UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

Papel dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ do colículo inferior na expressão de respostas incondicionadas e condicionadas de medo

ANA CAROLINE COLOMBO

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Psicobiologia.

RIBEIRÃO PRETO – SP
- 2014 -

ANA CAROLINE COLOMBO

Papel dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ do colículo inferior na expressão de respostas incondicionadas e condicionadas de medo

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia.

Orientação: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão

Versão Corrigida

**RIBEIRÃO PRETO – SP
- 2014 -**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Colombo, Ana Caroline.

Papel dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ do colículo inferior na expressão de respostas incondicionadas e condicionadas de medo / Ana Caroline Colombo; orientador Marcus Lira Brandão.

– Ribeirão Preto, 2014.

84 f.: 30cm.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia. Área de concentração: Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/ Universidade de São Paulo.

1. Colículo inferior.
2. Dopamina.
3. Medo.
4. Labirinto em cruz elevado.
5. Sobressalto potencializado pelo medo.

Nome: COLOMBO, Ana Caroline

Título: Papel dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ do colículo inferior na expressão de respostas incondicionadas e condicionadas de medo

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais, Cristiane e Edson,
por me ensinarem a sonhar, mas principalmente, por me ensinarem a nunca desistir de
fazer o sonho acontecer.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcus Lira Brandão, pela oportunidade e orientação.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro no início deste trabalho.

À Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira, que nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo de forma essencial para meu crescimento científico e intelectual. Por me ensinar a fazer ciência.

Aos amigos do laboratório, pela atenção, apoio, conversas e almoços durante todo processo de construção do conhecimento.

Aos meus outros tantos amigos, por darem sentido à palavra amigo. Por serem peças fundamentais em cada etapa da minha vida e que, mesmo distantes, se fazem parecer tão próximos.

À minha família, pelo apoio e amor incondicional. Por me mostrarem o caminho e por fazerem parte de tudo que hoje sou.

Ao Léo, por me colocar no chão nos momentos de desespero e por acreditar em mim mais do que eu mesma. Pelo simples motivo de ser meu melhor companheiro em todos os momentos e por me fazer feliz.

“Só sei que nada sei...”

– *Sócrates*

RESUMO

COLOMBO, A.C. **Papel dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ do colículo inferior na expressão de respostas incondicionadas e condicionadas de medo.** 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O colículo inferior (CI) é uma estrutura envolvida primariamente com o processamento da informação acústica, porém participa também na integração dos aspectos sensoriais, autonômicos e comportamentais da reação de defesa frente a situações de ameaça. Além disso, essa estrutura apresenta alta concentração de receptores dopaminérgicos, sendo a dopamina um dos neuromoduladores mais ativos em mecanismos subjacentes a estados de medo e ansiedade. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel dos receptores dopaminérgicos (D₁ e D₂) do CI na expressão de respostas defensivas incondicionadas ou condicionadas. Para tanto, ratos *Wistar* machos (± 270 g, n=186) passaram por cirurgia estereotáxica para implante bilateral de cânulas-guia direcionadas ao CI. Esses animais receberam administração intra-CI de quimpirrole (agonista D₂), sulpirida (antagonista D₂), SKF 38393 (agonista D₁) ou SCH 23390 (antagonista D₁), em diferentes doses, e foram submetidos aos testes do labirinto em cruz elevado (LCE) e ao campo aberto. Uma dose de sulpirida foi avaliada também no teste do sobressalto potencializado pelo medo (SPM). Quanto à avaliação das respostas defensivas no teste do LCE, foi observado que apenas a sulpirida diminuiu as entradas e o tempo despendido nos braços abertos, ou seja, causou um efeito pró-aversivo. As outras drogas não influenciaram essas respostas defensivas. Um comprometimento no desempenho motor foi observado pela administração intra-CI de quimpirrole (diminuição nas entradas nos braços fechados) e de SCH 23390 (diminuição da locomoção no campo aberto). Quanto aos efeitos de sulpirida sobre as respostas defensivas no teste do SPM, nenhuma influência sobre a resposta de amplitude do sobressalto e sobre o congelamento foi constatada. Os dados obtidos apontam para o envolvimento da modulação dopaminérgica por meio de receptores da família D₂ no CI na expressão de respostas incondicionadas de medo. Dopamina no CI parece, portanto, ser importante para regular a expressão dessas respostas. Por outro lado, não obtivemos evidências de que tal modulação no CI esteja envolvida na expressão de respostas condicionadas de medo. Portanto, a neurotransmissão dopaminérgica no CI sobre a expressão de respostas defensivas parece ocorrer por meio de receptores da família D₂, com ação seletiva na modulação de respostas incondicionadas de medo.

Palavras-Chave: colículo inferior, dopamina, medo, labirinto em cruz elevado, sobressalto potencializado pelo medo.

