UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

**Participação dos receptores NK-1 dos núcleos basolateral e central
da amígdala no comportamento defensivo de ratos**

Gabriel Shimizu Bassi

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto/USP, como parte das exigências para
a obtenção do Título de Mestre em Ciências.
Área: Psicobiologia

Ribeirão Preto - SP

- 2011 -

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

**Participação dos receptores NK-1 dos núcleos basolateral e central
da amígdala no comportamento defensivo de ratos**

Gabriel Shimizu Bassi

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto/USP, como parte das exigências para
a obtenção do Título de Mestre em Ciências.
Área: Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão

Ribeirão Preto - SP

- 2011 -

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

Bassi, Gabriel Shimizu

Participação dos receptores NK-1 dos núcleos basolateral e central da amígdala no comportamento defensivo de ratos/ Gabriel Shimizu Bassi; orientador Marcus Lira Brandão.

--Ribeirão Preto, 2009
134p: il. ; 30cm

Dissertação de mestrado, apresentado à Faculdade de Filosofia, Ciências e letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Psicobiologia

Orientador: Marcus Lira Brandão

1. Núcleo basolateral da amígdala; 2. Núcleo central da amígdala; 3. Substância P; 4. Receptores NK-1. 5. Labirinto em cruz elevado; 6. Nocicepção; 7. Vocalização ultrassônica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BASSI, Gabriel Shimizu

Título: Participação dos receptores NK-1 dos núcleos basolateral e central da amígdala no comportamento defensivo de ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.
Área: Psicobiologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcus Lira Brandão

Instituição: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP)

Assinatura:

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Instituição: Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

Assinatura:

Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP)

Assinatura:

AGRADECIMENTOS

Antes dos pormenores tenho realmente que agradecer ao Prof. Dr. Marcus Lira Brandão. Não somente pelo seu conhecimento e determinação para moldar, explicar e por em prática ideias e resultados numa folha de papel ou numa conversa informal ao pé do computador, mas pelo humanismo e caráter ético que me fizeram querer uma pós-graduação (e continuar a trabalhar) ao seu lado.

O outro especial agradecimento vai para o Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra, meu primeiro orientador, talvez a primeira imagem e inspiração de um (grande) cientista. Nos idos de 2004, numa época em que um garoto recém-calouro de 18 anos e inseguro sobre a profissão a seguir, teve a paciência de explicar e insistir na minha graduação, para aproveitá-la e absorver o máximo de conhecimento possível dos professores, para então determinar, de uma vez por todas, o que realmente eu queria para a vida. E não me arrependo de ter seguido seus conselhos.

Ao pessoal do laboratório (cujos nomes omitirei para evitar possível ostracismo dos omitidos)

Agradeço também ao CNPq pela disponibilidade da bolsa, a qual ajudou, de um modo inestimável, a melhorar não somente minha vida financeira como minha autoestima e moral em relação à minha própria pessoa.

E finalmente agradeço aos Professores que se foram neste conturbado mês de março de 2012 para a Ciência e para o Racionalismo brasileiro e mundial. Como fui aluno de alguns deles, deixo meu muito obrigado por engrandecerem não somente a minha mente com as maravilhas da ciência e do pensamento crítico, mas por engrandecerem também a mente dos seus outros milhares de alunos iguais a minha pessoa. Meu muito obrigado, e que seus legados não caiam no esquecimento num Brasil cada dia mais supersticioso e medieval.

Prof. Dr. Sérgio Zuccolotto

Prof. Dr. César Ades

Prof. Dr. Aziz Ab`Saber

Prof. Dr. Julio Cesar Voltarelli

Prof. Francisco Anysio de Oliveira Paula Filho (Chico Anysio)

E rumo à Imunologia

Lista de Abreviações

5-HT	Serotonina
AAA	Área Amigdalóide Anterior
AAH	Área Amígdalo-Hipocampal
ACo	Núcleo Cortical Anterior da Amígdala
BAOT	Núcleo Leito do Trato Olfatório Acessório
BLA	Núcleo Basolateral da Amígdala
BSTia.....	Núcleo Leito da Estria Terminal Intra-amigdalóide
CeA	Núcleo Central da Amígdala
CoA	Núcleo Cortical Anterior da Amígdala
CoP	Núcleo Cortical Posterior da Amígdala
CPA	Córtex Periamigdalóide
CPR	Córtex Perirrinal
LA.....	Núcleo Lateral da Amígdala
LCE.....	Labirinto em Cruz Elevado
MeA.....	Núcleo Medial da Amígdala
MeAD	Núcleo Medial Dorsal da Amígdala
MeAV	Núcleo Medial Ventral da Amígdala
NB.....	Núcleo Basal da Amígdala
NBA	Núcleo Basal Acessório da Amígdala
Ni	Núcleos Intercalados da Amígdala
NK.....	Neurocinina
NKA	Neurocinina A
NKB.....	Neurocinina B
NTOL.....	Núcleo do Trato Olfatório Lateral
SCP.....	Substância Cinzenta Periaquedutal
SCPd	Substância Cinzenta Periaquedutal parte dorsal
VUS.....	Vocalização Ultrassônica

Índice

Resumo	8
Abstract.....	10
1. Introdução.....	11
1.1. Estudo das Emoções.....	12
1.2. Amígdala e Emoções	18
1.3. Taquicinininas.....	24
1.3.1. Substância P.....	24
1.3.2. Receptores NK-1	26
1.4. Nocicepção como Parte da Reação de Defesa	27
1.5. Vocalizações Ultrassônicas (VUS)	30
2. Objetivos.....	34
3. Materiais & Métodos	36
3.1. Animais.....	37
3.2. Cirurgia	37
3.3. Drogas e Microinjeção.....	39
3.4. Testes Utilizados.....	41
3.4.1. Labirinto em Cruz Elevado.....	42
3.4.2. Latência de Retirada de Cauda	45
3.4.3. Emissão de VUS	46
3.5. Histologia.....	47
3.6. Análise Estatística	48
4. Resultados.....	49
4.1. Núcleo Basolateral da Amígdala.....	50
4.1.1. Efeitos da administração das drogas isoladamente	50
4.1.2. Efeitos da administração das drogas conjuntamente	54
4.2. Núcleo Central da Amígdala	57
4.2.1. Efeitos da administração das drogas isoladamente	58
4.2.2. Efeitos da administração das drogas conjuntamente	61
5. Discussão.....	66
6. Conclusões	72
7. Referências	74
8. Apêndice	97

RESUMO

RESUMO

BASSI, G.S. Participação dos receptores NK-1 dos núcleos basolateral e central da amígdala no comportamento defensivo de ratos. 2012. 134 p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Estudos realizados na última década mostram que a substância P (SP) é um neuromediador importante de estados emocionais e afetivos. A SP tem ação pró-aversiva quando microinjetada na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) através da ativação de receptores neurocininérgicos do tipo NK-1, uma vez que o comportamento defensivo é bloqueado por antagonistas desses receptores. A ativação de receptores NK-1 na SCPd também produz antinocicepção, a qual é considerada parte da reação de defesa. Na sequência desses estudos, este projeto visa investigar o envolvimento dos receptores neurocininérgicos no núcleo central (CeA) e basolateral (BLA) da amígdala na mediação dos estados aversivos gerados e elaborados nessa estrutura prosencefálica que, junto com a SCPd, faz parte do sistema encefálico aversivo. O presente estudo mostrou que a SP e o agonista NK-1 (Sar-Met-SP) promoveram efeitos pró-aversivos no labirinto em cruz elevado somente no CeA, mas não no BLA. Ao contrário da SCPd, não obtivemos qualquer alteração no limiar nociceptivo com a microinjeção de antagonista de receptores NK-1 (Spantide) em ambos os núcleos. O Spantide sozinho não alterou os indicadores de nocicepção e ansiedade. Nenhum tipo de vocalização (audível ou ultrassônica) foi detectado no presente trabalho após a microinjeção de SP ou Sar-Met-SP em ambos núcleos amigdalóides, apesar de relatos de vocalizações ultrassônicas (VUS) após o mesmo tipo de tratamento na SCPd. Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que o CeA, mas não o BLA, modula a expressão de comportamentos relacionados ao medo inato através de receptores neurocininérgicos do tipo NK-1. VUS e antinocicepção não parecem participar da reação de defesa elaborada no CeA. A ausência da emissão de VUS nesses núcleos pode indicar que somente estruturas mais antigas do neuroeixo (mesencéfalo e hipotálamo) são responsáveis pela produção de VUS.

Palavras-chave: Núcleo basolateral da amígdala. Núcleo central da amígdala. Substância P. Receptores NK-1. Labirinto em cruz elevado. Nocicepção. Vocalização ultrassônica.

Abstract

A substantial body of evidence obtained in the last decade demonstrated that the Substance P (SP) is an important mediator of the affective and emotional behaviors. SP is a pro-aversive compound when microinjected within the dorsal periaqueductal gray (dPAG). These effects are mediated by the type 1 neurokininergic receptors (NK-1), since the defensive behavior was inhibited by antagonists of these receptors. The activation of NK-1 receptors in the dPAG also produced antinociception and ultrasonic vocalizations (USV). In the sequence of these studies, this study investigated the involvement of neurokinin receptors of the central (CeA) and basolateral (BLA) nuclei of the amygdala in the mediation of the defense reaction. The amygdala together with the dPAG and the medial hypothalamus comprise the encephalic aversive system. The results showed that SP and the NK-1 agonist (Sar-Met-SP) promoted pro-aversive effects in the elevated plus maze test only when microinjected into the CeA, without effect in the BLA. Although SP and the activation of NK-1 receptors induce antinociception in the dPAG, we did not observe any alteration of the nociceptive threshold in the tail-flick test with the NK-1 antagonist (Spantide) injected into both nuclei and any changes of the anxiety parameters in the EPM. No vocalizations (audible or ultrasonic) were detected after treatment with SP or Sar-Met-SP in both amygdaloid nuclei. The lack of emissions of USVs after activation of these nuclei could indicate that only older structures (PAG and hypothalamus) of the neuroaxis are responsible for the production of USVs. The results obtained in the present study show that NK-1 receptors within CeA, but not BLA, modulate the expression of defensive behaviors related to the innate fear. Apparently USVs and antinociception are not involved in the defensive reactions induced by activation of NK-1 mechanisms in the CeA.

Keywords: Basolateral amygdaloid nucleus. Central amygdaloid nucleus. Substance P. NK-1 receptors. Elevated Plus Maze. Nociception. Ultrasonic vocalization.

1- INTRODUÇÃO

1.1. Estudo das Emoções

As emoções sempre foram foco de atenção dos estudos humanos desde tempos imemoráveis. Um dos primeiros métodos de identificação, qualificação e tratamento de distúrbios emocionais surgiu na China por volta de 5000 antes era comum (A.E.C). Para os chineses da época, o universo era composto de 5 elementos: terra, metal, água, madeira e fogo, sendo que cada elemento daria origem ao elemento subsequente. Acompanhando esse pensamento, a vitalidade do corpo humano seria regida pelo equilíbrio entre energias (yin e yang) que nasceriam e morreriam desses 5 elementos. Essa circulação de energia seria de modo ordenado e hierárquico através dos órgãos do corpo humano, e uma disfunção, colapso ou bloqueio dessa circulação faria surgir as patologias emocionais. Curiosamente, o encéfalo teria um papel secundário na experiência das emoções, sendo regido coordenado por órgãos fora do sistema nervoso central. Por exemplo, distúrbios do fígado levavam a distúrbios da ansiedade, da vesícula biliar ao medo (falta de coragem), e do coração a distúrbios depressivos (MACIOCIA, 1994). Para os gregos do período clássico (séculos V e IV A.E.C), acreditava-se que o universo era composto de 4 elementos básicos: água, terra, fogo e ar, e que as conexões entre as características físicas e o tipo de “temperamento” individuais eram regidas pela combinação desses elementos com fluidos corporais (humores) encontrados no organismo humano (FOUCAULT, 1978). O sangue estaria relacionado ao ar, a bÍlis amarela ao fogo, a bÍlis negra à terra, e a água estaria ligada à fleuma (entende-se como edema), e cada tipo de humor corresponderia a uma personalidade diferente. A pessoa do tipo sanguíneo teria um temperamento extrovertido e aventureiro, o tipo colérico (bÍlis amarela) um temperamento ambicioso e enérgico, os melancólicos (bÍlis negra) seriam pessoas mais criativas e introvertidas, e o

fleumático teria um temperamento mais tímido e afetuoso (Figura 1) (FOUCAULT, 1978).

Figura 1. Desenhos ilustrativos representando os tipos de temperamentos encontrados nos seres humanos. O tipo de temperamento apresentado pela pessoa seria uma explicação para o aparecimento de sintomas hoje classificados como psicopatológicos. 1 – Sanguíneo; 2 – colérico; 3 – fleumático; 4 – melancólico. Ilustrações de Georg Pencz (1500-1550), Museu Britânico.

A teoria hipocrática foi aceita plenamente até o século XVII. A partir do Iluminismo uma nova mentalidade científica que se afastava cada vez mais do sobrenatural surgia, criando novos métodos de questionamentos e análise dos fenômenos naturais. A partir do estudo de Charles Darwin em seu livro *A Expressão das Emoções em Homens e Animais* de 1872, no qual aborda a origem e o desenvolvimento dos principais comportamentos emocionais, demonstrou-se que a expressão das emoções se dá por: 1 - princípio da utilidade dos hábitos; 2 – antítese entre emoções; e 3 - ação direta no sistema nervoso. Com base nisso, admite-se que a expressão das emoções tem forte conotação adaptativa, abrangendo componentes fisiológicos, comportamentais e subjetivos (DAVIDOFF, 1983).

No final do século XIX, William James (1884) e Karl Lange (1887) propõem que as emoções seriam o resultado da percepção primária de alterações fisiológicas no organismo secundariamente a estímulos estressantes (veja um leão: meus músculos ficam rígidos e meus batimentos cardíacos aceleram para então sentir medo). Porém Walter Cannon (1927) e Philip Bard (1928) perceberam que essas alterações emocionais ainda ocorriam em animais com lesão na medula espinal, e que uma interação entre o córtex e os centros mais primitivos do sistema nervoso é necessário para essas respostas. Além disso, ao se desconectar o córtex do tronco encefálico em gatos, Cannon e Britton (1925) mostraram que o animal demonstrava atividades comportamentais relacionadas à excitação emocional, como ataques inespecíficos e aleatórios, denominando-as de “falsa raiva”. Propôs então a “teoria neural das emoções”, na qual o hipotálamo seria o centro controlador das emoções. O hipotálamo permitiria avaliar a relevância emocional dos eventos ambientais por meio de suas conexões com o córtex e expressar as respostas emocionais por meio de suas conexões com o tronco encefálico.

James Papez (1937), seguindo os passos da teoria de Cannon-Bard, enfatizou o papel central do sistema límbico tanto na expressão das emoções como em seu controle, aprofundando a conexão entre hipotálamo e córtex. Três componentes desse sistema: hipocampo, hipotálamo e giro do cíngulo não estavam somente interconectados, mas também serviriam de mediadores das experiências e das respostas emocionais do organismo. O circuito de Papez é então composto pelo córtex sensorial, tálamo, giro do cíngulo, hipocampo e hipotálamo. Papez diferenciava entre as estruturas encefálicas envolvidas nas expressões emocionais primitivas (medo) daquelas experiências emocionais subjetivas (ansiedade). Segundo Papez, a experiência emocional surgiria quando o giro do cíngulo fosse capaz de integrar sinais provenientes do córtex sensorial e hipotálamo.

Ainda na década de 30, Heinrich Kluver e Paul Bucy (1937, 1938) mostraram que lobotomias bilaterais da parte anterior do córtex temporal em macacos *rhesus* resultavam em perdas significativas das reações emocionais. Isso levou Paul MacLean (1949) a adicionar ao circuito de Papez regiões como amígdala e o córtex pré-frontal. MacLean associou o papel do sistema límbico com o substrato primário tanto da expressão emocional como de sua experiência. Dividindo o cérebro conceitualmente em três regiões maiores, MacLean cunhou o termo *Cérebro Triuno*, mantendo a visão na qual o crânio humano não contém somente um cérebro, mas três, cada um representando um estrato evolucionário distinto que se formou a partir da camada mais antiga ou abaixo dele. Ele então adotou o termo de *reptiliano* ou cérebro primitivo para as estruturas do tronco encefálico que servem para as funções básicas de sobrevivência e de memórias ancestrais; o sistema límbico ou cérebro *paleomamífero*, relacionado com as emoções puras, os instintos e o comportamento reprodutivo; e o *neocórtex* ou cérebro *neomamífero*, servindo às funções abstratas, experiências emocionais subjetivas

e habilidades de resolução de problemas. Todos os três estavam em sinergia e em comunicação, mas ocasionalmente em conflito uns com os outros.

Hess (1941), Molina & Hunsperger (1959) e Hunsperger (1956) descobriram que estimulações da substância cinzenta periaqueductal (SCP), hipotálamo medial ou da amígdala produzem respostas tanto de fuga como de agressão em gatos, similares a comportamentos espécie-específicos que ocorreriam em circunstâncias naturais entre presa e predador. Essas estimulações elétricas são acompanhadas por descargas do sistema nervoso simpático, tais como midríase, sudorese, taquicardia e taquipnéia. Além disso, a especificidade das respostas defensivas em função da estrutura encefálica estimulada diferia entre essas estruturas (por exemplo: fuga não direcionada quando se estimulava a SCP dorsal (SCPd), e fuga direcionada quando se estimulava o hipotálamo). A estimulação elétrica da amígdala produzia uma reação de defesa que se manifestava após alguns segundos (20 a 30 segundos), ao contrário do hipotálamo e SCP, cuja estimulação produz uma reação de defesa imediata em resposta à sua estimulação (KELLY; GROSSMAN, 1979), sugerindo mecanismos regulatórios hierárquicos. Por fim, Nauta (1958) sugeriu a adição de áreas encefálicas mais primitivas da escala evolutiva ao sistema límbico, tais como a SCP, permitindo uma investigação mais individualizada das emoções dentro desse sistema.

O grupo de Allan Siegel estudou especificamente as aferências e eferências neurais de áreas encefálicas cuja estimulação estaria envolvida nas respostas de comportamentos defensivos e do medo. A marcação anterógrada do hipotálamo anterior mostrou fibras neuroniais que se projetam para a amígdala e o núcleo leito da estria terminal, e a marcação do hipotálamo medial envia projeções neuroniais descendentes para a SCP (FUCHS; SIEGEL, 1984; FUCHS; EDINGER; SIEGEL, 1985). Aferências neuroniais originadas de estruturas corticais e subcorticais faziam sinapse em neurônios

da amígdala, cujas informações seriam retransmitidas para estruturas mais primitivas, tais como hipotálamo medial e estruturas de regulação autonômicas do tronco encefálico, tais como a SCP (GRAEFF et al., 1993). Portanto, a amígdala faria o repasse de informações de estímulos inatos ou condicionados relacionados ao medo para estruturas mais caudais do neuroeixo responsáveis pelas manifestações fisiológicas e comportamentais do medo (HICHCOCK; DAVIS, 1987). Fanselow (1991) argumenta que a amígdala teria a função de avaliar o grau de ameaça dos diferentes estímulos que sinalizam o perigo, processando e então enviando essas informações para a SCP, a qual seria responsável por organizar apropriadamente a resposta comportamental de defesa.

O comportamento de defesa e a análise do estímulo são graduados de acordo com a resposta obtida. Variam de “lento e sofisticado”, onde há espaço e tempo de manobras suficientes para a resposta, a “rápido e inespecífico”, onde o perigo e a fuga do local são imediatos (LEDOUX, 1993). Graeff (1990, 1994) associou a expressão de diferentes tipos de emoções relacionadas ao comportamento defensivo a diferentes estruturas encefálicas, denominando-as de *sistema encefálico aversivo*. A ansiedade (ameaça potencial) estaria relacionada à amígdala e ao sistema septo-hipocampal, o medo (ameaça real distal) à amígdala e à SCPd, e o pânico (ameaça proximal) à amígdala, SCPd e hipotálamo. Além disso, Graeff (1994) postulou uma visão hierárquica do sistema neuronal associado ao comportamento defensivo: no nível mais baixo se localizaria a SCP, a qual coordenaria a fuga não direcionada; o hipotálamo medial coordenaria a fuga direcionada, a amígdala a esquiva ativa simples; e o giro cingulado se localizaria no nível mais alto, correlacionando-se com as esquivas ativas complexas e coordenadas.

1.2. Amígdala e Emoções

Uma variedade de funções tem sido atribuída à amígdala, entre elas memória, atenção, interpretação de significado emocional de estímulos sensoriais e elaboração e produção de reações emocionais de medo (para revisão, ver LEDOUX, 2000). A amígdala faz parte do sistema límbico proposto por MacLean, porém não era considerada uma área límbica importante até meados da década de 1930, quando se demonstrou sua importância para a síndrome de Kluver-Bucy (BUCY; KLUVER, 1937, 1938). A região amigdalóide encefálica foi identificada no século XIX por Burdach (1819-1822), sendo nomeada, de acordo com a língua grega, devido à sua semelhança a uma estrutura em formato de amêndoa (ou casca de noz), área hoje reconhecida como composta de subdivisões ao invés de uma região inteira (SWANSON; PETROVICH, 1998). A amígdala está interconectada por uma variedade de regiões corticais e subcorticais por duas vias principais de saída: a via amigdalófuga ventral e a estria terminal, cujas fibras axonais podem se interconectar (AMARAL; INSAUSTI, 1992; PRICE et al., 1987). A estria terminal é composta de fibras originárias da parte ventromedial da amígdala caudal, enquanto a via amigdalófuga possui fibras neuronais cujos corpos celulares se localizam desde o limite dorsomedial até a parte rostrocaudal da amígdala (PRICE; AMARAL, 1981; RUSSCHEN et al., 1985). A amígdala é composta de grupos heterogêneos e complexos de núcleos e áreas corticais, localizando-se bilateralmente ao lobo temporal anterior do encéfalo, próxima à formação hipocampal (AMARAL; BASSET, 1989; AMARAL; INSAUSTI, 1992).

Associações entre o uso de recompensas para motivar e reforçar o comportamento (CARDINAL et al., 2002; EVERITT et al., 1999) e a expressão de estados emocionais associados a comportamentos agressivos, maternos, sexuais e alimentares estão relacionados à atividade amigdalóide (BAHAR et al., 2003;

GALAVERNA et al., 1992; MICZEK et al., 2007; PFAFF, 2005) (Figura 2). O medo tem sido uma emoção associada principalmente à amígdala desde estudos de Kluver e Bucy (1937, 1938) nos quais lesões nos lobos temporais de macacos causavam alterações profundas na reatividade a estímulos aversivos em testes de esquivas motivadas pelo medo e em tarefas condicionadas (GODDARD, 1964; MAREN; POREMBA; GABRIEL, 1991; GRAEFF et al., 1993). Uma vez detectado o estímulo emocional, a amígdala pode influenciar o processamento desse estímulo, visto que suas amplas conexões com áreas corticais envolvidas com funções cognitivas de atenção, percepção e memória explícita (MCGAUGH, 2000; PHELPS; LEDOUX, 2005), e a alteração desses circuitos podem levar a distúrbios de ansiedade que são comumente associadas à amígdala (Tabela 1).

A presença de uma via recíproca entre a SCP e a amígdala sugere uma modulação dessa última nas interações entre as áreas límbicas e a SCP (GRAEFF et al., 1993; CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; SAH et al., 2003). É possível que uma interação funcional entre o núcleo basolateral da amígdala (BLA) e a SCPd ocorra via CeA, uma vez que esse núcleo é uma das principais estruturas que compõem o substrato neural para a expressão das reações de defesa (AMARAL; INSAUSTI, 1992; LEDOUX, 1993; RIZVI et al., 1991; GRAEFF., 1993). A lesão da SCP bloqueia os efeitos comportamentais obtidos pela estimulação do núcleo medial da amígdala (MeA) (GRAEFF, 1994), assim como a inativação por lidocaína do MeA aumenta o limiar de fuga durante a estimulação da SCP (HERDADE et al., 2006).

Figura 2. Conexões amigdalóides recíprocas com estruturas encefálicas. Essas áreas contêm informações relacionadas às informações interoceptivas e exteroceptivas do animal que confluem para a amígdala, a qual integra essas informações e as envia de volta para cada área. Modificado de Whalen & Phelps, 2009.

DISTÚRBIOS DE ANSIEDADE ASSOCIADOS À AMÍGDALA	AUTORES
Estresse pós-traumático	ACKERMAN et al., 1998 RAUCH; SHIN; PHELPS, 2006
Distúrbios do pânico	COPLAN; LYDIARD., 1998 GORMAN et al., 2000 DOMSCHKE et al., 2006
Fobias sociais	AMARAL, 2002 BIRBAUER et al., 1998
Distúrbio obsessivo-compulsivo	PUJOL et al., 2004 SZESKO et al., 1999 VAN LAERE et al., 2006

Tabela 1. Tipos de distúrbios da ansiedade associados à disfunção da amígdala humana em suas respectivas referências

Pitkanen, Savander e LeDoux (1997) dividiram a amígdala em 13 núcleos e áreas corticais, incluindo núcleos específicos e o córtex periamigdalóide (Figura 3). Sendo composto basicamente de três núcleos principais: núcleo lateral, basal (núcleos

basais) e CeA, e outros núcleos correspondentes da “amígdala estendida”: MeA, leito da estria terminal (BSTia) e cortical anterior (CoA).

