of the Experimental Ethic Commission from FMRP-USP which are based on the ethic principles of the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior (SBNeC). All protocols are also in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory animals (NIH Publications No. 80-23; revised in 1996).

I hope this manuscript will be suitable for publication in this important journal.

Sincerely yours,

Norberto Cysne Coimbra, M.D., MSc., Sc.D.

Highlights

The activation of ACC-AH glutamatergic pathways exacerbates the escape behaviour

Glutamatergic projections from ACC to AH decrease freezing responses

Panic attack-like reactions induced by NO are followed by fear-induced analgesia

The activation of Cg1 neurons of the ACC with NMDA promotes pronociception

Top-down control of anterior hypothalamus-mediated panic-like behaviour and fear-induced antinociception by anterior cingulate cortex neurons

Luiz Luciano Falconi-Sobrinho^{1,2,3}, Norberto Cysne Coimbra^{1,2,3,*}

¹ Laboratory of Neuroanatomy and Neuropsychobiology, Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (USP), Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, São Paulo, 14049-900, Brazil.

² NAP-USP-Neurobiology of Emotions (NuPNE) Research Centre, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (USP), Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, São Paulo, 14049-900, Brazil.

³ Behavioural Neurosciences Institute (INeC), Avenida do Café, 2450, Ribeirão Preto, 14220-030, São Paulo, Brazil.

Laboratório de Neuroanatomia & Neuropsicobiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Avenida dos Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, São Paulo, 14049-900, Brasil.

Tel: +55 16 3315 3116; Fax: +5516 3315 3349; E-mail: nccoimbr@fmrp.usp.br

Regular research article

Short Title: Cortico-hypothalamic control on unconditioned fear responses

Statistical summary: abstract word count (241); manuscript word (6150); number of references (39); number of figures (4)

Abstract

The medial “prefrontal” cortex (mPFC) has been proposed to regulate the unconditioned fear-related defensive responses organised by diencephalic neurons. It is known that an excitatory imbalance in the hypothalamus by local microinjections of the nitric oxide (NO) donor SIN-1, an active metabolite of molsidomine, provokes panic-like defensive reactions, which can be accompanied by an antinociceptive response. In addition, this hypothalamic nitrgergic neuromodulation can be mediated by the glutamatergic system. In previous reports it was demonstrated that the anterior cingulate cortex (ACC), a limbic structure that comprises part of the mPFC, control, through glutamatergic pathways, defensive behaviours and fear-induced antinociception triggered by neurons located in the posterior hypothalamus. However, there is a lack of studies showing the participation of the ACC in the control of unconditioned fear-related defensive responses organised by anterior hypothalamus (AH) neurons. To understand this cortical mediation, it was characterised ACC-AH glutamatergic pathways and investigated the effects of ACC neurons chemical activation by intra-Cg1 microinjections of NMDA at different doses (0,1, 1 and 10 nmol) on panic-like defensive behaviour and fear-induced antinociception evoked by intra-AH administration of SIN-1 (300 nmol). Microinjections of a fluorescent anterograde neural tract tracer into the Cg1, showed glutamatergic vesicle-labelled axonal fibres in the AH perikarya. The activation of ACC with NMDA increased escape behaviour, but reduced freezing and antinociception organised by AH neurons. These findings suggest that glutamatergic pathways from ACC modulate panic-like defensive reactions organised by AH neurons, and its activation promotes pronociception.

Key words: Anterior cingulate cortex; Anterior hypothalamus; Defensive behaviour; Fear-induced analgesia; Nitric oxide, NMDA receptors; Panic.

1. Introduction

To better understand the limbic neural network involved in the processing of unconditioned fear-related defensive responses, recent pre-clinical studies have highlighted the importance of a top-down control of panic-like defensive behaviour, from the medial “prefrontal” cortex (mPFC) (de Freitas et al., 2014; Falconi-Sobrinho et al., 2017a,b). Furthermore, these authors have demonstrated that panic-like defensive reactions organised in the medial hypothalamus are accompanied by a fear-induced antinociceptive response, which can also be regulated by the limbic cortex. This fear-related antinociceptive phenomenon, which is also considered a defensive and adaptive response (Bolles and Fanselow, 1980; Coimbra et al., 2017), is triggered by the activation of the endogenous pain pathways originating the neocortex, hypothalamus, and mesencephalon (Aimone et al., 1988; Millan, 2002; Coimbra et al., 2006). In addition, it is known that the mPFC can influence the transmission of nociceptive information from the dorsal horn of the spinal cord (DHSC) through the activation or inhibition of the endogenous pain modulation descending system (Zhang et al., 2005) through increases in the activity of brainstem neurons (Ohara et al., 2005; Coimbra et al., 2006; da Silva Soares Jr et al., 2019). However, the idea that cortical modulation of nociceptive processes can occur through a diencephalic relay before reaching the DHSC, needs more investigation.

Studies performed by Falconi-Sobrinho et al. (2017a), have shown that the decrease in the activity of the anterior cingulate cortex (ACC) by microinjections of lidocaine in cingulum gyrus area 1 (Cg1) or diminished activity of ACC glutamatergic efferent pathways terminals in posterior hypothalamus (PH) by administration of glutamatergic receptors antagonists in the PH, attenuate both defensive behaviours expressed by running and jumping and the unconditioned fear-induced antinociception, evoked by chemical stimulation of PH neurons. Corroborating these findings, another

report by Falconi-Sobrinho et al. (2017b), demonstrated that the decreased activity of ACC glutamatergic efferent pathways to PH by intra-Cg1 microinjections of LY235959, a N-methyl-D-Aspartic acid (NMDA) receptor selective antagonist, impaired panic-like defensive responses and unconditioned fear-induced antinociception organised by PH neurons.