ABSTRACT

COLOMBO, A.C. **Role of dopamine D₁ and D₂ receptors of the inferior colliculus in the expression of unconditioned and conditioned fear responses.** 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The inferior colliculus (IC) is a structure primarily involved in acoustic information processing, but it also participates in the integration of the sensory, autonomic and behavioral aspects of the defensive reaction to threatening situations. Furthermore, this structure has a high concentration of dopamine receptors, and dopamine is one of the most active neuromodulators in the mechanisms underlying states of fear and anxiety. Thus, the aim of this study was to evaluate the role of IC dopamine receptors (D₁ and D₂) in the expression of unconditioned and conditioned defensive responses. For this purpose, male *Wistar* rats (± 270 g, n=186) were implanted with bilateral guide cannuli directed to the IC. These animals received intra-IC quinpirole (D₂ agonist), sulpiride (D₂ antagonist), SKF 38393 (D₁ agonist) or SCH 23390 (D₁ antagonist) at different doses, and were tested in the elevated plus maze (EPM) and the open field tests. A single dose of sulpiride was also evaluated in the fear potentiated startle test (FPS). In the EPM test, it was observed that only sulpiride decreased the numbers of entries and time spent in the open arms of the maze, suggesting an ansiogenic-like effect. The other drugs did not influence these defensive responses. Impairment in motor performance was observed with intra-IC quinpirole (decrease in closed arm entries) and SCH 23390 (decrease in locomotion in the open field test). In the FPS test, no significant effects in the amplitude of the startle response and freezing behavior were observed. The data point to an involvement of IC dopaminergic D₂-like receptors in the expression of unconditioned fear responses. Dopamine in the IC, therefore, seems to be important for regulating the expression of these responses. On the other hand, there was no evidence that this modulation in the IC is involved in the expression of conditioned fear responses. Therefore, the influence of the dopaminergic neurotransmission in the IC on the expression of defensive responses appears to occur via D₂-like receptors, which selectively modulate unconditional fear responses.

Keywords: inferior colliculus, dopamine, fear, elevated plus maze, fear potentiated startle.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. O medo e seus conceitos	12
1.2. Testes para avaliação do medo/ansiedade	13
1.3. Os sistemas encefálicos de defesa	15
1.4. O colículo inferior como componente do SEA	16
1.5. A dopamina e seus receptores	19
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Animais	25
3.2. Cirurgia.....	25
3.3. Drogas	26
3.4. Microinjeções	26
3.5. Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	26
3.5.1. Equipamentos	26
3.5.2. Procedimentos	27
3.5.3. Delineamento Experimental	28
3.6. Teste do Campo Aberto.....	28
3.6.1. Equipamentos	28
3.6.2. Procedimentos	29
3.6.3. Delineamento Experimental	29
3.7. Teste do Sobressalto Potencializado pelo Medo	30
3.7.1. Equipamentos	30
3.7.2. Procedimentos	31
3.7.3. Delineamento Experimental	32
3.8. Histologia	33
3.9. Análise Estatística	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Receptores D ₂ do CI na expressão do medo incondicionado e condicionado	36
4.1.1. Teste do labirinto em cruz elevado	36
4.1.2. Teste do campo aberto.....	44
4.1.3. Teste do sobressalto potencializado pelo medo	50
4.2. Receptores D ₁ do CI na expressão do medo incondicionado	52
4.2.1. Teste do labirinto em cruz elevado	52
4.2.2. Teste do campo aberto.....	60
5. DISCUSSÃO.....	63
5.1. Receptores D ₂	64
5.2. Receptores D ₁	70
6. CONCLUSÕES.....	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. INTRODUÇÃO

1.1. O medo e seus conceitos

O que são emoções? O destaque que Darwin proporcionou a esse tema no seu livro “A expressão das emoções no homem e nos animais” (1872) foi de grande importância para a ciência. A partir dele, uma visão evolutiva e comparativa envolvendo a busca por essa resposta começou a ser delineada. Diversas teorias têm sido desenvolvidas, porém nenhuma ainda é capaz de compreender o assunto em todos os seus aspectos. Isso se deve à complexidade de tal questão. Uma definição simplista para emoção se refere à manifestação de reações psicomotoras, geralmente acompanhadas de alterações neurovegetativas em resposta a um estímulo ambiental (BRANDÃO, 2004).

O medo e a ansiedade são emoções associadas ao comportamento de defesa, que surgem quando experimentamos uma ameaça iminente ou potencial à nossa sobrevivência. Apesar de serem termos empregados para descrever emoções humanas, é possível fazer um paralelo com outras espécies animais. Tal paralelo pode ser feito, pois as respostas de defesa a situações aversivas são similares em diferentes espécies (DARWIN, 1872). Assim, respeitando as características de cada espécie, podemos avaliar e melhor entender os mecanismos subjacentes à expressão de respostas defensivas em mamíferos não-humanos (roedores, por exemplo) e, conseqüentemente, relacioná-las às psicopatologias associadas ao medo e a ansiedade em humanos.

De maneira mais ampla podemos caracterizar o medo e a ansiedade como um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas características que visam reduzir potenciais perigos para o indivíduo frente a uma ameaça ostensiva ou a um sinal de ameaça potencial. Dentre as respostas comportamentais podemos incluir o congelamento e a fuga, enquanto que as fisiológicas incluiriam aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca e do ritmo respiratório (GRAEFF; BRANDÃO, 1999; GROSS; CANTERAS, 2012).

É possível separar, grosso modo, as respostas defensivas em dois conjuntos. O primeiro deles relaciona-se ao “medo inato ou incondicionado” que é deflagrado por estímulos aversivos proximais e espécie-específicos. Nesse conjunto podemos encontrar a exposição da presa aos seus predadores naturais e/ou ao odor destes. O segundo conjunto relaciona-se ao “medo aprendido ou condicionado” que é eliciado por um estímulo anteriormente neutro, um contexto (ambiente), uma luz ou um som, que é pareado com um estímulo aversivo incondicionado como, por exemplo, choques nas patas, corrente de ar ou sons intensos (condicionamento clássico ou pavloviano) (DEAKIN; GRAEFF, 1991; GROSS; CANTERAS, 2012). Devido ao emparelhamento desses estímulos, o estímulo inicialmente neutro adquire as propriedades aversivas do estímulo incondicionado, tornando-se um estímulo aversivo condicionado. A partir

de então, a apresentação apenas desse estímulo condicionado (contexto, luz ou som) é capaz de eliciar respostas de medo aprendido (como o congelamento).