O CeA é classicamente conhecido por ser a via de saída para a expressão das respostas comportamentais inatas e suas respostas fisiológicas associadas (PRICE; AMARAL, 1981; AGGLETON, 1985). Localiza-se na metade caudal da amígdala em primatas e ratos, e é subdividida em partes lateral e medial (PRICE et al, 1987; PAXINOS; WATSON, 2005). Sua divisão medial recebe projeções dos núcleo basal (NB), núcleo basal acessório (NBA), núcleo lateral (LA), MeA e córtex periamigdalóide (CPA) (AGGLETON, 1985; PRICE et al., 1987; PITKANEN; SAVANDER; LEDOUX, 1997; PRICE; AMARAL, 1981). Sua divisão lateral envia projeções para regiões do tronco encefálico, CPA, área amigdalóide anterior (AAA) e área amígdalohipocampal (AAH) (PRICE; AMARAL, 1981; AGGLETON, 1985), as quais estão envolvidas na evocação de comportamentos específicos e das respostas fisiológicas reflexas ao estímulo. A exposição de ratos ao estresse de contenção ou a odores de predadores aumenta a expressão da proteína Fos no CeA (ROSEBOOM et al., 2007; MARTINEZ et al., 2011; HENKE; RAY, 1992). Estudos mostraram aumento da liberação de fator de liberação de corticotrofina (CRF) no CeA em ovelhas expostas a cães, e de ratos submetidos ao teste de esQUIVA INIBITÓRIA (COOK, 2002; ROOZENDAAL et al. 2002), indicando que o CeA representa um sítio de convergência para as respostas ao estresse (LEDoux, 1993). Esses estudos são apoiados por testes nos quais a lesão eletrolítica bilateral do CeA impediu o sobressalto potencializado pelo medo a estímulos visual e auditório aversivos (HITCHCOCK; DAVIS, 1987; KIM; DAVIS, 1993). Estudos neuroquímicos mostraram que o CeA contém forte imunorreatividade para o ácido γ -aminobutírico (GABA) e para sua enzima precursora, a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) (LEDoux et al., 2000), e a microinjeção

de muscimol, um agonista de receptores GABA_A, no CeA, produz efeitos ansiolíticos mensurados no teste de labirinto em cruz elevado (LCE) (MOREIRA et al., 2007).

Figura 3. **Acima:** Principais núcleos do complexo amigdalóide e áreas associadas (divisão nuclear somente). **Abaixo:** Divisão simplificada do complexo amigdalóide, incluindo núcleos específicos e o córtex periamigdalóide. Para abreviações consultar Lista de Abreviações. IA: interaural. Barra de escala: 0,5 mm. Modificado de PITKANEN; SAVANDER; LEDOUX, 1997.

O BLA é um termo utilizado para se referir ao conjunto de núcleos do LA e BA (AMARAL; INSAUSTI, 1992). O LA é geralmente visto como a via de entrada de informações sensoriais, recebendo aferências dos sistemas olfatório, auditório, visual, somatossensorial (incluindo nocicepção) e gustatório (informações olfatórias e gustatórias também são transmitidas para outros núcleos amigdalóides) (AMARAL; INSAUSTI, 1992; LEDOUX; FARB; RUGIERO, 1990; HEIMER; VAN HOESSEN, 2006; MCDONALD, 1998; TURNER; HERKENHAM, 1991). O LA projeta-se para todos os outros núcleos do complexo amigdalóide, para todas as subdivisões dos BLA,

BA e CPA e para o CeA (AGGLETON, 1985; AMARAL; INSAUSTI, 1992; PITKANEN; AMARAL, 1998; PRICE; AMARAL, 1981). O BLA recebe um denso grupo de aferências provindas do LA (AGGLETON, 1985; PITKANEN; AMARAL, 1998). Suas projeções são direcionadas para os MeA, CeA e AAH, com poucas fibras de projeção para os LA, BA e CPA (AGGLETON, 1985; PRICE; AMARAL, 1981). Evidências experimentais sugerem que o BLA pode ser um local crítico para os efeitos ansiolíticos de benzodiazepínicos (PETERSEN; BRAESTRUP; SCHEEL-KRUFER, 1985), sugerindo sua importância na regulação da ansiedade. A lesão do BLA inibe tanto a aquisição do medo condicionado como sua expressão (CAMPEAU; DAVIS, 1995; SANANES; DAVIS, 1992), servindo como centro de integração de informações sensoriais e de memória necessárias para as respostas ao pânico e à ansiedade (CAMPEAU; DAVIS, 1995; LEDOUX, 1990).

Podemos resumir as conexões amigdalóides para o contexto do presente trabalho na Figura 4.

Figura 4. Conexões intra e extra-amigdalóides. Projeções robustas são representadas por linhas mais grossas, projeções fracas são representadas por linhas mais finas. Em geral, o fluxo de informação segue de lateral para medial. SCP: substância cinzenta periaquedutal.

1.3. Taquicininas

A família das taquicininas são peptídeos formados de 10 a 12 aminoácidos que contém uma sequência pentapeptídica Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂ e uma sequência COOH-terminal comum (BERTACCINI, 1976; ERSPAMER, 1986). Assim como outros peptídeos bioativos, as taquicininas são geradas através de clivagem proteolítica a partir de precursores denominados pré-pro-taquicininas (HARRIS, 1989). Existem três taquicininas encontradas no sistema nervoso central (SNC), denominadas neurocininas, que agem como neurotransmissores: substância P (SP), neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB). As neurocininas interagem com três tipos de receptores de neurocininas (NK): NK-1, NK-2 e NK-3, identificados por clonagem molecular e análise de sequência de RNA. A seletividade para cada um desses receptores serviu para identificar uma série de agonistas, muitos deles obtidos por modificações estruturais (conformacionais) da sequência C-terminal da SP (REGOLI et al., 1988). A SP liga-se preferencialmente ao receptor NK-1. A NKA liga-se ao receptor NK-2 e a NKB liga-se ao receptor NK-3 (PENNEFATHER et al., 2004; REGOLI et al., 1988).

1.3.1. Substância P

A SP foi descoberta em extratos cerebrais e intestinais de equinos no ano de 1931 por Von Euler e Gaddum, apresentando efeitos hipotensivos e de contrações intestinais.

O papel da SP no SNC está associado a mecanismos de reforço (para revisão do tema ver HUSTON; HASENOHRL, 1995). O primeiro trabalho a propor um papel da SP na mediação de estados aversivos foi realizado na Universidade de São Paulo- USP –RP, onde se verificou que a SP administrada na SCPd poderia atuar como um estímulo incondicionado aversivo em um teste de aversão condicionada ao lugar (AGUIAR;

BRANDÃO, 1994). Foi observado que a injeção da SP intracerebroventricular ou na SCPd produziu claros efeitos aversivos medidos no LCE (TEIXEIRA et al., 1996; AGUIAR et al., 1996; DUARTE; TESTOLIN; DE LIMA, 2004). Além disso, as pesquisas que buscavam uma seletividade de ação da SP em receptores de neurocininas na produção desses efeitos aversivos resultaram na identificação do fragmento C-terminal como o princípio ativo da molécula da SP. De fato, a injeção na SCPd desse fragmento (SP 6-11) reproduziu os efeitos aversivos da SP no teste do LCE e de aversão ao lugar (DE ARAÚJO et al., 1999, 2001). A ação do fragmento C-terminal parece ser seletiva para os receptores do tipo NK-1 na produção dos efeitos aversivos dado que foram inibidos por antagonistas desse subtipo de receptores. Curiosamente, parece que a ativação de receptores NK-1 produz um padrão característico de respostas defensivas nas categorias complementares do LCE, tais como aumento no número de esticamentos, diminuição de mergulhos da cabeça e menor exploração do final do braço aberto (BLANCHARD, D.; BLANCHARD, C.; RODGERS, 1991; RODGERS; JOHNSON., 1995, ANSELONI; BRANDÃO, 1997). Outra função das taquicinininas é a regulação das respostas inflamatórias e a transmissão da dor por meio de estudos de deleção de genes. A deleção do gene da pré-pró-taquicininina leva à hipoalgesia em resposta à estimulação de nociceptores (CAO et al., 1998; ZIMMER et al., 1998). Efeitos similares na falha da transmissão nociceptiva também são encontradas no camundongo nocaute para genes que codificam os receptores NK-1 (DE FELIPE et al., 1998).

Estudos imuno-histoquímicos para a localização de receptores para SP no SNC mostram uma população densa de corpos celulares marcadas positivamente para a SP no MeA, menor no CeA e praticamente inexistente no BLA (DAMALAMA; SWANN, 1993; MALSBUY; MACKAY, 1989; RIBEIRO-DA-SILVA; HOKFELT, 2000; ROBERTS et al, 1982). Além disso, esses estudos apóiam a hipótese do envolvimento

da SP na mediação de respostas ao estresse, e podem ter relevância para os testes de determinação do uso clínico de antagonistas de receptores de neurocinina como agente ansiolítico ou agente antidepressivo (KRAMER et al., 1998; KRAMER; RUPNIAK, 1999).

1.3.2. Receptores NK-1

A mediação dos efeitos aversivos da SP pelos receptores NK-1 é apoiada pelo fato de que a ativação desses receptores na SCPd modula os aspectos incondicionados relacionados ao medo (MONGEAU et al., 1998; FILE, 1997). Além disso, injeções intraventriculares de agonistas NK-1 são ansiogênicas, e seus antagonistas são ansiolíticos em ratos submetidos ao teste do LCE (TEIXEIRA et al., 1996). A distribuição de receptores NK-1 na amígdala é heterogênea entre diversas espécies (WEIDENHOFER et al., 2006; SHULTS et al., 1984; SAFFROY et al., 1988). Imunorreatividade para os receptores de SP (NK-1, NK-2 e NK-3) é moderada no MeA e no CeA (SAFFROY et al., 1988) e pouco intensa no BLA (LEVITA; MANIA; RAINNIE, 2003; SMITH et al, 1999). Boyce e colaboradores (2001), utilizando SP marcada radiotivamente em cobaias, mostraram que há maior expressão de receptores NK-1 no CeA e no MeA anterodorsal e níveis moderados no BLA (Figura 5). Smith e colaboradores (1999), utilizando anticorpos anti-NK-1 em gerbis, mostraram alta imunorreatividade de receptores NK-1 no MeA, esparsa no BLA e baixos níveis no CeA. Ribeiro-da-Silva e Hokfelt (2000), utilizando anticorpos monoclonais em ratos Wistar, encontraram imunorreatividade intensa para NK-1 na parte caudal e dorsal do MeA, e baixos níveis no BLA e CeA. Em encéfalos humanos *post-mortem*, há alta imunorreatividade para receptores NK-1 no BLA e CeA e baixa no MeA (WEIDENHOFER et al., 2006). Os receptores NK-1 localizados no BLA estão

envolvidos nas respostas a estímulos aversivos em roedores, tais como imobilização física (SMITH et al., 1999), estimulação do hipotálamo medial (GREGG; SIEGEL, 2003) e no sobressalto potencializado pelo medo (ZHAO et al., 2008). No CeA, os receptores NK-1 possuem efeitos reforçadores positivos no teste de preferência ao lugar (KERTES et al., 2009a). Além disso, facilita o aprendizado de esquiva passiva (KERTES et al., 2009b), porém não tem efeitos no teste do sobressalto potencializado pelo medo (ZHAO et al., 2008).

Figura 5. Imagem em cores falsas do encéfalo de cobaia ao nível da amígdala mostrando localização de receptores NK-1 por meio de ligação à SP marcada radiotivamente. A escala de cor indica a densidade da marcação (fmol/mg de tecido). Nota-se marcação expressiva nos núcleos amigdalóides medial e central, e menos expressiva na amígdala basolateral. Modificado de BOYCE et al., 2001.

1.3. Nocicepção como Parte da Reação de Defesa

A dor possui um forte componente emocional e sensorial, estando muitas vezes associada aos distúrbios de ansiedade e depressão (HUYSER; PARKER, 1999; MILLAN, 1999). A relação entre dor e efeitos comportamentais negativos em pacientes com distúrbios de depressão e ansiedade são aparentemente recíprocos, onde o medo e o estresse tipicamente inibem ou diminuem a sensibilidade à dor (HAYTHORNTHWAITE; SIEBER; KERNS, 1991; RHUDY; MEAGHER, 2003). Evidências mostram a amígdala como substrato neural da interação entre nocicepção e emoção (FIELDS, 2000; MEAGHER; ARNAU; RHUDY., 2001).

As informações sensoriais alcançam a amígdala principalmente através do LA, tendo-se o CeA como via de saída dessas informações já processadas pelos outros núcleos amigdalóides, tais como o BLA e o MeA (vide Figura 4). Informações polimodais, altamente processadas, de relevância afetiva e cognitiva alcançam a amígdala via tálamo e áreas corticais superiores (SHI; DAVIS, 1999; LEDOUX, 2000; PRICE, 2003). Através de prolongamentos das vias do sistema espino-hipotalâmico e espino-talâmico, o circuito LA-BLA-CeA recebe informações relacionadas à dor provindas do tálamo (núcleos da linha media e posterior) e córtices insulares (AUGUSTINE, 1996; MILLAN, 1999; SHI; DAVIS, 1999; LEDOUX, 2000; PRICE, 2000). Além disso, estudos mostram aferências nociceptivas diretas provindas da medula espinal e do tronco encefálico por meio de vias diretas da medula espinal ou pela via espino-parabrâquio-amigdalóide, as quais terminam na parte laterocapsular do CeA (GAURIAU; BERNARD, 2002; BURSTEIN; POTREBIC, 1993), sendo denominado de “amígdala nociceptiva” (BOURGEAIS; GAURIAU; BERNARD, 2001; NEUGEBAUER et al, 2004; LEE et al., 2001). O CeA, por sua vez, possui amplas conexões com áreas prosencefálicas, hipotálamo e tronco encefálico para a regulação do comportamento emocional (LEDoux, 2000; BOURGEAIS; GAURIAU, BERNARD, 2001) (Figura 6).

A lesão bilateral da amígdala, incluindo o CeA, diminui as reações emocionais à dor, tais como emissão de vocalizações pós-choque, sem afetar o comportamento normal ou as respostas nociceptivas (CHARPENTIER, 1967; CALVINO; LEVESQUE; BESSON, 1982; BORSZCZ, 1999). Além disso, lesão envolvendo particularmente o CeA abole ou reduz a analgesia condicionada (HELMSTETTER, 1992; HELMSTETTER; BELGOWAN, 1993), e no teste de formalina na pata inibe a segunda fase (tônica), mas não a primeira (fásica) da expressão do comportamento nociceptivo

(HELMSTETTER, 1992; MANNING; MAYER, 1995). A ativação de receptores para glicocorticóides no CeA produz diminuição do limiar nociceptivo no modelo de distensão colorretal de dor, correlacionando-se também a um aumento nos níveis de ansiedade em ratos (GREENWOON-VAN MEERVELD et al., 2001). Hasanein, Mirazi e Javanmardi (2008), mostraram que a aplicação de bicuculina (antagonista GABA_A) e muscimol (agonista GABA_A) no CeA causa analgesia e hiperalgesia, respectivamente, dados corroborados por estudos conduzidos por Shigematsu e colaboradores (2007), os quais relataram a presença de imunorreatividade para a descarboxilase do ácido glutâmico (enzima de síntese do GABA) em terminais axônicos positivos para SP.

Esse conjunto de resultados levou ao conceito de que a amígdala faz parte do sistema de controle descendente da dor, o qual inclui circuitos do tronco encefálico (SCP e bulbo rostro-ventro-medial) e medula espinal (HELMSTETTER, 1992; MILLAN, 1999; FIELDS, 2000; GAURIAU; BERNARD, 2002).

Figura 6. Vias aferentes e eferentes da amígdala na modulação do comportamento associado à dor. A parte látero-capsular do CeA (amígdala nociceptiva) recebe informações específicas da medula espinal e do tronco encefálico por meio da via espino-parabrâquio-amigdalóide. Informações polimodais altamente

processadas, incluindo informações nociceptivas, providas do tálamo e córtex alcançam o LA e o BLA. O CeA integra essas informações e as envia para outras áreas encefálicas envolvidas com diferentes componentes da resposta emocional, tais como tálamo, hipotálamo e tronco encefálico. Modificado de NEUGEBAUER et al., 2004.

1.4. Vocalizações Ultrassônicas (VUS)

Em *As Expressões das Emoções em Homens e Animais* de 1872, Charles Darwin foi o primeiro a relatar sobre a expressão emocional contida nas vocalizações, supondo ser um modo pelo qual os animais comunicam estados emocionais uns aos outros. Desde então as ciências comportamentais tentam explicar mais claramente a origem biológica da comunicação vocal em animais. Com a documentação da presença de chamados de alarme em macacos vervet (*Cercopithecus aethiops*) quando da presença de predadores (STRUHSAKER, 1967), percebeu-se que certos tipos de vocalizações alertam o grupo para a presença de um estímulo (predador). Muitos vertebrados utilizam-se de vocalizações espécie-específicas para comunicar informações úteis, tais como a identidade da espécie, posição social (dominante, submisso), comportamento a ser evocado (aproximação, limpeza, cópula), condições ambientais (presença de predadores ou alimentos) e interação entre mãe e prole (ROBINSON, 1982; BLUMSTEIN; ARMITAGE, 1997; BRUDZYNSKI; HOLLAND, 2005).

O sistema límbico tem sido frequentemente associado como parte importante das bases neurais da vocalização em mamíferos. Jurgens & Ploog (1970) estimularam eletricamente áreas encefálicas de macacos, construindo um mapa geral das vias encefálicas responsáveis pela geração de chamados específicos. Uma dessas vias, iniciadas na SCP caudal (DRESSNANDT; JURGENS, 1992), segue pelo pedúnculo talâmico inferior, faz sinapse com neurônios dos BA e CeA e, via cápsula interna e fascículo uncinado, termina no córtex temporal rostroventral.

Embora a evolução da vocalização e da comunicação auditória em vertebrados possua origens em peixes (BASS; GILLAND; BAKER, 2008), vocalizações

ultrassônicas, como ferramenta do comportamento defensivo, são aparentemente recentes na evolução. Um dos pré-requisitos para o desenvolvimento da comunicação ultrassônica foi o desenvolvimento de uma sensibilidade ao som muito além do espectro de frequências ultrassônicas. Essa sensibilidade deveria ser estimulada por hábitos noturnos, visto que o sistema visual seria ineficaz para evitar predadores noturnos (BRUDZYNSKI, 2010).

John W. Anderson mostrou, em 1954, que ratos adultos emitem várias frequências de vocalizações, incluindo a ultrassônica. Essas vocalizações foram posteriormente catalogadas por Nitschke (1982) de duas formas: audível (aos humanos) variando de 2-4 kHz e com vários componentes harmônicos; e ultrassônico, com frequências que variam de 20-70 kHz. As VUS podem ser classificadas em emocionalmente positivas, envolvidas com atividades de interação social, e negativas, envolvidas com aspectos de medo e estresse (BURGDORFF et al., 2008; PANKSEPP; BURGDORFF, 2000). Do lado positivo, especificamente as VUS de 50 kHz são emitidas em condições de intercurso sexual, encontro agonístico durante confrontos, brincadeiras entre ratos jovens, durante estimulação tátil pelo experimentador e recompensas (BARFIELD; GEYER, 1972; SALES; PYE, 1974, MICZEK et al., 1995; PANKSEPP; BURGDORFF, 2000), indicando um estado prazeroso ao roedor. As VUS especificamente de 22 kHz são emitidas somente em condições experimentais de conflitos potenciais ou distais, e não são emitidas diante de ameaças imediatas ou proximais, sugerindo que tais vocalizações estão associadas ao comportamento defensivo que expressa a ansiedade generalizada ao invés de ser uma resposta associada ao pânico (JELEN; SOLTYSIK; ZAGROSZKA., 2003; BASSI et al., 2009; LITVIN; BLANCHARD, D.; BLANCHARD, R., 2007). Portanto, as VUS de 22 kHz, são importantes no repertório de comportamentos defensivos em ratos (BLANCHARD, D.;

BLANCHARD, C.; RODGERS, 1991; BRUDZYNSKI; CHIU, 1995; TOMAZINI et al., 2006; BASSI et al., 2007a,b; 2009).

As VUS de 22 kHz estão numa faixa de frequência de 18-32 kHz, faixa de banda (*bandwidth*) de 1-6 kHz, nível de pressão sonora entre 65-85 dB e duração entre 300-4000 ms (BORTA; WÖHR; SCHWARTING, 2005; BRUDZYNSKI, 2001; VAN DER POEL; NOACH; MICZEK, 1989; WÖHR; BORTA; SCHWARTING, 2005). Essas frequências possuem geralmente uma forma simples e achatada no espectrograma (*flat frequency*), consistindo de séries repetitivas de pulsos de frequências fixas (*bouts*) durando por volta de 1 segundo cada uma, e em disposições de grupos de 3 a 5 vocalizações (BRUDZYNSKI; HOLLAND, 2005), embora pulsos menores de 30-60 ms de duração possam ocorrer (SEWELL, 1967). Esses tons são pobres em desenvolvimento harmônico, mantendo-se na mesma faixa de frequência durante os pulsos. Sua frequência é constante ao longo da vocalização exceto a “primeira” vocalização (mais curta e inconstante), pois se trata de ajuste vocal (treino) (BRUDZYNSKI; HOLLAND, 2005). Frequências de 50 kHz estão numa faixa de frequência de 32-96 kHz, formando uma curva semelhante a uma senóide em log quando emitida (*frequency modulated*), com duração entre 30-50 ms e uma faixa de banda de 5-7 kHz; são solitárias (isso é, não são emitidas em pulsos) e com amplo período entre as vocalizações (> 1 segundo) (BRUDZYNSKI; PNIAK, 2002; KALTWASSER, 1990; WHITE et al., 1990) (Figura 7).

Estudos subsequentes mostraram que o *playback* de ondas sonoras de 22 kHz aumenta a atividade celular de neurônios na amígdala, hipotálamo, SCP e córtex perirrinal (CPR) (ALLEN; FURTAK; BROWN, 2007; BECKETT et al., 1997). Além disso, o *playback* de USVs de 22 kHz gravadas previamente aumenta a expressão da proteína c-Fos no BLA e no LA, porém não no CeA (SADANANDA; WÖHR;

SCHWARTING, 2008). E a lesão bilateral do CeA bloqueia a produção de 22 kHz e do congelamento somente ao medo condicionado, ressaltando que o efeito visto não foi devido a um déficit motor (CHOI; BROWN, 2003).

Figura 7. Espectrograma demonstrativo dos componentes encontrados durante a vocalização de 22 kHz em roedores pelo *software* Avisoft. O eixo das abcissas indica o tempo, e o eixo das ordenadas a frequência em kHz. **A:** Os traços em preto indicam a captação de VUS numa frequência média de 25 kHz por um período de aproximadamente 9 segundos. **B:** Demonstrativo das respectivas amplitudes (em amarelo) das vocalizações emitidas em A. **C:** 3 pulsos (“bouts”) de vocalizações separados por intervalos de ~1 segundo. **D:** Visão ampliada de uma única vocalização de um “bout” mostrando a duração da vocalização (~1 segundo) e a localização da faixa de banda (bandwidth).

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

2.1. Gerais

Uma vez demonstrado o envolvimento de mecanismos neurocininérgicos da SCPd no comportamento defensivo (BASSI et al., 2007b, 2009), e visto que a SCPd apresenta conexões com a amígdala, o objetivo do presente trabalho é verificar o envolvimento de mecanismos neurocininérgicos NK-1 no BLA e CeA no medo e na ansiedade, através da microinjeções de drogas neurocininérgicas nesses núcleos amigdalóides de ratos posteriormente testados no labirinto em cruz elevado, na produção de antinocicepção e emissão de VUS.

2.2. Específicos

A fim de caracterizar a modulação de comportamentos defensivos por mecanismos mediados por receptores NK-1, analisaremos os efeitos da microinjeção combinada de antagonistas de receptores NK-1 e SP no BLA e CeA.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Um total de 144 (BLA: n = 70, CeA: n = 74) ratos Wistar entre 150 e 180 g (7-8 semanas), provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo – USP/RP foram utilizados. Essa idade foi escolhida pois ratos Wistar tornam-se sexualmente maduros por volta de 6 semanas de idade (ADAMS; BOICE, 1983) e emitem vocalizações ultrassônicas de 22 kHz na presença de perigo iminente (BLANCHARD, D.; BLANCHARD, C.; RODGERS, 1991; BRUDZYNSKI; BARNABI, 1996; TOMAZINI et al., 2006).

