

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento

RAIMUNDO DA SILVA SOARES JUNIOR

Estudo do envolvimento do sistema serotoninérgico do núcleo dorsal da rafe na elaboração do comportamento de defesa e da antinocicepção induzida pelo medo inato evocados por estimulação química dos corpos quadrigêmeos

Ribeirão Preto
2019

RAIMUNDO DA SILVA SOARES JUNIOR

Estudo do envolvimento do sistema serotoninérgico do núcleo dorsal da rafe na elaboração do comportamento de defesa e da antinocicepção induzida pelo medo inato evocados por estimulação química dos corpos quadrigêmeos

Versão Corrigida

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

Área de Concentração: Neurologia

Sub-área: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Ribeirão Preto
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

da SILVA SOARES, R. Jr.

Estudo do envolvimento do sistema serotoninérgico do núcleo dorsal da rafe na elaboração do comportamento de defesa e da antinocicepção induzida pelo medo inato evocados por estimulação química dos corpos quadrigêmeos. Ribeirão Preto, 2019.

89 p.

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Coimbra, Norberto Cysne

1. Pânico; 2. Antinocicepção; 3. Receptor 5-HT_{2A}; 4. Comportamento de defesa.

Nome: da SILVA SOARES, R. Jr.

TÍTULO: Estudo do envolvimento do sistema serotoninérgico do núcleo dorsal da rafe na elaboração do comportamento de defesa e da antinocicepção induzida pelo medo inato evocados por estimulação química dos corpos quadrigêmeos

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

Área de Concentração: Neurologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe e trabalhar em uma linha de pesquisa tão interessante. Lembro perfeitamente do primeiro dia em que visitei o laboratório e sai com o sorriso tão grande quanto o projeto que pude carregar comigo. Eu não fazia ideia se seria capaz de realizar um projeto tão complexo e desafiador, mas ainda que um pouco inseguro fiquei animado em imaginar o quanto poderia me desenvolver e aprender novas aptidões que me aproximariam do sonho de me tornar um grande neurocientista. Hoje vejo quantas coisas magníficas aconteceram na minha vida depois que cheguei no LNN e serei sempre muito grato pelos ensinamentos e orientação que tive o privilégio de receber durante esse período.

À Prof.^a Dr.^a Mirela Barros Dias, que me orientou durante a iniciação científica e me ensinou a dar os primeiros passos na ciência básica. Obrigado por me ajudar a lidar com as frustrações da rotina laboratorial, sem perder o entusiasmo pela ciência. Pude desenvolver uma base sólida de conhecimento no seu grupo, aprender lições preciosas e colecionar ótimas lembranças de um período muito feliz da minha vida.

Aos amigos que me apoiaram desde o início. Quando os desafios de iniciar um projeto de pesquisa em Ribeirão Preto pareciam insuperáveis, tive a sorte de encontrar no meu caminho pessoas maravilhosas que me ajudaram a vencer as dificuldades e acreditar que seria possível. Obrigado Felipe Carolo (Xera), Caio Cristóvão (Colombo), Alice Hartmann e Ana Omoto (Passinha). Vocês me incentivaram quando eu pensava que não conseguiria fazer meu TCC na USP. Aquele estágio acabou virando um mestrado e muitas coisas boas aconteceram na minha vida durante esse período. Nunca vou esquecer o quanto as suas mensagens me animaram e fizeram acreditar que, apesar das dificuldades, seria possível. De fato, tudo deu certo e serei sempre muito grato pelo apoio de vocês em um momento tão importante;

Aos amigos do Laboratório de Neuroanatomia e Neuropsicofarmacologia (LNN) que me receberam tão bem e tornaram a dura rotina de pesquisa muito mais animada com as nossas agradáveis conversas, principalmente no café. Obrigado Guilherme, Marcelo, Asmat, Juliana, Yara, Bruno, Gustavo, Receca e Ivair.

E ainda aos técnicos do departamento, Daoud, Eleni, Tadeu, Ieda e Vani, pelo apoio e contribuição que vocês me deram possibilitando a realização deste trabalho;

No grupo LNN, também expresse minha mais profunda gratidão:

Aos “pós-docs” Joyce e Rafael Almada, por terem compartilhado comigo o conhecimento da experiência na vida acadêmica. Aprendi muito com vocês; Ao Renato, pelo companheirismo e ótimas conversas. Admiro o que conseguiu conquistar na ciência;

Priscila Medeiros, pelo carinho e apoio que recebi durante esses anos. Tenho uma grande admiração pela sua competência e determinação. Sou muito grato por poder contar com a sua amizade;

Tayllon dos Anjos, pelas discussões sobre ciência e tecnologia. Eu jamais compraria um celular sem antes perguntar a sua opinião e dificilmente saberia os pilares da farmacologia se não tivesse te conhecido. Sou grato pela ajuda com a escrita científica, principalmente estatística, e por tudo que pude aprender com você durante esse período;

Luiz Falconi-Sobrinho, pelo apoio que você me deu desde o primeiro dia em que cheguei no laboratório. Você teve a paciência para ensinar e sempre estava ao lado para ajudar em todas as fases que precisei, seja nas cirurgias estereotáxicas, nos experimentos, na escrita de artigos e na participação dos congressos científicos. Sempre pude contar com o seu apoio e sou muito grato pelo quanto que pude aprender contigo;

Agradeço em especial à minha família: Ao meu irmão, William, que sempre foi um pirralho muito inteligente e me enche de orgulho. Ao meu pai, Raimundo, por me ensinar a trabalhar desde cedo, a ter responsabilidade e não economizar esforços para conquistar o que desejo. Minha mãe, Leda, por me ensinar a ser persistente e batalhar pelo o que acredito. Meus pais sacrificaram as suas vidas para que os seus filhos tivessem oportunidades e graças a eles posso ter sonhos grandes e a esperança para realiza-los.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que me apoiaram ao longo dessa trajetória repleta de desafios e profícua aprendizagem. Sem ajuda nada neste projeto seria realizado e, no final desse processo importante da minha trajetória na ciência, tenho uma enorme gratidão por todos que de alguma forma contribuíram para o meu amadurecimento profissional e pessoal.

Por fim, agradeço a você, caro leitor, que teve interesse e paciência para ler essa longa lista de agradecimentos. Espero que aprecie a leitura deste trabalho que foi escrito com tanto carinho e cuidado da mesma forma como esse projeto foi colocado em prática. Esta dissertação é a materialização de todos os meus esforços e dedicação ao longo do mestrado. Procurei me atentar a cada detalhe, fazer o meu melhor e, mesmo nos dias mais difíceis, encontrei forças e motivação para levantar cedo da cama, superar as dificuldades e construir algo que eu pudesse me orgulhar no futuro.

“A ciência trabalha na fronteira entre o conhecimento e a ignorância. Não podemos ter medo de admitir o que não sabemos. Não há vergonha nisso. A única vergonha é fingir que temos todas as respostas”

Neil deGrasse Tyson

RESUMO

da SILVA SOARES Jr., R. **Estudo do envolvimento do sistema serotoninérgico do núcleo dorsal da rafe na elaboração do comportamento de defesa e da antinocicepção induzida pelo medo inato evocados por estimulação química dos corpos quadrigêmeos.** 2019. 89 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Há estudos que mostraram que o ácido N-metil-D-aspártico (NMDA), microinjetado nas estruturas do teto mesencefálico (corpos quadrigêmeos) de ratos evoca comportamentos defensivos do tipo pânico que podem ser seguidos por uma resposta antinociceptiva. Tem sido sugerido que respostas defensivas relacionadas ao medo organizadas por neurônios do tronco cerebral podem ser moduladas por projeções ascendentes mediadas pelo neurotransmissor 5-hidroxitriptamina (5-HT) do núcleo dorsal da rafe (NDR), e fenômenos antinociceptivos induzidos pelo medo inato podem ser organizados por vias serotoninérgicas descendentes também originadas no NDR. Os neurônios do NDR que originam tais conexões, por sua vez, podem ser moduladas por monoaminas que recrutam receptores 5-HT_{2A} localizados no NDR. Não obstante, há uma escassez de estudos mostrando o papel dos receptores 5-HT_{2A} do NDR na modulação do comportamento do tipo pânico e da antinocicepção induzida pelo medo inato organizados nos colículos superiores e inferiores. O objetivo deste estudo foi investigar a participação dos receptores 5-HT_{2A} do NDR na modulação do comportamento de defesa organizado pelos corpos quadrigêmeos e da antinocicepção induzida pelo medo evocados por microinjeções de NMDA nos corpos quadrigêmeos. No experimento I, os animais receberam microinjeção de veículo (NaCl 0,9% / 0,2μL) ou 6, 9 e 12 nmol NMDA no CI. No experimento II, foi realizado o pré-tratamento do NDR com microinjeções de veículo ou o antagonista seletivo do receptor 5HT_{2A} (R-96544) nas concentrações de 5, 10 e 15 nM. Dez minutos depois, o NMDA na dose mais efetiva (12 nmol) foi injetado no CI. Em ambos os experimentos, as respostas defensivas foram analisadas quantitativamente durante 10 min e, em seguida, as latências de retirada de cauda foram medidas a intervalos de 10 min durante 70 min. No experimento III, os animais receberam microinjeção de salina fisiológica ou NMDA (6, 9 e 12 nmol) nas cpSC. No experimento IV, a dose mais efetiva de NMDA (12 nmol) ou veículo foi precedida por microinjeções de veículo ou antagonista seletivo do receptor 5HT_{2A} (R-96544) em diferentes concentrações, 0,5, 5 e 10 nM. Ambos os efeitos pró-eversivos e antinociceptivos provocados pelas injeções intra-cpCS de NMDA foram atenuados pelo pré-tratamento do NDR com R-96544. No experimento V, a análise morfológica mostrou que os receptores 5-HT_{2A} estão presentes nos interneurônios GABAérgicos do NDR. Em conjunto, esses achados sugerem que o bloqueio dos receptores 5-HT_{2A} no NDR é capaz de atenuar tanto o comportamento defensivo do tipo pânico quanto a antinocicepção induzida pelo medo organizada pelos corpos quadrigêmeos.

Palavras-chave: Ataques de Pânico. Antinocicepção induzida pelo medo. Comportamento de defesa. Receptor serotoninérgico 5HT_{2A}. Receptor glutamatérgico NMDA. Corpos quadrigêmeos. Núcleo dorsal da rafe.

ABSTRACT

da SILVA SOARES, R. Jr. **Study of the involvement of dorsal raphe nucleus serotonergic system in the elaboration of defensive behaviour and fear-induced antinociception elicited by corpora quadrigemina chemical stimulation.** 2019. 89 p. Dissertation (Master) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

There are studies that suggest that N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) microinjected into the midbrain tectum structures, such corpora quadrigemina, of rats evokes panic-like defensive behaviours that can be followed by an antinociceptive response. It has been suggested that fear-related defensive responses organised by brainstem neurons can be modulated by ascending projections mediated by the neurotransmitter 5-hydroxytryptamine (5-HT) of the dorsal raphe nucleus (DRN), and phenomena of innate fear-induced antinociception can be organised by descending serotonergic pathways also originating from the DRN. The DRN neurons that give rise to such connections, in turn, can be modulated by monoamines that recruit 5-HT_{2A} receptors located in the DRN. Nevertheless, there is a shortage of studies showing the role of DRN 5-HT_{2A} receptors in the modulation of panic-like behaviour and innate fear-induced antinociception organised by superior and inferior colliculi. The purpose of this study was to investigate the participation of DRN 5-HT_{2A} receptors in the modulation of panic-like behaviour and antinociception evoked by corpora quadrigemina injections of NMDA. In experiment I, the animals received microinjection of vehicle (0.9%NaCl/0.2µL) or 6, 9 and 12 nmol NMDA into the IC. In experiment II, it was performed the pretreatment of DRN with microinjections of vehicle or the 5HT_{2A} receptor selective antagonist (R-96544) in a concentration of 5, 10 and 15 nM. Ten minutes later, NMDA at the most effective dose (12nmol) was injected in the IC. In both experiments, the defensive responses were quantitatively analysed for 10 min and then the tail-flick withdrawal latencies were measured at 10 min-intervals for 70 min. In experiment III, the animals received microinjection of physiological saline or NMDA (6, 9 and 12 nmol) into the deep layers of SC (dlSC). In experiment IV, the most effective dose of NMDA (12 nmol) or vehicle was preceded by microinjections of vehicle or 5HT_{2A} receptor selective antagonist (R-96544) at different concentrations (0.5, 5, and 10 nM). Both proaversive and antinociceptive effects elicited by intra-dlSC injections of NMDA were attenuated by the pretreatment of the DRN with R-96544. In experiment V, the morphological analysis showed that 5-HT_{2A} receptors are present in GABAergic interneurons in the DRN. Taken together, these findings suggest that the blockade of DRN 5-HT_{2A} receptors decreased both panic attack-like defensive behaviour and fear- induced antinociception organised by the corpora quadrigemina neurons.

Keywords: Panic attack. Fear-induced antinociception. Defensive behaviour. 5-HT_{2A} receptor. NMDA glutamatergic receptor. Corpora quadrigemina. Dorsal raphe nucleus.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hydroxitriptamina (serotonina)
5-HT _{2A}	Receptor serotoninérgico do tipo 2A.
R-96544	(2R,4R)-5-[2-[2-[2-(3-Methoxyphenyl)ethyl]phenoxy]ethyl]-1-methyl-3-pyrrolidinol hydrochloride
AP	Anteroposterior
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
BDA	Biodextrana
CDME	Corno dorsal da medula espinal
CI	Colículo inferior
CS	Colículo superior
cpCS	Camadas profundas do colículo superior
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DV	Dorsoventral
EPM	Erro Padrão da Média
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA _A	Receptor do ácido gama-aminobutírico, do tipo A
IA	Índice de analgesia
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
LRC	Latência de Retirada de Cauda
ML	Médio lateral
ncCI	Núcleo central do colículo inferior
NDR	Núcleo dorsal da rafe
NMDA	N-metil-D-aspartato
nmol	Nanomol
Sal	Salina fisiológica (NaCl a 0,9%)
SCP	Substância Cinzenta Periaquedutal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Transtorno do Pânico.....	13
1.2 Comportamento defensivo	14
1.3 Dor e antinocicepção induzida pelo medo	17
1.4 Corpos Quadrigêmeos	20
1.5 Núcleo dorsal da rafe.....	21
1.6 Sistema serotoninérgico e receptores 5-HT _{2A}	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Animais	28
3.2 Drogas	28
3.3 Cirurgia	28
3.4 Procedimento experimental	29
3.5 Análise comportamental.....	31
3.6 Testes nociceptivos.....	33
3.7 Histologia	34
3.8 Análise Estatística.....	34
4 RESULTADOS	36
4.1 Experimento I.....	37
4.2 Experimento II.....	41
4.3 Experimento III.....	45
4.4 Experimento IV	48
4.5 Experimento V	54
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXO	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transtorno do Pânico

O transtorno do pânico é um subtipo do espectro de ansiedade caracterizado por episódios inesperados e recorrentes de ataques de pânico que consistem na sensação intensa de medo e mal-estar acompanhados por taquicardia, hiperventilação e aumento da pressão arterial média (ROY-BYRNE; PETER; MURRAY, 2006; BROWN; GLENN; CRASKE, 2009). A prevalência do transtorno de pânico é de 1,7% em adolescentes/adultos e o sexo feminino é o mais afetado em uma proporção de 2:1 (DSM-V, 2013). Embora esse transtorno psiquiátrico tenha seu diagnóstico descrito pela primeira vez na publicação do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-III, 1980), existem referências prévias a essa condição clínica com diferentes terminologias como, por exemplo, o “coração de soldado”, descrito por Da Costa, após observar sintomas clínicos de palpitação e dor torácica em soldados de guerra (WOOLEY, 1982); a “astenia neurocirculatória”, descrita por Oppenheimer com seus pacientes que apresentavam dispneia, palpitação, dores torácicas, tontura e nervosismo (WHEELER, 1950) e a “síndrome de esforço” citada por Lewis quando observou a reação de indivíduos durante um esforço físico moderado (NIXON, 1993).

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, em sua versão mais recente (DSM-V, 2013), descreve que, durante os ataques de pânico ocorrem sintomas, tais como palpitações, tremores, sudorese, *angina pectoris*, dispneia, perda do autocontrole e medo intenso. O transtorno de pânico também pode vir acompanhado de agorafobia, que é descrita como o medo de lugares abertos ou situações que induzam a sensação de falta de segurança ou impossibilidade de subterfúgio (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012). O medo intenso observado no transtorno de pânico pode ser considerado como uma característica instintiva que contribui para a sobrevivência uma vez que seja capaz de induzir o comportamento defensivo contra situações aversivas de perigo iminente ou potencial (COIMBRA, 1992; 2006; MILLAN, 2003; MISSLIN, 2003). Alguns relatos de pacientes também incluem a resposta de “congelamento” (como uma imobilidade defensiva) e o desejo de fuga imediata da situação (CASSANO; SAVINO, 1993; GOETZ, 1994).

No sentido de entender melhor a fisiopatologia e substratos neurais envolvidos no transtorno de pânico, modelos animais têm sido utilizados possibilitando a obtenção de evidências experimentais que nos permitem estabelecer

algumas correlações e analogias entre o transtorno psiquiátrico e as respostas comportamentais defensivas expressas por animais de laboratório em situações aversivas (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD, 2001; STEIN; BOUWER, 1997). Mesmo sabendo que existem dificuldades inerentes ao modelo de estudo das bases neurais do medo e transtornos psicopatológicos, houve, nas últimas décadas, um progresso considerável do conhecimento desses assuntos resultante do somatório de experimentos com animais de laboratório e dados clínicos de pacientes com lesões encefálicas, submetidos a procedimentos neurocirúrgicos e a estudos de neuroimagem. O padrão de resposta comportamental observado em estudos de experimentação animal como imobilidade defensiva, corrida ou saltos tem sido correlacionado com os ataques de pânico, uma vez que tais comportamentos são sensíveis a drogas clinicamente eficazes no tratamento do transtorno do pânico (BLANCHARD, 1997; GRAEFF, 1994; 2002; JENCK, 1995; PASCHOALIN-MAURIN, 2018; SCHENBERG, 2010).

Dentre todos os transtornos de ansiedade descritos na literatura, o transtorno do pânico está entre os mais estudados e, embora progressos significativos tenham sido obtidos nas últimas décadas, ainda existem lacunas importantes em termos de tratamento dessa condição clínica. As abordagens farmacológicas utilizadas nem sempre são eficazes e apresentam efeitos adversos que diminuem a adesão de pacientes ao tratamento farmacológico da doença, o que realça a grande importância da investigação científica para maior entendimento dos aspectos neurobiológicos do transtorno do pânico.

1.2 Comportamento defensivo

O estudo da neurobiologia do medo e o estabelecimento dos princípios etológicos do comportamento defensivo tiveram início com a publicação do livro “A expressão das emoções no homem e nos animais” (1872), escrito por Charles Darwin que descreve semelhanças entre as expressões comportamentais relacionadas às emoções primárias de seres humanos e de outros animais. A partir dessa obra, houve um progresso considerável do conhecimento em relação aos princípios etológicos do comportamento defensivo, o que contribuiu para o surgimento da ideia de que o medo e a ansiedade são emoções que apresentam um valor adaptativo por serem capazes de promover reações de defesa diante de situações aversivas que comprometem a sobrevivência das espécies (DEAKIN; GRAEFF, 1991; LEDOUX, 1991).

As estratégias comportamentais de defesa se desenvolveram por um longo período de seleção natural, conforme a teoria evolutiva de Darwin, surgindo certos padrões comportamentais defensivos, como a inibição comportamental e vigilância (GRAY, 1982; COIMBRA; BRANDÃO, 1993), congelamento (FANSELOW, 1980; COIMBRA, 1989) ou imobilidade defensiva (COIMBRA, 2017; PASCHOALIN-MAURIN, 2018), fuga (PANKSEPP, 1990; COIMBRA; BRANDÃO, 1993) ou imobilidade tônica (MENESCAL-DE-OLIVEIRA; HOFFMANN, 1993). Em último caso, quando não há possibilidade de subterfúgio, ocorrem as posturas ameaçadoras e vocalizações seguidas por ataque defensivo (defesa afetiva) (HESS; BRUGER, 1943) ou as posturas de submissão expressas para evitar o comportamento ofensivo do oponente dominante (MICZEK, 1984). A expressão das reações de defesa é acompanhada de alterações neurovegetativas e endócrinas amplamente estudadas, tais como aumento da pressão arterial, taquicardia, taquipneia (KEIM; SHEKAR, 1996), piloereção, micção e defecção (SCHIMITEL, 2012; BLANCHARD; TAKANASHI, 1988).

O comportamento de congelamento é um estado de imobilidade atenta que serve para evitar a detecção por predadores e para melhorar a percepção frente a uma ameaça em níveis intermediários (LANG; DAVIS, 2006; LOJOWSKA, 2015). A imobilidade tônica é um estado defensivo semelhante ao congelamento por ser caracterizada pela ausência de movimento em resposta à ameaça severa, mas é, em geral, induzido por manobras de contenção (LEITE-PANISSI, 2003; BASSI, 2018). No entanto, o comportamento de congelamento pode ocorrer no início da cascata de defesa, diferente da imobilidade tônica que ocorre posteriormente, como nos casos de contato físico onde a luta, a fuga e o congelamento não são mais ideais para a sobrevivência (EILAM, 2005; KOZLOWSKA, 2015). Diferente da imobilidade tônica passiva ("fingir-se de morto"), o congelamento prepara ativamente o animal para respostas defensivas adicionais (BLANCHARD, 2011; MISSLIN, 2003), como sugerido por respostas de sobressalto aumentadas em vez de diminuídas durante o comportamento de congelamento (LEATON; BORSZCZ, 1985; PLAPPERT, 1993).

Os fatores ambientais também desempenham um papel importante na formação do comportamento defensivo, por exemplo, a distância do predador em relação à presa, e a presença de rotas de fuga, assim como a experiência prévia com um determinado estímulo aversivo influenciam na determinação das reações de

congelamento ou de fuga. A ameaça distal evoca reações de congelamento mais longas do que a ameaça proximal. Com as rotas de fuga disponíveis, o congelamento é mais curto e mais provável seguido de fuga em comparação com uma situação em que não há rotas de fuga disponíveis (ADAMS, 1979; BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD, 2011). Robert e Caroline Blanchard classificaram em seus trabalhos as estratégias comportamentais exibidas por roedores de acordo com o nível de ameaça potencial ou real (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD, 1997). Em situações onde o risco de perigo é potencial, as estratégias observadas foram os comportamentos exploratórios cautelosos e hesitantes que possibilitam a aproximação e a investigação da possível ameaça, denominados de comportamentos de avaliação de risco ("*risk assessment behaviour*"). Tais estratégias estariam relacionadas à ansiedade em seres humanos e moduladas pelo complexo amigdalóide e pelo sistema septo-hipocámpal. No contexto de risco real, porém distal, foi observada fuga ou congelamento evocados através da ação do complexo amigdalóide e da substância cinzenta periaquedutal ventral. Nos casos de ameaça real em que o predador estava muito próximo ou em contato direto com o animal, ocorria a fuga, modulada pela substância cinzenta periaquedutal dorsal, ou a luta defensiva modulada pelo hipotálamo (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD, 1997; GRAEFF; GUIMARÃES, 2012). Em modelos de confronto entre presas e serpentes, o comportamento de avaliação de risco mostra-se exuberante, sendo precedido por alerta defensivo e seguido por imobilidade defensiva e fuga (URIBE-MARIÑO, 2012; COIMBRA, 2017; PASCHOALIN-MAURIN, 2018).

A investigação do substrato neural relacionado com a elaboração do comportamento defensivo sugere que exista uma vasta gama de interconexões entre diversas regiões encefálicas. Esta relação funcional e neuroanatômica propõe a existência de conexões entre as colunas dorsais da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), o hipotálamo medial, o complexo amigdalóide e a área septal (BEN-ARI, 1981; SIEGEL; POTT, 1988; GRAEFF, 1990), além de conexões diretas entre o a divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial e a SCPd (ULLAH, 2017) o que permite situar a SCPd no cerne do sistema encefálico de aversão, que coordenaria a geração e elaboração do medo (GRAEFF, 1981), ao lado de outras estruturas, como as camadas profundas do colículo superior (cpCS) (COIMBRA; BRANDÃO, 1993), e o núcleo central do colículo inferior (ncCI) (BRANDÃO, 1993; CASTELLAN-BALDAN,

2006; OSAKI, 2003). O envolvimento de estruturas mesencefálicas na geração e elaboração do comportamento defensivo pode ser crucial para a execução de respostas rápidas e eficientes de defesa; primeiramente, engajando o animal em um comportamento de fuga, o que envolve o substrato neural dos corpos quadrigêmeos (CS e CI) (CALVO, 2018; COIMBRA, 2000; 2006; MCNALLY, 2004).

O conhecimento sobre como as reações defensivas são controladas no cérebro pode ser importante para aprimorar as intervenções farmacológicas de desordens psicopatológicas caracterizadas pelas reações defensivas, como consiste o transtorno de pânico comumente associado com as reações de congelamento, muito embora o comportamento fuga induzido por estimulação elétrica ou química de estruturas límbicas e paralímbicas tem sido comumente proposto como um modelo de ataques de pânico (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988, CASTELLAN-BALDAN, 2006; NIERMANN, 2015; RIBEIRO, 2005; ROELOFS, 2010).

1.3 Dor e antinocicepção induzida pelo medo

Segundo a definição da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é uma sensação desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial, sendo, portanto, uma característica vital do sistema de defesa do organismo uma vez que comunique ao sistema nervoso o sinal necessário para iniciar uma resposta motora e minimizar o prejuízo físico (MERSKEY, 1994). Pessoas que não sentem dor, como ocorre na rara condição de insensibilidade congênita à dor com anidrose (CIPA, do inglês *Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis*), relatam diversos problemas graves que comprometem a saúde e bem-estar como: automutilações, autoamputações e perda da visão, ainda na infância (AXELROD, 2003). Tais características exemplificam o quanto a capacidade de sentir dor é importante em nossas vidas.

Existe a orientação de que os termos dor e analgesia não sejam utilizados para se referir aos animais de modelo experimental, sendo mais adequado fazer uso das palavras “nocicepção” e “antinocicepção”, respectivamente (JONES, 1992). A nocicepção é a percepção sensorial no sistema nervoso central, evocada pela ativação de receptores sensoriais, denominados nociceptores, especializados em captar o estímulo nocivo (FÜRST, 1999; MILLAN, 1999). A antinocicepção pode ser definida como uma redução da capacidade de perceber estímulos nociceptivos e tem

sido considerada uma parte complementar do comportamento defensivo evocado pelo medo (COIMBRA, 1992, 2006, 2017; COIMBRA; BRANDÃO, 1997). A estimulação elétrica de regiões mesencefálicas, como a SCPd é capaz de deflagrar o comportamento defensivo (SCHENBERG, 2001), assim como a estimulação química realizada com microinjeções do aminoácido excitatório N-metil D-aspartato (NMDA) em outras regiões mesencefálicas é capaz de evocar comportamento defensivo do tipo pânico, caracterizado por corrida, saltos e congelamento (CASTILHO, 1999; COIMBRA, 2006; EICHENBERGER, 2002) seguido da antinocicepção induzida pelo medo (COIMBRA; BRANDÃO, 1993) que, nesse sentido, tem sido considerada como parte integrante da reação de defesa, e uma importante resposta adaptativa do organismo em situações de emergência devido à redução das respostas comportamentais recuperativas eventualmente causadas por estímulos álgicos (BASSI, 2018), em razão da elaboração de um comportamento defensivo induzido pelo medo inato (COIMBRA, 2006; 2017).

Mecanismos opioides podem estar envolvidos no controle dessas reações defensivas organizadas por neurônios do *tectum*, pois a administração periférica de antagonistas de opioides endógenos aumenta os limiares aversivos induzidos por estimulação elétrica de algumas estruturas do mesencéfalo dorsal, tais como a SCPd e as cpCS (COIMBRA, 1996). Corroborando esses dados, evidências morfológicas e psicofarmacológicas da interação entre vias neurais opioides e GABAérgicas no controle de respostas defensivas induzidas por estimulação elétrica e química do mesencéfalo dorsal, mais especificamente dos corpos quadrigêmeos e SCPd (CASTELLAN-BALDAN, 2006; EICHENBERGER, 2002; RIBEIRO, 2005). Não obstante, surpreendentemente, não é o sistema opioide, mas sim o sistema serotoninérgico que participa da elaboração da antinocicepção induzida pelo medo elaborado por estruturas do mesencéfalo dorsal (COIMBRA, 1992; COIMBRA; BRANDÃO, 1997), possivelmente recrutando o sistema endógeno de modulação da dor (de OLIVEIRA, 2017).

Contudo, não obstante o envolvimento do sistema opioide e GABAérgico no controle das respostas defensivas evocadas por ativação de neurônios do mesencéfalo dorsal, os processos antinociceptivos que seguem a estimulação elétrica desse substrato neural são mediados, dependendo do sítio de estimulação, por mecanismos opioides e não opioides (NICHOLS, 1989; COIMBRA, 1992), neste

último caso, provavelmente monoaminérgicos. Com efeito, recentes relatos na literatura sugerem que os substratos neurais que controlam o comportamento de defesa tanto no CS (COIMBRA; BRANDÃO, 1997), como no CI (CASTILHO, 1999) encontram-se sob controle serotoninérgico.

Basbaum e Fields (1984) propuseram um circuito neural endógeno de inibição de dor, envolvendo estruturas da rafe e da formação reticular mesencefálica e pontina, ricas em monoaminas, que poderiam estar modulando a entrada do impulso nociceptivo no corno dorsal da medula espinal (CDME). As projeções nervosas que partem do NDR e se projetam ao núcleo magno da rafe, são caracterizadas por fibras serotoninérgicas descendentes que atingem a substância gelatinosa do CDME. Essas vias podem se projetar sobre interneurônios que hiperpolarizam os neurônios responsáveis pela primeira sinapse da via nociceptiva ascendente sensório-discriminativa (BASBAUM; FIELDS, 1984; MELZACK; WALL, 1982). Embora exista um progresso considerável no entendimento de tais circuitos neurais, o envolvimento do sistema endógeno de inibição da dor nos processos antinociceptivos evocados por estimulação do teto mesencefálico ainda está pouco claro, assim como também não está completamente elucidado se receptores serotoninérgicos da subfamília 5-HT_{2A} modulam os processos antinociceptivos unicamente no mesencéfalo dorsal (COIMBRA, 1992; COIMBRA; BRANDÃO, 1997) ou se esse mecanismo serotoninérgico também se estende a núcleos do sistema endógeno de inibição de dor.

1.4 Corpos Quadrigêmeos

Os corpos quadrigêmeos são quatro eminências arredondadas separadas por dois sulcos perpendiculares em forma de cruz. As duas eminências localizadas bilateralmente na superfície dorsal do mesencéfalo são denominadas colículos superiores (CS), enquanto que as outras duas regiões ventrais consistem nos colículos inferiores (CI), e tais estruturas formam o teto mesencefálico (HOLE, 1992), conjuntamente com as colunas dorsais da SCP.