Além disso, é importante distinguir os diferentes níveis de ameaças, as quais evocam distintos padrões de respostas defensivas. Estímulos que sinalizam uma ameaça potencial (um novo contexto, por exemplo) levam a respostas de avaliação de risco, como uma exploração cautelosa do ambiente. Já estímulos distais (percepção de um predador à determinada distância ou o reconhecimento de um contexto que foi previamente associado com um estímulo aversivo) evocam respostas de imobilidade com aumento da tensão e tônus muscular, como a resposta de congelamento. Por fim, estímulos proximais (como o contato direto com o predador) levam a respostas do tipo fuga ou luta (BLANCHARD; FLANNELLY; BLANCHARD, 1986).

1.2. Testes para avaliação do medo/ansiedade

Visando entender melhor as distintas respostas defensivas e a neurobiologia envolvida nesses processos, neurocientistas, psicólogos, etólogos e outros profissionais desenvolveram diversos testes em laboratórios. Esses testes foram criados para representar situações aversivas, incondicionadas e condicionadas, que se assemelhassem às ameaças recorrentes na natureza.

Para avaliação das respostas defensivas incondicionadas, alguns testes baseiam-se na exposição do animal a uma situação sinalizadora ou real do predador natural, como no teste de interação presa-predador, ou ao confronto iminente com animais da mesma espécie, como no teste de interação social de ratos. Além disso, há testes que se baseiam na exposição do animal a um ambiente novo ou potencialmente perigoso, como, por exemplo, no labirinto em “T” elevado, no campo aberto e no teste do labirinto em cruz elevado (LCE).

O LCE é um aparato com dois braços abertos e dois fechados, que se cruzam, e se encontra a certa distância do solo. Os animais quando expostos a esse teste tendem a ficar nos braços fechados. Essa preferência é um provável reflexo da aversão causada pelos braços abertos (MONTGOMERY, 1955; PELLOW et al., 1985). Assim, o determinante do comportamento do animal nesse teste é a aversão incondicionada à altura e ao espaço aberto. Porém, o caráter aversivo dos braços abertos não é aparente até os ratos entrarem neles (PELLOW al., 1985). Treit e cols. (1993) mostraram que o principal estímulo aversivo está associado ao espaço aberto. O tigmotactismo, uma resposta defensiva natural de contato das vibrissas com superfícies verticais para proteção contra predadores, é de grande importância no estabelecimento do comportamento exploratório de roedores no LCE. As vibrissas parecem fazer parte de um sistema de captura de informação do ambiente, somado a percepção visual (CARDENAS;

LAMPREA; MORATO, 2001; MARTÍNEZ et al., 2002). Além disso, outro componente que o LCE avalia relaciona-se à exploração de um ambiente novo. Por isso, este modelo é capaz de gerar um conflito de aproximação-evitação nos animais. Este conflito está associado à tendência natural de roedores de explorar ambientes novos e à aversão e o medo natural que ratos apresentam dos espaços abertos (MONTGOMERY, 1955; BARNETT, 1966; MCNAUGHTON; CORR, 2004; SALUM; ROQUE DA SILVA; MORATO, 2003). Por englobar esses componentes, espaço aberto e conflito de aproximação-evitação, o LCE tem sido amplamente utilizado para avaliação do estado geral de medo/ansiedade em roedores. As variáveis associadas a esse teste referem-se à quantificação do deslocamento, da avaliação de risco e da exploração pelo animal do ambiente novo e aversivo. Essas variáveis são sensíveis a benzodiazepínicos. De fato, sabe-se que ansiolíticos benzodiazepínicos aumentam as porcentagens de entrada e tempo gasto no espaço aberto, enquanto drogas ansiogênicas promovem efeitos opostos (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985; PELLOW; FILE, 1986).

O campo aberto, outro teste utilizado para avaliação das respostas defensivas incondicionadas, pode ser empregado também para avaliação de eventuais alterações motoras causadas por drogas. Dados recentes mostraram que dependendo da droga e do local de injeção há distintos efeitos sobre o desempenho motor. A administração i.p. de SCH 23390 (agonista D₁) afeta o desempenho motor, porém esse efeito não é observado quando a administração da mesma droga é feita intra-área tegmental ventral (ATV). Assim, a exposição do animal ao teste do campo aberto pode indicar se as alterações motoras causadas pelas drogas estão influenciando os comportamentos defensivos avaliados em outros testes (WALSH; CUMMINS, 1976; DE OLIVEIRA et al., 2006, 2011; DE SOUZA CAETANO; DE OLIVEIRA; BRANDÃO, 2013).

Para avaliação das respostas defensivas condicionadas, os testes se baseiam na exposição do animal a estímulos ou contextos associados a estímulos nociceptivos moderados, como é o caso do teste do medo condicionado contextual, medo condicionado a um estímulo discreto (luz ou som), esquiva ativa, esquiva passiva, sobressalto potencializado pelo medo, entre outros (DEAKIN; GRAEFF, 1991; CRUZ et al., 1997; CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

O teste do sobressalto potencializado pelo medo (SPM) é um teste que visa avaliar as reações defensivas condicionadas. Por outro lado, o sobressalto em si é uma resposta reflexa do animal frente a qualquer estímulo repentino que resulte em uma estimulação tátil, acústica e/ou vestibular (YEOMANS; FRANKLAND, 1996). Sabendo que o sobressalto constitui uma resposta de proteção, é possível esperar que ele seja aumentado em situações aversivas. Brown e cols. (1951) demonstraram que a avaliação da amplitude da resposta de sobressalto a um estímulo acústico em ratos pode ser aumentado por meio da apresentação de um estímulo

condicionado (ex., luz; som) que tenha sido previamente pareado com um estímulo aversivo (ex., choque nas patas) (BROWN; KALISH; FARBER, 1951; HITCHCOCK; DAVIS, 1987; DAVIS, 1993). Tal fenômeno é conhecido como “potencialização da resposta de sobressalto” pelo medo.