Os animais foram alojados no biotério setorial deste laboratório, com controle de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro escuro de 12/12 h, em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha. Os animais foram alocados em grupos de 5 animais por caixa, com livre acesso à água e comida durante todo o experimento. Os experimentos foram conduzidos entre 09:00 AM e 05:00 PM.

3.2 - Cirurgia

Cada animal foi anestesiado intraperitonealmente com tribromoetanol (250 mg/kg, I.P.) e posicionado em um aparelho estereotático (DAVID-KOPF) onde teve sua cabeça fixada pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Após tricotomia, uma injeção subcutânea de lidocaína 2% (0,2 ml) foi aplicada por via intradérmica no topo do escalpo. Após a incisão, o tecido subcutâneo foi removido, bem como o periósteo. Com a superfície craniana exposta e ajustada em posição horizontal, entre bregma e lambda, dois orifícios foram feitos, por meio de uma broca elétrica, para a introdução de

pequenos parafusos de aço inoxidável, que serviram para ancorar a prótese ao crânio do animal. Em seguida, outro orifício foi feito para a implantação de uma cânula, confeccionada a partir de agulhas hipodérmicas (25 × 6 mm) medindo 12 mm de comprimento, através da qual foram administradas as drogas utilizadas no experimento. Essa cânula foi direcionada unilateralmente ao complexo basolateral da amígdala (BLA) ou núcleo central da amígdala (CeA) seguindo as coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (2005), tendo-se a linha interaural como referência (Tabela 2). Em seguida, a cânula foi fixada com cimento de acrílico. Para evitar entupimentos, um fio de aço (mandril) foi introduzido no interior da cânula. Cada animal recebeu, no fim da cirurgia, uma injeção intramuscular de 120.000 U.I. de penicilina G benzatina (Fontoura-Wyeth-Brasil). Após a cirurgia estereotáxica para implantação de uma cânula-guia, os animais permaneceram em gaiolas de acrílico por um período total de sete dias até o início dos experimentos.

ESTRUTURA	COORDENADAS	LOCALIZAÇÃO HISTOLÓGICA
Núcleo Basolateral da Amígdala (BLA)	AP: +6,1 mm ML: - 4,7 mm DV: -8,3 mm
Núcleo Central da Amígdala (CeA)	AP: + 6,1 mm ML: - 4,2 mm DV: - 7,9 mm

Tabela 2. Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de ratos Wistar ao nível do complexo amigdalóide de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2005), indicando os respectivos locais para

microinjeção (área tracejada nomeada). Barra de escala: 1,2 mm. AP: ântero-posterior; ML: médio-lateral; DV: dorso-ventral.

3.3. Drogas e Microinjeção

Foi utilizado a Substância P (Sigma, EUA) que apresenta afinidade para receptores NK1, na dose de 35 pmol/0,2 µl. Essa dose foi escolhida por se mostrar efetiva em estudo prévio (BASSI et al., 2007b; DE ARAÚJO et al., 1999, 2001). Além disso, foi feita a microinjeção de [Sar⁹,Met(O₂)¹¹]-SP (Sar-Met-SP, agonista NK-1; Sigma, EUA) nas doses de 100 e 50 pmol e [D-Arg¹, D-Trp^{7,9}, Leu¹¹]-SP (Spantide, antagonista NK-1; Sigma, EUA) na dose de 100 pmol. Todos os fármacos foram dissolvidos em salina fosfatada (PBS, pH = 7,0) (Figura 8).

Fig 8. Esquema da composição molecular e da sequência de aminoácidos da Substância P, Sar (Sar-Met-SP) e Spantide. Extraído de www.sigma.com.

As injeções locais foram realizadas de acordo com técnica descrita por Azami, Llewelyn e Roberts (1980) e Nobre, Lopes e Brandão (2004) para minimizar dano tecidual. As micropipetas de microinjeção foram feitas a partir de capilares de sílica fundida ($\varnothing$ externo: 150 μ m, $\varnothing$ interno: 75 μ m; Cluzeau Info Lab, França), sendo 3 mm maiores que a cânula guia. Para prevenir quebras de cânulas, o capilar foi fixado num dispositivo feito com agulhas de $0,60 \times 25$ (23 G) e $1,00 \times 25$ (19 G) mm justapostas de forma a permitir a inserção sequencial do capilar em uma após a outra (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) (Figura 9). A micropipeta é conectada a uma seringa Hamilton de 5 μ L através de um tubo de polietileno (PE-10; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), conectada a um aparelho de microinfusão (Harvard Medical Apparatus, EUA). Um volume constante de 0,2 μ L é injetado por um período de 30 segundos. Uma bolha de ar dentro do tubo de polietileno que conecta a seringa à micropipeta de vidro serviu para monitorar as microinjeções (Figura 9). Após o término das injeções, as micropipetas são mantidas dentro do encéfalo por 30 segundos adicionais para maximizar a difusão para longe da ponta da pipeta. Imediatamente após a microinjeção os animais foram submetidos aos testes comportamentais.

Figura 9. Esquema de montagem, acoplamento e utilização de capilares de sílica. **A:** Utiliza-se cola especial para unir o capilar de sílica a uma cânula de 0,3 x 1,3 mm (30G) **B:** Solda-se, com solda comum, uma cânula maior (1,0 x 0,25 mm – 19G) à cânula fixa ao capilar e acoplamento da PE-10. Micropipeta pronta. **C:** Acopla-se a micropipeta pronta à cânula do capacete (0,6 x 0,25 mm - 23G) do animal, já implantado. Notar que a cânula maior ancora na cânula do capacete, não permitindo maiores deslocamentos laterais e dorso-ventrais. **D:** Aproximação das bordas das cânulas do capacete e do capilar e infusão segura de fármaco (setas). (ref.: ilustração do autor).

3.4. Testes utilizados

Os animais foram testados nos 3 diferentes testes comportamentais, exigindo um intervalo de 24 horas entre os testes, sendo sacrificados para análise histológica (vide sessão histologia – 3.5) após o último teste.

3.4.1. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é um teste baseado na aversão de roedores por lugares abertos e altos , como consequência os ratos submetidos ao LCE tendem a permanecer mais tempo nos braços fechados e evitar os braços abertos (HANDLEY; MCBLANE, 1993; RODGERS et al., 1992; CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994). Desse modo, o LCE envolve mecanismos aversivos condicionados, inatos, proximais e distais que são detectados pelos animais, proporcionando estímulos capazes de ativar o sistema de medo que os mantém distantes do perigo representado pelos braços abertos (CRUZ, FREI, GRAEFF., 1994; ANSELONI; BRANDÃO, 1997; RODGERS et al., 1992; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

Uma semana após a cirurgia os animais foram submetidos ao teste do LCE, que consiste de um equipamento elevado a 50 cm do solo, composto por dois braços abertos (50 × 10 cm), dispostos perpendicularmente a dois braços fechados (50 × 10 × 40 cm), formando um ângulo de 90°. Nos braços abertos são colocadas lâminas acrílicas, fazendo uma borda de 1 cm de altura, com o objetivo de evitar a queda dos animais (Figura 10). Os animais foram colocados no centro do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços fechados no início de cada sessão com duração de 5 min. Após o término de cada sessão o LCE foi limpo com papel de limpeza umedecido em álcool 70%. Uma câmara de vídeo acoplada a um circuito de TV registrou o comportamento dos animais durante o experimento e as análises comportamentais foram feitas manualmente com auxílio do programa OBS 1.1 (FFCLRP, Ribeirão Preto, Brazil).

Figura 10. Foto do labirinto em cruz elevado utilizado no presente estudo. Fonte: www.inec-usp.org

Certas categorias comportamentais analisadas no LCE refletem ansiedade, atividade locomotora ou outros fatores além dos parâmetros tradicionais de exploração. O desempenho do animal no labirinto foi medido através dos parâmetros:

- Número de entradas nos braços abertos: número de vezes que o animal atravessava, com as quatro patas, para o interior desses braços;
- Número de entradas nos braços fechados: número de vezes que o animal atravessava, com as quatro patas, para o interior desses braços;
- Porcentagem de entradas nos braços abertos: obtida através da razão entre o número de entradas nos braços abertos e do total de entradas no labirinto:

$$\% \text{ Entradas} = \frac{100 \times \text{Número de Entradas nos Braços Abertos}}{\text{Número Total de Entradas}}$$

- Porcentagem de tempo gasto nos braços abertos: obtida através da razão entre o tempo despendido nos braços abertos do labirinto pelo tempo total do teste (5 minutos)

$$\text{Tempo} = \frac{100 \times \text{Tempo nos Braços Abertos}}{\text{Tempo Total do Teste}}$$

Ao lado disso, foram também registradas 9 categorias comportamentais complementares de ratos no LCE (ANSELONI et al., 1995; BLANCHARD, D.; BLANCHARD, C.; RODGERS, 1991; ANSELONI; BRANDÃO, 1997; DE ARAÚJO et al., 1999):

- Autolimpeza (*grooming*): sequência de autolimpeza corporal começando pelo focinho, indo às orelhas e terminando pela limpeza do corpo inteiro;
- Esquadrinhamento (*scanning*): projeções da cabeça sobre as bordas de um braço (aberto ou fechado), esquadrinhando em qualquer direção;
- Mergulho de cabeça (*head-dipping*): movimento exploratório de cabeça e ombros nas laterais do braço aberto do labirinto em direção ao precipício;
- Esticamento (*stretched attend posture*): postura exploratória em que o animal estica-se e se contrai à posição inicial, sem se locomover para frente;
- Rastejamento (*flat back approach*): locomoção exploratória em que o animal estica-se totalmente e, cuidadosamente, move-se para frente;
- Levantamento (*rearing*): postura bípede do animal, apoiando-se com as patas posteriores no assoalho do labirinto, estando completamente ereto ou semi-arqueado;
- Exploração do final do braço aberto (EFBA) (*end-arm exploration*): o animal alcança a extremidade do braço aberto e mergulha com a cabeça;
- Espreitamento (*peeping out*): projeções da cabeça e ombros a partir do braço fechado para o centro, mantendo as quatro patas no braço fechado;

- Imobilidade (*immobility*): ausência de qualquer movimentação por um período de 6 segundos.

3.4.2. Latência de Retirada de Cauda (LRC)

O teste da retirada da cauda (teste do *tail-flick*) é baseado no método de D'Amour e Smith (1941) e modificado por Azami et al (1982). O terço distal da face ventral da cauda do rato é mantido em contato com uma espiral de níquel-cromo que se aquece por uma passagem de corrente elétrica. O aquecimento se dá a partir da temperatura ambiente até se atingir uma temperatura máxima tolerável pelo animal que então remove a cauda por meio de arco reflexo, ou até 6 segundos após o início do aquecimento, havendo desligamento da corrente elétrica na espiral para evitar lesões teciduais. A potência de aquecimento do equipamento foi ajustada somente no teste de linha de base para que o reflexo de retirada da cauda do animal ocorresse entre 2,5 e 3,5 segundos. O teste de linha de base consiste na determinação da média de três medidas individuais separadas por um intervalo de 5 minutos antes da injeção da droga ou salina nos núcleos amigdalóides. Toda latência de retirada de cauda (LRC) foi normalizada em um índice de analgesia (IA), usando-se para isso a fórmula (ROBERT; REES, 1986; PRADO, 1989; BRANDÃO et al., 1991):

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

A $LRC_{controle}$ foi considerada como a média das latências de retirada de cauda nos períodos -15, -10 e -5. A LRC_{teste} foi representada pelas latências de retirada de cauda registradas a partir da microinjeção (tempo zero) em intervalos de 5 minutos até um período total de 30 minutos.

3.4.3. Emissão de Vocalizações Ultrassônicas (VUS)

O aparato utilizado para gravar e analisar as VUS consiste de uma caixa de testes ($25 \times 25 \times 40$ cm) feita de acrílico. Tal caixa experimental situa-se dentro de outra caixa ($40 \times 45 \times 60$ cm), ventilada, maior, acolchoada e com atenuação de sons com uma lâmpada vermelha de 28W localizada no teto da caixa. Uma câmera de vídeo ligada à uma televisão foi utilizada para monitorar o comportamento do animal durante um período de 15 minutos. Para a gravação e análise das VUS, um microfone ultrassônico Electret (Emkay FG-3629, Avisoft Bioacoustics, Berlim, Alemanha) foi posicionado no teto da caixa experimental. Esse microfone é sensível a frequências de 1 a 100 kHz, cuja atenuação do som (em decibéis - dB) para as frequências próximas a 20 kHz ocorre somente por volta de -6 dB de gravação. No presente trabalho utilizamos -40 dB para detecção automática. O microfone foi conectado por meio de um dispositivo de áudio Avisoft Ultra Sound Gate 116 USB (Avisoft Bioacoustics) em um computador onde os dados acústicos analógicos foram convertidos para dados acústicos digitais, ocorrendo, então, a visualização em tempo real através do Avisoft Recorder (versão 2.7; Avisoft Bioacoustics), gravados numa frequência de até 214,285 Hz em formato de 16 bits (Figura 11). Para a análise acústica, as gravações foram transferidas para o SASLab Pro (versão 4,38; Avisoft Bioacoustics), e uma transformação rápida de Fourier (FFT) foi efetuada (512 *FFT-length*, 100% *frame*, *Hamming window* (janela de Hamming – resposta quadrada), 75% de sobreposição de janelas). Os espectrogramas foram produzidos numa frequência de resolução de 488 Hz, numa resolução de 0,512 ms. A detecção das vocalizações foi fornecida por um algoritmo baseado em limiares automáticos (limiar: -45dB), corrigidos manualmente no espectrograma, com um mecanismo de espera entre uma vocalização e outra (*hold time*) de 40 ms para evitar sobreposição entre as vocalizações. Uma frequência passa-baixo de 1 kHz foi utilizada

para a análise dos parâmetros. O número de chamadas emitidas em cada frequência serviu como unidade estatística para cada sujeito experimental. As vocalizações gravadas em frequências abaixo de 20 kHz foram operacionalmente definidas nesse estudo como vocalizações “audíveis”, embora o termo se refira às capacidades humanas (adaptado de BASSI et al., 2009). As VUS obtidas desse experimento foram armazenadas num disco rígido, sendo subsequentemente transferidas para tabelas do Microsoft Excel (Redmont, WA, USA) para análises posteriores.

Fig 11. A: Foto do modelo de microfone ultrassônico Electrec (Emkay FG-3629) utilizado para gravação das VUS. **B:** Foto de modelo do dispositivo de áudio Avisoft Ultra Sound Gate 116 (em que é acoplado o microfone) que se conecta com o computador. (www.avisoftbioacoustics.com).

Os animais foram colocados na caixa de testes, sem qualquer experiência prévia com a mesma, e suas vocalizações foram gravadas por um período de 15 minutos. Para o presente estudo foi feita uma somatoria da quantidade total das vocalizações emitidas entre 18 e 26 kHz.

3.5. Histologia

Após a realização dos experimentos, os animais foram mortos com uma dose alta de anestésico (1,5 mL de solução de hidrato de cloral 10%) por via intraperitoneal, e

perfundidos intracardiacamente com solução salina (0,9%), seguido de formalina a 4%. Os animais então foram decapitados e seus encéfalos removidos e mantidos em formalina 4% por 5 horas, depois mantidos em sacarose 40% por 24 horas para serem cortados para análise histológica.

Os cortes foram feitos em secções coronais de 60 µm de espessura com o auxílio de um criostato (Reichert-Jung, Alemanha), seguidos de preparação em lâminas de microscopia e coloração pelo método de Nissl. Os cortes foram analisados através de um microscópio óptico para a localização dos sítios de microinjeção em diagramas correspondentes do atlas estereotático de Paxinos e Watson (2005).

3.6. Análise Estatística

Labirinto em Cruz Elevado: os dados obtidos são mostrados como médias + EPM e analisados utilizando-se a ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Teste de Retirada da Cauda: os dados obtidos são mostrados como médias $\pm$ EPM e analisados utilizando-se a ANOVA de duas vias para medidas repetidas. O fator tratamento refere-se a cada um dos grupos de tratamento (Salina, SP, Sar-Met 50, Sar-Met 100 e Spantide) nos períodos de testes (fator tempo). O teste *post hoc* de Bonferroni foi utilizando se valores de F foram significativos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

Vocalização Ultrassônica: Os dados são apresentados como médias + EPM e analisados utilizando-se a ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Núcleo Basoteral (BLA)

Foram utilizados animais cujas análises histológicas indicaram que as microinjeções estavam localizadas dentro do BLA (Figura 12).

Fig. 12. A: Esquemas de seções coronais do complexo amigdalóide mostrando os sítios de microinjeção no BLA. B: Fotomicrografia de secção coronal mostrando o local de microinjeção (seta) no núcleo basolateral da amígdala. Coordenadas esquemáticas inter-aurais (IA) retiradas do Atlas de Paxinos e Watson, 2005. Barra de escala representa 1,2 mm

4.1.1. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS ISOLADAMENTE

A primeira parte do estudo consistiu em analisar a participação de receptores NK-1 da BLA na modulação de comportamentos aversivos, analgesia e emissão de VUS.

4.1.1.1. Labirinto em Cruz Elevado

O teste ANOVA de uma via revelou efeitos não significativos da injeção intra-BLA sobre a exploração dos braços abertos ($F_{4,42} = 0,7$; $p = 0,96$), na exploração dos braços fechados ($F_{4,42} = 1,19$; $p = 0,83$) e no tempo gasto nos braços abertos ($F_{4,42} = 0,71$; $p = 0,78$) nesse modelo de ansiedade (Figura 13).

Figura 13. Efeitos da microinjeção no BLA da Substância P (SP), Sar-Met (Sar) 50 ou 100 pmol ou Spantide no número de entradas nos braços abertos e fechados e no tempo despendido nos braços abertos no LCE. Salina: n = 7; SP, Sar 50, Sar 100 e Spantide: n = 10 em cada grupo.

Para as medidas comportamentais complementares (Figura 14), a ANOVA de uma via mostrou que houve efeito significativo somente para levantamentos ($F_{4,42} = 4,64$; $p = 0,003$). Não houve efeito estatisticamente significativo para a frequência de esticamentos ($F_{4,42} = 0,27$; $p = 0,89$), mergulhos de cabeça ($F_{4,42} = 1,07$, $p = 0,43$), EFBA ($F_{4,42} = 0,38$, $p = 0,86$), rastejamento ($F_{4,42} = 1,33$; $p = 0,27$), esquadrinhar ($F_{4,42} = 1,39$; $p = 0,25$), auto-limpeza ($F_{4,42} = 2,25$; $p = 0,08$) e imobilidade ($F_{4,42} = 1,24$; $p = 0,30$). O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou diminuição na frequência de levantamentos para os grupos tratados com Sar 50, Sar 100 e Spantide em relação ao grupo controle.

Fig. 14. Efeito da microinjeção no BLA da Substância P (SP), Sar-Met (Sar) 50 ou 100 pmol ou Spantide nas categorias comportamentais complementares avaliados no LCE. Os dados são mostrados em médio + EPM. EFBA: exploração de final de braço aberto. Salina: n = 7; SP, Sar 50, Sar 100 e Spantide: n = 10 em cada grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.1.1.2. Latência de Retirada de Cauda

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não revelou efeitos significativos da injeção intra-BLA de drogas nos grupos durante as três linhas de base. Não houve efeitos significativos dos tratamentos ($F_{4,42} = 0,69$; $p = 0,69$), tempo ($F_{9,378} = 0,79$; $p = 0,44$) ou da interação entre o tratamento e o tempo ($F_{36,378} = 1,26$; $p = 0,17$) (Figura 15).

Fig. 15. Latências de retirada de cauda a cada 5 minutos iniciando-se na linha de base (-15, -10, -5 e 0 minutos) até 30 minutos após a microinjeção de salina, substância P (SP), Sar-Met (Sar) 50 ou 100 pmol ou Spantide no BLA (seta). Os dados são mostrados como médias ($\pm$ EPM). Salina: $n = 7$; SP, Sar 50, Sar 100 e Spantide: $n = 10$ em cada grupo.

4.1.1.3. Emissão de Vocalizações Ultrassônicas

A ANOVA de uma via não mostrou efeitos significativos da injeção intra-BLA de drogas na emissão de VUS ($F_{4,42} = 0,11$; $p = 0,97$). (Figura 16)

Fig. 16. Efeitos da microinjeção de salina, substância P (SP), Sar-Met (Sar) 50 ou 100 pmol ou spantide no núcleo basolateral da amígdala na somatória das vocalizações emitidas nas frequências entre 18 a 26 kHz de animais submetidos a 15 minutos de novidade. Os dados são mostrados como médias ($\pm$ EPM). Salina: $n = 7$; SP, Sar 50, Sar 100 e Spantide: $n = 10$ em cada grupo.

4.1.2. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS CONJUNTAMENTE

Diante dos resultados negativos das microinjeções isoladas no BLA que atuam em receptores NK-1, avaliamos os efeitos da injeção combinada intra-BLA de drogas que atuam em receptores NK-1.

4.1.2.1. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

No LCE foram avaliados os efeitos da microinjeção de Spantide seguida da microinjeção de SP no BLA (Figuras 17 e 18). O teste ANOVA de uma via revelou efeitos não significativos do tratamento na exploração dos braços abertos ($F_{3,19} = 1,39$; $p = 0,27$), na exploração dos braços fechados ($F_{3,19} = 1,31$; $p = 0,30$) e no tempo gasto nos braços abertos ($F_{3,19} = 0,49$; $p = 0,69$) nesse modelo animal de ansiedade.

Para as medidas comportamentais complementares (Figura 18), a ANOVA de uma via mostrou que não houve efeito significativo do tratamento sobre o número de levantamentos ($F_{3,19} = 1,38$; $p = 0,27$), esticamentos ($F_{3,19} = 0,16$; $p = 0,91$), mergulhos de cabeça ($F_{3,19} = 1,54$; $p = 0,23$), EFBA ($F_{3,19} = 0,59$; $p = 0,62$), rastejamento ($F_{3,19} = 0,32$; $p = 0,80$), esquadrinhar ($F_{3,19} = 1,01$; $p = 0,40$), auto-limpeza ($F_{3,19} = 0,21$; $p = 0,88$) e imobilidade ($F_{3,19} = 0,65$; $p = 0,59$).

4.1.2.3. Latência de Retirada de Cauda

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas revelou efeitos significativos do tratamento somente para o tempo ($F_{9,171} = 2,54$; $p = 0,009$). Porém, o teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que não houve diferenças significativas entre os grupos. Não houve efeitos significativos dos tratamentos ($F_{3,19} = 1,52$; $p = 0,24$) e da interação entre o tratamento versus tempo ($F_{27,171} = 1,04$; $p = 0,41$) (Figura 19).

4.1.2.4. Emissão de Vocalizações Ultrassônicas

A ANOVA de uma via não mostrou efeitos significativos do tratamento na emissão de VUS ($F_{3,19} = 0,02$; $p = 0,99$) (Figura 20)

Fig. 18. Efeitos da microinjeção no BLA de Salina + Salina (S + S), Spantide + Salina (Span + S), Salina + Substância P (S + SP) ou Spantide + Substância P (Span + SP) nos parâmetros comportamentais complementares avaliados no LCE. Os dados são mostrados como média + EPM. EFBA: exploração de final de braço aberto. S + S: n = 5; Span + S: n = 5; S + SP: n = 7; Span + SP: n = 6

Fig. 19. Período de tempo das latências de retirada de cauda a cada 5 minutos iniciando-se na linha de base (-15, -10, -5 e 0 minutos) até 30 minutos após a microinjeção de Salina + Salina (S + S: n = 5), Spantide + Salina (Span + S: n = 5), Salina + Substância P (S + SP: n = 7) ou Spantide + SP (Span + SP: n = 6) no BLA (seta). Os dados são mostrados como médias ($\pm$ EPM).

Fig. 20. Efeitos da microinjeção de Salina + Salina (S + S: n = 5), Spantide + Salina (Span + S: n = 5), Salina + Substância P (S + SP: n = 7) ou Spantide + SP (Span + SP: n = 6) no BLA na somatória das vocalizações emitidas nas frequências entre 18 a 26 kHz de animais submetidos a 15 minutos de novidade. Os dados são mostrados como médias ($\pm$ EPM).

4.2. Núcleo Central (CEA)

Foram utilizados somente animais cujas análises histológicas indicavam que as microinjeções estavam localizadas dentro do CeA (Figura 21).

4.2.1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS ISOLADAMENTE

A primeira parte do estudo consistiu em analisar a participação de receptores NK-1 da CeA na modulação de comportamentos defensivos, analgesia e emissão de VUS.

