UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Psicologia e Educação
Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

**Estudo da participação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal no
comportamento defensivo de camundongos através do emprego de diferentes
modelos animais de ansiedade: a estimulação química e a exposição ao predador**

Eduardo Ferreira de Carvalho Netto

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Ciências, área de
Psicobiologia

Ribeirão Preto
-2007-

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Psicologia e Educação
Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

**Estudo da participação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal no
comportamento defensivo de camundongos através do emprego de diferentes
modelos animais de ansiedade: a estimulação química e a exposição ao predador**

Eduardo Ferreira de Carvalho Netto

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Ciências, área de
Psicobiologia

Ribeirão Preto
-2007-

AUTORIZO A 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

Carvalho Netto, Eduardo Ferreira

Estudo da participação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal no comportamento defensivo de camundongos através do emprego de diferentes modelos animais de ansiedade: a estimulação química e a exposição ao predador

105 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Psicobiologia.
Orientador: Nunes de Souza, Ricardo L.

1. Comportamento de defesa. 2. Matéria cinzenta Periaquedutal. 3. Estimulação Química. 4. MDTB. 5. RET

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Psicologia e Educação
Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

**Estudo da participação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal no
comportamento defensivo de camundongos através do emprego de diferentes
modelos animais de ansiedade: a estimulação química e a exposição ao predador**

Eduardo Ferreira de Carvalho Netto

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Ciências, área de
Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Ribeirão Preto
-2007-

Dedico este trabalho a Gilberto Kasteckas (*in memoriam*)

“Algumas pessoas que amamos entram em nossas vidas e partem rapidamente, mas nós não as perdemos, ganhamos a alegria de conviver e aprender com elas, mesmo que por pouco tempo.”

(Tatiana Kasteckas)

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, que contribuiu de maneira presente e dedicada para a minha formação científica e pessoal desde o início de minha carreira. Meus sinceros agradecimentos pela sua importante participação nas minhas conquistas, nestes anos de pós-graduação, e pela sua amizade.

Aos professores da banca examinadora pela atenção dispensada na leitura desta tese.

Aos professores Dr. Hélio Zangrossi e Dr. Sílvio Morato pela contribuição científica para o desenvolvimento e aprimoramento deste trabalho.

Aos professores Dr. Francisco Silveira Guimarães, Dr. Marcus Lira Brandão e Dr. Sílvio Morato de Carvalho, que participaram do exame de qualificação, pela leitura crítica e sugestões que muito contribuíram para aprimorar este trabalho.

Aos Professores Dr. Robert e Dra. Caroline Blanchard pela colaboração e valiosa contribuição para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também pela oportunidade de estágio de doutorado no exterior.

À professora Dra. Cleopatra da Silva Planeta por sempre estar disposta a colaborar e pela sua amizade

Aos Professores Dra. Maria do Carmo Longo, Dra. Azair Liane Canto de Souza e Dr. José Francisco Fracasso pela amizade e ótima convivência durante o período do desenvolvimento deste trabalho

Às técnicas do laboratório de farmacologia da FCFAr/UNESP, Elisabete Zocal Paro Lepera e Rosana Finoti Pupin Silva pela colaboração técnica e amizade.

À secretária do PANT, Tirene, pela amizade e pela disposição em ajudar sempre.

À secretária Renata B. Vicentini pela competência profissional na secretaria da Psicobiologia.

À Inês, Denise e Sônia, pela competência nos serviços prestados na secretaria da CPG.

Aos funcionários da Biblioteca, do Biotério e da Seção de Transportes da FCFAR da UNESP, em especial para aqueles da Seção de Apoio, Renato, Gilberto, Chico e Geni, que sempre atenderam minhas solicitações com boa vontade.

Aos meus pais Lafayette e Iolanda, com admiração e carinho, pelo apoio e confiança incondicional depositados em mim durante toda minha vida. Meus sinceros agradecimentos a vocês por estarem do meu lado durante as pequenas e grandes conquistas e durante as dificuldades enfrentadas nesta fase da minha vida

Aos meus queridos irmãos Ivan, Isnard, José Ricardo e Juliana que sempre me incentivaram e apoiaram. Obrigado por sempre poder contar com vocês.

À minha namorada Tatiana, que entrou na minha vida e encheu meu coração de amor, esperança e confiança. Obrigado pela sua compreensão e pelo seu incentivo incondicional em todos os momentos desta fase.

Aos companheiros do laboratório de farmacologia Joyce, Alianda, Vanessa, Tarciso, Aline, Débora, Ana Cláudia, Kátia, Karina, Fábio, Marcelo, Paulo, Egberto, Vander, Camila, Rodrigo, Ana Paula e Roberta pela amizade e boa convivência durante este período.

Aos Companheiros de república e amigos Gustavo (Pedrega), Tarciso, João Leopoldo, Lauro (Kibe), Juliana, Rodrigo, Camila, Simone, Jean (Kiwi), Kelly e Marcos pela amizade e apoio.

A todos os amigos da Psicobiologia, especialmente Karina, Lucas, Carlos Eduardo, Raquel, Júlia, Sueli, Milena, Milena (lab Sílvia) e Aninha pela receptividade, amizade e ajuda nos momentos que precisei.

À Faculdade de Ciências Farmacêutica da UNESP de Araraquara pelo espaço físico laboratorial, equipamentos e materiais fornecidos para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante todo Doutorado e durante o período de estágio de doutorado no exterior.

SUMÁRIO

1.RESUMO.....	1
2.ABSTRACT.....	3
3.INTRODUÇÃO	
3.1 Medo e Ansiedade.....	5
3.2 Reações de Defesa.....	6
3.3 Diferenças nos comportamentos defensivos de ratos e camundongos.....	8
3.4 Substrato Neural.....	12
3.4.1 Matéria Cinzenta Periaquedutal.....	15
3.4.2 Glutamato e Óxido Nítrico.....	18
3.4.3 Fator Liberador de Corticotropina (CRF).....	21
3.5 Modelos Animais de Ansiedade/medo.....	24
3.5.1 Estimulação química da MCPD.....	25
3.5.2 Bateria de Testes de Defesa para Camundongos.....	27
3.5.3 Teste de Exposição ao Rato.....	29
4.OBJETIVOS	
4.1 Objetivo Geral.....	31
4.2 Objetivos Específicos.....	31
5.MATERIAIS E MÉTODOS	
5.1 Animais.....	33
5.2 Equipamentos.....	33
5.3 Cirurgia e administração de drogas na MCPD.....	34
5.4 Drogas.....	35
5.5 procedimentos.....	36
5.5.1 Etapa 1. Estimulação Química	
5.5.1.1Experimento 1. Avaliação das respostas comportamentais induzidas pelo DLH em duas situações diferentes: Arena x MDTB.....	36

5.5.1.2 Experimento 2. Procedimento padrão no MDTB.....	37
5.5.1.3 Experimento 3. Avaliação da capacidade de reação de camundongos a estímulos ambientais durante o efeito máximo do DLH (fuga explosiva).....	39
5.5.2 Etapa 2. Exposição ao Predador	
5.5.2.1 Experimento 4. Efeito do NMDA e NPLA intra-MCPD avaliado no RET.....	39
5.5.2.2 Experimento 5. Efeito do ovineCRF intra-MCPD avaliado no MDTB e no RET.....	41
5.6 Histologia.....	42
5.7 Análise Estatística.....	42
5.8 Ética.....	43

6.RESULTADOS

6.1 Estimulação Química (Etapa 1)

6.1.1 Experimento 1. Avaliação das respostas comportamentais induzidas pelo DLH em duas situações diferentes: Arena x MDTB.....	44
6.1.2 Experimento 2. Procedimento padrão no MDTB.....	48
6.1.3 Experimento 3. Avaliação da capacidade de reação de camundongos a estímulos ambientais durante o efeito máximo do DLH (fuga explosiva).....	50

6.2 Exposição ao Predador (Etapa 2)

6.2.1 Experimento 4. Efeito do NMDA e NPLA intra-MCPD avaliado no RET.....	52
6.2.2 Experimento 5. Efeito do ovineCRF intra-MCPD avaliado no MDTB e no RET.....	59

7.DISSCUSSÃO

7.1 Estimulação Química.....	65
7.2 Exposição ao Predador.....	72

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....91

9. ANEXOS.....105

1.RESUMO

O medo e a ansiedade são emoções que apresentam claro valor adaptativo, e que tem suas origens nas reações de defesa que os animais exibem em resposta a situações de ameaça que podem comprometer sua integridade física ou sobrevivência. Recentes estudos têm indicado que a matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) está envolvida na organização e expressão de comportamentos intempestivos do tipo fuga e luta, os quais são relacionados ao estado de medo, e também participa, juntamente com estruturas prosencefálicas (ex. córtex pré-frontal, sistema septo-hipocampal e amígdala), do controle de comportamentos defensivos mais elaborados e orientados relacionados à ansiedade. O presente estudo investigou a participação da MCPD na modulação de diferentes comportamentos defensivos (p. ex. fuga, esquiva e avaliação de risco) induzidos por métodos artificial (estimulação química) e naturalístico (exposição ao predador) em camundongos. Na primeira etapa, investigamos o padrão de resposta comportamental induzida pela infusão do ácido D,L-homocistéico (DLH, estímulo aversivo químico) na MCPD em diferentes situações ou ambientes, com e sem grande disponibilidade de espaço - o *Mouse Defense Test Battery* (MDTB) e a Arena (Experimento 1), respectivamente. Além disso, o presente estudo avaliou a habilidade dos animais de reagirem a estímulos aversivos (predador) durante o período inicial (nos 60 s iniciais) do efeito do ácido DLH (fuga explosiva) (Experimento 3), e imediatamente após esse período, no qual o animal apresente comportamento de congelamento ou imobilidade (Experimento 2). Nossos resultados indicaram que a fuga desencadeada pela estimulação química é a resposta predominante de camundongos e que sua exibição depende da disponibilidade de espaço, uma vez que a maioria dos saltos observados na arena está intimamente relacionada ao contato tátil do animal com as paredes do aparato. Esse perfil de respostas de fuga explosiva e saltos parece não representar o padrão comportamental defensivo natural, tal como acontece diante de uma ameaça proximal (ex. um predador), uma vez que durante a estimulação química os camundongos apresentaram um déficit na estratégia antipredador. A segunda etapa do estudo avaliou os efeitos da injeção intra-MCPD do agonista glutamatérgico ácido *N*-metil-*D*-aspártico (NMDA), do inibidor da enzima de síntese do óxido nítrico neuronal (NOSn),

N ω -propil-L-arginina (NPLA) (Experimento 4), e do agonista não seletivo de receptores do fator de liberação de corticotrofina (CRF), CRF ovino (oCRF) (Experimento 5), no comportamento defensivo de camundongos submetidos ao MDTB e ao teste de exposição ao rato (*Rat Exposure Test*; RET). Os resultados da segunda etapa demonstraram que a ativação de receptores NMDA na MCPD de camundongos intensifica comportamentos relacionados à esquiva do predador. De maneira interessante, essas alterações produzidas pelo NMDA foram consistentemente revertidas pelo inibidor da NOSn, previamente microinjetado no mesmo sítio. Além disso, efeitos intrínsecos do NPLA atenuaram as respostas de esquiva e de avaliação de risco em camundongos submetidos ao RET. Por fim, os resultados da segunda etapa também apontaram para um efeito proaversivo (nas respostas de salto e de esquiva) do agonista de receptores CRF, indicando uma participação dos sistemas glutamatérgico, nitrérgico e CRFérgico, localizados na MCPD, na modulação de diferentes estratégias defensivas (ex. esquiva, avaliação de risco e saltos) de camundongos submetidos ao confronto com o predador. Em conjunto, nossos resultados corroboram a hipótese de que a MPCD está envolvida tanto na organização e expressão de comportamentos intempestivos do tipo fuga e luta como também no controle de comportamentos defensivos mais elaborados e orientados, tais como a avaliação de risco e a esquiva.

2. ABSTRACT

The midbrain dorsal periaqueductal grey (DPAG) is part of the brain defensive system involved in active defense reactions to threatening stimuli. Many lines of evidence suggest that besides fundamentally controlling fear-like responses (fight and flight) the DPAG also controls responses related to anxiety, such as avoidance and risk assessment. This study investigated the role of DPAG on different defensive strategies (i.e. flight, avoidance and risk assessment) elicited by artificial (chemical stimulation, Experiments 1-3) and naturalistic (exposure to predator, Experiments 4 and 5) paradigms in mice. Firstly, D,L-Homocysteic acid (DLH) was infused into the DPAG and behavioral responses of mice were evaluated in two different situations, a rectangular novel chamber and a large oval runway, the Mouse Defense Test Battery (MDTB) apparatus (Exp. 1). We also investigated the ability of mice to react to a threatening stimulus (ex. a predator) during (Exp. 3) and immediately after (Exp. 2) the hyperactive responses (ex. jumping and running) induced by DLH injection. Our results indicated that running as opposed to jumping is the primary response in mice injected with DLH into the DPAG when the environment enables flight. However, mice did not react the predator during the flight reaction induced by chemical stimulation, suggesting the behavioral profile induced by DLH infusion into the DPAG is not related to a normal antipredator flight. In the Experiments 4 and 5, we evaluated the effects of three different compounds, *N*-methyl-*D*-Aspartate (NMDA), a NMDA receptor agonist, *N*ω-propyl-L-arginine (NPLA), an neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitor as well as ovine CRF (oCRF), a nonspecific corticotropin-releasing factor (CRF) receptor agonist, injected into the DPAG of mice, in two predator-stress situations, the Mouse Defense Test Battery (MDTB), and the Rat Exposure Test (RET). Firstly, our results demonstrated that NMDA receptor activation into the mouse DPAG enhances antipredator reactivity (avoidance), an effect that was attenuated by prior infusion of NPLA into the same site. Moreover, the results from the Experiment 4 indicated that the NPLA treatment *per se* induces consistent anti-aversive effects on defensive behaviors (avoidance and risk assessment) of mice confronted by predator. Finally, our results pointed out a proaversive effect (e.g. increased jump escapes and avoidance behaviors) following intra-DPAG infusion of oCRF, suggesting an important role of glutamatergic,

nitroergic and CRFergic systems into the DPAG on the defensive behaviors (risk assessment, avoidance and jumps) elicited by the confront to the predator. Taken together, present results are compatible with previous studies which have emphasized the role of the periaqueductal gray in the modulation of behavioral responses related to anxiety such as risk assessment and avoidance besides fundamentally controlling fear-like responses.

3. INTRODUÇÃO

3.1 Medo e Ansiedade

O medo e a ansiedade são estados emocionais correlacionados, qualificados subjetivamente como não prazerosos e desagradáveis acompanhados por sentimentos de apreensão e insegurança e um conjunto de alterações comportamentais e psicofisiológicas. Lader (1981) atribui como causa principal da ansiedade, a expectativa de um perigo iminente e indefinido, porém sem que uma ameaça real seja identificada ou, quando existente, é considerada pelos demais como desproporcional à intensidade da emoção. Graeff (1990) cita como uma das raízes principais da ansiedade o sentimento de medo, por ser encontrado praticamente em todas as espécies e que tem como função sinalizar e preparar o organismo para situações de ameaça ou perigo. A diferença entre os dois estados emocionais pode ser caracterizada em relação aos estímulos e/ou situações que os desencadeiam, de forma que o medo surgiria diante de situações claras e evidentes de ameaça e perigo, enquanto a ansiedade seria desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, vago e incerto (Blanchard et al., 1990).

Contudo, quando nos referimos à ansiedade e ao medo, podemos também considerá-los como estados emocionais essenciais dentro do repertório afetivo humano, uma vez que até determinado grau estas emoções podem favorecer o desempenho em tarefas de natureza motora e cognitiva. Dentro deste contexto, esses processos emocionais são vistos como fenômenos que apresentam claro valor adaptativo. Todavia, quando essas emoções superam níveis considerados de normalidade, interferindo com o cotidiano do indivíduo, passam a ser consideradas patologias do sistema de defesa humano. Portanto, numa perspectiva evolutiva, a investigação do comportamento defensivo em vários mamíferos (como os roedores) é de crucial importância para a compreensão dos mecanismos neurobiológicos

subjacentes aos estados de medo e ansiedade (Gray & McNaughton, 2000; Blanchard et al., 2001; Graeff & Zangrossi, 2002).

3.2 Reações de Defesa

O estudo do comportamento em várias espécies de animais tem servido de base para compreensão de algumas emoções humanas. A correlação das emoções humanas com as respostas comportamentais emitidas pelos animais tem sido feita com base na proposta evolutiva de Charles Darwin, publicada originalmente em 1872 em seu livro *The expression of Emotions in Man and Animals*. Segundo Darwin (1872 *apud* Graeff, 1990; Panksepp, 1990; Graeff & Zangrossi, 2002), o homem tendo os animais como seus ancestrais, compartilha com eles não só características físicas, mas também suas emoções básicas. De acordo com esta perspectiva, o medo e ansiedade são emoções que apresentam claro valor adaptativo, e que tem suas origens nas reações de defesa que os animais exibem em resposta a situações de ameaça que podem comprometer sua integridade física ou sobrevivência.

São várias as fontes de perigo, dentre elas, confrontos com o predador ou com animais da mesma espécie em competições, estímulos ambientais tais como altura, iluminação, estímulos dolorosos e ambientes ou objetos desconhecidos. Embora o comportamento de defesa e a natureza dos sinais de ameaça variem com a espécie ou gênero, os animais geralmente utilizam uma de quatro estratégias defensivas comportamentais básicas, conhecidas por fuga, congelamento, ataque defensivo e submissão (Adams, 1979; Blanchard & Blanchard, 1988). A decisão por uma particular estratégia leva em conta vários fatores, como as características do ambiente (rota de fuga ou não), distância do estímulo ameaçador e experiência prévia com o estímulo ou ambiente.

Partindo dessa premissa, Robert e Caroline Blanchard, estudando as respostas defensivas comportamentais de roedores (ratos e camundongos) em confronto com predadores (Blanchard & Blanchard, 1988; Blanchard et al., 1997), classificaram o tipo de estratégia defensiva adotada de acordo com o nível de ameaça, a saber: potencial ou incerta, distal e proximal. No primeiro nível, as estratégias observadas são comportamentos exploratórios cautelosos e hesitantes, usando posturas e movimentos do corpo que possibilitam a aproximação e a investigação da possível ameaça, denominados de comportamentos de avaliação de risco. O segundo nível de defesa (distal) está associado aos comportamentos de fuga e congelamento, onde o animal tenta escapar da situação de confronto com o predador, caso exista uma rota de saída no ambiente, ou permanece imóvel, no chamado estado de congelamento, caso a fuga não seja viável e/ou o predador mantenha ainda certa distância. Finalmente, no caso em que o predador está muito próximo ou em contato direto com o animal, os comportamentos observados são tentativas descontroladas e não direcionadas de fuga ou luta defensiva (postura de ameaça e mordidas no predador).

Na tentativa de diferenciar os comportamentos relacionados com ansiedade e medo, esses pesquisadores sugerem que quando o estímulo ou a situação ameaçadora é real, como a presença do predador, os comportamentos desencadeados (fuga e luta) seriam representativos de medo, enquanto os representativos de ansiedade (avaliação de risco) seriam desencadeados por estímulos ou situações apenas potencialmente ameaçadoras como o odor do predador (Blanchard et al., 1993). A essa análise etoexperimental, Gray e McNaughton (2000) adicionaram componentes da teoria da aprendizagem, incluindo estímulos condicionados que sinalizam punição ou perda de recompensa (frustração) como eliciadores de ansiedade. Esses autores também realçam a importância da existência do conflito esquiva-aproximação e da direção da

resposta para a distinção entre medo e ansiedade. Assim, quando a situação permite aproximação ao estímulo aversivo, caracterizando um conflito entre aproximação e evitação, os comportamentos observados (inibição comportamental e avaliação de risco) estariam relacionados à ansiedade. Por outro lado, quando a situação oferece somente as estratégias de defesa do tipo esquiva ativa e fuga, os comportamentos estariam relacionados com o medo. Ainda, esses autores ressaltam a importância dos efeitos farmacológicos na diferenciação do medo e da ansiedade, ou seja, comportamentos relacionados ao estado de medo, tais como fuga e luta, são insensíveis a compostos ansiolíticos clinicamente testados, enquanto aqueles relacionados à ansiedade (comportamentos de avaliação risco) são sensíveis a essas drogas (para uma revisão ver Gray & McNaughton, 2000).

3.3 Diferenças nos comportamentos defensivos de ratos e camundongos

A investigação do comportamento defensivo em vários mamíferos (principalmente em roedores de laboratório: ratos e camundongos) tem contribuído de forma significativa para o entendimento das bases neurais relacionadas aos estados emocionais de medo e ansiedade (Marks, 1987; Blanchard & Blanchard, 1988). As estratégias defensivas utilizadas por esses roedores em diferentes níveis de ameaça têm sido relacionadas a diferentes estados emocionais (Gray & McNaughton, 2000; Graeff & Zangrossi, 2002). De fato, tomando como exemplo, evidências experimentais oriundas de estudos comportamentais e farmacológicos em roedores têm sugerido que a resposta de avaliação de risco que esses animais apresentam frente a uma ameaça potencial e a resposta de fuga que exibem diante de um perigo proximal podem estar relacionadas ao transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e

ao transtorno de pânico (TP), respectivamente (para uma revisão ver Gray & McNaughton, 2000; Graeff & Zangrossi, 2002; Blanchard et al., 2003).

As reações de defesa em ratos e camundongos são avaliadas em situações laboratoriais controladas, nas quais os roedores podem ser submetidos ao confronto com um predador natural, exposição a espaços abertos e altura ou confronto direto co-específico. Embora os padrões de respostas defensivas de ratos e camundongos de laboratório sejam bastante semelhantes, algumas diferenças comparativas nas estratégias defensivas entre essas espécies são encontradas (para uma revisão ver Blanchard et al., 2001; Carvalho-Netto & Nunes-de-Souza, 2004a). Exemplificando, diante do confronto com o predador, ratos e camundongos de laboratório demonstraram diferenças relevantes nas respostas defensivas (Blanchard et al., 1997; 1998; 2001). Uma das principais diferenças é o comportamento de avaliação de risco (orientação e aproximação frente à ameaça), o qual é muito mais frequentemente observado em camundongos do que em ratos. De acordo com Blanchard e colaboradores (1995; 1998; 2001), esse comportamento é usualmente exibido por camundongos, inclusive em situações altamente ameaçadoras, como na presença proximal do predador (gato ou rato) ou até mesmo quando perseguido por ele. Tal comportamento não é tão frequentemente observado em ratos, sendo mais comum nessas situações à exibição do comportamento de congelamento. Diante dessas evidências, em que camundongos apresentam níveis expressivos de exibição do comportamento de avaliação de risco, o qual tem sido implicado nos processos ansiosos (Gray & McNaughton, 2000; Blanchard et al., 2001), a escolha pelo uso dessa espécie pode ser de elevada importância em investigações sobre neurobiologia da ansiedade.

Blanchard e colaboradores argumentam que uma provável explicação para essas diferenças comportamentais estaria relacionada aos processos de domesticação dessas espécies (ver discussão em Blanchard et al., 1997; 1998; 2001). Talvez a maneira de agir do bioterista ou experimentador frente às repostas de defesa dos roedores possa ter interferido diferentemente no processo de seleção e domesticação dessas espécies. Por exemplo, devido ao seu reduzido tamanho (em média 10 vezes menor que o rato), o camundongo é facilmente manipulado pela cauda, o que dificulta os ataques defensivos (mordidas) por parte desse animal na mão do manipulador. Além disso, parece certo que esses ataques (mordidas), quando executados com sucesso por camundongos, causam menor grau de ferimentos no manipulador do que aqueles de ratos. Assim, por provocarem menor dano e serem de baixa frequência, as mordidas do camundongo tornam-se mais bem toleradas pelo manipulador do que aquelas exibidas por ratos, que por essa razão, na maioria das vezes, são sacrificados (Blanchard et al., 1997; 1998; 2001). Em outras palavras, ratos que exibem com menor intensidade e menos frequência comportamentos defensivos (ratos dóceis) apresentam maior probabilidade de serem selecionados artificialmente.

Em apoio a essa hipótese, estudos comparativos do comportamento defensivo entre linhagens de ratos (Long-Evans) e de camundongos (Swiss-Webster) de laboratórios e seus ancestrais selvagens indicam que os primeiros sofreram maior influência da domesticação no comportamento defensivo do que os camundongos (Blanchard et al., 1986; Blanchard, 1997; Blanchard et al., 1998). Exemplificando, diante da aproximação do predador, ratos selvagens apresentaram consistentes comportamentos de defesa tais como fuga (quando a rota de fuga é disponível), congelamento (se a rota não é disponível) e ataques e ameaças defensivas em situações nas quais a distância entre predador e o rato é proximal (Blanchard et al.,

1986; Blanchard, 1997). No entanto, ratos de laboratório apresentam reduzida frequência de comportamento de fuga e quase que ausência total de ataques defensivos (saltos de ataque em direção ao predador e mordidas), quando expostos a situações semelhantes. Nessas condições, ratos de laboratório apresentaram intenso comportamento de congelamento (correspondente a 80% dos comportamentos observados) ao invés da fuga e ataques defensivos. Diante desses fatos, Blanchard e colaboradores (1998) sugerem que a escolha de alguns comportamentos defensivos (principalmente ameaça e ataque defensivos) em ratos de laboratórios seja inadequada para o estudo de variáveis que controlam estratégias específicas de defesa.

Embora os comportamentos defensivos de camundongos de laboratório diante da aproximação do predador, principalmente a fuga e o congelamento, foram considerados de menor intensidade que os exibidos por camundongos selvagens, essas diferenças não foram tão expressivas quanto aquelas observadas em ratos em relação ao seu ancestral (Blanchard et al., 1998). Além disso, comportamentos de ameaça e ataque defensivos não foram reduzidos em camundongos de laboratório diante do contato com o predador (Blanchard et al., 1997; 1998; 2001). De acordo com Blanchard e colaboradores (2001), diante da aproximação, perseguição e contato com o predador, o comportamento defensivo de camundongos *Swiss* é semelhante ao de ratos selvagens. Diante disso, esses autores sugerem que o processo de domesticação no laboratório teve menor influência sobre o comportamento defensivo de camundongos do que sobre o de ratos. Em conjunto, esses dados sugerem ser o camundongo uma espécie adequada para o estudo tanto de comportamentos defensivos exibidos diante de ameaça proximal (tais como fuga e luta), relacionados ao estado de medo, como aqueles frente à ameaça potencial (avaliação de risco),

relacionados à ansiedade (para uma revisão ver Blanchard et al., 1997; 2001; 2003). Portanto, estudando-se o substrato neural de tais comportamentos procura-se desvendar, pelo menos em parte, as bases neurais relacionadas ao medo e a ansiedade.

3.4 Substrato neural

Grande parte do conhecimento atual das estruturas encefálicas relacionadas às emoções medo e ansiedade provém dos estudos clássicos da neurofisiologia - ablação, estimulação elétrica e estimulação química de estruturas encefálicas. Os trabalhos pioneiros de Hess e seus seguidores (Hess & Brugger, 1943; Fernandez de Molina & Hunsperger, 1959) demonstraram que a estimulação elétrica de um contínuo formado pela matéria cinzenta que margeia o terceiro ventrículo, no nível do hipotálamo, e se estende caudalmente à área que circunda o aqueduto do mesencéfalo (matéria cinzenta periaquedutal - MCP), desencadeia reações de defesa bem estruturadas em gatos, tais como de ameaça, luta e fuga, acompanhadas de manifestações neurovegetativas, tais como midríase, piloereção, hiperventilação e aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial. Verificaram ainda, que a estimulação da amígdala (AM), estrutura situada sob o córtex temporal e ligada ao hipotálamo por densas vias nervosas, produzia reações de defesa afetiva, perdurando após a cessação do estímulo.

Diante dessas evidências experimentais, o pesquisador Frederico Graeff (1981) propôs que o hipotálamo medial, a amígdala e a MCP, um conjunto de estruturas longitudinalmente organizadas e reciprocamente interconectadas, representariam o principal substrato neural para expressão de alterações comportamentais e neurovegetativas em resposta a estímulos aversivos. Esse conjunto foi denominado de sistema cerebral aversivo (SCA). Posteriormente, foram propostas as participações do colículo inferior e de camadas profundas do colículo superior

nesse sistema, que atualmente recebe o nome de sistema encefálico aversivo (SEA) (Graeff, 1990; Brandão et al., 1999).

Recentemente, Canteras e colaboradores (1997), utilizando a técnica de imunorreatividade para proteína Fos, delinearam a participação de sítios específicos do hipotálamo medial, o circuito formado pelo núcleo hipotalâmico anterior (AHN), núcleo ventromedial, parte dorsomedial (VMHdm) e núcleo pré-mamilar dorsal (PMd), na integração das respostas de defesa de ratos expostos ao predador natural, o gato. Esse conjunto de núcleos foi denominado de sistema hipotalâmico de defesa (para uma revisão ver Canteras, 2002). Os integrantes desse circuito recebem densas projeções de várias estruturas prosencefálicas (p. ex. sistema septo-hipocampal, amígdala e córtex pré-frontal) e de algumas localizadas no tronco encefálico (matéria cinzenta periaquedutal e núcleo cuneiforme) (para uma revisão ver Canteras, 2002).

A participação do sistema septo-hipocampal no comportamento defensivo vem sendo postulada desde os trabalhos iniciais do psicólogo inglês Jeffrey Gray, publicados no livro intitulado *Neuropsychology of Anxiety* (1982). De acordo com Gray, o sistema septo-hipocampal seria o principal substrato do sistema de inibição comportamental (SIC). Este sistema responderia a sinais condicionados de punição, estímulos de perigos inatos ou situações novas e sinais de frustração condicionada através da inibição de qualquer comportamento que estivesse sendo realizado pelo animal juntamente com aumento do nível de vigilância e da atenção. Posteriormente, Gray e McNaughton (2000) publicaram a segunda edição do livro *Neuropsychology of Anxiety*, procurando integrar o construto do SIC com o do SCA. Algumas importantes mudanças conceituais foram incluídas nesta última formulação. Dentre elas, a função principal do sistema septo-hipocampal passou a ser detectar os conflitos

entre tendências de aproximação e afastamento da fonte de perigo. Em outras palavras, dois sistemas em paralelo seriam ativados, o “sistema cerebral de aproximação” (representado principalmente pelo estriado ventral e núcleo accumbens), incentivando a busca de satisfação das necessidades biológicas, como alimento e sexo, e o sistema cerebral de defesa, gerando tendências de esquiva ou fuga de fontes de perigo inatas ou aprendidas. Nesse caso, o sistema septo-hipocampal detectaria ambas as tendências (aproximação e esquiva) e os comportamentos por ele ativados (inibição comportamental e avaliação de risco) seriam relacionados ao estado de ansiedade. Por outro lado, quando a fonte de ameaça não induz aproximação e pode ser evitada, as respostas comportamentais (ex. fuga e esquiva ativa), expressadas para afastar o animal do estímulo, seriam relacionadas ao estado de medo.