Associado ao teste do SPM, no Laboratório de Neuropsicofarmacologia da FFCLRP-USP, outra resposta tem sido comumente avaliada: o tempo de congelamento condicionado. O congelamento consiste em padrão comportamental complexo e coordenado, caracterizado pela ausência de todos os movimentos corporais, exceto movimentos respiratórios. Além disso, no congelamento observamos um alto nível de alerta e considerável tonicidade muscular. Trata-se de uma das reações de defesa mais comum em ratos e camundongos em resposta a diversos estímulos aversivos (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; BOLLES; COLLIER, 1976; CARRIVE, 2000; FANSELOW, 1991).

1.3. Os sistemas encefálicos de defesa

Devido à criação, validação e caracterização dos testes desenvolvidos para o estudo da neurobiologia do medo e da ansiedade, inúmeras pesquisas nas últimas décadas levaram à caracterização de sistemas de defesa, como o sistema de inibição comportamental (SIC) e o sistema encefálico de aversão (SEA), e as possíveis estruturas encefálicas envolvidas, considerando o tipo e a natureza (intensidade e distância) do estímulo aversivo.

O SIC é composto por estruturas como o septo e o hipocampo que atuam suprimindo os comportamentos que competem com o padrão de avaliação de risco ou de imobilidade tônica. Essa supressão ocorre em resposta a estímulos aversivos condicionados, novos e a frustração. Dessa forma, essas estruturas, com destaque ao hipocampo, avaliam as informações contextuais, detectando conflitos entre informações já armazenadas e os estímulos provenientes do meio. Se uma incongruência é detectada, o hipocampo age aumentando a valência negativa da informação, e tornando-a mais ameaçadora do que realmente é. Ocorre assim, uma supressão de outros comportamentos e uma inibição comportamental, caracterizada pela avaliação de risco ou pela imobilidade tônica (GRAY; MCNAUGHTON, 2000).

Os mecanismos subjacentes à resposta de defesa inata estão associados ao SEA ou também chamado de sistema de fuga/luta. As estruturas que compõem esse sistema são: hipotálamo medial, o complexo amigdalóide e a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) (GRAEFF, 1981). A estimulação elétrica destas estruturas produz um padrão típico de respostas caracterizado por uma atividade motora intensa acompanhada de saltos junto de reações neurovegetativas como aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca, da respiração, piloereção, micção, defecação e exoftalmia. No entanto, pesquisas posteriores passaram a incluir

no SEA o colículo superior e o colículo inferior (CI) na organização de tais respostas defensivas (BRANDÃO, 1988; DEAN; REDGRAVE; WESTBY, 1989). Estas evidências são plausíveis se considerarmos que nos estudos de Darwin sobre o comportamento emocional dos animais era destacada a importância da ativação dos sentidos da visão e da audição na determinação de estados aversivos. De fato, as camadas profundas do colículo superior participam do processamento de informação visual e o CI participa do processamento da informação acústica.

1.4. O colículo inferior como componente do SEA

O CI é uma estrutura disposta bilateralmente no teto mesencefálico (Figs. 1 e 2). Pode ser dividido utilizando-se critérios citoarquitetônicos, anatômicos e funcionais em um núcleo central e os córtices externo e dorsal (HUFFMAN; HENSON JR, 1990). O núcleo central do CI seria primordialmente uma estação relé das vias auditivas, enquanto que os córtices dorsal e externo seriam áreas participantes da integração sensorio-motora, já que recebem informações não só auditivas, mas também visuais e somáticas, e enviam eferentes para vias motoras (TOKUNAGA; SUGITA; OTANI, 1984).

O CI, como estação relé do mesencéfalo auditivo, mantém projeções ascendentes com o núcleo geniculado medial, e descendentes com retroalimentação com o núcleo coclear, incluindo o complexo olivar superior e as vias comissurais intracoliculares (FAYE-LUND, 1988; HUFFMAN; HENSON JR, 1990; SCHOFIELD; CANT, 1999; MALMIERCA; ERNANDEZ; REES, 2005). O CI também contribui para funções motoras e vocalizações através de projeções diretas com a ponte, colículo superior e substância cinzenta periaquedutal (SCHULLER; COVEY; CASSEDAY, 1991).

Segundo Casseday e Covey (1996), é possível que uma das principais funções do mesencéfalo auditivo seja selecionar informações biologicamente importantes e distribuí-las em um ritmo temporal apropriado para o desempenho motor. Dessa maneira, o CI agiria como um filtro para sons que provocam reações defensivas, tal como ocorre quando a presa é confrontada com seu predador. Neurônios que são sensíveis à duração do som têm sido descritos em diferentes mamíferos, como morcegos, camundongos e ratos (CASSEDAY; EHRLICH; COVEY, 1994; 2000; BRAND; URBAN; GROTHE, 2000; PEREZ-GONZALEZ et al., 2006). Em ratos, a maioria dos neurônios duração-sensitivos está localizada nas áreas corticais do CI (PEREZ-GONZALEZ et al., 2006). A duração do som é importante por contribuir com atributos espectrais e temporais distintos dos sons biológicos espécie-específicos. Além disso, parece que o CI não é apenas responsável em detectar as características físicas do som, mas também em

extrair elementos associados às fontes do som. Dessa forma, parece razoável assumir que são os emissores dos sons (predador, presa, coespecífico ou competidores), e não os sons propriamente ditos, que são utilizados para guiar o curso da ação do animal que os recebem (MASTERTON, 1992).