4.2.1.1. Labirinto em Cruz Elevado

A ANOVA de uma via mostrou que houve efeitos significativos da microinjeção intra-CeA sobre a exploração dos braços abertos ($F_{4,44} = 9,76$; $p < 0,0001$) e a porcentagem do tempo gasto nos braços abertos ($F_{4,44} = 4,73$; $p = 0,003$), porém não houve efeitos significativos para a exploração dos braços fechados ($F_{4,44} = 1,18$; $p = 0,33$) (Figura 21). O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou diminuição no tempo dispendido e na exploração dos braços abertos para os grupos SP, Sar 50 e Sar 100 (Figura 22).

Fig. 22. Efeitos da microinjeção no CEA da Substância P (SP), Sar-Met (Sar) 50 ou 100 pmol/0,2 μ L ou Spantide no número de entradas nos braços abertos e fechados e no tempo dispendido nos braços abertos no LCE. Salina: n = 9; SP: n = 14; Sar 50: n = 7; Sar 100: n = 8; Spantide: n = 11. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Para as medidas comportamentais complementares (Figura 23), a ANOVA de uma via mostrou que houve efeito significativo para o número de mergulhos de cabeça ($F_{4,44} = 6,22$; $p = 0,0005$), EFBA ($F_{4,44} = 9,12$; $p < 0,0001$), levantamentos ($F_{4,44} = 3,07$; $p = 0,02$), rastejamentos ($F_{4,44} = 5,40$; $p = 0,0002$) e esticamentos ($F_{4,44} = 4,27$; $p = 0,005$). O teste *post hoc* de Boferroni mostrou diminuição na frequência de levantamentos para os grupos Sar 50, Sar 100 e Spantide; mergulhos de cabeça para os grupos SP, Sar 50 e Sar 100; e somente para o grupo tratado com SP para a EFBA. Houve aumento no parâmetro de esticamentos somente para o grupo tratado com SP, quando comparados com o grupo controle. O teste *post hoc* mostrou que não houve diferenças entre os grupos tratados e o grupo controle. A ANOVA de uma via não mostrou efeitos significativos para o número de esquadrinhamentos ($F_{4,44} = 1,15$; $p = 0,34$), auto-limpezas ($F_{4,44} = 1,29$; $p = 0,28$) e imobilidades ($F_{4,44} = 1,24$; $p = 0,30$).

Fig 23. Efeitos da microinjeção no CeA de Salina, Substância P (SP), Sar-Met (Sar) 50 ou 100 pmol ou Spantide nas categorias comportamentais complementares avaliados no LCE. EFBA: exploração de final de braço aberto. Salina: n = 9; SP: n = 14; Sar 50: n = 7; Sar 100: n = 8; Spantide: n = 11. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

4.2.1.2. Latência de Retirada de Cauda

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou que houve efeitos significativos das microinjeções intra-CeA somente para o grupo tratamento ($F_{4,44} =$

1,06; $p = 0,02$), não mostrando efeitos significativos para o tempo ($F_{9,396} = 1,21$; $p = 0,28$) ou da interação entre o tratamento e o tempo ($F_{36,396} = 0,77$; $p = 0,82$). Porém o teste *post hoc* de Bonferroni não revelou efeitos significativos para qualquer tratamento quando comparado com o grupo controle (Figura 24).

Fig. 24. Latências de retirada de cauda a cada 5 minutos iniciando-se na linha de base (-15, -10, -5 e 0 minutos) até 30 minutos após a injeção de salina, substância P (SP), Sar-Met (Sar) 50 ou 100 pmol (seta) no núcleo central da amígdala. Os dados são mostrados como médias ($\pm$ SEM). Salina: $n = 9$; SP: $n = 14$; Sar 50: $n = 7$; Sar 100: $n = 8$; Spantide: $n = 11$.

4.2.1.3. Emissão de Vocalizações Ultrassônicas

A ANOVA de uma via não mostrou efeitos significativos da injeção intra-BLA de drogas na emissão de VUS ($F_{4,44} = 0,02$; $p = 0,99$) (Figura 25).

Fig. 25. Efeitos da microinjeção de salina, substância P (SP), Sar-Met (Sar) 50 ou 100 pmol ou spantide no CeA na somatória das vocalizações emitidas nas frequências entre 18 a 26 kHz de animais submetidos a 15 minutos de novidade. Os dados são mostrados como médias ($\pm$ EPM) comparados com o grupo controle (salina). Salina: $n = 9$; SP, Sar 50, Sar 100 e Spantide: $n = 10$ em cada grupo.

4.2.2. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS CONJUNTAMENTE

Diante dos resultados obtidos através das microinjeções isoladas no CeA das drogas que atuam em receptores NK-1, avaliamos os efeitos da injeção combinada intra-CeA de drogas que atuam em receptores NK-1.

4.2.1. Labirinto em Cruz Elevado

No LCE foram avaliados os efeitos da microinjeção de Spantide seguida da microinjeção de SP no CeA (Figuras 26 e 27). O teste ANOVA de uma via revelou efeitos significativos do tratamento na exploração dos braços abertos ($F_{3,21} = 6,77$; $p = 0,002$) e na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos ($F_{3,21} = 9,53$; $p = 0,0003$). Não houve efeitos significativos na exploração dos braços fechados ($F_{3,21} = 0,23$; $p = 0,87$) nesse modelo animal de ansiedade. O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que houve redução na frequência de entradas e no tempo dispendido nos braços abertos do LCE após a microinjeção de Salina + Substância P (Figura 26).

Para as medidas comportamentais complementares (Figura 27), a ANOVA de uma via mostrou que houve efeito significativo do tratamento sobre o número de esticamentos ($F_{3,21} = 4,87$; $p = 0,009$), mergulhos de cabeça ($F_{3,21} = 5,68$; $p = 0,004$), EFBA ($F_{3,21} = 20,56$; $p < 0,0001$), rastejamento ($F_{3,21} = 11,13$; $p = 0,0001$). O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que houve redução na frequência de mergulhos de cabeça e EFBA somente para o grupo Salina + Substância P (Sal + SP), ocorrendo o inverso para o número de rastejamentos e de esticamentos para o mesmo grupo. A ANOVA mostrou que não houve efeito significativo para o número de levantamentos ($F_{3,21} = 0,85$; $p = 0,47$), esquadrinhar ($F_{3,21} = 0,10$; $p = 0,95$), autolimpeza ($F_{3,21} = 0,17$; $p = 0,91$) e imobilidade ($F_{3,21} = 0,20$; $p = 0,89$).

Figura 26. Efeitos da microinjeção no CeA de Salina + Salina (S + S), Spantide + Salina (Span + S), Salina + Substância P (S + SP) ou Spantide + Substância P (Span + SP) nos parâmetros comportamentais clássicos avaliados no LCE. S + S e Span + S: n = 7 em cada grupo; S + SP: n = 6; Span + SP: n = 5. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.2. Latência de Retirada de Cauda

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou que não houve efeitos significativos do tratamento ($F_{3,21} = 2,35$; $p = 0,10$), tempo ($F_{9,189} = 0,69$; $p = 0,70$) e interação entre tratamento e tempo ($F_{27,189} = 0,97$; $p = 0,50$) (figura 28).

4.2.3. Emissão de Vocalizações Ultrassônicas

A ANOVA de uma via não mostrou efeitos significativos do tratamento na emissão de VUS ($F_{3,21} = 0,01$; $p = 0,99$) (Figura 29).

Fig. 27. Média (+EPM) dos efeitos da microinjeção no CeA de Salina + Salina (S + S), Spantide + Salina (Span + S), Salina + Substância P (S + SP) ou Spantide + Substância P (Span + SP) nos parâmetros comportamentais complementares avaliados no LCE. S + S e Span + S: n = 7 em cada grupo; S + SP: n = 6; Span + SP: n = 5. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figura 28. Latências de retirada de cauda a cada 5 minutos iniciando-se na linha de base (-15, -10, -5 e 0 minutos) até 30 minutos após a microinjeção de Salina + Salina (S + S: n = 7), Spantide + Salina (Span + S: n = 7), Salina + Substância P (S + SP: n = 6) ou Spantide + SP (Span + SP: n = 5) no CeA (seta).

Fig. 29. Efeitos da microinjeção de Salina + Salina (S + S: n = 7), Spantide + Salina (Span + S: n = 7), Salina + Substância P (S + SP: n = 6) ou Spantide + SP (Span + SP: n = 5) no CeA na somatória das vocalizações emitidas nas frequências entre 18 a 26 kHz durante 15 minutos de testes à novidade. Os dados são mostrados como médias (+EPM).

DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

A SP participa da mediação de estados aversivos em certas regiões do sistema encefálico aversivo, tais como a amígdala e hipotálamo medial (ZHAO et al., 2009) e SCPd (GREGG; SIEGEL, 2006; BASSI et al., 2007ab). Apesar de mediar estados aversivos no SNC, a microinjeção de SP ou de agonista de receptores NK-1 no BLA, no presente estudo, não apresentou efeitos significativos no LCE, produção de analgesia ou emissão de VUS. Isso poderia ser explicado por: 1) a baixa marcação para receptores NK-1 no BLA (DAMALAMA; SWANN, 1993; MALSBUY; MCKAY, 1989; RIBEIRO-DA-SILVA; ROKFELT, 2000; ROBERTS et al., 1982; SMITH et al., 1999; LEVITA; MANIA; RAINNIE, 2003); 2) a ativação de receptores NK-1 teria efeitos significativos somente durante a mediação do medo condicionado (ZHAO et al., 2009), não apresentando efeitos significativos quando os animais são submetidos a testes de medo inato; e 3) estudos mostram que interneurônios GABAérgicos do BLA expressam o receptor NK-1 (MAUBACH et al., 2001; ROGERS et al., 2000), e sua ativação levaria a uma consequente diminuição da excitabilidade dos neurônios de projeção para fora do BLA (para o CeA e o MeA, vide Figura 4). Além disso, Truitt e colaboradores (2007) mostraram que a destruição desses interneurônios produz comportamento ansiogênico em ratos.

Apesar de estudos mostrarem a presença de células positivas para receptores NK-3 (SMITH; FLYNN, 2000) e NK-2 (NAGANO, OISHI; SUZUKI, 2011) no BLA, curiosamente a administração de Spantide ou de Spantide + SP no BLA não produziu efeitos ansiogênicos no LCE ou alteração no limiar nociceptivo nos animais estudados. Pode-se supor, então, que além da SP não modular a expressão de comportamentos defensivos inatos ou analgesia quando microinjetada no BLA, a própria ausência de efeitos comportamentais pela inibição dos receptores NK-1 indica que esses receptores:

1) apesar de envolvidos na modulação GABAérgica dentro do BLA (TRUITT et al., 2007), os receptores NK-1 não participam da expressão de comportamentos de medo inato; 2) Simmons (2006) mostrou que agonistas do receptor NK-1 podem causar a dessensibilização ou a ativação desse receptor dependendo de sua concentração ao nível do receptor. A SP em baixas concentrações causa dessensibilização junto ao receptor, enquanto altas concentrações desse neuropeptídeo ativa o receptor por mecanismos dependentes de Ca^{2+} (SIMMONS, 2006).

Ebner & Singewald (2004) mostraram que não houve aumento na liberação de SP no CeA após estresse de imobilização, apesar de estudos mostrarem alta expressão de receptores NK-1 e de corpos celulares positivos para SP no CeA (BOYCE et al., 2001; DAMALAMA; SWANN, 1993). A microinjeção de SP no CeA causou efeitos do tipo ansiogênicos submetidos ao LCE. Além disso, a microinjeção do antagonista NK-1 Spantide sozinha não produziu efeitos ansiogênicos no LCE, indicando que a SP não é liberada de forma tônica, isso é, sua liberação e acoplamento aos receptores NK-1 ocorre somente na ocorrência de eventos aversivos (logo, sua mediação é fásica), como visto durante o estresse de contenção no BLA e no MeA (SMITH et al., 1999; EBNER; RUPNIAK; SARIA, 2004). A SP, então, mimetizaria os efeitos de estímulos aversivos, produzindo comportamentos defensivos. Brandão e colaboradores (1999) mostraram efeitos similares para o sistema serotoninérgico (5-HT) do teto mesencefálico. A aplicação de agonistas 5-HT inibe a expressão de comportamentos defensivos por meio da estimulação dessa estrutura, porém a microinjeção isolada de antagonistas 5-HT seguida de estimulação do teto não altera a expressão do comportamento defensivo.

Corroborando esses dados, o presente estudo mostrou que os efeitos aversivos produzidos pela microinjeção de SP no CeA são mediados pela ativação de receptores NK-1, visto que a microinjeção de Spantide seguida de SP reduziu a expressão de

comportamentos defensivos. Além disso, o presente estudo complementa o estudo de Boyce e colaboradores (2001), que mostrou alta densidade de receptores NK-1 no CeA.

Apesar do CeA receber aferências nociceptivas provindas diretamente do núcleo parabraquial (via espino-parabrâquio-amigdalóide) (GAURIAU; BERNARD, 2002), assim como projeções provindas diretamente da medula espinal (BURSTEIN; POTREBIC, 1993), e a manipulação do sistema GABAérgico dentro do CeA alterar os limiares nociceptivos (HASANEIN; MIRAZI, JAVANMARDI, 2008), não houve alteração no índice de analgesia seja com a microinjeção de Sar-Met-SP, Spantide ou Spantide + SP no teste de retirada da cauda. Apesar de Shigematsu e colaboradores (2007) tenham mostrado imunorreatividade para a descarboxilase do ácido glutâmico (enzima de síntese do GABA) em terminais axônicos positivos para SP no CeA, aparentemente a SP e os receptores NK-1 não estão envolvidos na modulação da nocicepção na amígdala. Provavelmente os receptores NK-1 estão envolvidos somente na modulação de estados defensivos. O CeA é um núcleo de grande importância para a expressão de respostas de medo, haja visto se projetar para áreas envolvidas no processamento de emoções, como hipotálamo e tronco encefálico (HIRCHOCK; DAVIS, 1987; LEDOUX, 2000).

A estimulação elétrica da amígdala elicia vocalizações que são acompanhadas de reações emocionais (JURGENS et al., 1967; JURGENS, 1982), e a inativação bilateral do CeA diminui as reações emocionais causadas pela dor, tais como vocalizações não condicionadas e vocalizações pós-choque (CHARPENTIER, 1967; BORSZCZ, 1999, 2006; CHOI; BROWN, 2003). Porém não encontramos nenhum tipo de vocalização (audível ou ultrassônica) após a microinjeção de SP no CeA e no BLA, mesmo na eliciação de comportamentos defensivos no CeA. Isso pode ser devido a 1) a produção de vocalizações no complexo amigdalóide de ratos surgir somente após o páreamento

de estímulos neutros (luz ou som) e choque, visto que a inativação bilateral do CeA ou do BLA diminuir a emissão de vocalizações a estímulos condicionados propriamente páreados ao choque (BORSZCZ, 1999, 2006; LEE et al., 2001); 2) a produção de VUS a partir da manipulação farmacológica nesses núcleos seria devida à ativação de outros tipos de mediadores diferentes dos neurocinérgicos. Brudynzki & Barnabi (1996) relataram a produção de VUS através da manipulação de vias colinérgicas ascendentes provindas de núcleos colinérgicos mesencefálicos, e tanto o BLA como CeA contém projeções colinérgicas originadas do prosencéfalo basal (neurônios Ch4) e neurônios e plexos de neurônios positivos para a acetilcolina (NITECKA; FROTSCHER, 1989; AMARAL; BASSETT, 1989; USUNOFF et al., 2007; HECKERS; MESULAM, 1994; WOOLF; ECKENSTEIN; BUTCHER, 1984; BRUDZYNSKI; KADISHEVITZ; FU, 1998); 3) a produção de VUS se daria somente em níveis inferiores do neuro-eixo, isso é, em estruturas localizadas no tronco encefálico, pois a estimulação química da SCPd com agonista NK-1 produz VUS (BASSI et al., 2007a, 2009). As estruturas encefálicas mais recentes, do ponto de vista evolutivo, serviriam como um “sistema de apoio” da emissão (mas não da eliciação) de VUS regulando componentes acústicos tais como intensidade, frequência e organização sequencial de contrações musculares (JURGENS, 1967, 1979); 4) As estimulações de vias descendentes (de saída) associadas com o comportamento defensivo, como a SCPd (BRANDÃO et al., 1999; VIANNA et al., 2001), são sensíveis aos efeitos da SP, produzindo VUS (BASSI et al., 2007b). Por outro lado, a ativação de mecanismos dependentes da SP na amígdala pode se utilizar de vias ascendentes para o córtex pré-frontal e giro do cíngulo, envolvendo processos “de entrada” relacionados às reações de defesa (VUS). Essas vias ascendentes estão relacionadas à manutenção e modulação dos estados de ansiedade, constituindo mecanismo “reverberante” de condicionamento e retroalimentado por estímulos

provindos da amígdala (PETERS; KALIVAS; QUIRK, 2009; PARÉ; QUIRK; LEDOUX, 2004; LEDOUX, 2000). Esse mecanismo de retroalimentação não possui via de “saída”, conseqüentemente não estimula estruturas de “saída” responsáveis pela produção de VUS (Figura 30).

Fig. 30. Modelo hipotético mostrando possíveis mecanismos da modulação e produção de vocalizações ultrassônicas (VUS) com a estimulação da amígdala (A) ou da SCPd (B). **A:** A estimulação da amígdala leva à ativação somente de vias ascendentes (vias de “entrada”) para estruturas prosencefálicas que, por sua vez, controlam e modulam a atividade da amígdala frente ao estímulo aversivo. Essa via reverberante não possui uma via de “saída”, o que não gera a emissão de VUS. **B:** A estimulação da SCPd produz a ativação tanto de vias de “entrada” (ex: para a amígdala), como de vias de “saída”, ocasionando, respectivamente, a produção de comportamentos defensivos e emissão de VUS. A SCPd pode atuar como gatilho para a produção de comportamentos defensivos dependentes de VUS, os quais são mantidos e modulados pela amígdala e pelos mesmos mecanismos reverberantes apresentados em A.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A SP produz efeitos ansiogênicos quando microinjetada no CeA. Porém no BLA a SP não produziu qualquer efeito ansiogênico. Portanto a SP está envolvida na mediação de respostas ao estresse somente no CeA.

Os efeitos ansiogênicos observados após a microinjeção de SP no CeA são produzidos pela ativação de receptores NK-1, visto que a microinjeção de Spantide reduzir os efeitos ansiogênicos produzidos pela SP.

A microinjeção de SP, Sar-Met-SP, Spantide ou Spantide + SP não alterou os índices de analgesia quando microinjetados no CeA. Esse perfil farmacológico foi obtido com microinjeções dessas drogas no BLA. Apesar do CeA possuir conexões diretas com a medula espinal e com o núcleo parabraquial, aparentemente os receptores NK-1 não estão envolvidos na modulação da nocicepção no CeA.

Não foi encontrado qualquer tipo de vocalização com a microinjeção de agonistas ou antagonistas NK-1 nos núcleos amigdalóides estudados no presente trabalho. Aparentemente, as VUS são mediadas por outros mecanismos que não NK-1 ou alternativamente a VUS ocorrem somente durante a ativação de estruturas mais primitivas do neuroeixo (ex: SCPd).

REFERÊNCIAS

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN, P.T., NEWTON, J.E., MCPHERSON, W.B., JONES, J.G., DYKMAN R.A. Prevalence of post traumatic stress disorder and other psychiatric diagnoses in three groups of abused children (sexual, physical, and both). **Child Abuse Negl.**, v. 22, n. 8, p. 759-774, 1998.

ADAMS, N., BOICE, R. A longitudinal study of dominance in an outdoor colony of domestic rats. **J. Comp. Psychol.**, v. 97, p. 24-33, 1983.

AGGLETON, J.P. A description of intra-amygdaloid connections in old world monkeys. **Exp Brain Res.**, v. 57, n.2, p. 390-399, 1985.

AGUIAR, M.S., BRANDÃO, M.L. Conditioned place aversion produced by microinjections of substance P into the periaqueductal gray of rats. **Behav. Pharmacol.**, v. 5, n. 3, p. 369-373, 1994.

AGUIAR, M.S., BRANDÃO, M.L. Effects of microinjections of the neuropeptide Substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of rats in the plus-maze test. **Physiol. Behav.**, v. 60, n. 4, p. 1183-1186, 1996.

ALLEN, T.A., FURTAK, S.C., BROWN, T.H. Single-unit responses to 22-kHz ultrasonic vocalizations on rat perirhinal cortex. **Behav. Brain Res.**, v. 182, n. 2, p. 327-336, 2007.

AMARAL, D.G. The primate amygdala and the neurobiology of social behavior: implications for understanding social anxiety. **Biol. Psychiatry**. V. 51, n. 1, p. 11-7, 2002.

AMARAL, D.G., BASSETT, J.L. Cholinergic innervation of the monkey amygdala: An immunohistochemical analysis with antisera to choline acetyltransferase. **J. Comp. Neurol.** V. 281, n.3, p. 337-361, 1989.

AMARAL, D.G., INSAUSTI, R. Retrograde transport of D-[3H]-aspartate injected into the monkey amygdaloid complex. **Exp. Brain Res.**, v. 88, n. 2, p. 375-88, 1992.

ANDERSON, J.W. The production of ultrasonic sounds by laboratory rats and other mammals. **Science**, v. 119, n. 3101, p. 808-809, 1954.

ANSELONI, V.Z., BRANDÃO, M.L. Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. **Behav. Pharmacol.**, v. 8, n. 6-7, p. 533-540, 1997.

ANSELONI, V.Z., MOTTA, V., LIMA, G., BRANDÃO, M.L. Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze constructed with transparent walls. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, n. 5, p. 597-601, 1995.

AUGUSTIN, J.R. Distinct neurochemical features of acute and persistent pain. **Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.**, v. 96, n. 14, p. 7739-7743, 1999.

AZAMI, J., LEWELYN, M.B., ROBERTS, M.H.T. An extra-fine assembly for intra-erebral microinjection. **Proc. British Physiol. Soc.**, v. 12, n. 3, p. 18-19, 1980.

AZAMI, J., LLEWELYN, M.B., ROBERTS, M.H.T. The contribution of nucleus reticularis paragigantocellularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produced by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. **Pain**, v. 12, n.3, p. 229-46, 1982.

BAHAR, A., SAMUEL, A., HAZVI, S., DUDAI, Y. The amygdalar circuit that acquires taste aversion memory differs from the circuit that extinguishes it. **Eur. J. Neurosci.**, v. 17, n. 7, p. 1527-30, 2003.

BARD, P. A diencephalic mechanism for the expression of rage with special reference to the sympathetic nervous system. **Am. J. Physiol.**, v. 84, p. 490-515, 1928.

BARFIELD, R.J., GEYER, L.A. Sexual behavior: Ultrasonic postejaculatory song of the male rat. **Science**, v. 176, n. 4041, p. 1349-1350, 1972.

BASS, A.H., GILLAND, E.H., BAKER, R. Evolutionary origins for social vocalization in a vertebrate hindbrain-spinal compartment. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 417-421, 2008.

BASSI, G.S., BROIZ, A.C., GOMES, M.Z., BRANDÃO, M.L. Evidence for mediation of nociception by injection of the NK-3 receptor agonist, senktide, into the dorsal periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**, v. 204, n. 1, p. 13-24, 2009.

BASSI, G.S., NOBRE, M.J., CARVALHO, M.C., BRANDÃO, M.L. Substance P injected into the dorsal periaqueductal gray causes anxiogenic effects similar to the long-term isolation as assessed by ultrasound vocalizations measurements. **Behav. Brain Res.**, v. 182, n. 2, p. 301-7, 2007a.

BASSI, G.S., NOBRE, M.J., DE ARAÚJO, J.E., BRANDÃO, M. L. Anxiogenic effects of activation of NK-1 receptors of the dorsal periaqueductal gray as assessed by the elevated plus-maze, ultrasound vocalizations and tail-flick tests. **Neuropeptides**, v. 41, n. 6, p. 365-74, 2007b.

BECKETT, S.R., DUXON, M.S., ASPLEY, S., MARSDEN, C.A. Central c-fos expression following 20 kHz/ultrasound induced defence behavior in the rat. **Brain Res Bull.**, v. 12, n. 6, p. 421-426, 1997.

BERTACCINI, G. Active polypeptides of non-mammalian origin. **Pharmacol. Rev.**, v. 28, p. 127-177, 1976.

BIRBAUMER, N., GRODD, W., DIEDRICH, O., KLOSE, U., ERB, M., LOTZE, M., SCHNEIDER, F., WEISS, U., FLOR, H. fMRI reveals amygdala activation to human faces in social phobics. **Neuroreport**, v. 9, n. 6, p. 1223-6, 1998.

BLANCHARD, D.C., BLANCHARD, R.J., RODGERS, R.J. Risk assessment and animal models of anxiety. In: Olivier, B., Mos, J., Slangen, J.L., eds. **Animal Models in Psychopharmacology**. Birkhauser Bale Ed., p. 117-134, 1991.

BLUMSTEIN, D.T., ARMITAGE, K.B. Alarm calling in yellow-bellied marmots: I. The meaning of situationally variable alarm calls. **Anim Behav.**, v. 53, p. 143-171, 1997.