Recentemente, McNaughton e Corr (2004) revisaram e expandiram os conceitos da teoria de Gray e McNaughton (2000) incluídos no livro *Neuropsychology of Anxiety*. Esses pesquisadores propõem que o conjunto de estruturas encefálicas envolvidas nos sistemas de defesa que modulam comportamentos relacionados ao medo, os quais buscam evitar ou afastar o animal da ameaça (fuga e luta), e a ansiedade, os quais visam à aproximação do estímulo ameaçador (avaliação de risco), são entidades categoricamente distintas inter e intra-conectadas. Além disso, baseando-se no conceito de distância defensiva (Blanchard & Blanchard, 1988; Blanchard et al., 1993), postularam que as estruturas que comandam as reações de defesa implicadas na ansiedade e no medo estão igualmente organizadas numa hierarquia funcional (do córtex ao tronco encefálico), atuando de acordo com a distância em que se encontra a fonte de perigo, de modo que todas as estruturas envolvidas participam da modulação de todos os comportamentos. Dessa

forma, por exemplo, os comportamentos defensivos relativos à ansiedade (ex. avaliação de risco) seriam organizados e expressados principalmente por estruturas prosencefálicas (ex. córtex pré-frontal, sistema septo-hipocampal e amígdala). No entanto, as estruturas anatomicamente mais caudais como a MCP e o hipotálamo também participariam sutilmente do controle de tais comportamentos. De fato, estudos demonstram que além de controlar fundamentalmente comportamentos relacionados ao medo, tais como fuga e luta (Misslin, 2003), a MCP participa da elaboração e expressão de comportamentos relacionados à ansiedade, tais como esquiva e avaliação de risco (Carobrez et al., 2001; Bertoglio et al., 2005). Dentro do contexto do presente estudo, abordaremos o envolvimento da MCP na gênese e modulação de comportamentos defensivos relacionados ao medo e a ansiedade em camundongos.

3.4.1 Matéria Cinzenta Periaquedutal (MCP)

A MCP é uma estrutura que circunda o aqueduto mesencefálico (também conhecido como aqueduto de Sylvius), sendo subdividida anatômica e funcionalmente ao longo do eixo rostrocaudal em quatro colunas, denominadas, de acordo com a posição em relação ao aqueduto, em dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral (Carrive, 1993; Bandler e Shipley, 1994).

A localização neuroanatômica e as abundantes conexões aferentes e eferentes favorecem a participação da MCP em vários sistemas ascendentes e trajetos descendentes (Manthy, 1982; Beitz, 1990), sendo considerada uma estrutura encefálica de alta complexidade. De fato, a MCP recebe aferências e envia eferências a diferentes áreas motoras, sensoriais, autonômicas e límbicas (Beitz, 1990; Bandler et al., 1991; Canteras & Swanson, 1992; Canteras, 2002; Sowards & Sowards, 2002)

(ver figura 1). Tal condição sugere que essa estrutura esteja interligada a um grande número de circuitos neurais responsáveis pela modulação e coordenação de muitas funções fundamentais para a sobrevivência do organismo, tais como a modulação de reações de defesa relacionadas ao medo e ansiedade, processamento de informação dolorosa, controle motor e cardiovascular (para uma revisão ver Behbehani, 1995), além da participação na coordenação de comportamentos maternal e predatório (Sukikara et al., 2006). Estudos mais recentes sugerem que estas funções sejam integradas diferentemente pelas colunas neuronais longitudinais da MCP ao longo do seu eixo rostrocaudal (Bandler & Shipley, 1994; Bandler et al., 2000).

Figura 1. Representação das conexões da matéria cinzenta periaquedutal com outras estruturas do encéfalo (retirado de Borelli, 2006)

No presente estudo o foco de interesse é o papel da porção dorsal, a MCPD, que compreende as colunas dorsolateral e dorsomedial, na organização do comportamento defensivo de camundongos. Inicialmente, a participação da MCP na elaboração foi proposta com os trabalhos pioneiros de Hess e seus seguidores (Hess & Brueger, 1943; Fernandez de Molina & Hunsperger, 1959). Esses pesquisadores demonstraram que a estimulação elétrica da MCP de gato desencadeia reações de

defesa bem estruturadas, tais como de ameaça, luta e fuga, acompanhadas de manifestações neurovegetativas. Posteriormente, outros pesquisadores (Olds & Olds, 1962; Valenstein, 1965) demonstraram em ratos que a estimulação da região dorsal (MCPD) produz comportamentos de congelamento e fuga que são semelhantes às reações de defesa que esses animais apresentam no seu ambiente natural, quando estão frente a um predador. Na mesma direção, Cazala e Garrigues (1981), através de estudos baseados em resposta comportamental operante de auto-estimulação de estruturas encefálicas, demonstraram que a estimulação da MCPD é aversiva também para camundongos. Recentemente, estudos conduzidos em nosso laboratório (Miguel & Nunes-de-Souza, 2006) demonstraram que a estimulação química da MCPD de camundongos elicia comportamentos como corridas, saltos e congelamento que são semelhantes àqueles relatados anteriormente em ratos (Bandler et al., 1985).

Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado que a lesão da MCP em ratos inibe as reações de defesa induzidas por estímulos ambientais aversivos, tais como o confronto com predador (Blanchard et al., 1981), ou pela estimulação elétrica do hipotálamo medial e da amígdala (Blanchard & Blanchard, 1988). Ainda, evidências importantes referentes ao envolvimento da MCPD com o medo e ansiedade também foram obtidas a partir de estudos clínicos com pacientes neurocirúrgicos submetidos à estimulação elétrica dessa região (Nashold et al., 1969). Tal procedimento produziu nesses pacientes sentimentos de medo intenso, pânico, desconforto bem como de manifestações de morte iminente associados a alterações autonômicas tais como aumento da frequência cardíaca e respiratória, sudorese e piloereção semelhantes aos ataques de pânico observados na clínica. Diante dessas evidências, a MCPD tem sido sugerida como uma estrutura chave na modulação e expressão de comportamentos

defensivos do tipo fuga e luta relacionados aos ataques de pânico em humanos (Graeff, 1990; Jenck et al., 1995).

No entanto, McNaughton e Corr (2004), em recente artigo revisando as vias neurais que comandam as reações de defesa, argumentam que estruturas anatomicamente mais caudais, como a MCP e o hipotálamo, além de coordenarem e expressarem comportamentos intempestivos do tipo fuga e luta relacionados ao estado de medo, também participam, juntamente com estruturas prosencefálicas (ex. córtex pré-frontal, sistema septo-hipocampal e amígdala), do controle de comportamentos defensivos mais elaborados e orientados como a esquivar e a avaliação de risco, os quais têm sido relacionados à ansiedade. Inserido neste contexto, vários sistemas de neurotransmissores têm sido propostos como mediadores ou moduladores das respostas comportamentais organizadas e expressadas pela MCPD, dentre eles, os sistemas serotoninérgico, gabaérgico, glutamatérgico, nitrérgico e os neuropeptídeos, tais como o fator liberador de corticotropina (do inglês, *Corticotrophin-Releasing Factor* - CRF) (para uma revisão ver Graeff, 1994; Behbehani, 1995; Guimarães et al., 2005).

3.4.2 Glutamato e Óxido Nítrico

O glutamato é o principal transmissor excitatório do sistema nervoso central de mamíferos (Collingridge & Lester, 1989), atuando em vários tipos de receptores classificados como ionotrópicos (ex. NMDA e não NMDA) e metabotrópicos (Ozawa et al., 1998). Experimentos realizados ao longo dos últimos anos têm comprovado o seu envolvimento com o desenvolvimento neural, plasticidade sináptica, aprendizado, memória, dano neuronal pós-isquemia ou hipoglicemia, epilepsia e outras doenças neurodegenerativas, dependência e tolerância a drogas, dor neuropática, ansiedade e

depressão (Meldrum, 2000; Ottersen & Storm-Mathisen, 2000). No entanto, o presente estudo enfocará a participação dos receptores de glutamato do subtipo NMDA no medo e na ansiedade, em especial na modulação de respostas defensivas organizadas pela MCPD e a relação da sua ativação com a síntese do óxido nítrico.

Diversas evidências têm demonstrado que microinjeções de agonistas de receptores de glutamato (NMDA e Metabotrópicos) na MCPD produzem reações explosivas de fuga características de reações de defesa proximal (fuga e saltos) tanto em ratos como em camundongos (Bandler & Carrive, 1988; Molchanov & Guimarães, 1999; Miguel & Nunes-de-Souza, 2006), enquanto antagonistas de receptores de NMDA e não NMDA na mesma região atenuam as reações de defesa em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE) (Guimarães et al., 1991; Matheus & Guimarães, 1997). Além disso, em doses baixas, a microinjeção de glutamato, agonista ou co-agonista NMDA intra-MCPD de ratos intensifica comportamentos defensivos no LCE, tais como a esquiva dos braços abertos e a avaliação de risco (Carobrez et al., 2001; Carobrez, 2003). Existem evidências sugestivas de que a ação proaversiva dos aminoácidos excitatórios (AAEs- sendo o glutamato o principal) está relacionada a ativação da síntese de óxido nítrico (NO), possivelmente induzida quando receptores glutamatérgicos, principalmente NMDA (Garthwaite et al., 1988), embora também os receptores AMPA, cainato e metabotrópicos (Southam et al., 1991; Okada, 1992) são ativados.

O NO é um gás altamente reativo e difusível, que atua como um mensageiro intercelular no sistema nervoso central (Dawson & Snyder, 1994). Sendo considerado um neurotransmissor atípico devido as suas características físico-químicas (Gally et al., 1990), atravessa facilmente membranas biológicas, não é armazenado em vesículas, é produzido quando necessário e rapidamente degradado e

sua sinalização não está restrita a uma única sinapse, podendo se propagar por centenas de micrômetros (Wood & Garthwaite, 1994). Dentro do neurônio, o NO é produzido principalmente pela atividade de uma isoenzima NOS (do inglês *Nitric oxide synthase*) denominada de NOS neuronal (NOSn), dentre três isoformas existentes. Estudos anatômicos têm demonstrado que neurônios produtores de NO, que contém a NOS, estão amplamente distribuídos em estruturas encefálicas envolvidas na modulação de comportamentos defensivos de ratos, tais como hipotálamo, amígdala e MCPD (Vincent & Kimura, 1992). Corroborando esses achados, Beijamini e Guimarães (2006) demonstraram que a exposição de ratos a um predador natural, o gato, provoca ativação de neurônios positivos para a NOS em várias estruturas encefálicas (dentre elas a MCPD), detectada por meio de imunohistoquímica para NADPH-diaforase (co-fator indispensável para NOS). No entanto, essa ativação é reduzida quando os animais são pré-tratados intracerebroventricularmente com o antagonista de receptor NMDA, ácido 2-amino 7-fosfoheptanóico (AP-7), fortalecendo assim, a relação de efeito entre glutamato e NO.

De grande interesse para o presente estudo, são os resultados de Leger e colaboradores (1998), que indicam a presença substancial de corpos celulares que expressam a isoenzima NOSn na MCPD de camundongos. Em concordância com esse dado, recente estudo conduzido em nosso laboratório (Miguel & Nunes-de-Souza, 2006) demonstrou que a microinjeção do inibidor seletivo da NOSn, NPLA (N-propil-L-arginina), na MCPD de camundongos, atenua comportamentos defensivos do tipo fuga e saltos induzidos pela infusão do agonista de receptor NMDA no mesmo sítio. Cabe ressaltar que a administração intra-MCPD de L-NAME (N ω -nitro-L-arginina-metil-éster) e L-NOARG (N ω -nitro-L-arginina), inibidores não seletivos da NOS, também atenuam as reações de defesa tanto em ratos (Guimarães et

al., 1994; De Oliveira et al., 1997, 2001) como em camundongos (Cabral et al., 2003) avaliadas no LCE. Além disso, foi observado que microinjeções de doadores de NO na MCPD, como o cloreto de 3-morfolinossilnomina (SIN-1) e dietilamina do óxido nítrico (DEA/NO), provocam reações de fuga em ratos (De Oliveira et al., 2000). Reforçando ainda mais o envolvimento do NO com as ações glutamatérgicas, injeções de AP-7 e NBQX, antagonistas de receptores glutamatérgicos NMDA e AMPA/Cainato, respectivamente, inibem a resposta de fuga eliciada pelo SIN-1 na MCPD de ratos (Moreira et al, 2004).

Em conjunto, as evidências discutidas acima sugerem que o NO está envolvido na organização e expressão de respostas defensivas via ativação, principalmente, de receptores NMDA na MCPD, indicando uma possível participação desses compostos na regulação dos estados emocionais de medo e ansiedade. É relevante mencionar que o glutamato e o NO parecem estar também envolvidos na liberação de outros neurotransmissores, como o GABA (ácido gama-amino-butírico), acetilcolina, serotonina, noradrenalina, dopamina, histamina, purinas e neuropeptídeos, como o CRF (Cratty & Birkle, 1999; Prast & Philippu, 2001).

3.4.3 Fator Liberador de Corticotropina (CRF)

É crescente o número de evidências experimentais demonstrando o envolvimento do fator liberador de corticotropina (mais conhecido pela sigla em inglês CRF) na gênese dos transtornos de medo e ansiedade (Muller & Wurst, 2004). O CRF, um neuropeptídeo de 41 aminoácidos, tem sido considerado um componente importante na coordenação das respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais associadas ao estresse e

ansiedade (Dunn & Berridge, 1990; Koob et al., 1993; Arborelius et al., 1999).

No eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), o CRF controla a secreção de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) que, por sua vez, induz a secreção de glicocorticóides do córtex adrenal (Vale et al., 1981; Rivier et al., 2003). Além das funções neuroendócrinas, o CRF também é amplamente distribuído no sistema nervoso central (SNC), agindo como neurotransmissor ou neuromodulador (Sawchenko et al., 1993; De Souza, 1987, 1995). Enquanto os neurônios que contêm CRF endócrino concentram-se no núcleo paraventricular do hipotálamo, os demais se distribuem difusamente em regiões límbicas e neocorticais relacionadas com as emoções (Graeff, 1994).

As respostas fisiológicas e comportamentais coordenadas pelo CRF ocorrem por meio da ativação de dois subtipos de receptores CRF ligados à proteína G, conhecidos como CRF1 e CRF2, os quais apresentam especificidade farmacológica e distribuição regional distintas no SNC (Swanson et al., 1983; Koob & Heinrichs, 1999; Van Pett et al., 2000). Os receptores CRF1 são encontrados predominantemente nas estruturas neocorticais, cerebelares e límbicas, enquanto a expressão do receptor CRF2 é geralmente localizada nas estruturas subcorticais, sobretudo no septo lateral e várias áreas hipotalâmicas (Chalmer et al., 1995).

O estudo do papel funcional de neurônios contendo CRF e de subtipos de receptores CRF na mediação química do medo e ansiedade vem crescendo significativamente nos últimos anos. Evidências oriundas de estudos anatômicos têm indicado a presença de neurônios CRF-érgicos e de subtipos dos receptores de CRF em várias estruturas encefálicas (Swanson et al., 1983; Van Pett et al., 2000) intimamente relacionadas ao medo e a ansiedade como os núcleos da amígdala,

hipocampo, núcleo intersticial da estria terminal, núcleos da rafe e a matéria cinzenta periaquedutal (Millan, 2002). De fato, diversos experimentos têm demonstrado que a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de CRF intensifica comportamentos defensivos em roedores submetidos a situações aversivas em vários modelos animais de ansiedade (Baldwin et al., 1991; Radulovic et al., 1999; Griebel, 1999; Arborelius et al., 1999). Além disso, camundongos transgênicos que expressam elevados níveis de CRF endógenos apresentam perfil comportamental com características ansiogênicas (Griegel, 1999). Por outro lado, uma série de evidências têm sido apresentadas demonstrando efeito ansiolítico na administração i.c.v. ou intraperitoneal de antagonistas de receptores CRF1 ou CRF2 em vários modelos animais de ansiedade. Dentre eles, a bateria de testes de defesa em camundongos (Griebel et al., 1998), labirinto em cruz elevado (Lundkvist et al., 1996, Griebel et al., 1998, Takahashi et al., 2001), arena (Takahashi et al., 2001) e sobressalto potencializado pelo medo (Risbrough et al., 2004).

Visando delinear estruturas encefálicas específicas, nas quais o CRF possa modular o comportamento defensivo, vários estudos utilizando microinjeções de CRF ou agonistas de receptores de CRF em sítios específicos têm sido realizados (para uma revisão ver Griebel, 1999). Esses estudos indicam a participação da neurotransmissão CRF-érgica em várias estruturas já conhecidamente envolvidas na modulação de respostas de medo e ansiedade tais como a amígdala, hipotálamo, locus coeruleus e a MCP. Inserido no contexto do presente estudo, Martins e colaboradores (1997), usando o modelo do labirinto em cruz elevado (LCE), demonstraram que a injeção intra-MCPD de CRF elicia alterações comportamentais sugestivas de efeito ansiogênico, indicando a participação desse neuropeptídeo na

modulação das respostas defensivas elaboradas pela MCPD. Esses pesquisadores reverteram os efeitos ansiogênicos do CRF exógeno através da microinjeção local do antagonista não seletivo de receptores de CRF, o CRF₉₋₄₁ α -helical, confirmando assim a participação específica de receptores CRF nos comportamentos defensivos elaborados pela MCPD (Martins et al., 1997). Muitas evidências até o momento apontam para a participação mais relevante dos receptores do subtipo CRF1 na mediação dos comportamentos defensivos (para uma revisão ver Griebel, 1999; Takahashi, 2001). No entanto, na MCP tanto de ratos como de camundongos, são expressos RNAs mensageiros para ambos os subtipos de receptores, CRF1 e CRF2 (Van Pett et al., 2000). Nesse sentido, é importante a realização de estudos adicionais visando um maior entendimento da participação dos receptores CRF na modulação das respostas de medo e ansiedade na MCP.

De maneira geral, é importante ressaltar que as respostas comportamentais de defesa que os animais exibem frente a estímulos ameaçadores e a manipulação farmacológica, central ou periférica, são as bases dos modelos animais existentes usados como ferramentas para investigação de novos fármacos e dos mecanismos neurais subjacentes aos transtornos de ansiedade (ver Blanchard et al., 2001; Graeff & Zangrossi, 2002).

3.5 Modelos Animais de Ansiedade/Medo

As últimas décadas têm assistido ao crescente interesse pelo desenvolvimento e utilização de modelos animais visando o entendimento da neurobiologia dos estados emocionais de medo e ansiedade. As diferentes estratégias comportamentais defensivas (ex. fuga, esquiva, avaliação de risco e outras) adotadas pelos animais de

laboratório (principalmente roedores) diante de condições ou situações aversivas, proporcionadas por diferentes tipos de modelos animais de ansiedade, têm sido relacionadas aos estados de medo/ansiedade (Blanchard et al., 2001; Graeff & Zangrossi, 2002). Assim, estudando-se o substrato neural de tais comportamentos pode-se desvendar, pelo menos em parte, as bases neurais relacionadas aos transtornos de medo e ansiedade. Para essa finalidade, os laboratórios de pesquisa têm utilizado diversos modelos animais de ansiedade em conjunto com procedimentos de manipulação do sistema nervoso central (SNC), tais como análise da marcação de proteína Fos, lesão e injeção de drogas em estruturas encefálicas específicas. Como foco do presente estudo, descreveremos sucintamente o modelo da estimulação química da MCPD e os modelos etologicamente fundamentados, a Bateria de testes de defesa para camundongos (do inglês *Mouse Defense test Battery* -.MDTB) e o Teste de Exposição ao Rato (do inglês *Rat Exposure Test* - RET).

3.5.1 Estimulação Química da MCPD

A estimulação elétrica de estruturas encefálicas subcorticais em animais foi o primeiro procedimento experimental sugerido para o estudo das reações de defesa relacionadas ao medo e ansiedade (Hess & Brugger, 1943). Essa técnica amplamente empregada por vários laboratórios atualmente, possui algumas desvantagens, como a falta de especificidade e seletividade da região estimulada, uma vez que tanto os corpos neuronais como fibras de passagem são atingidas pela corrente elétrica, impossibilitando a determinação exata da localização da população de neurônios ativados. Nesse sentido, a técnica de estimulação química com aminoácidos excitatórios mostra-se mais seletiva e específica, visto que apenas os corpos celulares e seus dendritos (mas não axônios de passagem) são estimulados

(Goodchild et al., 1982). De fato, uma série de estudos usando essa técnica (ver Bandler & Depaulis, 1991) demonstrou a localização da população de neurônios responsáveis pelas reações de defesa dentro da MCP.

A estimulação química da MCPD tem sido muito utilizada para o estudo das reações de defesa, principalmente fuga, e vários pesquisadores têm relacionado essa resposta aos ataques de pânico em humanos (Graeff, 1994; Graeff & Zangrossi, 2002; Bittencourt et al., 2005). A microinjeção (estimulação química) com aminoácidos excitatórios, tais como o D,L-homocisteico (DLH) e o L-glutamato, feita na porção caudal da MCPD, gera respostas comportamentais defensivas do tipo corrida e saltos característicos de reações de defesa à ameaça proximal (Bandler et al., 1985; Hilton & Redfern 1986; Beckett et al., 1992). Essas respostas comportamentais, com curto período de duração (40-60s após a microinjeção do AAE), são quantificadas através da duração da corrida ou distância percorrida e números de saltos realizados em uma arena. No entanto, cabe ressaltar que após a resposta de fuga explosiva inicial (primeiro minuto), os animais apresentam comportamento que pode ser denominado de congelamento ou imobilidade que pode perdurar por um período mais longo (Beckett et al., 1990; Carvalho-Netto & Nunes-de-Souza, 2004b; Miguel & Nunes-de-Souza, 2006). Entretanto, não está claro se essa última resposta é parte do repertório induzido pelo AAEs ou é uma resposta inespecífica devido ao cansaço ou desgaste físico que o animal apresenta após o período inicial de fuga explosiva.

Recentemente, investigando as respostas comportamentais em camundongos induzidas pela estimulação química da MCPD com o ácido DLH (Carvalho-Netto & Nunes-de-Souza, 2004b), observamos que os animais exibiam, além de fuga explosiva com vários saltos pouco orientados, muitas colisões contra as paredes de uma arena (23 cm de diâmetro) onde eram

testados. Os pesquisadores Robert e Caroline Blanchard, da Universidade do Havaí, após minuciosa análise dos nossos resultados, sugeriram que os comportamentos eliciados pela estimulação química da MCPD em camundongos poderiam ser, pelo menos em parte, modulados pelo ambiente no quais os animais eram testados. Esta hipótese foi investigada no presente estudo, que teve a colaboração desses pesquisadores. Assim, investigamos as respostas comportamentais induzidas pela microinjeção intra-MCPD de DLH em diferentes situações ou ambientes - um com grande disponibilidade de espaço (o MDTB) e o outro não (como uma arena). Além disso, com base nas evidências discutidas acima, que sugerem ser a estimulação da MCPD eliciadora de respostas defensivas semelhantes às reações induzidas por estímulos aversivos naturais (como o confronto com predador), o presente estudo também avaliou a habilidade dos animais de reagirem a estímulos aversivos (predador) durante o período inicial (nos 60s iniciais) do efeito do ácido DLH (fuga explosiva), e imediatamente após esse período, no qual o animal se mostra quiescente ou imóvel.

3.5.2 Bateria de Testes de Defesa para Camundongos (MDTB)

O comportamento defensivo observado durante o encontro de roedores com o seu predador natural tem sido amplamente descrito e estudado pelos pesquisadores Robert e Caroline Blanchard e colaboradores. As características do ambiente no qual ocorre a exposição e a distância na qual se encontra o predador são determinantes para a escolha de estratégias comportamentais. Acredita-se que o emprego de estímulos naturais permite maior confiabilidade na evocação de estados emocionais e comportamentos defensivos de uma determinada espécie.

Nesse sentido, o MDTB é um modelo animal proposto para avaliar diferentes estratégias comportamentais (ex. esquiva, fuga, congelamento, ameaça e ataque defensivo) em camundongos diante do confronto direto com o predador (rato). É importante mencionar que várias evidências da literatura confirmam a condição do rato como predador natural do camundongo (Rylov, 1985; De Catanzaro, 1988; Nikulina, 1991; Wuensch, 1992). O procedimento experimental do MDTB é conduzido numa grande pista oval (4,8 m) e é composto de seguidas etapas controladas pelo experimentador (segurando um rato anestesiado), que primeiro aproxima, depois persegue e por fim realiza o contato do predador com a presa. Vários estudos de validação comportamental, conduzidos com objetivo de delinear em detalhe os comportamentos defensivos exibidos por camundongos diante do confronto com o predador (para uma revisão ver Blanchard et al., 2001) demonstraram consistentes respostas de esquiva e fuga do predador, bem como vocalização, ameaça e ataques defensivos durante o contato com o rato.

Estudos farmacológicos enfatizam que o MDTB apresenta alta validade de predição para o estudo das reações de defesa relacionadas com medo/ansiedade, especificamente ao pânico, pois o tratamento crônico com compostos clinicamente considerados panicolíticos, como o benzodiazepínico de alta potência alprazolam, e os antidepressivos imipramina e fluoxetina, reduzem o índice de fuga no modelo. Cabe ressaltar também, que tanto o alprazolam como esses antidepressivos não exibem efeitos ou apresentam efeitos aversivos no modelo, respectivamente, quando administrados agudamente. Por outro lado, compostos considerados panicogênicos (ver Blanchard et al., 2001; 2003), como a ioimbina, a cocaína e o flumazenil exacerbam a resposta de fuga de camundongos no modelo, reforçando as analogias do teste e o TP.

Diante dessas evidências, o MDTB é sugerido como um modelo para o estudo dos mecanismos neurais que comandam as respostas comportamentais frente à ameaça proximal (fuga e luta) relacionadas às patologias do sistema de defesa humana como o TP. O modelo também pode ser útil para a investigação e *screening* de novos compostos farmacológicos usados para o alívio do transtorno do pânico (Blanchard et al., 2003). Por essa razão, utilizamos o MDTB, um modelo etologicamente fundamentado, e algumas ferramentas farmacológicas para investigarmos a participação da MCPD nessas reações de defesa proximais induzidas pelo confronto com o predador.

3.5.3 Teste de Exposição ao Rato (RET)

O RET é um novo modelo animal desenvolvido no laboratório de Robert e Caroline Blanchard, que também visa investigar a interação presa-predador. No entanto, diferente do MDTB, o modelo permite que a presa (ex. camundongo) escolha aproximar-se ou afastar-se do predador (ex. rato) (Yang et al., 2004). O RET é constituído de dois compartimentos interligados por um túnel. O primeiro compartimento é dividido em duas partes, uma onde se encontra o predador isolado por uma tela de arame, e outra, chamada de superfície, que permite a aproximação da presa ao compartimento do predador. O outro compartimento, uma pequena caixa, está separado da superfície através de um túnel e serve como abrigo (toca) para o camundongo durante o período de exposição ao rato. O modelo em questão possibilita a expressão de diferentes comportamentos defensivos, tais como, esquiva, avaliação de risco, congelamento, comportamento de ocultação defensiva (caracterizado pelo comportamento do camundongo em colocar maravalhas sobre a entrada do túnel) e auto-limpeza. Cabe ressaltar que o modelo do RET se destaca por eliciar marcante

resposta de avaliação de risco na presa, sendo essa, uma das principais vantagens desse modelo em relação a outros, tais como o LCE, o de transição claro-escuro e o MDTB.

Recentes resultados farmacológicos obtidos com o tratamento sistêmico com os ansiolíticos clássicos, como o agonista benzodiazepínico, diazepam, e o agonista serotoninérgico $5HT_{1A}$, buspirona, sugerem que o modelo apresenta boa previsibilidade farmacológica para o estudo do transtorno de ansiedade, uma vez que os comportamentos de avaliação de risco e esquiva do predador foram claramente reduzidos com o tratamento (Blanchard et al., 2004).

Portanto, devido às características do modelo RET, que possibilita uma consistente mensuração de comportamentos mais sutis e elaborados, como por exemplo a esquiva e a avaliação de risco, o presente estudo utilizou o aparato juntamente com ferramentas farmacológicas para investigar a participação da MCPD na modulação e expressão desses comportamentos em camundongos.

4.OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a participação da MCPD na modulação de diferentes comportamentos defensivos de camundongos induzidos por métodos artificial (estimulação química) e naturalístico (exposição ao predador).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Utilizando a estimulação química como principal estímulo aversivo, a primeira etapa (Etapa 1) do presente estudo teve como propósitos:

- Investigar o padrão de resposta comportamental induzida pela infusão do ácido DLH na MCPD de camundongos em duas situações diferentes: uma com maior disponibilidade de espaço, como o MDTB, e a outra com uma menor disponibilidade, como uma arena.
- Avaliar as reações de defesa de camundongos em confronto com o predador imediatamente após a resposta de fuga explosiva induzida pela infusão do DLH intra-MCPD (período de imobilidade).
- Investigar a habilidade dos animais de reagirem a estímulos ambientais neutros e aversivos, como o predador, durante o período de fuga explosiva provocado pela infusão do DLH.

Numa segunda etapa (Etapa 2), empregando estímulos naturais na evocação de estados emocionais e comportamentos defensivos relacionados à espécie, o presente estudo teve como propósitos:

- Avaliar os efeitos da injeção intra-MCPD do agonista glutamatérgico NMDA e do inibidor da síntese da NOS neuronal (NOSn), NPLA, no comportamento defensivo de camundongos submetidos ao RET.

-Avaliar os efeitos da injeção intra-MCPD do agonista não seletivo de receptor de CRF, ovine CRF, em dois modelos animais de ansiedade baseados na interação presa-predador: o MDTB e o RET.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss e Swiss-Webster (30-40 g), machos, provenientes, respectivamente, do biotério central da Universidade Estadual Paulista – UNESP e da Universidade do Havaí –UH. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 07:00 h), com livre acesso ao alimento e a água, exceto durante os curtos intervalos de testes.

5.2 Equipamentos

Para a avaliação das respostas comportamentais induzidas pela estimulação química em dois ambientes físicos diferentes foram utilizados uma arena retangular (28 cm x 24 cm x 35 cm), com assoalho constituído de madeira escura com 3 paredes de plástico escuro e uma com plástico transparente (através da qual podia ser gravado o experimento) e o aparelho do MDTB. O MDTB (ver figura 2) é uma pista oval (0,4 m largura, 0,3 m de altura e 4,8m de comprimento total), constituída de dois segmentos retos (2 m) unidos por dois segmentos curvados (0,4m), separados por uma parede mediana removível (2 x 0,3 x 0,6m). O aparelho é elevado a 0,8 m do solo, possibilitando que o experimentador segure o rato anestesiado confortavelmente e minimize o campo de visão do camundongo em relação ao experimentador. Todo o aparelho é constituído de plástico escuro e o assoalho é tracejado (dividido) a cada 20 cm para que as medidas da distância percorrida e velocidade sejam calculadas.