The hypothalamus is a diencephalic structure that has been considered a putative neural substrate for the study of the mechanisms that generate a panic attack (dos Anjos-Garcia et al., 2017, Falconi-Sobrinho et al., 2017a,b; Shekhar, 1994; Shekhar and Keim, 1997). The anterior hypothalamic (AH) nucleus is considered to be a part of the hypothalamic defensive system (Canteras et al., 1997; Canteras, 2002), and has been shown to be activated when animals are exposed to threatening situations. Studies using immunohistochemical techniques have shown an increase in the expression of the Fos protein in hypothalamic nucleus of rodents exposed to predators (Canteras et al., 1997; Paschoalin-Maurin et al., 2018). In addition, a recent study performed by Falconi-Sobrinho and Coimbra (2018) has explored the involvement of the AH in the organisation of unconditioned-fear related defensive responses. These authors have shown that an excitatory imbalance in the AH of mice caused by local microinjections of the molsidomine active metabolite SIN-1, a nitric oxide (NO) donor, induced defensive reactions such as freezing and escape, and these panic-like defensive reactions were followed by an increase in the nociceptive threshold. In addition, the same study has shown that the panicogenic and antinociceptive effect caused by AH treatment with SIN-1 can be mediated by the glutamatergic system, in particular, by the activation of NMDA receptors. Indeed, when this type of glutamatergic receptor was blocked by microinjections of AP-7, a NMDA receptors antagonist, the panic-like behaviours and

fear-induced antinociception, induced by microinjections of SIN-1 in the AH, was inhibited.

Glutamate binding to NMDA receptors promotes an influx of calcium that activates neuronal NOS (nNOS), an enzyme responsible for NO synthesis (Garthwaite et al., 1989). Once synthesised at the post-synaptic terminal, NO assumes the role as a retrograde messenger to the presynaptic terminal, thereby activating the soluble guanylate cyclase enzyme (sGC), which in turn facilitates the activation of monophosphate cyclic guanosine (cGMP) bound to glutamate (Bredt and Snyder, 1989; Knowles et al., 1989).

In fact, the interaction between the glutamatergic system and the nitrenergic system may result in an activation of different neural networks (Carvalho-Netto et al., 2009, Miguel and Nunes-de-Souza, 2006; Prast et al., 1996), and more recently, those involved in the processing of fear-related defensive responses triggered by AH neurons of mice (Falconi-Sobrinho and Coimbra, 2018). However, there is a lack of studies demonstrating the influence of limbic cortex glutamatergic pathways on the defensive behaviours and unconditioned fear-induced antinociception induced by a NO donor microinjected into the AH.

Thus, the aim of the present study was to investigate, through excitatory mechanisms, the role of ACC glutamatergic efferent pathways to AH on the panic attack-like defensive behaviour and unconditioned fear-induced antinociception. For this, a morphological study was performed to characterise ACC-AH glutamatergic pathways. In addition, pharmacological manipulations aiming at the activation of ACC NMDA receptors with intra-Cg1administration of NMDA at different doses (0,1, 1 and 10 nmol/0.1 μ L) were used to investigate the participation of glutamatergic pathways that connect the ACC to the AH in control of panic attack-like defensive behaviour and

unconditioned fear-induced antinociception elicited by intra-AH microinjections of NO donor SIN-1.

2. Material and Methods

2.1 Animals

Male C57BL/6 mice (10-12 weeks, weighing 30-35 g) from the animal facility of Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP) were studied. They were kept 4 to a cage and were habituated in the experimental room for at least 48 h prior to the experiments with free access to water and food. The enclosure was maintained under a light/dark cycle of 12/12 h (lights on from 7 am to 7 pm) and at a constant room temperature of $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. All efforts were made to minimise animal suffering. The experiments were performed in accordance with the recommendations of the Commission of Ethics in Animal Experimentation of the FMRP-USP (process 187/2015), which is consistent with the ethical principles in animal research adopted by the National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) and were approved by the Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) on 2/29/2016.

2.2 Stereotaxic surgery

Animals were anaesthetised with ketamine at 92mg/kg (Ketamine Agener, União Química Farmacêutica Nacional, São Paulo, Brazil) and xylazine at 9.2mg/kg (Calmium, União Química Farmacêutica Nacional, São Paulo, Brazil) and fixed in a stereotaxic frame (David Kopf, USA). In the experiment 1, stainless steel guide cannulae (outer diameter 0.6 mm, inner diameter 0.4 mm) were implanted in the ACC or diencephalon, targeting 0.5 or 1mm above the Cg1 region or AH, respectively. The

following coordinates were used for the ACC, Cg1 region, and AH: anteroposterior: 0.26 mm and -0.70 mm; mediolateral: -0.3 mm and -0.5 mm; and dorsoventral: -1.0 mm and -4.0 mm, respectively. The guide cannulae were fixed to the skull using acrylic resin. At the end of the surgery, each guide cannula was sealed with a stainless steel wire to protect it from obstruction. In the experiment 2, a fluorescent anterograde tracer was deposited into the Cg1 of the ACC through a dental needle directed to this cortical region according to the coordinates anteroposterior: 0,26 mm, mediolateral: -0,3 mm and dorsoventral: -1.5 mm). The coordinates used in both experimental sets were based on Paxinos and Franklin mouse brain in stereotaxic coordinates atlas (2001) and bregma was used as a reference.

After the stereotaxic surgery, each mouse was treated with an intramuscular injection of penicillin G-benzathine (120,000 UI; 0.1 mL) followed by subcutaneous injection of the non-steroidal analgesic and antiinflammatory flunixin meglumine (2.5 mg/kg) (Schering-Plough, São Paulo, SP, Brazil). After surgery, the animals were allowed to recover for 4 (Falconi-Sobrinho and Coimbra 2018) and 10 days before the behavioural tests and morphological study, respectively.

2.3 Drugs

Experiment 1: the NO donor SIN-1 (3-morpholinosydnonimine hydrochloride; Tocris Biosciences, Bristol, United Kingdom) at 300 nmol/0.1 μ L (de Oliveira et al., 2000; Falconi-Sobrinho and Coimbra, 2018) or physiological saline (0.9% NaCl/0.1 μ L) was microinjected into the AH following the intra-Cg1 microinjections of 0.1, 1 (Ullah et al., 2017) and 10 nmol/0.1 μ L of NMDA (N-methyl-D-Aspartic acid receptor agonist; Sigma/Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) or physiological saline (0.9%

NaCl/0.1 μ L). Both SIN-1 and NMDA were dissolved in physiological saline shortly before each central microinjection.

Experiment 2: the fluorescent anterograde neurotracer biotinylated dextran amine (10% Fluorescein-conjugated BDA, 10,000 MW; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), in a volume of 0.1 μ L, dissolved in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, was microinjected into the Cg1 of the ACC.