BORSZCZ, G.S. Contribution of the ventromedial hypothalamus to generation of the affective dimension of pain. **Pain**, v. 123, n. 1-2, p. 155-68, 2006.

BORSZCZ, G.S. Differential contributions of medullary, thalamic, and amygdaloid serotonin to the antinociceptive action of morphine administered into the periaqueductal gray: a model of morphine analgesia. **Behav. Neurosci.**, v. 113, n. 3, p. 612–31, 1999.

BORTA, A., WÖHR, M., SCHWARTING, R.K. Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. **Behav. Brain Res.**, v. 166, n. 2, p. 271-80, 2006.

BOURGEAIS, L., GAURIAU, C., BERNARD, J.F., Projections from the nociceptive área of the central nucleus of the amygdala to the forebrain: a PHA-L study in the rat. **Eur. J. Neurosci.**, v. 14, n. 2, n. 229-255, 2001.

BOYCE, S., SMITH, D., CARLSON, E., HEWSON, L., RIGBY, M., O'DONNELL, R. Intra-amygdala injection of the substance P [NK(1) receptor] antagonist L-760735 inhibits neonatal vocalisations in guinea-pigs. **Neuropharmacol.**, v. 41, n. 1, p. 130–137, 2001.

BRANDÃO, M.L., ANSELONI, V.Z., PANDÓSSIO, J.E., DE ARAÚJO, J.E., CASTILHO, V.M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 23, n. 6, p. 863-875, 1999.

BRANDÃO, M.L., REES, H., WITT, S., ROBERTS, M.H.T. Central antiaversive and antinociceptive affects of the anterior pretectal nucleus stimulation. **Brain Res.**, v. 542, n. 2, p. 266-272, 1991.

BRUDZYNSKI, S.M. Pharmacological and behavioral characteristics of 22 kHz alarm calls in rats. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 25, n. 7-8, p. 611-7, 2001.

BRUDZYNSKI, S.M. Vocalization as an ethotransmitter: introduction to the *Handbook of Mammalian Vocalization*. In: BRUDZYNSKI, S.M. **Handbook of Mammalian Vocalization**. Elsevier Press. Londres, R.U. 1a edição, 2010.

BRUDZYNSKI, S.M., BARNABI, F. Contribution of the ascending cholinergic pathways in the production of ultrasonic vocalization in the rat. **Behav. Brain Res.**, v. 80, n. 1-2, p. 145-52, 1996.

BRUDZYNSKI, S.M., CHIU, E.M. Behavioural responses of laboratory rats to playback of 22 kHz ultrasonic calls. **Physiol. Behav.**, v. 57, n. 6, p. 1039-44, 1995.

BRUDZYNSKI, S.M., HOLLAND, G. Acoustic characteristics of air puff-induced 22-kHz alarm calls in direct recordings. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 29, n. 8, p. 1169-80, 2005.

BRUDZYNSKI, S.M., KADISHEVITZ, L., FU, X.W. Mesolimbic component of the ascending cholinergic pathways: electrophysiological-pharmacological study. **J. Neurophysiol.**, v. 79, n. 4, p. 1675-86, 1998.

BRUDZYNSKI, S.M., PNIAK, A. Social contacts and production of 50-kHz short ultrasonic calls in adult rats. **J. Comp. Psychol.**, v. 116, n. 1, p. 73-82, 2002.

BUCH, P.C.; KLUVER, H. An anatomical investigation of the temporal lobe in the monkey (*Macaca mulatta*). **J. Comp. Neurol.**, v. 103, n. 2, p. 151-251, 1955.

BURDACH, K.F. **Vom Baue und Leben des Gehirns**. Leipzig. 1819-1822

BURGDORF, J., KROES, R.A., MOSKAL, J.R., PFAUS, J.G., BRUDZYNSKI, S.M., PANKSEPP, J. Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. **J. Comp. Psychol.**, v. 122, n. 4, p. 357-67, 2008.

BURSTEIN, R., POTREBIC, S. Retrograde labeling of neurons in the spinal cord that project directly to the amygdala or the orbital cortex in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 335, n. 4, p. 469-85, 1993.

CALVINO, B., LEVESQUE, G., BESSON, J.M. Possible involvement of the amygdaloid complex in morphine analgesia as studied by electrolytic lesions in rats. **Brain Res.**, v. 233, n. 1, p. 221-226, 1982.

CAMPEAU, S., DAVIS, M. Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 3, p. 2301-11, 1995.

CANNON, W. B. The James-Lange theory of emotion: A critical examination and an alternative theory. **Am. J. Psychol.**, vol. 39, p. 10-124, 1927.

CANNON, W.B., BRITTON S.W. Studies on the conditions of activity in endocrine glands; pseudoactive medulliadrenal secretion. **Amer. J. Physiol.**, v. 72, p. 283-294, 1925.

CANTERAS, N.S., SIMERLY, R.B., SWANSON, L.W. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat, **J. Comp. Neurol.**, vol. 360, n. 2, p. 213–245, 1995.

CAO, Y.Q., MANTYH, P.W., CARLSON, E.J., GILLESPIE, A.M., EPSTEIN, C.J., BASBAUM, A.I. I. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. **Nature**, vol. 392, n. 6674, p. 390-394, 1998.

CARDINAL, R.N., PARKINSON, J.A., HALL, J., EVERITT B.J. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, vol. 26, n. 3, p. 321-52, 2002.

CAROBREZ, A.P, BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, vol. 29, n. 8, p. 1193-205, 2005.

CHARPENTIER, J. Modifications de la réaction à la douleur provoquées par diverses lésions cérébrales, et leurs effets sur la sensibilité à la morphine. **Psychopharmacologia**, vol. 11, n. 2, p. 95–121, 1967.

CHOI, J.S., BROWN, T.H. Central amygdala lesion block ultrasonic vocalizations and freezing as conditional but not unconditional responses. **J. Neurosci.**, vol. 23, n. 25, p. 8713-8721, 2003.

COOK, C.J. Glucocorticoid feedback increases the sensitivity of the limbic system to stress. **Physiol. Behav.**, vol. 75, n. 4, p. 455–464, 2002.

COPLAN, J.D., LYDIARD, R.B. Brain circuits in panic disorder. **Biol. Psychiatry.**, vol. 44, n. 12, p. 1264-76, 1998

CRUZ, A.P., FREI, F., GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, vol. 49, n. 1, p. 171-6, 1994.

D'AMOUR, F.E., SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, vol. 72, n. 74-79, 1941.

DAMALAMA, M., SWANN, J. Substance P and neurokinin A are colocalized in the central chemosensory pathway of the male golden hamster. **Neuropeptides**, vol. 24, n. 6, p. 327-334, 1993.

DAVIDOFF, L.L. **Introduction to Psychology**. McgGraw-Hill Ed., p. 426-445, 1983.

DE ARAUJO, J.E., HUSTON, J.P., BRANDÃO, M.L. Opposite effects of substance P fragments C (anxiogenic) and N (anxiolytic) injected into dorsal periaqueductal gray. **Eur. J. Pharmacol.**, vol. 432, n. 1, p. 43-51, 2001.

DE ARAÚJO, J.E., SILVA, R.C.B, HUSTON, J.P., BRANDÃO, M.L. Anxiogenic effects of substance P and its 7-11 C terminal, but not 1-7 N terminal, injected into the dorsal periaqueductal gray matter. **Peptides**, vol. 20, n. 12, p. 1437-1443, 1999.

DE FELIPE, C., HERRERO, J.F., O'BRIEN, J.A., PALMER, J.A., DOYLE, C.A., SMITH, A.J., LAIRD, J.M., BELMONTE, C., CERVERO, F., HUNT, S.P. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. **Nature**, v. 392, n. 6674, p. 394-397, 1998.

DOMSCHKE, K., BRAUN, M., OHRMANN, P., SUSLOW, T., KUGEL, H., BAUER, J., HOHOFF, C., KERSTING, A., ENGELIEN, A., AROLT, V., HEINDEL, W., DECKERT, J. Association of the functional -1019C/G 5-HT1A polymorphism with prefrontal cortex and amygdala activation measured with 3 T fMRI in panic disorder. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, vol. 9, n. 3, p. 349-55, 2006.

DRESSNANDT, J., JURGENS, U. Brain stimulation-induced changes of phonation in the squirrel monkey. **Exp. Brain Res.**, vol. 89, n. 3, p. 549-559, 1992.

DUARTE, F.S., TESTOLIN, R., DE LIMA, T.C. Further evidence on the anxiogenic-like effect of substance P evaluated in the elevated plus-maze in rats. **Behav. Brain Res.**, vol. 154, n. 2, p. 501-510, 2004.

EBNER, K., RUPNIAK, N.M., SARIA, A., SINGEWALD, N. Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats. **Proc. Nation. Acadm Sci. U.S.A.**, vol. 101, n. 12, p. 4280-4285, 2004.

EBNER, K., SINGEWALD, N. The role of substance P in stress and anxiety responses. **Amino Acids.**, vol. 31, n. 3, p. 251-72, 2006.

ERSPAMER, V. The tachykinin peptide family. **Trends Neurosci.**, vol.4, p. 267-269, 1981.

EVERITT, B.J., PARKINSON, J.A., OLMSTEAD, M.C., Arroyo M., Robledo P., Robbins T.W. Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala-ventral striatal subsystems. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, vol. 29, n. 877, p. 412-38, 1999.

FANSELOW, M.S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in responses to fear and anxiety. In **The midbrain periaqueductal grey matter: Functional, anatomical and immunohistochemical organization**, DePaulis A. Eds., Bandler R. (Plenum Publishing Corp. New York), pp 151-173.

FIELDS, H.L. Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain. **Prog. Brain Res.**, vol. 122, p. 254-254, 2000.

FILE, S.E. Anxiolytic action of a neurokinin1 receptor antagonist in the social interaction test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, vol. 58, n. 3, p. 747-52, 1997.

FOULCAULT, M. **A Historia da Loucura na Idade Clássica**. São Paulo, SP. Editora Perspectiva, 1978.

FUCHS, S.A., EDINGER, H.M., SIEGEL, A. The role of the anterior hypothalamus in affective defense behavior elicited from the ventromedial hypothalamus of the cat. **Brain Res.**, vol. 330, n. 1, p. 93-107, 1985

FUCHS, S.A., SIEGEL, A. Neural pathways mediating hypothalamically elicited flight behavior in the cat. **Brain Res.**, vol. 306, n. 1-2, p. 263-81, 1984

GALAVARNA, O., DE LUCA, L.A., SCHULKIN, J., YAO, S.Z., EPSTEIN, A.N. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. **Brain Res. Bull.**, vol. 28, n. 1, p. 89-98, 1992.

GAURIAU, C., BERNARD, J.F. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. **Exp. Physiol.**, vol. 87, n. 2, p. 251-8, 2002.

GODDARD, G.V. Functions of the amygdala. **Psychol. Bull.**, vol. 62, p. 89-109, 1964

GORMAN, J.M., KENT, J.M., SULLIVAN, G.M., COPLAN, J.D. Neuroanatomical hypothesis of panic disorder, revised. **Am. J. Psychiatry.**, vol. 157, n. 4, p. 493-505, 2000.

GRAEFF, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, vol. 27, n. 4, p. 811-29, 1994.

GRAEFF, F.G., AUDI, E.A., ALMEIDA, S.S., GRAEFF, E.O., HUNZIKER, M.H. Behavioral effects of 5-HT receptor ligands in the aversive brain stimulation, elevated plus-maze and learned helplessness tests. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, vol. 14, n. 4, p. 501-6, 1990.

GRAEFF, F.G., SILVEIRA, M.C., NOGUEIRA, R.L., AUDI, E.A., OLIVEIRA, R.M. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behav. Brain Res.**, vol. 58, n. 1-2, p. 123-31, 1993.

GREENWOON-VAN MEERVERD, B., GIBSON, M., GUNDER, W., SHEPARD, J., FOREMAN, R., MYERS, D. Stereotaxic delivery of corticosterone to the amygdala modulates colonic sensitivity in rats. **Brain Res.**, vol. 893, n. 1-2, p. 135-142, 2001.

GREGG, T.R., SIEGEL, A. Differential effects of NK1 receptors in the midbrain periaqueductal gray upon defensive rage and predatory attack in the cat. **Brain Res.**, vol. 994, n. 1, p. 55-66, 2003.

HANDLEY, S.L., MCBLANE, J.W. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, vol. 29, n. 3, p. 129-38 1993.

HARRIS, R.B. Processing of prehormone precursor proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, vol. 275, p. 315-333, 1989.

HASANEIN, P., MIRAZI, N., JAVANMARDI, K. GABAA receptors in the central nucleus of amygdala (CeA) affect on pain modulation. **Brain Res.**, vol. 1241, p. 36-41, 2008.

HAYTHORNTHWAITE, J.A., SIEBER, W.J., KERNS, R.D. Depression and the chronic pain experience. **Pain**, vol. 46, n. 2, p. 177-184, 1991.

HECKERS, S., MESULAM, M.M. Two types of cholinergic projections to the rat amygdala. **Neurosci.**, vol. 60, n. 2, p. 383-397, 1994.

HEIMER, L., VAN HOESEN, G.W. The limbic lobe and its output channels: implications for emotional functions and adaptive behavior. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, vol. 30, n. 2, p. 126-47, 2006.

HELMSTETTER, F.J. The amygdala is essential for the expression of conditional hypoalgesia. **Behav. Neurosci.**, vol. 106, n. 3, p. 518-528, 1992.

HENKE, P.G., RAY, A. Stress ulcer modulation by limbic system structures. **Acta Physiol. Hung.**, vol. 80, n. 1-4, p. 117-125, 1992.

HERDADE, K.C.P., STRAUSS, C.V.A., ZANGROSSI-JÚNIOR, H., VIANA, M.B. Effects of medial amygdala inactivation on a panic-related behavior. **Behav. Brain Res.**, vol. 172, n. 2, p. 316-323, 2006.

HESS, W.R. Charakter der im Zwischenhirn ausgelösten Bewegungseffekte. **Pflugers Arch. Ges. Physiol.**, vol. 244, p. 767-86, 1941.

HITCHCOCK, J.M., DAVIS, M. Fear-potentiated startle using an auditory conditioned stimulus: effect of lesions of the amygdala. **Physiol. Behav.**, vol. 39, n. 3, p. 403-8, 1987.

HUNSPERGER, R.W. Role of substantia grisea centralis mesencephali in electrically-induced rage reactions. **Prog. Neurobiol.**, vol. 2, p. 289-94, 1956

HUSTON, J.P., HASENÖHRL, R.U. The role of neuropeptides in learning: focus on the neurokinin substance P. **Behav. Brain Res.**, vol. 66, n. 1-2, p. 117-127, 1995.

HUYSER, B.A., PARKER, J.C. Negative affect and pain in arthritis. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, vol. 25, n. 1, p. 105-121, 1999.

JAMES, W. What is emotion? **Mind**, vol. 9, p. 189, 1884

JELEN, P., SOLTYSIK, S., ZAGRODZKA, J. 22-kHz ultrasonic vocalization in rats as an index of anxiety but not fear: behavioral and pharmacological modulation of affective state. **Behav. Brain Res.**, vol. 141, n. 1, p. 63-72, 2003.

JURGENS U. Amygdalar vocalization pathways in the squirrel monkey. **Brain Res.**, vol. 241, n. 2, p. 189–96, 1982.

JURGENS, U., MAURUS, M., PLOOG, D., WINTER, P. Vocalization in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) elicited by brain stimulation. **Exp. Brain Res.**, vol. 4, n. 2, p. 114–7, 1967.

JURGENS, U., PLOOG, D. Cerebral representation of vocalization in the squirrel monkey. **Exp. Brain Res.**, vol. 10, n. 5, p. 532–554, 1970.

JURGENS, U., PRATT, R. Role of the periaqueductal grey in vocal expression of emotion. **Brain Res.**, vol. 167, n. 2, p. 367–378, 1979

KALTWASSER, M.T. Startle-inducing acoustic stimuli evoke ultrasonic vocalization in the rat. **Physiol. Behav.**, vol. 48, n. 1, p. 13-7, 1990.

KELLY, J.; GROSSMAN, S.P. GABA and hypothalamic feeding systems. II. A comparison of GABA, glycine and acetylcholine agonists and their antagonists. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, vol. 11, n. 6, p. 647-52, 1979.

KERTES, E., LÁSZLÓ, K., BERTA, B., LÉNÁRD, L. Effects of substance P microinjections into the globus pallidus and central nucleus of amygdala on passive avoidance learning in rats. **Behav. Brain Res.**, vol. 198, n. 2, p. 397-403, 2009b.

KERTES, E., LÁSZLÓ, K., BERTA, B., LÉNÁRD, L. Positive reinforcing effects of substance P in the rat central nucleus of amygdala. **Behav. Brain Res.**, vol. 205, n. 1, p. 307-310, 2009a.

KIM, M., DAVIS, M. Lack of a temporal gradient of retrograde amnesia in rats with amygdala lesions assessed with the fear-potentiated startle paradigm. **Behav. Neurosci.**, vol. 107, n. 6, p. 1088-92, 1993.

KLUVER, H., BUCY, P.C. "Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. **Am. Physiol.**, vol. 119, p. 352-353, 1937.

KLUVER, H., BUCY, P.C. An analysis of certain effects of bilateral temporal lobectomy in the rhesus monkey, with special reference to "psychic blindness". **I. Psychol.**, vol. 5, p. 33-54, 1938

KRAMER, M.S., CUTLER, N., FEIGHNER, J., SHRIVASTAVA, R., CARMAN, J., SRAMEK, J.J., REINER, S.A., GUANGHAN, L., SNAVELY, D., WYATT-KNOWLES, E., HALE, J.J., MILLS, S.G., MACCOSS, M., SWAIN, C.J., HARRISON T., HILL R.G., HEFTI F., SCOLNICK E.M., CASCIERI M.A., CHICCHI, G.G., SADOWSKI, S., WILLIAMS, A.R., HEWSON, L., SMITH, D., CARLSON, E.J., HARGREAVES, R.J., RUPNIAK, N.M.J. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. **Science**, vol. 281, n. 5383, p. 1640-1645, 1998.

KRAMER, M.S., RUPNIAK, N.M. Discovery of anti-depressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK1) antagonists. **Trends Pharmacol. Sci.**, vol. 20, n. 12, p. 485-490, 1999.

LANGE C. **Ueber Gemuthsbewegungen**, vol. 3, p. 8, 1887

LEDOUX J.E. Emotion circuits in the brain. **Annu. Rev. Neurosci.**, vol. 23, p. 155-84, 2000.

LEDOUX, J.E. Emotional memory systems in the brain. **Behav. Brain Res.**, vol. 58, n. 1-2, p. 69-79, 1993.

LEDOUX, J.E., FARB, C., RUGGIERO, D.A. Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. **J. Neurosci.**, vol. 10, n.4, p. 1043-54, 1990.

LEE, H.J., CHOI, J.S., BROWN, T.H., KIM, J.J. Amygdalar NMDA receptors are critical for the expression of multiple conditioned fear responses. **J. Neurosci.**, vol. 21, n. 11, p. 4116–4124, 2001.

LEVITA, L., MANIA, I., RAINNIE, D.G. Subtypes of substance P receptor immunoreactive interneurons in the rat basolateral amygdala. **Brain Res.**, vol. 981, n. 1-2, p. 41–51, 2003.

LITVIN, Y., BLANCHARD, D.C., Blanchard R.J. Rat 22 kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. **Behav. Brain Res.**, vol. 182, n. 2, p. 166–172, 2007.

MACIOCIA, G. **The Practice of Chinese Medicine.** Churchill Livingstone Ed., 1994

MACLEAN, P.D. Psychosomatic disease and the visceral brain; recent developments bearing on the Papez theory of emotion. **Psychosom. Med.**, vol. 11, n. 6, p. 338-53, 1949.

MALSBURY, C.W., MCKAY, K. Sex difference in the substance P-immunoreactive innervation of the medial nucleus of the amygdala. **Brain Res. Bull.**, vol. 23, n. 6, p. 561–567, 1989.

MANNING, B.H., MAYER, D.J. The central nucleus of the amygdala contributes to the production of morphine antinociception in the rat tail-flick test. **J. Neurosci.** vol. 15, n. 12, p. 8199-8213, 1995.

MAREN, S., POREMBA, A, GABRIEL, M. Basolateral amygdaloid multi-unit neuronal correlates of discriminative avoidance learning in rabbits. **Brain Res.**, vol. 549, n. 2, p. 311-6, 1991.

MARTINEZ, R.C., CARVALHO-NETTO, E.F., RIBEIRO-BARBOSA, E.R., BALDO, M.V., CANTERAS, N.S. Amygdalar roles during exposure to a live predator and to a predator-associated context. **Neuroscience**, vol. 172, p. 314-28, 2011.

MAUBACH, K.A., MARIN, K., DAVID, W.S., HEWSON, L., FRANKSHUN, R.A., HARRISON, T., SEABROOK, G.R. Substance P stimulates inhibitory synaptic transmission in the guinea pig basolateral amygdale in vivo. **Neuropharmacol.**, vol. 40, n. 6, p. 806-817, 2001.

MCDONALD, A.J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Prog. Neurobiol.**, vol. 55, n. 3, p. 257-332, 1998.

MCGAUGH, J.L. Memory – a century of consolidation. **Science**, vol. 287, n. 5451, p. 248-251, 2000.

MEAGHER, M.W., ARNAU, R.C., RHUDY, J.L. Pain and emotion: effects on affective picture modulation. **Psychosom. Med.**, vol. 63, n. 1, p. 79-90, 2001.

MICZEK, K.A., DE ALMEIDA, R.M., KRAVITZ, E.A., RISSMAN, E.F., DE BOER, S.F., RAINE, A. Neurobiology of escalated aggression and violence. **J. Neurosci.**, vol. 27, n. 44, p. 11803-6, 2007.

MICZEK, K.A., WEERTS, E.M., VIVIAN, J.A., BARROS, H.M. Aggression, anxiety and vocalizations in animals: GABAA and 5-HT anxiolytics. **Psychopharmacology**, vol. 121, n. 1, p. 38–56, 1995.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, vol. 57, n. 1, p. 1-167, 1999.

MOLINA, F.; HUNSPERGER, R.W. Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis, and adjacent structures. **J. Physiol.**, vol. 145, n. 2, p. 251-65, 1959.

MONGEAU, R., DE OCA, B., FANSELOW, M.S., MARSDEN, C.A. Differential effects of neurokinin-1 receptor activation in subregions of the periaqueductal gray matter on conditional and unconditional fear behaviors in rats. **Behav. Neurosci.**, vol. 112, n. 5, p. 1124-1135, 1998.

MOREIRA, C.M., MASSON, S., CARVALHO, M.C., BRANDÃO, M.L. Exploratory behaviour of rats in the elevated plus-maze is differentially sensitive to inactivation of the basolateral and central amygdaloid nuclei. **Brain Res. Bull.**, vol. 71, n. 5, p. 466-74, 2007.

NAGANO, M., OISHI, T., SUZUKI, H. Distribution and pharmacological characterization of primate NK-2 tachykinin receptor in the central nervous system of the *rhesus* monkey. **Neurosci. Lett.**, vol. 503, n. 1, p. 23-26, 2011.

NAUTA, W.J. Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat. **Brain.**, vol. 81, n. 3, p. 319-40, 1958.

NEUGEBAUER, V., WEIDONG, L., GARY, C.B., HAN, J.S. The amygdala and persistent pain. **Neuroscientist**, vol. 10, n.3, p. 221-234, 2004.

NITECKA, L., FROTSCHER, M. Organization and synaptic interconnections of GABAergic and cholinergic elements in the rat amygdaloid nuclei: Single- and double-immunolabeling studies. **J Comp. Neurol.**, vol. 279, n. 3, p. 470-488, 1989.

NITSCHKE, W. **Acoustic Behavior in the Rat. Research, Theory, and Applications.** Praeger Publishers, New York, NY, 1982.

NOBRE, M.J., LOPES, M.G., BRANDÃO, M.L. Defense reaction mediated by NMDA mechanisms in the inferior colliculus is modulated by GABAergic nigro-collicular pathways. **Brain Res.**, vol. 999, n. 1, p. 124–131, 2004.

PANKSEPP, J., BURGDORF, J. 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables. **Behav. Brain Res.**, vol. 115, n. 1, p. 25–38, 2000.

PAPEZ J.W. A proposed mechanism of emotion. **Arch. Neurol. Psych.**, vol. 38, p. 725-744, 1937.

PARÉ, D., QUIRK, G.J., LEDOUX, J.E. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. **J. Neurophysiol.**, vol. 92, n. 1, p. 1-9, 2004.

PAXINOS, G., WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.** Academic Press Eds., Sydney, Australia, 2005.

PENNEFATHER, J.N., LECCI, A., CANDENAS, M.L., PATAK, E., PINTO, F.M., MAGGI, C.A. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. **Life Sci.**, vol. 74, n. 12, p. 1445-63, 2004.