O RET (Yang et al., 2004) é uma caixa de plástico transparente (46 x 24 x 12 cm) dividida em dois compartimentos de igual tamanho por uma tela de arame (ver figura 2). Um dos compartimentos (superfície) é conectado a uma caixa menor (7 x 7 x 12 cm), feita de plástico escuro exceto uma parede lateral que é feita de plástico transparente (para facilitar a filmagem), através de um túnel de plástico transparente

4,4 cm de diâmetro, 13 cm de comprimento e elevado 1,5 cm em relação ao assoalho das duas outras caixas. A caixa menor é usada como abrigo (toca) para o camundongo durante o teste. Todos os experimentos foram gravados através de sistema de circuito fechado de câmera, DVD e televisão.

Figura 2. Visão geral dos modelos MDTB e RET.

5.3 Cirurgia e administração de drogas na MCPD

Os camundongos receberam implantação craniana de cânula-guia (26-gauge) de 7 mm de comprimento, após anestesia com tiopental sódico (90 mg/kg, i.p.). A cânula foi fixada no crânio do animal com cimento acrílico. As coordenadas estereotáxicas para implantação da cânula-guia foram: 4,16 mm posterior ao bregma, 1,32 mm lateral à linha média, 2,23 mm ventral a superfície craniana, ângulo de 26°, sendo a ponta da cânula-guia posicionada 1 mm dorsal à estrutura alvo. Tais coordenadas foram baseadas no atlas de Paxinos e Franklin (2001). Ao final da cirurgia os animais receberam 0,1 ml de pentabiótico via intramuscular.

No dia do teste, foi inserida uma agulha de injeção (33-gauge) dentro de cada cânula-guia para a infusão das soluções na MCPD. Com seu tamanho ultrapassando em comprimento 1 mm a ponta de cada cânula-guia, a agulha de injeção foi conectada, por meio de um tubo de polietileno (PE-10), a uma microseringa Hamilton de 5,0 µl. Uma bomba de infusão (Insight BI 2000 ou Harvard, 2000) foi programada para injetar 0,1 µl/10 seg ou 0,1 µl/30seg (ver procedimentos), sendo 0,1 µl o volume total injetado em cada animal. Após a microinjeção, a agulha de injeção permanecia por mais 30 segundos no interior da cânula guia para certificação do escoamento da solução, exceto para os experimentos da Etapa1. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno durante as injeções foi usado para confirmar o fluxo da solução.

5.4 Drogas

Foram utilizados os seguintes compostos: ácido D,L-homocistéico (DLH, Sigma), na dose de 5 nmol, Ácido N-metil-D-aspartico (NMDA, RBI), agonista de receptores glutamatérgicos tipo NMDA, nas doses de 0,02 e 0,04 nmol, N ω -propil-L-arginina (NPLA – Tocris Cookson Inc., Ballwin), um inibidor de NOS altamente seletivo para NOS neuronal (NOSn) (K_i = 57nM), na dose de 0,4 nmol e o fator liberador de corticotropina, Ovino (oCRF, Anaspec), nas doses de 30 e 100 ng. DLH, ovino CRF, NMDA e NPLA foram dissolvidos em soro fisiológico (0,9% NaCl) ou em líquido encéfalo raquidiano. As doses utilizadas dos compostos descritos acima foram baseadas em estudos anteriores (Beckett et al., 1992; Stiedl et al., 2005; Miguel & Nunes-de-Souza, 2006).

5.5 Procedimentos

5.5.1 Etapa 1. Estimulação Química

5.5.1.1 Experimento 1. Avaliação das respostas comportamentais induzidas pelo DLH em duas situações diferentes: Arena x MDTB

Após um período de cinco dias de recuperação da cirurgia, os animais foram conduzidos até a sala experimental, onde permaneceram por um período de habituação de 1 hora. Os animais foram separados aleatoriamente em 4 grupos (n= 8-10): dois grupos foram injetados com 5 nmol de DLH (0,1 µl em 10s) ou salina e, em seguida, cada animal foi colocado na arena teste. Os outros dois grupos receberam o mesmo tratamento farmacológico, porém, cada animal foi imediatamente colocado no aparelho do MDTB. Os comportamentos resultantes foram gravados e observados durante 1 min. Foram eles:

- **Salto (frequência):** caracterizado por pulos direcionados ou não para a borda do aparelho, nos quais os camundongos tiravam as quatro patas do solo. Para o grupo tratado com DLH e submetido à arena teste (onde a maioria dos saltos aconteceu), os dados foram analisados como percentagem de saltos precedidos ou não por contato de parte da cabeça do animal com as paredes do aparato.
- **Galope (tempo):** rápida corrida alternando entre as patas anteriores e posteriores.
- **Trote (tempo):** Corrida mantendo o padrão de andar.
- **Deambulação (tempo):** Locomoção.
- **Congelamento (tempo):** caracterizado por ausência total de movimento, exceto o de respiração (enquanto o animal assume uma postura tensa).
- **Contato facial (frequência):** o animal toca ou choca-se contra uma das paredes da arena ou MDTB com o focinho ou outra parte da cabeça.

- **Contato lateral (frequência):** enquanto corre (galope ou trote), o animal colide ou toca lateralmente nas paredes da arena ou MDTB com o tronco ou as vibrissas.
- **Levantamento (frequência):** número de vezes que o camundongo permanece na postura bípede, apoiando-se nas paredes da arena com as patas dianteiras.

A distância percorrida por cada animal na arena ou MDTB foi medida durante os primeiros 20 segundos.

5.5.1.2 Experimento 2. Procedimento padrão no MDTB.

Imediatamente após o teste inicial (1 mim no MDTB ou arena), todos os animais, independentemente do tratamento ou condição teste anterior, foram submetidos ao teste padrão do MDTB. As tarefas avaliadas no procedimento tradicional estão descritas abaixo, exceto o pré-teste, que por motivo de duração da resposta da estimulação química, não foi realizado.

Teste de esquiva do predador: Imediatamente após o camundongo ser colocado no aparelho, um rato anestesiado seguro pelo experimentador foi introduzido dentro da pista oval e conduzido em direção ao camundongo numa velocidade média aproximada de 0,5 m/s. A aproximação foi interrompida quando havia o contato ou quando o camundongo se esquivava da aproximação do rato. Foram registradas a distância inicial, na qual o camundongo se esquivava do predador, e a frequência de esquivas. O procedimento foi repetido por 5 vezes.

Teste de perseguição e fuga: Nesse procedimento, o rato anestesiado foi conduzido em direção ao camundongo (15 m de perseguição, ~ 3 voltas no aparato) numa velocidade aproximadamente de 2 m/s. Foram calculadas as velocidades média e

máxima de fuga atingidas durante o segmento reto do aparelho. Além disso, foram registrados os números de parada (interrupções da fuga) e de inversão da rota de fuga (camundongo para e corre na direção oposta).

Teste do corredor sem saída: Nesse procedimento, a pista oval foi convertida num corredor sem saída através do fechamento (com portões removíveis) das junções do segmento reto do aparelho com os curvados. O experimentador mantinha o rato a uma distância de 60 cm do camundongo, durante três períodos de 30 segundos. Os comportamentos registrados foram: tempo de congelamento, frequências de aproximações e retiradas (camundongo movia-se em direção ao rato percorrendo uma distância igual ou superior a 20 cm e então retornava), de contato com o predador (o animal tocava ou quase tocava o predador) e frequência de saltos visando escapar (saltos defensivos-SD) do aparelho.

Teste de Contato Forçado: Finalmente, com o corredor reduzido (40 cm), o experimentador realizava 5 rápidos contatos do predador (rato) com o camundongo, sendo registradas as frequências de: mordidas no rato, vocalização, postura de levantar defensivo (*defensive upright*) e saltos defensivos. Esse procedimento (Contato Forçado) foi repetido por 3 vezes.

Pós-teste: Defesa contextual: Imediatamente após o teste do corredor sem saída, o predador foi removido e os portões foram retirados deixando o animal livre. Nesse teste, foram registrados os números de (a) cruzamentos das linhas desenhadas no solo do aparelho, (b) levantamento e (c) saltos de fuga do contexto (SD).

Todos os experimentos foram gravados através de um circuito interno de câmera-TV-DVD.

5.5.1.3 Experimento 3. Avaliação da capacidade de reação de camundongos a estímulos ambientais durante o efeito máximo do DLH (fuga explosiva).

Com o objetivo de avaliar a habilidade dos camundongos de reagirem a estímulos naturalmente ameaçadores ou não para a espécie, ambos os grupos controles do experimento anterior receberam injeção intra-MCPD com a mesma dose do ácido DLH 24 horas após o Experimento 2. Em seguida, cada animal foi colocado no aparelho do MDTB. Durante a resposta de fuga (durava em média 40-60s), o caminho do animal foi bloqueado uma vez pelo fechamento de uma porta no final da reta do aparelho e três vezes por um rato anestesiado seguro pelo experimentador. Para avaliar as tentativas de esquiva dos estímulos ambientais, foi realizada uma contagem quadro-a-quadro (câmera lenta -1/30 quadros) da gravação da resposta em DVD. Essa contagem teve início no momento que o animal estava a 60 cm do estímulo (porta ou rato). Uma vez que o assoalho do MDTB é dividido por linhas perpendiculares dispostas a cada 20 cm, essa contagem foi realizada em três blocos de 20 cm. O procedimento visou avaliar se o animal seria capaz de diminuir sua velocidade para evitar o choque ou contato com a porta ou com o predador.

5.5.2 Etapa 2. Exposição ao Predador

5.5.2.1 Experimento 4. Efeito do NMDA e NPLA intra-MCPD avaliado no RET.

Como descrito acima, os animais passaram pelo mesmo procedimento de recuperação pós-cirúrgica. Posteriormente, cada camundongo foi individualmente submetido ao procedimento de habituação ao aparelho do RET.

Fase 1. Habituação: Cada camundongo foi colocado na superfície central da caixa de exposição por um período de 10 min de livre exploração sem a presença do rato. A maravalha da caixa moradia de cada animal era colocada nos compartimentos

superfície e toca para facilitar a habituação. Esse procedimento foi repetido por 3 dias consecutivos.

No quarto dia (dia do teste) os animais foram alocados em 6 grupos e submetidos ao procedimento de microinjeção intra-MCPD de salina ou NPLA (0,4 nmol/0,1 µl em 30 segundos) e, após 10 minutos, receberam outra injeção local de salina ou NMDA (0,02 nmol ou 0,04 nmol/0,1 µl em 30 s). Novamente, dez minutos após, cada animal foi levado ao aparelho do RET para realização do teste de exposição ao predador. Em resumo, foram formados seis grupos, a saber:

- Salina como primeira injeção + salina como segunda injeção após os 10 minutos (Salina + Salina).
- Salina + NMDA 0,02 nmol/0,1 µl
- Salina + NMDA 0,04 nmol/0,1 µl
- NPLA 0,4 nmol/0,1 µl + Salina
- NPLA 0,4 nmol/0,1 µl + NMDA 0,02 nmol/0,1 µl
- NPLA 0,4 nmol/0,1 µl + NMDA 0,04 nmol/0,1 µl

Fase 2. Teste de Exposição: No quarto dia, um rato macho Holtzman pesando 600 g (predador), tratado com apomorfina (3 mg/kg, i.p.) para mantê-lo em movimento durante o teste de exposição, foi introduzido no compartimento que o separava do camundongo por uma tela de arame. Em seguida, um camundongo tratado intra-MCPD com uma das soluções descritas acima foi colocado na superfície de exposição, compartimento que o separava do rato. A duração da exposição ao rato foi de 10 min para cada camundongo. Os parâmetros comportamentais registrados

foram medidas espaço-temporais e etológicas. As primeiras foram: tempo gasto na toca, túnel e superfície. Os tempos gastos em contato com a tela de arame (incluindo escalar a tela arame) foram registrados como tempo total de contato. As medidas etológicas foram: frequência e duração de avaliação de risco (AR: animal estica o corpo sem movimentar as patas traseiras e volta a posição inicial ou movimenta-se com corpo esticado) na toca, túnel ou na superfície, tempo total de congelamento, de ocultação defensiva (o camundongo empurra com as patas anteriores a maravalha da toca em direção ao túnel) e do comportamento de auto-limpeza.

5.5.2.2 Experimento 5. Efeito do ovineCRF intra-MCPD avaliado no MDTB e no RET.

Como descrito acima, os animais passaram pelo mesmo procedimento de recuperação pós-cirúrgica e habituação a sala experimental. No dia do teste, os animais foram alocados em 3 grupos e receberam os seguintes tratamentos intra-MCPD: ovineCRF 30 ng, 100 ng ou controle (líquido encéfalo-raquidiano-LER) (0,2 µl em 30 s). Após 8 min, os animais foram submetidos ao procedimento padrão no MDTB como descrito acima (Experimento 2.), exceto pela inclusão da exposição pré-teste (3 min para um período de adaptação e para o registro da atividade locomotora caracterizada por: frequência de cruzamentos das linhas desenhadas no assoalho e frequência de levantar).

Após o período de uma semana, todos os animais foram reutilizados para o RET. Para tal, os procedimentos de habituação ao RET, microinjeção e exposição ao rato (Long-Evans) foram semelhantes ao Experimento 4, porém os grupos receberam diferentes doses em relação ao primeiro teste.

5.6 Histologia- Após o término dos experimentos, os camundongos foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (80 mg/kg) e receberam injeção intra-MCPD de uma solução de 1% de azul de metileno (procedimento semelhante ao descrito acima para a injeção das soluções). Os animais foram perfundidos com salina e formalina 10% e então decapitados, e seus encéfalos removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) e sacarose (20%) para, posteriormente, sofrerem secções coronais ao longo do trajeto da cânula com auxílio de um criostato (Leica CM 1850). As secções (60 µm) foram inspecionadas com o uso de um microscópio (Leica DMLB) e a visualização da dispersão do azul de metileno foi usada para indicar o local da injeção.

5.7 Análise Estatística

Para análise dos dados foi utilizado o programa STATISTICA na versão 6. Os resultados dos Experimentos 1 e 2 foram analisados pela ANOVA fatorial 2x2 (tratamento e situação). Nos casos em que foram obtidos valores significantes no efeito tratamento ou interação (droga x situação), as análises foram seguidas pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Para análise do Experimento 3, foi utilizada a ANOVA para medidas repetidas.

Todos os resultados dos Experimentos 4 e 5 foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade de Levene. Posteriormente, os resultados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) unifatorial, seguida pelo teste de Duncan (dados paramétricos) ou pela ANOVA não-paramétrica Kruskal-Wallis,

seguida pelo teste de Mann-Whitney (não paramétricos). Foram considerados significativos os valores de $P \leq 0,05$.

5.8 Ética

Os experimentos realizados nestes estudos estão em acordo com as normas do Comitê de Ética da Universidade do Havaí e da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), que são baseadas nas normas do “*US National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*”.

6.RESULTADOS

As ilustrações dos sítios de injeção na MCPD dos experimentos descritos abaixo se encontram na figura 5 (Experimento 4) e nos artigos em anexo (Experimentos 1-3 e 5).

6.1 Estimulação Química (Etapa 1)

6.1.1 Experimento 1. Avaliação das respostas comportamentais induzidas pelo DLH em duas situações diferentes: Arena x MDTB

Como demonstrado nas figuras 3 e 4, a ANOVA fatorial revelou um efeito do fator tratamento para maioria dos comportamentos [frequência de saltos: $F(1,31)=25,7$ $p<0,001$; frequência de contato facial: $F(1,31)=10,3$ $p<0,05$; frequência de contato lateral: $F(1,31)=34,9$ $p<0,001$; duração de galope: $F(1,31)=66,8$ $p<0,001$; duração de trote: $F(1,31)=93,7$ $p<0,001$; duração de deambulação: $F(1,31)=234,6$ $p<0,001$; duração de congelamento: $F(1,31)=7,1$ $p<0,05$ (Fig.3); e distância percorrida: $F(1,31)=185,1$ $p<0,001$ (Fig.4)]. A ANOVA revelou um efeito do fator situação/aparato para os comportamentos saltos [$F(1,31)=19,6$ $p<0,001$], contato lateral [$F(1,31)=5,1$ $p<0,05$], levantar [$F(1,31)=5,54$ $p<0,05$], duração de galope [$F(1,31)=3,9$ $p>0,05$] e distância percorrida [$F(1,31)=16,3$ $p<0,001$].

A ANOVA fatorial também indicou um efeito da interação tratamento x situação, para saltos [$F(1,31)=19,6$ $p<0,001$], contato lateral [$F(1,31)=5,1$ $p<0,05$], galope [$F(1,31)=3,9$ $p>0,05$], deambular [$F(1,31)=7,1$ $p=0,01$] (fig. 3) e distância percorrida [$F(1,31)=15,1$ $p=0,0005$] (fig. 4). A ANOVA revelou uma tendência de efeito do contato facial [$F(1,31)=3,1$ $p=0,08$] na interação tratamento x situação, e não indicou significância para os comportamentos de levantar, trote e congelar. Para os animais tratados com DLH e observados na arena, a análise comportamental demonstrou que 87% dos saltos exibidos foram precedidos de contato de parte do

corpo, focinho ou vibrissas dos animais com uma ou mais paredes desse compartimento.

Figura 3. Efeito da injeção intra-MCPD do ácido DLH sobre a frequência (painel superior) e a duração (painel inferior) de comportamentos de camundongos avaliados em duas diferentes situações: Arena x MDTB (n= 9-10). As colunas representam as médias e as barras representam EPM. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle e # $p < 0,05$ em relação ao grupo testado na arena pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls.

Figura 4. Efeito da injeção intra-MCPD do ácido DLH sobre a distância percorrida em duas situações diferentes: Arena x MDTB. (n=9-10). As colunas representam as médias e as barras representam o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle e # $p < 0,05$ em relação ao grupo testado na arena pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls.

6.1.2 Experimento 2. Procedimento padrão no MDTB.

A tabela 1 ilustra os resultados comportamentais (média $\pm$ EPM e valores de F) de camundongos submetidos ao confronto com o predador no procedimento padrão do MDTB após os efeitos iniciais (60s iniciais) do ácido DLH intra-MCPD. A ANOVA fatorial não revelou efeito significativo nas tarefas do MDTB para os animais tratados intra-MCPD com DLH, independente da origem do animal (se proveniente da arena ou do próprio MDTB), exceto para o comportamento de salto defensivo no teste do corredor sem saída [$F(1,31)=5,9$ $p < 0,05$]. O teste- t para medidas independentes indicou uma diminuição na frequência de saltos para os animais tratados com DLH que tinham sido submetidos no primeiro minuto ao mesmo aparelho, comparado aos animais controle na mesma situação ($t=2,2$ $df=15$, $p < 0,05$). Todos os demais comportamentos não alcançaram diferenças significativas, sendo a frequência de mordidas no teste do contato forçado a que apresentou valor de F mais próximo da significância ($F=3,5$, $p=0,07$).

Tabela 1. Efeito da infusão intra-MCPD do ácido DLH sobre as respostas comportamentais de camundongos confrontados com o predador no procedimento padrão do MDTB, após o período inicial da resposta do ácido DLH (minuto inicial na Arena ou no MDTB, ver Material e Métodos para detalhes).

Comportamento	ARENA		MDTB		F(1,31)
	Salina	DLH	Salina	DLH	
Esquiva do Predador					
Distância esquiva (cm)	60,2 ± 15,2	22,0 ± 10,5	53,2 ± 13,1	46,0 ± 12,5	3,18
Frequência de esquiva	2,0 ± 0,5	0,6 ± 0,2	1,9 ± 0,4	1,9 ± 0,6	2,22
Fuga do Predador					
Vel. média (m/s)	0,51 ± 0,04	0,57 ± 0,07	0,59 ± 0,05	0,62 ± 0,08	0,45
Vel. Máxima (m/s)	0,89 ± 0,05	0,83 ± 0,04	0,96 ± 0,06	0,94 ± 0,12	0,30
Parada (F)	5,4 ± 1,1	2,6 ± 0,6	3,9 ± 1,2	3,2 ± 1,0	2,70
Inversão (F)	5,1 ± 1,1	2,8 ± 0,8	3,4 ± 1,1	3,0 ± 1,4	1,43
Corredor sem saída					
Aproximação e Retirada (F)	2,1 ± 0,4	1,9 ± 0,5	2,6 ± 0,3	2,6 ± 0,5	0,23
Contato c/ predador (F)	1,3 ± 0,4	1,4 ± 0,4	1,6 ± 0,6	1,3 ± 0,5	0,97
Salto defensivo (F)	1,1 ± 0,6	0,5 ± 0,1	4,3 ± 0,7	2,1 ± 0,6*	5,92
Congelamento (D)	4,8 ± 1,0	3,7 ± 0,9	2,1 ± 0,8	2,8 ± 1,4	0,54
Contato Forçado					
Lev. Defensivo (F)	9,5 ± 1,9	6,4 ± 1,3	5,6 ± 2,1	7,6 ± 1,2	0,13
Vocalização (F)	11,0 ± 1,4	7,7 ± 1,8	11,5 ± 1,8	11,1 ± 0,9	1,45
Mordidas (F)	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,4	0,5 ± 0,3	1,4 ± 0,7	3,54
Salto defensivo (F)	4,7 ± 2,2	7,0 ± 1,4	9,1 ± 2,0	7,6 ± 1,2	0,55
Pos-teste					
Cruzamento (F)	196,7 ± 22,1	169,3 ± 31,7	151,2 ± 22,0	162,3 ± 18,0	0,60
Levantamento (F)	32,4 ± 2,9	24,1 ± 4,4	24,1 ± 3,2	28,1 ± 5,0	0,15
Salto defensivo (F)	2,0 ± 0,9	0,7 ± 0,5	3,9 ± 1,2	2,3 ± 1,1	0,02

Os valores representam a média ± EPM. *P< 0,05 comparado ao grupo controle.

6.1.3 Experimento 3. Avaliação da capacidade de reação de camundongos a estímulos ambientais durante o efeito máximo do DLH (fuga explosiva).

A tabela 2 mostra que os animais não responderam a nenhum tipo de estímulo ambiental, seja ele aversivo ou não, durante a resposta de fuga provocada pelo composto DLH. Na contagem quadro-a-quadro (câmera lenta -1/30) da gravação da resposta em DVD, a ANOVA para medidas repetidas não indicou qualquer tendência de aumento do número de quadros contados com a proximidade do estímulo neutro [Porta $F(2,14)=1,0$ $p>0,05$] ou do estímulo aversivo, o rato: [1 tentativa $F(2,14)=0,81$ $p>0,05$], [2 tentativa $F(2,14)=1,36$ $p>0,05$] e [3 tentativa $F(2,14)=1,43$ $p>0,05$], indicando que os animais não reduziram a velocidade para evitar o choque com o estímulo ambiental. O número de quadros representa a velocidade na qual o animal se aproxima do estímulo neutro ou aversivo (4 quadros por segundo = 1,5 m/s ou 8,4 quadros= 0,71m/s).

Tabela 2. Demonstra a resposta dos animais sob pico de efeito inicial do ácido DLH (fuga explosiva) aos estímulos ambientais (porta ou rato).

Estímulo	Nº quadros no bloco 1 (60 cm do estímulo)	Nº quadros no bloco 2 (40 cm do estímulo)	Nº quadros no bloco 3 (20 cm do estímulo)	Percentagem de contatos
Porta no MDTB	4.0	4.0	3.9	100
Rato Tentativa 1	5.8	6.4	5.8	90
Rato Tentativa 2	6.0	6.1	6.5	90
Rato Tentativa 3	6.8	7.3	8.4	80

Os valores representam a média do número de quadros da análise em câmera lenta do DVD necessária pra o animal cruzar cada bloco até alcançar o estímulo. Cada bloco representa 20 cm. Contatos foram considerados quando o animal tocava ou colidia com a cabeça a porta ou o rato.

6.2 Exposição ao predador (Etapa 2)

6.2.1 Experimento 4. Efeitos do NMDA e NPLA intra-MCPD nos comportamentos avaliados no RET.

A ANOVA unifatorial seguida pelo teste de Duncan (dados paramétricos) revelou que somente o tratamento intra-MCPD com a dose mais alta do agonista de receptor NMDA (salina+NMDA 0,04) reduziu o número de cruzamentos entre os compartimentos toca [$F(5,88) = 2,8$; $P < 0,05$], túnel [$F(5,88) = 3,6$; $P < 0,005$] e superfície [$F(5,88) = 4,4$; $P < 0,005$] (fig. 6). Em relação ao tempo gasto nesses compartimentos, o grupo tratado com o inibidor da NOSn (NPLA+salina) teve o tempo na toca reduzido [$F(5,88) = 3,1$; $P < 0,05$] e o tempo na superfície aumentado [$F(5,88) = 4,2$; $P < 0,005$], enquanto o grupo que recebeu NMDA na dose mais elevada (salina+NMDA 0,04) tendeu a reduzir o tempo gasto na superfície (Duncan; $P = 0,09$) em relação ao grupo controle (fig. 6). Cabe ressaltar também que tendências de redução do tempo na toca (Duncan; $P = 0,08$) e de aumento na superfície (Duncan; $P = 0,10$) foram observadas para o grupo que recebeu injeções combinadas de NPLA com NMDA 0,02 (fig. 6). Por fim, a análise estatística não indicou nenhuma diferença entre os grupos tratados e o grupo controle no tempo de permanência no túnel [$F(5,88) = 0,58$; $P > 0,05$].

Para a última medida espaço-temporal, o tempo de contato, a ANOVA Kruskal-Wallis seguida pelo teste de comparações de Mann-Whitney (dados não paramétricos) revelou que o tempo de contato com a tela de arame entre o predador e a presa foi significativamente menor para o grupo que recebeu NMDA 0,04 e maior para os grupos que foram tratados com NPLA+salina e NPLA+NMDA 0,02 em relação ao grupo controle (salina+salina) [$H(5,94) = 31,3$; $P < 0,005$] (fig. 8).

Nas medidas etológicas, a frequência de avaliação de risco no compartimento toca foi reduzida para os grupos que receberam NPLA combinado com salina e NPLA com NMDA 0,02 comparados ao controle [$H(5,94)= 18,2$; $P<0,005$] (fig.7). No compartimento túnel [$F(5,88)= 0,79$; $P>0,05$] e superfície [$F(5,88)= 0,68$; $P>0,05$], nenhum tratamento alterou a frequência de avaliação de risco. Em relação à duração, o tratamento com NMDA (0,04 nmol) tendeu a aumentar o tempo total de avaliação de risco no compartimento toca [$H(5,94)= 22,7$; $p<0,005$ (Mann Whitney, $p=0,09$)], enquanto o NPLA reduziu consistentemente esse comportamento na mesma situação (fig.7), um efeito que se mostrou próximo da significância quando combinado com a menor dose de NMDA (0,02 nmol) (Mann Whitney, $P=0,06$) (fig. 7).

É relevante mencionar que a análise estatística da porcentagem de tempo do comportamento de avaliação de risco em relação ao tempo total em cada compartimento é uma medida mais expressiva e confiável das alterações desse comportamento diante dos tratamentos farmacológicos. Dessa maneira, a ANOVA Kruskal-Wallis seguida pelo teste de comparações de Mann-Whitney revelou que o grupo tratado com NPLA teve uma diminuição relativa da avaliação de risco na toca [$H(5,94)= 16,3$; $p<0,05$] e na superfície [$H(5,94)= 18,5$; $p<0,005$]. De maneira interessante, o grupo que recebeu o composto NMDA na dose mais alta após o tratamento com NPLA (NPLA+NMDA 0,04) teve um claro aumento relativo desse comportamento no compartimento superfície.

Finalmente, a análise estatística não apontou diferenças no comportamento de auto-limpeza entre os grupos tratados e grupo controle [$F(5,88)= 1,7$; $P>0,05$] (fig. 8). Em relação ao comportamento de congelar, suas intensificação e redução foram observadas nos animais que receberam injeção combinada de salina com NMDA 0,04

[$H(5,94) = 26,6$; $p < 0,005$] e NPLA combinado com salina (Mann Whitney $p < 0,005$),
respectivamente.

Figura 5. Representação esquemática dos sítios de microinjeção dentro da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) de camundongos (Experimento 4). O número de pontos representados na figura é menor que o número total de camundongos utilizado devido à sobreposição de alguns sítios.

Figura 6. Efeitos dos tratamentos combinados intra-MCPD sobre as respostas defensivas de camundongos (n=15-18) submetidos ao RET (frequência painel superior e duração no painel inferior). As colunas representam as médias e as barras representam EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle pelo teste de Duncan ou pelo teste de Mann-Whitney.

Figura 7. Efeitos dos tratamentos combinados intra-MCPD sobre as respostas defensivas de camundongos ($n=15-18$) submetidos ao RET (frequência no painel superior e duração no painel inferior). As colunas representam as médias e as barras representam EPM. * $p<0,05$ comparado ao grupo controle pelo teste de Duncan ou pelo teste de Mann-Whitney. AR: avaliação de risco.

Figura 8. Efeitos dos tratamentos combinados intra-MCPD nas respostas defensivas de camundongos submetidos ao RET (duração). As colunas representam as médias e as barras representam EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle pelo teste de Duncan ou pelo teste de Mann-Whitney.

6.2.2 Experimento 5. Efeito ovineCRF intra-MCPD avaliado no MDTB e no RET.

Todos os efeitos comportamentais da injeção intra-MCPD do agonista não seletivo de receptores CRF, ovine CRF, avaliados no MDTB estão representados na tabela 3 (média $\pm$ EPM e os valores de F). A ANOVA indicou efeitos do oCRF apenas nos testes de esquiva ao predador e contato forçado. O teste de *post hoc* de Duncan demonstrou que os animais tratados com a dose mais alta de oCRF (100ng) aumentaram a distância de esquiva. No teste de contato forçado, ambas as doses de oCRF aumentaram o número de saltos defensivos e diminuíram a frequência de levantamentos defensivos.

Por outro lado, a infusão do composto oCRF intensificou a maioria dos comportamentos defensivos avaliados no RET. Nas medidas espaço-temporais, a ANOVA unifatorial seguida pelo teste de Duncan mostrou efeitos significativos do oCRF (30-100 ng) na frequência [$F(2,26)= 10$ $P < 0,001$] e tempo [$F(2,26)= 6,0$ $P < 0,01$] na toca, na frequência [$F(2,26)= 7,3$ $P < 0,01$] e tempo [$F(2,26)= 4,9$ $P < 0,01$] de túnel, e na frequência de superfície [$F(2,26)= 5,1$ $P < 0,01$], e tendência de efeito para o tempo de superfície [$F(2,26)= 3,0$ $P=0,07$] (Fig 9). Tendência semelhante foi revelada pela ANOVA para a frequência de contato com a tela de arame que separava o predador da presa [$F(2,26)= 2,9$ $P=0,07$], enquanto a análise de variância Kruskal-Wallis seguida pelo teste de comparações de Mann-Whitney confirmou a significância para o tempo de contato com a tela [$H(2,26)= 8,18$, $P < 0,01$] (Fig. 10).