2.4 Experimental procedure

2.4.1. Experiment 1: microinjection of the N-methyl-D-Aspartic acid receptor agonist into the ACC

At the end of the habituation period, each mouse was submitted to three measures of control tail-flick latencies to determine the baseline nociceptive threshold. Thereafter, independent groups of mice were randomly assigned to receive microinjections of vehicle (0.9% NaCl/0.2 μ L) or 0.1, 1 and 10 nmol/0.1 μ L of NMDA into the Cg1 region of the ACC. Ten minutes later, vehicle (0.9% NaCl/0.1 μ L) or 300 nmol of the NO donor SIN-1 was microinjected into the AH. For this, SIN-1 or vehicle was injected in the AH through a polyethylene tube (PE-10) in a volume of 0.1 μ L for 30 seconds using a 5- μ L syringe (Hamilton, Reno, Nevada, USA) connected to an infusion pump (Stoelting, Kiel, Wisconsin, USA). To prevent reflux, the dental needle was left in place for 15 s after the end of each injection.

After the intra-AH microinjection of SIN-1, mice were placed in a polygonal arena, and behavioural responses were quantitatively analysed every minute for 10 min. To perform the behavioural test, a parallelepiped-shape polygonal transparent acrylic arena (140 x 62 x 50-cm; polygonal arena) was used. The floor of the polygonal arena was made of a transparent acrylic platform, placed on a rectangular stainless-steel plaque

below the arena. The arena was divided by red lines into 20 equal rectangles (4.2-mm width; Pritt mark-it). In the polygonal arena, there was a shelter box (black acrylic; 10 x 7 x 5 pol) and two transparent stairs with a small elevated platform (safe places) (Almada and Coimbra, 2015; Almada et al., 2015; Falconi-Sobrinho and Coimbra 2018). Immediately after the end of the behavioural tests, the nociceptive threshold was measured at 10-min intervals for 60 min.

2.4.2. Experiment 2: labelling the ACC-AH pathways using an anterograde neurotracer

The fluorescein-conjugated anterograde neurotracer BDA was deposited into the ACC, Cg1 region, at a volume of 0.1 μ L over the course of 5 min. Infusions were delivered using an infusion pump (Stoelting, Kiel, Wisconsin, USA) through a polyethylene tube (PE10) attached dental needle, targeting this limbic cortical region. The dental needle was left in place for 2 min after the end of each microinjection to allow local drug diffusion. After completed the microinjection procedure the dental needle was removed and the skin sutured. Ten days after BDA microinjections, mice were deeply anaesthetised with ketamine at 92 mg/kg (Ketamina®) and xylazine at 9.2 mg/kg (Dopaser®) and perfused intracardially with physiological saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma) dissolved in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The encephalon was removed, post-fixed in PFA for 4 h, and then transferred to 10% and 20% sucrose dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.3, at 4°C, for at least 12h in each solution. The nervous tissue was immersed in 2-methylbutane (Sigma), frozen in dry ice (30 s), embedded in Tissue Tek, sectioned (20 μ m thickness) using a cryostat (CM 1950, Leica, Wetzlar, Germany) at 20 C°, and mounted on silanised slides.

After this procedure, the forebrain slices were mounted on glass slides and coverslipped with mineral oil, and the anterior cingulate cortex was observed under the

fluorescence microscopy (AxioImager Z1 with APOTOME, Zeiss, Oberkochen, Germany). The sections of the anterior hypothalamus were then incubated with primary antibody (mouse monoclonal anti-vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2) (Merck, Germany) (procedure omitted in control situations), after titration assay. The sections were washed with 0.1 M PBS four times for 10 min each and then incubated with secondary antibodies (Alexa Fluor 594 fluorophore conjugated Goat anti-mouse IgG 1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), for 2 hours in the dark. Sections were again washed three times for 10 min each with 0.1 M PBS. Finally, the slides were coverslipped using ProLong with DAPI (Life Technologies, Eugene, OR, USA), and histological sections were analysed by fluorescence microscopy (AxioImager Z1 with APOTOME, Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.4.3 Behavioural tests

Fear-related behavioural defensive reactions were quantified by measuring the number and duration of freezing events, which is characterised by defensive immobility for at least 6 s followed by an autonomic reaction, such as defecation, exophthalmia, and/or micturition (Coimbra et al., 2017; Uribe-Mariño et al., 2012). Escape behaviour was expressed as the number and duration of oriented escape or non-oriented escape responses, which were defined as running and jumping towards the elevated platforms and/or the burrow or running and jumping in a direction in the arena other than towards the elevated platforms and/or the burrow, respectively (Almada and Coimbra, 2015; Almada et al., 2015; Falconi-Sobrinho and Coimbra 2018). Additionally, the frequency of crossings (stepping with four legs within a defined rectangle in the polygonal arena floor after crossing the border of each section line), recorded as a

quantitative measure of escape behaviour expressed by running (dos Anjos-Garcia et al., 2017; Falconi-Sobrinho et al., 2017a,b).

Behavioural reactions were recorded for 10 min using a video camera (Handycam, Sony Corporation, Osaki, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan).

2.4.4 Nociceptive testing

The nociception thresholds of the experimental animals were compared using the tail-flick test. Each mouse was placed in a restraining apparatus (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil) with acrylic walls, and its tail was placed on a heating sensor (tail-flick Analgesia Instrument; FMRP-USP Precision Workshop facilities; Ribeirão Preto, Brazil). The amount of heat applied to the tail was increased until the animal removed its tail from the apparatus. The coil (Ni/Cr alloy; 26.04 cm in length $\times$ 0.02 cm in diameter) began at room temperature (approximately 20°C), and then current was applied to increase the coil temperature at a rate of 9°C/s (Coimbra et al., 2006; Falconi-Sobrinho e Coimbra, 2018). Small adjustments in the current intensity were made, if necessary, at the beginning of the experiment (baseline records) to obtain three consecutive tail-flick latencies between 2.5 and 3.5 s. If the animal did not remove its tail from the heater within 6 s, the apparatus was turned off to prevent damage to the skin. Three baseline measurements of control tail-flick latencies were made at 5-min intervals. In the experiment, tail-flick latencies were measured at 10-min intervals for 60 min immediately after the defensive behaviour observation.