Figura 1. Esquemas representando o colículo inferior no encéfalo de humanos [A] (modificado de © 2011 PEARSON EDUCATION, Inc.) e de ratos [B] (modificado de IINO; KOBAYASHI; MAEKAWA, 1999). CI = colículo inferior.

Figura 2. Representação de corte histológico do mesencéfalo de rato, baseado no diagrama do Atlas de Paxinos & Watson (2007). Destaque para a disposição bilateral do colículo inferior (CI) no teto mesencefálico.

A estimulação elétrica ou química do CI induz respostas como alerta, congelamento e fuga, mimetizando as reações de defesa de um animal frente a desafios ambientais (BRANDÃO, et al., 1993, 1999; CARDOSO; COIMBRA; BRANDÃO, 1994; CASTILHO; AVANZI; BRANDÃO, 1999; LAMPREA et al., 2002). Alguns estudos anatômicos têm demonstrado projeções do CI para algumas estruturas que participam do sistema cerebral aversivo, como o colículo superior, a substância cinzenta periaquedutal e o hipotálamo, além das projeções indiretas para o complexo amigdalóide através do núcleo geniculado medial do tálamo (ADAMS, 1980; BEITZ, 1990; LEDOUX; FARB; RUGGIERO, 1990; BRANDÃO, 1994). Assim, reforçando a ideia da participação do CI nesse sistema. Somado a isso, o estudo de Silveira e cols. (1993), utilizando técnicas para a marcação da proteína c-Fos, mostrou a ativação dessas estruturas encefálicas ao expor o animal ao LCE. Portanto, o CI além de ser uma estrutura envolvida primariamente com processamento da informação acústica, também participa na integração dos aspectos sensoriais, autonômicos e comportamentais da reação de defesa frente a situações de ameaça (para revisão ver BRANDÃO et al., 1993, 1999, 2005).

Estudos têm sido desenvolvidos visando avaliar os neurotransmissores envolvidos na resposta defensiva mediada pelo CI, dentre eles: o GABA (BRANDÃO et al., 1988, 1993; REIMER; DE OLIVEIRA; BRANDÃO, 2008, 2009), os aminoácidos excitatórios (CARDOSO; COIMBRA; BRANDÃO, 1994; NOBRE; LOPES; BRANDÃO, 2004), a serotonina (BRANDÃO; MELO; CARDOSO, 1993; MELO; BRANDÃO, 1995), o óxido nítrico

(MOREIRA; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2003), os opióides (BAGRI; DI SCALA; SANDNER, 1992; OSAKI et al., 2003) e a dopamina (MELO et al., 2009). Apesar da grande variedade de neurotransmissores estudados, a dopamina não tem tido grande atenção quanto à modulação das respostas defensivas no CI, embora sua participação nos mecanismos dessas respostas seja evidente e a existência de receptores dopaminérgicos nessa estrutura seja observada (CONTRERAS, et al., 1987; WAMSLEY et al., 1989; HURD; SUZUKI; SEDVALL, 2001; VAN DER WERF; SEBENS; KORF, 1986; WEINER; LEVEY; SUNAHARA, 1991).

1.5. A dopamina e seus receptores

A dopamina, um neurotransmissor da família das catecolaminas, é amplamente conhecida por seu papel na regulação da atividade motora e de processos cognitivos e, principalmente, na modulação das funções motivacionais relacionadas à recompensa (WISE; ROMPRE, 1989; KOOB; LE MOAL, 2001; STUCHLIK et al., 2007). Além disso, a dopamina parece participar como um dos neuromoduladores mais ativos em mecanismos subjacentes a estados de medo e ansiedade (RODGERS; NIKULINA; COLE, 1994; GREBA; GIFKINS; KOKKINIDIS, 2001; MILLAN, 2003; PEZZE; FELDON, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2006; 2009; 2011).

As principais vias dopaminérgicas do sistema nervoso central de mamíferos são: a via nigroestriatal, a via mesocorticolímbica e a via túbero-infundibular. A via nigroestriatal tem origem predominantemente na substância negra do mesencéfalo (A9) e inerva o estriado dorsal. A degeneração desta via leva à doença de Parkinson, ressaltando seu papel no controle da motricidade. A via mesocorticolímbica surge principalmente da área tegmental ventral e projeta-se para áreas como o córtex pré-frontal, hipocampo, complexo amigdalóide e núcleo *accumbens*. Acredita-se estar envolvida na regulação de comportamentos emocionais. Distúrbios nessa via contribui para o surgimento de distúrbios mentais. Por fim, a via túbero-infundibular tem origem no hipotálamo e se projeta para hipófise que regula a secreção de prolactina, influenciando a lactação e a fertilidade (CIVELLI; BUNZOW; GRANDY, 1993). Fármacos dopaminérgicos – agonistas e antagonistas – são comumente utilizados para tratamento de psicopatologias, como a doença de Parkinson e a esquizofrenia. Além disso, essa manipulação farmacológica pode ser também uma importante ferramenta para o estudo da neurobiologia do medo e da ansiedade. De fato, é possível alterar os mecanismos envolvendo a neurotransmissão dopaminérgica e, conseqüentemente, avaliar o aspecto comportamental associado.