Nas medidas etológicas, a ANOVA mostrou que a microinjeção do composto oCRF reduziu a frequência [$F(2,26)= 6,5$ $P < 0,01$] e duração [$F(2,26)= 6,9$ $P < 0,01$] do comportamento de avaliação de risco no compartimento túnel (fig.10). No entanto, a análise estatística não revelou diferenças entre os grupos tratados e o grupo controle

na porcentagem relativa de avaliação de risco no túnel [$F(2,26)= 1,6$ $P>0,05$]. Para o compartimento toca, nenhum efeito foi observado na frequência [$F(2,26)= 1,8$ $P>0,05$], duração total [$F(2,26)= 1,4$ $P>0,05$] (Fig. 10) e duração relativa [$F(2,26)= 1,7$ $P>0,05$] da avaliação de risco. Os comportamentos de congelamento [$H(2,29)=4,1$ $P>0,05$], ocultação defensiva [$F(2,26)= 0,5$ $P>0,05$] e auto-limpeza [$F(2,26)=0,3$ $P>0,05$] não foram alterados pelo tratamento com o agonista de CRF (Fig. 11).

Tabela 3. Efeitos da infusão intra-MCPD do composto ovineCRF sobre a resposta comportamental de camundongos confrontados com o rato no MDTB (n=9-11).

Comportamentos	Controle	oCRF 30 ng	oCRF 100ng	F(2,28)
Pré-Teste				
Cruzamentos (F)	200,4 ± 19,6	187,4 ± 6,6	182,3 ± 15,7	0,39
Levantar (F)	9,5 ± 2,1	9,0 ± 2,1	6,7 ± 2,3	0,47
Esquiva do predador				
Dist. de esquiva (cm)	45,7 ± 10,4	44,9 ± 6,9	75,4 ± 8,3*	3,68
Frequência esquiva	1,4 ± 0,3	2,1 ± 0,4	2,2 ± 0,2	1,90
Fuga do predador				
Vel. Média (m/s)	0,51 ± 0,05	0,53 ± 0,05	0,61 ± 0,04	1,11
Vel. Máxima (m/s)	0,84 ± 0,06	0,89 ± 0,07	0,94 ± 0,05	0,52
Parada (F)	2,45 ± 1,1	4,8 ± 1,1	2,89 ± 0,5	1,78
Inversão (F)	5,73 ± 1,3	6,73 ± 1,6	4,33 ± 1,5	0,62
Corredor sem saída				
Aprox. e Retirada (F)	1,9 ± 0,2	2,0 ± 0,4	2,3 ± 0,4	0,30
Contato cPredador (F)	1,1 ± 0,3	1,0 ± 0,2	1,3 ± 0,2	0,42
Saltos defensivos (F)	0,8 ± 0,4	1,8 ± 0,5	1,4 ± 0,2	1,08
Congelamento (D)	2,1 ± 0,5	3,7 ± 1,4	1,9 ± 0,6	1,04
Contato forçado				
Vocalização (F)	13,6 ± 0,4	13,4 ± 0,8	14,0 ± 0,8	0,13
Lev. defensivo (F)	12,4 ± 1,0	6,9 ± 1,3*	8,1 ± 1,6*	5,50
Saltos defensivos (F)	2,4 ± 1,0	8,2 ± 1,3*	7,0 ± 1,6*	6,03
Mordidas no rato (F)	1,6 ± 0,7	1,4 ± 0,6	0,8 ± 1,0	0,33
Pós-teste				
Cruzamentos (F)	179,5 ± 20,9	152,6 ± 13,9	184,3 ± 22,9	0,80
Levantamento (F)	25,2 ± 3,0	28,6 ± 2,4	21,2 ± 4,9	1,16
Saltos defensivos (F)	1,7 ± 0,6	3,7 ± 1,7	1,2 ± 0,6	1,26

Os comportamentos foram avaliados em frequência (F) e duração (D). Os dados estão representados como média ± EPM. *p<0,05 relação ao respectivo grupo controle usando o teste de Duncan.

Fig. 9. Efeito da infusão do oCRF intra-MCPD no comportamento defensivo de camundongos submetidos ao RET (frequência no painel superior e duração no painel inferior). As colunas representam as médias e as barras o EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle pelo teste de Duncan ou pelo teste de Mann-Whitney.

Fig. 10. Efeito do oCRF intra-MCPD no comportamento defensivo de camundongos submetidos ao RET (frequência no painel superior e duração no painel inferior). As colunas representam as médias e as barras o EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle pelo teste de Duncan ou pelo teste de Mann-Whitney.

Fig. 11. Efeito do oCRF intra-MCPD no comportamento defensivo (medidas etológicas) de camundongos submetidos ao RET. As colunas representam as médias e as barras representam o EPM.

7.DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

7.1 Estimulação Química

A primeira etapa do presente estudo teve como propósito investigar se as características físicas do ambiente no qual o animal é testado interferem com as respostas comportamentais induzidas pela estimulação química da MCPD em camundongos. Inicialmente, nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores, que demonstraram que a infusão intra-MCPD do ácido DLH em ratos e camundongos provoca imediata resposta motora de alta intensidade e que se caracteriza por corridas (galope e trote) e saltos que perduram por curto período (cerca de 40-60s), sendo seguidos por cerca de cinco minutos de congelamento ou imobilidade (Beckett et al., 1990; 1992; Carvalho-Netto & Nunes-de-Souza, 2004b). No entanto, nossos resultados adicionalmente indicam que essas respostas comportamentais induzidas pelo DLH são dependentes das características físicas do ambiente onde os animais são testados. Exemplificando, durante o período de resposta motora explosiva (60s iniciais) provocada pela injeção intra-MCPD de DLH, os animais que foram submetidos a uma situação com pouca disponibilidade de espaço, a arena (onde percorriam um reduzido espaço antes de alcançarem as paredes do aparato), tiveram como resposta predominante o comportamento de saltos. Por outro lado, os camundongos tratados e avaliados no aparelho do MDTB (no qual estava disponível um grande espaço físico: 4,8 m de trajeto oval sem interrupções abruptas), exibiram principalmente o comportamento de corrida (galope) e uma quantidade reduzida de saltos. Cabe ressaltar que esse número de saltos foi extremamente reduzido na situação MDTB, não alcançando níveis de significância em relação aos animais que receberam salina na mesma situação.

Nossos resultados não corroboram recentes dados obtidos com a técnica da estimulação elétrica da MCPD em ratos testados em ambientes de tamanhos diferentes. Schenberg e colaboradores (2005) demonstraram que alterações no tamanho do diâmetro da arena onde os animais são estimulados eletricamente (20 cm ou 50 cm de diâmetro) não interferem na intensidade da corrente elétrica para eliciar alguns comportamentos defensivos, incluindo os saltos. De modo interessante, esses autores mostraram que quando a estimulação ocorria em um compartimento com menor disponibilidade de espaço (arena 20 cm), os animais tiveram o comportamento de corrida abolido, e em seu lugar surgiram os comportamentos de rápida rotação e congelamento. Entretanto, de modo diferente ao demonstrado no presente estudo, em que o comportamento de saltos teve aumentos substanciais num ambiente com pouca disponibilidade de espaço, os resultados de Schenberg e colaboradores (2005) não apontaram para alterações na frequência dessa resposta. Embora diferentes espécies de animais (camundongo vs ratos), diferentes métodos (estimulação químicas vs elétrica) e aparatos (MDTB vs Arena) tenham sido utilizados nesses estudos, a principal diferença possa ser devida às técnicas empregadas para avaliar os efeitos do ambiente físico nas respostas induzidas pela estimulação da MCPD. Em outras palavras, o uso do limiar de intensidade da corrente elétrica para produzir determinado comportamento pode ser menos sensível para alterações do ambiente do que a própria expressão da resposta comportamental.

Resultados complementares da primeira etapa do presente estudo sugerem que as alterações comportamentais, principalmente a predominância de saltos ao invés de corrida, observadas para os animais tratados com DLH e submetidos à arena, possam ser moduladas pelo contato tátil. De fato, uma análise detalhada revelou que 87% dos saltos exibidos na arena foram precedidos de um contato (colisão ou toque) de parte

da cabeça do animal com uma ou mais paredes do aparato. Dando apoio a essa hipótese, os resultados da análise comportamental do Experimento 1 indicaram que os animais testados na arena sob efeito do ácido DLH apresentaram frequências de contatos faciais e laterais significativamente maiores nas paredes do aparato do que aqueles testados no MDTB. Em parte, esses resultados encontram apoio naqueles oriundos dos trabalhos de Bandler e Depaulis (1991), que mostraram que ratos microinjetados intra-MCPD com outro aminoácido excitatório, o ácido caínico, não exibem comportamentos defensivos frente a aproximação da mão do experimentador (estímulo visual), contudo, apresentam reações de defesa quando tocados pelo experimentador (estímulo tátil). Em conjunto, esses resultados sugerem que a estimulação química de neurônios da MCPD provoca um déficit no funcionamento normal do sistema visual nos animais estimulados.

O fato das evidências discutidas acima indicarem que o perfil das respostas comportamentais (ex. saltos ou corrida) induzidas pela estimulação química depende das características do ambiente, sendo essas moduladas especificamente pelo contato tátil do animal com as paredes do ambiente, não invalida que a MCPD contém elementos do sistema de defesa ativados seja por estímulos aversivos naturais (ex interação presa-predador) ou artificiais, tais como as estimulações química ou elétrica. Inserido nesse contexto, estudos anteriores têm demonstrado que animais aprendem a evitar a estimulação elétrica dessa região, reforçando o seu caráter aversivo (Olds & Olds, 1962; Cazala & Garrigues, 1981; Schenberg et al., 2001). Além disso, os comportamentos do tipo galope e saltos eliciados pela estimulação dessa região em animais de laboratório são semelhantes àqueles exibidos em situações de perigo imediato, como o confronto com o predador (Beckett et al., 1992; Keay & Bandler, 2001; Schenberg et al., 2001; Vianna & Brandão, 2003). Ainda, a estimulação elétrica

ou química da MCPD tem sido proposta como um modelo animal para o estudo do transtorno do pânico em humanos (Vargas & Schenberg, 2001), uma vez que produz sensações de medo intenso, pavor e de morte iminente em humanos, que se assemelham a um ataque de pânico (Nashold et al., 1969).

No entanto, os resultados do Experimento 2 demonstraram que os animais testados no procedimento padrão do MDTB após o minuto inicial de efeito do DLH (após resposta explosiva) não apresentaram alterações significativas no comportamento defensivo frente ao predador em relação aos animais controles. Seria esperado que a ativação de neurônios da MCPD (ex. com DLH), que comandam o sistema de luta e fuga, provocasse aumento nas respostas defensivas no procedimento padrão do MDTB, principalmente nos componentes de luta e fuga. Uma possível explicação para a ausência de efeitos do DLH injetado intra-MCPD sobre as respostas defensivas de camundongos em confronto com predador seria, em parte, devido ao perfil do efeito farmacológico do composto DLH (curta duração) (Bandler et al., 1985; Beckett et al., 1992; Carvalho-Netto & Nunes-de-Souza, 2004b). Embora a resposta explosiva inicial (saltos e intensa atividade locomotora) provocada pela infusão do DLH seja de curta duração, o perfil comportamental que a segue (imobilidade ou congelamento) pode perdurar cinco minutos ou mais (Beckett et al., 1990; Carvalho-Netto & Nunes-de-Souza, 2004b). Porém, não está claro se essa última resposta é parte do repertório provocado pela estimulação com DLH ou se é um sinal de exaustão ou quietez em consequência da intensa resposta motora inicial. Por outro lado, estudos conduzidos por Bandler e DePaulis (1988) demonstraram que a microinjeção intra-MCPD de doses baixas do ácido caínico intensifica a exibição de comportamentos defensivos em ratos submetidos ao teste de interação social. Tais comportamentos foram semelhantes àqueles expressados em situações que o animal

sofre um ataque co-específico, porém nesse caso não se observaram ataques co-específicos por parte do outro animal. Nesse sentido, DePaulis e colaboradores (1989) sugeriram que o ácido caínico é um composto mais adequado para o estudo do efeito da ativação neuronal da MCPD no comportamento defensivo em um ambiente naturalístico, como as interações social e presa-predador. De acordo com esses pesquisadores, essa droga apresenta um efeito farmacológico de ativação neuronal mais duradouro (20-30 minutos). Além disso, por alguma razão, esse composto não elicia respostas comportamentais explosivas (intensa atividade locomotora), mesmo em doses mais altas (embora elicie alguns saltos orientados), contrastando, assim, com os efeitos do DLH, que induz intensa atividade motora por um período reduzido de tempo (Bandler & Depaulis, 1988). Tal efeito torna mais difícil a viabilidade de se avaliar se essas respostas comportamentais induzidas pelo ácido DLH intra-MCPD correspondem às reações de defesa frente a uma ameaça real e proximal, como por exemplo, o confronto com o predador.

Na tentativa de investigar essa hipótese, o Experimento 3 teve como propósito avaliar se durante essa resposta motora intensa provocada pelo DLH intra-MCPD os animais responderiam a estímulos neutros e naturalmente aversivos para a espécie, como um predador. De forma surpreendente, os resultados revelaram que durante o efeito máximo do ácido DLH, em que se observou intensa atividade locomotora (corrida ou fuga explosiva), os animais não responderam a qualquer tipo de estímulo, seja ele neutro (fechamento de uma porta no final do corredor do MDTB) ou aversivo (colocação de um rato anestesiado bloqueando a passagem). Em outras palavras, durante a expressão do comportamento de fuga explosiva os animais invariavelmente colidiam com os estímulos neutro ou aversivo que eram colocados na tentativa de bloqueio do caminho sem esboçar redução significativa na velocidade de corrida. De

maneira interessante, sob efeito do DLH, a maioria dos camundongos não esboçava qualquer alteração de direção após tocarem ou colidirem contra o estímulo aversivo (rato), correndo contra o corpo do predador anestesiado, sugerindo uma deficiência na estratégia defensiva antipredador.

Primeiramente, tal como sugerido para os resultados do Experimento 1, poderíamos explicar essa deficiência na resposta antipredador devido alterações do funcionamento normal do sistema visual do animal durante o efeito do aminoácido excitatório (AAE). Entretanto, Bandler e DePaulis (1991) mostraram que embora o ácido cáínico intra-MCPD também interfira no funcionamento normal do sistema visual de ratos, não altera com o aumento significativo no comportamento defensivo durante um encontro com co-específico no teste de interação social (Bandler & DePaulis, 1988). De acordo com esses pesquisadores, essas respostas defensivas só foram eliciadas após o contato físico com o outro co-específico, indicando que estes animais respondem através do sistema tátil a estímulos que possam representar perigo a espécie.

Diante dessas evidências, é plausível sugerir que a resposta observada em camundongos após a estimulação com ácido DLH possa refletir um alto nível de ativação reflexa do sistema locomotor, que se sobrepõe às outras funções da MCPD como aquelas relacionadas aos componentes de defesa. Argumentando nessa linha, o presente estudo demonstrou que o DLH levou os camundongos a alcançarem a velocidade máxima de 1,4 m/s durante a resposta de corrida no aparelho MDTB. De modo interessante, a mesma espécie de camundongos (Swiss-Webster) exibe a velocidade máxima de 0,8 m/s quando exposta a uma situação natural de ameaça, como a que envolve a perseguição pelo predador no mesmo aparelho (Blanchard et al., 1998). No mesmo procedimento, animais tratados sistemicamente com drogas

com potencial ansiogênico, tais como a cocaína e o flumazenil, tiveram potencializada a fuga do predador, entretanto, com velocidade máxima de 1,1 m/s (Blanchard et al., 1999). A velocidade de fuga induzida pelo DLH em camundongos de laboratório foi semelhante àquela exibida por camundongos selvagens quando perseguidos pelo predador (Blanchard et al., 1998), o que pode ser um indicativo de uma ativação máxima e fora dos padrões fisiológicos de resposta de fuga normal para esses animais de laboratório.

Várias evidências têm indicado que a MCP é uma estrutura fundamental envolvida na elaboração e coordenação de respostas defensivas para perigo proximal (Bandler & DePaulis, 1991; Graeff, 1994; 2004). De fato, lesões nessa região atenuam drasticamente as reações de defesa de ratos selvagens em confronto com o predador (Blanchard et al., 1981). Além disso, recentes estudos têm demonstrado que a exposição de ratos ao predador (gato) ou ao odor do predador provoca intensa ativação de proteína Fos na MCPD desses animais (Canteras & Goto, 1999; Dielenberg et al., 2001). No entanto, no presente estudo os animais não responderam à presença do predador durante o efeito do ácido DLH. Tal fato não deve ser interpretado como uma evidência contrária às muitas que ratificam a participação da MCPD na elaboração e coordenação dos comportamentos defensivos frente a um perigo proximal (ver Graeff, 1994; 2004). É mais provável que esse perfil de resposta esteja relacionado à dose do ácido DLH utilizada no presente estudo. Embora dentro da faixa utilizada em estudos anteriores (Bandler et al., 1985; Beckett et al., 1990; 1992), a dose do presente estudo pode ter provocado uma estimulação intensa e generalizada dos neurônios da MCPD de camundongos, podendo levar a uma ativação inespecífica ou exacerbada de outros componentes e sistemas, como o sensorial e o motor. Dessa forma, o perfil das respostas induzidas pelo DLH parece

se distanciar daquele desencadeado por ameaças proximais encontradas na natureza ou em modelos etologicamente fundamentados.

7.2 Exposição ao Predador

A segunda etapa do presente estudo, empregando um estímulo natural como principal situação aversiva, investigou o envolvimento da MCPD na modulação de diferentes estratégias defensivas evocadas pelo confronto de camundongos com o predador natural, o rato. Primeiramente, inserido no contexto da investigação do envolvimento dos aminoácidos excitatórios (AAE) nas reações de defesa moduladas pela MCP, no presente estudo utilizou-se como ferramenta farmacológica doses baixas de NMDA, agonista de receptor glutamatérgico de mesmo nome, para avaliar as respostas defensivas de camundongos submetidos ao RET. É importante enfatizar que a menor dose de NMDA (0,02 nmol) não provocou qualquer alteração comportamental relevante, apenas um breve aumento da atividade locomotora. Já a dose de 0,04 nmol levou a moderada ativação locomotora, caracterizada por corrida, saltos e congelamento, que se iniciou imediatamente após a injeção e teve duração média de dois minutos (ver Miguel & Nunes-de-Souza, 2006). No entanto, no presente estudo, os animais só foram testados no RET após um período (10 min) aparentemente suficiente para que os efeitos imediatos provocados pela infusão do NMDA (ex. atividade locomotora inicial, imobilidade ou quietez) não prejudicassem o desempenho dos animais no teste. Cabe ressaltar que esse período foi determinado com base em evidências sugestivas de que as alterações comportamentais decorrentes dos efeitos farmacológicos da ativação do receptor glutamatérgico NMDA (p.ex. formação de NO e ativação de cascata intracelular e liberação de outros neurotransmissores) são detectadas durante o procedimento experimental (para uma

revisão Garthwaite, 1991; Carobrez et al., 2001; Prast & Philippu, 2001; Esplugues, 2002; Carobrez, 2003).

No presente estudo, substituiu-se a ferramenta farmacológica DLH pelo NMDA, em razão das evidências apontarem ser o primeiro um agonista glutamatérgico inespecífico, atuando tanto em receptores NMDA como não NMDA e metabotrópicos (Fagg et al., 1986; Griffiths, 1991). Além disso, é crescente o número de evidências que indicam um importante envolvimento na MCP do subtipo de receptor glutamatérgico NMDA na modulação de comportamentos defensivos relacionados aos estados de medo e ansiedade (para uma revisão ver Carobrez et al., 2001; Carobrez, 2003; Bergink et al., 2004).

De fato, em concordância com as evidências acima, nossos resultados indicam que a ativação dos receptores NMDA na MCPD exacerba as respostas defensivas de camundongos em confronto com o predador no RET. Exemplificando, nas medidas espaço-temporais, a dose mais alta de NMDA produziu uma tendência em reduzir a permanência dos sujeitos na superfície de exposição ao rato ($P=0,10$) e reduziu significativamente o tempo de contato dos animais com a tela de arame que separa o predador da superfície, indicando um aumento nas respostas de esquiva ao predador. Além disso, nas medidas etológicas, os animais tratados com a maior dose do agonista NMDA exibiram um aumento substancial do comportamento de congelamento e tenderam a aumentar o tempo total de avaliação de risco no compartimento toca ($p=0,08$). No entanto, é importante comentar que para esse último comportamento, quando analisado em percentagem de tempo em relação à permanência no compartimento toca (dados não mostrados), tais diferenças em relação ao controle não se confirmaram ($p=0,13$).

Os resultados do presente estudo corroboram várias evidências anteriores que têm indicado um papel ansiogênico do glutamato via ativação do subtipo de receptor NMDA. Por exemplo, a administração sistêmica do agonista NMDA evoca comportamentos relacionados à ansiedade em ratos e camundongos testados em vários modelos animais, tais como o labirinto em cruz elevado, a interação social e o modelo de vocalização ultra-sônica (Dunn et al., 1989; Vasar et al., 1993; Podhorna & Brown, 2000). Mais especificamente, nossos resultados estão de acordo com aqueles oriundos do grupo liderado pelo pesquisador Antonio Carobrez, do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (Carobrez et al., 2001; Carobrez, 2003). Esses pesquisadores demonstraram que a infusão intra-MCPD de doses baixas de glutamato ou de NMDA aumentou a esquia dos braços abertos em ratos testados no labirinto em cruz elevado (LCE) dez minutos após o tratamento. Na mesma linha de argumentação, a infusão intra-MCPD dos compostos glicina ou D-serina, co-agonistas dos receptores glutamatérgico NMDA/Glicina B, também intensificou a esquia dos braços abertos e o comportamento de avaliação de risco em ratos submetidos ao LCE (Schmitt et al., 1995; Teixeira & Carobrez, 1999). Ainda, fortalecendo as evidências de envolvimento específico do subtipo de receptor NMDA da MCPD na mediação dos comportamentos defensivos, Guimarães e colaboradores (1991) demonstraram que injeções locais com o antagonista de receptor NMDA, AP-7, levaram ratos a explorarem mais braços abertos do LCE, um sugestivo efeito ansiolítico. Além disso, recentes resultados oriundos do mesmo grupo de pesquisa (Beijamini & Guimarães, 2006) revelaram que a administração i.c.v. do composto AP-7 induz um efeito antiaversivo em ratos confrontados com o predador natural, o gato.

Embora vários estudos confirmem a participação do glutamato, via receptor NMDA, nas respostas de medo e ansiedade, não podemos descartar a possibilidade de que as alterações comportamentais obtidas no presente estudo estejam vinculadas a uma alteração motora. Em apoio a essa hipótese, nossos resultados demonstram que os animais que receberam a maior dose de NMDA tiveram a frequência de cruzamentos entre os compartimentos significativamente reduzida em relação ao grupo controle. Tal fato abre a possibilidade para outras interpretações, como por exemplo, a de um prejuízo motor induzido pelo NMDA. Assim, a diminuição do tempo de permanência na superfície e o aumento do tempo de congelamento induzidos pelo NMDA poderiam, em parte, representar uma diminuição da atividade locomotora (ex. sedação) nos animais ao invés de um efeito puramente ansiogênico. No entanto, o próprio perfil da resposta induzida inicialmente pelo agonista NMDA (ativação locomotora) enfraquece a hipótese de um efeito depressor na atividade motora (ex. sedação) dos animais. Em concordância com essa linha de raciocínio, tem sido descrito que a infusão de NMDA na mesma estrutura e em doses similares às empregadas no presente estudo, não altera a atividade exploratória vertical (comportamento de levantar) em camundongos (Miguel & Nunes-de-Souza, 2006). Além disso, é relatado que o bloqueio de receptores NMDA na MCPD, por antagonistas competitivos como o AP-7, produz perturbação no comportamento motor (ataxia) de ratos (Molchanov & Guimarães, 2002) e de camundongos (Siegfried & Nunes-de-Souza, 1989). Além disso, o bloqueio de receptores NMDA no hipotálamo dorsomedial também induz marcante redução na atividade locomotora de ratos avaliados no LCE e no campo aberto (Jardim & Guimarães, 2001). Ainda, um corpo de evidências oriundas de estudos utilizando tratamento sistêmico fortalece os indícios de prejuízo motor (efeito sedativo, miorrelaxante e ataxia) perante o bloqueio

dos receptores NMDA, e não de sua ativação (Lehman et al., 1987; Turski et. al., 1987; Starr & Starr, 1994; Danysz et al., 1994; Podhorna & Brown, 2000). Diante de tais evidências, a hipótese de um efeito do NMDA *per se* na redução da atividade motora mostra-se enfraquecida.

Por outro lado, com base no que já foi discutido na primeira etapa do presente estudo, torna-se plausível argumentar que esse possível efeito de redução da atividade motora seja devido a um estado de exaustão dos animais, uma vez que a infusão intra-MCPD de 0,04 nmol de NMDA também produziu inicialmente moderada ativação locomotora em camundongos. Entretanto, é importante enfatizar que no Experimento 4 a exposição ao RET foi conduzida após o período inicial de ativação locomotora e congelamento (em média dois minutos) induzidos pela droga. Na realidade, os animais foram mantidos livres de qualquer manipulação ou estímulos por um período de recuperação de 10 minutos, antes de iniciar a exposição ao predador. Embora o controle dessa variável não tenha sido registrado de maneira sistemática, pode-se inferir que esse período de repouso após tratamento intra-MCPD foi suficiente para uma aparente recuperação do comportamento exploratório normal nos animais, de maneira que variáveis inespecíficas, como a exaustão ou esgotamento físico, mostraram-se improváveis.

Além disso, um dado importante quantificado durante o teste no RET sugere que os animais que receberam NMDA expressaram resposta motora normal. Por exemplo, a frequência e a duração do comportamento de avaliação de risco, que é usualmente expresso diante de uma atividade locomotora normal, no compartimento túnel e superfície foram estatisticamente semelhantes ao grupo controle. Além disso, o NMDA tendeu a aumentar a avaliação de risco no compartimento toca, sugerindo que a redução nos cruzamentos entre compartimentos provocada pelo agonista

glutamatérgico possa estar associada aos seus efeitos ansiogênicos e não a uma eventual alteração locomotora. Considerando-se que a avaliação de risco tem como função principal buscar informações sobre a fonte de perigo, que nesse caso é o predador (para uma revisão ver Blanchard et al, 2001), nossos resultados favorecem a interpretação de um efeito proaversivo específico do agonista NMDA na MCPD sobre o comportamento defensivo de camundongos submetidos ao confronto com o predador no RET.

Existem evidências sugestivas de que a ação proaversiva dos aminoácidos excitatórios (AAEs - sendo o glutamato o principal) está relacionada a ativação da síntese de óxido nítrico (NO), possivelmente induzida quando são ativados os receptores glutamatérgicos, principalmente NMDA (Garthwaite et al., 1988), mas também AMPA, Cainato e metabotrópicos (Southam et.al., 1991; Okada, 1992). De fato, estudos anteriores têm demonstrado que a ação glutamatérgica resultante da estimulação do receptor NMDA se dá através de um aumento imediato do fornecimento de NO (Garthwaite et al., 1989, Garthwaite, 1991). Segundo esses autores, ao se estimular o receptor NMDA, ocorre rápida ativação da enzima NOS neuronal (NOSn) cálcio dependente, devido ao imediato influxo de cálcio intracelular através do canal iônico ativado, aumentando assim, os níveis de NO.

Inserido nesse contexto, os resultados descritos no Experimento 4 corroboram essas evidências, uma vez que a infusão prévia na MCPD do inibidor seletivo da NOS neuronal, NPLA, reverteu de maneira consistente os efeitos ansiogênicos provocados pela microinjeção do agonista glutamatérgico NMDA no mesmo sítio. Em outras palavras, a inibição da formação do NO endógeno reverteu os efeitos ansiogênicos desencadeados pela ativação de receptores NMDA, confirmando a hipótese da ação proaversiva do glutamato via ativação da síntese de

óxido nítrico. Em concordância com os nossos achados, recente estudo conduzido em nosso laboratório (Miguel & Nunes-de-Souza, 2006) revelou que a inibição da síntese do NO com NPLA atenua a exibição de saltos, corridas e congelamento bem como bloqueia a antinocicepção induzidos pela injeção intra-MCPD de NMDA em camundongos. No entanto, recente trabalho conduzido por Aguiar e colaboradores (2006) contraria os resultados acima que indicam ser o efeito aversivo induzido pela infusão do agonista de receptor NMDA na MCPD via produção de NO endógeno. Nesse estudo a resposta de fuga induzida pela infusão intra-MCPD de NMDA de ratos não foi atenuada pela microinjeção prévia, na mesma estrutura mesencefálica, dos compostos L-NAME (inibidor da NOS), carboxi-PTIO (sequestrador do NO) ou ODQ (inibidor da guanilato ciclase), que conhecidamente interferem com a produção ou com o mecanismo de ação do NO. Em parte, essas discrepâncias observadas acima poderiam ser explicadas pelas diferentes espécies animais utilizadas nesses estudos (camundongos x ratos). Estudos anteriores com outros modelos animais de ansiedade têm revelado que camundongos apresentam um perfil comportamental defensivo diferente daquele exibido por ratos (Jardim et al., 1999; Blanchard et al., 2001; Carvalho-Netto & Nunes-de-Souza, 2004a). Tais diferenças podem estar também associadas à ativação de distintos mecanismos neurobiológicos. No entanto, é incontestável que pesquisas adicionais utilizando ferramentas moleculares seriam importantes na tentativa de elucidar essas discrepâncias.