2.5 Histology

Upon completion of the experiments, the animals were anaesthetised with ketamine at 92mg/kg (Ketamina®) and xylazine at 9.2mg/kg (Dopaser®) and perfused

through the left cardiac ventricle using an infusion pump (Master Flex® L/S TM, Vernon Hills, IL, USA). The thoracic descending aorta was clamped, the pericardial heart wrap was released to allow perfusion through left ventricle, and blood was washed out with Tyrode buffer (40mL at 4°C). The animal was then perfused with 200mL ice-cold 4% (w/v) paraformaldehyde in 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.3) for 15 min at a pressure of 50mmHg. The brain was quickly removed and maintained in 4% paraformaldehyde for at least 4 h and was then immersed in a 10% and 20% sucrose solution for at least 12 h in each solution. Tissue pieces were immersed in 2-methylbutane (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), frozen on dry ice (30 s), embedded in Tissue Tek, and cut on a cryostat (CM 1950, Leica). Slices were then mounted on glass slides that were coated with chrome alum gelatin to prevent detachment and stained in a robotic autostainer (CV 5030 Leica Autostainer) with haematoxylin-eosin. The sections were viewed under a motorised photomicroscope (AxioImager Z1, Zeiss, Oberkochen, Germany), and the positions of the tips of the guide cannulae were localised according to the Paxinos and Franklin mouse brain in stereotaxic coordinate atlas (2001). Data from mouse with the guide cannulae tips that were located outside the Cg1 region of the ACC and/or the AH were not included in the statistical analysis.

2.6 Statistical analysis

Two-way analysis of variance (two-way ANOVA) followed by Tukey's post hoc tests test was used to analyse the behavioural studies data using Cg1 (NMDA or saline) and AH (SIN-1 or saline) treatment as main factors. Data from the nociceptive threshold experiments collected immediately after the end of the defensive behaviour were submitted to a repeated measures two-way ANOVA (RM-ANOVA) followed by Tukey's post hoc test. Behavioural data are expressed as mean and tail-flick latencies are

expressed as mean $\pm$ S.E.M for $n=8$ mice per group. $P < 0.05$ was considered statistically significant. The software used for statistical analysis and graph plotting was GraphPad Prism version 7.0.

3 Results

3.1 Experiment 1: Effect of increasing doses of intra-Cg1 NMDA on behavioural reactions and unconditioned fear-induced antinociception

3.1.1 Behavioural reactions

According to two-way ANOVA, there was a statistically significant effect of the AH treatment ($F_{1,56} = 162.9$; $p < 0.001$), however, no effect was observed from the Cg1 pre-treatment ($F_{3,56} = 0.7241$; $p > 0.05$), and interaction between them ($F_{3,56} = 0.7241$; $p > 0.05$) regarding number of freezing (Fig. 1A). Interestingly, there was a statistically significant effect of the Cg1 ($F_{3,56} = 5.597$; $p < 0.01$) and AH ($F_{1,56} = 20.12$; $p < 0.001$) treatments as well as an interaction between them ($F_{3,56} = 5.597$; $p < 0.01$) in duration of freezing (Fig. 1B). The intra-AH SIN-1 microinjections preceded by physiological saline administered in the Cg1 evoked long-term freezing events than the Cg1 vehicle + AH vehicle-treated control group (Tukey's post hoc test; $p < 0.001$ to number and duration of freezing), as shown in Fig. 2A, B. Intra-Cg1 pre-treatment with NMDA at different doses did not have a statistically significant effect on the number of freezing induced by SIN-1 microinjected in the AH (Tukey's post hoc test; $p > 0.05$), as shown in Fig. 1A. However, the higher doses of NMDA (1 and 10 nmol) were able to attenuate the duration of freezing reactions (Tukey's post hoc test; $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) compared to the Cg1 vehicle + AH SIN-1-treated group (Fig. 1B).

According to two-way ANOVA, there was a statistically significant effect of the AH treatment ($F_{1,56} = 201.6$; $p < 0.001$ and $F_{1,56} = 227$; $p < 0.001$), however, no difference was observed on Cg1 pre-treatment ($F_{3,56} = 0.4869$; $p > 0.05$ and $F_{3,56} = 1.069$; $p > 0.05$), nor significant interaction between these treatments ($F_{3,56} = 0.4869$; $p > 0.05$ and $F_{3,56} = 1.069$; $p > 0.05$) on the number and duration of oriented escape, respectively (Fig. 1C, D).

Regarding to the number of non-oriented escape reactions, there was a statistically significant effect of the AH treatment ($F_{1,56} = 150$; $p < 0.001$), however, no effect was observed on Cg1 pre-treatment ($F_{3,56} = 1.766$; $p > 0.05$), nor significant interaction between them ($F_{3,56} = 1.766$; $p > 0.05$), as shown in Fig. 1E. While, on the duration of non-oriented escape two-way ANOVA revealed significant effects of the Cg1 ($F_{3,56} = 5.358$; $p < 0.01$) and AH ($F_{1,56} = 179.3$; $p < 0.001$) treatments, and significant interaction between these treatments ($F_{3,56} = 5.358$; $p < 0.01$), as shown in Fig. 1F. Intra-AH microinjections of SIN-1 preceded by administration of physiological saline into the Cg1 evoked oriented and non-oriented escape reactions (behavioural incidence; Tukey's post hoc test, $p < 0.001$ in both cases) and caused also statistically different effect on the duration of both oriented and non-oriented escape (Tukey's post hoc test, $p < 0.001$ in both cases) in comparison to Cg1 vehicle + AH vehicle-treated control group (Fig. 1E, F). In addition, intra-Cg1 pre-treatment with NMDA at different doses did not have a statistically different effect on the number and duration of oriented escape as well as number of non-oriented escape (Tukey's post hoc test, $p > 0.05$ in all cases). However, the higher dose of NMDA (10 nmol) was able to increase the duration of non-oriented escape behaviours compared to the Cg1 vehicle + AH SIN-1-treated group ($p < 0.001$) and the Cg1 NMDA 1 nmol + AH SIN-1-treated group ($p < 0.01$), as shown in (Fig. 1C-F).