O CS é organizado em camadas celulares e fibrosas alternadas, as quais são orientadas horizontalmente. Sua divisão anatômica compreende sete camadas, sendo elas a camada zonal (SZ), cinzenta superficial (SGS), óptica (SO), cinzenta intermediária (SGI), branca intermediária (SAI), cinzenta profunda (SGP) e branca

profunda (SAP). As camadas SZ, SGS e SO são localizadas mais superficialmente e desempenham um importante papel no processamento de informações visuais recebendo projeções organizadas topograficamente, proveniente das células ganglionares da retina. Em contraste, temos as camadas SGI, SAI, SGP e SAP que, juntas, formam as cpCS relacionadas com diversas modalidades sensoriais, além de receber impulsos de estruturas motoras do encéfalo para auxiliar na orientação visual e direcionar respostas comportamentais para pontos específicos no espaço (DEAN, 1989; HOLE, 1992; MAY, 2006).

O CI é formado pela região dorsal e ventral. A região dorsal possui os núcleos pericentral e dorsal descritos como uma região implicada em animais geneticamente modificados convulsões audiogênicas (SIMLER, 1994; KLEIN, 2004), enquanto que a região ventral é composta pelo núcleo central e braço do CI, regiões envolvidas com as vias auditivas, mas também responsivas a estímulos acústicos de natureza aversiva (DE FRANCESCHI, 2016; FERREIRA-NETTO, 2007). Efetivamente, CI age primariamente como um núcleo auditivo envolvido na integração e no encaminhamento das percepções sensoriais sendo um importante relé da informação auditiva ao receber sinais convergentes de núcleos auditivos e mediar respostas comportamentais apropriadas à estímulos auditivos via projeções para o CS (CASSEDAY; COVEY, 1996).

Os corpos quadrigêmeos, além de desempenharem funções importantes nos sistemas auditivo e visual, também parecem estar envolvidos com as reações defensivas frente a estímulos aversivos. Existem evidências mostrando a participação dessas estruturas mesencefálicas na elaboração do comportamento defensivo. A desinibição GABAérgica local, ou a estimulação química, com microinjeções de bicuculina ou NMDA, respectivamente, no CI e colículo superior (CS) evocam o comportamento do tipo pânico, como corrida, salto e congelamento (COIMBRA, 2006; EICHENBERGER, 2002; CASTILHO, 1999), seguido de antinocicepção induzida pelo medo (BIAGIONI, 2013; COIMBRA, 1992; 2006; COIMBRA; BRANDÃO, 1997; FREITAS, 2009; de FREITAS, 2014 b). Essas características sugerem que as estruturas que compõem os corpos quadrigêmeos parecem desempenhar um papel importante na percepção e na expressão dos comportamentos defensivos inatos. O envolvimento do mesencéfalo dorsal na geração e elaboração de medo e do comportamento defensivo pode ser crucial para a elaboração de respostas rápidas e eficientes de defesa; primeiro engajando o animal em um comportamento de fuga

explosiva (para o que participa o substrato neural dos corpos quadrigêmeos) e em seguida, após a ativação do complexo amigdalóide ou do hipotálamo é elaborado um comportamento mais bem organizado (KUDO; NIIMI 1980; MEININGER, 1986; HUFFMAN; HENSON 1990; COIMBRA, 1998; BRANDÃO, 1999; ULLAH, 2015, 2017). Embora o CS e CI sejam intimamente relacionados, tratam-se de estruturas distintas que apresentam heterogeneidades morfológicas e funcionais (MIZE, 1996; OERTEL; DOUPE, 2000) de modo que ainda existem lacunas a serem preenchidas em relação ao entendimento de como essas estruturas atuam nas respostas de comportamento defensivo sendo relevante a investigação científica que explore as diferenças e semelhanças entre as reações elaboradas no CS e CI, conforme foi feito no presente trabalho.

1.5 Núcleo dorsal da rafe

Os núcleos da rafe se estendem ao longo do eixo mediano e do plano paramediano do mesencéfalo rostral ao bulbo caudal. A região rostral apresenta os núcleos mediano da rafe, núcleo linear caudal e o núcleo dorsal da rafe (NDR), enquanto que os núcleos magno da rafe, *obscurus* da rafe e *pallidus* da rafe, juntamente com a parte adjacente da formação reticular lateral, compõem a divisão caudal da rafe (HORNUNG, 2003; FIELDS; BASBAUM, 1977). O NDR é constituído neurônios organizados de acordo com as regiões dorsal (DRD), ventral (DRV), asas laterais (DRW), caudal (DRC) e interfascicular (DRI). Tais sub-regiões possuem diferentes características morfológicas e funcionais sendo organizadas topograficamente ao longo do eixo rostro-caudal (ABRAMS, 2004; STEINBUSCH, 1981). Muitos dos neurônios encontrados no NDR são serotoninérgicos, no entanto, um número substancial de células não-5-HT também estão presentes e modulam as funções desta região encefálica, incluindo os neurônios dopaminérgicos (STRATFORD; WIRTSHAFTER, 1990) e interneurônios GABAérgicos (GAMRANI, 1979; QING-PING, 1992) distribuídos de acordo com a organização topográfica funcional ao longo da região rostral e caudal do NDR (JACOBS; AZMITIA, 1992; DAY, 2004).

A serotonina é amplamente encontrada no sistema nervoso central (DAHLSTRÖM, 1965; BARNES; SHARP, 1999) e o NDR é considerado a estrutura encefálica com a maior concentração de neurônios serotoninérgicos no cérebro com extensas fibras ascendentes que se projetam para outras estruturas encefálicas

(STEINBUSCH, 1981), além disso, a desregulação serotoninérgica está relacionada com doenças psiquiátricas (UNDERWOOD, 1999; LOWRY, 2008). A hipótese do papel dual da serotonina proposta por Deakin e Graeff (1991) sugere um papel importante do NDR uma vez que seja o local de onde se originam as duas vias serotoninérgicas envolvidas com a ansiedade. A via que se projeta para o complexo amigdalóide é relacionada com as respostas de ansiedade frente a um perigo potencial, e associada ao transtorno de ansiedade generalizada. Com o aumento da atividade serotoninérgica no complexo amigdalóide, ocorre um efeito ansiogênico. Em contraste, a via que se projeta para as regiões mesencefálicas, como a SCP, é relacionada com as respostas defensivas a uma ameaça proximal, associada ao transtorno de pânico. Com o aumento de 5-HT na SCP há um efeito panicolítico com a diminuição das respostas do tipo pânico caracterizadas pelo comportamento de fuga (DEAKIN; GRAEFF, 1991).

O NDR também se encontra entre os núcleos mesencefálicos que possuem um papel relevante na integração de processos antinociceptivos através de projeções descendentes para a medula espinal integrando a via descendente da modulação da dor (YAARI, 1985). O NDR também envia projeções serotoninérgicas ao CI (FUXE, 1965; KLEPPER; HERBERT, 1991), CS (VILLAR, 1988; WATERHOUSE, 1993; GRAHAM, 1977), o que sugere uma relação entre o NDR e os corpos quadrigêmeos. Além disso, as evidências experimentais de que esse núcleo da rafe participa na modulação de comportamentos defensivos (CRANSAC, 1998; BIAGIONI, 2013) reforçam a ideia de que o NDR é uma estrutura encefálica chave para a investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico nas reações defensivas e na antinocicepção induzida pelo medo.

1.6 Sistema serotoninérgico e receptores 5-HT_{2A}

A serotonina é uma indolamina sintetizada a partir da hidroxilação do aminoácido essencial L-triptofano, o qual sofre ação da enzima triptofano-hidroxilase convertendo-se no composto 5-hidroxitriptofano que, posteriormente, é descarboxilado, originando a 5-HT. Sua síntese é feita pelas células que possuem a enzima triptofano-hidroxilase como as células enterocromafins, as plaquetas e os neurônios de regiões encefálicas, como os núcleos da rafe (OWENS; NEMEROFF, 1994). No sistema nervoso, a 5-HT age como um neurotransmissor capaz de atuar

em diferentes tipos e subtipos de receptores da família 5-HT₁ a 5-HT₇, os quais apresentam perfis farmacológicos distintos (BAXTER, 1995; HOYER, 1994).

A 5-HT parece desempenhar um papel importante na regulação das respostas defensivas relacionadas à ansiedade e ao medo (GRAEFF, 1996; DEAKIN; GRAEFF, 1991; GRAEFF, 2003). Esse neurotransmissor é amplamente encontrado no NDR, que é uma estrutura mesencefálica associada à gênese e regulação do comportamento defensivo semelhante à ansiedade e ao pânico (SPIACCI, 2012; BIAGIONI, 2013; YAMASHITA, 2017) bem como com mecanismos de controle da dor (KISHI, 2006; FREITAS, 2009). Conforme já foi dito no presente trabalho, os corpos quadrigêmeos participam das reações de defesa e antinocicepção induzida pelo medo. Evidências experimentais sugerem que os substratos neurais mesencefálico relacionados com o controle do comportamento defensivo, como o CS e o CI encontram-se sob controle serotoninérgico (CASTILHO, 1999; COIMBRA; BRANDÃO, 1997). A microinjeção de 5-HT diretamente na SCPd promove um efeito inibitório sobre a resposta de fuga induzida pela estimulação elétrica desta mesma estrutura. Tais efeitos inibitórios são bloqueados com o pré-tratamento local com a cetanserina, que é um antagonista preferencial de receptores 5-HT_{2A/2C}, implicando na participação desse subtipo de receptores na modulação das respostas do comportamento defensivo do tipo pânico (SCHUTZ, 1985).

O receptor 5-HT_{2A} é um receptor pré-sináptico acoplado à proteína Gq (GPCR, do inglês *G protein-coupled receptors*) e sua ativação leva à despolarização da membrana de neurônios que o expressam. Por ser um receptor modulador localizado em terminais não-5HT é classificado como um heterorreceptor (BARNES; SHARP, 1999; TODOROVIC, 1997). Biagioni (2013) mostra em seu estudo que o uso de um potente antagonista serotoninérgico seletivo para receptores 5-HT_{2A} (R-96544; K_i = 1.6 nM) na região do Locus Ceruleus (LC) não foi capaz de atenuar as respostas defensivas evocadas pela estimulação química de bicuculina na região do hipotálamo dorsomedial, porém diminuiu a antinocicepção induzida pelo medo. O trabalho sugere que os receptores 5-HT_{2A} expressos no LC desempenham um papel de modulação na antinocicepção, mas poucos estudos verificaram a função destes receptores na região do NDR que é uma importante região mesencefálica na modulação da nocicepção e dos comportamentos defensivos do tipo pânico. Estudos clínicos e

pré-clínicos sugerem um papel importante dos receptores 5-HT_{2A} na patogênese do transtorno do pânico (INADA, 2003; POBBE; ZANGROSSI, 2005; de OLIVEIRA, 2011). Somado a isso, existem evidências de que na região do NDR, os receptores 5-HT_{2A} são expressos por interneurônios GABAérgicos (BOOTHMAN; SHARP, 2005), porém novas evidências de abordagem em imunofluorescência podem contribuir para um entendimento mais amplo quanto a organização morfológica e possível participação dos receptores do subtipo 5-HT_{2A} presentes no NDR na modulação do comportamento defensivo e antinocicepção induzida pelo medo.

Considerando o papel panicolítico dos antagonistas de receptores serotoninérgicos e o envolvimento dos receptores 5-HT_{2A} nas respostas de comportamento defensivo evocadas pela estimulação química de regiões mesencefálicas e na modulação da nocicepção, a hipótese do presente trabalho é que a estimulação química dos corpos quadrigêmeos pode induzir o comportamento de defesa relacionado ao medo inato e às respostas do tipo pânico caracterizadas por congelamento e fuga, seguidas por antinocicepção induzida pelo medo. O bloqueio de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2A} no NDR deve atenuar a antinocicepção induzida pelo medo inato, podendo afetar também a intensidade das respostas de comportamento defensivo elaborado pelos corpos quadrigêmeos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o envolvimento dos receptores 5-HT_{2A} presentes no núcleo dorsal da rafe na modulação do comportamento de defesa e da antinocicepção induzida pelo medo inato, eliciados pela estimulação química dos corpos quadrigêmeos.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito da ativação de receptores NMDA do núcleo central do colículo inferior e das camadas profundas do colículo superior no comportamento de *Rattus norvegicus*.
- Investigar o efeito da microinjeção de R-96544, antagonista seletivo para receptores 5-HT_{2A}, no núcleo dorsal da rafe sobre as respostas de defesa e antinocicepção induzida pelo medo evocadas por estimulação química dos corpos quadrigêmeos.
- Investigar a localização dos receptores 5-HT_{2A} no núcleo dorsal da rafe por meio da técnica de imuno-histoquímica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 134 ratos machos, da cepa Wistar (*Rattus norvegicus*, *Rodentia*, *Muridae*), pesando entre 250-300g, com idade de 8-10 semanas, provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo (USP) em Ribeirão Preto. Os roedores foram mantidos em grupos entre 4-5 animais em caixas de polipropileno, sob ciclo claro/escuro de 12/12h sob temperatura entre $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e sem privação de água e comida, exceto durante os registros comportamentais. Os experimentos foram aprovados e realizados segundo os princípios éticos elaborados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (processo 017/2016) que estão em conformidade com o estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

3.2 Drogas

O agonista de receptores glutamatérgicos *N-Methyl-D-aspartic acid* (NMDA; Sigma/Aldrich, St. Louis, USA) foi utilizado nas concentrações de 6, 9 e 12 nmol/0,2 μL solubilizado em NaCl a 0.9% (ULLAH, 2015). Também foi utilizado o antagonista seletivo para receptores do tipo 5-HT_{2A} (2R, 4R)-4-hydroxy-2- [2-[2-[2-(3-methoxy) phenyl]ethyl] phenoxy] ethyl-1-methylpyrrolidine hydrochloride (R-96544; K_i = 1.6 nM; Tocris Bioscience, Avonmouth, Bristol, UK) nas concentrações de 0.5; 5; 10 e 15 nM/0,2 μL (de FREITAS, 2014 b) solubilizado em veículo (DMSO a 10% e NaCl a 0,9%). Os respectivos diluentes foram utilizados como controle das drogas injetadas no tecido nervoso.

3.3 Cirurgia

Os animais foram anestesiados com cetamina na dose de 92 mg/kg (Ketamine Agener®, União Química Farmacêutica Nacional, Brasil; solução de 0.2 mL a 10%) e xilazina na dose de 9.2 mg/kg (Dopaser®, Hertape/Calier, Juatuba, Minas Gerais, Brasil) e levados a um aparelho estereotáxico (David Kopf, EUA), onde suas cabeças foram fixadas pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Uma cânula-guia de 10 mm, confeccionada a partir de agulhas de microinjeção hipodérmica (diâmetro externo = 0,6 mm; diâmetro interno = 0,4 mm), foi implantada no mesencéfalo e posicionada a 1 mm acima do ncCl ou das cpCS conforme as seguintes coordenadas:

anteroposterior (AP) = -8,8 mm e -5,4 mm, médio lateral (ML) = 1,5 mm e 1,6 mm, dorsoventral (DV) = 4,5 mm e 3,6 mm, considerando o ncCl e as cpCS, respectivamente. Outra cânula-guia independente de 15 mm foi introduzida verticalmente no tronco encefálico e posicionada a 1 mm acima da região central do NDR, segundo as coordenadas: AP = -8,0 mm, ML = 0,2 mm, e DV = 5,0 mm, traçadas, tomando-se o bregma como ponto de referência, estando as suturas lambdoide e bregmática no mesmo plano horizontal e de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007). Depois de implantada a cânula-guia, uma prótese de acrílico autopolimerizável foi fixada na calvária e esta foi ancorada por um parafuso de fornitureira de aço inoxidável. No fim da cirurgia, um mandril foi colocado na cânula-guia para evitar obstruções de sua luz.

Após a cirurgia, 60.000 U.I. de penicilina G benzatina e o analgésico anti-inflamatório não esteroide flumixin meglumine na dose de 2,5 mg/kg foram aplicados, por via intramuscular, em cada animal.

3.4 Procedimento experimental

3.4.1 Experimento I: microinjeção do agonista de receptores NMDA no ncCl

O primeiro experimento foi realizado em grupos independentes de animais ($n = 6$) que foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a introdução da cânula-guia direcionada ao ncCl, conforme as coordenadas citadas anteriormente no presente trabalho. Depois de um período pós-operatório de cinco dias, cada animal foi submetido a três registros de latência de retirada de cauda, segundo o teste de *tail-flick*, para determinar a linha de base do teste nociceptivo. No dia seguinte, o experimento foi feito com os animais separados de maneira randômica, e distribuídos nos grupos tratados com diferentes concentrações de NMDA (6, 9 e 12 nmol/0.2 μ L) ou veículo (0.9% NaCl/0.2 μ L). As microinjeções foram realizadas com uma agulha gengival (11 mm x 0,3 mm), conectada a um tubo de polietileno (PE-10) e a uma seringa de 5 μ L (Hamilton, Reno, Nevada, USA) utilizada para injetar a droga (volume de 0.2 μ L durante 15 s) com o auxílio de uma bomba injetora (Stoelting, Kiel, Wisconsin, USA). A agulha gengival permaneceu no local de microinjeção por mais 30 segundos para prevenir o refluxo no final de cada microinjeção. Imediatamente após aplicar o NMDA na região do ncCl, os animais foram colocados no centro da arena circular e as respostas do comportamento defensivo foram quantificadas e

registradas por meio de uma câmera digital (Sony Handcam) durante 10 minutos em uma arena circular com paredes de acrílico (50 x 60 cm). Imediatamente após as respostas comportamentais, foi feito o teste nociceptivo aferido em intervalos de 10 minutos até completar 70 minutos.

3.4.2 Experimento II: Estudo efeito do *pré-tratamento do NDR com R-96544 sobre as respostas comportamentais decorrentes da estimulação química do ncCI*

O segundo experimento foi realizado em grupos independentes de animais (n = 6) que foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a introdução de uma cânula-guia direcionada ao ncCI e outra direcionada ao NDR, conforme as coordenadas citadas anteriormente no presente trabalho. Depois de um período pós-operatório de cinco dias, cada animal foi submetido a três registros de latência de retirada de cauda (*tail-flick*) para determinar a linha de base do teste nociceptivo. No dia seguinte, o experimento foi feito com os animais separados de maneira randômica nos grupos pré-tratados com diferentes concentrações de R-96544 (5, 10 ou 15 nM/0,2 µL) ou seu respectivo veículo (DMSO a 10% e NaCl a 0,9%) no NDR. Depois de 10 minutos, foi feita a administração da dose mais efetiva de NMDA determinada no experimento I ou veículo (0.9% NaCl/0.2 µL) no ncCI e então os animais foram colocados no centro da arena circular para que as respostas do comportamento defensivo fossem quantificadas e analisadas durante 10 minutos e, imediatamente após as respostas comportamentais, foi feito o teste nociceptivo aferido em intervalos de 10 minutos até completar os 70 minutos.

3.4.3 Experimento III: microinjeção do agonista de receptores NMDA nas cpCS

O terceiro experimento foi realizado em grupos independentes de animais (n = 6) seguindo o mesmo procedimento do experimento I; porém, com a introdução da cânula-guia direcionada as cpCS conforme as coordenadas citadas anteriormente. Em seguida, foram feitos os testes comportamental e nociceptivo conforme já foi descrito no presente trabalho.

3.4.4 Experimento IV: Estudo do efeito do *pré-tratamento do NDR com R-96544 sobre as respostas comportamentais decorrentes da estimulação química no cpCS*

O quarto experimento foi realizado em grupos independentes de animais (n = 6) seguindo o mesmo procedimento do experimento II; porém, com a introdução da cânula-guia direcionada as cpCS e no dia do experimento, os animais foram pré-tratados com diferentes concentrações de R-96544 (0.5; 5 e 10 nM/0,2 µL) ou seu respectivo veículo (DMSO a 10% e NaCl a 0,9%) no NDR. Depois foram feitos os testes comportamental e nociceptivo conforme já foi descrito no presente trabalho.

3.4.5 Experimento V: *Imunofluorescência*

A perfusão dos encéfalos foi feita de acordo com o que será descrito no item 3.6 Histologia. Cada corte possui 16 µm de espessura e foi montado em lâminas de vidro gelatinizadas, seco ao ar e mantido em solução de salina tamponada (0.1 M *sodium phosphate buffer*, LabSynth, Diadema, São Paulo, Brasil; pH 7.2) no pernoite. No dia seguinte, a recuperação antigênica com citrato de sódio 10 M (pH 6,0) foi realizada por 30 minutos em banho-maria a 40 °C. Os cortes foram lavados três vezes com solução tampão (fosfato de sódio 0,1 M) durante 5 minutos cada e glicina a 0,1 M (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos. As secções foram incubadas com imagem-IT (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) durante 1 hora e depois incubadas com os anticorpos primários: IgG de coelho anti-receptor 5-HT_{2A} (diluição 1: 200, Abcam Plc, Cambridge, UK) e IgG anti-GABA de camundongo (diluição 1: 200, Sigma-Aldrich). Foram realizadas três lavagens de 5 minutos cada para depois incubar os cortes com os anticorpos secundários (Alexa Fluor 488 cabra anti-coelho IgG 1: 500 e Alexa Fluor 568 cabra anti-camundongo IgG, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) durante 120 minutos no escuro e lavados novamente mais três vezes. Por fim, as lâminas foram recobertas com Prolong com DAPI (Life Technologies) e as secções histológicas foram analisadas com o auxílio da microscopia (Axiolmager Z1 com APOTOME, Zeiss).

3.5 Análise comportamental

As respostas do comportamento defensivo foram quantificadas e registradas por meio de uma câmera digital (Sony Handcam) durante 10 minutos em uma arena de acrílico, de paredes transparentes, medindo 50 x 60 cm, com o assoalho dividido em doze secções iguais (figura 1). As reações defensivas foram analisadas

através de um *software* de uso livre (*X-PlorRat*), desenvolvido no Laboratório de Comportamento Exploratório da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto (TEJADA, 2007). Os comportamentos foram classificados como congelamento (imobilidade defensiva de pelo menos 6 s, seguida de alterações neurovegetativas), fuga (corrida e salto) e o número de cruzamentos na arena. Assim, foram registradas a frequência (número de incidência de resposta comportamental) e a duração de cada resposta.

A resposta de corrida é considerada um comportamento de fuga explosiva no qual o animal expressa caminhada acelerada com passos rápidos podendo também apresentar postura alternada com movimentos de balanço das patas anteriores e posteriores. Já o salto vertical é caracterizado como uma fuga orientada para a superfície superior da arena de acrílico (SCHENBERG, 2001). O congelamento consiste na interrupção do comportamento em curso por pelo menos 6 segundos, com arqueamento do dorso e retração das orelhas, acompanhado de reações autonômicas visíveis, como micção, piloereção e/ou exoftalmia (de FREITAS, 2014 a).

A reação de cruzamento é qualificada como a passagem do animal de um quadrante do assoalho da arena para o outro, levando em consideração o posicionamento das quatro patas em um quadrante adjacente àquele em que se situava o animal.



Figura 1: Arena circular.

3.6 Testes nociceptivos

Todos os ratos tiveram seus limiares nociceptivos aferidos utilizando o teste de retirada de cauda (*Tail-Flick*). Cada animal foi colocado em um recipiente de contenção e teve sua cauda posicionada sobre uma fonte de calor (*Tail-Flick Instrument; Stoelting* – Figura 2) cuja elevação progressiva de calorimetria era imediatamente interrompida, tão logo o animal retirasse a cauda do dispositivo.

A linha de base (LB) foi formada pela média de três latências de retirada de cauda (LRC), tomadas em intervalos de 5 minutos e, quando necessário, um pequeno ajuste da intensidade na corrente elétrica era realizado com o propósito de se obterem três LRC, aferidas entre 2,5 e 3,5 s. Toda LRC foi normalizada em um índice de analgesia (IA) usando-se para isso a seguinte fórmula:

$$IA = \frac{(LRC_{\text{teste}}) - (\overline{LRC_{\text{controle}}})}{6 - (\overline{LRC_{\text{controle}}})}$$

O limiar nociceptivo foi igualmente aferido em sequência à estimulação química dos corpos quadrigêmeos, logo após o arrefecimento das respostas de defesa ativas, sendo imediatamente registradas as latências de retirada de cauda em intervalos de 10 minutos, durante 70 minutos após o comportamento de fuga (t_0 , t_{10} , t_{20} , t_{30} , t_{40} , t_{50} , t_{60} e t_{70}).



Figura 2: Analgesímetro usado para o teste de retirada de cauda.

3.7 Histologia

Após os registros psicobiológicos, os animais foram anestesiados com cetamina na dose de 92 mg/kg (Ketamine Agener®, União Química Farmacêutica Nacional, Brazil; solução de 0.2 mL a 10 %) e xilazina na dose de 9.2 mg/kg (Dopaser®, Hertape/Calier, Juatuba, Minas Gerais, Brazil) e perfundidos por meio de uma bomba de perfusão (Master Flex® L/S™), através de punção do ventrículo cardíaco esquerdo, com solução de NaCl 0,9%, em volume suficiente para retirar todo o sangue do animal (± 200 ml), seguida de solução tamponada de paraformaldeído a 4%, em volume suficiente para fixar os tecidos (± 200 ml). O encéfalo de cada animal foi retirado e mantido no fixador por no mínimo 4 horas e, posteriormente, foram crioprotetidos por imersão em soluções de sacarose a 10% e a 20% durante 12h em cada solução. Depois desse período, os encéfalos foram congelados e seccionados com o auxílio de um criostato (HM 505 E, Microm, Zeiss) para obtenção de cortes com 40 μ m de espessura, os quais foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas. Os cortes também foram secos ao ar e corados com hematoxilina e eosina (HE) em um sistema motorizado de coloração de lâminas (Autostainer LX, Leica, Alemanha). Posteriormente foi feita a análise morfológica com o auxílio de um microscópio de luz (Axiolmager Z1, Zeiss, Alemanha) para a confirmação dos sítios de microinjeção das drogas. As posições das pontas das agulhas de microinjeção foram assinaladas em diagramas modificados do atlas de Paxinos e Watson (2007). Somente animais com a presença de sinais de microinjeções dentro dos corpos quandrígêneos e do NDR foram incluídos na análise estatística.

3.8 Análise Estatística

Os dados foram inicialmente submetidos a um teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism* versão 7.0 (GraphPad Software Inc., California, USA). O estudo do comportamento foi feito através da análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*) para os experimentos I e III e de duas vias (*two-way ANOVA*) para o experimento IV seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls nos experimentos I e II, ou do teste *post hoc* de Tukey nos experimentos III e IV. Os limiares nociceptivos foram avaliados através da análise de variância para medidas repetidas (*two-way RM-ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de comparações múltiplas de Bonferroni nos experimentos I e II e de Tukey nos experimentos III e IV, considerando as medidas de LRC.

Em todos os casos, os resultados foram expressos como média + erro padrão da média (média \pm EPM) e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.1 Experimento I

4.1.1 Localização dos sítios de microinjeção

A figura 3 apresenta os diagramas das secções coronais que ilustram os sítios histologicamente confirmados de microinjeção de NMDA ou veículo no CI de todos os animais submetidos ao experimento I. Ao lado dos desenhos esquemáticos há, também, uma fotomicrografia de um sítio representativo de microinjeção de droga no CI.

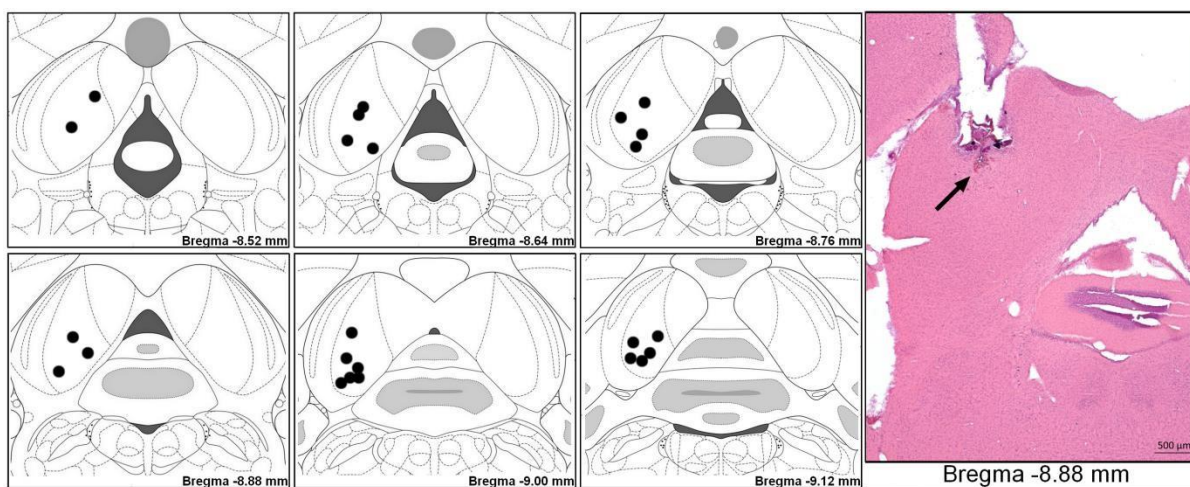


Figura 3. Diagramas das secções coronais esquemáticas do mesencéfalo de rato mostrando os locais de microinjeções (círculos negros) de NMDA ou veículo no colículo inferior (CI) representados em ilustrações modificadas, extraídas do atlas de Paxinos e Watson (2007). A imagem apresentada à direita é uma fotomicrografia de uma seção transversal mesencefálica, mostrando um sítio representativo de microinjeção de droga no CI (seta). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra: 500 µm.

4.1.2 Efeito da microinjeção do agonista de receptores NMDA no ncCI de ratos

De acordo com a ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls, houve um efeito significativo do tratamento na frequência [$F(3,20) = 10,95$, $p < 0,001$] e duração [$F(3,20) = 11,97$, $p < 0,001$] de congelamento. O tratamento do ncCI com NMDA a 6, 9 e 12 nmol causou um efeito dose-dependente na frequência de congelamento ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). Além disso, o congelamento eliciado pelo tratamento do ncCI com 12 nmol de NMDA foi significativamente diferente daquele expresso pelo grupo que recebeu 6 nmol de NMDA (teste *post hoc* Newman-Keuls; $p < 0,05$). Apenas o tratamento do ncCI com 12 nmol de NMDA foi capaz de aumentar a duração do comportamento de congelamento (teste *post hoc* Newman-Keuls; $p < 0,001$) em comparação com o

grupo tratado com salina fisiológica. A dose mais alta de NMDA causou um efeito significativamente diferente daquele causado pelo NMDA doses menores (teste *post hoc* Newman-Keuls; $p < 0,01$ em todos os casos, figura 2A-B).

Considerando o comportamento de fuga expresso por corrida e saltos, de acordo com a ANOVA de uma via, houve efeito significativo do tratamento na frequência [$F_{(3,20)} = 16,44$, $p < 0,001$] e duração de corrida [$F_{(3,20)} = 12,64$, $p < 0,001$] e na frequência de salto [$F_{(3,20)} = 3,95$, $p < 0,05$]. O tratamento do ncCI com 12 nmol de NMDA aumentou a frequência (teste *post hoc* Newman-Keuls; $p < 0,001$) e a duração ($p < 0,001$) do comportamento de fuga expresso por corrida comparado com o grupo controle, e o comportamento de fuga evocado pelo NMDA na dose mais alta também foi significativamente diferente daquele apresentado pelos grupos tratados com NMDA em doses mais baixas (6 e 9 nmol), considerando tanto a frequência ($p < 0,001$) quanto a duração do comportamento de fuga expresso por corrida ($p < 0,001$, figura 2C-D).