Por outro lado, vários estudos conduzidos pelo grupo de pesquisa liderado pelo Professor Francisco Guimarães, do Departamento de Farmacologia da Universidade de São Paulo, têm reforçado o envolvimento do NO com as ações glutamatérgicas. Como exemplos, esses pesquisadores demonstraram que injeções de AP-7 e NBQX, antagonistas de receptores glutamatérgicos NMDA e

AMPA/Cainato, respectivamente, inibem a resposta de fuga eliciada pela microinjeção do doador de NO SIN-1 na MCPD de ratos (Moreira et al., 2004). Além disso, a exposição de ratos ao seu predador natural, o gato, provoca a ativação de neurônios NOS positivos (detectado por meio de histoquímica para NADPH-diaforase - co-fator indispensável para NOS) em algumas estruturas, tais como os núcleos pré-mamilar dorsal, dorsal da rafe e a MCPD (Beijamini & Guimarães, 2006). Cabe ressaltar também que resultados semelhantes indicando que a exposição ao predador ativa a produção de NO na MCPD (detectado pelo aumento da citrulina, um índice indireto da atividade da NOS), foram descritos anteriormente por Chiavegatto e colaboradores (1998). Adicionalmente, num elegante experimento, Beijamini e Guimarães (2006) demonstraram que a injeção i.c.v do antagonista competitivo de receptores NMDA, AP-7, além de produzir uma atenuação das respostas defensivas induzidas pelo confronto com o predador, reduziu também a ativação desses neurônios NOS positivos na MCPD. Em outras palavras, a exposição de ratos ao estímulo aversivo, o predador, induz a ativação da produção de NO na MCPD (Chiavegatto et al., 1998) e essa ativação é inibida pelo pré-tratamento i.c.v com AP-7 (Beijamini & Guimarães, 2006). De acordo com esses pesquisadores, uma possível explicação para esse efeito seria de que o bloqueio dos receptores NMDA pelo AP-7 prejudicaria a mediação do efeito excitatório do glutamato e, conseqüentemente, a ativação da NOS.

De modo interessante, esse último estudo citado sugere que os efeitos ansiogênicos induzidos por estímulos naturalmente aversivos (predador) dependem, pelo menos em parte, da produção de óxido nítrico na MCP via ativação dos receptores NMDA pelo glutamato endógeno. De fato, concordando com esses achados, os resultados do presente estudo demonstram que a infusão intra-MCPD do

inibidor seletivo da NOS neuronal produziu, por si só (NPLA+salina), um marcante efeito ansiolítico em camundongos expostos ao predador natural. Os animais que tiveram a produção de óxido nítrico na MCPD prejudicada pelo tratamento com NPLA exibiram marcante redução no comportamento de esquiva ao predador (aumento no tempo de permanência na superfície e em contato com a tela de arame onde estava o predador). Fortalecendo esse efeito antiaversivo, esses animais também tiveram uma redução significativa no congelamento e no tempo total do comportamento de avaliação de risco exibido no compartimento toca. Cabe mencionar, que numa análise relativa em relação ao tempo que os animais gastaram nos compartimentos, o comportamento de avaliação de risco foi atenuado tanto na toca como na superfície pelo tratamento com NPLA. De maneira consistente, esses achados confirmam a redução geral do comportamento de avaliação de risco, favorecendo assim, a interpretação de um efeito antiaversivo do inibidor da NOSn. Embora existam algumas evidências que relatam que alguns inibidores da NOS em certas doses causem prejuízo na atividade motora (Del Bel et al., 1998, 2002 e 2004), nossos resultados não apontam para nenhum efeito dessa natureza. Por exemplo, o grupo de animais tratado com NPLA apresentou frequência de cruzamentos entre os compartimentos estatisticamente semelhante ao grupo controle, o que sugere uma atividade locomotora normal.

Ainda, cabe mencionar que inúmeros estudos com injeções sistêmicas de inibidores seletivos e não seletivos da NOS em ratos e camundongos submetidos a modelos de ansiedade sugerem que o NO facilita as reações de defesa (para uma revisão ver Guimarães et al., 2005). É importante mencionar também que existe um considerável número de trabalhos que apontam para um papel ansiolítico do óxido nítrico (para uma revisão ver Guimarães et al., 2005). Entretanto, resultados mais

consistentes têm sido relatados a partir de estudos com injeções intra-encefálica de compostos que alteram a função do NO em estruturas específicas (para uma revisão ver Guimarães et al., 2005). Recentemente, a região na qual o papel do NO tem recebido maior atenção é a MCPD. Exemplificando, Guimarães e colaboradores (1994) observaram um efeito ansiolítico do L-NOARG (L-nitro-arginina) e L-NAME (L-nitro arginina metil éster), inibidores não seletivos da NOS, microinjetados na MCPD de ratos submetidos ao LCE. Na tentativa de investigar o envolvimento do NO na ansiedade induzida pela exposição ao LCE em camundongos, recentemente foi testado em nosso laboratório os efeitos da administração intra-MCPD de L-NAME (Cabral et al, 2003). De modo semelhante ao observado em ratos (Guimarães et al, 1994), a inibição da NOS atenuou os principais índices de ansiedade (% entradas e de tempo nos braços abertos) sem afetar a atividade locomotora (entradas nos braços fechados). Além disso, Guimarães e colaboradores (2005) também relataram que a microinjeção intra-MCPD de um sequestrador de NO (carboxi-PTIO) ou de um inibidor da guanilato ciclase sensível ao NO (ODQ) induziu efeito ansiolítico em animais expostos ao LCE.

Em conjunto, os resultados da segunda etapa do presente estudo e as expressivas evidências discutidas acima confirmam um compartilhamento de funções dos sistemas glutamatérgico e nitrérgico nas reações de defesas organizadas pela MCPD. Em especial, o presente estudo sugere um importante papel do complexo glutamato/NMDA/NO na MCP na elaboração e expressão de comportamentos defensivos específicos, como a esquiva e a avaliação de risco, considerados mais sutis e elaborados (Carobrez et al, 2001; McNaughton & Corr, 2004). Nessa direção, nossos achados fortalecem a teoria de McNaughton e Corr (2004) das vias neurais que comandam as reações de defesa. De acordo com esses

pesquisadores, estruturas anatomicamente mais caudais, como a MCP, além de coordenarem e expressarem comportamentos intempestivos do tipo fuga e luta relacionados ao estado de medo, também participam, juntamente com estruturas prosencefálicas (ex. córtex pré-frontal, sistema septo-hipocampal e amígdala), do controle de comportamentos defensivos mais elaborados e orientados relacionados à ansiedade.

No entanto, merece uma breve discussão, no presente estudo, os efeitos do inibidor seletivo da NOSn *per se* (NPLA + Salina) na redução do medo e da ansiedade em camundongos avaliados no RET. De acordo com a vasta maioria das evidências relatadas até o momento, é plausível admitir que esses efeitos do NPLA representam uma inibição da formação do NO, por sua vez estimulado por mecanismos glutamatérgicos endógenos, via ativação de receptores NMDA. De fato, tem sido sugerido que a ativação do receptor NMDA é a principal condição para produção de NO no SNC (Esplugues, 2002) e que esses dois sistemas (glutamatérgico via NMDA e nitrérgico) funcionam por mecanismos regulatórios recíprocos (Lin et al., 2000), onde ambos controlam a liberação de cada um. Mesmo assim, não pode ser descartada a hipótese de que os efeitos ansiolíticos do NPLA *per se* ocorram, pelo menos em parte, devido à inibição da formação do NO produzido por uma via distinta daquela do glutamato/NMDA/NO. Apoiando essa hipótese, alguns estudos têm demonstrado que a formação de NO também ocorre após a ativação de outros receptores glutamatérgicos ionotrópicos, como os suptipos AMPA e cainato, e de receptores metabotrópicos (Southam et al., 1991; Okada, 1992). Além disso, outros neurotransmissores ou neuromoduladores parecem estar envolvidos na formação de NO, incluindo a serotonina, bradicinina, endotelina, acetilcolina e noradrenalina (Reiser, 1990a; 1990b). Portanto, alguns estudos adicionais devem ser

conduzidos visando contribuir para elucidação dos efeitos do NPLA no presente estudo. Por exemplo, avaliar os efeitos intra-MCPD de um antagonista NMDA, como o AP-7, nas mesmas condições (RET) e compará-los com os do NPLA. Assim, pode ser inferido, caso o perfil das respostas comportamentais seja semelhante, que o efeito ansiolítico do NPLA por si só no RET ocorre principalmente pela inibição do NO da via glutamato/NMDA/NO.

Por outro lado, não deve ser rejeitada a hipótese que outros neurotransmissores estejam participando da modulação dessas respostas defensivas elaboradas pela MCPD frente ao predador. De fato, vários neurotransmissores têm sido sugeridos na gênese e controle das reações de defesa na MCP como GABA, serotonina, colecistoquinina e neuropeptídeos como os opióides e o fator liberador de corticotrofina (CRF) (para uma revisão ver Graeff, 1994; Behbehani, 1995). Embora os resultados do presente estudo indiquem uma consistente participação intrínseca dos sistemas glutamatérgicos e nitrérgicos, existem evidências que propõem que esse sistema complementar esteja envolvido no controle e liberação de outros neurotransmissores. Por exemplo, estudos indicam ser o NO um mensageiro retrógrado (difunde-se da célula pós-sináptica para a pré-sináptica) que provoca retro-alimentação positiva na liberação de glutamato, através de um mecanismo GMPc dependente (Nowicky & Bindman, 1993). Além de sua ação sobre o glutamato, o NO parece estar também envolvido direta ou indiretamente (via glutamato) na liberação de outros neurotransmissores, como o GABA (ácido gama-amino-butírico), acetilcolina, serotonina, noradrenalina, dopamina, histamina, purinas e neuropeptídeos, como o CRF (Prast & Philippu, 2001). Inserido nesse contexto, recente estudo *in vitro* demonstrou que a ativação do receptor NMDA em culturas de neurônios oriundos da amígdala de ratos provoca liberação do

neurotransmissor CRF de maneira dose dependente e que o bloqueio desses receptores com o antagonista NMDA, AP-5, reverte essa liberação de CRF (Cratty & Birkle, 1999). Resultado semelhante, utilizando cultura de neurônios hipotalâmicos, foi descrito anteriormente por Joanny e colaboradores (1997). Com base em estudos farmacológicos utilizando modelos animais de ansiedade, Cratty e Birkle (1999) sugeriram que os efeitos ansiolíticos obtidos com uso de antagonistas NMDA, seriam pelo menos em parte, devido à inibição da liberação de CRF. Dando apoio a essa hipótese, um recente estudo revelou que os efeitos ansiogênicos induzidos pelo tratamento sistêmico com NMDA são atenuados pelo bloqueio dos receptores do subtipo CRF1 na amígdala de ratos expostos ao labirinto em cruz elevado (Wieronska et al., 2003). Portanto, diante das evidências acima que indicam que a ativação glutamatérgica provoca a liberação de CRF, é plausível supor que as respostas defensivas frente ao predador sejam também moduladas pela transmissão CRFérgica na MCP.

Nesse sentido, como continuidade da segunda etapa, o presente estudo teve como propósito investigar se o CRF participa das reações de defesa inatas coordenadas pela MCPD. Para essa finalidade avaliamos os efeitos do peptídeo ovino CRF (oCRF), microinjetado na MCPD, sobre a respostas defensivas de camundongos em confronto com o predador no MDTB e no RET. Nossos resultados demonstraram que este agonista não seletivo de receptores CRF1 e CRF2 alterou apenas alguns comportamentos defensivos de camundongos no procedimento do MDTB, porém, o fez de maneira consistente. Por exemplo, a dose mais alta do composto oCRF aumentou a distância de esquiva de camundongos durante a aproximação do predador no teste de esquiva ao predador. Ainda, quando os animais foram submetidos ao contato forçado com o predador, ambas as doses do oCRF

produziram aumentos da frequência de saltos defensivos (visando diminuir o contato com o predador), enquanto reduziram a postura de levantar defensivo nessa tarefa. Esse padrão de resposta indica que oCRF intra-MCPD alterou particularmente alguns comportamentos que visam amenizar o confronto direto ou contato com predador, ou seja, aqueles relacionados a esquiva.

Embora com um moderado efeito, nossos dados estão em concordância com uma ampla literatura que mostra que a administração i.c.v de CRF aumenta as respostas defensivas em vários modelos animais de ansiedade (ex. resposta de sobressalto potencializada pelo medo, aquisição de medo condicionado e indução de congelamento por choque) (para uma revisão ver Griebel, 1999). Além disso, a microinjeção desse peptídeo em estruturas encefálicas específicas, tais como amígdala, locus coeruleus e hipotálamo paraventricular, favorece a expressão de comportamentos defensivos relacionados ao medo e ansiedade (para uma revisão ver Griebel, 1999). Na mesma linha de argumentação, a infusão intra-MCPD de CRF potencializa as reações de defesa de ratos avaliados no labirinto em cruz elevado (Martins et al., 1997).

Diferentemente da grande parte dos modelos de medo e ansiedade, o MDTB envolve confronto direto da presa (camundongo) com o predador (rato anestesiado seguro pelo experimentador), no qual, inicialmente, o predador é lentamente aproximado da presa, em seguida levado a persegui-la e por fim a tocá-la. Em tal procedimento, o qual é composto por várias fases, são remotas as possibilidades da presa de evitar o predador, de forma que esse elevado nível de ameaça e estresse elicia respostas defensivas extremamente intensas. Assim, uma possível explicação para moderado/fraco efeito do composto oCRF avaliado no MDTB seria devido ao próprio

teste, que por si só teria eliciado um nível de ameaça/defesa teto onde o efeito do composto não pôde ser detectado claramente.

Em recente estudo, Yang e colaboradores (2006) mostraram que a infusão i.c.v. do composto oCRF intensificou de maneira consistente a maioria dos comportamentos defensivos expressados por camundongos no MDTB. Por exemplo, durante o procedimento foram caracterizados aumentos nos comportamentos de avaliação de risco, congelamento, fuga, esquiva e saltos defensivos. Tal resultado condiz com a viabilidade de uma intensificação das reações de defesa avaliadas no MDTB. No entanto, os discrepantes resultados relatados entre o presente estudo e aqueles conduzidos por Yang e colaboradores (2006) podem estar relacionados às diferentes linhagens de camundongos utilizadas (Swiss-Webster x CD1), diferentes sítios de injeção (intra-MCPD x i.c.v), bem como a substancial diferença nas faixas de doses de oCRF utilizadas (30-100ng x 450-950ng). Com relação à faixa de dose, parece razoável sugerir que doses mais elevadas de oCRF intra-MCPD poderiam produzir resultados ansiogênicos mais expressivos no MDTB.

Por outro lado, o possível efeito teto sugerido acima para o MDTB é compatível com os resultados obtidos com o oCRF no RET. O RET (ver Introdução: Modelos Animais de Ansiedade/Medo), diferentemente do MDTB, permite a presa (camundongo) escolher aproximar ou esquivar-se do estímulo aversivo, o rato, de modo que o nível da intensidade da ameaça/estresse é menor que aquela experimentada pela presa no MDTB. De fato, a injeção intra-MCPD de oCRF intensificou de maneira consistente a situação ansiogênica do RET. Os animais tratados aumentaram o tempo gasto na toca e diminuíram o tempo no túnel, na superfície de exposição e em contato com a tela de arame que separava o camundongo do predador. Esses achados apontam para um efeito específico na resposta de esquiva

ao predador. Vale enfatizar as reduções da frequência e duração de avaliação de risco no túnel, indicando também um efeito ansiogênico. No entanto, quando analisado em porcentagem relativa ao tempo de permanência no túnel, esse comportamento não foi significativamente ($p=0,25$) aumentado quando comparado ao grupo controle, enfraquecendo a hipótese de que a droga tenha alterado esse comportamento. Embora o oCRF tenha reduzido o número de transições entre os compartimentos, esse resultado não deve ser considerado como um efeito intrínseco da droga na atividade motora, uma vez que não foram constatadas alterações da função locomotora medidas durante o pré-teste do MDTB. Em relação ao comportamento de congelamento, embora pareça estar aumentado para os animais que receberam microinjeção de oCRF, não foi significativamente diferente quando comparado aos animais que receberam salina intra-MCPD.

As alterações provocadas pelo tratamento com oCRF intra-MCPD no RET sugerem que ativação do sistema CRF nessa estrutura intensifica os comportamentos antipredador, principalmente aqueles relacionados a esquiva do predador. Esses resultados corroboram os obtidos com o oCRF no MDTB. Na bateria de teste, os animais tratados com oCRF aumentaram a distância de esquiva diante da aproximação do predador. Nossos resultados também corroboram aqueles de Martins e colaboradores (1997), que demonstraram que a infusão de CRF intra-MCPD aumenta a esquiva dos braços abertos de ratos testados no LCE. Nesse estudo a infusão intra-MCPD de CRF reduziu a porcentagem de entrada e tempo gasto nos braços abertos de ratos submetidos ao LCE (índice de ansiedade), sem alterar o número de entrada nos braços fechados, uma medida geralmente usada para avaliar índice geral da atividade locomotora (Rodgers & Jonhson, 1995).

Recentemente, D. C. Blanchard, M. Yang e R. J. Blanchard (comunicação oral, 2004) demonstraram que esses comportamentos antipredador expressos no RET são alterados pela administração sistêmica de drogas, diazepam e buspirona, clinicamente comprovados para o tratamento dos transtornos de ansiedade. Nesse estudo, os compostos com propriedades ansiolíticas atenuaram significativamente as medidas espaço-temporais e etológicas. Dessa maneira, seria razoável sugerir um envolvimento do sistema CRF na MCP na organização e expressão de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade. De fato, um envolvimento local de receptores CRF no estado de ansiedade tem sido confirmado por Martins e colaboradores (2000). Esses pesquisadores demonstraram que a administração intra-MCPD do antagonista competitivo de receptores CRF, CRF₍₉₋₄₁₎ α -helical, atenuou as respostas de ansiedade no LCE em ratos previamente estressados pela imobilização forçada. Portanto, esses achados indicam uma específica participação da neurotransmissão CRFérgica na MCPD na modulação de reações de defesa relacionadas a ansiedade. No entanto, essa participação parece ser de menor magnitude que aquela observada para o sistema glutamato/NMDA/NO, visto que a ativação dos receptores CRF na MCPD não alterou significativamente, em nenhum momento do procedimento do RET, o principal comportamento relacionado à ansiedade – a avaliação de risco.

Por outro lado, os resultados do presente estudo também apontam para a participação do sistema CRFérgico em respostas mais intempestivas coordenadas pela MCPD. Por exemplo, quando confrontados pelo predador no teste do contato forçado, camundongos tratados aumentaram as tentativas de escape (saltos defensivos). Cabe salientar que várias evidências da literatura têm proposto que essa estratégia defensiva, juntamente com a resposta de fuga expressada em situações de perigo

proximal, é relacionada ao estado de medo, ou, mais especificamente ao pânico (Blanchard & Blanchard, 1988; Graeff & Deakin, 1991; Graeff, 1994; Blanchard et al., 2001; McNaughton & Corr, 2004). Assim, com base nessas evidências poder-se-ia sugerir também uma modulação CRFérgica na matéria cinzenta periaquedutal para os comportamentos que são relacionados aos ataques de pânico. Em apoio a essa hipótese, estudos com modelos animais e clínicos têm sugerido um envolvimento da transmissão CRFérgica na gênese dos ataques de pânico (para uma revisão ver Risbrough & Stein, 2006). Por fim, os resultados do Experimento 5 sugerem a participação da transmissão CRFérgica na MCPD tanto na modulação de estratégias defensivas mais intempestivas do tipo fuga e luta (aumento dos saltos defensivos no MDTB) quanto naquelas mais elaboradas e direcionadas (aumento de esquivas ao predador) relacionadas a ansiedade.

Considerações finais

Os resultados da primeira etapa do presente estudo indicam que a fuga desencadeada imediatamente após a infusão do ácido DLH na MCPD é a resposta predominante de camundongos. Entretanto, esta resposta comportamental depende da disponibilidade de espaço, sendo que a maioria dos saltos observados na arena está intimamente relacionada ao contato tátil do animal com as paredes do aparato. Além disso, essas respostas comportamentais (fuga explosiva e saltos) induzidas pela estimulação química parecem não representar o padrão natural de respostas adaptadas ao ambiente, tal como acontece com os animais frente a uma ameaça proximal (como um predador). De fato, durante o efeito da estimulação química, os camundongos exibiram um claro déficit na estratégia antipredador. Portanto, o presente estudo indica a necessidade de análises e interpretações mais rigorosas e cautelosas para a

determinação de analogias entre comportamentos eliciados artificialmente pela estimulação de uma dada estrutura cerebral com aqueles eliciados por estímulos naturalmente aversivos.

Por outro lado, a segunda etapa do presente estudo, utilizando estímulo natural na evocação de estados emocionais e comportamentos defensivos relacionados à espécie, destaca a participação dos sistemas glutamatérgicos, nitrérgicos e CRFérgico localizados na matéria cinzenta periaquedutal na modulação de diferentes estratégias defensivas (ex. esquiva, avaliação de risco e saltos) de camundongos submetidos ao confronto com o predador.

Em conclusão, nossos resultados corroboram a hipótese de que a MPCD, uma estrutura anatomicamente mais caudal, além de estar envolvida na organização e expressão de comportamentos intempestivos do tipo fuga e luta, os quais são relacionados ao estado de medo, também participa, juntamente com estruturas prosencefálicas (ex. córtex pré-frontal, sistema septo-hipocampal e amígdala), do controle de comportamentos defensivos mais elaborados e orientados relacionados à ansiedade (McNaughton & Corr 2004).

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS DB. Brain mechanisms for offense, defense, and submission. *The Behavioral and Brain Sciences* 2: 201-241, 1979.
- AGUIAR DC, MOREIRA FA, GUIMARÃES FS. Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-d-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. *Pharmacol Biochem Behav* 83(2):296-301, 2006.
- ARBORELIUS L, OWENS MJ, PLOTSKY PM, NEMEROFF CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* 60:1-12, 1999.
- BALDWIN HA, RASSNICK S, RIVIER J, KOOB GF, BRITTON KT. CRF antagonist reverses the "anxiogenic" response to ethanol withdrawal in the rat. *Psychopharmacol (Berl)* 103(2):227-32, 1991.
- BANDLER R, DEPAULIS A, VERGNES M. Identification of midbrain neurones mediating defensive behavior in the rat by microinjections of excitatory amino acids. *Behav Brain Res* 15: 107-19, 1985.
- BANDLER R, DEPAULIS A. Elicitation of intraspecific defence reactions in the rat from midbrain periaqueductal grey by microinjection of kainic acid, without neurotoxic effects. *Neurosci Letters* 88:291-296, 1988.
- BANDLER R, CARRIVE P. Integrated defense reaction elicited by excitatory amino acid in the midbrain periaqueductal gray region of the unrestrained cat. *Brain Res* 439, (1-2): 95-106, 1988.
- BANDLER R, CARRIVE P, ZHANG SP. Integration of somatic autonomic reactions within the midbrain periaqueductal gray: Viscerotopic, somatotopic and functional organization. *Prog Brain Res* 87:269-305, 1991.
- BANDLER R, DEPAULIS A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and the rat. In: DEPAULIS A, BANDLER R. The midbrain periaqueductal gray matter. *Plenum Press*, New York pp-175-197, 1991.
- BANDLER R, SHIPLEY MT. columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modulates for emotional expression? *Trends Neurosci* 17:379-389, 1994.
- BANDLER R, PRICE JL, KEAY KA. Brain mediation of active and passive emotional coping. *Prog Brain Res* 122:333-349, 2000.

- BECKETT SR, MARSDEN CA, MARSHALL PW. Microinjections of DLH into the rat periaqueductal gray matter induce a dose-dependent defense response attenuated by midazolam. *Br J Pharmacol* 101: p.585, 1990.
- BECKETT SR, LAWRENCE AJ, MARSDEN CA, MARSHALL PW. Attenuation of chemically induced defence response by 5-HT₁ receptor agonists administered into the periaqueductal gray. *Psychopharmacol (Berl)* 108(1-2):110-114, 1992.
- BEHBEHANI MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Progress Neurobiol.* 46:575-605, 1995.
- BEITZ AJ. Central Gray. In: Paxinos G. The human nervous system. *Academic Press*, New York 1990.
- BEIJAMINI V, GUIMARÃES FS. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. *Behav Brain Res* 170(1):52-61, 2006.
- BERGINK V, VAN MEGEN H J G M, WESTENBERG HGM. Glutamate and Anxiety. *Eur Neuropsychopharmacol* 14(3):175-183, 2004.
- BERTOGLIO LJ, ANZINI C, LINO-DE-OLIVEIRA C, CAROBREZ AP. Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteracts the anxiolytic response to midazolam on the elevated plus-maze Trial 2 in rats. *Behav brain Res* 162(1):99-107, 2005.
- BITTENCOURT AS, NAKAMURA-PALACIOS EM, MAUAD H, TUFIK S, SCHENBERG LC. Organization of electrically and chemically evoked defensive behaviors within the deeper collicular layers as compared to periaqueductal gray matter of the rat. *Neurosci* 133:873-892, 2005.
- BLANCHARD DC, WILLIAMS G, LEE EMC, BLANCHARD RJ. Taming wild *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central gray. *Physiol psychol* 9:157-63, 1981.
- BLANCHARD RJ, FLANNELLY KJ, BLANCHARD DC. Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *J Comp Psychol* 100(2):101-107, 1986.
- BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Rev of Psychol* 39: 43-68, 1988.

BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ, RODGERS RJ. Pharmacological and neural control of anti-predator defense in the rat. *Aggress Behav* 16: 165-176, 1990.

BLANCHARD RJ, YUDKO EB, RODGERS RJ, BLANCHARD DC. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav Brain Res* 58: 155-165, 1993.

BLANCHARD RJ, PARMIGIANI S, BJORNSEN C, MASUDA C, WEISS SM, BLANCHARD DC. Antipredator behavior of Swiss-Webster mice in a visible burrow system. *Aggress Behav*. 21:123-136, 1995.

BLANCHARD DC. Stimulus and environmental control of defense behaviors. In: BOUTON M, FANSELOW M. eds. The functional behaviorism of Robert C. Bolles: Learning, motivation and cognition. Washington, DC: *American Psychological Association* p. 283-305, 1997.

BLANCHARD RJ, GRIEBEL G, HENRIE JA, BLANCHARD DC. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 783-789, 1997.

BLANCHARD RJ, HEBERT MA, FERRARI P, PALANZA P, FIGUEIRA R, BLANCHARD DC, PARMIGIANI S. Defensive behaviors in wild and laboratory (Swiss) mice: the mouse defense test battery. *Physiol Behav* 65(2):201-209, 1998

BLANCHARD RJ, KAAWALOA JN, HEBERT MA, BLANCHARD DC. Cocaine produces panic-like flight responses in mice in the mouse defense test battery. *Pharmacol Biochem Behav* 64(3):523-528, 1999.

BLANCHARD DC, GRIEBEL G, BLANCHARD RJ. Mouse defense behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 25:205-218, 2001.

BLANCHARD DC, GRIEBEL G, BLANCHARD RJ. Mouse defense behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Eur J Pharmacol* 463(1-3):97-116, 2003.

BLANCHARD DC, YANG M, MARKHAM C, FARROH KI CF, PENTKOWSKI NS, BLANCHARD RJ, GRIEBEL G. Diazepam and buspirone effects in c57bl/6j mice in the rat exposure test (ret) Program No. 784.3. 2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2004. Online.

BORELLI KG. Distribuição da proteína Fos no encéfalo durante estados aversivos induzidos pela inibição GABAérgica na substância periaquedutal dorsolateral e no colículo inferior de ratos [Tese de doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2006.

BRANDÃO ML, ANSELONI VZ, PANDOSSIO JE, DE ARAUJO JE, CASTILHO VM. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsol midbrain. *Neurosci Biobehav Rev* 23:863-875, 1999.

CABRAL JCP, CORNÉLIO AM, CARVALHO-NETTO EF, NUNES-DE-SOUZA, RL. A dor reverte o efeito ansiolítico do L-NAME injetado na Matéria Cinzenta Periaquedutal (MCP) de camundongos. Apresentado na XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – Fesbe, 01.06.062., 2003.

CANTERAS NS, SWANSON LW. The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. *Proc Nalt Acad Sci USA* 89:10089-10093, 1992.

CANTERAS NS, CHIAVEGATTO S, RIBEIRO DO VALLE LE, SWANSON LW. Severe reduction of defensive behavior to predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res Bull* 44:297-305, 1997.

CANTERAS NS, GOTO M. Fos-like imunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator, *Neuroreport* 10:413–418, 1999.

CANTERAS NS. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol Biochem Behav* 71:481-491, 2002.

CAROBREZ AP, TEIXEIRA KV, GRAEFF FG. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neurosci Biobehav Rev* 25(7-8):697-709, 2001.

CAROBREZ AP. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. *Rev Bras Psiquiatr* 25(supl II):52-58, 2003.

CARRIVE P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional significance and neuronal organization. *Behav Brain Res* 58:27-47,1993.

CARVALHO NETTO EF, NUNES-DE-SOUZA RL. Use of the elevated T-maze to study anxiety in mice. *Behav Brain Res* 148(1-2): 119-132, 2004a.

- CARVALHO-NETTO EF, NUNES-DE-SOUZA RL. Behavioral responses followed by chemical stimulation of the midbrain periaqueductal gray in mice. *Internat Behav Neurosci Soc. (Personal communication)* 13: 49, 2004b.
- CAZALA P, GARRIGUES AM. Differential aversive effects of mesencephalic central gray stimulation in two inbred strains of mice. *Behav Neural Biol.* 32(1):114-120, 1981.
- CHALMERS DT, LOVENBERG TW, DE SOUZA EB. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci* 15:6340-6350, 1995.
- CHIAVEGATTO S, SCAVONE C, CANTERAS NS. Nitric oxide synthase activity in the dorsal periaqueductal gray of rats expressing innate fear responses. *Neuroreport* 9 (4):571-576, 1998.
- COLLINGRIDGE GL, LESTER RA. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 41(2):143-210, 1989
- CRATTY MS, BIRKLE DL. N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated corticotropin-releasing factor (CRF) release in cultured rat amygdala neurons. *Peptides* 20(1):93-100, 1999.
- DANYSZ W, ESSMANN U, BRESINK I, WILK R. Glutamate antagonists have different effects on spontaneous locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 48(1):111-118, 1994.
- DAWASON TM, SYNDER SH. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14(9):5147-159, 1994.
- DEAKIN JFW, GRAEFF FG. 5HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol* 5:305-315, 1991.
- DEL BEL EA, SILVA CA, GUIMARÃES FS. Catalepsy induced by nitric oxide synthase inhibitors. *General Pharmacol* 30:245-248, 1998.
- DEL BEL EA, SOUZA AS, GUIMARÃES FS, SILVA CA, NUCCI-DA-SILVA LP. Motor effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis in mice. *Psychopharmacol* 161:32-37, 2002

- DEL BEL EA, SILVA CA, GUIMARÃES FS, BERMUDEZ-ECHEVERRY M. Catalepsy induced by intra-striatal administration of nitric oxide synthase inhibitors in rats. *Eur J Pharmacol* 485:175-181, 2004.
- DE CATANZARO D. Effect of predator exposure upon early pregnancy in mice. *Physiol Behav* 43:691-696, 1988.
- DE OLIVEIRA CL, DEL BEL EA, GUIMARÃES FS. Effects of L-NOARG on plus maze performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 56(1):55-59, 1997.
- DE OLIVEIRA RW, DEL BEL EA, GUIMARÃES FS. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Brain Res Bull* 51(6):457-464, 2000.
- DE OLIVEIRA RW, DEL BEL EA, GUIMARÃES FS. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. *Neurosci Biobehav Rev* 25(1-2):679-685, 2001.
- DEPAULIS A, BANDLER R, VERGNES M. Characterization of pretentorial periaqueductal gray matter neurons mediating intraspecific defensive behaviors in the rat by microinjections of kainic acid. *Brain Res* 486:121-132, 1989.
- DE SOUZA EB. Corticotropin-releasing factor receptors in the rat central nervous system: characterization and regional distribution. *J Neurosci* 7:88-100, 1987.
- DE SOUZA EB. Corticotropin-releasing factor receptors: Physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinol* 20:789-819, 1995.
- DIELENBERG RA, HUNT GE, MCGREGOR IS. "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor, *Neurosci* 104:1085–1097, 2001.
- DUNN RW, CORBETT R, FIELDING S. Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and NMDA receptor antagonists in the social interaction test and the elevated plus maze. *Eur. J Pharmacol* 169:1–10, 1989.
- DUNN AJ, BERRIDGE CW. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res Rev* 15:71-100, 1990.