According to two-way ANOVA, there was a statistically significant effect of the Cg1 ($F_{3,56} = 38.28$; $p < 0.001$) and AH ($F_{1,56} = 124.8$; $p < 0.001$) treatments, and interaction between them ($F_{3,56} = 19.11$; $p < 0.001$) regarding number of crossings. Intra-Cg1 pre-treatment with vehicle followed by microinjection of SIN-1 into the AH was not able to increase the number (Tukey's post hoc test; $p > 0.05$) of crossings compared to the Cg1 vehicle + AH vehicle-treated control group. However, the number of crossings exhibited by the mice was higher when they received intra-Cg1 microinjections of NMDA before the administration of SIN-1 in the AH. The highest doses of NMDA (1 e 10 nmol) were able to increase the number of crossings when compared to the Cg1 vehicle + AH SIN-1- and Cg1 vehicle + AH vehicle-treated groups (Tukey's post hoc test; $p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively). In addition, mice that were pre-treated with NMDA in a dose of 10 nmol exhibited more crossings than those receiving the intermediate dose of the same drug (Tukey's post hoc test; $p < 0.05$), as shown in (Fig. 1G).

3.1.2 Fear-induced antinociception

According to a two-way RM-ANOVA, there were statistically significant effects of treatment ($F_{7,56} = 56.58$, $p < 0.001$) and time ($F_{9,504} = 119.6$, $p < 0.001$) as well as a significant effect of the interaction between treatment and time ($F_{63,504} = 24.38$, $p < 0.001$). Intra-AH microinjections of a NO donor SIN-1 (300 nmol) preceded by administration of physiological saline into the Cg1 evoked fear-related defensive reactions that increased tail-flick latencies from 0 to 20 min after defensive behaviour than those exhibited by the Cg1 vehicle + AH vehicle-treated control group (Tukey's post hoc test; $p < 0.05$). Interestingly, the fear-induced antinociception evoked by SIN-1 administrated in the AH, was attenuated by the activation of NMDA receptors in the Cg1 region of the ACC. The activation of Cg1 NMDA glutamatergic receptors through

intracortical NMDA microinjections at the higher doses (1 and 10 nmol) decreased antinociceptive response at the same time (0-20 min post-defensive behaviour, Tukey's post hoc test; $p < 0.05$ in both cases). In addition, when compared to the Cg1 vehicle + AH vehicle-treated control group, intra-Cg1 microinjections of NMDA at the higher doses followed by intra-AH administration of vehicle diminished tail-flick latencies from 0 to 10 min at the dose of 1 nmol and from 0 to 20 min at the dose of 10 nmol after defensive behaviour (Tukey's post hoc test; $p < 0.05$ in both cases), as shown in (Fig. 2).

3.2 Experiment 2: Neurotracing of glutamatergic efferent pathways from the ACC to the AH

Microinjections of the fluorescent anterograde BDA neurotracer in the ACC, aiming at the Cg1 region (Fig. 4A-C), showed connections between this limbic cortical region with the anterior hypothalamus. Cingulum gyrus cortical efferent projections were demonstrated reaching glutamatergic synaptic vesicle-labelled axonal fibres in the anterior hypothalamus, as shown in Fig. 4D-G.

3.3 Histology

Histologically confirmed sites of NMDA (0.1, 1 and 10 nmol) or vehicle microinjections into the Cg1 region of the ACC and of SIN-1 (300 nmol) or vehicle administration into the AH are shown in schematic drawings of sections of the C57BL/6 mouse brain in figure 3. The number of points illustrated in the figure is less than the total number of rats because of overlapping microinjection sites.

4 Discussion

The present findings characterise glutamatergic connections between the Cg1 region of the ACC and the AH of mice. In addition, using pharmacological approaches we have shown that increased activity of glutamatergic efferent pathways to the AH from the ACC may influence defensive responses such as panic attack-like behaviours and innate fear-induced antinociception. These unconditioned fear-related defensive responses, which were evoked by intra-AH microinjections of nitric oxide donor SIN-1, started after one minute of microinjection of this drug. This increased latency of the SIN-1-induced panic attack-like behavioural reactions could be a result of the slow release of NO produced by this donor through the formation of the intermediate compound SIN-1C. SIN-1 produces a slow NO release involving the formation of the intermediate compound SIN-1C that is to say SIN-1 is converted to SIN-1A, which then decomposes to NO and SIN-1C (Feelisch et al., 1989; Southam and Garthwaite, 1991). SIN-1-evoked defensive behaviours observed in our work are according with previous studies published by our research team that showed that the intra-AH microinjections of SIN-1 in mice produced freezing and escape defensive reactions that were followed by an unconditioned fear-induced antinociceptive response (Falconi-Sobrinho and Coimbra 2018). In addition, these authors have shown that the defensive responses triggered by activation of excitatory neurons (e.g. glutamate) via intra-AH microinjections of SIN-1 depends on activation of local NMDA receptors, since the blockade of NMDA receptors abolished the panic-like behaviour. Other studies have shown that when the glutamate released from the synaptic cleft binds to the NMDA receptor it promotes a calcium influx into the postsynaptic cell which triggers a cascade of intracellular events (Mori and Mishina, 1995), including activation of nitric oxide synthase (NOS), an enzyme that produces NO (Garthwaite et al., 1989). Considering that the release of glutamate in the AH due to

increased activity of glutamatergic projections from the ACC by intra-Cg1 microinjections of NMDA influences AH nitrgic activity, it is expected that these animals exhibit more fearful defensive behaviours such as escape reactions. Several studies have shown that the hypothalamus predominantly organises escape defensive behaviours. An excitatory imbalance caused by chemical stimulation of neurons of the anterior (Falconi-Sobrinho and Coimbra, 2018), ventromedial (dos Anjos-Garcia et al., 2017), dorsomedial (Biagioni et al., 2013) and posterior (Falconi-Sobrinho et al., 2017a,b; Biagioni et al., 2012) hypothalamic nuclei, despite causing varied defensive behaviours depending on the target hypothalamic nucleus, it elicits vigorous escape reactions characterised by running interspersed with jumps. Previous studies performed by Falconi-Sobrinho et al. (2017a) have shown that the GABAergic disinhibition of PH neurons did not cause freezing behaviour, but it induced vigorous escape reactions. Here, we show that the activation of AH excitatory neurons provoked by intra-AH administrated of SIN-1 caused both escape and freezing behaviours. Although pharmacological approach has been different between these two studies, it appears that the AH neurons trigger less intense panic-like defensive behaviours, than those organised by PH neurons, since the animals treated with the nitric oxide donor SIN-1 in the AH, exhibited escape behaviours interspersed with freezing.