Os receptores de dopamina são membros da família de proteínas receptoras acopladas à proteína G, com sete domínios transmembrana. São conhecidos cinco tipos de receptores

dopaminérgicos em mamíferos, que se encontram divididos em duas famílias, D₁ e D₂. Na família D₁ temos os receptores D₁ e D₅, enquanto na família D₂ temos os receptores D₂, D₃ e D₄. Originalmente, as propriedades dos receptores de dopamina foram classificadas de acordo com seu efeito sobre a formação de AMP cíclico (cAMP). A ativação dos receptores da família D₁ leva a um aumento do cAMP, enquanto a ativação dos receptores da família D₂ inibe a produção de cAMP. De fato, os receptores da família D₁ estão associados a uma proteína G estimulatória (G_s), à abertura de canais iônicos de cálcio e a conseqüente despolarização da célula, levando à excitação neuronal e a propagação do impulso elétrico. Já os receptores da família D₂ são considerados inibitórios, pois atuam hiperpolarizando o neurônio através de proteínas G inibitórias (G_i), e impedindo, conseqüentemente, a propagação do impulso (CALLIER et al., 2003; KEBABIAN; CALNE, 1979; SIBLEY; MONSMA, 1992).

Os receptores dopaminérgicos podem ainda ser classificados como pré ou pós-sinápticos. Os pré-sinápticos ou autoreceptores são da família D₂ e atuam na regulação da liberação de dopamina para as células pós-sinápticas. A grande maioria encontra-se nos corpos celulares e dendritos da substância negra e da área tegmental ventral. Essas estruturas contêm neurônios dopaminérgicos e são as principais responsáveis pela produção e liberação de dopamina para outras estruturas encefálicas. Os receptores pós-sinápticos, por sua vez, podem ser da família D₁ ou D₂. Sabe-se que os autoreceptores D₂ são de 6 a 10 vezes mais sensíveis a ação de agonistas dopaminérgicos do que os receptores D₂ pós-sinápticos (SKIRBOLL; GRACE; BUNNEY, 1979). Desta forma, esses últimos são ativados com doses maiores de agonistas dopaminérgicos. Assim, dependendo da dose administrada de uma mesma droga, podem-se obter efeitos comportamentais opostos. Isso é devido ao local de ação do fármaco, podendo se acoplar a receptores pré ou pós-sináptico (MOORE; BLOOM, 1978; SKIRBOLI; GRACE; BUNNEY, 1979).

Os receptores dopaminérgicos das famílias D₁ e D₂ encontram-se distribuídos em diferentes quantidades nas diferentes regiões anatômicas do sistema nervoso central. O estriado apresenta altos níveis de expressão de ambas às famílias de receptores. Na maioria das regiões neocorticais a expressão de D₁ é elevada, com baixa expressão de D₂. No tálamo, hipocampo e no tronco encefálico encontram-se principalmente receptores da família D₂. Há, no entanto, pouca evidência de expressão de D₁ nessas regiões (HURD; SUZUKI; SEDVALL, 2001; WEINER; LEVEY; SUNAHARA, 1991). Dentre as estruturas do tronco encefálico que participam da integração de respostas defensivas, o CI é uma das estruturas que apresenta receptores dopaminérgicos da família D₂. Há pouca evidência da presença de receptores D₁ nessa estrutura (CONTRERAS; QUIRION; GEHLERT, 1987; WAMSLEY et al., 1989; HURD;

SUZUKI; SEDVALL, 2001; VAN DER WERF; SEBENS; KORF, 1986; WEINER; LEVEY; SUNAHARA, 1991). No entanto, é importante analisar os efeitos da estimulação e inibição desses receptores (D_1 e D_2) no CI na integração de reações de defesa. A partir dessa análise, poderemos obter mais evidências para melhor entender a participação da dopamina na expressão de respostas incondicionados e condicionados de medo. Nossa hipótese é que, de maneira geral, a neurotransmissão dopaminérgica no CI seja mais importante para a expressão do medo incondicionado do que do medo condicionado, e que os receptores envolvidos sejam os do tipo D_2 .

2. OBJETIVOS

.....

O objetivo do presente estudo foi avaliar se e como a modulação dopaminérgica no CI está envolvida na expressão de respostas incondicionadas e condicionadas de medo. Para tanto, a neurotransmissão dopaminérgica no CI foi manipulada farmacologicamente, com o uso de agonistas e antagonistas de receptores da família D₁ e D₂, e os efeitos dessas manipulações sobre as respostas de ratos expostos aos testes do labirinto em cruz elevado e/ou do sobressalto potencializado pelo medo foram estudados. O teste do campo aberto foi usado para avaliar eventuais efeitos motores das drogas utilizadas nesse estudo. O trabalho foi dividido em duas etapas:

- Etapa 1: Envolvimento dos receptores dopaminérgicos da família D₂ do CI na expressão do medo incondicionado e condicionado.
 - *Experimento 1A*: Efeitos da administração intra-CI do agonista D₂ (quimpirole) e do antagonista D₂ (sulpirida) no teste do labirinto em cruz elevado;
 - *Experimento 1B*: Efeitos da administração intra-CI do agonista D₂ (quimpirole) e do antagonista D₂ (sulpirida) no teste do campo aberto;
 - *Experimento 1C*: Efeitos da administração intra-CI do antagonista D₂ (sulpirida) no teste do sobressalto potencializado pelo medo.
- Etapa 2: Envolvimento dos receptores dopaminérgicos da família D₁ do CI na expressão do medo incondicionado.
 - *Experimento 2A*: Efeitos da administração intra-CI do agonista D₁ (SKF 38393) e do antagonista D₁ (SCH 23390) no teste do labirinto em cruz elevado;
 - *Experimento 2B*: Efeitos da administração intra-CI do agonista D₁ (SKF 38393) e do antagonista D₁ (SCH 23390) no teste do campo aberto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 186 ratos *Wistar* machos, com peso entre 250 e 300 g, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo do *Campus* de Ribeirão Preto. Os animais foram alojados em grupos de quatro, em gaiolas de polipropileno ($40 \times 33 \times 26$ cm) forradas com maravalha, tendo livre acesso à água e alimento. Os animais foram mantidos em um biotério setorial com um programa de iluminação artificial com ciclo claro-escuro 12 h x 12 h, com o início do período claro às 7h00, e temperatura entre 23 e 25 °C. Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo. Os procedimentos desse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto (protocolo nº 12.1.909.53.3).