- ESPLUGUES J. NO as a signalling molecule in the nervous system, *Br J Pharmacol*. 135:1079–1095, 2002.
- FAGG GE, FOSTER AC, GANONG AH. Excitatory amino acid synaptic mechanism and neurological function. *Trends Pharmacol Sci* 7:357-363, 1986.
- FERNANDEZ DE MOLINA A, HUNSPERGER RW. Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: Electrical stimulation of amygdala, stria terminalis, and adjacent structures. *J Physiol* 145(2):251-265, 1959.
- GALLY JA, MONTAGUE PR, REEKE GNJR, EDELMAN GM. The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci* 87:3547-3551, 1990.
- GARTHWAITE J, CHARLES SL, CHESS-WILLIAMS R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336:385-388, 1988.
- GARTHWAITE J, GARTHWAITE G, PALMER RM, MONCADA S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 172(4-5):413-416, 1989
- GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 14(2):60-67,1991.
- GOODCHILD AK, DAMPNEY RA, BANDLER R. A method for evoking physiological responses by stimulation of cell bodies, but not axons of passage, within localized regions of the central nervous system. *J Neurosci Methods* 6(4):351-363, 1982.
- GRAY JA. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. 1th ed. Oxford University Press, London, 1982.
- GRAY JA, MCNAUGHTON N. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. 2th ed. Oxford University Press, London, 2000.
- GRAEFF FG. Minor tranquilizers and brain defense system. *Braz J Med Biol Res* 14:239-265, 1981.

- GRAEFF FG. Brain defence systems and anxiety. In: Roth, M.; Burrows, G. D.; Noyes, R. (eds.) *Handbook of anxiety*, Vol. 3, *Elsevier Science Publishers*, Amsterdam, pp. 307-354, 1990.
- GRAEFF FG. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res* 27(4):811-829, 1994.
- GRAEFF F G, ZANGROSSI JR H. Animal models of anxiety. In: D'HAENEN.; DEN BOER, J. A.; WILLER, P. Eds. *Biolog Psychiatr*. John Wiley & Sons Ltd. 2002. p. 1-15.
- GRAEFF FG. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 28:239-259, 2004.
- GRIEBEL G, PERRAULT G, SANGER DJ. Characterization of the behavioral profile of the non-peptide CRF receptor antagonist CP-154,526 in anxiety models in rodents. Comparison with diazepam and buspirone. *Psychopharmacol* 138:55-66, 1998.
- GRIEBEL G. Is there a future for neuropeptide receptor ligands in the treatment of anxiety disorders? *Pharmacol Ther* 82(1):1-61, 1999.
- GRIFFITHS R. Sulphur-containing excitatory amino acids. In: KROGSGAARD-LARSEN P, HANSEN JJ. (eds.) *Excitatory Amino Acid receptor: Design of agonist and antagonist*. *Ellis Horwood*, London, pp. 163-181, 1991.
- GUIMARÃES FS, CAROBREZ AP, DE AGUIAR JC, GRAEFF F.G.. Anxiolytic effect in the elevated plus maze of NMDA receptor antagonist AP 7 microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacol* 103:91-94, 1991.
- GUIMARÃES FS, DE AGUIAR JC, DEL-BEL EA, BALLEJO G. Anxiolytic effect of NO synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *Neuro Report* 5:123-126, 1994.
- GUIMARÃES FS, BEIJAMINI V, MOREIRA FA, AGUIAR DC, DE LUCA ACB. Role of nitric oxide on brain regions related to defensive reactions. *Neurosci Biobehav Rev* 29(8):1313-1322, 2005.
- HESS WR, BRUGGER M. Das subkortikale Zentrum der affektiven Abwehrreaktion, *Acta Helv Physiolog* 1: 33-52, 1943.

- HILTON SM, REDFERN WS. A search for brainstem cell groups integrating the defense reaction in the rat. *J Physiol* 378: 213-228, 1986.
- JARDIM MC, NOGUEIRA RL, GRAEFF FG, NUNES-DE-SOUZA RL. Evaluation of the elevated T-maze as an animal model of anxiety in the mouse. *Brain Res Bull* 57(1):1-5, 1999.
- JARDIM MC, GUIMARÃES FS. GABAergic and glutamatergic modulation of exploratory behavior in the dorsomedial hypothalamus. *Pharmacol Biochem Behav* 69(3-4): 579-584, 2001.
- JENCK F, MOREAU JL, MARTIN JR. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res* 57(2):181-191, 1995.
- JOANNY P, STEINBERG J, OLIVER C, GRINO M. Glutamate and N-methyl-D-aspartate stimulate rat hypothalamic corticotropin-releasing factor secretion in vitro. *J Neuroendocrinol* 9(2):93-7, 1997.
- KEAY KA, BANDLER R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neurosci Biobehav Rev* 25:669-678, 2001.
- KOOB GF, HEINRICHS SC, PICH EM, MENZAGLI F, BALDWIN H, MICZEK K, BRITTON KT. The role of corticotropin-releasing factor in behavioural responses to stress. *Ciba Found Symp* 172:277-89, 1993.
- KOOB GF, HEINRICHS SC. A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain Res* 848:141-152, 1999.
- LADER MH. Clinical anxiety and the benzodiazepines. In: Neuropharmacology of Central Nervous System and Behavioral Disorders. Palmer GC, ed., *Academic Press*, New York, pp. 225-241, 1981.
- LEGER L, CHARNAY Y, BURLET S, GAY N, SCHAAD N, BOURAS C, CESPUGLIO R. Comparative distribution of nitric oxide synthase- and serotonin-containing neurons in the raphe nuclei of four mammalian species. *Histochem cell biol* 110(5):517-525, 1998.
- LEHMAN J, SCHNEIDER J, MCPHERSON S, MURPHY DE, BERNARD P, TSAI C, BENNETT DA, PASTOR G, STEEL DJ, BOEHM C. CPP, a selective N-methyl-

D-aspartate (NMDA)-type receptor antagonist: characterization in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 240:737–746, 1987.

LIN HC, KANG BH, WAN FJ, HUANG ST, TSENG CJ. Reciprocal regulation of nitric oxide and glutamate in the nucleus tractus solitarii of rats. *Eur J Pharmacol* 407:83–89, 2000.

LUNDKVIST J, CHAI Z, TEHERANIAN R, HASANVAN H, BARTFAI T, JENCK F, WIDMER U, MOREAU JL. A non peptidic corticotropin releasing factor receptor antagonist attenuates fever and exhibits anxiolytic-like activity. *Eur J Pharmacol* 309:195-200, 1996.

MARKS IM. Fears, phobia and rituals: panic, anxiety and their disorders. *Oxford University Press*, New York.1987.

MANTHY PH. The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat and monkey: a nissl, weiss and golgi analysis. *The J.Comp Neurol* 204:146-158, 1982.

MARTINS AP, MARRAS RA, GUIMARÃES FS. Anxiogenic effect of corticotropin-releasing hormone in the dorsal periaqueductal grey. *Neuroreport* 8(16):3601-3604, 1997.

MARTINS AP, MARRAS RA, GUIMARÃES FS. Anxiolytic effect of a CRH receptor antagonist in the dorsal periaqueductal gray. *Depress Anxiety* 12(2):99-101, 2000.

MATHEUS MG, GUIMARÃES FS. Antagonism of the non-NMDA receptors in the dorsal periaqueductal gray induces anxiolytic effect in th elevated plus maze. *Psychopharmacol (Berl)*132:14-18, 1997.

MCNAUGHTON N, CORR PJ. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev* 28(3):285-305, 2004.

MELDRUM BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 130(4S SUPPL):1007S-10015S, 2000.

MILLAN MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66(6):355-474, 2002.

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

- MIGUEL TT, NUNES-DE-SOUZA RL. Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. *Brain Res* 1076(1):42-8, 2006.
- MOLCHANOV ML, GUIMARÃES FS. Defense reaction induced by a metabotropic glutamate receptor agonist microinjected into the dorsal periaqueductal gray of rats. *Braz J Med Biol Res* 32(12):1533-1571, 1999.
- MOLCHANOV ML, GUIMARÃES FS. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacol* 160(1):30-38, 2002.
- MOREIRA FA, MOLCHANOV ML, GUIMARÃES FS. Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacol (Berl)* 171(2):199-203, 2004.
- MULLER MB, WURST W. Getting closer to affective disorders: the role of CRH receptor systems. *Trends Mol Med* 10(8):409-415, 2004
- NASHOLD BS JR, WILSON WP, SLAUGHTER DG. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30(1):14-24, 1969.
- NIKULINA EM. Neural control of predatory aggression in wild and domesticated animals. *Neurosci Biobehav Rev* 15:545-547, 1991.
- NOWICKY AV, BINDMAN LJ. The nitric oxide synthase inhibitor, N-monomethyl-L-arginine blocks induction of a long-term potentiation-like phenomenon in rat medial frontal cortical neurons in vitro. *J Neurophysiol* 70(3):1255-1259, 1993.
- OKADA D. Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor-mediated nitric oxide synthesis. *J Neurochem* 59(4):1203-1210, 1992.
- OLDS ME, OLDS J. Pharmacological patterns in subcortical reinforcement behavior. *Int J Neuropharmacol* 64:309-325, 1962.
- OTTERSEN OP, STORM-MATHISEN J. Handbook of chemical neuroanatomy. Glutamate, vol. 18. Amsterdam:Elsevier, 2000.
- OZAWA S, KAMIYA H, SUZUKI K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54(5):581-618, 1998.

PANKSEPP J. The psychoneurology of fear: evolutionary perspective and the role of animal models in understanding human anxiety. In: Burrows G D, Roth M, Noyes, Jr R. *Handbook of anxiety. The neurobiology of anxiety*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1990, v.3, p.3-58.

PAXINOS G, FRANKLIN KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd ed. Academic Press, California; 2001.

PODHORNA J, BROWN RE. Interactions between n-methyl-D-aspartate and nitric oxide in the modulation of ultrasonic vocalizations of infant rats. *Eur J Pharmacol* 408(3): 265-271, 2000.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as a modulator of neuronal function. *Progr Neurobiol* 64:51-59, 2001.

RADULOVIC J, RUHMANN A, LIEPOLD T, SPIESS J. Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. *J neuroscience* 19(12):5016-5025, 1999.

REISER G. Mechanism of stimulation of cyclic-GMP level in a neuronal cell line mediated by serotonin (5-HT₃) receptors. Involvement of nitric oxide, arachidonic-acid metabolism and cytosolic Ca²⁺. *Eur J Biochem* 20;189(3):547-552, 1990a.

REISER G. Endothelin and a Ca²⁺ ionophore raise cyclic GMP levels in a neuronal cell line via formation of nitric oxide. *Br J Pharmacol* 101(3):722-726, 1990b.

RISBROUGH VB, HAUGER RL, ROBERTS AL, VALE WW, GEYER MA. Corticotropin-releasing factor receptors CRF1 and CRF2 exert both additive and opposing influences on defensive startle behavior. *J Neurosci* 24:6545-6552, 2004.

RIVIER CL, GRIGORIADIS DE, RIVIER JE. Role of corticotropin-releasing factor receptors type 1 and 2 in modulating the rat adrenocorticotropin response to stressors. *Endocrinol* 144:2396-2403, 2003.

RODGERS RJ, JOHNSON NJT. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 52: 297-303, 1995.

RISBROUGH VB, STEIN MB. Role of corticotropin releasing factor in anxiety disorders: a translational research perspective. *Horm Behav* 50(4):550-61, 2006.

- RYLOV AI. Change of predatory intraspecies aggression of males rats under food deprivation. *Zh Vyssh Nervn Deyat im I P Pavlova* 35:875-878, 1985.
- SAWCHENKO PE, IMAKI T, POTTER E, KOVACS K, IMAKI J, VALE W. The functional neuroanatomy of corticotropin-releasing factor. *Ciba Found Symp* 172 (5-21):21-29,1993
- SCHENBERG LC, BITTENCOURT AS, SUDRÉ ECM, VARGAS LC. Modeling panic attacks. *Neurosci Behav Rev* 25:647–659,2001.
- SCHENBERG LC, POVOA RMF, COSTA ALP, CALDELLAS AV, TUFIK S, BITTENCOURT AS. Functional specializations within the tectum defense systems of the rats. *Neurosci Behav Rev* 29(8): 1279–1298, 2005.
- SCHMITT ML, COELHO W, LOPES-DE-SOUZA AS, GUIMARÃES FS, CAROBREZ AP. Anxiogenic-like effect of glycine and D-serine microinjected into dorsal periaqueductal gray matter of rats. *Neurosci Lett* 189: 93–96, 1995.
- SEWARDS TV, SEWARDS MA. Fear and power-dominance drive motivation: neural representations and pathways mediating sensory and mnemonic inputs, and outputs to premotor structures. *Neurosci Biobehav Rev* 26(5):553-79, 2002.
- SIEGFRIED B, NUNES-DE-SOUZA RL. NMDA receptor blockade in the periaqueductal grey prevents stress-induced analgesia in attacked mice. *Eur J Pharmacol* 168 (2):239–242, 1989.
- SOUTHAM E, EAST SJ, GARTHWAITE J. Excitatory amino acid receptors coupled to the nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat cerebellum during development. *J Neurochem* 56(6):2072-2081, 1991.
- STARR MS, STARR BS. Do NMDA receptor-mediated changes in motor behaviour involve nitric oxide? *Eur J Pharmacol* 272:211–217, 1995.
- STIEDL O, MEYER M, JAHN O, OGREN SO, SPIESS J. Corticotropin-releasing factor receptor 1 and central heart rate regulation in mice during expression of conditioned fear. *J Pharmacol Exp Ther* 312(3):905-16, 2005.
- SUKIKARA MH, MOTA-ORTIZ SR, BALBO MV, FELÍCIO LF, CANTERAS NS. A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. *J Neurosci* 26(9):2583-9, 2006.

- SWANSON LW, SAWCHENKO PE, RIVIER J, VALE WW. Organization of the ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinol* 36:165-186, 1983.
- TAKAHASHI LK. Role of CRF(1) and CRF(2) receptors in fear and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 25(7-8): 627-636, 2001.
- TEIXEIRA KV, CAROBREZ AP. Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plus-maze task. *Behav Neurosci* 113 1:196-203, 1999.
- TURSKI L, KLOCKGETHER T, SONTAG KH, HERRLING PL, WATKINS JC. Muscle relaxant and anticonvulsant activity of 3-((±)-2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid, a novel N-methyl-D-aspartate antagonist, in rodents. *Neurosci Lett* 73: 143-148, 1987.
- VALENSTEIN ES. Independence of approach and escape reactions to electrical stimulation of the brain. *J Comp Physiol Psychol* 60:20-30, 1965.
- VALE WW, SPIESS J, RIVIER C, RIVIER J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 18:1394-1397, 1981.
- VAN PETT K, VIAU V, BITTENCOURT JC, CHAN RK, LI HY, ARIAS C, PRINS GS, PERRIN M, VALE W, SAWCHENKO PE. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol* 428(2):191-212, 2000.
- VARGAS LC, SCHENBERG LC. Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacol* 155(3):260-268, 2001.
- VASAR E, HARRO J, LANG A, SOOSAAR A, OOIPIK T, KOKS S, SIHVER S, VOLKE V. Anti-exploratory effect of N-methyl-D-aspartate in elevated plus-maze. Involvement of NMDA and CCK receptors. *Eur. Neuropsychopharmacol* 3:63-73, 1993.

- VIANNA DM, BRANDÃO ML. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. *Braz J Med Biol Res*; 36(5):557-66, 2003 (Review).
- VINCENT SR, KIMURA H. Histochemical mapping of the nitric oxide synthase in the rat brain. *Neurosci* 46:755-784, 1992.
- WIERONSKA JM, SZEWCZYK B, PALUCHA A, BRANSKI P, SMIALOWSKA M. Involvement of CRF but not NPY in the anxiety regulation via NMDA receptors. *Pol j Pharmacol* 55(6):1119-1124, 2003.
- WOOD J, GARTHWAITE J. Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacol* 33(11):1235-1244, 1994.
- WUENSCH KL. Fostering house mouse onto rats and deer mice: Effects on response to species odors. *Anim Learn Behav* 20:253-258, 1992.
- YANG M, AUGUSTSSON H, MARKHAM C, HUBBARD DT, WEBSTER D, WALL PM, BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. *Physiol Behav* 81(3):465-473, 2004.
- YANG M, FARROKHI C, VASCONCELLOS A, BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC. Central infusion of ovine CRF (oCRF) potentiates defensive behaviors in CD-1 mice in the mouse defense test battery (MDTB). *Behav Brain Res* 171(1):1-8, 2006.

9.ANEXOS

Physical environment modulates the behavioral responses induced by chemical stimulation of dorsal periaqueductal gray in mice

E.F. Carvalho-Netto^{a,b,*}, C. Markham^c, D.C. Blanchard^{d,e},
R.L. Nunes-de-Souza^b, R.J. Blanchard^c

^a Psychobiology Graduate Program, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brazil

^b Laboratory of Pharmacology, São Paulo State University-UNESP, Araraquara, SP 14801-902, Brazil

^c Department of Psychology, University of Hawaii, Honolulu, HI 96822, USA

^d Pacific Biomedical Research Center, University of Hawaii, Honolulu, HI 96822, USA

^e Department of Genetics and Molecular Biology, John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii, Honolulu, HI 96822, USA

Received 6 April 2006; received in revised form 6 July 2006; accepted 18 July 2006

Available online 1 September 2006

Abstract

In order to investigate the relationship between behaviors elicited by chemical stimulation of the dorsal periaqueductal gray (dorsal PAG) and spontaneous defensive behaviors to a predator, the excitatory amino acid D,L-homocysteic acid (5 nmol in 0.1 μ l), was infused into the dorsal PAG and behavioral responses of mice were evaluated in two different situations, a rectangular novel chamber or the Mouse Defense Test Battery (MDTB) apparatus. During a 1-min period following drug infusion, more jumps were made in the chamber than in the MDTB runway but running time and distance traveled were significantly higher in the runway. Animals were subsequently tested using the standard MDTB procedure (anti-predator avoidance, chase and defensive threat/attack). No drug effects on these measures were significant. In a further test in the MDTB apparatus, the pathway of the mouse during peak locomotion response was blocked 3 times by the predator stimulus (anesthetized rat) to determine if the mouse would avoid contact. Ninety percent of D,L-homocysteic treated animals made direct contact with the stimulus (rat), indicating that D,L-homocysteic-induced running is not guided by relevant (here, threat) stimuli. These results indicate that running as opposed to jumping is the primary response in mice injected with D,L-homocysteic into the dorsal PAG when the environment enables flight. However, the lack of responsivity to the predator during peak locomotion suggests that D,L-homocysteic-stimulation into the dorsal PAG does not induce normal antipredator flight.

© 2006 Published by Elsevier Inc.

Keywords: D,L-homocysteic acid; Dorsal periaqueductal gray; Aversion; Mouse Defense Test Battery; Defense reactions; Mice

1. Introduction

The periaqueductal gray (PAG) is a midbrain structure divided along its rostro-caudal axis into dorsomedial, dorsolateral, lateral and ventrolateral columns (Carrive, 1993). The dorsal columns of the PAG are proposed to integrate behavioral and autonomic expression of defensive reactions (for reviews, see Bandler and Shipley, 1994; Graeff, 1990,1994). In rats,

either electrical or chemical stimulation of these columns induces freezing behavior alternating with vigorous flight and apparently aimless vertical jumps (Di Scala et al., 1984; Bandler et al., 1985; Aguiar et al., 2006). These behaviors appear to be similar to escape reactions induced by natural aversive stimuli, such as exposure to a proximal predator (Blanchard and Blanchard, 1988). Stimulation of the dorsal PAG in humans undergoing surgery has produced reports of intense fear associated with autonomic reactions (e.g. tachycardia and hyperventilation) reminiscent of a full-blown panic attack (Nashold et al., 1969). Given the striking similarities between the autonomic and behavioral effects of dorsal PAG stimulation and the symptoms of panic attacks, it has been suggested that this site is

* Corresponding author. Laboratório de Farmacologia, FCF - UNESP, Rod. Araraquara-Jau, Km 01, Araraquara-SP, 14801-902 Brazil. Tel.: +55 16 33016985; fax: +55 16 33016980.

E-mail address: efcnetto@usp.br (E.F. Carvalho-Netto).

involved in the genesis of panic disorder in humans and that dorsal PAG stimulation can serve as a model of panic attack (Graeff, 1990; Beckett et al., 1992; Jenck et al., 1995).

Recent ethopharmacological studies suggest that flight responses of mice to an oncoming threat stimulus are particularly responsive to propanic and antipanic drugs (Blanchard et al., 2001). Combining this focus on flight with dorsal PAG stimulation, Carvalho-Netto and Nunes-de-Souza (2004) reported that infusion of the excitatory amino acid D,L-Homocysteic into the dorsal PAG of mice produces explosive behaviors which include running and jumping; behaviors also previously reported in rats (Beckett et al., 1992). However, the behavioral responses elicited in that study were evaluated in a small enclosed apparatus (chamber with 23 cm diameter and 30 height), which may have prevented a clear analysis of the flight response. In fact, we have observed that mice under drug effect ran often into the walls chamber suggesting that behavioral response patterns induced by D,L-homocysteic infusion might depend on features of the physical environment (unpublished data). Hence, one of the objectives of the present work was to investigate the D,L-homocysteic-induced escape response in two different apparatuses, a small rectangular novel chamber and a large oval runway, the Mouse Defense Test Battery (MDTB) (e.g. Griebel et al., 1996). The first apparatus permitted only brief forward locomotion before the animal would encounter a wall. The second was an endless oval runway allowing mice to run forward for 2 m before being required to turn around a curved section of runway into another 2 m straight alley, ending in another curved section straightening into the original segment.

Following an initial 1-min postdrug period, animals from both conditions were tested using the standard MDTB procedure, which is designed to assess the defensive reactions of mice to a natural predator — the rat. A number of psychoactive drugs have been evaluated in this test (Blanchard et al., 2001 for review), and a consistent pattern of results has emerged. Among the various defensive behaviors, active defenses such as fight and escape appear to be selectively responsive to panicogenic compounds such as yohimbine (Blanchard et al., 1993), as well as to chronic administration of panicolytic compounds such as alprazolam (Griebel et al., 1995a), imipramine and fluoxetine (Griebel et al., 1995b). Observation of a selective increase in flight and active defenses would provide further and specific evidence that stimulation of dorsal PAG produces panic-like effects.

However, it has been well demonstrated that the main behavioral responses (running and jumping) induced by micro-injection of D,L-homocysteic into the dorsal PAG, which have been considered as proximal defensive responses, remain for a brief period of 40–60 s following drug administration (Bandler and DePaulis, 1988; Beckett et al., 1992; Carvalho-Netto and Nunes-de-Souza, 2004). A further test in the MDTB apparatus was proposed to determine if the mouse would react to threat stimuli during this brief postinjection period. To determine if mice would respond appropriately to the threat, avoiding it by changing the direction of flight, the pathway of the mouse during peak behavioral responses (first minute) was blocked 3 times by the predator stimulus (anesthetized rat).

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Subjects were male Swiss–Webster mice, obtained from Charles River Suppliers (St. Louis, MO). Upon arrival, all mice were single-housed in opaque polypropylene cages in temperature controlled room (22 ± 1 °C) with ad lib access to food and water. The mice were acclimatized for 4–6 weeks until they reached a weight range of 30–40 g. All mice were maintained on a 12 h light/dark cycle (lights on at 07:00 am). Three male Long–Evans rats were used as predator stimuli during the course of the study.

2.2. Drugs

D,L-homocysteic acid was obtained from Sigma (St. Louis, MO) and dissolved in 0.9% sterile physiological saline. The dose used (5 nmol/0.1 μ l) was based on previous studies (Carvalho-Netto and Nunes-de-Souza, 2004; Beckett et al., 1992).

2.3. Surgery

Mice were implanted unilaterally with 8 mm stainless-steel guide cannula (26-gauge) under sodium pentobarbital (90 mg/kg, i.p.) anesthesia. The guide cannula was fixed to the skull using dental cement and jewelers' screw. Stereotaxic coordinates for the dorsal PAG were 4.16 mm posterior to the bregma, 1.32 mm lateral to the midline and 2.23 mm ventral to the skull surface, with the guide cannula angled 26° to the vertical. A dummy cannula inserted into the guide cannula at the time of surgery served to reduce the incidence of occlusion. To prevent accumulation of salivatory and bronchial secretions, 0.01 mg/kg subcutaneous (s.c.) glycopyrrolate (Luitpold Pharmaceuticals, Shirley, NY), was administered 15 min before surgery. Upon removal from the stereotaxic apparatus mice were administered 1 ml 0.9% saline s.c. to prevent dehydration.

2.4. Intracerebral drug administration

Following a 1 week recovery period, mice were transferred from the main holding area to the laboratory and left undisturbed for 1 h prior to drug administration. Each mouse was lightly restrained and a 32-gauge injection cannula (1.0 mm longer than the guide cannula) was inserted into the guide cannula, the injector connected via PE-10 polyethylene tubing to a 10 μ l Hamilton microsyringe. Solution administration was controlled by an infusion pump (Harvard Apparatus, Inc. USA) programmed to deliver a volume of 0.1 μ l over a period of 10 s. Confirmation of successful infusion was obtained by monitoring the movement of a small air bubble in the PE-10 tubing. Immediately following drug infusion, each animal was placed in the experimental chamber or in the MDTB apparatus.

2.5. Apparatus

The behavioral responses induced by dorsal PAG chemical stimulation were evaluated in a chamber or in the MDTB apparatus.

2.5.1. Chamber

The test chamber was a black Plexiglas box (28×24×35 cm) with one side of transparent Plexiglas, which permitted recording of the experiment by a vertically mounted camera linked to a video monitor and DVD.

2.5.2. MDTB apparatus

The Mouse Defense Test battery apparatus (Fig. 1) was an oval runway, 0.40 m wide, 0.30 m high, and 4.8 m in total length, consisting of two 2.0-m straight segments joined by two 0.4-m curved segments, and separated by a median wall (2.0 m long×0.30 m high). The apparatus was elevated to a height of 0.80 m from the floor to minimize the mouse's visual contact with the experimenter. All parts of the apparatus were made of black Plexiglas. The floor of the runway was marked with white lines every 20 cm, to facilitate distance measurement. Activity was recorded using two ceiling-mounted video cameras.

2.6. Procedure

2.6.1. Experiment 1. *D,L-homocysteic-induced explosive motor response: chamber vs. MDTB apparatus*

Mice were randomly assigned to four groups ($n=8-10$); two groups were injected with *D,L*-homocysteic (5 nmol) or saline into the dorsal PAG and each animal was immediately placed in the chamber. The resultant behaviors were observed and video recorded for 1 min. The other two groups received the same pharmacological treatment and were immediately placed in the MDTB apparatus for behavioral recording for 1 min. No further manipulations or conditions were imposed during this 1-minute period. The following behavioral responses were recorded throughout the stimulation trials:

Jumping: Upward leaps directed or not to the border of the apparatus. For those groups treated with *D,L*-homocysteic and exposed to the chamber situation (where most of the jumps occurred), the data were presented as percentage of jumps preceded or not preceded by touch or crash into the chamber walls with the mouse's body, nose or vibrissae.

Walking: Slow locomotion with elevation of trunk and tail and out of phase stance and swing movements of contralateral limbs

Trotting: Fast locomotion with elevation of trunk and tail and out of phase stance and swing movements of contralateral limbs

Galloping: Running alternating stance and swing movements of anterior and posterior limb pairs.

Freezing: Complete absence of movement except breathing, while the animal assumes a characteristic tense posture.

Facial contact: The animal crashes or touches head first into the wall of the chamber or MDTB

Lateral contact: While galloping or trotting the animal comes into contact with the chamber or MDTB walls with its body (trunk) or its vibrissae.

Rearing: Standing on hind limbs, with both forelimbs off the floor. This measure included both unsupported rearing, and rearing against the wall.

Fig. 1. An overhead view of the MDTB apparatus. The two 2-m straight segments of the oval runway are joined by two 0.4-m curved segments and separated by a median wall. The apparatus was elevated 0.8 m.

The distance traveled for each mouse was also measured during the first 20 s after intra-dorsal PAG injection.

2.6.2. Experiment 2. Standard MDTB procedure

Immediately after experiment 1 (i.e. 1 min postdrug), animals from both conditions (chamber and MDTB) were then tested using the standard MDTB procedure which is designed to assess the defensive reactions of mice to a natural predator, the rat. This procedure is described in detail in Blanchard et al., 2001, 2003). Briefly, the procedures and measures taken were as follows:

2.6.2.1. Reactions to the predator. When the subject mouse is at one end of the apparatus, a hand-held anesthetized rat is introduced into the opposite end of the open runway and brought up the subject at an approximate speed of 0.5 m/s. Approach was terminated on contact with, or movement by, the subject. Avoidance distance (the distance from rat to subject at the point of flight) was recorded. This procedure was repeated five times, with mean avoidance distance (cm) and number of avoidances calculated for each subject.

2.6.2.2. Chase. The hand-held rat is brought up to the subject at a speed of approximately 2.0 m/s. Total flight time (time taken to travel 15 m when the mouse was running away from the rat) was recorded. Overall flight speed (m/s) and maximum linear flight speed (over a 2-m linear segment of the runway) were subsequently calculated. The number of stops (pause in locomotion) and reversals (subject turned and ran in the opposite direction) were recorded.

2.6.2.3. Straight alley. Upon closing two doors (80 cm apart), one runway was converted into a closed straight alley in which

the subject was trapped. The threat stimulus (rat) was held at one end of straight alley. Subjects were given three successive 30 s trials in which both the number of approach—withdrawals and the number of voluntary contacts with the rat stimulus were recorded. Measures taken also included immobility (freezing) time and frequency of jump escapes.

2.6.2.4. Forced contact. With the alley length reduced to 40 cm the hand-held rat quickly approached and contacted the subject (five contacts). This procedure was repeated three times. During each trial, the number of vocalizations, defensive uprights, jump escapes and bites were recorded.