PETERS, J., KALIVAS, P.W., QUIRK, G.J. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. **Learn Mem.**, vol. 16, n. 5, p. 279-288, 2009

PETERSEN, E.N., BRAESTRUP, C., SCHEEL-KRUGER, J. Evidence that the anticonflict effect of midazolam in amygdala is mediated by the specific benzodiazepine receptors. **Neurosci. Lett.**, vol. 53, n. 3, p. 285-8, 1985.

PFAFF, D. Hormone-driven mechanisms in the central nervous system facilitate the analysis of mammalian behaviors. **J. Endocrinol.**, vol. 184, n. 3, p. 447-453, 2005.

PHELPS, E.A., LEDOUX, J.E. Contributions of the amygdala to emotion processing: From animal models to human behavior. **Neuron**, vol. 48, n. 2, p. 175-187, 2006.

PITKÄNEN, A., AMARAL, D.G. Organization of the intrinsic connections of the monkey amygdaloid complex: projections originating in the lateral nucleus. **J. Comp. Neurol.**, vol. 398, n. 3, p. 431-58, 1998.

PITKÄNEN, A., SAVANDER, V., LEDOUX, J.E. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. **Trends Neurosci.**, vol. 20, n. 11, p. 517-23, 1997.

PRADO, W.A. Antinociceptive effects of agonists microinjected into the anterior pretectal nucleus of the rat. **Brain Res.**, vol. 493, n. 1, p. 147-154, 1989.

PRICE, D.L., CORK, L.C., STRUBLE, R.G., KITT, C.A., WALKER, L.C., POWERS, R.E., WHITEHOUSE, P.J., GRIFFIN, J.W. Dysfunction and death of neurons in human degenerative neurological diseases and in animal models. **Ciba Found Symp.**, vol. 126, p. 30-48, 1987.

PRICE, J.L. Comparative aspects of amygdala connectivity. In: Shinnick-Gallagher P., Pitkanen A., Shekhar A., Cahill L. **The Amygdala in Brain Function. Basic and Clinical Approaches**. New York: New York Academy of Sciences, p. 50-58, 2003.

PRICE, J.L., AMARAL, D.G. An autoradiographic study of the projections of the central nucleus of the monkey amygdala. **J. Neurosci.**, vol. 1, n. 11, p. 1242-59, 1981

PUJOL, J., SORIANO-MAS, C., ALONSO, P., CARDONER, N., MENCHÓN, J.M., DEUS, J., VALLEJO, J. Mapping structural brain alterations in obsessive-compulsive disorder. **Arch. Gen. Psychiatry.**, vol. 61, n. 7, p. 720-30, 2004.

RAUCH, S.L., SHIN, L.M., PHELPS, E.A. Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: human neuroimaging research--past, present, and future. **Biol. Psychiatry.**, vol. 60, n. 4, p. 376-82, 2006.

REGOLI, D., DRAPEAU, G., DION, S., COUTURE, R. New selective agonists for neurokinin receptors: pharmacological tools for receptor characterization. **Trends Pharmacol. Sci.**, vol. 9, n. 8, p. 290-295, 1988.

Rhudy J.L., Meagher M.W. Negative affect: effects on an evaluative measure of human pain. *Pain*. 104: 617-626, 2003.

RIBEIRO-DA-SILVA, A, HÖKFELT, T. Neuroanatomical localisation of Substance P in the CNS and sensory neurons. *Neuropeptide*, vol. 34, n. 5, p. 256-71, 2000.

RIZVI, T.A., ENNIS, M., BEHBEHANI, M.M., SHIPLEY, M.T. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. **J. Comp. Neurol.**, vol. 303, n. 1, p. 121-31, 1991.

ROBERTS, G.W., WOODHAMS, P.L., POLAK, J.M., CROW, T.J. Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the amygdaloid complex. **Neurosci.**, vol. 7, n. 1, p. 99-131, 1982.

ROBERTS, G.W., WOODHAMS, P.L., POLAK, J.M., CROW, T.J. Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the amygdaloid complex. **Neuroscience**, vol. 7, n. 1, p. 99-131, 1982.

ROBERTS, M.H., REES, H. The antinociceptive effects of stimulating the pretectal nucleus of the rat. **Pain**, vol. 25, n. 1, p. 83-89, 1986

ROBINSON, J.G. **Vocal systems regulating within group spacing**. In: Snowdon S.T., Brown C.H., Petersen M.R. (Eds.). *Primate Communication*. Cambridge University Press, NY, p: 94-116, 1982.

RODGERS, R.J., COLE, J.C., COBAIN, M.R., DALY, P., DORAN, P.J., EELLS, J.R. Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the elevated plus-maze. Profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMPP and mCPP. **Behav. Pharmacol.**, vol. 3, n. 6, p. 621-34, 1992.

RODGERS, R.J., JOHNSON, N.J.T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological in murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, vol. 52, n. 2, p. 297-303, 1995.

ROGERS, S., SALAK-JOHNSON, J., SCHWEI, M., POMONIS, J., MANTYH, P. Reduced anxiety related behavior following ablation of amygdala neurons expressing substance P receptor. **Society for Neuroscience**, vol. 26, 2000.

ROOZENDAAL, B., BRUNSON, K.L., HOLLOWAY, B.L., MCGAUGH, J.L., BARAM, T.Z. Involvement of stress-released corticotropin-releasing hormone in the basolateral amygdala in regulating memory consolidation. **Proc. Nation. Acad. Sci. U.S.A.**, vol. 99, n. 21, p. 13908-13, 2002.

ROSEBOOM, P.H., NANDA, S.A., BAKSHI, V.P., TRENTANI, A., NEWMAN, S.M., KALIN, N.H. Predator threat induces behavioral inhibition, pituitary-adrenal activation and changes in amygdala CRF-binding protein gene expression, **Psychoneuroendocrinol**, vol. 32, n. 1, p. 44–55, 2007.

RUSSCHEN, F.T., BAKST, I., AMARAL, D.G., PRICE, J.L. The amygdalostriatal projections in the monkey. An anterograde tracing study. **Brain Res.**, vol. 29, n. 1-2, p. 241-57, 1985.

Sadananda, M., Wöhr, M., Schwarting, R.K. Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in the rat brain. **Neurosci Lett.**, vol. 435, n. 1, p. 17-23, 2008.

SAFFROY, M., BEAUJOUAN, J.C., TORRENS, Y., BESSEYRE, J., BERGSTROM, L., GLOWINSKI, J. Localization of tachykinin binding sites (NK1, NK2, NK3 ligands) in the rat brain. **Peptides**, vol. 9, n. 2, p. 227–241, 1988.

SAH, P., FABER, E.S., LOPEZ DE ARMENTIA, M., POWER, J. The amygdala complex: anatomy and physiology. **Physiol. Rev.**, vol. 83, n. 3, p. 803–834, 2003.

SALES, G.D., PYE, D. **Ultrasonic communication by animals**. New York: Wiley, 1974

SANANES, C.B., DAVIS, M. N-methyl-D-aspartate lesions of the lateral and basolateral nuclei of the amygdala block fear-potentiated startle and shock sensitization of startle. **Behav. Neurosci.**, vol. 106, n. 1, p. 72-80, 1992.

SEWELL, G.D. Ultrasound in adult rodents. **Nature**, vol. 215, n. 5100, p. 512, 1967

SHI, C., DAVIS, M. Pain pathways involved in fear conditioning measured with fear-potentiated startle: lesion studies. **J. Neurosci.**, vol. 19, n. 1, p. 420-430, 1999.

SHIGEMATSU, N., YAMAMOTO, K., HIGUCHI, S., FUKUDA, T. An immunohistochemical study on a unique colocalization relationship between substance P and GABA in the central nucleus of amygdala. **Brain Res.**, v. 1198, p. 55-67, 2008.

SHULTS, C.W., QUIRION, R., CHRONWALL, B., CHASE, T.N., O'DONOHUE, T.L. A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. **Peptides**, vol. 5, n. 6, p. 1097–1128, 1984.

SIMMONS, M.A. Functional Selectivity of NK1 Receptor Signaling: Peptide Agonists Can Preferentially Produce Receptor Activation or Desensitization. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, vol. 319, n. 2, p. 907-913, 2006.

SMITH, D.W., HEWSON, L., FULLER, P., WILLIAMS, A.R., WHEELDON, A., RUPNIAK, N.M. The substance P antagonist L-760,735 inhibits stress-induced NK(1) receptor internalisation in the basolateral amygdala. **Brain Res.**, vol. 848, n. 1-2, p. 90-95, 1999.

SMITH, M.E., FLYNN, F.W. Distribution of Fos-like immunoreactivity within the rat brain following intraventricular injection of the selective NK(3) receptor agonist senktide. **J. Comp. Neurol**, v. 23, n. 426, p. 413-428, 2000.

STRUHSAKER, T.T. Auditory communication among vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*). In: Altmann S.A. Ed. **Social Communication Among Primates**. Chicago University Press. Chicago, IL, p. 281–324, 1967.

SWANSON, L.W., PETROVICH, G.D. What is the amygdala? **Trends Neurosci.**, vol. 21, n. 8, p. 323-31, 1998.

SZESZKO, P.R., ROBINSON, D., ALVIR, J.M., BILDER, R.M., LENCZ, T., ASHTARI, M., WU, H., BOGERTS, B. Orbital frontal and amygdala volume reductions in obsessive-compulsive disorder. **Arch. Gen. Psychiatry**, vol. 56, n. 10, p. 913-919, 1999.

TEIXEIRA, R.M., SANTOS, A.R.S., RIBEIRO, S.J., CALIXTO, J.B., RAE, G.A., DE LIMA, T.C.M. Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, vol. 311, n. 1, p. 7-14, 1996.

TOMAZINI, F.M., REIMER, A., ALBRECHET-SOUZA, L., BRANDÃO, M.L. Opposite effects of short- and long-duration isolation on ultrasonic vocalization, startle and prepulse inhibition in rats. **J. Neurosci. Methods**, vol. 153, n. 1, p. 114-20, 2006.

TRUITT, W.A., SAJDYK, T.J., DIETRICH, A.D., OBERLIN, B., MCDOUGLE, C.J., SHEKHAR, A. From anxiety to autism: spectrum of abnormal social behaviors modeled by progressive disruption of inhibitory neuronal function in the basolateral amygdala in Wistar rats. **Psychopharmacol.**, vol. 191, n. 1, p. 107–118, 2007.

TURNER, B.H., HERKENHAM, M. Thalamoamygdaloid projections in the rat: a test of the amygdala's role in sensory processing. **J. Comp. Neurol.**, vol. 313, n. 2, p. 295-325, 1991.

USUNOFF, K.G., LAZAROV, N.E., ITZEV, D.E., SCHMITT, O., ROLFS, A., WREE, A. Cholinergic neuronal system of rat amygdala. An Immunocytochemical study. **Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences**, vol. 60, n. 11, p. 1215-1220, 2007.

VAN DER POEL, A.M., NOACH, E.J., MICZEK, K.A. Temporal patterning of ultrasonic distress calls in the adult rat: effects of morphine and benzodiazepines. **Psychopharmacol. (Berl)**, vol. 97, n. 2, p. 147-8, 1989.

VAN LAERE, K., NUTTIN, B., GABRIELS, L., DUPONT, P., RASMUSSEN, S., GREENBERG, B.D., COSYNS, P. Metabolic imaging of anterior capsular stimulation

in refractory obsessive-compulsive disorder: a key role for the subgenual anterior cingulate and ventral striatum. **J. Nucl. Med.**, vol. 47, n. 5, p. 740-747, 2006.

VIANNA, D.M.L., LANDEIRA-FERNANDEZ, J., GRAEFF, F.G., BRANDÃO, M.L. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. **Learn Mem.**, vol. 8, n. 3, p. 164-169, 2001.

VON EULER, U.S., GADDUN, J.H. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. **J. Physiol.**, vol. 72, n. 1, p. 74-87, 1931.

WEIDENHOFER, J., YIP, J., ZAVITSANOU, K., HUANG, X.F., CHAHL, L.A., TOONEY, P.A. Immunohistochemical localisation of the NK1 receptor in the human amygdala: preliminary investigation in schizophrenia. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, vol. 30, n. 7, p. 1313-1321, 2006.

WHALEN, P.J.; PHELPS, E.A. The Human Amygdala. **Guilford Press**, NY, 2009.

WHITE, N.R., CAGIANO, R., MOISES, A.U., BARFIELD, R.J. Changes in mating vocalizations over the ejaculatory series in rats (*Rattus norvegicus*). **J. Comp. Psychol.**, vol. 104, n. 3, p. 255-62, 1990.

WÖHR, M., BORTA, A., SCHWARTING, R.K. Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: a dose-response study in the rat. **Neurobiol. Learn Mem.**, vol. 84, n. 3, p. 228-40, 2005.

WOOLF, N.J., ECKENSTEIN, F., BUTCHER, L.L. Cholinergic system in the rat brain: I. Projections to the limbic telencephalon. **Brain Res. Bull.**, vol. 13, n. 6, p. 751-784, 1984.

ZHAO, Z., YANG, Y., WALKER, D.L., DAVIS, M. Effects of substance P in the amygdala, ventromedial hypothalamus, and periaqueductal gray on fear-potentiated startle. **Neuropsychopharmacol.**, vol. 34, n. 2, p. 331-340, 2009.

ZIMMER, A., ZIMMER, A.M., BAFFI, J., USDIN, T., REYNOLDS, K., KÖNIG, M., PALKOVITS, M., MEZEY, E. Hypoalgesia in mice with a targeted deletion of the tachykinin 1 gene. **Proc. Nation. Acad. Sci. U. S. A.**, vol. 95, n. 5, p. 2630-2635, 1998.

APÊNDICE

O trabalho realizado a seguir serve como complemento ao estudo original para consultas futuras de pesquisadores interessados nos núcleos mediais da amígdala

EFEITOS ANSIOGÊNICOS E ANTINOCICEPTIVOS DA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES NK-1 DO NÚCLEO MEDIAL DA AMÍGDALA AVALIADOS NOS TESTES DE MEDO INATO E ANALGESIA

RESUMO

Estudos pré-clínicos têm mostrado que a Substância P (SP) e seu receptor de maior afinidade, NK-1, podem ser possíveis alvos de novas terapias antidepressivas e ansiolíticas. A SP tem ação pró-aversiva quando microinjetada na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) através da ativação de receptores neurocininérgicos do tipo NK-1. A ativação de receptores NK-1 na SCPd também produz antinocicepção, a qual é considerada parte da reação de defesa. O presente investigou se a microinjeção de SP em ambos núcleos medial ventral (MeAV) e medial dorsal (MeAD) da amígdala produz comportamentos defensivos semelhantes aos observados na SCPd. A SP microinjetada em ambos núcleos produz efeitos ansiogênicos no labirinto em cruz elevado (LCE) e antinociceptivos no teste de retirada de cauda. Esses efeitos foram mais pronunciados no MeAD que no MeAV. A SP aparenta modular seus efeitos ansiogênicos por meio de outros receptores conjuntamente com o NK-1, visto que a aplicação de antagonista NK-1 (Spantide) seguida de SP ainda produzir comportamentos defensivos no LCE, enquanto seus efeitos antinociceptivos aparentemente são modulados exclusivamente pelos receptores NK-1. Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que a SP modula a expressão de comportamentos relacionados ao medo inato no MeAV e MeAD através da ação de receptores neurocininérgicos NK-1 conjuntamente com outros receptores neurocininérgicos (ex: NK-3 e/ou NK-2). Não foi observado nenhum tipo de VUS após a microinjeção de SP ou agonistas NK-1 no MeAV e MeAD, provavelmente devido à produção de VUS somente ocorrer após condicionamento ao medo, ativação de outros tipos de receptores, ativação de estruturas mais primitivas do neuroeixo ou ativação de vias descendentes dependentes de SP.

ANXIOGENIC AND ANTINOCICEPTIVE EFFECTS-INDUCED BY THE ACTIVATION OF THE NK-1 RECEPTORS OF THE MEDIAL NUCLEI OF AMYGDALA

Abstract

Pre-clinical studies have shown that Substance P (SP) and its preferred receptor, NK-1, could be targets for new therapies against depression and anxiety. The SP has pro-aversive effects when microinjected in the dorsal periaqueductal grey (dPAG), effect mediated by the NK-1 receptors. The activation of the dPAG's NK-1 receptors also induces antinociception, which is considered a branch of the defensive reaction. The present study will investigate if the microinjection of SP inside both medial ventral (MeAV) and medial dorsal (MeAD) amygdaloid nuclei could evoke defensive behaviors as seen when microinjected inside dPAG. The SP produced anxiogenic effects on the elevated plus maze (EPM) and antinociception when administered in both nuclei. SP's effects are apparently modulated by NK-1 receptors jointly with others neurokininergic receptors (e.g. NK-3 or NK-2), as administration of the NK-1 antagonist Spantide followed by SP still produced anxiety-like effects in the EPM. The antinociceptive effects of the SP are modulated exclusively by NK-1 receptors. This effect is probably due the emission of USVs only occurs after fear conditioning, activation of other kinds of neurokininergic receptors, activation of older structures of the neuroaxis, or the activation of SP-dependent descending pathways. The present results shows that the SP modulates the production of defensive behaviors inside both MeAV and MeAD by activating NK-1 receptors jointly with others neurokininergic receptors (e.g. NK-3 and/or NK-2). It was not seen any kind of ultrasonic vocalizations (USVs) after the microinjection of SP ou NK-1 agonist in both nuclei.

EFEITOS ANSIOGÊNICOS E ANTINOCICEPTIVOS DA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES NK-1 DO NÚCLEO MEDIAL DA AMÍGDALA AVALIADOS POR TESTES DE MEDO INATO E ANALGESIA

Estudos pré-clínicos têm mostrado que a Substância P (SP) e seu receptor de maior afinidade, NK-1, podem ser possíveis alvos de novas terapias antidepressivas e ansiolíticas. A administração central de SP induz alterações características de estados comportamentais defensivos (AGUIAR; BRANDÃO, 1996; KRAMER et al., 1998), e antagonistas de receptores NK-1 têm mostrado relativo sucesso na inibição de comportamentos aversivos após sua administração central (TEIXEIRA et al., 1996) ou sistêmica (KRAMER et al., 1998; FILE, 1997). Corroborando esses fatos, camundongos nocautes para o gene que codifica a SP ou o receptor NK-1 mostraram redução da ansiedade (RUPNIAK et al., 2000; SANTARELLI et al., 2001).

Estudos têm associado a amígdala uma variedade de funções, incluindo processamento e uso de recompensas para motivar e reforçar o comportamento (CARDINAL et al., 2002; EVERITT et al., 1999) e a comportamentos agressivos, maternos, sexuais e alimentares (para revisão ver WHALEN; PHELPS, 2009). Embora várias regiões da amígdala possam modular a evocação de estados aversivos (AGGLETON, 1993; LEDOUX, 1996), o núcleo medial da amígdala (MeA) é particularmente ativado por estressores emocionais (DAYAS et al., 1999). Além disso, estudos imuno-histoquímicos mostraram uma população densa de corpos celulares marcadas positivamente para a SP (DAMALAMA; SWANN, 1993; MALSBURY; MCKAY, 1989; RIBEIRO-DA-SILVA; ROKFELT, 2000; ROBERTS et al., 1982), e grande expressão de receptores NK-1 no MeA (BOYCE et al., 2001; SAFFROY et al., 1988; SMITH et al., 1999).

A MeA pode ser dividida em 2 subnúcleos distintos: MeA ventral (MeAV) e dorsal (MeAD). Estudos indicam que o MeAD possui conexões com o hipotálamo

posterior, o qual está envolvido com comportamentos reprodutivos, além disso, a exposição ao odor de potenciais fêmeas receptivas aumenta a expressão da proteína c-Fos principalmente no MeAD, especialmente em sua parte posterior (CANTERAS, 2002; MARAS; PETRULLIS, 2010). E a exposição de odor de potenciais machos rivais aumenta a expressão da proteína c-Fos principalmente no MeAV como um todo (CANTERAS, 2002; MARAS; PETRULLIS, 2010).

Devido à importância da amígdala no processamento de circuitos emocionais envolvidos no medo e ansiedade (AGGLETON, 1993; LEDOUX, 1996), e neurônios positivos tanto para a SP como para receptores NK-1 serem altamente expressados no MeA (LJUNDAHL et al., 1978; ROBERTS et al., 1982; NAKAYA et al., 1994; RIBEIRO-DA-SILVA; ROKFELT, 2000), no presente estudo investigaremos se a ativação local ou o bloqueio da neurotransmissão mediada pela SP no MeAV e MeAD pode modular a produção de comportamentos defensivos relacionados ao medo e à ansiedade.

Materiais e Métodos

Animais

Ao total, 139 ratos Wistar entre 150 e 180 g, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo – USP/RP foram utilizados. Os animais foram alojados no biotério setorial do laboratório de Neuropsicofarmacologia, com controle de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro escuro de 12/12 h, em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha. Os animais foram alocados em grupos de 5 animais por caixa, com livre acesso à água e comida durante todo o experimento.

Cirurgia

Cada animal foi anestesiado intraperitonealmente com tribromoetanol (250 mg/kg, I.P.) e posicionado em um aparelho estereotáxico (David-Kopf) onde teve sua cabeça fixada pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Após tricotomia, uma injeção subcutânea de lidocaína 2% (0,2 ml) foi aplicada por via intradérmica no topo do escalpo. Após a incisão, o tecido subcutâneo foi removido, bem como o periósteo. Com a superfície craniana exposta e ajustada em posição horizontal, entre bregma e lambda, dois orifícios foram feitos, por meio de uma broca elétrica, para a introdução de pequenos parafusos de aço inoxidável, que serviram para ancorar a prótese ao crânio do animal. Em seguida, outro orifício foi feito para a implantação de uma cânula, confeccionada a partir de agulhas hipodérmicas (25 × 6 mm) medindo 12 mm de comprimento, através da qual foram administradas as drogas utilizadas no experimento. Essa cânula foi direcionada ao MeAV ou MeAD direitos, seguindo as seguintes coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (2005), tendo-se a medida interaural como referência (Figuras 1 e 2, respectivamente).

Procedimento de Microinjeção

As injeções locais foram realizadas de acordo com técnica descrita por Azami et al. (1980) e Nobre et al. (2004) para minimizar dano tecidual. As micropipetas de microinjeção foram feitas a partir de capilares de sílica fundida ($\varnothing$ externo: 150 μ m, $\varnothing$ interno: 75 μ m; Cluzeau Info Lab, França). Para prevenir quebras de cânulas, o capilar foi fixado num dispositivo feito com agulhas de 0,60 × 25 e 1,00 × 25 mm justapostas de forma a permitir a inserção sequencial do capilar em uma após a outra (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

A micropipeta é conectada a uma seringa Hamilton de 5 μ L através de um tubo de polietileno (PE-10; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), conectada a um aparelho de microinfusão (Harvard Medical Apparatus, USA). Um volume constante de

0,2 µL é injetado por um período de 30 segundos. Uma bolha de ar dentro do tubo de polietileno que conecta a seringa à micropipeta de vidro serviu para monitorar as microinjeções. Após o término das injeções, as micropipetas são mantidas dentro do encéfalo por 30 segundos adicionais para maximizar a difusão para longe da ponta da pipeta.

Drogas e Doses

Foi utilizado a Substância P (Sigma, EUA) na dose de 35 pmol/0,2 µl; dose escolhida por se mostrar efetiva em estudo prévio (Bassi et al., 2007; De Araújo et al., 1999, 2001). Como agonista de receptores NK-1 foi utilizado Sar-Met-SP (Sigma, EUA) nas doses de 50 e 100 pmol/0,2 µl e microinjetada no MeAV e MeAD. Como antagonista de receptores NK-1, foi utilizado o composto Spantide (Sigma, EUA) na dose de 100 pmol/0,2 µl. Todos os fármacos foram dissolvidos em salina fosfatada (PBS, pH = 7,4).

Histologia

Após a realização dos experimentos, os animais foram sacrificados com uma dose alta de anestésico (1,5 mL de solução de hidrato de cloral 10%) por via intraperitoneal, e perfundidos intracardiacamente com solução salina (0,9%), seguido de formalina a 4%. Os encéfalos foram removidos e mantidos em formalina 4% por 5 horas. Posteriormente foram mantidos em sacarose 40% por 24 horas e, em seguida, seccionados para análise histológica. Os cortes foram feitos em secções coronais de 60 µm de espessura, com o auxílio de um criostato (Reichert-Jung). Os cortes foram corados pelo método de Nissl e analisados em microscópio óptico para a localização dos sítios de microinjeção e mapeamento em diagramas correspondentes ao atlas estereotático de Paxinos e Watson (2005).

Experimento 1: Envolvimento dos receptores NK-1 no MeAV ou MeAD na evocação de comportamentos relacionados à ansiedade.