3.2. Cirurgia

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com a associação de cloridrato de cetamina (Agener, Brasil) na dose de 100 mg/kg e cloridrato de xilazina (Calier, Brasil) na dose de 7,5 mg/kg. Após tricotomia do campo cirúrgico, foram levados a um aparelho estereotático (David-Kopf, EUA) onde tiveram o crânio fixado pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Em seguida, foi realizada a limpeza do campo cirúrgico com iodo a 1% em solução alcoólica. Uma injeção de 0,2 mL de lidocaína 2% (Harvey, Brasil) foi aplicada sob a epiderme craniana. Após a incisão, o tecido subcutâneo foi removido, assim como o periósteo (por raspagem, com auxílio de pinça e algodão). Já com a superfície craniana exposta e ajustada em posição horizontal, entre *bregma* e *lambda* (barra dos incisivos ajustada a 3 mm abaixo da linha interaural), dois orifícios foram feitos nos ossos parietais com o uso de uma broca elétrica para a fixação de parafusos destinados a ancorar a prótese ao crânio do animal. Tomando-se o *lambda* como referência e seguindo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (2007), dois outros orifícios foram feitos para o implante de cânulas-guia (11 mm de comprimento e 0,6 mm de diâmetro externo). As cânulas foram direcionadas bilateralmente ao CI (ântero-posterior = -0,9 mm; médio-lateral = $\pm 1,5$ mm; dorso-ventral = -3,9 mm do *lambda*). Em seguida, o crânio foi revestido com acrílico dental (JET, Brasil) para a fixação das cânulas-guia e fios de aço inoxidável foram introduzidos nestas cânulas para evitar entupimentos. Ao término da cirurgia, cada animal recebeu, por via intramuscular, uma injeção de 0,2 mL de Pentabiótico (240.000 UI/ml; Fort Dodge, Brasil) e uma injeção de 0,2 mL do anti-inflamatório/analgésico Banamine (2,5 mg/kg; Schering-Plough, Brasil) por via subcutânea. Os animais, após serem retirados do

estereotático, foram recolocados em suas gaiolas para um período de cinco dias de recuperação pós-cirúrgica.

3.3. Drogas

As drogas utilizadas foram: (-)-quimpirrole cloridrato (QUI), um agonista de receptores dopaminérgicos da família D₂; e (S)-(-)-sulpirida (SUL), um antagonista de D₂; (±)-SKF-38393 cloridrato (SKF), um agonista de receptores dopaminérgicos da família D₁; R(+)-SCH-23390 hidrocloreto (SCH), um antagonista de D₁. QUI, SKF e SCH foram dissolvidos em salina fisiológica (0,9%) e microinjetados bilateralmente no CI nas doses de 0,5; 1,0; 2,0 e/ou 4,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção. SUL foi primeiramente misturada a Tween 80 – 2% e, em seguida, dissolvida em salina fisiológica (0,9%), sendo também microinjetada bilateralmente no CI nas doses de 1,0; 2,0 e 4,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção. Salina ou salina misturada a Tween (2%) foram utilizadas como controle. O tempo de espera entre a microinjeção e o início dos testes foi de quinze minutos para o LCE e o campo aberto e de cinco minutos para o teste do SPM. As doses e os tempos de espera foram baseados na literatura (EMMI; CRESCIMANNO; AMATO, 1995; NADER; LEDOUX, 1999; DE OLIVEIRA; REIMER; BRANDÃO, 2009), e em experimentos preliminares deste projeto.

3.4. Microinjeções

Durante o procedimento de microinjeção de drogas, os animais permaneceram livres em uma caixa de polipropileno forrada com maravalha, medindo 28 × 17 × 13 cm. Uma agulha dental, conectada a um tubo de polietileno (PE-10; Becton-Dickinson, EUA) e a uma microseringa *Hamilton* graduada de 5 µL, foi utilizada para a microinjeção das drogas. As drogas foram bilateralmente microinjetadas no CI em um volume constante de 0,2 µL durante 1 minuto de microinjeção, com o auxílio de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, EUA). O deslocamento de uma bolha de ar no tubo de polietileno foi utilizado para monitorar a microinjeção. Após o término da infusão, a agulha foi mantida por mais 1 minuto para evitar refluxo da droga pela cânula-guia.

3.5. Teste do Labirinto em Cruz Elevado

3.5.1. Equipamentos

O labirinto em cruz elevado (LCE, Fig. 3) segue as especificações de Pellow e colaboradores (1985) e consiste de dois braços abertos e opostos (50 × 10 cm cada um) e outros

dois braços opostos do mesmo tamanho, fechados com paredes laterais de 40 cm de altura. Os braços abertos e fechados cruzam-se perpendicularmente formando uma cruz, elevados a 50 cm do solo. Esse cruzamento delimita uma área central de 10×10 cm. Uma pequena borda de acrílico (1 cm de altura) foi fixada nas laterais dos braços abertos para evitar a queda dos animais. O LCE foi mantido em uma sala com ruído ambiente (50 dB) e 30 lux de iluminação. As sessões experimentais foram monitoradas e gravadas por meio de uma vídeo-câmera conectada a um aparelho de TV e a um gravador de DVD. O desempenho de cada animal foi analisado posteriormente com o auxílio de um programa computacional de análises comportamentais (OBSERVER, Noldus Inf. Co., Holanda).