Considerando o comportamento de fuga expresso pelo salto, apenas o tratamento do ncCI com 12 nmol de NMDA evocou esse comportamento do tipo pânico (teste *post hoc* Newman-Keuls; $p < 0,05$) e esse efeito foi significativamente diferente do eliciado por NMDA na dose de 6 nmol ($p < 0,05$, figura 2E). Além disso, houve um efeito significativo do tratamento na frequência [$F_{(3,20)} = 3,90$, $p < 0,05$] de cruzamentos. Neste caso, apenas o tratamento do ncCI com 12 nmol de NMDA aumentou significativamente ($p < 0,05$) a frequência de cruzamentos, o que também foi estatisticamente diferente da incidência de cruzamentos após tratamento do ncCI com NMDA na menor dose de 6 nmol ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls (figura 2F).

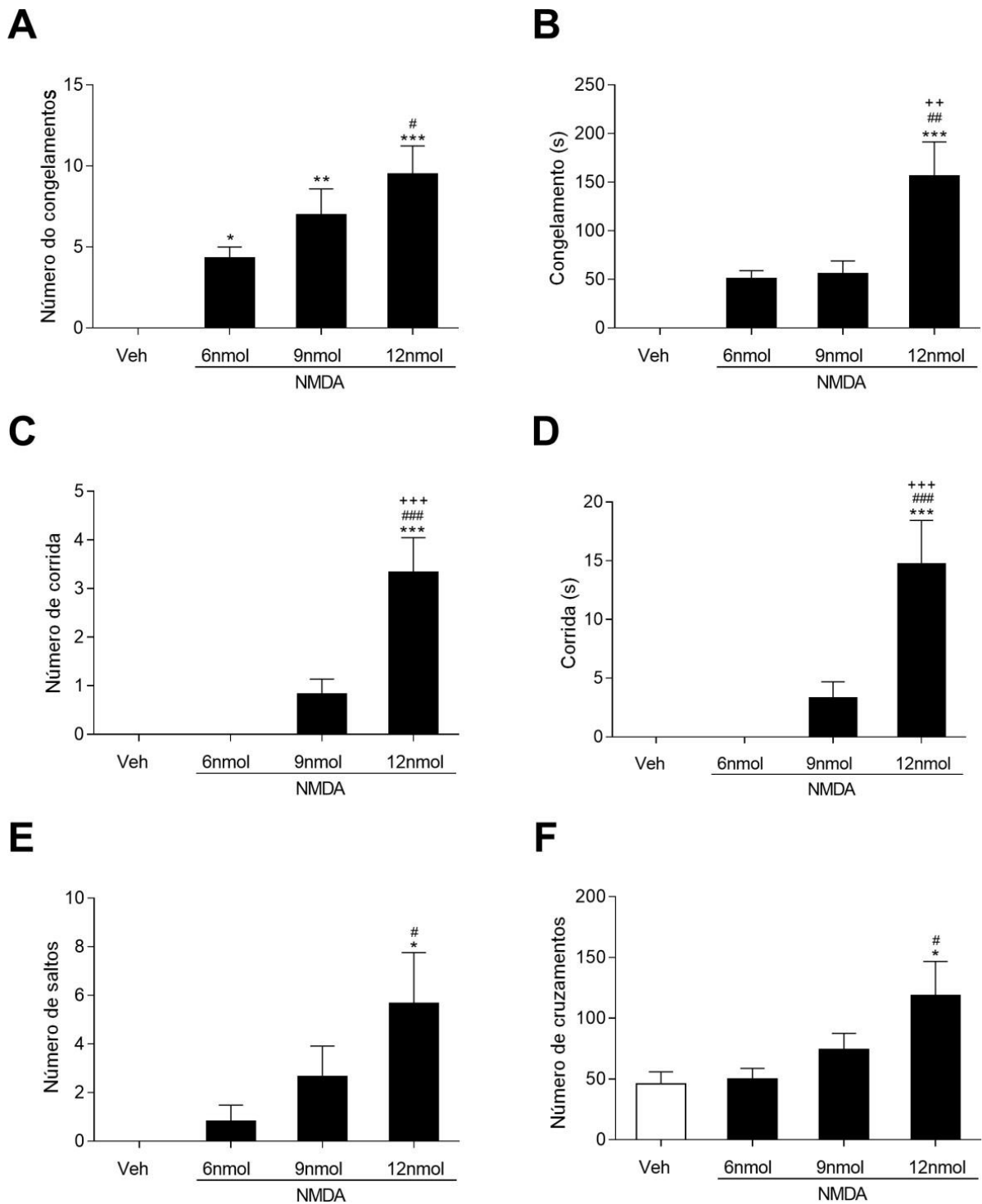


Figura 4. Efeito da microinjeção de NMDA (6, 9 e 12 nmol) ou veículo (NaCl 0,9%; 0,2 μ L) no colículo inferior (CI) na frequência (A, C, E e F) e duração (B e D) do comportamento de congelamento (A e B), corrida (C e D), saltos (E) e cruzamentos (F); $n = 6$ por grupo. As colunas representam a média e as barras o EPM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ em relação ao grupo tratado com salina (veh); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ e ### $p < 0.001$ em comparação com o grupo tratado com 6 nmol de NMDA; ++ $p < 0.01$ e +++ $p < 0.001$ em relação ao grupo tratado com 9 nmol de NMDA, de acordo com a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls.

O tratamento do ncCI com NMDA em todas as doses usadas no presente trabalho causou antinocicepção induzida pelo medo. De acordo com a ANOVA de duas vias (*two-way RM-ANOVA* de medidas repetidas), houve efeito significativo do tratamento, [$F_{(3,20)} = 8.66$, $p < 0.001$], do tempo [$F_{(8,160)} = 82.36$, $p < 0.001$] e da interação tratamento *versus* tempo [$F_{(24,160)} = 9.44$, $p < 0.001$]. O comportamento de fuga do tipo pânico foi seguido por um aumento significativo da LRC observada no teste *tail-flick* de 0 a 30 minutos (teste *post hoc* de comparações múltiplas de Bonferroni; $p < 0.05$) depois do tratamento com todas as doses de NMDA em comparação com o grupo controle (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.05$ em todos os casos). Aos 40 minutos após o comportamento de fuga, apenas o grupo tratado no ncCI com 9 nmol de NMDA teve diferença significativa na LRC em relação ao grupo controle (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.05$). A antinocicepção induzida pelo medo eliciada no grupo tratado com NMDA na dose de 12 nmol apresentou diferença significativa em relação àquela expressa pelo grupo tratado no ncCI com 6 nmol de NMDA do 0 aos 20 minutos (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.05$), como mostrado na figura 5.

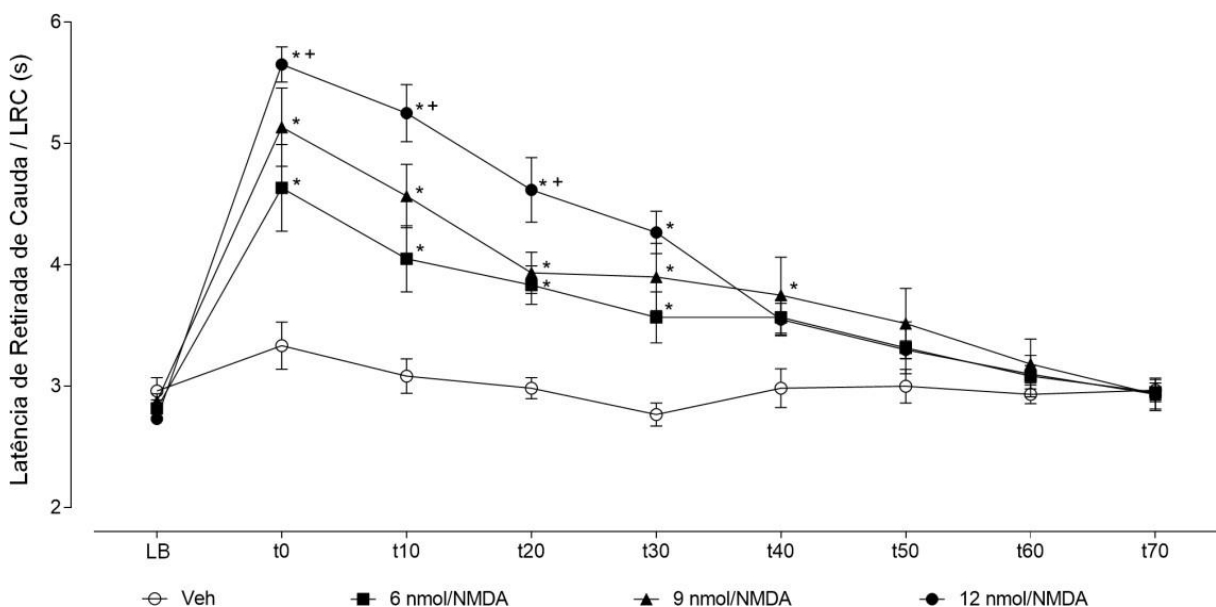


Figura 5. Efeito da microinjeção de NMDA (6, 9 e 12 nmol) ou veículo (Veh = NaCl 0,9%; 0,2 μ L) no colículo inferior (CI) em relação a antinocicepção induzida pelo medo. A antinocicepção causada pelo comportamento defensivo foi registrada pelo teste de retirada de cauda (*tail-flick*); $n=6$ por grupo. Aumentos nos limiares nociceptivos foram representados como médias \pm EPM. * $p < 0.05$ em comparação com o grupo controle veículo (veh); + $p < 0.05$ em relação ao grupo tratado com 6 nmol de NMDA, segundo a ANOVA de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

4.2 Experimento II

4.2.1 Localização dos sítios de microinjeção

A figura 6 apresenta os diagramas das secções coronais que ilustram os sítios histologicamente confirmados de microinjeção de NMDA ou veículo no ncCI e de R-96544 ou veículo no NDR de todos os animais submetidos ao experimento II. Ao lado dos desenhos esquemáticos também temos a fotomicrografia de um sítio (seta) representativo da microinjeção de drogas no ncCI e no NDR.

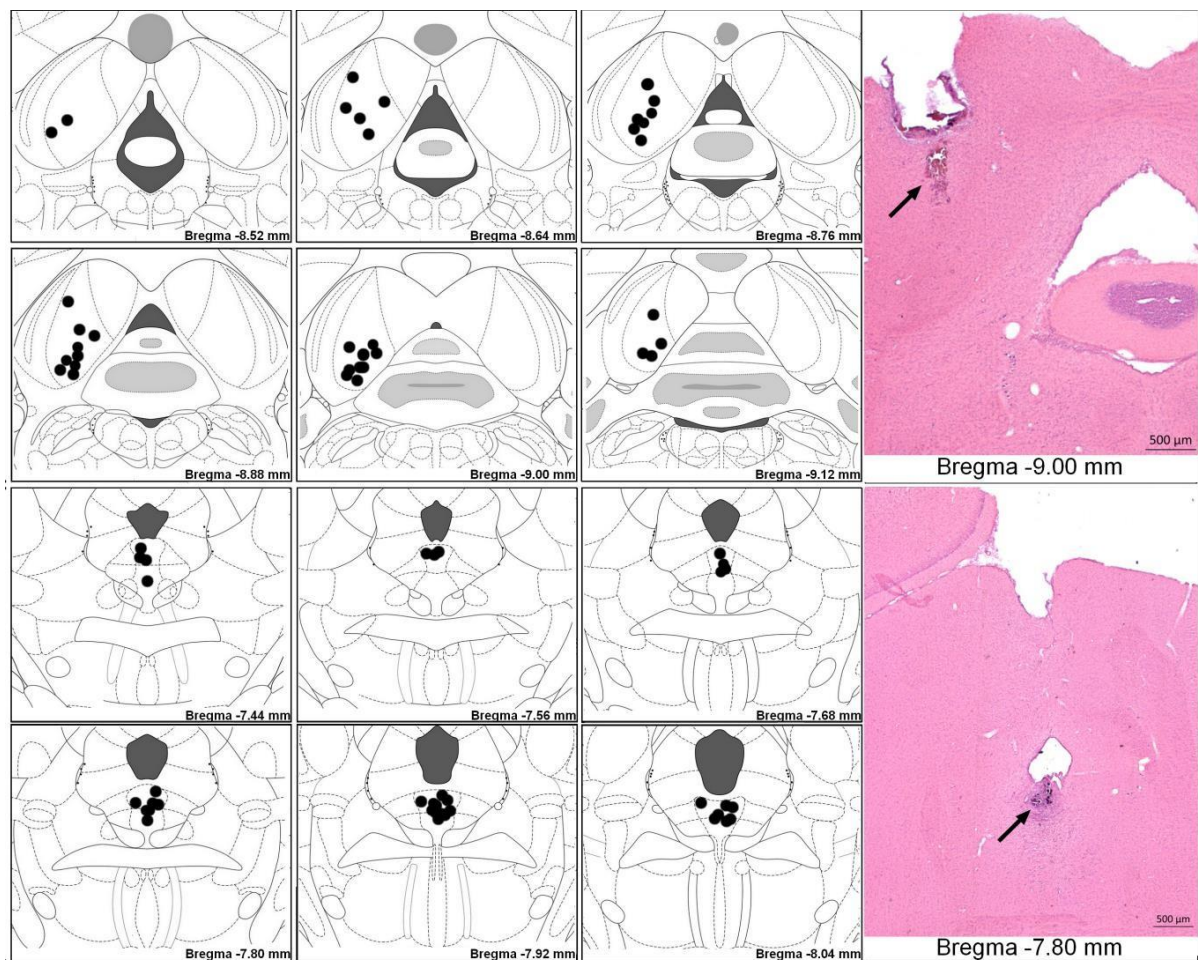


Figura 6. Diagramas de secções transversais do encéfalo de rato mostrando os locais de microinjeção (círculos negros) de drogas no mesencéfalo, referentes ao pré-tratamento do núcleo dorsal da rafe (NDR) com R-96544 (5, 10 e 15 nM) ou veículo, seguido de administração de veículo ou NMDA na dose de 12 nmol no núcleo central do colículo inferior (ncCI), retratados em ilustrações do atlas de Paxinos e Watson (2017). As imagens à direita são fotomicrografias de secções coronais mesencefálicas que cujas setas indicam o local de microinjeção das drogas no ncCI e NDR. Coloração: hematoxilina e eosina. Barra: 500 μm.

4.2.2 Efeitos do pré-tratamento com R-96544 no NDR sobre o comportamento de defesa e antinocicepção induzidos pela administração do agonista de receptores NMDA no ncCI de ratos

Semelhante ao primeiro experimento, de acordo com a ANOVA de uma via, o tratamento do ncCI com veículo ou NMDA na dose de 12 nmol (Veh/NMDA) aumentou significamente a frequência [$F_{(5,30)} = 8.49$, $p < 0.001$] e a duração [$F_{(5,30)} = 8.93$, $p < 0.001$] do congelamento em comparação com o grupo controle (Veh-Veh). O pré-tratamento do NDR com R-96544 em diferentes concentrações (5, 10 and 15 nM) diminuiu a frequência e a duração (teste *post hoc* de Newman-Keuls; $p < 0.001$ em todos os casos) de "congelamento". O pré-tratamento do NDR com R-96544 na concentração de 15 nM (R-15/veh) não teve efeito *per se* (teste *post hoc* Newman-Keuls; $p > 0.05$) comparado com o grupo controle (Veh-Veh), tanto no que se refere à frequência quanto à duração do congelamento, conforme mostrado na figura 7A-B.

Considerando o comportamento de fuga expresso por corrida e saltos, de acordo com a ANOVA de uma via, houve efeito significativo do tratamento na frequência [$F_{(3,30)}=9.33$, $p < 0.001$] e na duração [$F_{(3,30)}=15.05$, $p < 0.001$] do comportamento de fuga expresso por corridas e também na frequência [$F_{(3,30)}=6.75$, $p < 0.05$] do comportamento de fuga expresso por saltos. O grupo pré-tratado com veículo no NDR e tratado com NMDA no ncCI (Veh-NMDA) apresentou um aumento na frequência e duração de corrida (teste *post hoc* Newman-Keuls; $p < 0.001$ em ambos os casos) e também na frequência de saltos (teste *post hoc* Newman-Keuls; $p < 0.001$) comparado ao grupo controle (veh-veh). O pré-tratamento do NDR com R-96544 em diferentes concentrações (5, 10 e 15 nM) diminuiu significativamente a frequência (teste *post hoc* Newman-Keuls; $p < 0.001$ em todos os casos) e a duração (teste *post hoc* Newman-Keuls; $p < 0.001$ em todos os casos) de corrida (figura 7C-D). O pré- tratamento do NDR com R-96544 em todas as concentrações (5, 10 e 15 nM) diminuiu significativamente (teste *post hoc* Newman-Keuls; $p < 0.05$) o comportamento de fuga expresso por saltos (figura 7E).

Em relação ao número de cruzamentos, houve efeito significativo do tratamento [$F_{(5,30)}=6.30$, $p < 0.001$]. O grupo tratado com NMDA (Veh-NMDA) aumentou o número de cruzamentos (teste *post hoc* Newman-Keuls; $p < 0.01$), e o pré-tratamento do NDR com R-96544 em diferentes concentrações (5, 10 e 15 nM) diminuiu esse efeito (teste *post hoc* Newman-Keuls; $p < 0.01$ em todos os casos) conforme mostrado na figura 7F. Já o grupo pré-tratado com R-96544 no NDR na

concentração de 15 nM e veículo no ncCI (R-15/veh) não teve efeito *per se* (teste *post hoc* Newman-Keuls; $p > 0.05$) comparado com o grupo controle tratado com veículo (veh-veh).

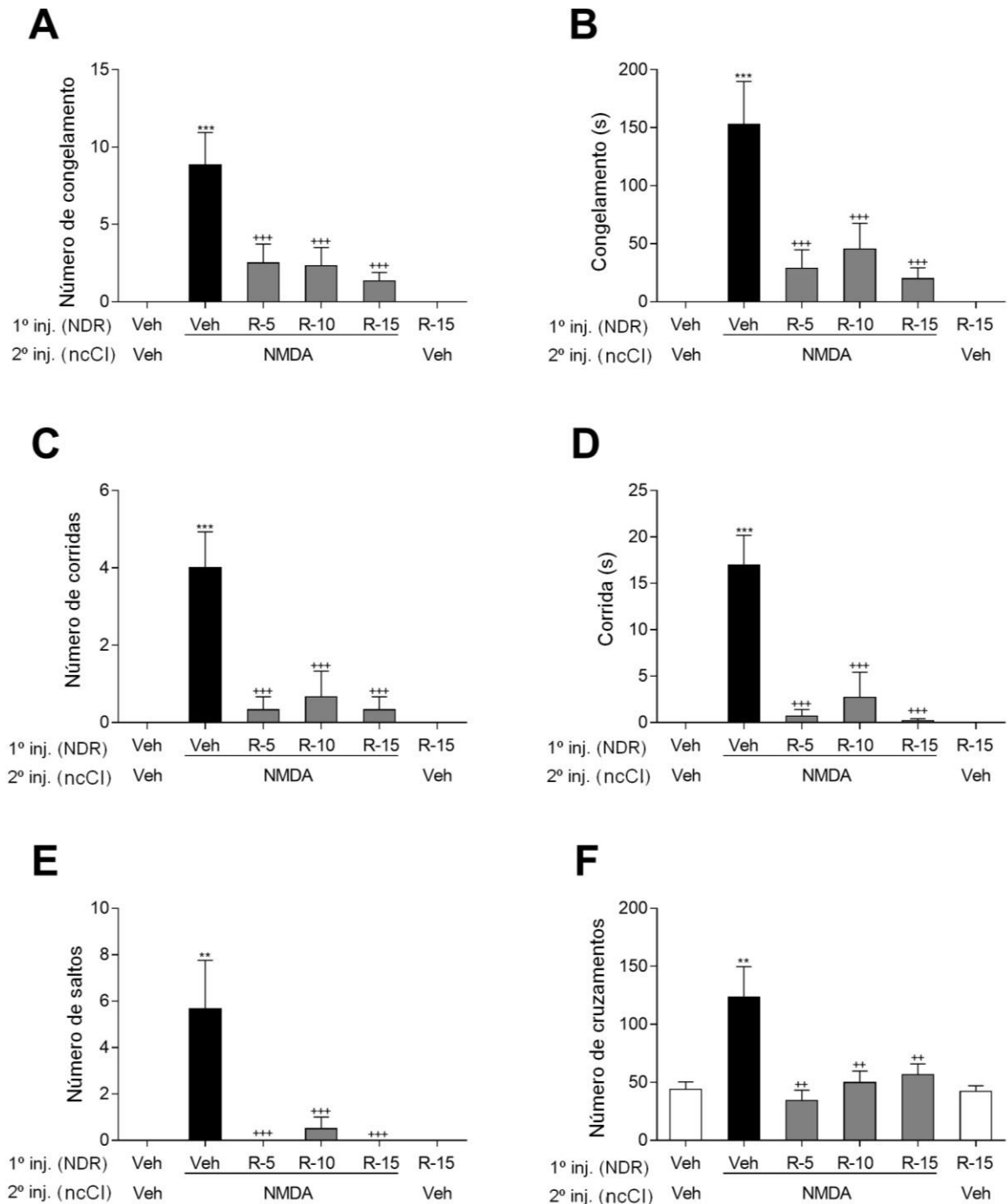


Figura 7. Efeito da microinjeção de R-96544 (5, 10 e 15 nM) ou veículo (10% DMSO) no núcleo dorsal da rafe (NDR) na frequência (A, C, E e F) e na duração (B e D) de congelamento (A e B), corrida (C e D), saltos (E) e no número de cruzamentos (F) evocados pela microinjeção de NMDA (12 nmol/0,2 μ L) ou veículo (NaCl 0,9%; 0,2 μ L) no colículo inferior (CI); $n = 6$ por grupo. As colunas representam a média e as barras o EPM. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ comparados com o grupo controle (Veh-Veh); ++ $p < 0.01$ e +++ $p < 0.001$ comparado com o grupo tratado com NMDA (Veh-NMDA), de acordo com a

ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls.

De maneira similar ao experimento I, observamos o comportamento de defesa evocado pelo tratamento do ncCI com NMDA seguido pela antinocicepção induzida pelo medo, além disso, o pré-tratamento do NDR com R-96544 diminuiu significativamente tanto o comportamento de defesa, quanto a antinocicepção induzida pelo medo inato. De acordo com a ANOVA de duas vias (RM-ANOVA-de medidas repetidas), houve efeito significativo do tratamento [$F_{(5,30)} = 37.78$, $p < 0.001$], do tempo [$F_{(8,240)} = 91.71$, $p < 0.001$] e da interação tratamento *versus* tempo [$F_{(40,240)} = 24.74$, $p < 0.001$]. A ativação dos neurônios no ncCI (Veh-NMDA) aumentou a LRC no teste de *tail-flick* do tempo 0 aos 30 minutos (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $p < 0.05$) quando comparado com o grupo controle (Veh-Veh). Os grupos pré-tratados no NDR com R-96544 nas concentrações de 10 nM (R-10/NMDA) e 15 nM (R-15/NMDA) diminuíram a antinocicepção induzida pelo medo de 0 aos 30 minutos após o comportamento de fuga, quando comparados ao grupo controle, tratado com NMDA (Veh/NMDA) (Teste *post hoc* Bonferroni; $p < 0.05$). Também houve diferença significativa destes dois grupos (R-10/NMDA e R15/NMDA) comparado com o grupo pré-tratado no NDR com R-96544 na concentração de 5 nM (R-5/NMDA) de 0 aos 30 minutos depois do comportamento de fuga evocado pela estimulação química do ncCI. O R-96544 *per se* (R-15/Veh) não teve efeito intrínseco na LRC (Teste *post hoc* Bonferroni; $p > 0.05$), comparado com o grupo controle (Veh/Veh) conforme mostrado na figura 8.

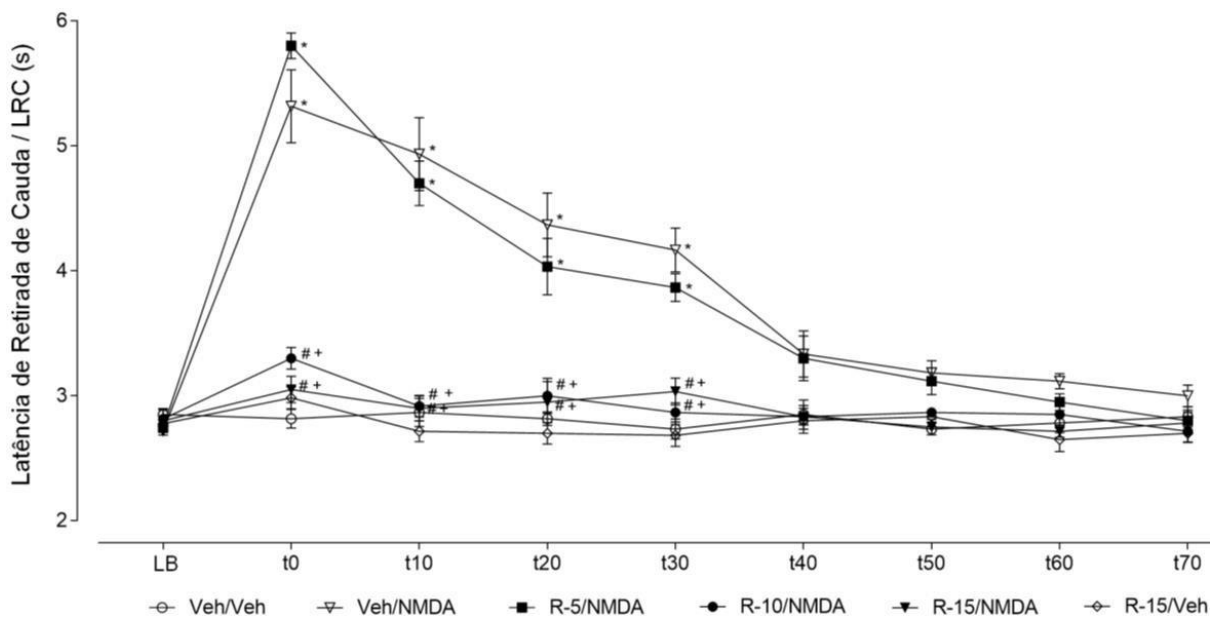


Figura 8. Efeito da microinjeção de R-96544 (5, 10 e 15 nM) ou veículo (10% DMSO) no núcleo

dorsal da rafe (NDR), seguido pela microinjeção de NMDA na dose de 12 nmol ou veículo (NaCl 0.9%; 0.2 μ L) no colículo inferior (CI) em relação à antinocicepção induzida pelo medo. A antinocicepção causada pelo comportamento defensivo foi registrada pelo teste de retirada de cauda (*tail-flick*); $n = 6$ por grupo. Aumentos nos limiares nociceptivos foram representados como médias \pm EPM. * $p < 0.05$ comparado com o grupo controle, tratado com veículo (Veh-Veh); # $p < 0.05$ comparado com o grupo controle tratado com NMDA (Veh/NMDA); + $p < 0.05$ comparado com o grupo pré-tratado no NDR com R-96544 na concentrações de 5 nM (R-5)/NMDA), de acordo com a ANOVA de duas vias (RM-ANOVA de medidas repetidas), seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

4.3 Experimento III

4.3.1 Localização dos sítios de microinjeção

A figura 9 apresenta os diagramas das secções transversais do mesencéfalo de *Rattus norvegicus* que ilustram os sítios de microinjeção de NMDA ou veículo no cpCS de todos os animais submetidos ao experimento I. Ao lado dos desenhos esquemáticos há também uma fotomicrografia representativa do sítio (seta) de microinjeção de droga no CS.

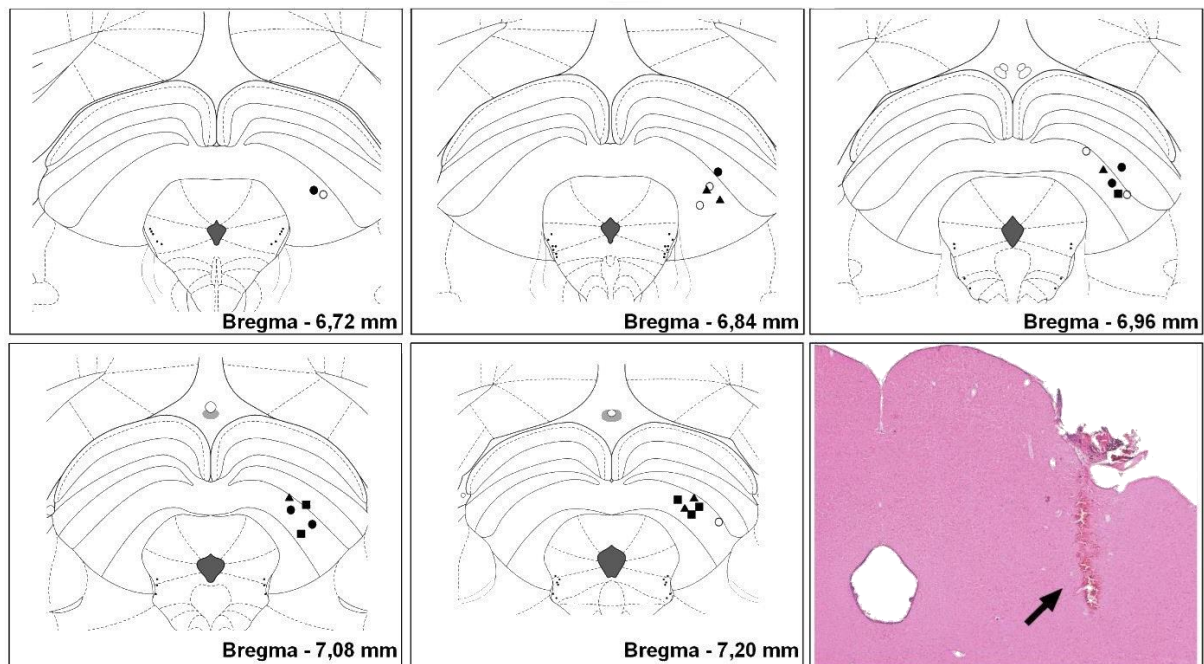


Figura 9. Diagramas das secções transversais do mesencéfalo de rato mostrando os locais de microinjeções de NMDA nas doses de 6 (■), 9 (▲), 12 (●) nmol/ 0,2 μ L ou veículo (○) no colículo superior (CS) representados em ilustrações modificadas do atlas de Paxinos e Watson (2007). A imagem apresentada à direita é uma fotomicrografia de uma seção coronal mesencefálica cuja seta indica o local da microinjeção de droga no CS. Coloração: hematoxilina e eosina. Barra: 500 μ m.

4.3.2 Efeitos da microinjeção do agonista de receptores NMDA nas cpCS de ratos

De acordo com a ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey, houve efeito significativo do tratamento na frequência [$F_{(3,20)} = 15.98$; $p < 0.001$] e na duração [$F_{(3,20)} = 4.808$; $p < 0.05$] de congelamento. O tratamento das cpCS com NMDA em diferentes doses (6, 9 e 12 nmol) causou efeito dose-dependente na frequência ($p < 0.01$, $p < 0.001$ e $p < 0.01$ respectivamente) e na duração (teste *post hoc* Tukey; $p < 0.05$) de congelamento (figura 10 A e B).