2.6.3. Experiment 3. Evaluating the ability of mice to react to the threat stimulus during D,L-homocysteic-induced flight

In order to evaluate the ability of mice to react to environmental stimuli following D,L-homocysteic infusion, the previous control groups (i.e. saline groups from experiments 1–2) were injected intra-dorsal PAG with D,L-homocysteic (5 nmol) 24 h following the initial test. Each animal was immediately placed in the MDTB apparatus. During the peak running response induced by dorsal PAG stimulation (i.e. first 50 s after injection) the pathway was blocked once by a closed door at the end of a runway and 3 times by an anesthetized predator stimulus (rat). To assess changes in the subject's speed and its response to the introduced block of its pathway, a frame-by-frame analysis of the DVD (1/30) was conducted. This analysis was carried out 60 cm before the animal reached the introduced block of the runway (either the door or the Rat). The scoring was divided into three equal squares (20 cm each) of the MDTB apparatus and then a mean for each animal was calculated. The procedure evaluated whether the mice would avoid contact with the interposed stimulus.

2.7. Histology

Mice were sacrificed with an overdose of sodium pentobarbital and received an infusion of 10% methylene blue intra-dorsal PAG, according to the microinjection procedure described above. The animals were perfused intra-cardially with 10 cc 0.9% formalin and their brains were removed from the cranial cavity and stored in 10% formalin/30% sucrose solution for at least 48 h before histological analysis. Mouse brains were coronally sectioned by cryostat (50 μ m) and microscopically verified with reference to the atlas of Paxinos and Franklin (2001). Data from animals with injection sites outside the dorsal PAG were excluded from analysis.

2.8. Statistical analyses

The behavioral data from experiments 1 and 2 were analyzed by factorial analysis of variance (ANOVA) with saline vs. D,L-homocysteic treatment and chamber vs. MDTB apparatus as between-subjects factors. Where significant main effects (drug) or interactions (drug $\times$ apparatus) were obtained, data were further analyzed by Newman–Keuls multiple comparisons test. Repeated measures analysis of variance (ANOVA) was used to

analyze the data from experiment 3. A p value ≤ 0.05 was considered significant.

2.9. Ethics

All procedures were run in accord with protocols approved by the University of Hawaii Institutional Animal Care and Use Committee.

3. Results

Histological analysis demonstrated that 36 mice had accurate cannula placements in the PAG (Fig. 2). Final sample sizes ranged from $n=8$ –10 animals per group.

3.1. Experiment 1. D,L-homocysteic-induced explosive motor response: Chamber $\times$ MDTB apparatus

As shown in Figs. 3, 4 and 5 ANOVA revealed a main effect of drug for most behavioral responses [frequency of jump $F(1,31)=25.7$, $p<0.001$; frequency of facial contact $F(1,31)=10.3$, $p<0.05$; frequency of lateral contact $F(1,31)=34.9$, $p<0.001$ (Fig. 3); duration galloping $F(1,31)=66.9$, $p<0.001$;

Fig. 2. Schematic representation of microinfusion sites within the midbrain periaqueductal gray (PAG) of the mouse. The number of the points in the figure is less than the total number of mice because of the overlaps.

Fig. 3. Effect of D,L-homocysteic injected into the dorsal PAG on the behaviors (frequency) of mice evaluated in two different situations: chamber $\times$ MDTB ($n=8-10$). Each bar represents the mean $\pm$ S.E. * $p<0.05$ compared to respective control group and # $p<0.05$ compared to D,L-homocysteic Chamber group by Newman–Keuls multiple comparisons test. Lateral and facial contact behaviors are represented by L contact and F contact, respectively.

duration trotting $F(1,31)=93.7$, $p<0.001$; duration walking $F(1,31)=234.6$, $p<0.001$; duration of freezing $F(1,31)=7.13$, $p<0.01$ (Fig. 4); and distance traveled $F(1,31)=185.1$, $p<0.001$ (Fig. 5). ANOVA for the situation/apparatus factor revealed significance for frequency of jump [$F(1,31)=19.6$, $p<0.001$]; lateral contact [$F(1,31)=5.13$, $p<0.05$]; rearing [$F(1,31)=5.54$, $p<0.05$]; duration of galloping [$F(1,31)=3.93$, $p<0.05$]; and distance traveled [$F(1,31)=16.3$, $p<0.001$]. ANOVA also indicated a drug vs. apparatus interaction for jumps [$F(1,31)=19.65$, $p<0.001$]; lateral contact [$F(1,31)=5.13$, $p<0.05$] (Fig. 3); galloping [$F(1,31)=3.93$, $p<0.05$]; walking [$F(1,31)=7.06$, $p<0.01$] (Fig. 4); and, distance traveled [$F(1,31)=15.11$, $p<0.001$] (Fig. 5). This interaction was not significant for facial contact, rearing, trotting, or freezing. For treated mice in the chamber compartment, 87% of these jumps were preceded by a contact of the animal's body, nose or vibrissae with one or more chamber walls.

3.2. Experiment 2. Standard MDTB procedure

All behavioral data (means $\pm$ S.E.) from the standard MDTB procedure, evaluated beginning 1 min after drug administration, are presented in Table 1. The factorial ANOVA did not indicate a reliable effect of drug for any task evaluated in the standard

MDTB procedure, except jump escapes [$F(1,31)=5.92$, $p<0.05$]. The t -test for independent samples indicated that frequency of jumps decreased in the straight alley for the drugged animals that had been run in the MDTB apparatus during the first minute after D,L-homocysteic infusion, compared to controls run in the same situation ($t=2.18$, $df=15$, $p<0.05$), but it did not reveal any significant difference in comparison to animals from the Chamber situation ($t=1.02$, $df=16$, $p>0.05$).

3.3. Experiment 3. Evaluating the ability of mice to react to the threat stimulus during D,L-homocysteic-induced flight responses

Table 2 presents the mean number of frames (at 30 fps) required for animals of each group to pass through each of 3, 20-cm squares that were progressively closer to either a closed door, or an anesthetized rat, placed in the MDTB runway. The number of frames translates to flight speed, with 4 frames per second equaling 1.5 m/s, and 8.4 frames (the highest number of frames required for any group) equaling .71 m/s. ANOVA for repeated measures did not reveal any trend of increase of the number of frames required to pass through each square at 60, 40, or 20 cm while moving toward the closed door [$F(2,14)=1.0$, $p>0.05$] or the three rat-blocked pathway trials [trial 1 $F(2,14)=$

Fig. 4. Effect of DLH injected into the dorsal PAG on the behaviors (duration) of mice evaluated in two different situations: chamber $\times$ MDTB ($n=8-10$). Each bar represents the mean $\pm$ S.E.M. * $p<0.05$ compared to control group and # $p<0.05$ compared to D,L-homocysteic Chamber group by Newman–Keuls multiple comparisons test.

Fig. 5. Effect of DLH injected into the dorsal PAG of mice on the distance moved either in the chamber or in the MDTB apparatus ($n=8-10$) following 20 s initial after administration of drug. * $p<0.05$ compared to respective control group and # $p<0.05$ compared to chamber group.

0.81 $p>0.05$]; [trial 2 $F(2,14)=1.36$ $p>0.05$]; [trial 3 $F(2,14)=1.43$ $p>0.05$], suggesting that the animals did not reduce speed to avoid contact with either a barrier (door) or an aversive stimulus.

4. Discussion

The present results are in agreement with previous findings in rats and mice (e.g. Beckett et al., 1992; Carvalho-Netto and Nunes-de-Souza, 2004) that microinjection of the excitatory

Table 1
Effect of DLH acid infusions in the DPAG on behavioral responses of mice confronted with a rat in the standard MDTB procedure following the initial 1-min post-drug period (first minute on the chamber or on the MDTB apparatus)

Behaviors	Chamber		MDTB		<i>F</i> (1,31)
	Control	DLH	Control	DLH	
<i>Reaction to the predator</i>					
Avoidance distance (cm)	60.2±15.2	22.0±10.5	53.2±13.1	46.0±12.5	3.18
Avoidance frequency	2.0±0.5	0.6±0.2	1.9±0.4	1.9±0.6	2.22
<i>Chase/flight test</i>					
Flight speed (m/s)	0.51±0.04	0.57±0.07	0.59±0.05	0.62±0.08	0.45
Max speed (m/s)	0.89±0.05	0.83±0.04	0.96±0.06	0.94±0.12	0.30
Stops	5.4±1.1	2.6±0.6	3.9±1.2	3.2±1.0	2.70
Reversals	5.1±1.1	2.8±0.8	3.4±1.1	3.0±1.4	1.43
<i>Straight alley test</i>					
Approaches/withdrawals	2.1±0.4	1.9±0.5	2.6±0.3	2.6±0.5	0.23
Contacts	1.3±0.4	1.4±0.4	1.6±0.6	1.3±0.5	0.97
Jump escapes	1.1±0.6	0.5±0.1	4.3±0.7	2.1±0.6*	5.92
Freezing (s)	4.8±1.0	3.7±0.9	2.1±0.8	2.8±1.4	0.54
<i>Forced contact test</i>					
Uprights	9.5±1.9	6.4±1.3	5.6±2.1	7.6±1.2	0.13
Vocalization	11.0±1.4	7.7±1.8	11.5±1.8	11.1±0.9	1.45
Bites	0.0±0.0	0.8±0.4	0.5±0.3	1.4±0.7	3.54
Jump escapes	4.7±2.2	7.0±1.4	9.1±2.0	7.6±1.2	0.55

Values represent means±S.E.M. * $p<0.05$ compared to control.

Table 2

Response of the animals under DLH-initial effect peak (explosive flight) to environmental stimuli (door or rat)

Target	Frames in the first square (60 cm from target)	Frames in the second square (40 cm from target)	Frames in the third square (20 cm from target)	Percentage of the contact
Closed door	4.0±0.3	4.0±0.3	3.9±0.2	100
Rat block trial 1	5.8±0.6	6.4±1.0	5.8±0.6	90
Rat block trial 2	6.0±0.4	6.1±0.5	6.5±0.6	90
Rat block trial 3	6.8±0.4	7.3±0.4	8.4±1.4	80

The values represent the means of the number of frames required to pass through each square at 60, 40, or 20 cm while moving toward a closed door or one of three rat blocked pathway trials. It was tallied to demonstrate differences in speed based on the location the target. Each square represents a 20 cm block in the MDTB apparatus. Contact was considered when the subject crashed or touched its face into the target (door or rat).

amino acid D,L-homocysteic into the dorsal PAG produces explosive motor behaviors characterized by running (galloping and trotting) and jumping. However, this study further demonstrates that the type of motor response to D,L-homocysteic infusion is strongly influenced by features of the environment in which animals are tested. In the chamber compartment, where animals often ran into the walls, jumping was the overwhelmingly predominant response during a brief period of 40–60 s following drug administration. In the MDTB, with its endless oval runway, mice exhibited galloping, rather than jumping, as a primary response to D,L-homocysteic. In fact, in the MDTB apparatus D,L-homocysteic-treated mice failed to make significantly more jumps than controls.

These findings contrast with some previous reports that physical characteristics of the test conditions do not impact responsivity to dorsal PAG stimulation. Schenberg et al. (2005) reported that neither test arena size (20 vs. 50 cm diameter) or the presence or absence of a roof had any effects on the thresholds of somatic defensive behaviors, including jumping. Although different animal species (rat vs. mouse) and different methods (electrical or chemical stimulation) and specifics of the test arena used in these studies were different, the major difference may be between measures: thresholds for responses may be less sensitive to situational characteristics than is the expression of the responses themselves.

Our results further suggest that the switch from running to jumping immediately after D,L-homocysteic stimulation, for animals run in the chamber compared to the MDTB apparatus, may be modulated by tactile contact. In the chamber, 87% of either vertical or horizontal jumps were preceded by a contact (touch or crash) of the animal's head or vibrissae to the chamber wall. Consonant with the predominance of jumps in the chamber, more lateral and facial wall contacts occurred in this situation than in the MDTB situation. Based on findings that visual stimuli (i.e., approach of a brush or glove) did not readily evoke defensive reaction in rats that had been infused with kainic acid within the dorsal PAG, Bandler and DePaulis (1991) suggested that chemical stimulation of dorsal PAG induces a deficit in the rat's visual perception of environmental stimuli. The results of Experiment 1 suggest that D,L-homocysteic infusion provoked a

similar effect in mice, along with a concomitant increase in the role of tactile stimuli in modulating the behavioral responses elicited by D,L-homocysteic acid infusion into the dorsal PAG.

Previous studies have emphasized that jumping, running, or galloping induced by dorsal PAG stimulation are related to natural defensive responses elicited by aversive situations (Beckett et al., 1992; Keay and Bandler, 2001; Vianna and Brandao, 2003; Bittencourt et al., 2004; Schenberg et al., 2001), as they are similar to escape reactions induced by natural aversive stimuli, such as the exposure to a proximal predator (Blanchard and Blanchard, 1988; Blanchard et al., 2001). They have also been recently proposed as indices of panic-like behaviors in rats (Vargas and Schenberg, 2001).

While present results suggest that the choice of running or jumps after D,L-homocysteic stimulation is largely based on environmental stimuli, specifically tactile contact with walls, these results are not counter to a view that the dorsal PAG contains elements of defense systems that are normally active when confronting aversive stimuli. However, in Experiment 2, animals tested in the MDTB following the initial 1-minute postdrug period did not show any reliable changes in their defensive reactions to a predator (rat). The failure of D,L-homocysteic to enhance any of these defensive behaviors is likely related to the brevity of effects observed with intra-PAG injections of this excitatory amino acid (Beckett et al., 1990; Carvalho-Netto and Nunes-de-Souza, 2004). Even though the initial motor reaction induced by D,L-homocysteic has a short duration, another behavioral response, immobility, may last at least 5 min (Beckett et al., 1990; Carvalho-Netto and Nunes-de-Souza, 2004). However, it is not clear if such immobility is part of the behavioral defense repertory or is a sign of exhaustion or quiescence following the dramatic locomotor activity burst elicited by D,L-homocysteic as an initial response. Bandler and DePaulis (1988) have shown that microinjections of low doses of another excitatory amino acid, kainic acid, in the PAG region evoked a significant increase in both defensive and immobile behaviors in rats tested in a social interaction test situation. The elicited reactions appeared identical to the rat's natural reactions to attack by a conspecific. The long duration and natural appearance of the kainic acid evoked reactions stands in contrast to the short explosive reactions provoked by injections in the PAG of the other excitatory amino acids such as D,L-homocysteic.

Further contrasting with kainic acid results from Bandler and DePaulis (1988), these D,L-homocysteic-stimulated animals did not show potentiated responsivity to an animated threat stimulus. The D,L-homocysteic-induced flight response was neither initiated nor guided by the introduction of the predator. It always began immediately on placement of animals into the MDTB (Experiment 1) and when a rat was introduced into the path of a running mouse, D,L-homocysteic-stimulated mice ran toward it and typically into it, or to an interposed door, without slowing (Experiment 3). Although low doses of kainic acid in the PAG may have degraded visual processing, they nonetheless produced a significant increase in both defensive and immobile behaviors in rats in the social interaction test (Bandler and DePaulis, 1988). According to Bandler and DePaulis (1988), defensive responses to a conspecific were evoked by contact with another rat during

these social encounters, suggesting that the rats were usually sensitive to stimuli that might be interpreted as an indicating threat.

These differences suggest that D,L-homocysteic stimulation of the dorsal PAG may reflect high level reflex activation of locomotor systems in addition to, or instead of, activation of defensiveness or emotionality. It is notable that, in the absence of the rat, the maximum flight speed induced by D,L-homocysteic was 1.5 m/s. In the context of the 0.8 m/s maximum flight speed exhibited by untreated lab mice, or the 1.5 m/s speed of wild mice, each when chased by a predator (Blanchard et al., 1998), the speeds attained in this study by lab mice under D,L-homocysteic stimulation of the dorsal PAG appear to represent a maximal running response, and one that was not altered by the presence of the predator.

It has been firmly established that the PAG is one of the fundamental brain regions involved in the elaboration and expression of emergency defense responses (Bandler and DePaulis, 1991; Graeff, 2004). Large lesions in the area of the PAG dramatically reduce defensive behaviors to a potential predator in wild rats (Blanchard et al., 1981), although lesions of the dorsal PAG have much lesser effects on contextual conditioned fear responses (Leman et al., 2003). A striking c-Fos activation of the dorsal PAG has been reported in rats exposed to a predator (cat) or to cat odor (Canteras and Goto, 1999; Dielenberg et al., 2001), but, interestingly, not to trimethylthiazoline, a synthetic fox anal gland odor that is often used to elicit defensiveness in laboratory studies (Day et al., 2004).

While the present results do not indicate that the jumping and running behaviors initially elicited by D,L-homocysteic stimulation of the dorsal PAG reflect enhancement of defensiveness to a predator, they should not be taken as counter indicating a role for the dorsal PAG in defense. The dose given of D,L-homocysteic —albeit not outside the range of doses used in similar studies and far less than many— may have had highly unphysiological effects on the activity of the area stimulated. Also, it is by no means certain that D,L-homocysteic optimally activates the PAG elements that are normally involved in defensive behaviors elicited by threatening stimuli, and even less certain that such activation is relatively specific to these systems. What this study does indicate is a necessity for caution in interpreting jumping and running — or other— behaviors elicited by regional brain stimulation as direct analogues to the defensive behaviors that they may somewhat resemble. This research suggests that the dependence of behaviors on specifics of the test situation may be a useful feature in determining how an elicited behavior relates to responses to relevant natural stimuli. However, such dependence requires sensitive analysis. Here, differences in type of response (jump vs. run) in the chamber compared to the MDTB runway were apparently mediated by the ability of tactile stimuli to elicit jumps; a relationship that is of much less importance in the normal running response of animals to threat stimuli which are more visually mediated. Conversely, the lack of normal visual control of behavior in these animals was likely involved in their failure to slow or stop running into threatening or neutral but unyielding stimuli. These considerations suggest that a fuller analysis

of behavior, and of the circumstances in which it occurs, should accompany attempts to determine the brain mechanisms controlling defensive and other natural behavior patterns.

Acknowledgements

We acknowledge Catherine Farrohi and Mu Yang for their generous help in these studies. This study was supported by CAPES and FAPESP, Brazil, as well as University of Hawaii, USA. E.F. Carvalho-Netto was recipient of CAPES and R.L. Nunes-de-Souza received a CNPq research fellowship.

References

- Aguiar DC, Moreira FA, Guimarães FS. Flight reactions induced by injection of glutamate *N*-methyl-D-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;83:296–301.
- Bandler R, DePaulis A. Elicitation of intraspecific defence reactions in the rat from midbrain periaqueductal gray by microinjection of kainic acid, without neurotoxic effects. *Neurosci Lett* 1988;88:291–6.
- Bandler R, DePaulis A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and the rat. In: DePaulis A, Bandler R, editors. *The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization*. New York: Plenum Press; 1991. p. 175–97.
- Bandler R, Shipley MT. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modulates for emotional expression? *Trends Neurosci* 1994;17:379–89.
- Bandler R, DePaulis A, Vergnes M. Identification of midbrain neurones mediating defensive behavior in the rat by microinjections of excitatory amino acids. *Behav Brain Res* 1985;15:107–19.
- Beckett SR, Marsden CA, Marshall PW. Microinjections of DLH into the rat periaqueductal gray matter induce a dose-dependent defense response attenuated by midazolam. *Br J Pharmacol* 1990;101:585.
- Beckett SR, Lawrence AJ, Marsden CA, Marshall PW. Attenuation of chemically induced defence response by 5-HT₁ receptor agonists administered into the periaqueductal gray. *Psychopharmacol (Berl)* 1992;108(1–2):110–4.
- Bittencourt AS, Carobrez LP, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of *N*-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience* 2004;125:71–89.
- Blanchard RJ, Blanchard DC. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol* 1988;39:43–68.
- Blanchard DC, Williams G, Lee EMC, Blanchard RJ. Taming wild *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central gray. *Physiol Psychol* 1981;9:157–63.
- Blanchard RJ, Taubulus H, Rodgers RJ, Magee LK, Blanchard DC. Yohimbine potentiates active defensive responses to threatening stimuli in Swiss–Webster mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;44:673–81.
- Blanchard RJ, Hebert MA, Ferrari P, Palanza P, Figueira R, Blanchard DC, et al. Defensive behaviors in wild and laboratory (Swiss) mice: the Mouse Defense Test Battery. *Physiol Behav* 1998;65(2):201–91.
- Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. Mouse defense behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 2001;25:205–18.
- Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Eur J Pharmacol* 2003;463:97–116.
- Canteras NS, Goto M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport* 1999;10:413–8.
- Carrive P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional significance and neuronal organization. *Behav Brain Res* 1993;58:27–47.
- Carvalho-Netto EF, Nunes-de-Souza RL. Behavioral responses followed by chemical stimulation of the midbrain periaqueductal gray in mice. *Internat Behav Neurosci Soc. (Personal communication)* 2004; 13: 49.
- Day HE, Masini CV, Campeau S. The pattern of brain *c-fos* mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. *Brain Res* 2004;1025:139–51.
- Dielenberg RA, Hunt GE, McGregor IS. “When a rat smells a cat”: the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience* 2001;104:1085–97.
- Di Scala G, Schmitt P, Karli P. Flight induced by infusion of bicuculline methiodide into periventricular structures. *Brain Res* 1984;309:199–208.
- Graeff FG. Brain defence systems and anxiety. In: Roth M, Burrows GD, Noyes R, editors. *Handbook of anxiety*, vol. 3. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1990. p. 307–54.
- Graeff FG. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res* 1994;27(4):811–29.
- Graeff FG. Serotonin in the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28:239–59.
- Griebel G, Blanchard DC, Jung A, Lee JC, Masuda CK, Blanchard RJ. Further evidence that the mouse defense test battery is useful for screening anxiolytic and panicolytic drugs: effects of acute and chronic treatment with alprazolam. *Neuropharmacology* 1995a;34(12):1625–33.
- Griebel G, Blanchard DC, Agnes RS, Blanchard RJ. Differential modulation of antipredator defensive behavior in Swiss–Webster mice following acute or chronic administration of imipramine and fluoxetine. *Psychopharmacol (Berl)* 1995b;120(1):57–66.
- Griebel G, Blanchard DC, Blanchard RJ. Predator-elicited flight responses in Swiss–Webster mice: an experimental model of panic attacks. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1996;20(2):185–205.
- Jenck F, Moreau JL, Martin JR. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychol Res* 1995;57(2):181–91.
- Keay KA, Bandler R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neurosci Biobehav Rev* 2001;25: 669–78.
- Leman S, Dielenberg RA, Carrive P. Effect of dorsal periaqueductal gray lesion on cardiovascular and behavioural responses to contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res* 2003;143:169–76.
- Nashold BS, Wilson WP, Slaughter DG. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 1969;30(1):14–24.
- Paxinos G, Franklin KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2nd ed. California: Academic Press; 2001.
- Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré ECM, Vargas LC. Modeling panic attacks. *Neurosci Behav Rev* 2001;25:647–59.
- Schenberg LC, Povoas RMF, Costa ALP, Caldellas AV, Tufik S, Bittencourt AS. Functional specializations within the tectum defense systems of the rats. *Neurosci Behav Rev* 2005;29(8):1279–98.
- Vargas LC, Schenberg LC. Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacol (Berl)* 2001;155(3):260–8.
- Vianna DML, Brandao ML. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrate for different kinds of fear. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:557–66.

Research report

Effects of intra-PAG infusion of ovine CRF on defensive behaviors in Swiss-Webster mice

Eduardo F. Carvalho-Netto^{a,b,*}, Yoav Litvin^{c,e}, Ricardo L. Nunes-de-Souza^b,
D. Caroline Blanchard^{d,e}, Robert J. Blanchard^c

^a Psychobiology Graduate Program, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brazil

^b Laboratory of Pharmacology, São Paulo State University, Araraquara, SP 14801-902, Brazil

^c Department of Psychology, University of Hawaii, Honolulu, HI 96822, USA

^d Pacific Biomedical Research Center, University of Hawaii, Honolulu, HI 96822, USA

^e Department of Genetics and Molecular Biology, John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii, Honolulu, HI 96822, USA

Received 9 August 2006; received in revised form 29 September 2006; accepted 5 October 2006

Available online 13 November 2006

Abstract

The midbrain dorsal periaqueductal gray (DPAG) is part of the brain defensive system involved in active defense reactions to threatening stimuli. Corticotrophin releasing factor (CRF) is a peptidergic neurotransmitter that has been strongly implicated in the control of both behavioral and endocrine responses to threat and stress. We investigated the effect of the nonspecific CRF receptor agonist, ovine CRF (oCRF), injected into the DPAG of mice, in two predator–stress situations, the mouse defense test battery (MDTB), and the rat exposure test (RET). In the MDTB, oCRF weakly modified defensive behaviors in mice confronted by the predator (rat); e.g. it increased avoidance distance when the rat was approached and escape attempts (jump escapes) in forced contact. In the RET, drug infusion enhanced duration in the chamber while reduced tunnel and surface time, and reduced contact with the screen which divides the subject and the predator. oCRF also reduced both frequency and duration of risk assessment (stretch attend posture: SAP) in the tunnel and tended to increase freezing. These findings suggest that patterns of defensiveness in response to low intensity threat (RET) are more sensitive to intra-DPAG oCRF than those triggered by high intensity threats (MDTB). Our data indicate that CRF systems may be functionally involved in unconditioned defenses to a predator, consonant with a role for DPAG CRF systems in the regulation of emotionality.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: oCRF; DPAG; Defensive behaviors; Mice; MDTB and RET

1. Introduction

It has been consistently established that one of the fundamental brain regions responsible for the command of primitive flight and fight reactions elicited by proximal threat, acute pain and asphyxia is the midbrain periaqueductal gray (PAG) matter [6,20]. The dorsal part (DPAG) of this structure has been implicated as a site of integration and modulation of the behavioral and autonomic expression of defensive reactions [5,20]. Electrical and chemical (e.g. excitatory amino acid) stimulation

of the DPAG leads to explosive motor responses characterized by vigorous running and apparently aimless vertical jumps in freely moving experimental animals [4,17,19]. These behaviors are proposed to reflect aversive responses due to their similarity with escape reactions induced by natural aversive stimuli, such as the exposure to a proximal predator [9]. Stimulation of the DPAG has been done in humans undergoing surgery and these patients reported intense fear along with autonomic reactions (e.g. tachycardia and hyperventilation) reminiscent of a full-blown panic attack [35].

Recently, McNaughton and Corr [31] have argued that brain structures controlling defensive behaviors related to anxiety (e.g. risk assessment and avoidance) and fear (e.g. flight) are categorically distinct entities, and these form parallel streams that are represented at all levels of these systems. According to these researchers behavioral responses related to anxiety would be

* Corresponding author at: Laboratório de Farmacologia, FCF-UNESP, Rod. Araraquara-Jau, Km 01, Araraquara, SP 14801-902, Brazil.
Tel.: +55 16 33016985; fax: +55 16 33016980.

E-mail address: efcnetto@usp.br (E.F. Carvalho-Netto).

mediated mainly by forebrain structures (e.g. pre-frontal cortex, septo-hippocampal system); however, the PAG and hypothalamus would be the lower-level components of this system. In fact, many lines of evidence suggest that besides fundamentally controlling fear-like responses [22], the DPAG controls responses related to anxiety, such as avoidance and risk assessment [18,32].

Several neurotransmitters have been implicated as mediators or modulators of the behavioral responses elicitable in the DPAG, including GABA, glutamate, serotonin, cholecystokinin (CCK) and neuropeptides such as opioid peptides [6,21]. A number of recent studies suggest a role for the neuropeptide corticotrophin releasing factor (CRF) in anxiety and fear-related behaviors [3]. CRF is a 41-amino acid peptide that serves as the main hypothalamic factor stimulating corticotrophin (ACTH) release from the anterior pituitary and, in turn, glucocorticoids from the adrenal cortex [46]. The behavioral effects of central administration of CRF mimic those seen in response to stress, such as place aversion, increased locomotor activity, and decreased sexual activity [41,27,16]. Chronic activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis may have pathological consequences for the animal. In stressed animals, CRF administration potentiates these behaviors [15], whereas CRF antagonists administered intracerebroventricularly or to the central amygdala can block the behavioral effects of stress [7,44]. Albeck et al. [1] reported that stress-responsive subordinate rats and nonresponsive subordinate rats showed an increase in the CRF mRNA levels in the central amygdala compared to the control group, whereas responsive subordinate rats exhibited higher levels than the dominant rats.

CRF and the CRF-like peptide, urocortin, are also widely distributed in extrahypothalamic portions of the mammalian brain, as are a number of CRF-responsive receptor subtypes [23,37]. CRF receptor types include CRF1 and CRF2, which are differentially distributed within the brain. In addition, each receptor has a number of splice variants. Anatomical studies have identified several neural sites containing CRFergic neurons [43] and CRF receptors [47] including the basal nuclei of the amygdala, hippocampus, bed nucleus of stria terminalis, raphe nuclei and PAG. It is important to note that these areas are involved in the processing of anxiety and fear states as well as nociceptive information [33]. Anatomical heterogeneity of CRF1 and CRF2 suggests the existence of functional differences between them [8,28]. Overall, evidence accumulated so far has been relatively consistent for a role of CRF1 in the modulation of anxiety-like behaviors but much less so for that of CRF2 [45].

Experimental evidence has demonstrated that intracerebroventricular (i.c.v.) administration of CRF increases anxiety related behaviors in rodents [2,34]. In addition, transgenic mouse lines overexpressing CRF exhibited behavioral states resembling anxiety [24]. In order to clarify the neural circuitry underlying anxiogenic effects of i.c.v. CRF, several studies have investigated the direct infusion of CRF into discrete brain structures (for review see [24]). In the DPAG infusion of CRF increased anxiety-like behaviors in the elevated plus-maze test [29] while the CRF antagonist, α -helical CRF, reduced anxiety-related behaviors in stress-experienced rats [30]. Although CRF1 receptor subtype might represent the primary target involved in the

mediation of the anxiogenic-like effects of CRF [24], in rodents both CRF1 and CRF2 mRNA expression are found in PAG [47].

Unconditioned threat stimuli such as encounters with a predator are widely used to provide measures of behavioral responses to threat and stress [12]. The present study was designed to investigate the effect of the nonspecific CRF receptor agonist ovine CRF (oCRF) injected into the DPAG of mice, in two different predator or stress situations, the mouse defense test battery (MDTB), and the rat exposure test (RET). The MDTB involves direct confrontation of mouse subjects with a hand-held anesthetized rat (predator) that first approaches, then chases, and finally contacts the mouse. This test elicits a number of high magnitude behavioral defenses and has proved to be responsive to anxiety and panic-related drugs [11]. The RET [49] was designed to afford a less intense threat situation, in which a wire mesh prevents the predator (rat) from approaching or contacting the mouse subject, allowing the subject to seek or avoid the predator stimulus and thus regulate its own exposure to threat.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Subjects were male Swiss-Webster mice, obtained from Charles Rivers laboratories (St. Louis, MO). Upon arrival, all mice were single-housed in opaque polypropylene cages in a temperature controlled room ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) with ad libitum access to food and water. The mice were acclimatized for 4–6 weeks until they reached a weight range of 30–40 g. All mice were maintained on a 12 h light/dark cycle (lights on at 07:00 a.m.). A total of five male Long–Evans rats were used as predator stimuli during the course of the study.