Ferramenta Etológica:

O labirinto em cruz elevado (LCE) consiste de um equipamento elevado a 50 cm do solo, composto por dois braços abertos (50×10 cm), dispostos perpendicularmente a dois braços fechados ($50 \times 10 \times 40$ cm), formando um ângulo de 90° . Nas bordas dos braços abertos há lâminas acrílicas de 1 cm de altura, com o objetivo de evitar a queda dos animais. Os animais foram colocados no centro do labirinto voltados para um dos braços fechados imediatamente após a microinjeção, por um período de 5 minutos. Uma câmara de vídeo acoplada a um circuito de TV registrou o comportamento dos animais durante o experimento, e a análise do comportamento do animal foi feita pelo experimentador. O desempenho do animal no labirinto foi medido através dos parâmetros clássicos: frequência de entradas nos braços abertos e fechados e porcentagem de tempo despendido nos braços abertos em relação ao tempo total. Foram também avaliadas as categorias comportamentais complementares, tais como mergulhos de cabeça, levantamentos, exploração da porção final dos braços abertos, esticamentos, rastejamento, espreitamento, autolimpeza e imobilidade (BLANCHARD et al., 1991; ANSELONI; BRANDÃO, 1997; DE ARAÚJO., 1999, 2001).

Procedimento

Imediatamente após o término do procedimento de microinjeção, os animais foram colocados individualmente no centro do LCE, com o rosto virado para um dos braços fechados, e 5 minutos de exploração livre do labirinto foram analisados. As sessões experimentais foram conduzidas entre 12:00 PM e 6:00 PM. Um observador experiente analisou os parâmetros do LCE a partir da videocâmera. O desempenho do animal no labirinto foi medido através dos parâmetros clássicos: frequência de entradas nos braços abertos e fechados e porcentagem de tempo despendido nos braços abertos em relação ao tempo total. Foram também avaliadas as categorias comportamentais complementares, tais como mergulhos de cabeça, levantamentos, exploração da porção final dos braços abertos, esticamentos, rastejamento, esquadrinhamentos, autolimpeza e imobilidade (BLANCHARD et al., 1991; ANSELONI; BRANDÃO, 1997; DE ARAÚJO., 1999, 2001).

Experimento II: Influência dos receptores NK-1 no MeAV e MeAD no teste de latência de retirada de cauda

Teste de retirada da cauda (“tail-flick”)

O teste da retirada da cauda é baseado no método de D’Amour e Smith (1941). Neste teste é registrada a latência da retirada da cauda do rato. Um feixe de luz radiante emitido por um equipamento construído para esse fim é focalizado no terço distal da cauda do animal (Ugo Basile, Varese, Itália). O movimento da cauda ativa uma célula fotorreceptora, desligando tanto a luz como um cronômetro digital. A intensidade da luz foi ajustada para alcançar latências de retirada entre 2,5 e 3,5 segundos. Uma latência de 6 segundos é a máxima permitida (medida de corte) para minimizar danos à cauda. O

teste de linha de base consiste na determinação da média de três medidas individuais separadas por um intervalo de 5 minutos antes da injeção da droga ou salina nos núcleos amigdalóides.

Toda latência de retirada de cauda foi normalizada em um índice de analgesia (IA), utilizando-se para isso a seguinte fórmula (ROBERT; REES, 1986; PRADO, 1989; BRANDÃO et al., 1991):

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

Experimento II: Envolvimento de receptores NK-1 no MeAV e MeAD na geração de vocalizações ultrassônicas

Gravação das vocalizações ultrassônicas

O aparato utilizado para gravar e analisar as VUS consiste em uma caixa de testes (25x25x40 cm) feita de acrílico. Tal caixa experimental situa-se dentro de outra caixa, ventilada, maior, acolchoada para atenuação de sons (40x45x60 cm) com uma lâmpada vermelha de 28W localizada no teto da caixa. Para a gravação e análise das VUS, um microfone ultrassônico Electret (Emkay FG-3629, Avisoft Bioacoustics, Berlim, Alemanha), sensível a frequências de 1 a 100 kHz. O microfone foi conectado por meio de um dispositivo de áudio Avisoft Ultra Sound Gate 116 USB (Avisoft Bioacoustics) em um computador cujos dados acústicos foram mostrados em tempo real através do Avisoft Recorder (versão 2.7; Avisoft Bioacoustics), sendo gravados numa frequência de até 214,285 Hz em formato de 16 bits. Para a análise acústica, as gravações foram transferidas para o SASLab Pro (versão 4,38; Avisoft Bioacoustics), e uma transformação rápida de Fourier foi efetuada (512 FFT-length, 100% frame,

Hamming window, 75% de sobreposição de janelas). Os espectrogramas foram produzidos numa frequência de resolução de 488 Hz, numa resolução de 0,512 ms. A detecção das vocalizações foi fornecida por um algoritmo baseado em limiares automáticos (limiar: -45dB), corrigidos manualmente no espectrograma, e um mecanismo de espera entre uma vocalização e outra (*hold time*) de 40 ms. Uma frequência passa-baixo (“*cut-off*”) de 1 kHz foi utilizada para a análise dos parâmetros das VUS. O número de chamadas emitidas em cada frequência serviu como unidade estatística para cada indivíduo. As vocalizações gravadas em frequências abaixo de 20 kHz foram operacionalmente definidas nesse estudo como vocalizações “audíveis”, embora o termo se refira às capacidades humanas (adaptado de Bassi et al., 2009). As VUS obtidas desse experimento foram armazenadas num disco rígido, sendo subsequentemente transferidas para tabelas no Microsoft Excel (Redmont, WA, USA) para análises posteriores.

As sessões consistiram do alojamento do animal, sem condicionamento prévio, individualmente dentro da caixa experimental por 15 minutos. Durante cada sessão de teste, o microfone estava localizado, por meio de um buraco, na parte central do teto da caixa maior, 40 cm acima do chão para a gravação de todo o espectro das VUS. Uma câmera de vídeo ligada a uma televisão foi utilizada para acompanhar o comportamento do animal durante o período total de 15 minutos do teste. Os dados apresentados são a somatória das vocalizações emitidas entre 18 e 26 kHz.

Análise estatística

Labirinto em Cruz Elevado: os dados obtidos são mostrados como médias + EPM e analisados utilizando-se a ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Teste de Retirada da Cauda: os dados obtidos são mostrados como médias $\pm$ EPM e analisados utilizando-se a ANOVA de duas vias para medidas repetidas. O teste *post hoc* de Bonferroni foi utilizado se valores significativos de F forem alcançados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

Emissão de Vocalizações Ultrassônicas: Os dados são apresentados como médias + EPM e analisados utilizando-se a ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

Foram utilizados animais cujas análises histológicas indicavam que os sítios de microinjeção estavam localizados dentro do MeAV (Figura 1) ou MeAD (Figura 2).

Fig. 1. A: Esquemas de secções coronais do complexo amigdalóide mostrando os sítios de microinjeção (pontos) no núcleo medial ventral da amígdala (MeAV). B: Fotomicrografia de secção coronal mostrando o local de microinjeção (seta) no MeAV. Coordenadas esquemáticas inter-aurais (IA) retiradas do Atlas de Paxinos e Watson, 2005. Barra de escala: 1,2 mm

Fig. 2. A: Esquemas de secções coronais mostrando os sítios de microinjeção (pontos) no núcleo medial dorsal da amígdala (MeAD). B: Fotomicrografia de secção coronal mostrando o local de microinjeção (seta) no MeAD. Coordenadas esquemáticas inter-aurais (IA) retiradas do Atlas de Paxinos e Watson, 2005. Barra de escala: 1,2 mm

Experimento I – Labirinto em cruz elevado

MeAV

Na figura 3, a ANOVA de uma via mostrou efeitos significativos da microinjeção intra-MeAV sobre a frequência de entradas ($F_{4,31} = 9,52$; $p < 0,0001$) e porcentagem de tempo dispendido ($F_{4,31} = 3,27$; $p = 0,02$) nos braços abertos. O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que houve diminuição na frequência de entrada nos braços abertos para os grupos tratados com SP e Sar 50, enquanto houve diminuição na porcentagem de tempo dispendido nos braços abertos somente para o grupo SP. Nenhum efeito significativo foi encontrado pra o número de entradas no braço fechado ($F_{4,31} = 0,88$; $p = 0,48$).

Para as medidas comportamentais complementares (Figura 4), a ANOVA de uma via mostrou que houve efeito significativo para os parâmetros de levantamentos ($F_{4,31} = 8,23$; $p = 0,0001$), esticamentos ($F_{4,31} = 7,49$; $p = 0,0002$), EFBA ($F_{4,31} = 4,14$; $p = 0,008$), rastejamentos ($F_{4,31} = 4,26$; $p = 0,007$) e autolimpezas ($F_{4,31} = 3,51$; $p = 0,016$). O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou

diminuição na frequência de levantamentos para os grupos tratados com Sar 100 e Spantide; aumento na frequência de esticamentos para o grupo SP; e diminuição da EFBA para o grupo SP, porém não houve diferenças significativas dos grupos tratados em relação ao grupo controle. Não houve efeito estatisticamente significativo para mergulhos de cabeça ($F_{4,31} = 2,36$; $p = 0,07$), esquadrinhamento ($F_{4,31} = 2,05$; $p = 0,10$) e imobilidades ($F_{4,31} = 2,11$; $p = 0,10$).

Figura 3 - Efeitos da microinjeção no MeAV de Salina, Substância P (SP), Sar 50 e 100 ou Spantide nos parâmetros comportamentais clássicos avaliados no LCE. Sal, SP, Sar 50 e Spantide: $n = 7$ em cada grupo. Sar 100: $n = 8$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fig. 4. Efeitos da microinjeção no MeAV de Substância P (SP), Sar-Met (Sar) 50 ou 100 pmol/0,2 μ L ou Spantide nas categorias comportamentais complementares avaliados no LCE. Os dados são mostrados em médio + EPM. EFBA: exploração de final de braço aberto. Salina, SP, Sar 50 e Spantide: $n = 7$ em cada grupo; Sar 100: $n = 8$. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

MeAD

Para as microinjeções dentro do MeAD (Figura 5), a ANOVA de uma via mostrou efeitos das microinjeções intra-MeAD sobre a frequência de entradas ($F_{4,39} = 13,38$; $p < 0,0001$) e na porcentagem de tempo dispendido ($F_{4,39} = 48,02$; $p < 0,0001$) nos braços abertos. O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que houve diminuição na frequência e porcentagem de tempo dispendido nos braços abertos em todos os grupos de tratamento, exceto para Spantide. Nenhum efeito significativo foi encontrado pra o número de entradas no braço fechado ($F_{4,39} = 1,14$; $p = 0,35$).

Figura 5 - Efeitos da microinjeção no MeAD de Salina, Substância P (SP), Sar 50 e 100 ou Spantide nos parâmetros comportamentais clássicos avaliados no LCE. Sal: $n = 10$; SP e Sar 50: $n = 9$ em cada grupo; Sar 100 e Spantide: $n = 8$ em cada grupo. *** $p < 0,001$.

Para as medidas comportamentais complementares (Figura 6), a ANOVA de uma via mostrou que houve efeito significativo para os parâmetros de mergulhos ($F_{4,39} = 5,93$; $p = 0,0008$), esticamentos ($F_{4,39} = 6,70$; $p = 0,0003$), EFBA ($F_{4,39} = 7,42$; $p = 0,0001$), esquadrinhamentos ($F_{4,39} = 5,36$; $p = 0,001$) e autolimpeza ($F_{4,39} = 5,13$; $p = 0,001$). O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que houve aumento no número de esticamentos para os grupos SP e Sar 100; diminuição para as frequências de mergulhos

de cabeça, EFBA para os grupos SP, Sar 50 e 100 pmol; diminuição nas frequências de esquadrinhar e autolimpezas para os grupos SP e Sar 100. Não houve efeitos significativos para os parâmetros de levantamentos ($F_{4,39} = 1,20$; $p = 0,32$), imobilidades ($F_{4,39} = 0,26$; $p = 0,90$) e rastejamentos ($F_{4,39} = 1,51$; $p = 0,21$).

Fig. 6. Efeitos da microinjeção no MeAD de Substância P (SP), Sar-Met (Sar) 50 ou 100 pmol/0,2 μ L ou Spantide nas categorias comportamentais complementares avaliados no LCE. Os dados são mostrados em médio + EPM. EFBA: exploração de final de braço aberto. Sal: n = 10; SP e Sar 50: n = 9 em cada grupo; Sar 100 e Spantide: n = 8 em cada grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Experimento II – Latência de retirada da cauda

MeAV

Nas microinjeções no MeAV (Figura 7), a ANOVA para medidas repetidas relevou efeitos significativos das microinjeções intra-MeAV no tratamento ($F_{4,31} = 35,17$; $p < 0,0001$), tempo ($F_{9,279} = 38,48$; $p < 0,0001$) e interação entre tratamento e tempo ($F_{36, 279} = 10,34$; $p < 0,0001$). O teste *post hoc* mostrou que essas diferenças foram atribuídas às microinjeções (seta) de SP (0-20 minutos) e Sar 100 pmol (0-5 minutos) em relação ao grupo controle.

Figura 7. Latências de retirada de cauda a cada 5 minutos da linha de base (-15, -10 e 0 min.) até 30 minutos após a microinjeção (seta) de salina, SP, Sar ou Spantide no MeAV de ratos submetidos ao teste de retirada de cauda. Os dados são mostrados como média±EPM. Salina, SP, Sar 50 e Spantide: n = 7 em cada grupo; Sar 100: n = 8. * refere-se ao grupo SP, # refere-se ao grupo Sar 100 e # refere-se ao grupo Sar 50 comparados com o grupo Salina. ** $p < 0,01$; ***, ### e #### $p < 0,001$.

MeAD

Nas microinjeções no MeAD (Figura 8), a ANOVA para medidas repetidas relevou efeitos significativos das microinjeções intra-MeAD de drogas no tratamento

($F_{4,39} = 27,29$; $p < 0,0001$), tempo ($F_{9,351} = 32,85$; $p < 0,0001$) e interação entre tratamento e tempo ($F_{36, 351} = 11,73$; $p < 0,0001$). O teste *post hoc* mostrou que essas diferenças foram atribuídas às microinjeções (seta) de SP (0-15 minutos), Sar 50 e 100 pmol (0-5 minutos) em relação ao grupo controle. A microinjeção de Spantide não causou alterações no índice de analgesia.

Figura 8. Latências de retirada da cauda a 5 minutos da linha de base (-15, -10 e 0 min.) até 30 minutos após a microinjeção (seta) de salina, SP, Sar ou Spantide no MeAD de ratos submetidos ao teste de retirada de cauda. Os dados são mostrados como média±EPM. Sal: n = 10; SP e Sar 50: n = 9 em cada grupo; Sar 100 e Spantide: n = 8 em cada grupo. * refere-se ao grupo SP, # refere-se ao grupo Sar 50 e *# refere-se ao grupo Sar 100 comparados ao grupo Salina. * p < 0,01; **, *** e ### p < 0,001.

Experimento III - VUS

A ANOVA de uma via mostrou efeitos não significativos das microinjeções intra-MeAV ($F_{4,31} = 0,01$; $p = 0,99$) e MeAD ($F_{4,39} = 0,62$; $p = 0,64$) (Figura 9).

Figura 9. Efeitos da microinjeção de Salina, SP, Sar 50 ou 100 pmol e Spantide no MeAV ou MeAD na somatória das vocalizações emitidas nas frequências entre 18 a 26 kHz de animais submetidos a 15 minutos de novidade. Os dados são mostrados como médias (+EPM). MeAV/MeAD (respectivamente): Salina: n = 7/10; SP: n = 7/9; Sar 50: n = 7/9; Sar 100: n = 8/8; e Spantide: n = 7/8.

Experimento IV

Após completo os experimento I-III, examinamos se os efeitos observados da SP eram seletivamente mediados pelos receptores NK-1. Os efeitos da microinjeção de SP foram analisados após a microinjeção intra-MeAV ou MeAD de Spantide. Utilizando os mesmos procedimentos descritos acima, os ratos foram testados no LCE, emissão de VUS e no teste de retirada de cauda. Os animais foram alocados aleatoriamente a um dos quatro tratamentos possíveis: Salina + Salina, Spantide + Salina, Salina + SP ou Spantide + SP. Um intervalo de 5 minutos separou as duas microinjeções. Imediatamente após a segunda microinjeção, os animais foram submetidos a um dos três testes etológicos, exigindo um intervalo de 24 horas entre os testes. Similarmente aos experimentos prévios, somente com os locais de microinjeção localizados dentro do MeAV ou do MeAD foram utilizados para o experimento IV.

Labirinto em Cruz Elevado

MeAV

A ANOVA de uma via mostrou que houve efeitos significativos dos tratamentos para o parâmetro de entradas e a porcentagem do tempo dispendido no braço aberto ($F_{3,25} = 19,58$ e $8,89$, respectivamente; $p < 0,0001$). O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que houve redução em ambos parâmetros para os grupos Sal + SP e Span + SP. Não houve efeitos significativos para o número de entradas no braço fechado ($F_{3,25} = 2,36$; $p = 0,09$) (Figura 10).

Para as medidas comportamentais complementares (Figura 11), a ANOVA de uma via mostrou que houve efeito significativo para o número de mergulhos de cabeça ($F_{3,25} = 9,02$; $p = 0,0003$), EFBA ($F_{3,25} = 9,02$; $p = 0,0003$), levantamentos ($F_{3,25} = 7,40$; $p = 0,001$), rastejamentos ($F_{3,25} = 6,14$; $p = 0,003$), esticamentos ($F_{3,25} = 5,36$; $p = 0,005$), autolimpeza ($F_{3,25} = 4,19$; $p = 0,015$), imobilidade ($F_{3,25} = 4,81$; $p = 0,008$). O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que houve diminuição nos parâmetros de mergulhos de cabeça e EFBA somente para o grupo Sal + SP; diminuição na frequência de levantamentos para os grupos Sal + SP e Span + SP; e aumento na frequência dos parâmetros de esticamentos, rastejamentos e tempo de imobilidade somente para o grupo Sal + SP. Não houve efeitos significativos para o parâmetro de esquadrinhamentos ($F_{3,25} = 1,65$; $p = 0,20$).

MeAD

Para o MeAD, a ANOVA de uma via mostrou que houve efeitos significativos dos tratamentos sobre o número de entradas e a porcentagem do tempo dispendido no braço aberto ($F_{3,26} = 14,42$ e $10,64$, respectivamente; $p < 0,0001$), não mostrando efeitos para o número de entradas no braço fechado ($F_{3,26} = 0,76$; $p = 0,0552$) (Figura 12). O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que houve redução para os grupos tratados com Sal + SP e Spantide + SP.

Fig. 11. Efeitos da microinjeção no MeAV de Salina + Salina (Sal + Sal), Spantide (Span) + Sal, Sal + Substância P (SP) ou Span + SP nos parâmetros comportamentais complementares avaliados no LCE. Sal + Sal, Span + Sal e Span + SP : n = 7 em cada grupo. Sal + SP: n = 8. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figura 12 - Efeitos da microinjeção no MeAD de Salina + Salina (S + S), Spantide + Salina (Span + S), Salina + Substância P (S + SP) ou Spantide + Substância P (Span + SP) nos parâmetros clássicos avaliados no LCE. Sal + Sal e Span + Sal: n = 7; Span + SP : n = 10; Sal + SP: n = 6. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Para as medidas comportamentais complementares (Figura 13), a ANOVA de uma via mostrou que houve efeito significativo para o número de mergulhos de cabeça ($F_{3,26} = 14,32$; $p < 0,0001$), EFBA ($F_{3,26} = 14,45$; $p < 0,0001$), rastejamentos ($F_{3,26} = 12,53$; $p < 0,001$), esticamentos ($F_{3,26} = 8,01$; $p = 0,0006$) e imobilidades ($F_{3,26} = 7,50$; $p = 0,0009$). O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que houve aumento nos parâmetros de esticamentos e tempo de imobilidade para o grupo Sal + SP; diminuição nos parâmetros de mergulhos de cabeça para o grupo Sal + SP; diminuição na frequência de EFBA para os grupos Sal + SP e Spantide + SP; e aumento na frequência de rastejamentos para os grupos Sal + SP e Span + SP. Não houve efeitos significativos para o parâmetro de esquadrinhamentos ($F_{3,26} = 1,65$; $p = 0,20$), levantamentos ($F_{3,26} = 1,11$; $p = 0,12$) e autolimpezas ($F_{3,26} = 0,24$; $p = 0,86$).

Fig. 13. Efeitos da microinjeção no MeAD de Salina + Salina (Sal + Sal), Spantide (Span) + Sal, Sal + Substância P (SP) ou Span + SP nos parâmetros comportamentais complementares avaliados no LCE. Sal + Sal e Span + Sal: n = 7; Span + SP : n = 10; Sal + SP: n = 6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Teste de Retirada da Cauda

MeAV

A ANOVA para medidas repetidas mostrou efeitos significativos dos tratamentos no MeAV para o tratamento ($F_{3,25} = 36,75$; $p < 0,0001$), tempo ($F_{9,225} = 18,33$; $p < 0,0001$) e interação entre o tratamento e o tempo ($F_{27,225} = 12,08$; $p < 0,0001$) (Figura 10). A comparação *post hoc* de Bonferroni indicou que essas diferenças foram causadas no MeAV pelo grupo Salina + SP 0 a 15 minutos após as microinjeções, e pelo grupo Spantide + SP somente no período imediatamente após a microinjeção.

Figura 14. Latências de retirada da cauda a cada 5 minutos da linha de base (-15, -10 e 0 min.) até 30 minutos após a microinjeção (seta) de Salina + Salina (S + S; n = 7), Spantide + Salina (Span + S; n = 7), Salina + Substância P (S + SP; n = 8) ou Spantide + Substância P (Span + Sal, n = 7) no MeAV. Os dados são mostrados como média±EPM. * refere-se ao grupo S + SP: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

MeAD

A ANOVA para medidas repetidas mostrou efeitos significativos dos tratamentos para o tempo ($F_{3,36} = 26,02$; $p < 0,0001$) e interação entre tempo e tratamento ($F_{27,324} = 3,73$; $p < 0,05$), porém não houve efeitos para o tratamento ($F_{9,324} = 0,24$; $p = 0,86$) (Figura 11). O teste *post hoc* mostrou diferença significativa somente para o grupo Salina + SP nos períodos de 0 a 15 minutos após a microinjeção,

comparando-se com o grupo controle. A microinjeção de Spantide + Salina não alterou o índice de analgesia.

Figura 15. Latência de retirada da cauda a cada 5 minutos da linha de base (-15, -10 e 0 min.) até 30 minutos após a microinjeção (seta) de Salina + Salina (S + S; n = 7), Spantide + Salina (Span + S; n = 7), Spantide + SP (Span + SP; n = 10), ou Salina + SP (S + SP; n = 6) no MeAD. Os dados são mostrados como média±EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle (Sal + Sal).

Vocalizações Ultrassônicas

A figura 16 ilustra os efeitos dos tratamentos combinados no número de VUSs emitidas. A ANOVA de uma via não mostrou efeitos significativos na emissão de VUS para o MeAV ($F_{3,25} = 0,004$; $p = 0,99$) e MeAD ($F_{3,26} = 0,04$; $p = 0,98$).

Figura 16. Efeitos da microinjeção de Salina + Salina (S + S), Spantide + Salina (Span + S), Salina + Substância P (S + SP) ou Spantide + Substância P (Span + SP) no MeAV ou MeAD na somatória das vocalizações emitidas nas frequências entre 18 a 26 kHz de ratos submetidos a 15 minutos a novidade. Os dados são mostrados como médias (+EPM) comparados com o grupo controle. MeAV/MeAD (respectivamente): S + S: n = 7/7; Span + S: n = 7/7; S + SP: n = 8/6; Span + SP: n = 7/10.

Discussão

A SP está implicada como neurotransmissor na mediação de estados aversivos em certas regiões do sistema encefálico aversivo, tais como a amígdala, hipotálamo medial (ZHAO et al., 2009) e SCPd (GREGG; SIEGEL, 2006; BASSI et al., 2007ab). Embora várias subregiões da amígdala (ex: central, basolateral e medial) tenham um papel no controle do comportamento emocional (AGGLETON, 1993; LEDOUX, 1996), aparentemente os núcleos mediais são mais ativados pelo estresse emocional através da marcação da expressão da proteína c-Fos (DAYAS et al., 1999). No MeA em geral, a separação materna ou estresse de imobilização produziu um aumento liberação de SP nesses núcleos (BOYCE et al., 2001; SMITH et al., 1999, EBNER; SINGEWALD, 2004), efeito bloqueado pelo pré-tratamento com L-760735, um antagonista de receptores NK-1. (BOYCE et al., 2001). Além disso, a MeA contém a maior concentração de SP detectada dentro do complexo amigdalóide (ROBERTS et al., 1982).