Considerando o comportamento de fuga caracterizado por reações de corrida e saltos, houve efeito significativo do tratamento na frequência [$F_{(3,20)} = 3.895$; $p < 0.05$], mas não na duração [$F_{(1,568, 7,841)} = 3.778$; $p > 0.05$] do comportamento de fuga, de acordo com a ANOVA de uma via. Somente a dose mais alta de NMDA (12 nmol) no CS causou efeito estatisticamente diferente daquele causado no grupo controle (Veh-Veh), considerando a frequência ($p < 0.05$) do comportamento de fuga, de acordo com o teste *post hoc* Tukey (figura 10 C e D). Além disso, de acordo com a ANOVA de uma via, houve efeito significativo do tratamento do CS com NMDA na frequência [$F_{(3,20)} = 3.156$; $p < 0.05$] de cruzamentos. Contudo, somente a dose mais alta de NMDA (12 nmol) foi capaz de aumentar significativamente a frequência de cruzamentos (teste *post hoc* Tukey; $p < 0.05$), comparado com o grupo controle (Sal), conforme mostrado na figura 10 E.

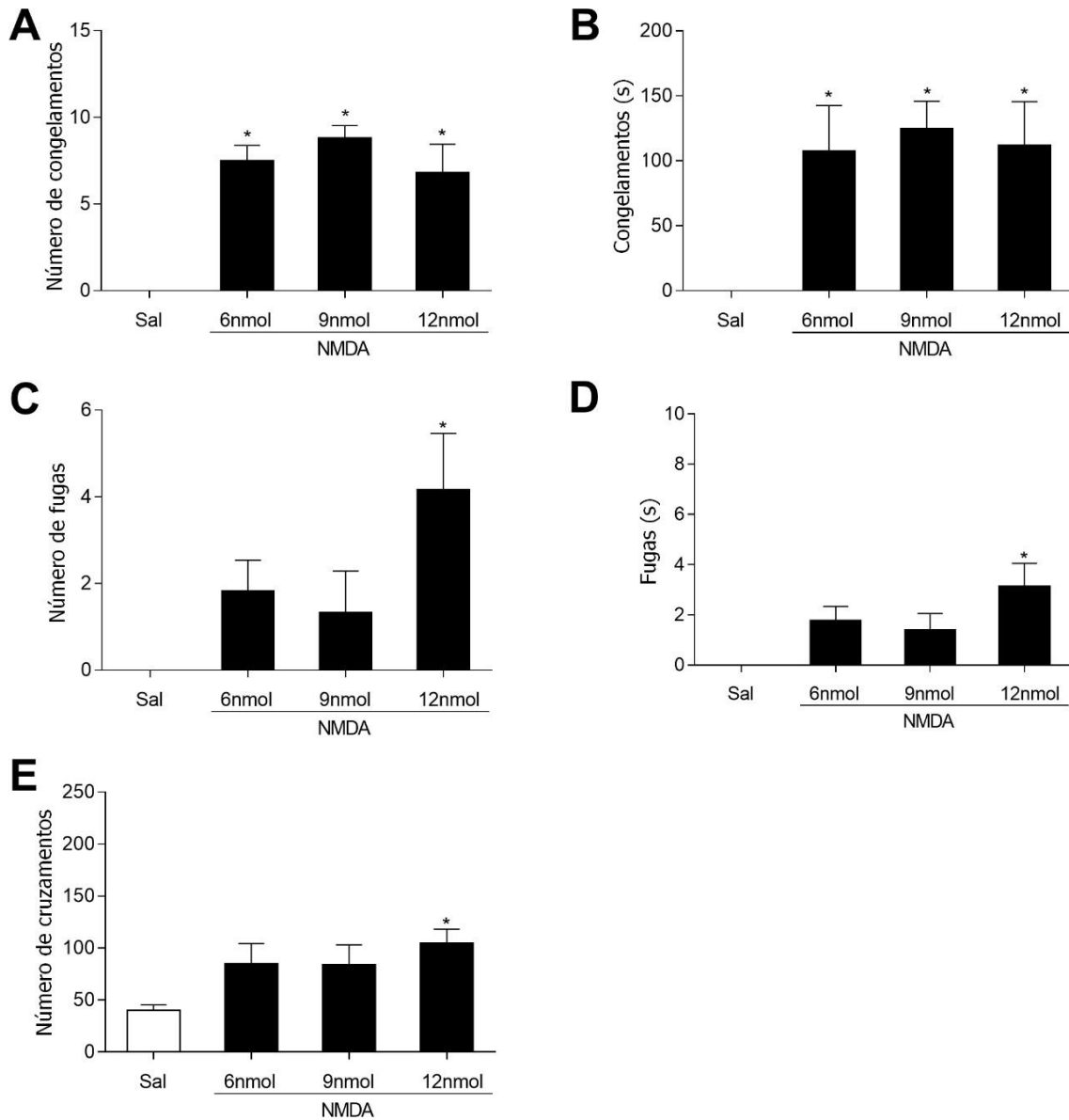


Figura 10. Efeito da microinjeção de NMDA (6, 9 e 12 nmol) ou de salina (NaCl 0,9%; 0,2 μ L) no CS na frequência (A, C e E) e duração (B e D) de congelamento (A e B), fuga (C e D) e cruzamentos (E); n = 6 por grupo. As colunas representam a média e as barras o EPM. *p<0.05 comparado com o grupo controle tratado com salina (Sal), de acordo com a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de comparações múltiplas de Tukey.

A ativação dos neurônios no CS com o agonista de receptores NMDA em todas as doses (6, 9 e 12 nmol) evocou antinocicepção induzida pelo medo em ratos. De acordo com a ANOVA de duas vias (RM-ANOVA), houve efeito significativo do tratamento [$F_{(3,20)} = 3.767$; $p < 0.05$], do tempo [$F_{(8,160)} = 42.42$; $p < 0.001$] e da interação tratamento *versus* tempo [$F_{(24,160)} = 3.938$; $p < 0.001$]. O grupo de ratos tratados com microinjeções de NMDA na dose mais alta (12 nmol) apresentou antinocicepção de 0 a 20 minutos após o comportamento defensivo de fuga. O grupo tratado no CS com a dose intermediária de NMDA (9 nmol) e a dose mais baixa (6 nmol) teve um aumento de LRC do tempo 0 aos 10 minutos e no tempo 0, respectivamente, em comparação ao grupo controle (Sal), de acordo com o teste *post hoc* Tukey ($p < 0.05$ em todos os casos), como mostrado na figura 11.

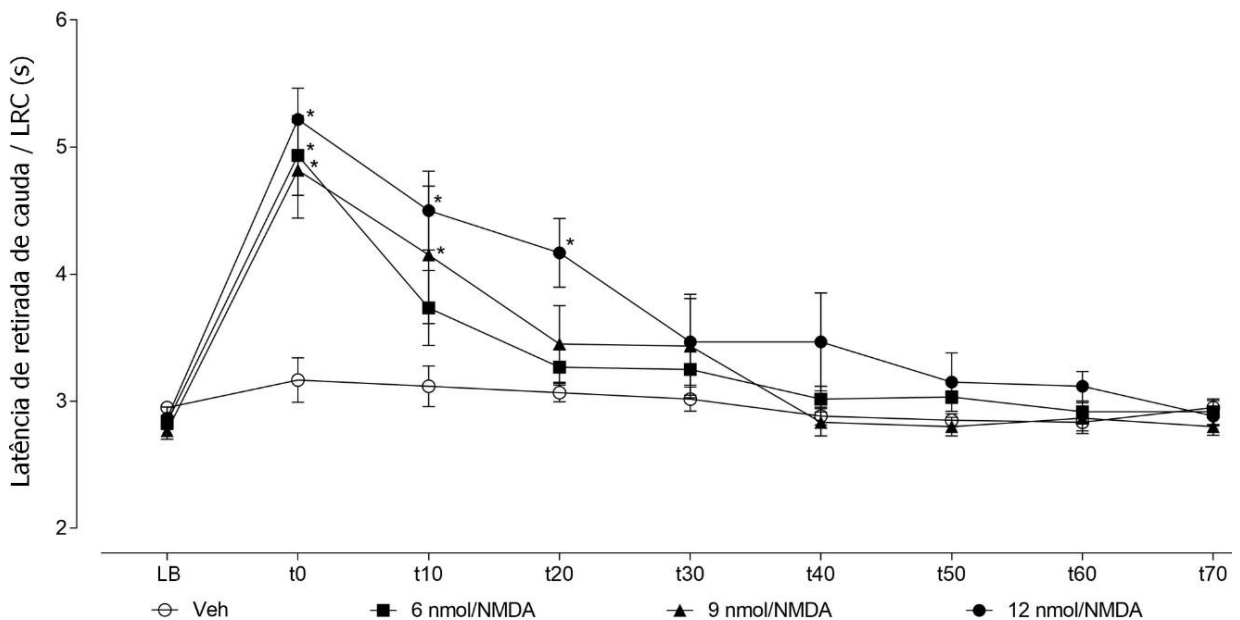


Figura 11. Efeito da microinjeção de NMDA (6, 9 e 12 nmol) ou veículo (Veh = NaCl 0,9%; 0,2 μ L) no colículo superior (CS) em relação à antinocicepção induzida pelo medo. A antinocicepção causada pelo comportamento defensivo foi registrada pelo teste de retirada de cauda (*tail-flick*); $n = 6$ por grupo. Aumentos nos limiares nociceptivos foram representados como médias \pm EPM. * $p < 0.05$ em comparação com o grupo controle tratado com veículo (Veh), de acordo com a ANOVA (RM-ANOVA – comparações múltiplas) de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

4.4 Experimento IV

4.4.1 Localização dos sítios de microinjeção

Confirmação histológica dos sítios de microinjeção de NMDA (12 nmol) ou de veículo na região das cpCS e de microinjeção de R-96544 (0.5; 5 e 10 nM) ou veículo no NDR representados em cortes transversais da figura 12.

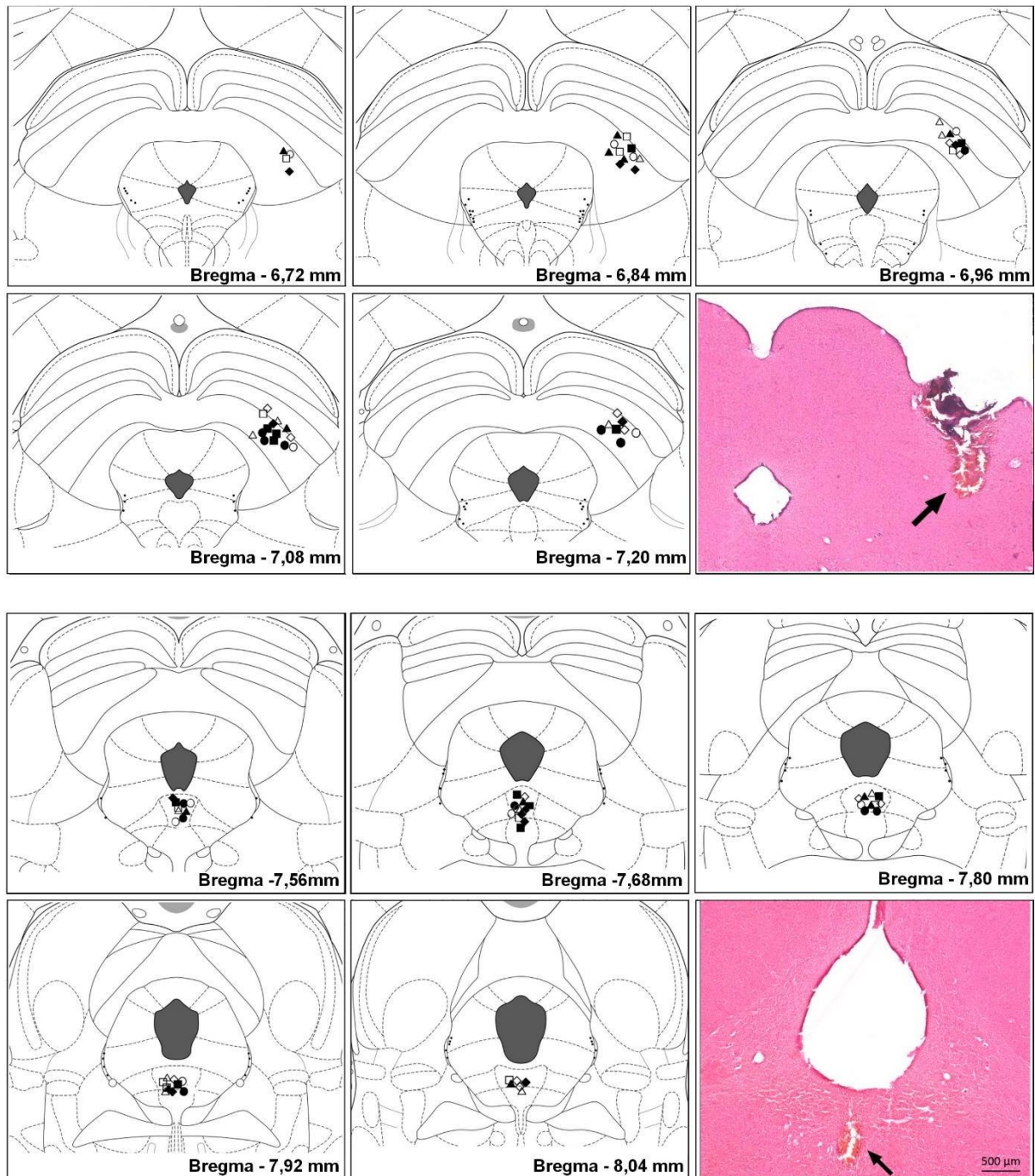


Figura 12. B: Diagramas de secções transversais do encéfalo de rato, passando pelos corpos quadrigêmeos e NDR, mostrando os locais de microinjeção de R-96544 nas concentrações 0.5 (◆), 5 (■) e 10 (▲) nM seguido da administração de NMDA (12 nmol) nas cpCS. Grupos controles: Pré-tratamento do NDR com R-96544 nas concentrações 0.5 (◇), 5 (□), 10 (Δ) nM seguido da administração de veículo (NaCl 0,9%; 0,2 µL) nas cpCS. Pré-tratamento do NDR com veículo seguido da microinjeção de NMDA (●) ou veículo (○) nas cpCS. As imagens são retratadas em ilustrações modificadas do atlas de Paxinos e Watson (2017). As imagens à direita são fotomicrografias de secções transversais mesencefálicas ilustrando o local de microinjeção das drogas no CS e no NDR. Coloração: hematoxilina e eosina. Barra: 500 µm.

4.4.2 Efeitos do pré-tratamento do NDR com R-96544 sobre o comportamento de defesa e antinocicepção induzida pelo medo evocado pela administração do agonista de receptores NMDA nas cpCS de ratos

De acordo com a ANOVA de duas vias, houve efeito significativo nos tratamentos do NDR [$F_{(3,40)} = 35.71$; $p < 0.001$] e das cpCS [$F_{(1,40)} = 78.35$; $p < 0.001$] e também na interação entre eles [$F_{(3,40)} = 35.71$; $p < 0.001$] em relação ao número de congelamento. Semelhante ao que observamos no experimento III, de acordo com a ANOVA de duas vias, o tratamento das cpCS com NMDA na dose de 12 nmol evocou congelamento, tendo havido aumento significativo da frequência ($p < 0.001$) e da duração ($p < 0.001$) de congelamento quando comparado com o grupo controle, tratado com veículo (Veh-Veh) nas cpCS. O pré-tratamento do NDR com R-96544 em diferentes concentrações (0.5; 5 e 10 nM) diminuiu tanto o número (teste *post hoc* de Tukey; $p < 0.001$ em todos os casos) quanto a duração (teste *post hoc* de Tukey; $p < 0.001$ em todos os casos) do congelamento evocado pela microinjeção de NMDA nas cpCS.

O pré-tratamento do NDR com R-96544 em diferentes concentrações, seguido pela administração de veículo nas cpCS não apresentou efeito estatisticamente significativo nem na frequência, nem na duração (teste *post hoc* de Tukey; $p > 0.05$ em ambos os casos) de congelamento em comparação com o grupo controle, tratado com veículo no NDR e veículo nas cpCS (Veh-Veh), conforme mostrado na figura 13 A e B.

No que concerne ao comportamento de fuga, de acordo com a ANOVA de duas vias, houve efeito estatisticamente significativo do tratamento no NDR [$F_{(3,40)} = 3.946$; $p < 0.05$] e nas cpCS [$F_{(1,40)} = 22.04$; $p < 0.001$] e também da interação entre esses fatores [$F_{(3,40)} = 3.946$; $p < 0.05$]. A microinjeção de NMDA nas cpCS evocou uma elevada frequência e duração de fuga (teste *post hoc* de Tukey; $p < 0.001$ em ambos os casos) em comparação com o grupo controle, tratado com veículo (Veh-Veh). O pré-tratamento do NDR com R-96544 nas maiores concentrações (5 e 10 nM) diminuiu significativamente a frequência (teste *post hoc* de Tukey; $p < 0.01$ em ambos os casos) e a duração (teste *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$ em ambos os casos) do comportamento de fuga, enquanto que a menor concentração de R-96544 foi capaz de diminuir apenas a duração da fuga (teste *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$), ilustrado na figura 13 C e D.

O pré-tratamento do NDR com o R-96544 nas concentrações 0.5; 5 e 10 nM não apresentou efeito *per se* nem no congelamento, nem no comportamento de fuga (teste *post hoc* de Tukey; $p > 0.05$ em todos os casos), em comparação com o grupo controle, tratado com veículo (Veh-Veh), conforme mostrado na figura 13 A e D.

De acordo com a ANOVA de duas vias, houve efeito significativo do tratamento nas cpCS [$F_{(1,40)} = 44.56$; $p < 0.001$], mas não no NDR [$F_{(3,40)} = 1.698$; $p < 0.05$] e interação entre esses fatores [$F_{(3,40)} = 1.35$; $p < 0.05$]. O grupo de ratos que recebeu a microinjeção de veículo seguida pela administração de R-96544 no NDR exibiu um maior número de cruzamentos (teste *post hoc* de Tukey; $p < 0.001$) em relação ao grupo controle (Veh-Veh). Além disso, o pré-tratamento do NDR com R-96544 em diferentes concentrações (0.5; 5 e 10 nM) que não foi capaz de diminuir o número de cruzamentos (teste *post hoc* de Tukey; $p > 0.05$ em todos os casos) em comparação com o grupo controle, tratado com NMDA (Veh-NMDA), ilustrado na figura 13 E.

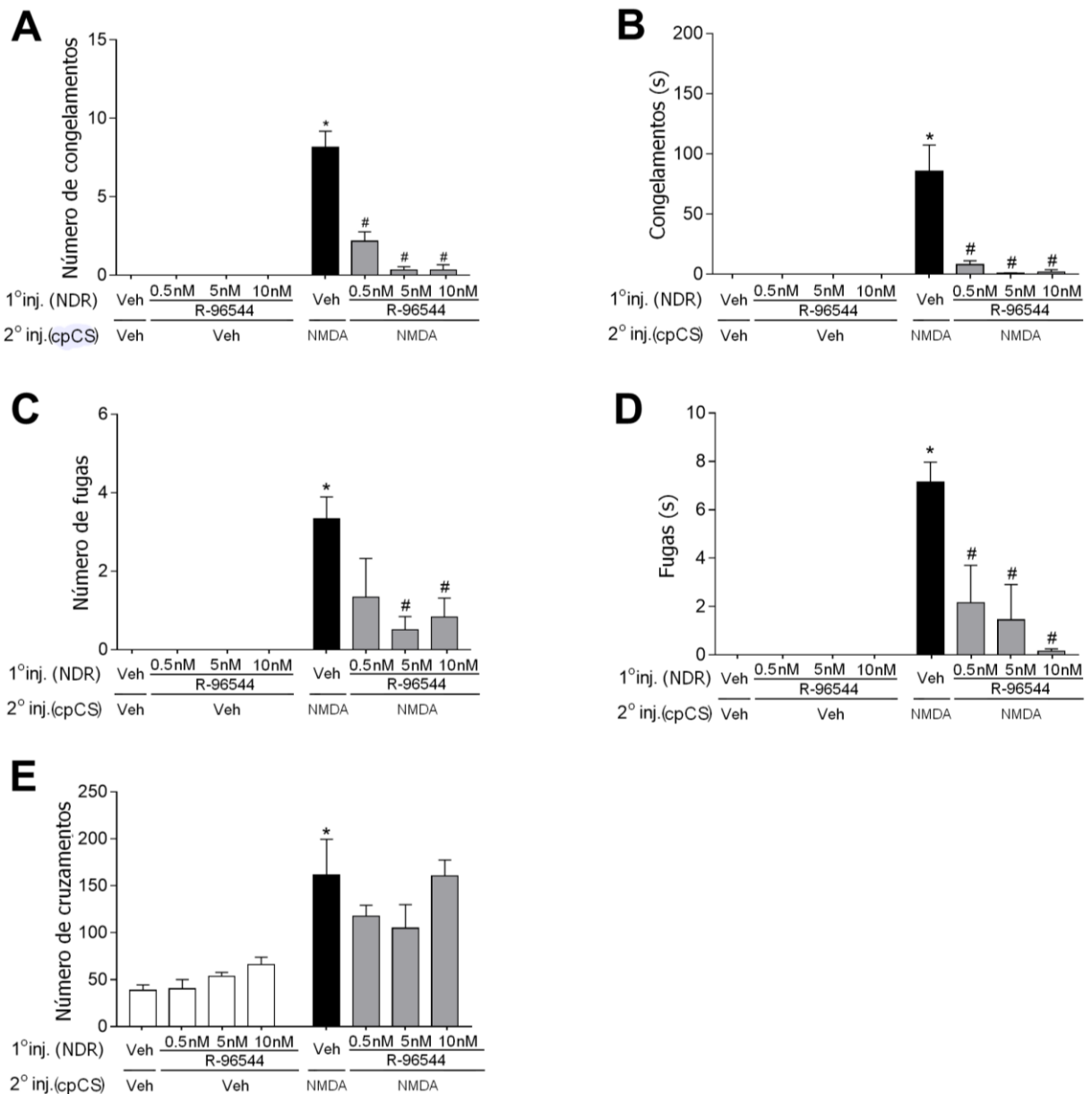


Figura 13. Efeito da microinjeção de R-96544 (0.5; 5 e 10 nM) ou veículo (10% DMSO) no núcleo dorsal da rafe (NDR) na frequência (A, C e E) e duração (B e D) de congelamento (A e B) e de fuga (C e D), e no número de cruzamentos (E) evocados pela microinjeção de NMDA na dose de 12 nmol ou veículo (NaCl 0.9%;0.2 μ L) nas cpCS; n=6 por grupo. As colunas representam a média e as barras o EPM. * p <0.05 em comparação com o grupo controle, tratado com veículo (Veh-Veh); # p <0.05 em comparação com o grupo controle tratado com NMDA (Veh-NMDA), de acordo com a ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

De maneira semelhante aos experimentos anteriores, o comportamento defensivo foi evocado com o tratamento das cpCS com NMDA, o que foi acompanhado pela antinocicepção induzida pelo medo. Além disso, o pré-tratamento do NDR com R-96544 diminuiu de maneira significativa tais respostas aversivas relacionadas ao comportamento defensivo. De acordo com a ANOVA de

duas vias (RM-ANOVA), houve efeito significativo do tratamento [$F_{(7,40)} = 28.3, p < 0.001$], do tempo [$F_{(8,320)} = 35.1, p < 0.001$] e da interação tratamento *versus* tempo [$F_{(56,320)} = 14.9, p < 0.001$]. A ativação dos neurônios nas cpCS promovida pela microinjeção do agonista de receptores NMDA precedida pela administração de veículo no NDR aumentou a LRC no teste *tail-flick* durante os primeiros 40 minutos após os comportamentos defensivos (teste comparações múltiplas de Tukey; $p < 0.001$), em comparação com o grupo controle, tratado com veículo (Veh-Veh). O pré-tratamento do NDR com R-96544 nas concentrações de 5 e 10 nM diminuiu a antinocicepção induzida pelo medo, também durante os 40 minutos, em comparação com o grupo controle tratado nas cpCS com NMDA (Veh-NMDA) e com o grupo pré-tratado no NDR com R-96544 na concentração de 0.5 nM (teste *post hoc* Tukey; $p < 0.001$ em ambos os casos) conforme mostrado na figura 14 F.

As microinjeções de R-96544 no NDR seguidas pela administração de veículo nas cpCS não tiveram efeito *per se* na LRC, de acordo com o teste *post hoc* Tukey; $p > 0.05$), conforme mostrado na figura 14 F.

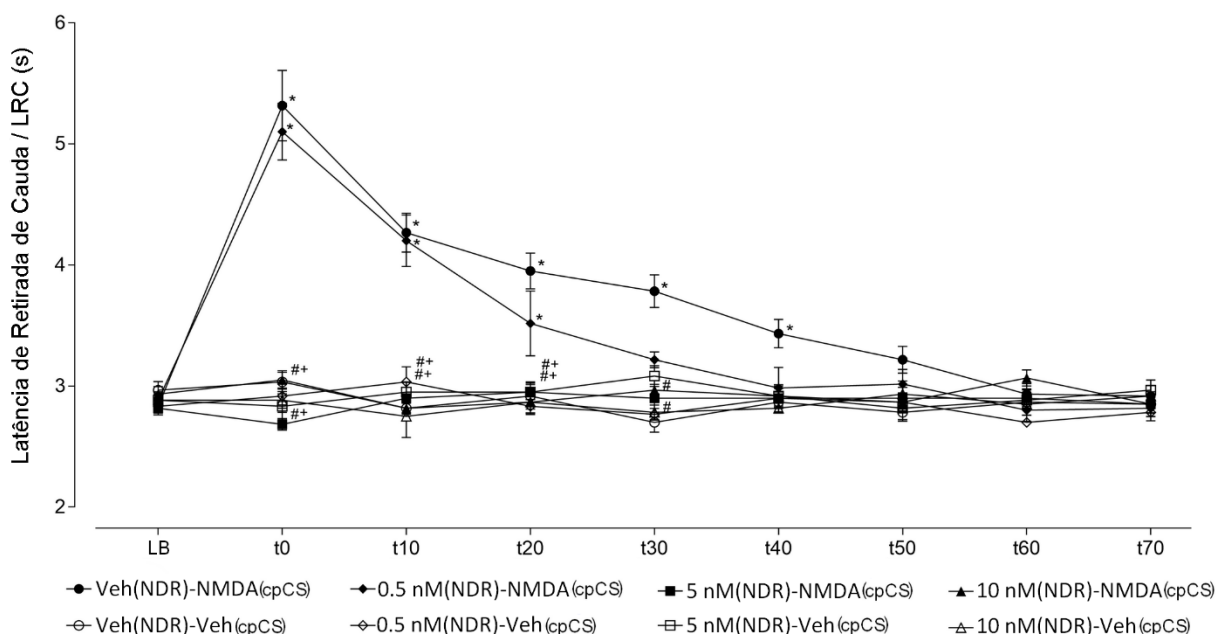


Figura 14. Efeito da microinjeção de R-96544 (0.5; 5 e 10 nM) ou veículo (10% DMSO) no NDR seguida pela microinjeção de NMDA (12 nmol/0.2 μ L) ou veículo (NaCl 0.9%; 0.2 μ L) nas cpCS na antinocicepção induzida pelo medo. A antinocicepção causada pelo comportamento defensivo foi registrada pelo teste de retirada de cauda (*tail-flick*); $n = 6$ por grupo. Aumentos nos limiares nociceptivos foram representados como médias \pm EPM. * $p < 0.05$ comparado com o grupo controle, tratado com veículo (Veh-Veh); # $p < 0.05$ em comparação com o grupo tratado com NMDA (Veh/NMDA); + $p < 0.05$ em comparação com o grupo pré-tratado no NDR com R-96544 na concentração 0.5 nM, de acordo com a ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

4.5 Experimento V

4.5.1 Localização morfológica dos receptores 5-HT_{2A} nos neurônios do NDR

Foi identificada marcação de receptores 5-HT_{2A} presentes nos corpos de neurônios GABAérgicos tanto na região dorsal (DRD, do inglês *sub-region Dorsal of the Dorsal Raphe Nucleus*) quanto nas asas laterais (WRD, do inglês *Lateral Wings of the Dorsal Raphe Nucleus*) do NDR, o que nos permite considerar que tais receptores podem estar atuando na modulação serotoninérgica de projeções eferentes do NDR, via interneurônios GABAérgicos presentes no NDR (Figura 15).

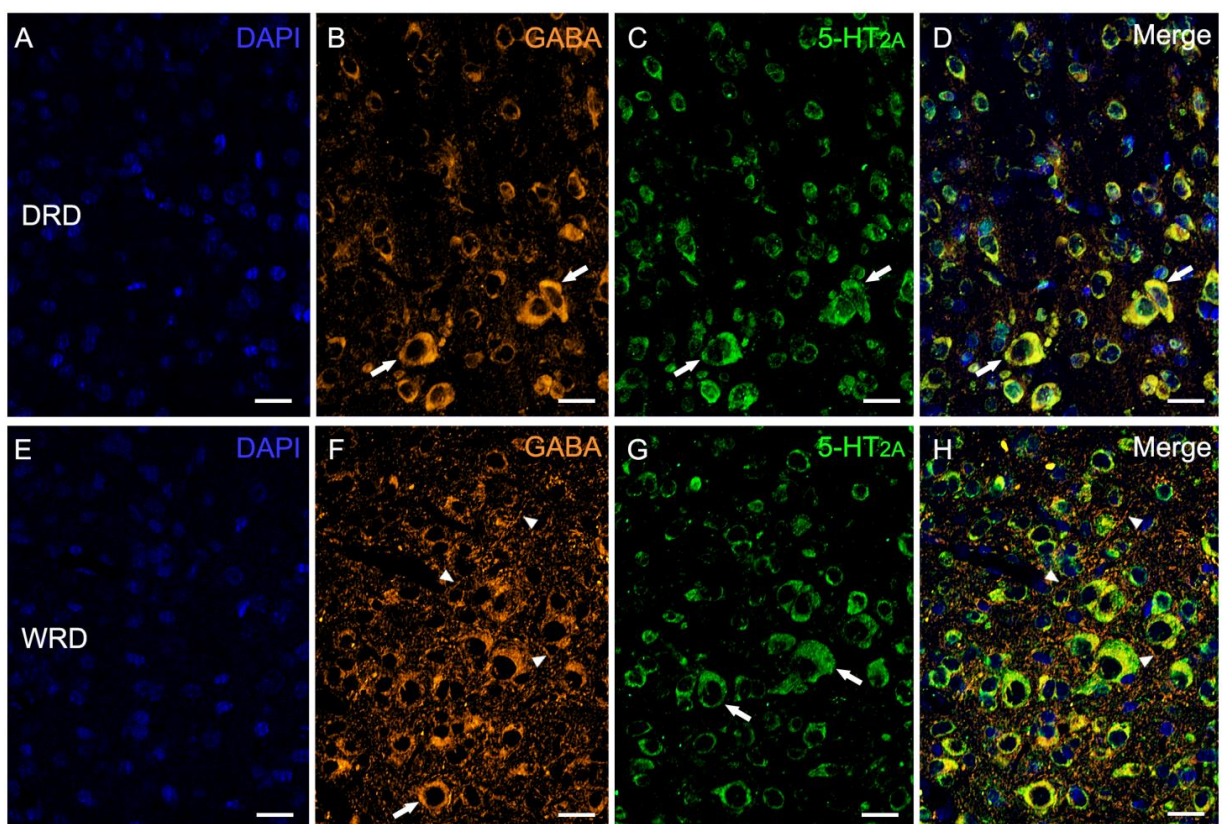


Figura 15. Fotomicrografias de seções transversais da região dorsal (DRD, do inglês *sub-region Dorsal of the Dorsal Raphe Nucleus*) e das asas laterais (WRD, do inglês *Lateral Wings of the Dorsal Raphe Nucleus*) do NDR, mostrando através da imuno-histoquímica a marcação de GABA e do receptor 5-HT_{2A} em *pericaria* (setas) neuroniais. A ponta de seta indica as fibras dos interneurônios GABAérgicos. Barra: 20 μ m.