Regarding cortical mediation on the escape defensive behaviours organised by AH neurons, we showed for the first time, that the intra-Cg1 pretreatment with the highest dose (10 nmol) of NMDA exacerbated the escape behaviour elicited by intra-AH administration of SIN-1 due to increased activity of glutamatergic projections to AH from the ACC. In addition to the activation of ACC-AH projecting glutamatergic neurons by Cg1 NMDA microinjections enhancing the escape behaviours evoked by SIN-1 injected in the AH of mice, it was also able to produce a significant increase in the distance moved

by these animals, here represented by the crossings number. Interestingly, the activation of the ACC with NMDA followed by administration of physiological saline into the AH did not cause panic-like defensive behaviours, but it was able to influence the defensive behaviours generated by the same hypothalamic nucleus of those mice that received intra-AH microinjections of SIN-1. The increase in the distance moved by the animals that were pretreated with NMDA (1 and 10 nmol) reinforces the hypothesis that the release of glutamate in the AH due to the activation of ACC-AH glutamatergic efferent pathways causes a proaversive effect elicited by intra-AH microinjections of SIN-1. These data suggest that ACC-AH glutamatergic pathways play a role in the modulation the escape panic-like defensive behaviours organised in the AH.

These findings were supported by neuromorphological studies performed here that showed glutamatergic synaptic vesicle-labelled fibres in the AH, from the ACC, after the deposits of fluorescent anterograde neurotracer into the Cg1. Although the projective dimension of ACC to the AH appears to be moderate, it provides the neural substrate for the influence exerted by ACC glutamatergic long projection neurons on the AH in defensive behaviour.

Curiously, we observed that the increased activity of ACC by activation of Cg1 NMDA receptors promoted an opposite effect on freezing. The decrease rather than increase in the duration of freezing behaviour by the cortical activation was unexpected. One possible idea is that glutamatergic pathways projecting from the cingulum gyrus may be influencing other limbic structures, which connects with the hypothalamus, and are involved in the organisation of innate fear-related behavioural responses. For example, the amygdaloid complex, which also receives inputs from the ACC (Buchanan et al., 1994; Jhang et al., 2018) and connects to the anterior hypothalamus (Petrovich et al., 1996). Studies by Jhang et al. (2018) have shown that the optogenetic photoactivation of

the glutamatergic projections from the ACC to the amygdaloid complex inhibits freezing reactions triggered by mice exposed to the predator odor. On the other hand, these authors demonstrated that the optogenetic inactivation of the ACC increases the freezing of mice submitted to the same test. Thus, while it is likely that the behavioural effects of intra-Cg1 microinjections of NMDA in this study are at least in part mediated through direct pathways connecting the ACC to the AH, the ACC projects throughout the brain, and could be regulating these behaviours through other circuits. It has been established that the ACC can play a critical role in making decisions for defensive strategies such as escape or inhibitory avoidance, since this cortical structure is activated in situations of distal threat (Mobbs et al., 2007). In this sense, we can argue that the ACC activation may be important for earlier disruption of the freezing response for achieving a possible escape response to an aversive situation.

In addition to freezing and escape defensive reactions, the present findings clearly show that mice receiving microinjections of SIN-1 into the AH showed an increase in the nociceptive threshold measured by the tail flick test. Works published by our group have suggested that the chemical stimulation of both the medial hypothalamus (de Freitas et al., 2014) and posterior hypothalamus (Falconi-Sobrinho et al., 2017a,b) activates descending inhibitory pain pathways, providing an antinociceptive response that follows panic-like defensive behaviour. In addition, these authors have demonstrated that the fear-induced antinociception organised in these both hypothalamic nuclei can be mediated by different regions of the limbic cortex. Neurons located in the mPFC, including the Cg1 region of the ACC, are able to encode nociceptive stimulus intensity (Zhang et al., 2004), and it is involved in phenomenon of pain suppression related to emotions (Falconi-Sobrinho et al., 2017a,b; Butler and Finn, 2009 for review). According to Falconi-Sobrinho et al. (2017a,b), the decreased excitatory activity of ACC neurons by

microinjections of lidocaine or NMDA receptor antagonist into the Cg1 attenuates the unconditioned fear-induced antinociception elicited by chemical stimulation of PH neurons. These authors have demonstrated that the decrease of the antinociception by reduction of Cg1-PH glutamatergic efferent pathways activity is correlated with the decrease of the defensive behaviours. Conversely, the results of the present study demonstrate a dissociation between the proaversive effects of NMDA from the escape panic like-induced antinociception, since the treatment of NMDA at dose of 1 and 10 nmol decreased the tail-withdrawal latencies of both mice that were then treated in the AH with SIN-1 and those receiving physiological saline in the same hypothalamic nucleus. These findings suggest that the activation of ACC by high doses of NMDA causes a pronociceptive/facilitative effect of descending pain facilitatory connections. Descending facilitation of sensory inputs may increase the perception to peripheral sensory stimuli (Bliss et al., 2016). Thus, the pharmacological manipulation of rodent's mPFC areas, exploring the participation of efferent pathways to the hypothalamus from the ACC in animal models of fear provides a better understanding top-down circuits involved in mechanisms of central sensitisation.

In conclusion, the present study showed that the increased ACC activity exacerbates escape defensive behaviour, but reduced freezing and antinociception organised by AH neurons. Our findings suggest that glutamatergic pathways from the ACC to the AH modulates panic-like defensive reactions organised in AH, and its activation promotes pronociception.

Acknowledgements

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by FAPESP (grant numbers 2007/01174-1, 2012/03798-0 and 2017/11855-8) and CNPq (grant numbers 483763/2010-1, 474853/2013-6 and 427397/2018-9). LL Falconi-Sobrinho was supported by FAPESP (MSc process 2013/10984-8) and CNPq (MSc fellowship process 134267/2013-3; ScD fellowship process 145258/2015-7). NC Coimbra is a researcher (level 1A) at CNPq (processes 301905/2010-0 and 301341/2015-0). The authors also thank Daoud Hibrahim Elias-Filho for his expert technical assistance. D.H. Elias-Filho received technician scholarships from FAPESP (TT-2, process 02/01497-1) and CNPq (processes 501858/2005-9, 372654/2006-1, 372810/2008-0, 372877/2010-9, 474853/2013-6, and 372838/2018-9).