O presente estudo corrobora os dados obtidos por Ebner e Singewald (2004), os quais obtiveram efeitos comportamentais ansiogênicos após a microinjeção de SP no MeA. Porém o presente estudo subdividiu os locais de microinjeção em MeA ventral (MeAV) e MeA dorsal (MeAD). A microinjeção de SP diminuiu o número de entradas e a porcentagem de tempo dispendido nos braços abertos após a microinjeção de SP. Aparentemente a SP microinjetada no MeAD produziu efeitos mais pronunciados que aqueles observados para o MeAV e, curiosamente, a microinjeção de agonista de receptores NK-1 produziu efeitos também mais pronunciados no MeAD que no MeAV no mesmo teste. O MeAD (especificamente sua parte posterior) tem sido proposto como área de modulação de informações sensoriais de circuitos envolvidos com comportamentos reprodutivos no hipotálamo (SWANSON, 2000; CANTERAS, 2002),

enquanto o MeAV (especificamente sua parte posterior) tem sido proposto como componente de circuitos hipotalâmicos envolvidos com componentes defensivos do comportamento (CANTERAS, 2002). Sabe-se que o MeA como um todo envia projeções ao hipotálamo medial, projetando-se através de neurônios que contêm SP via estria terminal (HAN et al., 1996; SHAIKH et al., 1991). A ativação do hipotálamo medial inibe o ataque ofensivo, facilitando o comportamento de ataque defensivo em gatos (SHAIKH et al., 1993; STODDARD-APTER; MCDONNELL, 1980, BLOCK et al., 1980, EGGER; FLYNN, 1963), essa inibição pode ainda ser reproduzida através da administração sistêmica de antagonistas de receptores NK-1 (SHAIKH et al., 1993). De acordo com esses dados, as diferenças encontradas nos efeitos comportamentais evocados pela microinjeção de SP ou Sar-Met-SP no MeAD ou MeAV pode ser devido a 1) maior densidade de receptores NK-1 no MeAD que no MeAV ou 2) projeções mais robustas localizadas no MeAD que no MeAV direcionadas para o hipotálamo medial e que utilizem a SP como neurotransmissor. Essas duas hipóteses poderiam explicar a diferença nos efeitos observados pela microinjeção de SP ou agonista NK-1 nesses núcleos. Esse efeito é corroborado por estudos de Ebner e colaboradores (2004), os quais mostraram que o efeito ansiolítico do antagonista NK-1 (ComA) microinjetado no MeA somente produz efeitos em animais estressados previamente (estresse de contensão), não ocorrendo diferenças significativas em relação ao grupo controle em animais hígidos.

Curiosamente, a microinjeção de Spantide seguida de SP em ambos subnúcleos do MeA não reduziu os efeitos ansiogênicos produzidos pela ativação de receptores para a SP. Provavelmente outro tipo de receptor além do NK-1 ainda mantém esse estado aversivo. Sabe-se que o MeA possui imunorreatividade para receptores NK-3 (DING et al., 1996; QUIANG-YU et al., 1996), assim como a presença do RNAm que codifica o

receptor NK-3 (SHUGHRUE et al., 1996). Provavelmente há o envolvimento da ativação de receptores NK-3, visto que esse receptor também produz efeitos ansiogênicos quando ativado em outras estruturas, como a SCPd (BASSI et al., 2009), além disso a administração sistêmica de um agonista NK-3 aumenta a expressão de proteína c-Fos no MeA (YIP; CHAHL, 1997).

Os dados apresentados claramente mostram que a SP microinjetada tanto no MeAD como no MeAV tem efeitos antinociceptivos, cujo índice de analgesia se manteve significativamente acima do grupo controle por um período de até 20 minutos após sua microinjeção, e que esse efeito é mediado pelos receptores NK-1. Esse efeito foi também significativamente maior (porém com duração menor) para microinjeções de Sar-Met-SP 50 e 100 pmol para ambos núcleos. O efeito antinociceptivo eliciado pela SP no MeAD e no MeAV foi causado pela ativação específica de receptores NK-1, visto que a antagonização desses receptores anteriormente à microinjeção de SP causar redução do índice de analgesia para semelhantes ao grupo controle (Salina + Salina).

Apesar da antinocicepção produzida pela SP depende de receptores NK-1, curiosamente seus efeitos ansiogênicos são aparentemente modulados por outros receptores além do NK-1 (ex: NK-2, NK-3). Nagano e colaboradores (2011) mostraram a presença de receptores NK-2 na amígdala. A administração sistêmica de agonista NK-2 é ansiogênica, enquanto seu antagonista é ansiolítico quando testados no LCE e no teste da caixa claro-escuro (SALOMÉ et al., 2006; BERNATZKY; SARIA, 1995; WALSH et al., 1995; TEIXEIRA et al., 1996), efeito similar ao encontrado após microinjeção de antagonistas NK-2 nos núcleos dorsais da rafe (STRATON et al., 1993, 1994). Nagano e colaboradores (2006) mostraram a presença do RNAm de receptores NK-3 na amígdala. A administração de agonistas NK-3 sistemicamente produz comportamentos ansiolíticos e antidepressivos (SALOMÉ et al., 2006; TEIXEIRA et

al., 1996; KRAMER et al., 1998; MASSI et al., 2000). Além disso, a ativação de receptores NK-3 da SCPd produz efeitos ansiogênicos e hiperalgesia em ratos (BASSI et al., 2007a). Novos estudos focando os receptores NK-2 e NK-3 no MeA serão necessários para avaliar a influência desses receptores na evocação de comportamentos aversivos analisados no LCE.

Estudos mostram que a SCPd está envolvida na produção de vocalizações (JURGENS; PRATT, 1979; JURGENS et al., 1967; CHARPENTIER, 1967), e a ativação de receptores NK-1 e NK-3 nessa estrutura produz a emissão de VUS (BASSI et al., 2007a, 2009). Reações comportamentais de defesa são acompanhadas de vocalizações após a estimulação elétrica da amígdala (JURGENS et al., 1967; JURGENS, 1982; CHARPENTIER, 1967; BORSZCZ, 1999, 2006). Porém a microinjeção de SP ou agonista NK-1 não produziu vocalizações, sejam audíveis ou ultrassônicas, apesar da produção de comportamentos ansiogênicos e analgesia. Podemos supor as seguintes hipóteses: 1) Visto que a inativação bilateral de outros núcleos amigdalóides como núcleo central e o basolateral diminui as vocalizações condicionadas ao choque (BORSZCZ, 1999, 2006; LEE et al., 2001), a produção de vocalizações surgiria somente após condicionamento de estímulos (ex: luz e choque); 2) A produção de VUS no MeAV e MeAD seria devido à ativação de outros tipos de receptores que não neurocininérgicos. Brudynzki & Barnabi (1996) relataram a produção de VUS através da manipulação de vias colinérgicas ascendentes provindas de núcleos colinérgicos mesencefálicos, e o MeA contém fibras positivas para colina acetiltransferase (HECKERS; MESULAM, 1994); 3) Uma outra hipótese seria que a produção de VUS se daria somente em níveis mais inferiores do neuroeixo evolutivo, visto que estimulação farmacológica da SCPd e do hipotálamo anterior produzirem emissão de VUS (BASSI et al., 2007a, 2009; BRUDZYNSKI; BARNABI, 1996). Logo,

estruturas encefálicas mais novas serviriam como um “sistema de apoio” da emissão (mas não da sua produção) de VUS regulando componentes acústicos tais como intensidade, frequência e organização sequencial de contrações musculares; 4) Sabe-se que a estimulação de vias neurais descendentes relacionadas a comportamentos defensivos, como encontrada na SCPd (BRANDÃO et al., 1999; VIANNA et al., 2001), produz VUS (BASSI et al., 2007b). A estimulação da amígdala pode ativar vias ascendentes direcionadas para estruturas mais novas do neuroeixo (giro do cíngulo e córtex pré-frontal), ocasionando um circuito retroalimentado amígdala-córtex que serviria para a manutenção do estado defensivo, mas não para sua produção.

Conclusão

A SP produz efeitos ansiogênicos e antinociceptivos quando microinjetada tanto no MeAV como no MeAD. Esse efeito é mais pronunciado quando microinjetada no MeAD. A antinocicepção produzida pela SP depende de receptores NK-1, porém seus efeitos ansiogênicos são aparentemente modulados por outros receptores ativados conjuntamente com o NK-1 (ex: NK-2, NK-3).

Emissões de VUSs não foram encontradas após a estimulação farmacológica neurocininérgica em ambos núcleos mediais da amígdala. Aparentemente as VUSs são produzidas por outros mecanismos independentes dos receptores NK-1 ou porque sua produção se dá somente em estruturas mais antigas do neuroeixo (ex: SCPd e hipotálamo).

Referências

- AGGLETON, J.P. The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. **Trends Neurosci.**, vol. 16, n. 8, p. 328-33, 1993.
- AGUIAR, M.S., BRANDÃO, M.L. Effects of microinjections of the neuropeptide Substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of rats in the plus-maze test. **Physiol. Behav.** vol. 60, n. 4, p. 1183-1186, 1996.
- ANSELONI, V.Z., BRANDÃO, M.L. Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. **Behav. Pharmacol.**, vol.8, n. 6-7, p. 533-540, 1997.
- AZAMI, J., LEWELYN, M.B., ROBERTS, M.H.T. An extra-fine assembly for intracerebral microinjection. **Proc. Brit. Physiol. Soc.**, v. 12, n. 3, p. 18–19, 1980.
- BASSI, G.S., BROIZ, A.C., GOMES, M.Z., BRANDÃO, M.L. Evidence for mediation of nociception by injection of the NK-3 receptor agonist, senktide, into the dorsal periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacol.** , vol. 204, n. 1, p. 13-24, 2009.
- BASSI, G.S., NOBRE, M.J., CARVALHO, M.C., BRANDÃO, M.L. Substance P injected into the dorsal periaqueductal gray causes anxiogenic effects similar to the long-term isolation as assessed by ultrasound vocalizations measurements. **Behav. Brain Res.**, v. 182, n. 2, p. 301-7, 2007a.
- BASSI, G.S., NOBRE, M.J., DE ARAÚJO, J.E., BRANDÃO, M. L. Anxiogenic effects of activation of NK-1 receptors of the dorsal periaqueductal gray as assessed by the elevated plus-maze, ultrasound vocalizations and tail-flick tests. **Neuropeptides**, v. 41, n. 6, p. 365-74, 2007b.
- BERNATZKY, G., SARIA, A. Behavioral effect of the NK2 antagonist SR 48968 but not of the NK1 antagonist SR 140333 in the mouse black and white box model. **Soc. Neurosci. Abstr.**, vvol. 21, p. 1696, 1995.
- BLANCHARD, D.C., BLANCHARD, R.J., RODGERS, R.J. Risk assessment and animal models of anxiety. In: Olivier, B., Mos, J., Slangen, J.L., eds. **Animal Models in Psychopharmacology**. Birkhauser Bale Ed., p. 117-134, 1991.

BLOCK., C.H., SIEGEL, A., EDINGER. H.M. Effects of amygdaloid stimulation upon trigeminal sensory fields of the lip that are established during hypothalamically-elicited quiet biting attack in the cat. **Brain Res.**, vol. 197, p. 39-55, 1980.

BORSZCZ, G.S. Contribution of the ventromedial hypothalamus to generation of the affective dimension of pain. **Pain**, v. 123, n. 1-2, p. 155-68, 2006.

BORSZCZ, G.S. Differential contributions of medullary, thalamic, and amygdaloid serotonin to the antinociceptive action of morphine administered into the periaqueductal gray: a model of morphine analgesia. **Behav. Neurosci.**, v. 113, n. 3, p. 612–31, 1999.

BOYCE, S., SMITH, D., CARLSON, E., HEWSON, L., RIGBY, M., O'DONNELL, R. Intra-amygdala injection of the substance P [NK(1) receptor] antagonist L-760735 inhibits neonatal vocalisations in guinea-pigs. **Neuropharmacol.**, v. 41, n. 1, p. 130–137, 2001.

BRANDÃO, M.L., ANSELONI, V.Z., PANDÓSSIO, J.E., DE ARAÚJO, J.E., CASTILHO, V.M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 23, n. 6, p. 863-875, 1999.

BRANDÃO, M.L., REES, H., WITT, S., ROBERTS, M.H.T. Central antiaversive and antinociceptive affects of the anterior pretectal nucleus stimulation. **Brain Res.**, v. 542, n. 2, p. 266-272, 1991.

BRUDZYNSKI, S.M., BARNABI, F. Contribution of the ascending cholinergic pathways in the production of ultrasonic vocalization in the rat. **Behav. Brain Res.**, v. 80, n. 1-2, p. 145-52, 1996.

CANTERAS, N.S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. **Pharmacol Biochem Behav.**, vol. 71, n.3, p. 481-91, 2002.

CARDINAL, R.N., PARKINSON, J.A., HALL, J., EVERITT B.J. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, vol. 26, n. 3, p. 321-52, 2002.

CHANDRA, P., HAFIZI, S., MASSEY-CHASE, R.M., GOODWIN, G.M., COWEN, P.J., HARMER, C.J. NK1 receptor antagonism and emotional processing in healthy volunteers. **J. Psychopharmacol.**, vol. 24, n. 4, p. 481-487, 2010.

CHARPENTIER, J. Modifications de la réaction à la douleur provoquées par diverses lésions cérébrales, et leurs effets sur la sensibilité à la morphine. **Psychopharmacologia**, vol. 11, n. 2, p. 95–121, 1967.

D'AMOUR, F.E., SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, vol. 72, n. 74–79, 1941.

DAMALAMA, M., SWANN, J. Substance P and neurokinin A are colocalized in the central chemosensory pathway of the male golden hamster. **Neuropeptides**, vol. 24, n. 6, p. 327–334, 1993.

DAYAS, C.V., BULLER, K.M., DAY, T.A. Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. **Eur. J. Neurosci.**, vol. 11, p. 2312-22, 1999.

DE ARAUJO, J.E., HUSTON, J.P., BRANDÃO, M.L. Opposite effects of substance P fragments C (anxiogenic) and N (anxiolytic) injected into dorsal periaqueductal gray. **Eur. J. Pharmacol.**, vol. 432, n. 1, p. 43-51, 2001.

DE ARAÚJO, J.E., SILVA, R.C.B., HUSTON, J.P., BRANDÃO, M.L. Anxiogenic effects of substance P and its 7-11 C terminal, but not 1-7 N terminal, injected into the dorsal periaqueductal gray matter. **Peptides**, vol. 20, n. 12, p. 1437-1443, 1999.

DING, YQ, SHIGEMOTO, R, TAKADA, M, OHISHI, H, NAKANISHI, S, MIZUNO, N. Localization of the neuromedin K receptor (NK3) in the central nervous system of the rat. **J. Comp. Neurol.**, vol. 364, n. 2, p. 290-310, 1996

EBNER, K., SINGEWALD, N. The role of substance P in stress and anxiety responses. **Amino Acids.**, vol. 31, n. 3, p. 251-72, 2006.

EBNER, K., RUPNIAK, N.M., SARIA, A., SINGEWALD, N. Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats. **Proc. Nation. Acadm Sci. U.S.A.**, vol. 101, n. 12, p. 4280-4285, 2004.

- EGGER, M.D., FLYNN, J.P. Effects of electrical stimulation of the amygdala on hypothalamically elicited attack behavior in cats. **J. Neurophysiol.**, vol. 26, p. 705-720, 1963.
- EVERITT, B.J., PARKINSON, J.A., OLMSTEAD, M.C., Arroyo M., Robledo P., Robbins T.W. Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala-ventral striatal subsystems. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, vol. 29, n. 877, p. 412-38, 1999.
- FILE, S.E. Anxiolytic action of a neurokinin1 receptor antagonist in the social interaction test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, vol. 58, n. 3, p. 747-52, 1997.
- GREGG, T.R., SIEGEL, A. Differential effects of NK1 receptors in the midbrain periaqueductal gray upon defensive rage and predatory attack in the cat. **Brain Res.**, vol. 994, n. 1, p. 55-66, 2003.
- HAN, Y., SHAIKH, M.B., SIEGEL, A. Medial amygdaloid suppression of predatory attack behavior in the cat: I Role of a substance P pathway from the medial amygdala to the medial hypothalamus. **Brain Res.**, vol. 716, p. 59-71, 1996.
- HECKERS, S., MESULAM, M.M. Two types of cholinergic projections to the rat amygdala. **Neurosci.**, vol. 60, n. 2, p. 383-397, 1994.
- JURGENS, U., MAURUS, M., PLOOG, D., WINTER, P. Vocalization in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) elicited by brain stimulation. **Exp. Brain Res.**, vol. 4, n. 2, p. 114-7, 1967.
- JURGENS, U., PRATT, R. Role of the periaqueductal grey in vocal expression of emotion. **Brain Res.**, vol. 167, n. 2, p. 367-378, 1979
- KRAMER, M.S., CUTLER, N., FEIGHNER, J., SHRIVASTAVA, R., CARMAN, J., SRAMEK, J.J., REINER, S.A., GUANGHAN, L., SNAVELY, D., WYATT-KNOWLES, E., HALE, J.J., MILLS, S.G., MACCOSS, M., SWAIN, C.J., HARRISON T., HILL R.G., HEFTI F., SCOLNICK E.M., CASCIERI M.A., CHICCHI, G.G., SADOWSKI, S., WILLIAMS, A.R., HEWSON, L., SMITH, D., CARLSON, E.J., HARGREAVES, R.J., RUPNIAK, N.M.J. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. **Science**, vol. 281, n. 5383, p. 1640-1645, 1998.

KRAMER, M.S., RUPNIAK, N.M. Discovery of anti-depressant and anti-hemetic efficacy of substance P receptor (NK1) antagonists. **Trends Pharmacol. Sci.**, vol. 20, n. 12, p. 485-490, 1999.

LEDOUX, J.E. Emotion circuits in the brain. **Annu. Rev. Neurosci.**, vol. 23, p. 155-84, 2000.

LEDOUX, J.E. **The Emotional Brain: The Mysterious Underpinnings of emotional Life** (Touchstone Press, New York), 1996.

LEE, H.J., CHOI, J.S., BROWN, T.H., KIM, J.J. Amygdalar NMDA receptors are critical for the expression of multiple conditioned fear responses. **J. Neurosci.**, vol. 21, n. 11, p. 4116–4124, 2001.

LJUNGDAHL, A., HÖKFELT, T., NILSSON, G. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat--I. Cell bodies and nerve terminals. **Neuroscience**, vol. 3, n. 10, p. 861-943, 1978.

MALSBURY, C.W., MCKAY, K. Sex difference in the substance P-immunoreactive innervation of the medial nucleus of the amygdala. **Brain Res. Bull.**, vol. 23, n. 6, p. 561–567, 1989.

MARAS, P.M., PETRULIS, A. The anterior medial amygdala transmits sexual odor information to the posterior medial amygdala and related forebrain nuclei. **Eur. J. Neurosci.**, vol. 32, p. 469-482, 2010.

MASSI, M., PANOCKA, I., DE CARO, G. The psychopharmacology of tachykinin NK-3 receptors in laboratory animals. **Peptides**, vol. 21, p. 1597-1609, 2000.

NAGANO, M., OISHI, T., SUZUKI, H. Distribution and pharmacological characterization of primate NK-2 tachykinin receptor in the central nervous system of the *rhesus* monkey. **Neurosci. Lett.**, vol. 503, n. 1, p. 23-26, 2011.

NAGANO, M., SAITOW, F., HANEDA, E., KONISHI, S., HAYASHI, M., SUZUKI, H. Distribution and pharmacological characterization of primate NK-1 and NK-3 tachykinin receptors in the central nervous system of the *rhesus* monkey. **Br. J. Pharmacol.**, vol. 147, n. 3, p. 316-323, 2006.

- NAKAYA, Y., KANEKO, T., SHIGEMOTO, R., NAKANISHI, S., MIZUNO, N. Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. **J Comp. Neurol.**, vol. 347, n. 2, p. 249-74, 1994.
- NOBRE, M.J., LOPES, M.G., BRANDÃO, M.L. Defense reaction mediated by NMDA mechanisms in the inferior colliculus is modulated by GABAergic nigro-collicular pathways. **Brain Res.**, vol. 999, n. 1, p. 124–131, 2004.
- PAXINOS, G., WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. Academic Press Eds., Sydney, Australia, 2005.
- PRADO, W.A. Antinociceptive effects of agonists microinjected into the anterior pretectal nucleus of the rat. **Brain Res.**, vol. 493, n. 1, p. 147-154, 1989.
- QIANG-YU, D., SHIGEMOTO, R., TAKADA, M., OHISHI, H., NAKANISHI, S., MIZUNO, N. Localization of the neuromedin K receptor (NK3) in the central nervous system of the rat. **J. Comp. Neurol.**, vol. 364, n. 2, p. 190-310, 1996.
- RIBEIRO-DA-SILVA, A, HÖKFELT, T. Neuroanatomical localisation of Substance P in the CNS and sensory neurons. **Neuropeptide**, vol. 34, n. 5, p. 256-71, 2000.
- ROBERTS, G.W., WOODHAMS, P.L., POLAK, J.M., CROW, T.J. Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the amygdaloid complex. **Neurosci.**, vol. 7, n. 1, p. 99–131, 1982.
- ROBERTS, M.H., REES, H. The antinociceptive effects of stimulating the pretectal nucleus of the rat. **Pain**, vol. 25, n. 1, p. 83-89, 1986
- RUPNIAK, N.M., CARLSON, E.C., HARRISON, T., OATES, B., SEWARD, E., OWEN, S., DE FELIPE, C., HUNT, S., WHEELDON, A. Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK(1)) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. **Neuropharmacol.**, vol. 39, n. 8, p. 1413-21, 2000.
- SAFFROY, M., BEAUJOUAN, J.C., TORRENS, Y., BESSEYRE, J., BERGSTROM, L., GLOWINSKI, J. Localization of tachykinin binding sites (NK1, NK2, NK3 ligands) in the rat brain. **Peptides**, vol. 9, n. 2, p. 227–241, 1988.

SALOMÉ, N., STEMMELIN, J., COHEN, C., GRIEBEL, G. Selective blockade of NK2 or NK3 receptors produces anxiolytic- and antidepressant-like effects in gerbils. **Pharm. Biochem. Behav.**, vol. 83, n. 4, p. 533-539, 2006.

SANTARELLI, L., GOBBI, G., DEBS, P.C., SIBILLE, E.T., BLIER, P., HEN, R., HEATH, M.J. Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, vol. 98, n. 4, p. 1912-7, 2001.

SHAIKH, M.B., STEINBERG, A., SIEGEL, A. Evidence that substance P is utilized in medial amygdaloid facilitation of defensive rage behavior in the rat. **Brain Res.**, vol. 625, p. 283-294.

SHUGHRUE, P., LANE, M.V., MERCHENTHALER, I. In situ hybridization analysis of the distribution of the neurokinin-3 mRNA on the rat central nervous system. **J. Comp. Neurol.**, vol. 372, n. 3, p. 395-414, 1996.

SMITH, D.W., HEWSON, L., FULLER, P., WILLIAMS, A.R., WHEELDON, A., RUPNIAK, N.M. The substance P antagonist L-760,735 inhibits stress-induced NK(1) receptor internalisation in the basolateral amygdala. **Brain Res.**, vol. 848, n. 1-2, p. 90-95, 1999.

STODDARD-APTER, S.L., MACDONNELL, M.F. Septal and amygdalar afferents to the hypothalamus which facilitate hypothalamic elicited intraspecific aggression and associated hissing in the cat. **Brain Res.**, vol. 193, n. 1, p. 19-32, 1980.

SWANSON, L.W., PETROVICH, G.D. What is the amygdala? **Trends Neurosci.** vol. 21, n. 8, p. 323-31, 1998.

TEIXEIRA, R.M., SANTOS, A.R.S., RIBEIRO, S.J., CALIXTO, J.B., RAE, G.A., DE LIMA, T.C.M. Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, vol. 311, n. 1, p. 7-14, 1996.

VIANNA, D.M.L., LANDEIRA-FERNANDEZ, J., GRAEFF, F.G., BRANDÃO, M.L. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change

freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. **Learn Mem.**, vol. 8, n. 3, p. 164-169, 2001.

WALSH, D., STRATTON, S.C., HARVEY, F.J., BERESFORD, I.J., HAGAN, R.M. The anxiolytic-like activity of GR159897, a non-peptide NK2 receptor antagonist, in rodent and primate models of anxiety. **Psychopharmacol. (Berl)**, vol. 121, n. 2, p. 186-191, 1995.

WHALEN, P.J.; PHELPS, E.A. The Human Amygdala. **Guilford Press**, NY, 2009.

YIP, J., CHAHL, L.A. Localization of Fos-like immunoreactivity induced by NK3 tachykinin receptor agonist, senktide, in the guinea-pig brain. **Br. J. Pharmacol.**, vol. 122, n. 4, p. 15-25, 1997.

ZHAO, Z., YANG, Y., WALKER, D.L., DAVIS, M. Effects of substance P in the amygdala, ventromedial hypothalamus, and periaqueductal gray on fear-potentiated startle. **Neuropsychopharmacol.**, vol. 34, n. 2, p. 331-340, 2009.