O presente trabalho mostrou que o bloqueio dos receptores 5-HT_{2A} no NDR reduziu as reações defensivas e a antinocicepção induzida pelo medo incondicionado, evocada pela estimulação química do ncCI e das cpCS com NMDA. Inicialmente, mostramos que a facilitação da neurotransmissão de aminoácidos excitatórios através da ativação de receptores ionotrópicos de NMDA desencadeia os comportamentos de congelamento e de fuga. Tais respostas defensivas foram consideradas como respostas do tipo pânico semelhantes aos ataques de pânico observados na clínica psiquiátrica (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD, 2001; SHEKHAR, 1994; SCHENBERG, 2001). De fato, existem evidências mostrando que o comportamento de congelamento provocado pela estimulação elétrica de regiões mesencefálicas de animais de laboratório é altamente responsivo ao tratamento crônico com a fluoxetina, fármaco clássico do grupo de inibidores seletivos de recaptação de serotonina que possui efeito panicolítico (BORELLI, 2004). Nossos dados mostram que as doses crescentes de NMDA administradas no ncCI e nas cpPCS provocaram um padrão comportamental defensivo, caracterizado pelo estado de congelamento e de fuga expressa por corrida e saltos.

A estimulação dos corpos quadrigêmeos com NMDA na maior dose foi a mais efetiva em evocar o comportamento de fuga caracterizado por corrida vigorosa, colisão com as paredes da arena circular e saltos horizontais durante episódios de corrida rápida. No final dos comportamentos explosivos de fuga, os animais exibiram reações de congelamento duradouras, o que também é considerado uma resposta do tipo pânico (SCHENBERG, 2001; URIBE-MARIÑO, 2012). Nossos dados corroboram estudos prévios que mostraram que a estimulação química de neurônios do mesencéfalo com NMDA (ULLAH, 2015), incluindo o CI (CARDOSO 1994, BRANDÃO 1993) evoca o congelamento seguido por um vigoroso comportamento de fuga, em consequência da ativação de estruturas límbicas (LAMPREA, 2002). A resposta de congelamento, que segue os comportamentos explosivos de fuga, também foi observado em alguns estudos usando outras abordagens experimentais, como a estimulação elétrica do teto mesencefálico (BRANDÃO, 2008; MARTINEZ, 2007; SAITO, 2015). Por exemplo, Ruiz-Martinez e colaboradores observaram que o congelamento ocorreu também após o término dessa estimulação (PSF, do inglês *post-stimulation freezing*) (MARTINEZ, 2007). De fato, os comportamentos defensivos evocados por microinjeções de NMDA tanto no CS quanto no CI parecem

ser similares àqueles desencadeados por animais submetidos à estimulação elétrica em estruturas do teto mesencefálico, com a vantagem de ativar apenas os corpos neuroniais e não fibras de passagem.

Além disso, os resultados apresentados mostram claramente que os comportamentos defensivos do tipo pânico organizados pelos corpos quadrigêmeos foram seguidos por antinocicepção induzida pelo medo não condicionado. Esta antinocicepção tem sido considerada uma importante resposta defensiva que acompanha as reações afetivas. Há evidências de que essa resposta antinociceptiva relacionada ao medo não condicionado ocorre devido ao recrutamento de neurônios localizados nas estruturas límbicas e paralímbicas que estão conectadas ao sistema endógeno modulador da dor (COIMBRA, 2016; FALCONI-SOBRINHO, 2017; FANSELOW, 1986; RHODES, 1978) e é semelhante àquelas respostas antinociceptivas exibidas por roedores que estão expostos a uma situação de risco a vida (COIMBRA, 2017). Não ignoramos o fato de que o próprio contentor utilizado pela técnica de *tail-flick* pode ter um efeito estressor considerável nos animais, o que por sua vez pode influenciar nas respostas nociceptivas, porém, devemos considerar também que todos os ratos foram submetidos sob as mesmas condições durante os experimentos e ao comparar os grupos tratados com os controles encontramos diferenças significativas. O *tail-flick* já é uma técnica válida e muito utilizada para testes nociceptivos desde que foi descrita pela primeira vez na literatura por D'Amour e Smith em 1941 (D'AMOUR; SMITH, 1941), o que aumenta a nossa convicção quanto a validade dos nossos dados e nos permite afirmar que tais distinções encontradas nos nossos grupos experimentais se dão pelo efeito dos fármacos utilizados neste trabalho.

Os presentes resultados corroboram estudos prévios que demonstraram que comportamentos defensivos de fuga elaborados por estruturas do teto mesencefálico, como a cpCS, SCPd (COIMBRA, 1992) e o CI (CASTILHO, 1999; COIMBRA, 1997) são seguidos por resposta antinociceptiva não opioide. Há evidências de que pelo menos parte da antinocicepção induzida pelo medo, desencadeada pela ativação do teto mesencefálico, recruta os mecanismos serotoninérgicos do sistema endógeno de modulação da dor (BASBAUM, 1984; de OLIVEIRA, 2017). Tais vias originadas a partir dos neurônios de estruturas mesencefálicas recrutam estruturas da medula oblonga, como o núcleo magno do rafe

e o complexo reticular gigante-lular/paragigantocelular antes de chegar ao CDME (de OLIVEIRA, 2017). O presente trabalho apresenta evidência de que há um envolvimento dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2A}, presentes no NDR, na elaboração da antinocicepção induzida pelo medo eliciado pela ativação química dos neurônios localizados nos corpos quadrigêmeos.

De fato, estudos neurofisiológicos mostraram que a ativação da neurotransmissão glutamatérgica pode promover liberação de 5-HT (CELADA, 2001). Considerando que a estimulação elétrica dos neurônios do mesencéfalo dorsal e fibras de passagem podem promover uma facilitação da atividade serotoninérgica no sistema endógeno de modulação da dor (de OLIVEIRA, 2017), podemos supor que o aumento no limiar nociceptivo provocado pela microinjeção de NMDA nos corpos quadrigêmeos é devido a uma possível liberação de 5-HT nos núcleos reticulares monoaminérgicos do tronco encefálico, cujas projeções descendentes podem controlar a atividade do CDME e dos neurônios que compõem as vias espinotalâmicas (RAHMAN, 2011).

Quando os animais receberam microinjeções de R-96544, antagonista seletivo de receptores 5-HT_{2A} (OGAWA, 2002), no NDR, houve uma significativa diminuição da incidência dos comportamentos de congelamento e fuga, evocados pela administração de NMDA nos corpos quadrigêmeos, sugerindo uma alta sensibilidade de redes neuais CI e do CS ao aumento da atividade de aferências serotoninérgicas ao NDR. Tais resultados são semelhantes ao que foi observado por Nogueira e Graeff (1995), que microinjetaram DOI, um agonista seletivo a receptores do tipo 5-HT_{2A}, na SCPd, o que causou um aumento do limiar de estimulação elétrica nessa mesma estrutura para induzir respostas de fuga. Este efeito panicolítico foi bloqueado com o pré-tratamento da SCPd com um antagonista de receptores 5-HT_{2A}. Neste mesmo estudo, os agonistas de receptores 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT e BAY-R-1530) também atenuaram as respostas de fuga, ao passo que o inverso ocorreu com o pré-tratamento da SCPd com um antagonista de receptores 5-HT_{1A} (NAN-190). É curioso ver que os receptores do tipo 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} parecem promover o mesmo papel de modulação do comportamento de defesa, apesar de desempenharem mecanismos distintos ao serem ativados. Os receptores do tipo 5-HT_{1A} são acoplados à proteína Gi, promovendo uma hiperpolarização da membrana pós-sináptica, devido ao aumento na permeabilidade de membrana ao K⁺, o que

produz um efeito inibitório nos neurônios serotoninérgicos que expressam esse autorreceptor. Já os receptores do tipo 5-HT_{2A} são acoplados à proteína Gq promovendo uma despolarização da membrana pós-sináptica, devido ao aumento de Ca²⁺ intracelular, produzindo um efeito de ativação nas células que expressam tais heterorreceptores (HOYER, 2002). Acredita-se que a serotonina poderia exercer sua ação ativando neurônios inibitórios da SCPd. Embasando essa hipótese, sabe-se que mais de 70% dos receptores do tipo 5-HT_{2A} estão em interneurônios GABAérgicos em todas as colunas da SCP (NOGUEIRA; GRAEFF, 1995; GRIFFITHS; LOVICK, 2002).

Seguindo essa mesma linha de raciocínio, um possível mecanismo que pode justificar as respostas observadas no presente trabalho é a presença dos receptores 5-HT_{2A} em interneurônios GABAérgicos que modulam as projeções serotoninérgicas do NDR. Com o bloqueio do receptor que despolariza os neurônios de modulação inibitória de vias de projeção, é possível que tenha ocorrido um aumento na liberação de 5-HT no teto do mesencéfalo, promovendo o efeito panicolítico, caracterizado pela diminuição da resposta defensiva evocada pela ativação dos neurônios dos corpos quadrigêmeos. No sentido de fornecer um embasamento morfológico para essa hipótese, fez-se um estudo imunistoquímico para localizar o tipo de neurônio que expressa os receptores 5-HT_{2A} no NDR. Foi observada uma sobreposição da marcação dos neurônios GABAérgicos com receptores 5-HT_{2A} na região central do NDR (DRD), sugerindo que estes estão localizados nos interneurônios inibitórios. Existem evidências de que o NDR envia projeções serotoninérgicas para regiões do teto mesencefálico como CS (EDWARDS, 1990; VILLAR, 1988; VERTTES, 1991). Considerando que o bloqueio dos receptores 5-HT_{2A} do NDR, por meio de microinjeções locais de R-96544, diminui a atividade dos interneurônios GABAérgicos que estariam promovendo uma modulação inibitória das projeções serotoninérgicas eferentes que partem da região WRD (onde notamos maior marcação de fibras GABAérgicas) para o CS (VILLAR, 1988), podemos argumentar que o aumento da atividade das vias serotoninérgicas do NDR aos corpos quadrigêmeos atenuaram os comportamentos de congelamento e fuga organizados no CS e CI.

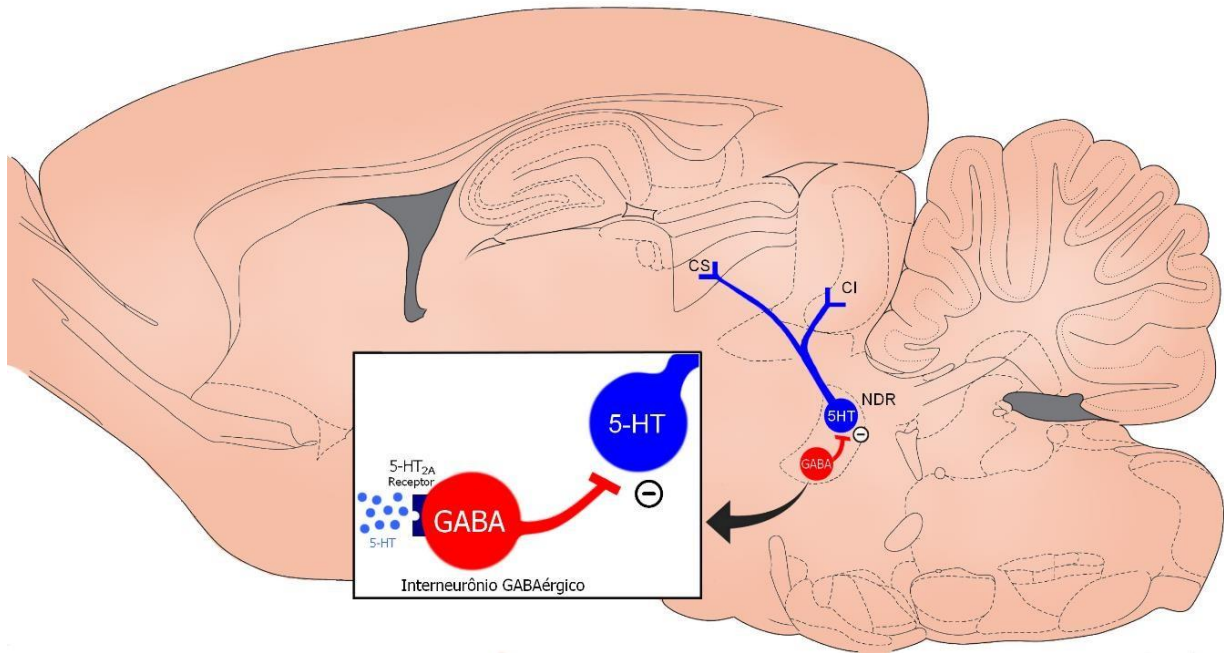


Figura 16. Representação esquemática da possível modulação inibitória dos receptores 5-HT_{2A} via interneurônios GABAérgicos que interagem com as fibras serotoninérgicas que partem do NDR e se projetam ao teto do mesencéfalo (CS e CI). Em vermelho estão representados os interneurônios GABAérgicos que promovem a modulação inibitória das células eferentes presentes no NDR. Em azul, está a representação dos neurônios serotoninérgicos que se projetam aos corpos quadrigêmeos. Os receptores 5-HT_{2A} presentes nos interneurônios GABAérgicos (heterorreceptores) interagem com os agonistas serotoninérgicos endógenos liberados no NDR. Quando estes receptores são ativados, promovem a despolarização dos interneurônios GABAérgicos que regulam a atividade dos neurônios serotoninérgicos que se projetam para outras estruturas que organizam o comportamento defensivo. Ilustração modificada do atlas de Paxinos e Watson (2007).

Evidências morfológicas indicam a existência de vias serotoninérgicas que partem do NDR e se projetam ao teto do mesencéfalo (PARENT, 1981). Além disso, a administração sistêmica do DOI, agonista de receptores 5-HT₂, aumentou as células imunopositivas para proteína Fos no NDR e os neurônios com marcação para receptores 5-HT₂ estavam colocalizados com corpos celulares imunopositivos para GABA (do inglês *gamma aminobutyric acid*) (BOOTHMAN; SHARP, 2005). No mesmo trabalho, sugere-se que o aumento na expressão de Fos no NDR induzido por DOI foi mediado por receptores 5-HT_{2A}, uma vez que este efeito foi bloqueado por um antagonista seletivo (MDL100907) de receptores 5-HT_{2A}, enquanto que o bloqueio dos receptores 5-HT_{2B/2C} com SB206553, não foi capaz de promover uma resposta similar. Desta forma, nossos dados reforçam a ideia de que projeções serotoninérgicas do NDR

ao teto mesencefálico podem ser moduladas pelos receptores 5-HT_{2A} localizados em neurônios do NDR.

Os presentes resultados corroboram estudos que mostram que o aumento da liberação de 5-HT através de abordagens farmacológicas em estruturas mesencefálicas diminui as reações de fuga relacionadas ao ataque de pânico (GRAEFF, 1996). Pobbe e Zangrossi mostraram que a ativação de receptores serotoninérgicos na SCPd promovida pelo agonista seletivo de receptores 5-HT_{1A} (WAY-100635) injetado no NDR, atenuou as respostas de fuga expressa por roedores submetidos ao teste do labirinto em T-elevado. O efeito panicólico do pré-tratamento com WAY-100635 no NDR foi bloqueado com o pré-tratamento da SCPd com cetanserina, um antagonista preferencial de receptores 5-HT_{2A/2C}. Tais resultados indicam que os receptores 5-HT_{1A} no NDR desempenham uma modulação inibitória e os receptores 5-HT_{2A} na SCPs parecem mediar o efeito da 5-HT no comportamento de fuga (POBBE; ZANGROSSI, 2005). Em relação à resposta antinociceptiva que se seguiu aos comportamentos defensivos provocados pela estimulação química do CI e CS com NMDA, as microinjeções intra-NDR de R-96544 em concentrações mais altas foram capazes de reduzir a antinocicepção induzida pelo comportamento de fuga. Já foi proposto que o sistema serotoninérgico poderia mediar a antinocicepção induzida pelo medo não condicionado, desencadeada pela estimulação elétrica e química da cpCS, SCPd (COIMBRA, 1992) e CI (CASTILHO, 1999; COIMBRA, 1997). Há estudos que demonstraram que a antinocicepção induzida pela estimulação dos neurônios de estruturas mesencefálicas pode ser revertida com microinjeções de cetanserina nas cpCS (COIMBRA, 1997) e pelo pré-tratamento do núcleo magno da rafe com ritanserina, um antagonista preferencial de receptores do tipo 5-HT_{2A/2C} (de OLIVEIRA, 2017). Apesar dessas evidências farmacológicas serem importantes, o presente trabalho utilizou um antagonista com maior afinidade pelo receptor 5-HT_{2A}, corroborando a ideia de que os receptores 5-HT_{2A} modulam as respostas de comportamento defensivo em estruturas mesencefálicas.

Nosso estudo apoia a hipótese de que a elaboração da antinocicepção induzida pelo medo não condicionado eliciada pela estimulação química dos corpos quadrigêmeos depende do recrutamento de receptores 5-HT_{2A} no NDR, uma vez que a microinjeção do antagonista seletivo a esses tipos de receptores atenuou as respostas de comportamento defensivo seguidas pela antinocicepção induzida pelo medo, evocadas pela ativação dos neurônios nos corpos quadrigêmeos com NMDA.

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

- A estimulação química tanto do CI quanto do CS com o agonista de receptores NMDA em diferentes doses (6, 9 e 12 nmol) é capaz de evocar comportamentos defensivos seguidos da antinocicepção induzida pelo medo, sendo a dose de 12 nmol a mais efetiva em eliciar comportamentos do tipo ataque de pânico em ambas as estruturas que constituem o teto mesencefálico.
- Receptores 5-HT_{2A} presentes no NDR possuem um papel importante, tanto na modulação do comportamento defensivo do tipo pânico, quanto de processos antinociceptivos elaborados no CI e no CS, uma vez que o bloqueio de tais receptores com o R-96544 foi capaz de atenuar as respostas pró-aversivas e a antinocicepção induzida pelo medo inato, observadas com a estimulação dos receptores de NMDA no teto mesencefálico.
- Receptores 5-HT_{2A} colocalizam-se com interneurônios GABAérgicos presentes no NDR, o que nos faz considerar a possibilidade de que tais receptores exercem sua modulação via interneurônios de função inibitória; porém, estudos mais aprofundados parecem pertinentes para melhor compreensão do envolvimento da neurotransmissão GABAérgica sobre vias serotoninérgicas eferentes do NDR, que possam modular a atividade de estruturas do *tectum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrams, J. K., Johnson, P. L., Hollis, J. H., & Lowry, C. A. (2004). Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1018(1), 46-57.
- Adams, R. D., & Coppendale, J. (1979). The stress-strain behaviour of axially-loaded butt joints.
- American Psychiatric Association. (1980) Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Washington, DC: APA.
- Axelrod FB, Hilz MJ. (2003) Inherited autonomic neuropathies. *Semin Neurol*; 23(4):381-90. <http://pesquisa.bvsalud.org/regional/resources/mdl-15088259>
- Barnes, N.M.; Sharp, T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function, *Neuropharmacology*. 38 1083–1152.
- Basbaum, A.I. & Fields, H.L. (1984). Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci*. 7:309-38.
- Bassi GS, Kanashiro A, Rodrigues GJ, Cunha FQ, Coimbra NC, Ulloa L. (2018) Brain Stimulation Differentially Modulates Nociception and Inflammation in Aversive and Non-aversive Behavioral Conditions. *Neuroscience*; 383:191-204. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.05.008.
- Baxter, G. Kennett, F. Blaney. (1995) T. Blackburn, 5HT, receptor subtypes: a family re-united, *Trends Pharmacol. Sci*. 1725–1731.
- Ben-Ari, Y. (1981). The amygdaloid complex. (Ed), Elsevier, Amsterdam.
- Besson, J, M. & Chaouch, A. (1987) Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev*. 1987 Jan;67(1):67-186
- Biagioni, A.F.; de Freitas, R.L.; da Silva, J.A.; de, Oliveira R.C.; de Oliveira, R.; Alves, V.M.; 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*; 67:379-94.
- Biagioni, A.F.; Silva, J.A.; 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(4):328-36.
- Blanchard, D.C. & Blanchard, R.J. (1988 a). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol*. 1988;39:43-68.
- Blanchard, D.C. & Takahashi, S.N. (1988 b). No change in intermale aggression after amygdala lesions which reduce freezing. *Physiol Behav*. 42(6):613-6.

Blanchard, R. J., Griebel, G., Henrie, J. A., & Blanchard, D. C. (1997). Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(6), 783-789.

Blanchard, D.C.; Hynd A.L.; Minke, K.A.; Minemoto, T.; Blanchard, R.J. (2001 a). Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. *Neurosci Biobehav Rev.* (7-8):761-70.

Blanchard DC, Griebel G, Pobbe R, Blanchard RJ. (2011) Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 991–998. (doi:10.1016/j.neubiorev.2010.10.016)

Boothman, T. Sharp. (2005) A role for midbrain raphe gamma aminobutyric acid neurons in 5-hydroxytryptamine feedback control., *Neuroreport.* 16 891–6.

Borelli, M.J. Nobre, M.L. Brandão, N.C. Coimbra. (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.* 557–566.

Brandão, M.L.; Melo, L.L.; Cardoso, S.H. (1993). Mechanisms of defense in the inferior colliculus. *Behavioural Brain Res.* 58:49-55.

Brandão, M.L.; Tomaz, C.; Leão-Borges, P.C.; Coimbra, N.C.; Bagri, A. (1988). Defense reaction induced by microinjections of bicuculine into inferior colliculus. *Physiol. Behav.* 44: 361-365.

Brandão, J.M. Zanoveli, R.C. Ruiz-Martinez, L.C. Oliveira, J. Landeira-Fernandez. (2008) Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety, *Behav. Brain Res.*1–13.

Brown, L. A., LeBeau, R., Liao, B., Niles, A. N., Glenn, D., & Craske, M. G. (2016). A comparison of the nature and correlates of panic attacks in the context of Panic Disorder and Social Anxiety Disorder. *Psychiatry research*, 235, 69-76.

Cabanac, M.; Cabanac, A.J.; Parent A. (2009). The emergence of consciousness in phylogeny. *Behav. Brain Res.* 198 (2):267-272.

Calvo, F., Lobão-Soares, B., de Freitas, R. L., Paschoalin-Maurin, T., dos Anjos-Garcia, T., Medeiros, P., ... & Coimbra, N. C. (2018). The endogenous opioid system modulates defensive behavior evoked by *Crotalus durissus terrificus*: Panicolytic-like effect of intracollicular non-selective opioid receptors blockade. *Journal of Psychopharmacology*, 0269881118806301.

Cardoso, S.H; Coimbra, N.C; Brandão, M.L. (1994). Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. *Behav Brain Res.*63(1):17-24.

Cassano, G. B., & Savino, M. (1993). Symptomatology of panic disorder: an attempt to define the panic-agoraphobic spectrum phenomenology. *Psychopharmacology of*

Panic. Oxford Medical Publication, Oxford, 38-57.

Casseday, J. H., & Covey, E. (1996). A Neuroethological Theory of the Operation of the Inferior Colliculus; pp. 323–336. *Brain, behavior and evolution*, 47(6), 323-336.

Castellan-Baldan, M. da Costa Kawasaki, S.J. Ribeiro, F. Calvo, V.M.A. Corrêa, N.C. Coimbra. (2006) Topographic and functional neuroanatomical study of GABAergic disinhibitory striatum-nigral inputs and inhibitory nigrocollicular pathways: Neural hodology recruiting the substantia nigra, pars reticulata, for the modulation of the neural activity in the , *J. Chem. Neuroanat.* 32 1–27.

Castilho, V. Avanzi, M.L. Brandão. (1999) Antinociception elicited by aversive stimulation of the inferior colliculus, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62 425–431.

Casey, K.L. (1999). Forebrain mechanisms of nociception and pain: analysis through imaging. *ProcNatlAcadSci USA*96:7668-74.

Celada, M. V Puig, J.M. Casanovas, G. Guillazo, F. Artigas. (2001) Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors, *J Neurosci.* 9917–9929.

Coimbra, N.C. & Brandão, M.L. (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(1):97-103.

Coimbra, N.C. & Brandão, M.L. (1993). GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behavior elicited by midbraintectum stimulation. *Behav. Brain Res.*59:131-139.

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.; Brandão, M.L. (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.

Coimbra, N.C., Leão-Borges, P.C.; Brandão, M. L. (1989). GABAergic fibers from substantianigra, pars reticulata modulate escape behaviour induced by midbrain central gray stimulation, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22:111-114.

Coimbra, N.C.; Tomaz, C.; Brandão, M.L. (1992). Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalictectum. *Behav. Brain* 50:77-83.

Coimbra, N. C., Osaki, M. Y., Eichenberger, G. C. D., Ciscato Jr, J. G., Jucá, C. E. B., & Biojone, C. R. (2000). Effects of opioid receptor blockade on defensive behavior elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior colliculus in *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). *Psychopharmacology*, 152(4), 422-430.

Coimbra, N. C., Calvo, F., Almada, R. C., Freitas, R. L., Paschoalin-Maurin, T., dos Anjos-Garcia, T., ... & Tracey, I. (2017). Opioid neurotransmission modulates defensive behavior and fear-induced antinociception in dangerous environments. *Neuroscience*, 354, 178-195.

Cornea-Hébert, M. Riad, C. Wu, S.K. Singh, L. Descarries. (1999) Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of adult rat., *J. Comp. Neurol.* 409 187–209.

Cransac, J.M. Cottet-Emard, S. Hellström, L. Peyrin. (1998) Specific sound-induced noradrenergic and serotonergic activation in central auditory structures, *Hear. Res.* 118 151–156.

D'Amour, F. E., & Smith, D. L. (1941). A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther*, 72(1), 74-9.

da Silva, A.F. Biagioni, R.C. Almada, J.A. de Souza Crippa, J.E. Ceclio Hallak, A.W. Zuardi, N.C. Coimbra. (2015) Dissociation between the panicolytic effect of cannabidiol microinjected into the substantia nigra, pars reticulata, and fear-induced antinociception elicited by bicuculline administration in deep layers of the superior colliculus: The role of CB₁-cannabi, *Eur. J. Pharmacol.* 758 153–163.

de Freitas, R.L.;Salgado-Rohner C.J.;Hallak J.E.;de Souza Crippa J.A.;Coimbra N.C. (2013). Involvement of prelimbic medial prefrontal cortex in panic-like elaborated defensive behaviour and innate fear-induced antinociception elicited by GABA_A receptor blockade in the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei: role of the endocannabinoid CB₁ receptor. *Int J Neuropsychopharmacol.* 25:1-18.

de Freitas, R.L.; Salgado-Rohner C.J.; Biagioni A.F.; Medeiros P.; Hallak J.E.; Crippa J.A.; Coimbra N.C. (2014 a). NMDA and AMPA/Kainate Glutamatergic Receptors in the Prelimbic Medial Prefrontal Cortex Modulate the Elaborated Defensive Behavior and Innate Fear-Induced Antinociception Elicited by GABA_A Receptor Blockade in the Medial Hypothalamus. *Cereb Cortex.* (6):1518-28.

de Freitas, R. L., de Oliveira, R. C., de Oliveira, R., Paschoalin-Maurin, T., de Aguiar Corrêa, F. M., & Coimbra, N. C. (2014 b). The role of dorsomedial and ventrolateral columns of the periaqueductal gray matter and in situ 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} serotonergic receptors in post-ictal antinociception. *Synapse*, 68(1), 16-30.

de Oliveira, R. de Oliveira, C.M. dos R. Ferreira, N.C. Coimbra. (2006) Involvement of 5-HT₂ serotonergic receptors of the nucleus raphe magnus and nucleus reticularis gigantocellularis/paragigantocellularis complex neural networks in the antinociceptive phenomenon that follows the post-ictal immobility syndrome, *Exp. Neurol.* 201 144–153.

de Oliveira, R.C. de Oliveira, L.L. Falconi-Sobrinho, R. da Silva Soares Junior, N.C. Coimbra. (2017) 5-Hydroxytryptamine_{2A/2C} receptors of nucleus raphe magnus and gigantocellularis/paragigantocellularis pars α reticular nuclei modulate the unconditioned fear-induced antinociception evoked by electrical stimulation of deep layers of the superior collicul, *Behav. Brain Res.* 316 294–304.

de Oliveira Sergio, T., de Bortoli, V. C., & Zangrossi, H. (2011). Serotonin-2A receptor regulation of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray matter: the role of GABA. *Psychopharmacology*, 218(4), 725-732.

Dahlström, K. Fuxe. (1965) The adrenergic innervation of the nasal mucosa of certain mammals, *Cell Tissue Res.*

Darwin, C. (1872) *The expression of the emotions in man and animals*. London: John Murray.

Day, H. E., Greenwood, B. N., Hammack, S. E., Watkins, L. R., Fleshner, M., Maier, S. F., & Campeau, S. (2004). Differential expression of 5HT-1A, alpha 1b adrenergic, CRF-R1, and CRF-R2 receptor mRNA in serotonergic, gamma-aminobutyric acidergic, and catecholaminergic cells of the rat dorsal raphe nucleus. *The Journal of comparative neurology*, 474(3), 364-78.

Deakin, F.G. Graeff. (1991) 5-HT and mechanisms of defence. Author's response, *J. Psychopharmacol.* 5 339–341.

Dean, P.; Redgrave, P.; Westby, G.W.M. (1989) Event or emergency? Two responses systems in the mammalian superior colliculus. *Trends in Neuroscience*, 12:137-147.

De Franceschi, G., Vivattanasarn, T., Saleem, A. B., & Solomon, S. G. (2016). Vision Guides Selection of Freeze or Flight Defense Strategies in Mice. *Current Biology*, 26(16), 2150–2154. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.006>

Edwards, S. B., Ginburgh, C. L., Henkel, C. K., & Stein, B. E. (1990). Sources of Subcortical GABAergic Projections to the Superior Colliculus in the Cat. *The Journal of Compa*, 302, 143–158. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051060102>

Eichenberger, G.C.D.; Ribeiro, S.J.; Osaki, M.Y.; Maruoka, R.Y.; Resende, G.C.C.; Castellan-Baldan, L.; Corrêa, S.A.L.; Da Silva, L.A.; Coimbra, N.C. (2002). Neuroanatomical and psychopharmacological evidences for interactions between opioid and GABAergic neural pathways in the modulation of the defensive behavior elicited by electrical and chemical stimulation of the dorsal mesencephalon. *Neuropharmacology* 42:48-59.