2.2. Drugs

Ovine corticotrophin releasing factor (oCRF) was obtained from Max-Planck Institute for Experimental Medicine, Gottingen, Germany and dissolved in cerebrospinal fluid (CSF). The dose used (30 ng and 100 ng/0.2 μl) was based in previous studies [42,50]. The CSF solution was used as the vehicle compound.

D-Amphetamine sulfate (Research Biochemicals, MA) was dissolved in sterile physiological saline and administered i.p. to rats at a single dose of 5.0 mg/kg 15 min prior to placement into the rat exposure chamber. This procedure was used to facilitate the maintenance of motor activity and interest in the mouse subject throughout the course of a 10-min trial duration.

2.3. Surgery

Mice were implanted unilaterally with an 8 mm stainless-steel guide cannula (26-gauge) under sodium pentobarbital (90 mg/kg, i.p.) anesthesia. The guide cannula was fixed to the skull using dental cement and jewelers' screw. Stereotaxic coordinates for the dorsal PAG were 4.16 mm posterior to the bregma, 1.32 mm lateral to the midline and 2.23 mm ventral to the skull surface, with the guide cannula angled 26° to the vertical. A dummy cannula inserted into the guide cannula at the time of surgery, served to reduce the incidence of occlusion. To prevent accumulation of salivary and bronchial secretions, 0.01 mg/kg subcutaneous (s.c.) glycopyrrolate (Luitpold Pharmaceuticals, Shirley, NY), was administered 15 min before surgery. Upon removal from stereotaxic apparatus mice were administered 1 ml 0.9% saline s.c. in order to prevent dehydration.

2.4. Intracerebral drug administration

Following a 1-week recovery period, mice were transferred from the main holding area to the laboratory and left undisturbed for 1 h prior to drug administration. Each mouse was lightly restrained and a 32-gauge injection cannula

(1.0 mm longer than the guide cannula) was inserted into the guide cannula, the injector connected via PE-10 polyethylene tubing to a 10 μ l Hamilton microsyringe. The solution administration was controlled by infusion pump (Harvard Apparatus, Inc. USA) programmed to deliver a volume of 0.2 μ l over a period of 30 s. The injector remained in place for an additional 30 s (before slow removal) to allow for maximum drug infusion. Confirmation of successful infusion was obtained by monitoring the movement of small air bubble in the PE-10 tubing. Immediately following drug infusion, each animal was returned to its home cage, brought into the testing room and left undisturbed for 8 min prior to behavioral evaluation.

2.5. Apparatus

Behavioral responses were measured in the mouse defense test battery (MDTB) and the rat exposure test (RET) apparatus.

2.5.1. MDTB apparatus

The MDTB used in the present experiments was identical to that described for Griebel et al. [26] (Fig. 1). The mouse defense test battery is an oval runway, 0.40 m wide, 0.30 m high, and 4.8 m in total length, consisting of two 2.0-m straight segments joined by two 0.4-m curved segments, and separated by a median wall (2.0 m long $\times$ 0.30 m high). The apparatus was elevated to a height of 0.80 m from the floor to minimize the mouse' visual contact with the experimenter. All parts of the apparatus were made of black Plexiglas. The floor of the runway was marked with white lines every 20 cm, to facilitate distance measurement. Activity was recorded using two ceiling-mounted video cameras.

2.5.2. RET apparatus

The rat exposure test (Fig. 2) was developed and validated by Yang et al. [49] to facilitate measurement of risk assessment behaviors in mice. Testing procedures were conducted in a 46 cm $\times$ 24 cm $\times$ 21 cm clear polycarbonate

Fig. 1. An overhead view of the MDTB apparatus.

Fig. 2. An overhead view of the RET apparatus.

cage (exposure chamber) covered with a metal lid. The exposure chamber was divided into two equal-sized compartments by a wire mesh screen. The home cage was a 7 cm $\times$ 7 cm $\times$ 12 cm box made of black Plexiglas on three sides and clear Plexiglas on the fourth side to facilitate videotaping. The home chamber was connected to the exposure cage by a clear Plexiglas tube tunnel (4.4 cm in diameter, 13 cm in length, 1.5 cm elevated the floor of the two chamber). One vertically mounted camera linked to a video monitor and DVD was used to record the experiment.

2.6. Procedure

All testings were conducted during the light phase of the light/dark cycle under illumination of a 100-W red light. Each apparatus was cleaned with 20% alcohol and dried with paper towels in between trials.

2.6.1. Experiment 1: mouse defense test battery

Seven days after surgery, each mouse was transported to the experimental room and left undisturbed for 60 min prior to testing. The mouse received an intra-PAG injection of CSF or oCRF (30 or 100 ng) and, 8 min later, was run in the MDTB. The Long-Evans rat used as predator was deeply anesthetized with sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.) 10 min before the test session begins. The MDTB consists of the following subtests.

2.6.1.1. Pretest: evaluation of motor response to drug treatment. Subjects were placed into the MDTB apparatus for a 3-min familiarization period during which total line crossings and escape attempts (combined wall rears and jumps) were recorded.

2.6.1.2. Predator avoidance test. To ensure an initial separation of 2 m between the threatening stimulus and subject, the test began only when the subject was at one end of the apparatus. Immediately after the pre-test, a hand-held anesthetized rat was introduced into the opposite end of the open runway and brought up to the subject at an approximate speed of 0.5 m/s. Approach was initiated only if the subject was at a standstill with its head oriented toward the rat. Approach was terminated when contact with subject occurred, or the subject ran away from the approaching rat. If the subject fled, avoidance distance (the distance from the rat to the subject at the point of flight) was recorded. This procedure was repeated five times, with mean avoidance distance (cm) and number of avoidance calculated for each subject.

2.6.1.3. Chase/flight test. The hand-held rat was brought up to the subject at a speed of approximately 2.0 m/s. Chase was initiated only when the subject was at a standstill with its head oriented toward the rat, and completed when the subject had traveled a distance of 15 m (~three laps). Total flight time (time taken to travel 15 m when the mouse was running forward) was recorded. Overall

flight speed (m/s) and maximum linear flight speed (over a 2-m linear segment of the runway) were subsequently calculated for each animal. In addition, the number of stops (pause in locomotion) and reversals (subject turned and ran in the opposite direction) were recorded.

2.6.1.4. Closed alley test. Upon closing two doors (80 cm apart), one runway was converted into a closed straight alley in which the subject was trapped. The rat was introduced into one end of the straight alley. Trials began only when the subject faced the rat at a minimum of 60 cm stimulus-subject distance. Subjects were given three successive 30 s trials. During a trial, the number of approach-withdrawals (subject moves more than 20 cm from the closed door toward the rat, and immediately turns to the closed door) as well as voluntary contacts with the rat stimulus were recorded. Measures scored included freezing time, jump escape and jump attack frequencies. The results were expressed as means for each behavior for each animal.

2.6.1.5. Forced contact test. In this situation, the closed alley length was reduced to 40 cm. The experimenter quickly approached and touched the subject with a hand-held rat (five rapid contacts directed toward the subjects' head). This procedure was repeated three times. During each trial, the number of vocalizations, defensive uprights, jump escapes and bites were recorded. The total for each dependent variable was summed over the three trials for each animal.

2.6.1.6. Post-test. Upon completion of the forced contact test, the alley doors were opened to permit locomotion around the circular runway. The subject's activities were recorded for another 3 min during which time the experimenter and the rat stimulus were out of sight. Line crossings and escape attempts (rearing and jump escapes) were recorded.

2.6.2. Experiment 2: rat exposure test

One week after the MDTB procedure the subjects were tested in the rat exposure test (RET). Prior to the start of each trial, home cage bedding of each subject was placed on the floor of the home chamber as well as on the surface of the RET. The testing procedure consisted of two phases.

2.6.2.1. Phase 1: habituation. Each subject was allowed one daily habituation sessions during three consecutive days in the apparatus. The mouse was placed in the center of the surface and was allowed to explore freely for 10 min with no rat present.

2.6.2.2. Phase 2: exposure test. When a mouse was placed into the center of the surface on Day 4, an amphetamine-treated male Long-Evans rat was immediately introduced behind the wire mesh. The followed behaviors were recorded during a 10 min trial.

The behavioral parameters comprised spatiotemporal and ethological measures. The spatiotemporal measures were frequency and time spent in the home chamber, tunnel, and on the surface. Time spent in contact with (including climbing) the wire screen barrier was taken as total (barrier) contact time. The ethological measures were frequency and duration of risk assessment (stretch attend postures, an exploratory posture in which the body is stretched forward but the animal's hind paws remain in position, and stretched approach, in which the body is stretched while moving forward); freezing (complete cessation of movement except breathing); defensive burying (digging and/or pushing of the sawdust); and self-grooming.

2.7. Histology

Mice were sacrificed with an overdose of sodium pentobarbital and received an infusion of 10% methylene blue intra-DPAG (according to the microinjection procedure described above). The animals were perfused intra-cardially with 10 cc 0.9% formalin and their brain were removed from the cranial cavity and stored in 10% formalin/30% sucrose solution for at least 48 h before histological analysis. Mouse brain was coronally sectioned by a cryostat (50 μ m) and microscopically verified with reference to the atlas of Paxinos and Franklin [38]. Data from animals with injection sites outside the DPAG were excluded from analysis.

2.8. Statistical analyses

The behavioral data from the MDTB and RET were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA-vehicle, low dose and high dose as between-subjects factors) for parametrically distributed data, or Kruskal-Wallis for non-parametrically distributed data. Post hoc Newman-Keuls tests were conducted for significant treatment effects relative to control means (parametric), and Mann-Whitney *U*-tests (non-parametric). A *P* value ≤ 0.05 was considered significant.

2.9. Ethics

All procedures were run in accord with protocols approved by the University of Hawaii Institutional Animal Care and Use Committee.

3. Results

Histology confirmed that a total of 31 mice had accurate cannula placements in the DPAG and 6 had placements outside of the respective circumscribed area (Fig. 3).

3.1. Experiment 1: mouse defense test battery

All behavioral data (means $\pm$ S.E.M. and *F* value) from the mouse defense test battery are listed in Table 1. The one-way ANOVA indicates significant main effects of oCRF injection on predator avoidance and forced contact tasks. Newman-Keuls post hoc test shows that the animals treated with oCRF (100 ng) exhibited higher avoidance distance as the reaction to the preda-

Fig. 3. Schematic representation of microinfusion sites within (filled circle) and outside (blank circle) the midbrain periaqueductal gray (PAG) of the mouse. The number of the filled circle in the figure is less than the total number of mice because of the overlaps.

Table 1

Effect of oCRF infusions in the DPAG on behavioral responses of mice confronted with a rat in the mouse defense test battery

Behaviors	Control	oCRF 30 ng	oCRF 100 ng	<i>F</i> (2, 28)
Pretest activity				
Line crossing	200.4 ± 19.5	187.4 ± 6.6	182.3 ± 15.7	0.39
Escape attempts	9.5 ± 2.1	9.1 ± 2.1	6.7 ± 2.3	0.47
Predator avoidance test				
Avoidance distance (cm)	45.7 ± 10.4	44.9 ± 6.7	75.4 ± 8.3*	3.69
Avoidance frequency	1.4 ± 0.3	2.1 ± 0.4	2.2 ± 0.2	1.89
Chase/flight test				
Flight speed (m/s)	0.51 ± 0.05	0.53 ± 0.05	0.61 ± 0.04	1.11
Max speed (m/s)	0.84 ± 0.06	0.89 ± 0.07	0.94 ± 0.05	0.52
Stops	2.4 ± 1.0	4.8 ± 1.1	2.9 ± 0.5	1.78
Reversals	5.7 ± 1.3	6.7 ± 1.6	4.3 ± 1.5	0.62
Closed alley test				
Approaches/withdrawals	1.9 ± 0.2	2.0 ± 0.4	2.3 ± 0.4	0.30
Contacts	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.2	0.42
Jump escapes	0.9 ± 0.4	1.8 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.08
Freezing (s)	2.1 ± 0.5	3.7 ± 1.4	1.9 ± 0.6	1.04
Forced contact test				
Uprights	12.4 ± 0.9	6.9 ± 1.3*	8.1 ± 1.6*	5.50
Vocalization	13.6 ± 0.4	13.4 ± 0.8	14.0 ± 0.9	0.13
Bites	1.6 ± 0.7	1.4 ± 0.6	1.8 ± 1.0	0.07
Jump escapes	2.4 ± 1.0	8.1 ± 1.3*	7.0 ± 1.6*	6.03
Post-test				
Line crossing	179.5 ± 20.9	152.6 ± 14.0	184.3 ± 23.0	0.80
Escape attempts	27.0 ± 3.1	32.4 ± 3.7	22.4 ± 5.2	0.47

* $P < 0.05$ compared to control by Newman–Keuls test.

tor. In the forced contact test, Newman–Keuls test indicated that both doses of oCRF had effects on escape attempts (increase jump escapes) and defensive threats (decrease upright postures).

3.2. Experiment 2: rat exposure test

3.2.1. Spatiotemporal measures

One-way ANOVA revealed significant effects of oCRF (30–100 ng) infusions on home chamber frequency ($F(2, 26) = 9.98$, $P < 0.001$) and duration ($F(2, 26) = 6.00$, $P < 0.01$), on tunnel frequency ($F(2, 26) = 7.32$, $P < 0.01$) and duration ($F(2, 26) = 4.94$, $P < 0.01$), and on surface frequency ($F(2, 26) = 5.09$, $P < 0.01$) with a borderline effect on surface duration ($F(2, 26) = 2.99$, $P = 0.07$) (Fig. 4). ANOVA also revealed a borderline effect on mesh contact frequency ($F(2, 26) = 2.87$, $P = 0.07$), while the Kruskal–Wallis ANOVA followed by Mann–Whitney U comparisons showed a significant effect on mesh contact duration ($X^2_{(2)} = 8.18$, $P < 0.01$) (Fig. 5).

3.2.2. Ethological measures

Intra-DPAG infusions of oCRF decreased tunnel stretch attend frequency ($F(2, 26) = 6.53$, $P < 0.01$) and duration ($F(2, 26) = 6.96$, $P < 0.01$). No significant treatment effects were obtained for chamber stretched attend frequency ($F(2, 26) = 1.80$, $P > 0.05$) or duration ($F(2, 26) = 1.43$, $P > 0.05$) (Fig. 5); freezing duration ($X^2_{(2)} = 4.16$, $P > 0.05$); burying duration ($F(2, 26) = 0.51$, $P > 0.05$); or grooming duration ($F(2, 26) = 0.24$, $P > 0.05$) (Fig. 6).

4. Discussion

This study evaluated the behavioral effects of the peptide oCRF microinjected into the mouse DPAG in two different predator–stress situations: the mouse defense test battery (MDTB) and the rat exposure test (RET). In the MDTB, oCRF weakly but consistently modified defensive behaviors in mice confronted by the predator, with an apparent emphasis on avoidance and escape. In this context only the highest dose of oCRF increased avoidance distance when the rat was approached. However, when mice were forced to contact the rat, both doses of oCRF potentiated escape attempts (jump escapes) while reduced defensive threats (upright posture). This pattern suggests a primary effect on escape, with a secondary effect on defensive threat, in that such threat is very dependent on the distance between prey and predator [10]: if the prey escapes prior to proximity/contact with the predator, a proportionate decline in defensive threat – as was obtained – would be expected. Thus the reduction in defensive threat is compatible with an overall enhancement of escape/avoidance following oCRF infusion. Earlier studies have demonstrated that acute peripheral administration of fluoxetine, imipramine or the benzodiazepine inverse agonist Ro 19-4603 all produced increases in avoidance and defensive threat behaviors, whereas chronic administration of fluoxetine or imipramine reduced these behaviors [25,26]. These avoidance changes are consonant with a view that single acute administrations of SSRIs or tricyclic antidepressants can enhance the severity and frequency of some anxiety symptoms

Fig. 4. Effect of oCRF injected into the dorsal PAG on the spatiotemporal (frequency upper panel and duration lower panel) defensive responses in the rat exposure test. Each bar represents the mean $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$ compared to control group.

[25], as does Ro 19-4603 in preclinical models of anxiety [36], and support an interpretation of enhanced anxiety for the present finding of oCRF-enhanced avoidance in the MDTB. While these earlier studies found increased, rather than decreased, defensive attack (as occurred in the present study), they also failed to find increased escape in the forced contact test, such that proximity and contact of the subject with the predator was not reduced in treated animals; a factor important for the elicitation of attack toward the predator, and significantly reduced in the present study.

Our findings corroborate a consistent literature demonstrating that i.c.v. administration of CRF enhances behavioral responses in several animal models of anxiety (e.g. potentiated acoustic startle response, facilitated fear conditioning and enhanced shock-induced freezing and fighting behavior) [24]. Microinjection of CRF directly into specific sites such as the locus coeruleus, amygdala and hypothalamic paraventricular nucleus has also been shown to intensify anxiety-related behaviors (for a review see [24]). Similarly, intra-DPAG infusion of CRF has been reported to produce anxiogenic-like behavior in the rat plus-maze test [29].

In contrast to many of these tests, the MDTB involves direct confrontation of the prey (mouse) with a hand-held anesthetized rat (predator) that first approaches, then chases, and finally contacts the mouse. This procedure leaves little escape possibility,

Fig. 5. Effect of oCRF injected into the dorsal PAG on the spatiotemporal and ethological (frequency upper panel and duration lower panel) defensive responses in the rat exposure test. Each bar represents the mean $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$ compared to control group.

providing a very intense threat and eliciting high levels of defensive responses in mice. Thus the relatively mild oCRF effects recorded in the present study may have been due to the high level of threat/stress elicited by the MDTB, which might have

Fig. 6. Effect of oCRF injected into the dorsal PAG on the ethological (duration) defensive responses in the rat exposure test. Each bar represents the mean $\pm$ S.E.M.

increased defensive responses to a level considered to be a ceiling effect.

In a recent MDTB study, Yang et al. [50] showed that i.c.v. injection of oCRF reliably potentiated most of the defensive behaviors evaluated in CD-1 strain of mice. oCRF robustly suppressed exploratory activities and increased risk assessment, freezing, avoidance, flight speed and jump escapes. These findings indicate that the MDTB can support enhanced defensiveness. However, these apparent contrasting differences between present results and those reported by Yang et al. [50] may be related to the different mouse strains used (Swiss-Webster $\times$ CD-1), injection sites (DPAG $\times$ i.c.v.), as well as a substantial difference in the range of doses of oCRF (30–100 ng versus 450–950 ng). Regarding the latter issue, it could be argued that higher doses of oCRF would produce stronger results when injected into the DPAG.

On the other hand, this view of a partial ceiling effect in the MDTB is compatible with the RET findings described in the Experiment 2. In the RET, connections of the mouse “home chamber” via a tunnel to a “surface area” where the predator is located allow the subject to seek or avoid the predator stimulus and thus regulate its own exposure to the threat. oCRF infusion into the DPAG consistently increased a number of measures of avoidance of the predator. For instance, both doses of oCRF increased home chamber time while reduced tunnel time, contact with the wire mesh and surface time ($P=0.06$). This avoidance effect appears to be relatively specific, i.e. although frequency and duration of risk assessment (stretch attend posture—SAP) were reduced in the tunnel compartment, relative frequency of SAP did not change. Behaviors like burying and grooming, which were mainly exhibited in the home chamber, were not different in both control and oCRF groups, thus suggesting that the drug did not provoke any motoric disruption. Although freezing durations appeared to increase in animals treated with oCRF this effect failed to reach an acceptable level of statistical significance.

Our results from RET confirm an overall enhancement of avoidance following intra-DPAG infusion of oCRF. These findings are in agreement with the results of Experiment 1, in which oCRF enhanced the avoidance distance as the reaction to the predator. These results also corroborate previous findings from Martins et al. [29] who have demonstrated that intra-DPAG infusion of CRF was able to increase the open arm avoidance in the EPM in rats. In that study, CRF microinjection reduced the percentage of entries and percentage of time spent on open arms of the EPM (anxiety indices), without significantly changing the number of enclosed arm entries, a measure usually considered to be an index of general activity [39].

A role of the DPAG in anxiety and, specifically, in panic attacks has been previously proposed [20]. The flight behavior or jumping that follows DPAG stimulation [17,40,48] as well as the reports from human patients undergoing neurosurgery [35] give support to this view. Present results with MDTB (Experiment 1) corroborate these evidences since intra-DPAG infusion of oCRF increased escape trials (jump escapes) during the predator approaches and contacts in the forced contact test. In front of this evidence, it could be suggested a CRFergic modula-

tion within this midbrain structure on behaviors that have been related with panic attacks. In addition, the results from Experiment 2 strongly support previous findings [18] emphasizing the importance of the dorsal region of PAG in the modulation of a more subtle defensive behavior, such as risk assessment or threat avoidance. Taken together, these evidences are compatible with the McNaughton and Corr hypothesis [31] which suggests that the periaqueductal gray modulates behavioral responses related to anxiety such as risk assessment and avoidance besides fundamentally controlling fear-like responses [22].

It has been previously shown that antipredator defensive behaviors elicited in the RET respond to drugs effective against anxiety disorders such as diazepam and buspirone [13]. In other words, these drugs significantly reduced the spatiotemporal (avoidance) and ethological (risk assessment) measures. Hence, it would be reasonable to suggest a potential role for CRF systems in the DPAG in the regulation of emotionality. Indeed, an involvement of local CRF receptors on the emotional state has been confirmed by Martins et al. [30]. These researchers demonstrated that the enhancement of anxiety induced by forced immobilization was attenuated by intra-DPAG injection of alpha-helical-CRF_{9–41}, a competitive CRF receptor antagonist, in rats exposed to the plus-maze test. These findings indicate a specific involvement of CRF-mediated neurotransmission in the DPAG on anxiety-related behaviors.

In conclusion, the two different predator–stress situations used in the present study – the MDTB and the RET – indicated that the patterns of defensiveness in response to low intensity threat (RET) are more sensitive to intra-DPAG oCRF than those triggered by high intensity threats (MDTB). Finally, present results suggest that CRF systems may be functionally involved in unconditioned defenses, acting in some of the same brain sites that have previously been investigated as components of an antipredator defense system [14].

Acknowledgements

This study was supported by CAPES Brazil and University of Hawaii-USA. E.F. Carvalho-Netto was recipient of CAPES and R.L. Nunes-de-Souza received a CNPq research fellowship.

References

- [1] Albeck DS, McKittrick CR, Blanchard DC, Blanchard RJ, Nikulina J, McEwen BS, et al. Chronic social stress alters levels of corticotrophin-releasing factor and arginine vasopressin mRNA in rat brain. *J Neurosci* 1997;17:4895–903.
- [2] Baldwin HA, Rassnick S, Rivier J, Koob GF, Britton KT. CRF antagonist reverses the “anxiogenic” response to ethanol withdrawal in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 1991;103(2):227–32.
- [3] Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:525–57.
- [4] Bandler R, DePaulis A, Vergnes M. Identification of midbrain neurones mediating defensive behavior in the rat by microinjections of excitatory amino acids. *Behav Brain Res* 1985;15:107–19.
- [5] Bandler R, DePaulis A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and the rat. In: Bandler R, DePaulis A, editors. *The midbrain periaqueductal gray matter*. New York: Plenum Press; 1991. p. 175–97.

- [6] Behbehani MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol* 1995;46(6):575–605.
- [7] Berridge CW, Dunn AJ. A corticotropin-releasing factor antagonist reverses the stress-induced changes of exploratory behavior in mice. *Horm Behav* 1987;21:393–401.
- [8] Bittencourt JC, Sawchenko PE. Do centrally administered neuropeptides access cognate receptors? An analysis in the central corticotropin-releasing factor system. *J Neurosci* 2000;20(3):1142–56.
- [9] Blanchard DC, Williams G, Lee EMC, Blanchard RJ. Taming wild *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central gray. *Physiol Psychol* 1988;9(1):157–63.
- [10] Blanchard RJ, Blanchard DC. Anti-predator defense as models of fear and anxiety. In: Brain PF, Blanchard RJ, Parmigiani S, editors. *Fear and defense*. London: Harwood Academic Publishers; 1990. p. 89–108.
- [11] Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. Mouse defense behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 2001;25:205–18.
- [12] Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27(8):1177–85.
- [13] Blanchard DC, Yang M, Markham C, Farrokh C, Pentkowski NS, Blanchard RJ, et al. Diazepam and buspirone effects in c57bl/6j mice in the rat exposure test (ret) Program no. 784.3. 2004 abstract viewer/itinerary planner. Washington, DC: Society for Neuroscience; 2004, online.
- [14] Blanchard DC, Canteras NS, Markham C, Pentkowski NS, Blanchard RJ. Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29(8):1243–53.
- [15] Britton DR, Koob GF, Rivier J, Vale W. Intraventricular CRF enhances behavioral effects of novelty. *Life Sci* 1982;31:363–7.
- [16] Cador M, Ahmed SH, Koob GF, Le Moal M, Stinus L. Corticotropin-releasing factor induces a place aversion independent of its neuroendocrine role. *Brain Res* 1992;597:304–9.
- [17] Carvalho-Netto EF, Markham C, Blanchard DC, Nunes-de-Souza RL, Blanchard RJ. Physical environment modulates the behavioral responses induced by chemical stimulation of dorsal periaqueductal gray in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;85(1):140–7.
- [18] Carobrez AP, Teixeira KV, Graeff FG. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neurosci Biobehav Rev* 2001;25(7–8):697–709.
- [19] Di Scala G, Schmitt P, Karli P. Flight induced by infusion of bicuculline methiodide into periventricular structures. *Brain Res* 1984;309:199–208.
- [20] Deakin JFW, Graeff FG. 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol* 1991;5:305–15.
- [21] Graeff FG. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res* 1994;27(4):811–29.
- [22] Graeff FG. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28(2):239–59.
- [23] Gray TS, Bingaman EW. The amygdala: corticotropin-releasing factor, steroids, and stress. *Crit Rev Neurobiol* 1996;10(2):155–68.
- [24] Griebel G. Is there a future for neuropeptide receptor ligands in the treatment of anxiety disorders? *Pharmacol Ther* 1999;82(1):1–61.
- [25] Griebel G, Blanchard DC, Agnes RS, Blanchard RJ. Differential modulation of antipredator defensive behavior in Swiss-Webster mice following acute or chronic administration of imipramine and fluoxetine. *Psychopharmacology* 1995;120:57–66.
- [26] Griebel G, Blanchard DC, Jung A, Blanchard RJ. A model of ‘antipredator’ defense in Swiss-Webster mice: effects of benzodiazepine receptor ligands with different intrinsic activities. *Behav Pharmacol* 1995;6(6):732–45.
- [27] Lee EH, Tang YP, Chai CY. Stress and corticotropin-releasing factor potentiate center region activity of mice in an open field. *Psychopharmacology* 1987;93:320–3.
- [28] Li C, Vaughan J, Sawchenko PE, Vale WW. Urocortin III-immunoreactive projections in rat brain: partial overlap with sites of type 2 corticotropin-releasing factor receptor expression. *J Neurosci* 2002;22(3):991–1001.
- [29] Martins AP, Marras RA, Guimaraes FS. Anxiogenic effect of corticotropin-releasing hormone in the dorsal periaqueductal grey. *Neuroreport* 1997;8(16):3601–4.
- [30] Martins AP, Marras RA, Guimaraes FS. Anxiolytic effect of a CRH receptor antagonist in the dorsal periaqueductal gray. *Depress Anxiety* 2000;12(2):99–101.
- [31] McNaughton N, Corr PJ. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28(3):285–305.
- [32] Mendes-Gomes J, Nunes-de-Souza RL. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. *Brain Res* 2005;1047(1):97–104.
- [33] Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 2002;66(6):355–474.
- [34] Momose K, Inui A, Asakawa A, Ueno N, Nakajima M, Fujimiya M, et al. Intracerebroventricularly administered corticotropin-releasing factor inhibits food intake and produces anxiety-like behaviour at very low doses in mice. *Diabetes Obes Metab* 1999;1(5):281–4.
- [35] Nashold Jr BS, Wilson WP, Slaughter DG. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 1969;30(1):14–24.
- [36] Nicolas LB, Prinssen EP. Social approach-avoidance behavior of a high-anxiety strain of rats: effects of benzodiazepine receptor ligands. *Psychopharmacology (Berl)* 2006;184:65–74.
- [37] Olschowka JA, O’Donohue TL, Mueller GP, Jacobowitz DM. Hypothalamic and extrahypothalamic distribution of CRF-like immunoreactive neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology* 1982;35(4):305–8.
- [38] Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. California: Academic Press; 2001.
- [39] Rodgers RJ, Johnson NJT. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;52:297–303.
- [40] Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré ECM, Vargas LC. Modeling panic attacks. *Neurosci Behav Rev* 2001;25:647–59.
- [41] Sirinathsinghi DJ, Rees LH, Rivier J, Vale W. Corticotropin-releasing factor is a potent inhibitor of sexual receptivity in the female rat. *Nature* 1983;305:232–5.
- [42] Stiedl O, Meyer M, Jahn O, Ogren SO, Spiess J. Corticotropin-releasing factor receptor 1 and central heart rate regulation in mice during expression of conditioned fear. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312(3):905–16.
- [43] Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 1983;36(3):165–86.
- [44] Swiergiel AH, Takahashi LK, Kalin NH. Attenuation of stress induced behavior by antagonism of corticotropin-releasing factor receptors in the central amygdala in the rat. *Brain Res* 1993;623:229–34.
- [45] Takahashi LK. Role of CRF(1) and CRF(2) receptors in fear and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 2001;25(7–8):627–36.
- [46] Vale WW, Rivier C, Perrin M, Smith M, Rivier J. Pharmacology of gonadotropin releasing hormone: a model regulatory peptide. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1981;28:609–25.
- [47] Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, et al. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol* 2000;428(2):191–212.
- [48] Vianna DM, Brandao ML. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. *Braz J Med Biol Res* 2003;36(5):557–66 (review).
- [49] Yang M, Augustsson H, Markham C, Hubbard DT, Webster D, Wall PM, et al. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. *Physiol Behav* 2004;81(3):465–73.
- [50] Yang M, Farrokhi C, Vasconcellos A, Blanchard RJ, Blanchard DC. Central infusion of ovine CRF (oCRF) potentiates defensive behaviors in CD-1 mice in the mouse defense test battery (MDTB). *Behav Brain Res* 2006;171(1):1–8.