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest with respect to the presented work.

References

- Aimone, L.D., Bauer, C.A., and Gebhart, G.F., 1988. Brain-stem relays mediating stimulation-produced antinociception from the lateral hypothalamus in the rat. *J. Neurosci.* 8, 2652-2663.
- Almada, R.C., Roncon, C.M., Elias-Filho, D.H., and Coimbra, N.C., 2015. Endocannabinoid signaling mechanisms in the substantia nigra pars reticulata

- modulate GABAergic nigrotectal pathways in mice threatened by urutu-cruzeiro venomous pit viper. *Neuroscience* 303, 503-514.
- Biagioni, A.F., de Freitas, R.L., da Silva, J.A., de Oliveira, R.C., de Oliveira, R., Alves, V.M., and Coimbra, N.C., 2013. Serotonergic neural links from the dorsal raphe nucleus modulate defensive behaviours organised by the dorsomedial hypothalamus and the elaboration of fear-induced antinociception via locus coeruleus pathways. *Neuropharmacology* 67, 379-394.
- Biagioni, A.F., Silva, J.A., and Coimbra, N.C., 2012. Panic-like defensive behavior but not fear-induced antinociception is differently organized by dorsomedial and posterior hypothalamic nuclei of *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45, 328-336.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L., Kaang, B.K., and Zhuo, M., 2016. Synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex in acute and chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 485-496.
- Bolles, R.C., and Fanselow, M.S., 1980. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behavioral and Brain Sciences* 3, 291.
- Butler, R.K., and Finn, D.P., 2009. Stress-induced analgesia. *Prog. Neurobiol.* 88, 184-202.
- Bredt, D.S., and Snyder, S.H., 1989. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9030-9033.
- Buchanan, S.L., Thompson, R.H., Maxwell, B.L., and Powell, D.A., 1994. Efferent connections of the medial prefrontal cortex in the rabbit. *Exp. Brain. Res.* 100, 469-483.

- Canteras, N.S., 2002. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71, 481-491.
- Canteras, N.S., Chiavegatto, S., Ribeiro do Valle, L.E., and Swanson, L.W., 1997. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res. Bull.* 44, 297-305.
- Carvalho-Netto, E.F., Gomes, K.S., Amaral, V.C., and Nunes-de-Souza, R.L., 2009. Role of glutamate NMDA receptors and nitric oxide located within the periaqueductal gray on defensive behaviors in mice confronted by predator. *Psychopharmacology* 204, 617-625.
- Coimbra, N.C., Calvo, F., Almada, R.C., Freitas, R.L., Paschoalin-Maurin, T., Dos Anjos-Garcia, T., Elias-Filho, D.H., Ubiali, W.A., Lobao-Soares, B., and Tracey, I., 2017. Opioid neurotransmission modulates defensive behavior and fear-induced antinociception in dangerous environments. *Neuroscience* 354, 178-195.
- Coimbra, N.C., De Oliveira, R., Freitas, R.L., Ribeiro, S.J., Borelli, K.G., Pacagnella, R.C., Moreira, J.E., da Silva, L.A., Melo, L.L., Lunardi, L.O., et al. (2006). Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. *Exp. Neurol.* 197, 93-112.
- da Silva Soares, R., Jr., Falconi-Sobrinho, L.L., Dos Anjos-Garcia, T., and Coimbra, N.C. (2019). 5-Hydroxytryptamine 2A receptors of the dorsal raphe nucleus modulate panic-like behaviours and mediate fear-induced antinociception elicited by

- neuronal activation in the central nucleus of the inferior colliculus. *Behav. Brain Res.* 358, 71-81.
- de Freitas, R.L., Salgado-Rohner, C.J., Biagioni, A.F., Medeiros, P., Hallak, J.E., Crippa, J.A., and Coimbra, N.C., 2014. NMDA and AMPA/kainate glutamatergic receptors in the prelimbic medial prefrontal cortex modulate the elaborated defensive behavior and innate fear-induced antinociception elicited by GABAA receptor blockade in the medial hypothalamus. *Cereb. Cortex* 24, 1518-1528.
- de Oliveira, R.M., Aparecida Del Bel, E., Mamede-Rosa, M.L., Padovan, C.M., Deakin, J.F., and Guimaraes, F.S., 2000. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. *Neurosci. Lett.* 289, 123-126.
- Dos Anjos-Garcia, T., Ullah, F., Falconi-Sobrinho, L.L., and Coimbra, N.C., 2017. CB1 cannabinoid receptor-mediated anandamide signalling reduces the defensive behaviour evoked through GABAA receptor blockade in the dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus. *Neuropharmacology* 113, 156-166.
- Falconi-Sobrinho, L.L., Anjos-Garcia, T.D., Elias-Filho, D.H., and Coimbra, N.C., 2017. Unravelling cortico-hypothalamic pathways regulating unconditioned fear-induced antinociception and defensive behaviours. *Neuropharmacology* 113, 367-385.
- Falconi-Sobrinho, L.L., Anjos-Garcia, T.D., de Oliveira, R., and Coimbra, N.C., 2017. Decrease in NMDA receptor-signalling activity in the anterior cingulate cortex diminishes defensive behaviour and unconditioned fear-induced antinociception elicited by GABAergic tonic inhibition impairment in the posterior hypothalamus. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 27, 1120-1131.

- Falconi-Sobrinho, L.L., and Coimbra, N.C., 2018. The Nitric Oxide Donor SIN-1-Produced Panic-Like Behaviour And Fear-Induced Antinociception Are Modulated By NMDA Receptors In The Anterior Hypothalamus. *J. Psychopharmacol.* 32, 711-722.
- Feelisch, M., Ostrowski, J., Noack, E. 1989. On the mechanism of NO release from sydnonimines. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14, S13-22.
- Paxinos, G., and Franklin, K.B.J., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press.
- Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R.M., and Moncada, S., 1989. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* 172, 413-416.
- Jhang, J., Lee, H., Kang, M.S., Lee, H.S., Park, H., and Han, J.H., 2018. Anterior cingulate cortex and its input to the basolateral amygdala control innate fear response. *Nat. Commun.* 9, 2744.
- Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M., and Moncada, S., 1989. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5159-5162.
- Miguel, T.T., and Nunes-de-Souza, R.L., 2006. Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. *Brain Res.* 3, 42-48.
- Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66, 355-474.
- Mori, H., and Mishina, M., 1995. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34, 1219-1237.