Eilam D. (2005) Die hard: a blend of freezing and fleeing as a dynamic defense—implications for the control of defensive behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1181–1191. (doi:10.1016/j.neubiorev.2005.03.027)

Falconi-Sobrinho, T. dos Anjos-Garcia, D.H. Elias-Filho, N.C. Coimbra. (2017) Unravelling cortico-hypothalamic pathways regulating unconditioned fear-induced antinociception and defensive behaviours, *Neuropharmacology*. 113 367–385.

Fanselow, M. S. (1980). Conditional and unconditional components of post-shock freezing. *The Pavlovian journal of biological science: Official Journal of the Pavlovian*, 15(4), 177-182.

Fanselow, M. S. (1986) Conditioned Fear-Induced Opiate Analgesia: A Competing

Motivational State Theory of Stress Analgesia, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 40–54.

Ferreira-Netto, C., Borelli, K. G., & Brandão, M. L. (2007). Distinct Fos expression in the brain following freezing behavior elicited by stimulation with NMDA of the ventral or dorsal inferior colliculus. *Experimental neurology*, 204(2), 693-704.

Fields, H. L., Basbaum, A. I., Clanton, C. H., & Anderson, S. D. (1977). Nucleus raphe magnus inhibition of spinal cord dorsal horn neurons. *Brain research*, 126(3), 441-453.

Freitas, R.L.; Uribe-Mariño, A.; Castiblanco-Urbina, M.A.; Elias-Filho, D.H.;Coimbra, N.C. (2009). 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*. 1305:118-31.

Fürst, S. (1999) Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Research Bulletin*, v.48, n.2, p.129-141.

Fuxe, (1965) Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system, *Zeitschrift Für Zellforsch. Und Mikroskopisch*. 596 573–596.

Gamrani H, Calas A, Belin MF, Aguera M, Pujol JF. (1979) High resolution radioautographic identification of [³H]GABA labeled neurons in the rat nucleus raphe dorsalis. *Neurosci Lett* 15: 43–48.

Goetz, R. R., Klein, D. F., & Gorman, J. M. (1994). Consistencies between recalled panic and lactate-induced panic. *Anxiety*, 1(1), 31-36.

Graeff, F.G. (1981). Minor tranquilizers and brain defense system. *Braz. J. Med. Biol.Res.*14:239-265.

Graeff, F.G. (1990). Brain defense systems and anxiety. *Handbook of Anxiety*, M. Roth; G. D. Burrows e R. Noyes (eds.), vol. 3, Elsevier Science Publishers, Amsterdam pp. 307-354.

Graeff, F. G. (1994). Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 27(4), 811-829.

Graeff, F.S. Guimarães, T.G.C.S. De Andrade, J.F.W. Deakin, (1996) Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression, *Pharmacol. Biochem. Behav.*129–141.

Graeff, M.B. Viana, P.O. Mora. (1996) Opposed regulation by dorsal raphe nucleus 5-HT pathways of two types of fear in the elevated T-maze, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 171–177.

Graeff, F. G., & Zangrossi Jr, H. (2002). Animal models of anxiety disorders. *Biological psychiatry*, 877-893.

Graeff, F. G. (2003). Serotonin, periaqueductal gray matter and panic disorder. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 25, 42-45.

- Graeff, F.G. & Guimarães F.S. (2012). *Fundamentos da Psicofarmacologia*. Atheneu.
- Graham, J. (1977). An autoradiographic study of the efferent connections of the superior colliculus in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 173(4), 629-654.
- Gray, J. A. (1982). Précis of The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. *Behavioral and Brain Sciences*, 5(3), 469-484.
- Griffiths, J. L., & Lovick, T. A. (2002). Co-localization of 5-HT_{2A}-receptor-and GABA-immunoreactivity in neurones in the periaqueductal grey matter of the rat. *Neuroscience letters*, 326(3), 151-154.
- Hess, W. R., & Brügger, M. (1943). Das subkortikale Zentrum der affektiven Abwehrreaktion. *Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta*.
- Hole, J. W. (1992). *Essentials of Human Anatomy Physiology*. WCB/McGraw-Hill.
- Huffman, R. F., & Henson Jr, O. W. (1990). The descending auditory pathway and acousticomotor systems: connections with the inferior colliculus. *Brain research reviews*, 15(3), 295-323.
- Hornung, J. P. (2003). The human raphe nuclei and the serotonergic system. *Journal of chemical neuroanatomy*, 26(4), 331-343.
- Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J. Humphrey, P. P. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological reviews*, 46(2), 157-203.
- Hoyer, D., Hannon, J. P., & Martin, G. R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71(4), 533-554.
- Inada, Y., Yoneda, H., Koh, J., Sakai, J., Himei, A., Kinoshita, Y., Sakai, T. (2003). Positive association between panic disorder and polymorphism of the serotonin 2A receptor gene. *Psychiatry Research*, 118(1), 25–31. [https://doi.org/10.1016/S0165-1781\(03\)00064-7](https://doi.org/10.1016/S0165-1781(03)00064-7).
- Jacobs BL, Azmitia EC. (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72: 165–229.
- Jenck, F., Moreau, J. L., & Martin, J. R. (1995). Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry research*, 57(2), 181-191.
- Jones, S.L. (1992) Anatomy of pain. In: SINATRA, R.S. et al. *Acute pain – Mechanisms & management*. Missouri: Mosby Year Book. Cap.2, p.8-28
- Keim, S.R. & Shekhar, A. (1996). The effects of GABA_A receptor blockade in the

dorsomedial hypothalamic nucleus on corticotrophin (ACTH) and corticosterone secretion in male rats. *Brain Res.* 739(1-2):46-51.

Kishi, R., Bongiovanni, R., De Nadai, T. R., Freitas, R. L., De Oliveira, R., Ferreira, C. M. D. R., & Coimbra, N. C. (2006). Dorsal raphe nucleus and locus coeruleus neural networks and the elaboration of the sweet-substance-induced anti-nociception. *Neuroscience Letters*, 395(1), 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.10.046>

Klepper, H. Herbert. (1991) Distribution and origin of noradrenergic and serotonergic fibers in the cochlear nucleus and inferior colliculus of the rat, *Brain Res.* 557190–201.

Klein, B. D., Fu, Y. H., Ptacek, L. J., & White, H. S. (2004). c-Fos immunohistochemical mapping of the audiogenic seizure network and tonotopic neuronal hyperexcitability in the inferior colliculus of the Frings mouse. *Epilepsy research*, 62(1), 13-25.

Kozłowska K, Walker P, McLean L, Carrive P. (2015) Fear and the defense cascade: clinical implications and management. *Harv. Rev. Psychiatry* 23, 263–287. (doi:10.1097/HRP.000000000000065).

Kudo, M., & Niimi, K. (1980). Ascending projections of the inferior colliculus in the cat: an autoradiographic study. *Journal of Comparative Neurology*, 191(4), 545-556.

Lamprea, F.P. Cardenas, D.M. Vianna, V.M. Castilho, S.E. Cruz-Morales, M.L. Brandão. (2002) The distribution of fos immunoreactivity in rat brain following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus, *Brain Res.*186–194.

Lang PJ, Davis M. (2006) Emotion, motivation, and the brain: reflex foundations in animal and human research. *Prog. Brain Res.* 156, 3–29. (doi:10.1016/S0079-6123(06)56001-7).

Leaton RN, Borszcz GS. (1985) Potentiated startle: its relation to freezing and shockintensity in rats. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Processes*, 11, 421–428. (doi:10.1037/0097-7403.11.3.421).

LeDoux, J.E. (1991). Emotion and the limbic system concept. *Concepts in Neuroscience* 2:169-199.

Leite-Panissi, C. R. A., Coimbra, N. C., & Menezes-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 Research Bulletin*, 60(1-2), 167-178.

Lojowska MJ, Gladwin TE, Hermans EJ, Roelofs K. (2015) Freezing promotes perception of coarse visual features. *J. Exp. Psychol. Gen.* 144, 1080–1088. (doi:10.1037/xge0000117).

Lowry, C. A., Hale, M. W., Evans, A. K., Heerkens, J., Staub, D. R., Gasser, P. J., & Shekhar, A. (2008). Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Annals of the New York Academy of*

Sciences, 1148(1), 86-94.

May, P. J. (2006). The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. *Progress in brain research*, 151, 321-378.

Martinez, A. Ribeiro de Oliveira, M.L. Brandão. (2007) Serotonergic mechanisms in the basolateral amygdala differentially regulate the conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray, *Eur. Neuropsychopharmacol.*717–724.

Mcnally, G.P; Pigg, M.; Weidemann, G. (2004). Opioid receptors in the midbrain periaqueductal gray regulate extinction of pavlovian fear conditioning. *J. Neurosci.*, 31:6912-9.

Meininger, V., Pol, D., & Derer, P. (1986). The inferior colliculus of the mouse. A Nissl and Golgi study. *Neuroscience*, 17(4), 1159-1179.

Melzack, R. & Wall, P.D.; Ty.T.C. (1982). Acute pain in an emergency clinic: latency of onset and descriptor patterns related to different injuries. *Pain*. 1982(1):33-43.

Menesal-de-Oliveira, L. & Hoffmann, A. (1993). The parabrachial region as a possible region modulating simultaneously pain and tonic immobility. *Behav Brain Res*. 56(2):127-32.

Merskey, N.B. (1994) Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms prepared by the International Association for the Study of Pain. 2nd ed. Seattle: IASP Press.

Miczek, K. A., DeBold, J. F., & Thompson, M. L. (1984). Pharmacological, hormonal, and behavioral manipulations in analysis of aggressive behavior. *Progress in clinical and biological research*, 167, 1-26.

Millan, M.J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*. 57(1):1-164. Review

Millan, M.J. (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol*. 66(6):355-474.

Millan, M.J. (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology* 70:82-244.

Misslin, R. (2003). The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. *Neurophysiol. Clin*. 33:55-66.

Mize, R. R. (1996). Neurochemical microcircuitry underlying visual and oculomotor function in the cat superior colliculus. *Progress in Brain Research*, 112, 35–55.

Nichols, D. S., Thorn, B. E., & Berntson, G. G. (1989). Opiate and serotonergic mechanisms of stimulation-produced analgesia within the periaqueductal gray. *Brain research bulletin*, 22(4), 717-724.

Niermann HCM, Ly V, Smeekens S, Figner B, Riksen-Walraven JM, Roelofs K. (2015) Infant attachment predicts bodily freezing in adolescence: evidence from a prospective

longitudinal study. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 263. (doi:10.3389/fnbeh.2015.00263).

Nogueira, R. L., & Graeff, F. G. (1995). Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52(1), 1-6.

Oertel D, Doupe AJ. (2000). The Auditory Central Nervous System. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds. *Principles of Neural Science*, 5th ed. New York: McGraw-Hill.

Ogawa, A. Sugidachi, N. Tanaka, K. Fujimoto, F. Asai. (2002) Pharmacological profiles of R-96544, the active form of a novel 5-HT_{2A} receptor antagonist R-102444, *Eur. J. Pharmacol.* 457:107–114.

Osaki, L. Castellan-Baldan, F. Calvo, A.D. Carvalho, T.T. Felippotti, R. De Oliveira, W.A. Ubiali, T. Paschoalin-Maurin, D.H. Elias-Filho, V. Motta, L.A. Da Silva, N.C. Coimbra. (2003) Neuroanatomical and neuropharmacological study of opioid pathways in the mesencephalic tectum: Effect of μ 1- and κ -opioid receptor blockade on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus, *Brain Res.* 992 179–192.

Owens, M. J., & Nemeroff, C. B. (1994). Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clinical chemistry*, 40(2), 288-295.

Panksepp, J. (1990). The psychoneurology of fear: Evolutionary perspectives and the role of animal models in understanding human anxiety. *Handbook of anxiety*, 3, 3-58.

Parent, L. Descarries, A. Beaudet. (1981) Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [³H]5-hydroxytryptamine, *Neuroscience*.

Paschoalin-Maurin, T., dos Anjos-Garcia, T., Falconi-Sobrinho, L. L., de Freitas, R. L., Coimbra, J. P. C., Laure, C. J., & 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.

Paxinos, G.; Watson, C. (2007). *The rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Sidney.

Pazos, J.M. Palacios. (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors, *Brain Res.* 346 205–230.

Plappert CF, Pilz PK, Schnitzler HU. (1993) Acoustic startle response and habituation in freezing and nonfreezing rats. *Behav. Neurosci.* 107, 981–987. (doi:10.1037/0735-7044.107.6.981).

Pobbe, H. Zangrossi. (2005) 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus, *Psychopharmacology (Berl)*. 183 314–321.

- Pompeiano, J.M. Palacios, G. Mengod. (1994) Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors, *Mol. Brain Res.* 23 163–178.
- Qing-Ping, W., Ochiai, H., & Nakai, Y. (1992). GABAergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat studied by electron microscopy double immunostaining. *Brain research bulletin*, 29(6), 943-948.
- Quesseveur, H.T. Nguyen, A.M. Gardier, B.P. Guiard. (2012) 5-HT₂ ligands in the treatment of anxiety and depression, *Expert Opin. Investig. Drugs.* 21 1701–1725.
- Rahman, K. Bannister, L.A. Bee, A.H. Dickenson. (2011) A pronociceptive role for the 5-HT₂ receptor on spinal nociceptive transmission: An in vivo electrophysiological study in the rat, *Brain Res.* 29–36.
- Rhodes, J.C. Liebeskind. (1978) Analgesia from rostral brain stem stimulation in the rat, *Brain Res.* 521–532.
- Ribeiro, J.G. Ciscato, R. De Oliveira, R.C. De Oliveira, R. D'Ângelo-Dias, A.D. Carvalho, T.T. Felippotti, E.C.C. Rebouças, L. Castellan-Baldan, A. Hoffmann, S.A.L. Corrêa, J.E. Moreira, N.C. Coimbra. (2005) Functional and ultrastructural neuroanatomy of interactive intratectal/tectonigral mesencephalic opioid inhibitory links and nigrotectal GABAergic pathways: Involvement of GABA_A and μ 1-opioid receptors in the modulation of panic-like reactions elicited by, *J. Chem. Neuroanat.* 30 184–200.
- Roelofs K, Hageraars MA, Stins J. (2010) Facing freeze: social threat induces bodily freeze in humans. *Psych. Sci.* 21, 1575–1581. (doi:10.1177/0956797610384746)
- Roy-Byrne, Peter P., Michelle G. Craske, and Murray B. (2006) Stein. "Panic disorder." *The Lancet* 368.9540: 1023-1032
- Saito, M.L. Brandão. (2015) The benzodiazepine midazolam acts on the expression of the defensive behavior, but not on the processing of aversive information, produced by exposure to the elevated plus maze and electrical stimulations applied to the inferior colliculus of rats, *Neuropharmacology.* 88 180–186.
- Schenberg, A.S. Bittencourt, E.C.M. Sudré, L.C. Vargas. (2001) Modeling panic attacks, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 647–659.
- Schenberg, L. C. (2010). Towards a translational model of panic attack. *Psychology & Neuroscience*, 3(1), 9.
- Schmitel, F.G.; de Almeida, G.M.; Pitol, D.N.; Armini, R.S.; Tufik, S.; Schenberg, L.C. (2012). Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience.* 200:59-73.
- Schütz, M. T. B., De Aguiar, J. C., & Graeff, F. G. (1985). Anti-aversive role of serotonin

in the dorsal periaqueductal grey matter. *Psychopharmacology*, 85(3), 340-345.

Shekhar. (1994) Effects of treatment with imipramine and clonazepam on an animal model of panic disorder, *Biol. Psychiatry*. 36 745–758.

Siegel, A & Pott, C.B. (1988). Neural substrates of aggression and flight in the cat. *Prog.Neurobiol.* 31:261-283.

Simler, S., Hirsch, E., Danober, L., Motte, J., Vergnes, M., & Marescaux, C. (1994). C-fos expression after single and kindled audiogenic seizures in Wistar rats. *Neuroscience letters*, 175(1-2), 58-62.

Soares, V. de P., Campos, A. C., Bortoli, V. C. de, Zangrossi, H., Guimarães, F. S., & Zuardi, A. W. (2010). Intra-dorsal periaqueductal gray administration of cannabidiol blocks panic-like response by activating 5-HT_{1A} receptors. *Behavioural Brain Research*, 213(2), 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.004>

Spiacci, N.C. Coimbra, H. Zangrossi. (2012) Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors, *Neuroscience*. 227 350–360.

Stein, D. J., Bouwer, C., & Maud, C. M. (1997). Use of the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram in treatment of trichotillomania. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 247(4), 234-236.

Steinbusch, H. W. M. (1981). Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat—cell bodies and terminals. *Neuroscience*, 6(4), 557-618.

Stratford TR, Wirtshafter D. (1990) Ascending dopaminergic projections from the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Res* 511: 173–176.

Tejada, Julian, Chaim, Khallil Taverna, & Morato, Silvio. (2017). X-PlorRat: A Software for Scoring Animal Behavior in Enclosed Spaces. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 33, e3322. Epub January 08, 2018.

Todorovic SM, Scroggs RS, Anderson EG. (1997) Cationic modulation of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors in rat sensory neurons: the role of K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺. *Brain Res*;765(2):291-300.

Ullah, T. dos Anjos-Garcia, I.R. dos Santos, A.F. Biagioni, N.C. Coimbra. (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., Elias-Filho, D. H., Falconi-Sobrinho, L. L., de Freitas, R. L., 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. *Behavioural brain research*, 319, 135-147.

Underwood, M. D., Arango, V., Bakalian, M. J., Ruggiero, D. A., & Mann, J. J. (1999). Dorsal raphe nucleus serotonergic neurons innervate the rostral ventrolateral medulla in rat. *Brain research*, 824(1), 45-55.

Uribe-Mariño, A.; Francisco, A.; Castiblanco-Urbina, M.A.; Twardowschy A, Salgado-Rohner C.J.; Crippa J.A.; Hallak J.E.; Zuardi A.W.; 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 cenchricus* confrontation paradigm. *Neuropsychopharmacology* 37(2):412-21.

Vertes, R. P. (1991). A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 313(4), 643–668. <https://doi.org/10.1002/cne.903130409>

Villar, M. J., Vitale, M. L., Hökfelt, T., & Verhofstad, A. A. J. (1988). Dorsal raphe serotonergic branching neurons projecting both to the lateral geniculate body and superior colliculus: A combined retrograde tracing–immunohistochemical study in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 277(1), 126–140. <https://doi.org/10.1002/cne.902770109>

Waterhouse, B. D., Mihailoff, G. A., Baack, J. C., & Woodward, D. J. (1986). Topographical distribution of dorsal and median raphe neurons projecting to motor, sensorimotor, and visual cortical areas in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 249(4), 460–476. <https://doi.org/10.1002/cne.902490403>

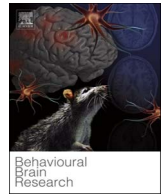
Wheeler EO, White P.D. (1950) Neurocirculatory asthenia, anxiety neurosis, effort syndrome, neurasthenia; a 20 year follow-up study of 173 patients. *J Am Med Assoc.* 1950;142(12):878-89.

Willis, W.D. & Westlund, K.N. (1997). Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol.* 14(1):2-31.

Wooley, C.F. (1982). Jacob Mendez Da Costa: medical teacher, clinician, and clinical investigator. *Am J Cardiol.* 50 (5):1145-8.

YAARI, Y.; DEVOR, M. (1985) Phenytoin suppresses spontaneous ectopic discharge in rat sciatic nerve neuromas. *Neuroscience Letters*, v.58, n.1, p.117-122.

Yamashita, P. S. M., Spiacci, A., Hassel, J. E., Lowry, C. A., & Zangrossi, H. (2017). Disinhibition of the rat prelimbic cortex promotes serotonergic activation of the dorsal raphe nucleus and panicolytic-like behavioral effects. *Journal of Psychopharmacology*, 31(6), 704–714. <https://doi.org/10.1177/0269881116684334>.



Research report

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

Raimundo da Silva Soares Jr.^a, Luiz Luciano Falconi-Sobrinho^a, Tayllon dos Anjos-Garcia^a, Norberto Cysne Coimbra^{a,b,c,*}

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

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

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Defensive behaviour
Fear-induced antinociception
Dorsal raphe nucleus
Inferior colliculus
5-HT_{2A} receptors

ABSTRACT

It has been established that chemical stimulation of the inferior colliculus (IC) of laboratory animals evokes fear-related defensive responses, which are considered panic attack-like behaviours. In addition, there is evidence that defensive reactions provoked by chemical stimulation of midbrain tectum neurons may induce an antinociceptive response. Morphologically, the IC receives projections from other mesencephalic structures, such as the dorsal raphe nucleus (DRN), a region rich in serotonergic neurons that play a critical role in the control of defensive behaviours. Moreover, this monoaminergic brainstem reticular nucleus is suggested to comprise the endogenous pain modulatory system. The aim of the present study was to investigate the role of DRN 5-hydroxytryptamine 2A (5-HT_{2A}) receptors in Wistar rats by local microinjection of R-96544 (a selective antagonist of the 5-HT_{2A} receptor) at doses of 5, 10 or 15 nM on defensive reactions and fear-induced antinociception evoked by chemical stimulation of the central nucleus of the IC with NMDA (6, 9 or 12 nmol). Behavioural responses were analysed for 10 min, and then the nociceptive threshold was measured at 10 min intervals for 70 min. The dose of 12 nmol of NMDA was the most effective in causing panic attack-like defensive behaviours and much higher hypoalgesia. In addition, both effects were attenuated by pretreatment of the DRN with R-96544. These findings suggest the critical participation of DRN 5-HT_{2A} receptors in the modulation of panic attack-like defensive behaviour and unconditioned fear-induced antinociception organised by neurons in the central nucleus of the IC.

1. Introduction

Ethoexperimental approaches to the defensive reactions displayed by laboratory animals allow us to better understand the behavioural alterations that occur in individuals experiencing a panic attack-like response [1–5]. It has been established that some midbrain tectum structures, such as the periaqueductal grey matter (PAG) [6,7], the deep layers of the superior colliculus (dISC) [6,8–10], and the inferior colliculus (IC) [1,11–14], when electrically or chemically stimulated, trigger defensive responses, which are considered panic attack-like behaviours [9,13]. Electrical stimulation of the IC of laboratory animals caused alertness, freezing end escape behaviours, followed by 5-

hydroxytryptamine (5-HT)-mediated antinociception [11].

The N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor is an ionotropic excitatory amino acid receptor that requires binding of glutamate or aspartate neurotransmitters for its activation, and its dysfunction is related to some psychiatric diseases [15]. Intra-mesencephalic administration of NMDA elicits defensive escape reactions in laboratory animals [1,7]. There is evidence that chemical stimulation of the central nucleus of the IC of Wistar rats with NMDA evokes defensive behavioural responses, expressed by running and jumping [1]. After the end of the defensive escape behaviour, the tail-flick test revealed an increase in the nociceptive threshold of the animals, a phenomenon known as instinctive fear-induced antinociception that is consistently

* Corresponding author at: Laboratório de Neuroanatomia & Neuropsicobiologia, Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto (SP), 14049-900, Brasil.

E-mail address: nccoimbr@fmrp.usp.br (N.C. Coimbra).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.016>

Received 24 February 2017; Received in revised form 14 June 2017; Accepted 15 July 2017

Available online 21 July 2017

0166-4328/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

reported in the literature [11,16–18].

The dorsal raphe nucleus (DRN) is another mesencephalic structure involved in the unfolding of the antinociceptive process [19–21]; it sends serotonergic projections to the IC [22] and is known to be involved in the modulation of defensive behaviours [23]. Serotonin is widely found in the central nervous system [24,25], and the DRN is considered the midbrain structure with the higher concentration of this neurotransmitter. The 5-hydroxytryptamine-2 (5-HT₂) subfamily of serotonin receptors has been extensively mapped [26]. A quantitative radioautographic study has shown a significant density of 5-HT₂ receptors in some midbrain structures, such as the DRN [27]. This evidence was confirmed using *in situ* hybridisation for 5-HT₂ receptor mRNA [28]. 5-HT₂ receptors are also densely localised on neurons of the brainstem reticular formation [29], in which there are structures related to the endogenous pain modulatory system, such as the nucleus raphe magnus, the DRN, and the gigantocellular/paragigantocellular reticular nuclei [18,35]. More specifically, there is evidence showing a significant concentration of 5-HT_{2A} receptors distributed in the DRN [30,31]. Interestingly, it seems that, unlike the 5-HT_{1A} autoreceptor, the 5-HT_{2A} receptor is found on GABAergic interneurons instead of serotonin-labelled perikarya of the DRN [32]. However, ascending serotonergic projections from the DRN reach rostral limbic structures, such as the septal area [33,34] lateral hypothalamic nucleus [36] and dorsomedial hypothalamus [23]. Medial hypothalamus neurons are connected to dorsal midbrain structures [37] that send connections back to raphe nucleus neurons [6], a neural network that can be recruited during the enactment of defensive responses organised by midbrain tectum neurons.

Interestingly, fear-related defensive behaviours organised by IC neurons, as described above, was attenuated by local microinjections of methysergide, a non-specific 5-HT receptor antagonist, and ketanserin, which acts with higher specificity at 5-HT_{2A/2C} receptors [11]. This neural network plays a critical role in the modulation of fear-induced antinociception [18,23,35]. In addition to the involvement of DRN neurons in the modulation of pain, DRN serotonergic ascending pathways to midbrain tectum have been proposed to regulate panic-related behaviours [38,39]. For example, increases in 5-HT release in the dorsal periaqueductal grey matter (dPAG), accomplished via blockade of 5-HT_{1A} receptors by microinjection of WAY-100635 into the DRN, can inhibit escape behaviours of rodents submitted to the elevated T-maze test. In this same study, pretreatment of the dPAG with ketanserin was able to impair the panicolytic effects caused by microinjection of WAY-100635 into the DRN [40]. In fact, it seems that 5-HT_{1A/2A} receptors localised in mesencephalic structures mediate panic attack-like behavioural responses. Interestingly, Biagioni et al. (2013) [23] showed that escape behaviours organised by neurons of the medial hypothalamus (MH), a diencephalic region also involved in the mediation of panic attack-like defensive reactions [41], can be attenuated by reduction of the activity of 5-HT excitatory ascending pathways from the DRN via microinjections of the selective serotonergic neurotoxin 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) into the DRN.

Based on the evidence presented above, the hypothesis of the present work is that the 5-HT_{2A} receptor of DRN neurons is involved in the organisation of also in the unconditioned fear-induced antinociception enacted in the caudal aspect of the dorsal midbrain. Accordingly, pretreatment of the DRN with the selective 5-HT_{2A} receptor antagonist R-96544 [42] should impair both freezing and escape behavioural responses elicited by chemical stimulation of the IC. The aim of the present work was to study the role played by DRN serotonergic neurons in defensive behaviours and unconditional fear-induced antinociception organised by the central nucleus of the IC. The role played by 5-HT_{2A} receptors of the DRN neurons in defence and pain was also investigated.

2. Materials and methods

2.1. Ethical approval

All experiments were performed in compliance with the recommendations of the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (CEUA-FMRP-USP; process 017/2016), which agrees with the ethical principles in animal research adopted by the National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) and were approved by the CEUA-FMRP-USP on 02/02/2016.

2.2. Animals

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*, Rodentia, Muridae), weighing 250–300 g (n = 6 per group) from the animal facility of the FMRP-USP were used. These animals were housed in groups of four in plexiglass cages (41 × 34 cm) and given free access to food and water throughout the experiment. They were habituated to the experimental room for 48 h prior to the experiment on a 12 h light/12 h dark cycle (lights on at 7 am) at 24 ± 1 °C.

2.3. Drugs

An N-methyl-D-aspartic acid receptor agonist (NMDA; Sigma/Aldrich, St. Louis, USA) was microinjected into the IC at different doses (6, 9 and 12 nmol); saline (0.9% NaCl) served as a control. The selective 5-HT_{2A} receptor antagonist (2R,4R)-5-[2-[2-(3-methoxyphenyl)ethyl]phenoxy]ethyl]-1-methyl-3-pyrrolidinol hydrochloride (R-96544; Tocris Bioscience, Avonmouth, Bristol, UK) was microinjected into the DRN at doses of 5, 10 and 15 nM; the vehicle (10% dimethyl sulfoxide and 0.9% NaCl) was used as a control.

2.4. Stereotaxic surgery

Animals were anaesthetised with ketamine at 92 mg/kg (Ketamine Agener, União Química Farmacêutica Nacional, São Paulo, Brazil) and xylazine at 9.2 mg/kg (Calmium, União Química Farmacêutica Nacional, São Paulo, Brazil) and placed in a stereotaxic frame (David Kopf, Tujunga, CA, USA). Stainless steel guide cannulae (outer diameter 0.6 mm, inner diameter 0.4 mm) were implanted in the DRN and the central nucleus of the IC, targeting a point 1 mm above each of these mesencephalic nuclei. The following coordinates were used for the DRN and IC: anteroposterior: –8.04 mm and –8.88 mm; mediolateral: –0.2 mm and –1.5 mm; and dorsoventral: –5.2 mm and –3.6 mm. The coordinates were based on Paxinos and Watson's Rat Brain in Stereotaxic Coordinates [43], with the bregma serving as a reference for each plane. Each guide cannula was fixed to the skull using acrylic resin and 1 stainless steel screw to protect it from obstruction. At the end of the surgery, each animal received an intramuscular injection of penicillin G benzathine (120000 IU; 0.1 mL) and a subcutaneous injection of the non-steroidal analgesic and anti-inflammatory flunixin meglumine (2.5 mg/kg) (Schering-Plough, São Paulo, SP, Brazil).

2.5. Experimental procedure

2.5.1. Behavioural tests

Defensive behavioural responses were recorded for 10 min using a video camera (Handycam, Sony Corporation, Osaki, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan). The behavioural tests were performed in a circular arena with transparent acrylic walls. The floor of the circular arena was divided into twelve equal sections used to count crossings.

Freezing (defensive immobility) reactions were defined by immobility for at least 6 s followed by a visible autonomic reaction, such as defecation, exophthalmia and/or micturition. Both the frequency (number of behavioural events) and the duration of this behaviour were

analysed over a span of 10 min [23,44]. Escape behaviour was recorded as the frequency (number of responses) and duration of running and as the frequency (number) of horizontal jumps. Additionally, the number of crossings, characterised as 4 paws within a given division of the floor of the circular arena, was used as a quantitative measure of escape behaviour [45,46].

2.5.2. Microinjection of an *N*-methyl-D-aspartic acid receptor agonist in the IC

Five days after surgery, each animal was subjected to the tail-flick test to determine the baseline nociceptive threshold. Thereafter, independent groups of Wistar rats were randomly assigned to receive microinjections of 6, 9 and 12 nmol/0.2 μ L NMDA or vehicle (0.9% NaCl/0.2 μ L) in the IC. Microinjections were performed using a dental needle (0.3 mm OD) 1 mm longer than the guide cannulae, aiming at the central nucleus of the IC. A polyethylene tube (PE-10) linked to a 5 μ L syringe (Hamilton, Reno, Nevada, USA) connected to an infusion pump (Stoelting, Kiel, Wisconsin, USA) was used to inject the drug (a volume of 0.2 μ L over 15 s). To prevent reflux, the dental needle was left in place for 30 s after the end of each injection. After the intra-IC microinjection of NMDA, the behavioural reactions exhibited by the rodents in a circular arena (50 cm width \times 60 cm high) with transparent acrylic walls situated in an experimental room illuminated with a 40 W fluorescent lamp (350 Lux at the arena floor level) were quantitatively analysed for 10 min. The rats were allowed a 10 min period of habituation in the arena at the beginning of each experimental session. Following the behavioural tests, the nociceptive thresholds were measured at 10 min intervals for 70 min. Both the wall and the floor of the circular enclosure were cleaned with 5% alcoholic solution after each session.

2.5.3. Microinjection of the selective 5-HT_{2A} receptor antagonist R-96544 into the DRN

After a postoperative period of five days, the baseline nociceptive threshold of each animal was determined using the tail-flick test. Thereafter, independent groups of Wistar rats were randomly assigned to receive a pretreatment microinjection of 5, 10 or 15 nM R-96544 or vehicle (0.9% NaCl/0.2 μ L) into the DRN. Ten minutes later, NMDA at 12 nmol/0.2 μ L was microinjected into the IC. The microinjection procedure was similar to the one used in the previous experiment. After the administration of NMDA into the IC, the defensive responses displayed by the rats in the circular arena were quantitatively analysed for 10 min, and immediately after the behavioural tests, the tail-flick withdrawal latencies were measured at 10 min intervals for 70 min.

2.5.4. Nociceptive testing

The rats had their nociception thresholds compared using the tail-flick test. Each animal was placed in a restraining apparatus (Insight, Ribeirão Preto, Brazil) with acrylic walls, and its tail was placed on a heating coil (tail-flick Analgesia Instrument; Insight, 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 an electrical current was applied to increase the temperature of the coil at a rate of 9 °C/s [46]. If necessary, small adjustments were made to the intensity of the electrical current at the beginning of the experiment to obtain three consecutive tail-flick latencies (TFL) 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 TFL were taken at 5 min intervals. TFL were also measured every 10 min for 70 min (t0, t10, t20, t30, t40, t50, t60, and t70) immediately after the end of the defensive behaviour assay.

2.5.5. Histology

Upon completion of the experiments, each animal was anaesthetised

with ketamine at 92 mg/kg (Ketamina[®]) and xylazine at 9.2 mg/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 pericardium was removed to allow perfusion through left ventricle, and the blood was washed out with Tyrode's solution (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 encephalon was quickly removed and maintained in 4% paraformaldehyde for at least 4 h and was then immersed in a 10% sucrose solution for 48 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). 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 Paxinos and Watson's Rat Brain in Stereotaxic Coordinates atlas [43]. Data from rats with guide cannulae tips located outside their target regions (IC and/or DRN) were not included in the statistical analysis.

2.5.6. Statistical analysis

The software used in the present work for statistical analyses was GraphPad Prism version 7.0. The data are expressed as the mean \pm S.E.M. One-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by a Newman-Keuls *post hoc* test was used to analyse the data from the behavioural studies. Two-way repeated-measures analysis of variance (two-way RM-ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test was used to analyse the tail-flick latencies. In all cases, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of increasing doses of intra-IC NMDA on defensive behaviour and unconditioned (instinctive) fear-induced antinociception

Histologically confirmed sites of NMDA microinjection into the inferior colliculus are shown in schematic drawings of coronal sections in Fig. 1.

3.1.1. Defensive behaviour

According to one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls *post hoc* test, there was a significant effect of treatment on the frequency [$F_{(3,20)} = 10.95$, $p < 0.001$] and duration [$F_{(3,20)} = 11.97$, $p < 0.001$] of freezing. Treatment with NMDA at 6, 9 and 12 nmol evoked a dose-dependent response in the frequency ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively) of freezing. In addition, there was a significant difference between the results of intracollicular treatment with 12 nmol and 6 nmol NMDA (Newman-Keuls *post hoc* test; $p < 0.05$). Only the intracollicular treatment with NMDA at 12 nmol was able to increase the duration of freezing (Newman-Keuls *post hoc* test; $p < 0.001$) compared with the physiological saline-treated group, and the effect of the highest dose of NMDA was significantly different from those of the lower doses (Newman-Keuls *post hoc* test; $p < 0.01$ in all cases, Fig. 2A and B).

Regarding escape behaviour expressed by running and jumping, there was a significant effect of treatment on the frequency [$F_{(3,20)} = 16.44$, $p < 0.001$] and duration [$F_{(3,20)} = 12.64$, $p < 0.001$] of running and on the frequency [$F_{(3,20)} = 3.95$, $p < 0.05$] of jumping according to one-way ANOVA. Treatment of the central nucleus of the IC with NMDA at 12 nmol increased the frequency (Newman-Keuls *post hoc* test; $p < 0.001$) and duration ($p < 0.001$) of running compared with the control group, and the escape behaviour elicited by NMDA at that highest dose was also

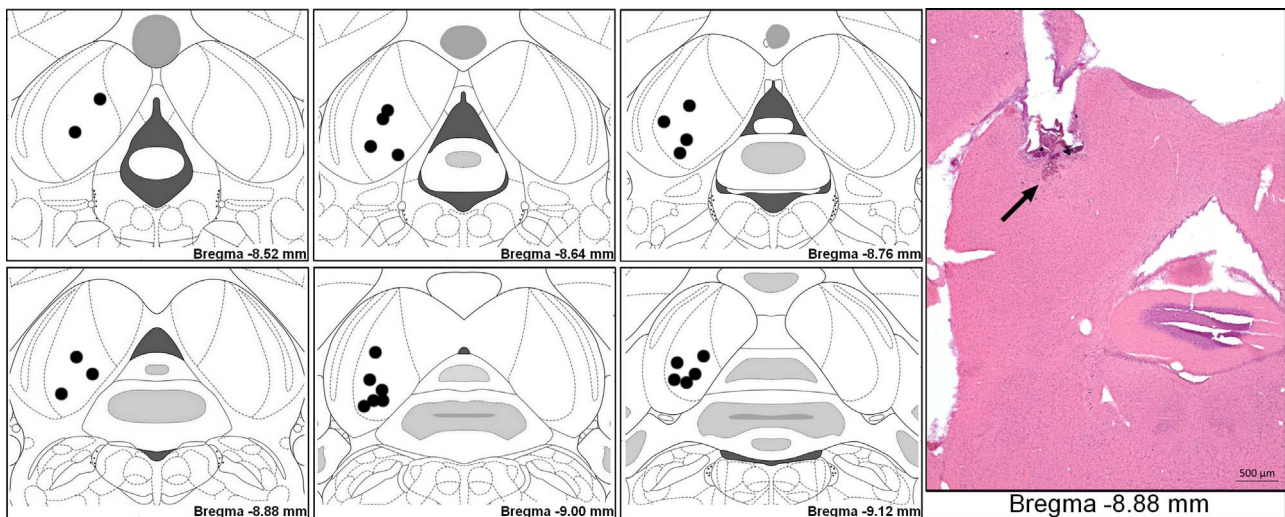


Fig. 1. Schematic transverse sections of the rat midbrain showing histologically confirmed microinjection sites of NMDA or vehicle into the inferior colliculus (IC), which are depicted on illustrations from Paxinos and Watson's stereotaxic atlas [43]. The image presented on the right is a photomicrograph of a mesencephalic transverse section showing a representative site of drug microinjection into the IC. Scale bar: 500 μ m. Staining: haematoxylin and eosin.

significantly different from that displayed by groups treated with NMDA at lower doses (6 and 9 nmol), in terms of both the frequency ($p < 0.001$) and the duration ($p < 0.001$, Fig. 2C and D) of running. With regard to the escape behaviour expressed by jumping, only the intracollicular treatment with NMDA at 12 nmol evoked this aversive stimulus-induced panic-like behaviour (Newman-Keuls *post hoc* test; $p < 0.05$) and that effect was significantly different from the effect caused by NMDA at a dose of 6 nmol ($p < 0.05$, Fig. 2E). In addition, there was a significant effect of treatment on the frequency [$F_{(3,20)} = 3.90$, $p < 0.05$] of crossing, a quantitative measure of escape behaviour. In this case, only the intracollicular treatment with NMDA at 12 nmol significantly increased ($p < 0.05$) the frequency of crossing, and NMDA at the highest dose was also significantly different from NMDA at the lowest dose of 6 nmol ($p < 0.05$, Fig. 2F), according to one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls *post hoc* test.

3.1.2. Unconditioned fear-induced antinociception

The activation of the central nucleus of the IC with NMDA at any dose used in the present work caused unconditioned fear-induced antinociception in rodents. According to two-way RM-ANOVA, there were statistically significant effects of treatment [$F_{(3,20)} = 8.66$, $p < 0.001$], time [$F_{(8,160)} = 82.36$, $p < 0.001$], and the interaction of treatment and time [$F_{(24,160)} = 9.44$, $p < 0.001$]. The panic-like escape behaviour was followed by significant increases in tail-flick latencies from 0 to 30 min after the intracollicular treatment with NMDA at all doses used when compared with the control group (Bonferroni's multiple comparison test; $p < 0.05$ in all cases). At 40 min, only the tail-flick latencies of rats treated with intracollicular microinjections of NMDA at 9 nmol were significantly different compared to the latencies shown by the control group (Bonferroni's multiple comparison test; $p < 0.05$). The unconditioned fear-induced antinociception displayed by animals treated with intracollicular microinjections of NMDA at the highest dose of 12 nmol was significantly different from that of groups treated with NMDA at 6 nmol from 0 to 20 min (Bonferroni's multiple comparison test; $p < 0.05$), as shown in Fig. 3.

3.2. Effect of DRN pretreatment with R-96544 on defensive behaviour and unconditioned fear-induced antinociception evoked by intracollicular microinjections of NMDA at the highest dose

Histologically confirmed sites of R-96544 microinjection into the DRN and NMDA microinjection into the inferior colliculus are shown in schematic drawings of midbrain coronal sections in Fig. 4.

3.2.1. Defensive behaviour

Similar to the first set of experiments, according to one-way ANOVA, IC treatment with NMDA at 12 nmol (vehicle-NMDA-treated group) significantly increased the frequency [$F_{(5,30)} = 8.49$, $p < 0.001$] and duration [$F_{(5,30)} = 8.93$, $p < 0.001$] of freezing compared with the vehicle-vehicle-treated control group. Pretreatment of the DRN with R-96544 at different doses (5, 10 and 15 nM) decreased the frequency (Newman-Keuls *post hoc* test; $p < 0.001$ in all cases) and duration (Newman-Keuls *post hoc* test; $p < 0.001$ in all cases) of freezing. DRN pretreatment with R-96544 *per se* (R-96544-15nM-vehicle-treated group) had no effect (Newman-Keuls *post hoc* test; $p > 0.05$) on the frequency or duration of freezing compared with the vehicle-vehicle-treated group, as shown in Fig. 5A and B.

Regarding escape behaviour expressed by running and jumping, according to one-way ANOVA, there was a significant effect of treatment on the frequency [$F_{(3,30)} = 9.33$, $p < 0.001$] and duration [$F_{(3,30)} = 15.05$, $p < 0.001$] of running and on the frequency [$F_{(3,30)} = 6.75$, $p < 0.05$] of jumping. The vehicle-NMDA-treated group displayed increased frequency and duration of running (Newman-Keuls *post hoc* test; $p < 0.001$ in both cases) and frequency of jumping (Newman-Keuls *post hoc* test; $p < 0.001$) compared with the vehicle-vehicle-treated control group. Pretreatment of the DRN with R-96544 at different doses (5, 10 and 15 nM) significantly decreased the frequency (Newman-Keuls *post hoc* test; $p < 0.001$ in all cases) and duration (Newman-Keuls *post hoc* test; $p < 0.001$ in all cases) of running (Fig. 5C and D). DRN pretreatment with R-96544 at all doses (5, 10 and 15 nM) significantly decreased (Newman-Keuls *post hoc* test; $p < 0.05$) escape behaviour expressed by jumping (Fig. 5E). In regard to crossing, there was also a significant effect of treatment [$F_{(5,30)} = 6.30$, $p < 0.001$]. The vehicle-NMDA-treated group had an increased frequency of crossing (Newman-Keuls *post hoc* test; $p < 0.01$), and pretreatment of the DRN with R-96544 at different doses (5, 10 and 15 nM) decreased that escape-related motor response (Newman-Keuls *post hoc* test; $p < 0.01$ in all cases), as shown in Fig. 5F. With regard to all behaviours describe above, R-96544 at 15 nM *per se* caused no intrinsic effect (Newman-Keuls *post hoc* test; $p > 0.05$) compared with vehicle-vehicle treatment (Fig. 5).

3.2.2. Unconditioned fear-induced antinociception

Similar to the first experiment, the defensive behaviour elicited by treatment of the central nucleus of the IC with NMDA was followed by unconditioned fear-induced antinociception, and pretreatment of the DRN with R-96544 significantly decreased this instinctive fear-induced

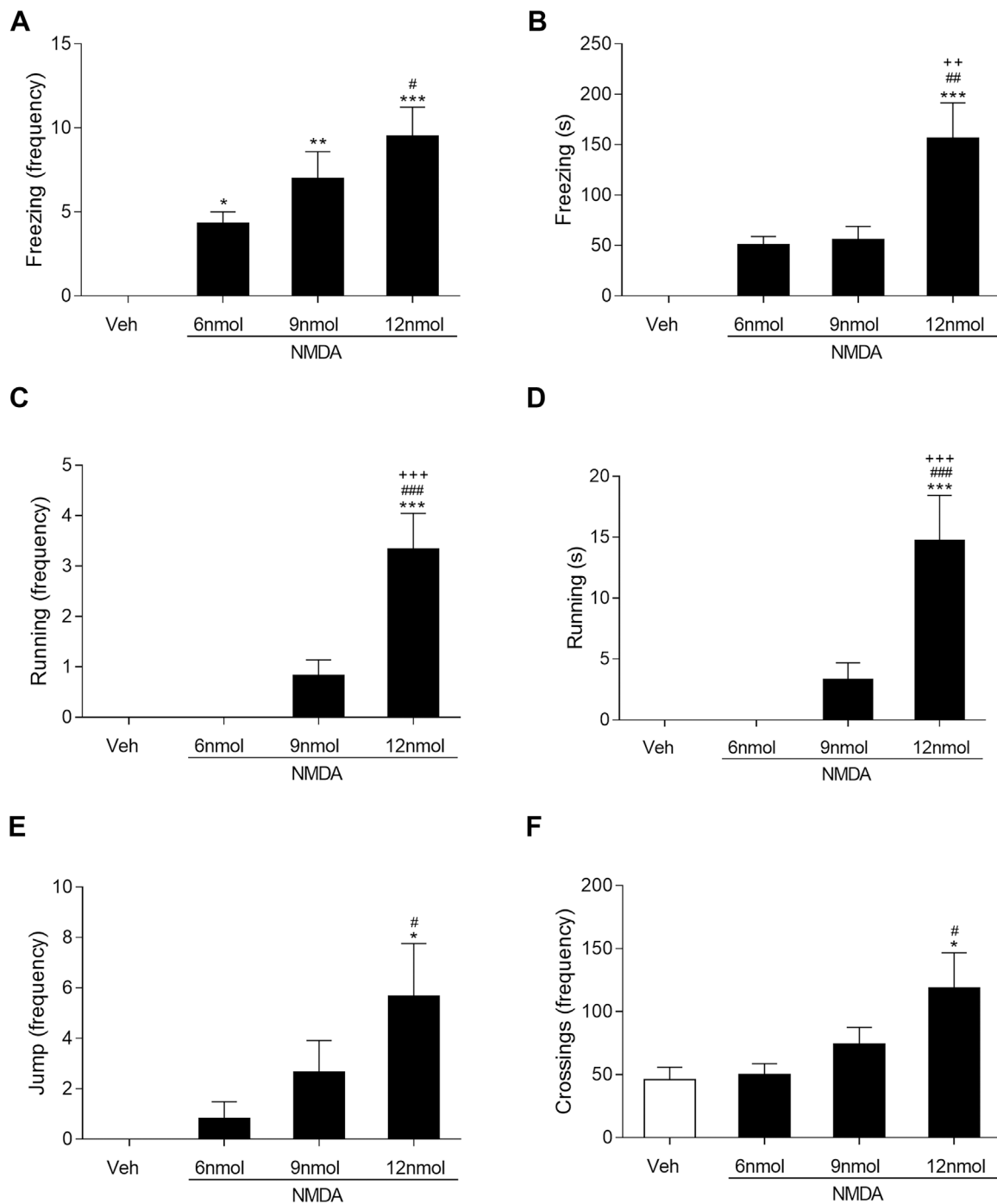


Fig. 2. Effect of central microinjections of NMDA (6, 9 and 12 nmol) or vehicle (NaCl 0.9%; 0.2 μ L) into the inferior colliculus (IC) on the frequency (A, C, E and F) and duration (B and D) of freezing (A and B), running (C and D), jumps (E) and crossings (F); $n = 6$ per group. The columns represent the mean, and the bars the standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 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 NMDA at 6 nmol-treated group. +++ $p < 0.01$ and ++++ $p < 0.001$ compared with the NMDA at 9 nmol-treated group (according to one-way ANOVA followed by Newman-Keuls *post hoc* test).

hypoalgesic response. According to two-way RM-ANOVA, there were statistically significant effects of treatment [$F_{(5,30)} = 37.78$, $p < 0.001$], time [$F_{(8,240)} = 91.71$, $p < 0.001$] and the interaction of treatment and time [$F_{(40,240)} = 24.74$, $p < 0.001$]. The activation of neurons in the central nucleus of the IC (vehicle-NMDA-treated group) increased the tail-flick latencies during the first 30 min of the test period (Bonferroni's multiple comparison test; $p < 0.05$), compared with the vehicle-vehicle-treated control group. R-96544 at 10 nM/NMDA and R-96544 at 15 nM/NMDA treatment decreased the unconditioned fear-induced antinociception for the first 30 min of the test, compared with the vehicle/NMDA-treated group (Bonferroni's *post hoc*

test; $p < 0.05$). The unconditioned fear-induced antinociception displayed by the R-96544 at 10 nM/NMDA- and R-96544 at 15 nM/NMDA-treated groups was also significantly different from that displayed by the R-96544 at 5 nM/NMDA-treated group from 0 to 30 min after escape behaviour elicited by chemical stimulation of the IC. R-96544 *per se* (R-96544 at 15 nM/vehicle-treated group) had no intrinsic effect on tail-flick latencies (Bonferroni's *post hoc* test; $p > 0.05$) compared with the vehicle-vehicle control treatment, as shown in Fig. 6.

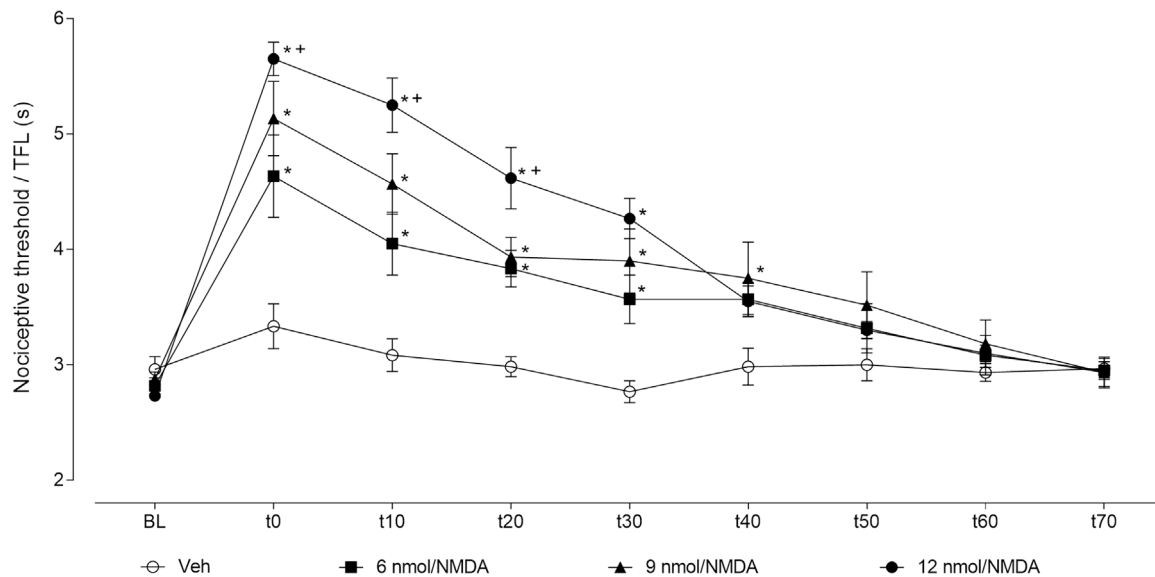


Fig. 3. Effect of the central microinjection of NMDA (6, 9 and 12 nmol) or vehicle (NaCl 0.9%; 0.2 μ L) into the inferior colliculus (IC) on unconditional fear-induced antinociception. Antinociception caused by defensive behaviour was recorded using the tail-flick test; $n = 6$ per group. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$ compared with the vehicle (veh)-treated control group. + $p < 0.05$ compared with the NMDA at 6 nmol-treated group (according to two-way RM-ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison tests).

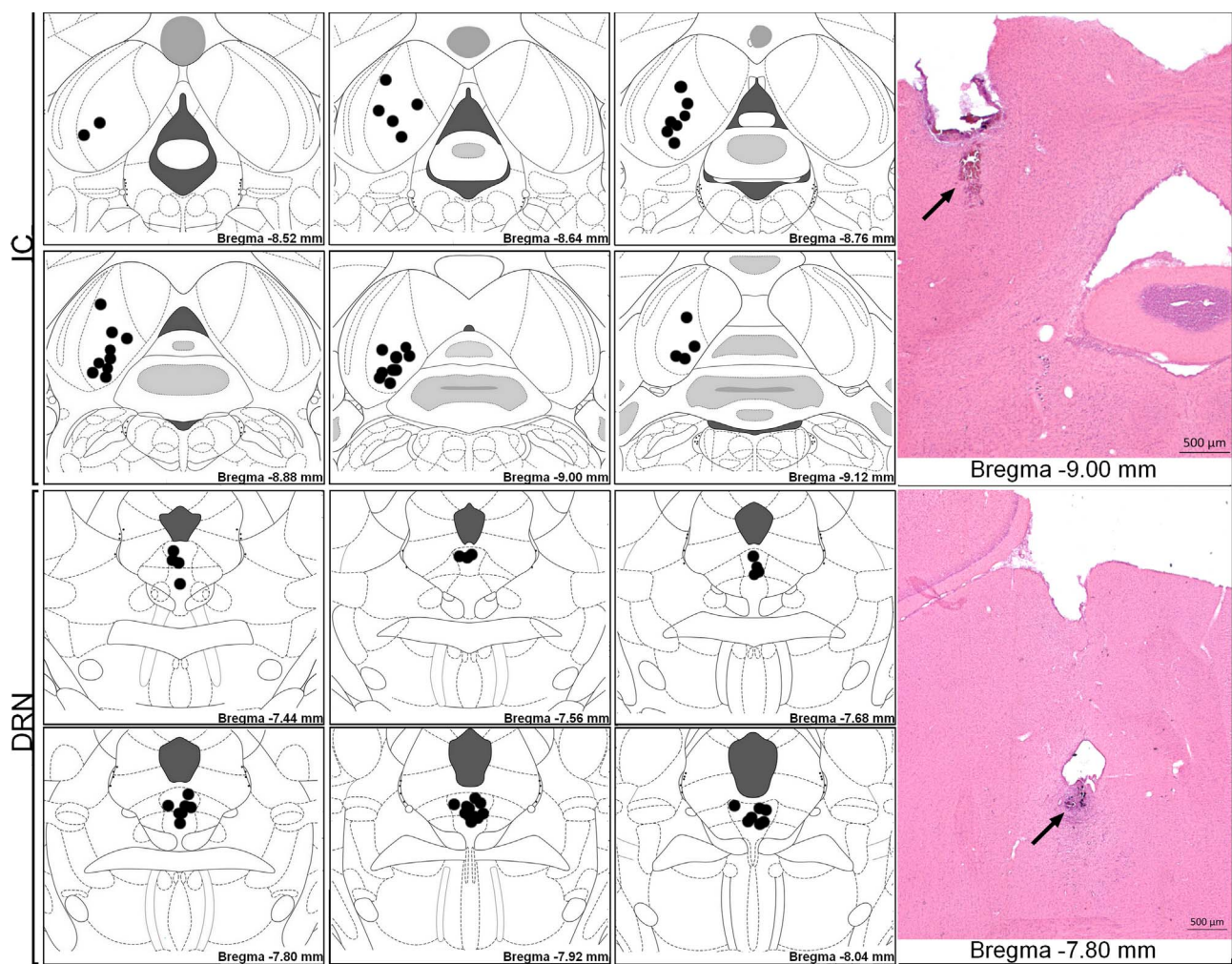


Fig. 4. Schematic transverse sections of the rat encephalon showing histologically confirmed microinjection sites for pretreatment of the dorsal raphe nucleus (DRN) with R-96544 (5, 10 and 15 nM) or vehicle followed by administration of NMDA at 12 nmol or vehicle into the inferior colliculus (IC), which are depicted on illustrations from Paxinos and Watson's stereotaxic atlas [43]. The image on the right is a photomicrograph of a mesencephalic transverse section showing a representative site of drug microinjection into the IC or DRN. Scale bar: 500 μ m. Staining: haematoxylin and eosin.

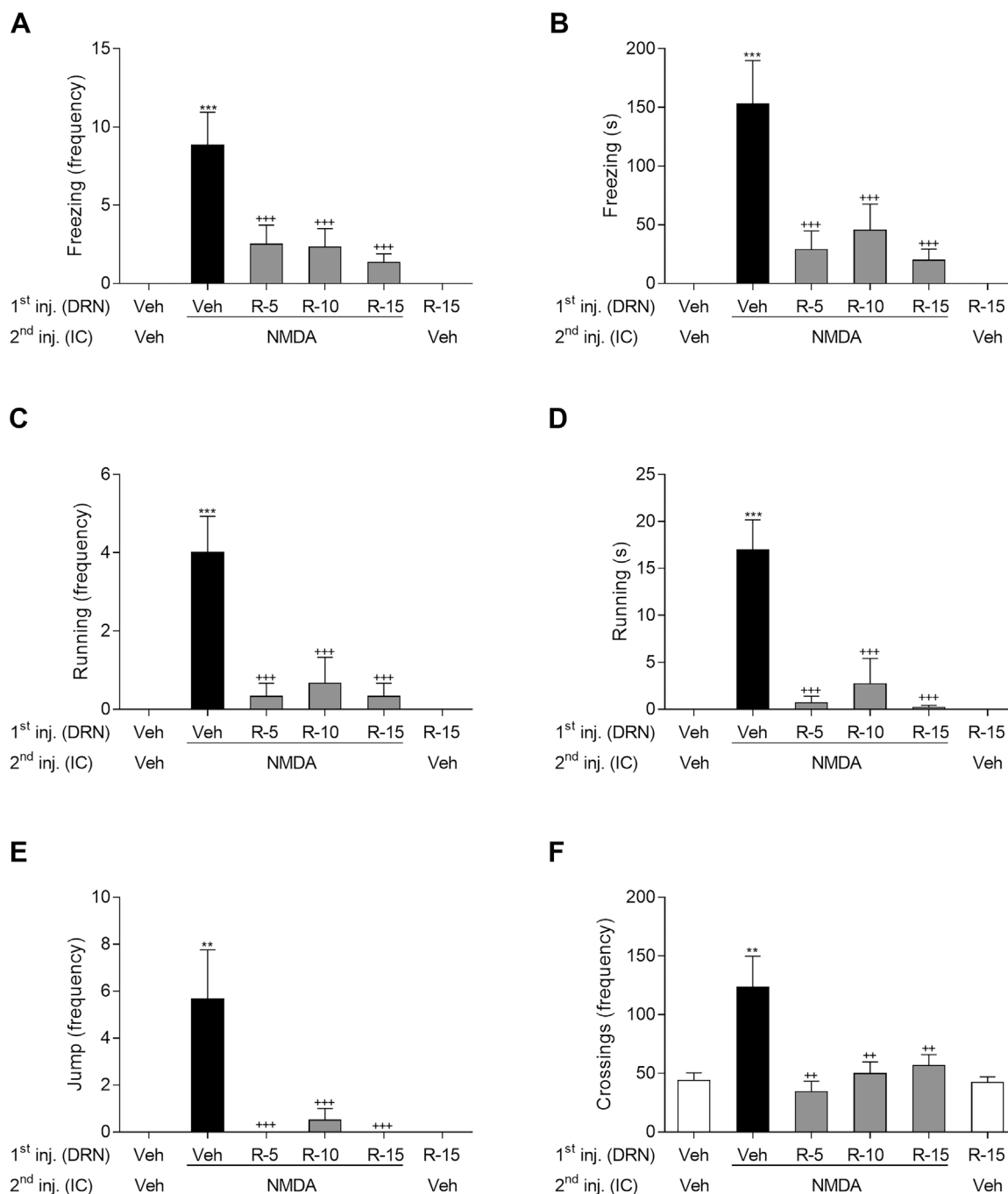


Fig. 5. Effect of the central microinjection of R-96544 (5, 10 and 15 nM) or vehicle (10% DMSO) into the dorsal raphe nucleus (DRN) on the frequency (A, C, E and F) and duration (B and D) of freezing (A and B), running (C and D), jumps (E) and crossings (F) evoked by the microinjection of NMDA at 12 nmol or vehicle (NaCl 0.9%; 0.2 μ L) into the inferior colliculus (IC); n = 6 per group. The columns represent the mean, and the bars represent the standard error of the mean. **p < 0.01 and ***p < 0.001 compared with the vehicle (veh)-veh-treated control group. + + p < 0.01 and + + + p < 0.001 compared with the veh-NMDA-treated group (according to one-way ANOVA followed by Newman-Keuls *post hoc* test).