- Ohara, P.T., Vit, J.P., and Jasmin, L., 2005. Cortical modulation of pain. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 44-52.
- Paschoalin-Maurin, T., Dos Anjos-Garcia, T., Falconi-Sobrinho, L.L., de Freitas, R.L., Coimbra, J.P.C., Laure, C.J., and Coimbra, N.C., 2018. The Rodent-versus-wild Snake Paradigm as a Model for Studying Anxiety- and Panic-like Behaviors: Face, Construct and Predictive Validities. *Neuroscience* 369, 336-349.
- Petrovich, G.D., Risold, P.Y., and Swanson, L.W., 1996. Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 374, 387-420.
- Prast, H., Lamberti, C., Fischer, H., Tran, M.H., and Philippu, A., 1996. Nitric oxide influences the release of histamine and glutamate in the rat hypothalamus. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 354, 731-735.
- Shekhar, A., 1994. Effects of treatment with imipramine and clonazepam on an animal model of panic disorder. *Biol. Psychiatry* 36, 748-758.
- Shekhar, A., and Keim, S.R., 1997. The circumventricular organs form a potential neural pathway for lactate sensitivity: implications for panic disorder. *J. Neurosci.* 17, 9726-9735.
- Southam, E., Garthwaite, J. 1991. Intercellular action of nitric oxide in adult rat cerebellar slices. *Neuroreport* 2, 658-660.
- Ullah, F., Dos Anjos-Garcia, T., Mendes-Gomes, J., Elias-Filho, D.H., Falconi-Sobrinho, L.L., Freitas, R.L., Khan, A.U., Oliveira, R., and Coimbra, N.C., 2017. Connexions between the dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal grey matter are critical in the elaboration of hypothalamically mediated panic-like behaviour. *Behav. Brain Res.* 319, 135-147.

- Uribe-Mariño, A., Francisco, A., Castiblanco-Urbina, M.A., Twardowschy, A., Salgado-Rohner, C.J., Crippa, J.A., Hallak, J.E., Zuardi, A.W., and Coimbra, N.C., 2012. Anti-aversive effects of cannabidiol on innate fear-induced behaviors evoked by an ethological model of panic attacks based on a prey vs the wild snake *Epicrates cenchria crassus* confrontation paradigm. *Neuropsychopharmacology* 37, 412-421.
- Zhang, L., Zhang, Y., and Zhao, Z.Q., 2005. Anterior cingulate cortex contributes to the descending facilitatory modulation of pain via dorsal reticular nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1141-1148.

Figure legends

Figure 1— Effect of the activation of the anterior cingulate cortex (ACC), Cg1 region, with NMDA (0.1, 1 and 10 nmol/0.1µL) or vehicle (NaCl 0.9%/0.1 µL) on the behavioural defensive reactions elicited by microinjection of SIN-1 (300 nmol/0.2µL) or vehicle into the anterior hypothalamus (AH) of mice. Number and duration of freezing (A and B), number and duration of oriented escape (C and D), number and duration of non-oriented escape (E and F), and number of crossings (G). Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) (scatter dot plot; each dot representing one response per animal); $n = 8$ per group. *** $p < 0.001$ compared with the Veh (Cg1) + Veh (AH)-treated group; ++ $p < 0.01$ and +++ $p < 0.001$ compared with the Veh (Cg1) + SIN-1 (AH)-treated group; # $p < 0.05$, and ### $p < 0.001$ compared with the 0.1 nmol NMDA (Cg1) + SIN-1 (AH); $\sim p < 0.01$ and $\sim\sim p < 0.01$ compared with the 1 nmol NMDA (Cg1) + SIN-1 (AH) (according to two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* tests).

Figure 2 – Effect of the activation of the anterior cingulate cortex (ACC), Cg1 region, with NMDA (0.1, 1 and 10 nmol/0.1 μ L) or vehicle (NaCl 0.9%/0.1 μ L) followed by microinjection of SIN-1 (300 nmol/0.1 μ L) into the anterior hypothalamus (AH) on nociceptive thresholds of mice. Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.), n=8 per group. *, $p < 0.05$ compared with the Veh (Cg1) + Veh (AH)-treated group; +, $p < 0.05$ compared with the Veh (Cg1) + SIN-1 (AH)-treated group; #, $p < 0.05$ compared with the 0.1 nmol NMDA (Cg1) + SIN-1 (AH)-treated group (according to two-way RM-ANOVA followed by Tukey's post hoc tests). BL: Baseline nociceptive threshold.

Figure 3 – Diagrammatic representation of coronal sections of the C57BL/6 mice brain showing the sites of central administrations of NMDA or vehicle microinjection into the Cg1 region of the anterior cingulate cortex (A) and of SIN-1 or vehicle microinjection into the anterior hypothalamus (B). Photomicrographs of cortical (top) and diencephalic (bottom) coronal sections of the brain at Bregma 0.26 mm and -70 mm showing representative sites (black arrows) of the central microinjection of drugs in the anterior area of the cingulum gyrus (A) and in anterior hypothalamus (B), respectively. Scale bar: 20 μ m. Histological staining: hematoxylin and eosin.

Figure 4 – Photomicrographs of a transverse section of the anterior cingulate cortex of C57BL/6 mice showing the microinjection (closed white arrow) of the fluorescein-conjugated anterograde neurotracer biotinylated dextran amine (BDA; 10.000 MW) in the Cg1 region of the ACC (A), nuclear staining with DAPI in blue (B), and merged images (C). Photomicrographs of a transverse section of the anterior hypothalamus of a C57BL/6 mouse showing nuclear staining with DAPI in blue (D), BDA-labelled cortico-hypothalamic fibres (open arrow head) in green (E), immunolabeling of glutamatergic synaptic vesicle (closed white arrow) in red (F), and

BDA-labelled cortico-hypothalamic fibres (open arrow head) and merged images showing glutamatergic vesicle-labelled axonal terminals (closed arrow head) distributed in AH, surrounding perikarya (G). The scale bar represents 200 μm in A-C and 20 μm in D-G.

A **B** **C** **D** **E** **F** **G**