4. Discussion

The present study showed that the blockade of 5-HT_{2A} receptors in the DRN reduced defensive reactions and unconditioned fear-induced antinociception evoked by chemical stimulation of the central nucleus of the IC with NMDA. Initially, we showed that the facilitation of excitatory amino acid neurotransmission via activation of NMDA ionotropic receptors elicited freezing and defensive escape behaviours. These defensive responses are considered panic attack-like responses [47–50]. In fact, freezing behaviour elicited by dorsal midbrain electric stimulation was shown to be highly responsive to chronic treatment with the classic panicolytic drug fluoxetine [51]. Here, increasing doses

of NMDA administered in the central nucleus of the IC provoked a progressive defensive behavioural pattern, characterised by alertness (data not shown), freezing, and running interspersed with jumps. Stimulation of the IC with the highest dose of NMDA caused non-oriented/explosive escape behaviour, characterised by vigorous running, collision with the walls of the circular arena and horizontal jumps during fast running episodes. Interestingly, at the end of the explosive escape behaviours, the animals exhibited long-lasting freezing reactions. Freezing is also considered a panic-like response [50,52]. Our findings corroborate previous studies that showed that chemical stimulation of midbrain tectum neurons with NMDA [7], including the neurons of the IC [1,53] evokes freezing followed by vigorous escape behaviour and

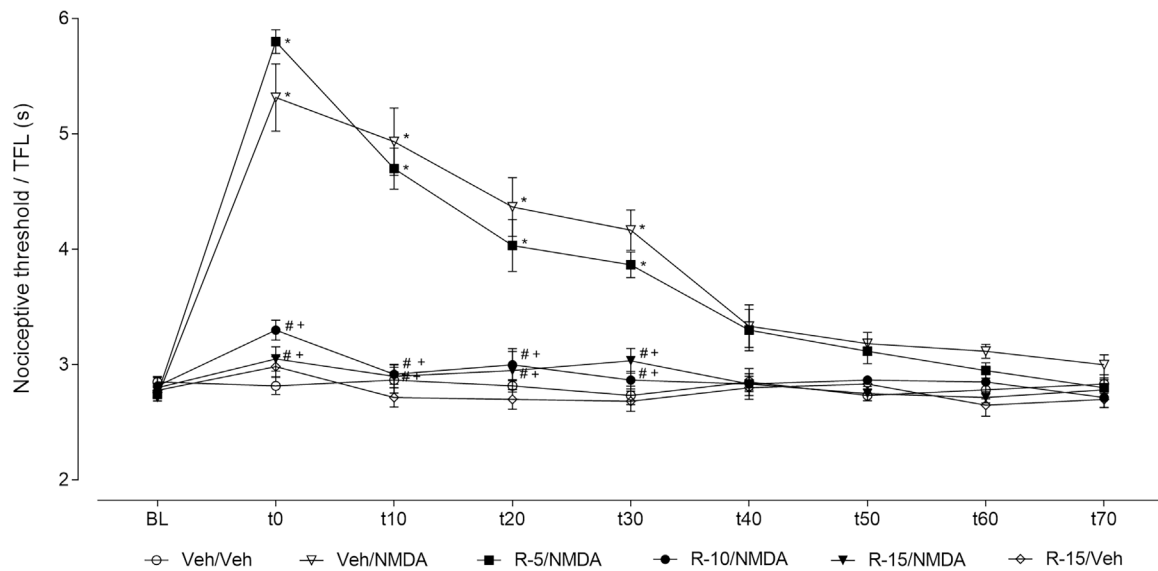


Fig. 6. Effect of the central microinjections of R-96544 (5, 10 and 15 nM) or vehicle (10% DMSO) into the dorsal raphe nucleus (DRN) followed by microinjection of NMDA at 12 nmol or vehicle (NaCl 0.9%; 0.2 μ L) into the inferior colliculus (IC) on unconditioned fear-induced antinociception. Antinociception caused by defensive behaviour was recorded using the tail-flick test; $n = 6$ per group. The data are presented as the mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$ compared with the vehicle (veh)/veh-treated control group. # $p < 0.05$ compared with the veh/NMDA-treated group. + $p < 0.05$ compared with the R-96544 at 5 nM (R-5)/NMDA-treated group (according to two-way RM-ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test).
modulate

subsequent activation of limbic structures [54]. Freezing after the explosive escape behaviours was also observed in some studies using other experimental approaches such as electrical stimulation of the mesencephalic tectum [55–57]. For example, Ruiz-Martinez et al. (2007) [56] observed that freezing also occurred after termination of this stimulation (post-stimulation freezing; PSF). In fact, the defensive behaviours evoked by microinjections of NMDA in the IC seem to be similar to those triggered in animals subjected to electrical stimulation of midbrain tectum structures, with the advantage of specifically activating neuronal perikarya.

In addition, the present results clearly show that the panic attack-like defensive behaviours organised by neurons of the central nucleus of the IC were followed by unconditioned fear-induced antinociception. That instinctive fear-induced antinociception is considered an important defensive response that accompanies affective reactions. There is evidence that this unconditioned fear related-antinociceptive response occurs due to the recruitment of neurons localised in limbic and paralimbic structures that are connected to the endogenous pain modulatory system [6,46,58,59] and is similar to the antinociceptive responses displayed by rodents that are exposed to a dangerous situation [4,60]. In addition, our data corroborate previous studies that demonstrated that explosive defensive escape behaviours enacted by mesencephalic tectum structures, such as the dlSC/dPAG [16] and the IC [11,17], are followed by a non-opioid antinociceptive response. There is evidence that at least part of the unconditioned fear-induced antinociception elicited by midbrain tectum activation occurs through recruitment of the serotonergic mechanisms of the endogenous pain modulatory system [61] by midbrain tectum outputs [6]. These pathways, which originate from the mesencephalic tectum neurons before reaching the dorsal horn of the spinal cord (DHSC), recruit medulla oblongata structures, such the nucleus raphe magnus and the gigantocellular/paragigantocellular reticular pars alpha nuclei [18]. The present work provides the first evidence for the involvement of DRN 5-HT_{2A} serotonergic receptors in the mechanism of unconditioned/instinctive fear-induced antinociception elicited by NMDA-induced activation of the central nucleus of the IC.

In fact, neurophysiological studies have shown that the activation of glutamatergic neurotransmission can promote 5-HT release [62]. Considering that electrical stimulation of dorsal midbrain neurons and

fibres of passage can promote a facilitation of serotonergic activity in the endogenous pain modulatory system [18], we can hypothesise that increases in nociceptive threshold elicited by intracollicular microinjection of NMDA are due to a possible release of 5-HT in monoaminergic brainstem reticular nuclei whose descending inputs can control the activity of neurons in the dorsal horn of the spinal cord spinal that project to the thalamus [63].

Interestingly, when animals received microinjections of the selective 5-HT_{2A} receptor antagonist R-96544 in the DRN at the doses used in the present work, the incidence of freezing and escape behaviours evoked by intra-IC administration of NMDA significantly decreased, suggesting that the IC is highly sensitive to the panicolytic effect of DRN pretreatment with R-96544. One possible neurochemical mechanism to explain that panicolytic effect is that the blockade of 5-HT_{2A} receptors located on GABAergic interneurons can disinhibit ascending serotonergic outputs from the DRN to the dorsal midbrain, decreasing the aversive effect of NMDA-induced activation of IC neurons. Ascending serotonergic pathways from the DRN, a midbrain structure rich in serotonin-labelled perikarya [33], have already been demonstrated elsewhere [34]. In addition, systemic administration of the 5-HT₂ receptor agonist DOI increased the number of Fos-immunopositive cells within the DRN. Interesting, those DRN 5-HT₂ receptor-labelled neurons are co-localised with glutamic acid decarboxylase-immunolabelled cells [32]. In the same work, it is suggested that the increase in DRN Fos expression induced by DOI is mediated by 5-HT_{2A} receptors since this effect was blocked by the 5-HT_{2A} receptor antagonist MDL100907, whereas the blockade of 5-HT_{2B/2C} receptors with the antagonist SB206553 did not cause a similar effect.

Taken together, our data reinforce the idea that DRN-IC serotonergic projections can be modulated by 5-HT_{2A} receptors located on DRN GABAergic interneurons. In addition, increases in the activity of serotonergic efferent pathways from the DRN to the central nucleus of the IC cause attenuation of freezing and defensive escape behaviours. Our findings corroborate studies showing that increasing the release of 5-HT from DRN terminals by pharmacological means diminishes panic attack-related jumping reactions [64,65]. In agreement with that evidence, Pobbe and Zangrossi [40] showed that the release of serotonin in dPAG, induced by microinjection of the 5-HT_{1A} receptor agonist WAY-100635 into the DRN, impaired the escape response displayed by

rodents in elevated T-maze test. That panicolytic effect of DRN pretreatment with WAY-100635 was abolished by pretreatment with the preferential 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist ketanserin in the dPAG. These results indicate that DRN 5-HT_{1A} receptors are under tonic inhibitory influence by endogenous 5-HT. In addition, 5-HT_{2A} receptors in the dPAG seem to mediate the effect of 5-HT on escape behaviour.

Regarding the antinociceptive response that followed the defensive behaviours elicited by chemical stimulation of the IC with NMDA, intra-DRN microinjections of R-96544 at higher doses were able to reduce that fear-induced antinociception. The 5-HT system has already been proposed to mediate unconditioned fear induced-antinociception elicited by electrical and chemical stimulation of the dLSC/dPAG [17] and IC [11]. Studies have shown that the unconditioned fear-induced antinociception elicited by the stimulation of midbrain tectum neurons can be reversed by intra-mesencephalic (dLSC and dPAG) microinjection of ketanserin [17] and by pretreatment of the nucleus raphe magnus and gigantocellularis/paragigantocellularis pars alpha reticular nuclei with ritanserin [18]. However, the pharmacological evidence that 5-HT_{2A} receptors modulate this fear-related antinociceptive response is still incomplete, since ketanserin and ritanserin also act on other receptor subtypes such as 5-HT_{2C} [26,66]. Our study supports the hypothesis that the unconditioned fear-induced antinociception elicited by chemical stimulation of the central nucleus of the IC response depends on the involvement of DRN 5-HT_{2A} receptors, since microinjection of the selective and potent 5-HT_{2A} receptor antagonist R-96544 into the DRN impairs the unconditioned fear-induced antinociception elicited by chemical stimulation of the IC.

Interestingly, although all the NMDA doses used were able to induce fear-induced antinociception, the lower doses (6 and 9 nmol) increased only the frequency of freezing without inducing running or jumping. In fact, freezing is a relevant ethological component of the defensive behaviour continuum [51,67,68], and significant fear-induced antinociception follows not only escape [6] but also freezing, as previously demonstrated [16,17]. Defensive immobility is a common response displayed by prey during confrontation with their natural predators [4,5,52,69–71]. Interestingly, chronic peripheral treatment with the serotonin uptake inhibitor fluoxetine decreases freezing behaviour elicited by electrical stimulation of the dorsal midbrain [52], suggesting that unconditioned freezing behaviour is a panic attack-related behavioural response.

With regard to the possible limitations of the present work, we can consider the fact that only one division each of the dorsal raphe nucleus (the central part) and the inferior colliculus (the central nucleus) was chosen for each central neuropharmacological treatment. The result could be better supported by a neurotracing assay followed by immunohistochemistry for the 5-HT_{2A} receptor. However, although the central nucleus of the inferior colliculus is mainly related to auditory ascending pathways, it has already been demonstrated that both electrical [12,72] and chemical [3,14] stimulation of that nucleus elicits defensive behaviour and non-opioid fear-induced antinociception [11,73]. Finally, in addition to evidence demonstrating direct connexions between the dorsal raphe nucleus neurons and limbic structures, such as the medial hypothalamus [21] and dorsal midbrain [23], a previous radioautographic study demonstrated that DRN 5-HT₂ receptors were labelled with the 5-HT₂ agonists [³H]ketanserin and [³H]mesulergine [27].

In conclusion, our findings demonstrated that the blockade of DRN 5-HT_{2A} receptors decreased both panic attack-like defensive behaviour and fear-induced antinociception elicited by chemical stimulation of the IC neurons with NMDA. However, although the selective blockade of 5-HT_{2A} receptors with DRN microinjections of R-96544 caused an impairment of freezing and escape responses at all doses of the drug, only the higher doses of R-96544 microinjected into the DRN were able to diminish unconditioned fear-induced antinociception. This suggests that DRN 5-HT_{2A} receptors are critically involved in the modulation of panic-like responses organised by IC neurons and mediate fear-induced

antinociceptive responses triggered by a neural substrate in the dorsal midbrain.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with respect to the work presented herein.

Authors' contributions

R. da Silva-Soares Jr. performed the experiments, analysed and interpreted the data, and wrote the manuscript. L. L. Falconi-Sobrinho and T. dos Anjos-Garcia analysed and interpreted the data, wrote the manuscript and collaborated on the design of the figures. N.C. Coimbra designed the experiments, analysed and interpreted the data, wrote the manuscript, and approved the final manuscript. All authors have approved the final version of the manuscript. We are entirely responsible for the scientific content of this paper.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (processes 483763/2010-1 and 474853/2013-6) FAEPA (processes 1291/1997, 355/2000, 68/2001, and 15/2003), and FAPESP (processes 1995/3604-4, 1995/8418-4, 2007/01174-1, and 2012/03798-0). R da Silva-Soares Jr. was supported by Botucatu-UNESP Institute of Biosciences (Scientific Initiation process 1725/2015-IB) and by CAPES (Magister Scientiae fellowship process CAPES/PROEX 0053040). L.L. Falconi-Sobrinho was supported by CNPq (M.Sc. fellowship process 134267/2013-3; Sc. D. fellowship process 145258/2015-7). T. dos Anjos-Garcia was supported by CNPq (M.Sc. fellowship, process 130124/2012-5; Sc. D. fellowship, proc. 141124/2014-8). N.C. Coimbra was granted a research fellowship (level 1A) from CNPq (processes 301905/2010-0 and 301341/2015-0). The authors are grateful to D.H. Elias-Filho and to Ieda Regina dos Santos Schivo for providing expert technical assistance. D.H. Elias-Filho received a technician scholarship from FAPESP (TT-2, process 02/01497-1) and was the recipient of scholarships sponsored by CNPq (processes 501858/2005-9, 500896/2008-9, and 505461/2010-2).

References

- [1] S.H. Cardoso, N.C. Coimbra, M.L. Brandão, Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus, *Behav. Brain Res.* 63 (1994) 17–24.
- [2] J.F.W. Deakin, F.G. Graeff, 5-HT and mechanisms of defence. Author's response, *J. Psychopharmacol.* 5 (1991) 339–341.
- [3] M.L. Brandão, C. Tomaz, P.C. Leão Borges, N.C. Coimbra, A. Bagri, Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus, *Physiol. Behav.* 44 (1988) 361–365.
- [4] N.C. Coimbra, F. Calvo, R.C. Almada, R.L. Freitas, T. Paschoalin-Maurin, T. dos Anjos-Garcia, D.H. Elias-Filho, W.A. Ubiali, B. Lobão-Soares, I. Tracey, Opioid neurotransmission modulates defensive behaviour and fear-induced antinociception in dangerous situations, *Neuroscience* 354 (2017) 178–195.
- [5] N.C. Coimbra, T. Paschoalin-Maurin, G.S. Bassi, A. Kanashiro, A.F. Biagioni, T.T. Felippotti, D.H. Elias-Filho, J. Mendes-Gomes, J.P. Cysne-Coimbra, R.C. Almada, B. Lobão-Soares, Critical neuropsychobiological analysis of panic attack- and anticipatory anxiety-like behaviors in rodents confronted with snakes in polygonal arenas and complex labyrinths: a comparison to the elevated plus- and T-maze behavioral tests, *Rev. Bras. Psiquiatr.* 39 (2017) 72–83.
- [6] N.C. Coimbra, R. de Oliveira, R.L. Freitas, S.J. Ribeiro, K.G. Borelli, R.C. Pacagnella, J.E. Moreira, L.A. da Silva, L.L. Melo, L.O. Lunardi, M.L. Brandão, 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 (2006) 93–112.
- [7] F. Ullah, T. dos Anjos-Garcia, I.R. dos Santos, A.F. Biagioni, N.C. Coimbra, 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 (2015) 143–152.
- [8] G.C.D. Eichenberger, S.J. Ribeiro, M.Y. Osaki, R.Y. Maruoka, G.C.C. Resende, L. Castellán-Baldan, S.A.L. Corrêa, L.A. Da Silva, N.C. Coimbra, Neuroanatomical and psychopharmacological evidence for interaction between opioid and

- GABAergic neural pathways in the modulation of fear and defense elicited by electrical and chemical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal. *Neuropharmacology* 42 (2002) 48–59.
- [9] S.J. Ribeiro, J.G. Ciscato Jr., R. de Oliveira, R.C. de Oliveira, R. D'Ângelo-Dias, A.D. Carvalho, T.T. Felippotti, E.C.C. Rebouças, L. Castellan-Baldan, A. Hoffmann, S.A.L. Corrêa, J.E. Moreira, N.C. Coimbra, Functional and ultrastructural neuroanatomy of interactive intratectal/tectonigral mesencephalic opioid inhibitory links and nigrotectal GABAergic pathways: involvement of GABA_A and μ_1 -opioid receptors in the modulation of panic-like reactions elicited by electrical stimulation of the dorsal midbrain, *J. Chem. Neuroanat.* 30 (2005) 184–200.
- [10] J.A. da Silva, A.F. Biagioni, R.C. Almada, J.A. de Souza Crippa, J.E. Cecílio Hallak, A.W. Zuardi, N.C. Coimbra, Dissociation between the panicolytic effect of cannabidiol microinjected into the substantia nigra, pars reticulata, and fear-induced antinociception elicited by bicuculline administration in deep layers of the superior colliculus: the role of CB1-cannabinoid receptor in the ventral mesencephalon, *Eur. J. Pharmacol.* 758 (2015) 153–163.
- [11] V.M. Castilho, V. Avanzi, M.L. Brandão, Antinociception elicited by aversive stimulation of the inferior colliculus, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62 (1999) 425–431.
- [12] M.Y. Osaki, L. Castellan-Baldan, F. Calvo, A.D. Carvalho, T.T. Felippotti, R. de Oliveira, W.A. Ubiali, T. Paschoalin-Maurin, D.H. Elias-Filho, V. Motta, L.A. da Silva, N.C. Coimbra, Neuroanatomical and neuropharmacological study of opioid pathways in the mesencephalic tectum: effect of μ_1 - and κ -opioid receptor blockade on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus, *Brain Res.* 992 (2003) 179–192.
- [13] L. Castellan-Baldan, M. da Costa Kawasaki, S.J. Ribeiro, F. Calvo, V.M.A. Corrêa, N.C. Coimbra, Topographic and functional neuroanatomical study of GABAergic disinhibitory striatum-nigral inputs and inhibitory nigrocollicular pathways: neural hodology recruiting the substantia nigra pars reticulata, for the modulation of the neural activity in the inferior colliculus involved with panic-like emotions, *J. Chem. Neuroanat.* 32 (2006) 1–27.
- [14] A. Twardowsky, N.C. Coimbra, μ - and κ -Opioid receptor activation in the dorsal periaqueductal grey matter differentially modulates panic-like behaviours induced by electrical and chemical stimulation of the inferior colliculus, *Brain Res.* 2015 (1597) 168–179.
- [15] G. Akgül, C.J. McBain, Diverse roles for ionotropic glutamate receptors on inhibitory interneurons in developing and adult brain, *J. Physiol.* 594 (2016) 5471–5490.
- [16] N.C. Coimbra, C. Tomaz, M.L. Brandão, Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum, *Behav. Brain Res.* 50 (1992) 77–83.
- [17] N.C. Coimbra, M.L. Brandão, 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 (1997) 97–103.
- [18] R. de Oliveira, R.C. de Oliveira, L.L. Falconi-Sobrinho, R. da Silva Soares Jr., N.C. Coimbra, 5-Hydroxytryptamine_{2A/2C} receptors of nucleus raphe magnus and gigantocellularis/paragigantocellularis pars α 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 (2017) 294–304.
- [19] R. Kishi, R. Bongiovanni, T.R. de Nadai, R.L. Freitas, R. de Oliveira, C.M. dos Reis Ferreira, N.C. Coimbra, Dorsal raphe nucleus and locus coeruleus neural networks and the elaboration of the sweet-substance-induced antinociception, *Neurosci. Lett.* 395 (2006) 12–17.
- [20] R.L. Freitas, C.M. dos Reis Ferreira, M.A.C. Urbina, A.U. Mariño, A.D. Carvalho, G. Butera, A.M. de Oliveira, N.C. Coimbra, 5-HT_{1A/1B}, 5-HT₆, and 5-HT₇ serotonergic receptors recruitment in tonic-clonic seizure-induced antinociception: role of dorsal raphe nucleus, *Exp. Neurol.* 217 (2009) 16–24.
- [21] A.F. Biagioni, R.C. de Oliveira, R. de Oliveira, J.A. da Silva, T. dos Anjos-Garcia, C.M. Roncon, N.C. Coimbra, 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 (3) (2016) 532–545.
- [22] A. Klepper, H. Herbert, Distribution and origin of noradrenergic and serotonergic fibers in the cochlear nucleus and inferior colliculus of the rat, *Brain Res.* 557 (1991) 190–201.
- [23] A.F. Biagioni, R.L. de Freitas, J.A. da Silva, R.C. de Oliveira, R. de Oliveira, V.M. Alves, N.C. Coimbra, 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 (2013) 379–394.
- [24] K. Fuxe, Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system, *Zeitschrift Für Zellforsch Und Mikroskopisch.* 596 (1965) 573–596.
- [25] H. Cransac, J.M. Cottet-Emard, S. Hellström, L. Peyrin, Specific sound-induced noradrenergic and serotonergic activation in central auditory structures, *Hear. Res.* 118 (1998) 151–156.
- [26] N.M. Barnes, T. Sharp, A review of central 5-HT receptors and their function, *Neuropharmacology* 38 (1999) 1083–1152.
- [27] A. Pazos, J.M. Palacios, Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors, *Brain Res.* 346 (1985) 205–230.
- [28] M. Pompeiano, J.M. Palacios, G. Mengod, Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors, *Mol. Brain Res.* 23 (1994) 163–178.
- [29] D.A. Morilak, P. Somogyi, R. Lujan-Miras, R.D. Ciaranello, Neurons expressing 5-HT₂ receptors in the rat brain: neurochemical identification of cell types by immunocytochemistry, *Neuropsychopharmacology* 11 (1994) 157–166.
- [30] V. Cornea-Hébert, M. Riad, C. Wu, S.K. Singh, L. Descarries, Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of adult rat, *J. Comp. Neurol.* 409 (1999) 187–209.
- [31] G. Quesseveur, H.T. Nguyen, A.M. Gardier, B.P. Guiard, 5-HT₂ ligands in the treatment of anxiety and depression, *Expert Opin. Investig. Drugs* 21 (2012) 1701–1725.
- [32] L.J. Boothman, T. Sharp, A role for midbrain raphe gamma aminobutyric acid neurons in 5-hydroxytryptamine feedback control, *Neuroreport* 16 (2005) 891–896.
- [33] C. Kohler, V. Chan-Palay, H.W.M. Steinbusch, The distribution and origin of serotonin-containing fibres in the septal area: a combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat, *J. Comp. Neurol.* 209 (1982) 91–111.
- [34] A. Parent, L. Descarries, A. Beaudet, Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [³H]5-hydroxytryptamine, *Neuroscience* 6 (1981).
- [35] R.C. de Oliveira, R. de Oliveira, C.M. dos Reis Ferreira, N.C. Coimbra, Involvement of 5-HT₂ serotonergic receptors of the nucleus raphe magnus and nucleus reticularis gigantocellularis/paragigantocellularis complex neural networks in the antinociceptive phenomenon that follows the post-ictal immobility syndrome, *Exp. Neurol.* 201 (2006) 144–153.
- [36] J. Jalewa, A. Joshi, T.M. McGinnity, G. Prasad, K. Wong-Lin, C. Hölscher, Neural circuit interactions between the dorsal raphe nucleus and the lateral hypothalamus: an experimental and computational study, *PLoS One* 9 (2014) e88003.
- [37] F. Ullah, T. dos Anjos-Garcia, J. Mendes-Gomes, D.H. Elias-Filho, L.L. Falconi-Sobrinho, R.L. Freitas, A.U. Khan, R. de Oliveira, N.C. Coimbra, 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 (2017) 135–147.
- [38] A. Spiacci, N.C. Coimbra, H. Zangrossi Jr., Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors, *Neuroscience* 227 (2012) 350–360.
- [39] P.S.M. Yamashita, A. Spiacci Jr., J.E. Hassel Jr., C.A. Lowry, H. Zangrossi Jr., Disinhibition of the rat prelimbic cortex promotes serotonergic activation of the dorsal raphe nucleus and panicolytic-like behavioral effects, *J. Psychopharmacol.* 31 (2017) 704–714.
- [40] R.L.H. Pobbe, H. Zangrossi, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus, *Psychopharmacology (Berl.)* 183 (2005) 314–321.
- [41] W.B. Wilent, M.Y. Oh, C.M. Buetefisch, J.E. Bailes, D. Cantella, C. Angle, D.M. Whiting, Induction of panic attack by stimulation of the ventromedial hypothalamus, *J. Neurosurg.* 112 (2010) 1295–1298.
- [42] T. Ogawa, A. Sugidachi, N. Tanaka, K. Fujimoto, F. Asai, Pharmacological profiles of R-96544, the active form of a novel 5-HT_{2A} receptor antagonist R-102444, *Eur. J. Pharmacol.* 457 (2002) 107–114.
- [43] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Acad. Press. Inc., 2007.
- [44] A.F. Biagioni, T. dos Anjos-Garcia, F. Ullah, I.R. Fisher, L.L. Falconi-Sobrinho, R.L. de Freitas, T.T. Felippotti, N.C. Coimbra, Neuroethological validation of an experimental apparatus to evaluate oriented and oriented escape behaviours: comparison between the polygonal arena with a burrow and the circular enclosure of an open-field test, *Behav. Brain Res.* 298 (2016) 65–77.
- [45] T. dos Anjos-Garcia, F. Ullah, L.L. Falconi-Sobrinho, N.C. Coimbra, CB1 cannabinoid receptor-mediated anandamide signalling reduces the defensive behaviour evoked through GABA_A receptor blockade in the dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus, *Neuropharmacology* 113 (2017) 156–166.
- [46] L.L. Falconi-Sobrinho, T. dos Anjos-Garcia, D.H. Elias-Filho, N.C. Coimbra, Unravelling cortico-hypothalamic pathways regulating unconditioned fear-induced antinociception and defensive behaviours, *Neuropharmacology* 113 (2017) 367–385.
- [47] D.C. Blanchard, R.J. Blanchard, Ethoexperimental approaches to the biology of emotion, *Ann. Rev. Psychol.* 39 (1988) 43–68.
- [48] C. Blanchard, G. Griebel, R. Blanchard, Mouse defensive behaviours: pharmacological and behavioural assays for anxiety and panic, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20 (2001) 205–218.
- [49] A. Shekhar, Effects of treatment with imipramine and clonazepam on an animal model of panic disorder, *Biol. Psychiatry* 36 (1994) 745–758.
- [50] L.C. Schenberg, A.S. Bittencourt, E.C.M. Sudrê, L.C. Vargas, Modeling panic attacks, *neurosci, Biobehav. Rev.* 64 (2001) 647–659.
- [51] K.G. Borelli, M.J. Nobre, M.L. Brandão, N.C. Coimbra, 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.* 55 (2004) 557–566.
- [52] A. Uribe-Mariño, A. Francisco, M.A. Castiblanco-Urbina, A. Twardowsky, C.J. Salgado-Rohner, J.A.S. Crippa, J.E.C. Hallak, A.W. Zuardi, N.C. Coimbra, 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 cenchrus* confrontation paradigm, *Neuropsychopharmacology* (2012) 412–421.
- [53] M.L. Brandão, L.L. Melo, S.H. Cardoso, Mechanisms of defense in the inferior colliculus, *Behav. Brain Res.* 4 (1993) 49–55.
- [54] M.R. Lamprea, F.P. Cardenas, D.M. Vianna, V.M. Castilho, S.E. Cruz-Morales, M.L. Brandão, The distribution of fos immunoreactivity in rat brain following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus, *Brain Res.* (2002) 186–194.
- [55] M.L. Brandão, J.M. Zanoveli, R.C. Ruiz-Martinez, L.C. Oliveira, J. Landeira-Fernandez, Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal

- gray of rats: association with different types of anxiety, *Behav. Brain Res.* (2008) 1–13.
- [56] R.C.R. Martinez, A. Ribeiro de Oliveira, M.L. Brandão, Serotonergic mechanisms in the basolateral amygdala differentially regulate the conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 71 (2007) 717–724.
- [57] V.M. Saito, M.L. Brandão, The benzodiazepine midazolam acts on the expression of the defensive behavior but not on the processing of aversive information, produced by exposure to the elevated plus maze and electrical stimulations applied to the inferior colliculus of rats, *Neuropharmacology* 88 (2015) 180–186.
- [58] M.S. Fanselow, Conditioned fear-induced opiate analgesia: a competing motivational state theory of stress analgesia, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 4 (1986) 40–54.
- [59] D.L. Rhodes, J.C. Liebeskind, Analgesia from rostral brain stem stimulation in the rat, *Brain Res.* (1978) 521–532.
- [60] J. Mendes-Gomes, V.C.S. Amaral, R.L. Nunes-de-Souza, Ventrolateral periaqueductal gray lesion attenuates nociception but does not change anxiety-like indices or fear-induced antinociception in mice, *Behav. Brain Res.* 24 (2011) 248–253.
- [61] A. Basbaum, Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry, *Annu. Rev. Neurosci.* 30 (1984) 309–338.
- [62] P. Celada, M.V. Puig, J.M. Casanovas, G. Guillazo, F. Artigas, Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: involvement of serotonin-1A, GABA_A, and glutamate receptors, *J. Neurosci.* (2001) 9917–9929.
- [63] W. Rahman, K. Bannister, L.A. Bee, A.H. Dickenson, A pronociceptive role for the 5-HT₂ receptor on spinal nociceptive transmission: an in vivo electrophysiological study in the rat, *Brain Res.* (2011) 29–36.
- [64] F.G. Graeff, M.B. Viana, P.O. Mora, Opposed regulation by dorsal raphe nucleus 5-HT pathways of two types of fear in the elevated T-maze, *Pharmacol. Biochem. Behav.* (1996) 171–177.
- [65] F.G. Graeff, F.S. Guimarães, T.G.C.S. de Andrade, J.F.W. Deakin, Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression, *Pharmacol. Biochem. Behav.* (1996) 129–141.
- [66] G. Baxter, G. Kennett, F. Blaney, T. Blackburn, 5HT₂ receptor subtypes: a family reunited? *Trends Pharmacol. Sci.* (1995) 1725–1731.
- [67] N.C. Coimbra, M.L. Brandão, GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation, *Behav. Brain Res.* 59 (1993) 131–139.
- [68] K.G. Borelli, C. Ferreira-netto, N.C. Coimbra, M.L. Brandão, Fos-like immunoreactivity in the brain associated with freezing or escape induced by inhibition of either glutamic acid decarboxylase or GABA_A receptors in the dorsal periaqueductal gray, *Brain Res.* 1051 (2005) 100–111.
- [69] A. Twardowsky, M.A. Castiblanco-Urbina, A. Uribe-Mariño, A.F. Biagioni, C.J. Salgado-Rohner, J.A. de Souza Crippa, N.C. Coimbra, The role of 5-HT_{1A} receptors in the anti-aversive effects of canabidiol on panic attack-like behaviors evoked in the presence of the wild snake *Epicrates cenchria crassus* (Reptilia; Boidae), *J. Psychopharmacol.* 27 (2013) 1149–1159.
- [70] R.C. Almada, N.C. Coimbra, Recruitment of striatonigral disinhibitory and nigro-tectal inhibitory GABAergic pathways during the organization of defensive behavior by mice in a dangerous environment with the venomous snake *Bothrops alternatus* (Reptilia, Viperidae), *Synapse* (2015) 299–313.
- [71] R.C. Almada, C.M. Roncon, D.H. Elias-Filho, N.C. Coimbra, Endocannabinoid signaling mechanisms in the substantia nigra pars reticulata modulate GABAergic nigro-tectal pathways in mice threatened by urutu-cruzeiro venomous pit viper snake, *Neuroscience* (2015) 503–514.
- [72] N.C. Coimbra, M.Y. Osaki, G.C.D. Eichenberger, J.G. Ciscato Jr., C.E.B. Jucá, C.R. Biojone, Effects of opioid receptor blockade on defensive behavior elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior colliculus in *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae), *Psychopharmacology (Berl.)* 152 (2000) 422–430.
- [73] V.M. Castilho, M.L. Brandão, Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT_{2A} receptors in rats, *Psychopharmacology (Berl.)* 155 (2001) 154–162.