Figura 3. Fotografia do labirinto em cruz elevado.

3.5.2. Procedimentos

Cada animal foi colocado individualmente na área central do LCE, com a cabeça direcionada para um dos braços fechados, podendo explorar livremente o equipamento por 5 minutos. Entre um animal e outro foi realizada a assepsia do LCE com algodão e álcool a 20%. Através do programa OBSERVER, foi mensurado o número de entradas e o tempo de permanência dos animais em cada um dos braços do LCE. O animal foi considerado “dentro” de um braço quando ele encontrava-se com as quatro patas no interior deste. A porcentagem de tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos foi calculada utilizando-se o tempo em que os animais permaneceram nesses braços em relação ao tempo total do teste.

Além das categorias comportamentais tradicionais descritas acima analisamos também a frequência e/ou duração das seguintes categorias comportamentais complementares

(ANSELONI; BRANDÃO, 1997; COLE; RODGERS, 1993): autolimpeza (higiene, com as patas dianteiras, da cabeça e/ou do corpo); levantamento (resposta de erguer-se sobre as duas patas traseiras, mantendo as duas patas dianteiras elevadas, com ou sem apoio da parede do labirinto); farejamento (exploração olfatória do ambiente); exploração da extremidade aberta (postura exploratória da extremidade do braço aberto do labirinto); mergulho da cabeça (movimento exploratório de cabeça/ombros nas laterais ou extremidades do labirinto, em direção ao “precipício”); espreitamento (alongamento da cabeça/ombros dos braços fechados para a plataforma central); esticamento (postura exploratória na qual o animal se estica e em seguida retoma a posição original, sem se locomover para frente) e rastejamento (locomoção caracterizada pelo esticamento do animal seguido de um avanço cauteloso).

3.5.3. Delineamento Experimental

Antes do início dos experimentos, os ratos permaneceram no biotério setorial para habituação por pelo menos dois dias. Logo após, os animais passaram por uma cirurgia estereotáxica, na qual foram introduzidas duas cânulas-guia bilateralmente no CI. Os animais foram retirados do estereotáxico e recolocados em suas gaiolas para um período de cinco dias de recuperação pós-cirúrgica. Após esse período, foi feita a microinjeção das drogas dopaminérgicas no CI quinze minutos antes do início do teste do LCE. Este teste foi gravado por 5 min por uma vídeo-câmera e analisado posteriormente (Fig. 4). A análise compreendeu as categorias comportamentais tradicionais e complementares.

Figura 4. Esquema representativo do delineamento dos experimentos envolvendo o teste do labirinto em cruz elevado (LCE). CI = colículo inferior. * Teste do campo aberto.

3.6. Teste do Campo Aberto

3.6.1. Equipamentos

O campo aberto consiste em uma arena circular de acrílico transparente (60 cm de diâmetro e 50 cm de altura), colocada sobre um assoalho dividido em 12 quadrantes (Fig. 5). O

campo aberto foi mantido em uma sala com ruído ambiente (50 dB) e 30 lux de iluminação. As sessões experimentais foram monitoradas e gravadas por meio de uma vídeo-câmera, conectada a um aparelho de TV e a um gravador de DVD, e analisadas posteriormente.

Figura 5. Fotografia da arena na qual foi realizado o teste do campo aberto.

3.6.2. Procedimentos

Cada animal foi colocado individualmente na área central do campo aberto e foi avaliado durante 30 min. Entre um animal e outro foi realizada a assepsia do campo aberto com algodão e álcool a 20%. Este teste visou avaliar o desempenho motor dos animais ao longo do tempo. Para tanto, o registro comportamental foi dividido em três blocos de 10 min, e consistiu das medidas de cruzamentos (resposta de cruzar com as quatro patas um dos quadrantes do assoalho da arena), levantamentos (resposta de erguer-se sobre as duas patas traseiras, mantendo as duas patas dianteiras elevadas, com ou sem apoio na parede da arena), autolimpeza (higiene, com as patas dianteiras, da cabeça e/ou do corpo) e imobilidade (tempo em que o animal permanece parado).

3.6.3. Delineamento Experimental

Os mesmos animais anteriormente submetidos ao LCE foram também avaliados no teste do campo aberto. Os grupos no teste do campo aberto foram balanceados de acordo com o histórico de infusão (ou seja, o mesmo número de ratos de cada grupo de infusão no LCE foi alocado em cada grupo do teste do campo aberto). Foi feita a microinjeção das drogas

dopaminérgicas no CI quinze minutos antes do início do teste do campo aberto (Fig. 6). Este teste foi gravado por 30 min por uma vídeo-câmera e analisado posteriormente.

Figura 6. Esquema representativo do delineamento dos experimentos utilizando o teste do campo aberto. CI = colículo inferior. * Teste do LCE.

3.7. Teste do Sobressalto Potencializado pelo Medo

3.7.1. Equipamentos

Caixas de condicionamento: Para o procedimento de condicionamento foram utilizadas duas caixas idênticas ($20 \times 20 \times 25$ cm, Fig. 7A). A parede do fundo, assim como as duas paredes laterais, eram de alumínio, e o teto e a portinhola, de acrílico transparente. O assoalho das caixas era constituído por barras de metal de 5 mm de diâmetro, distando 1,5 cm entre si. Estas caixas encontravam-se encerradas em duas câmaras de atenuação acústica ($45 \times 45 \times 45$ cm) feitas de compensado de madeira e revestidas por Eucatex. Os choques elétricos, de intensidade de 0,6 mA e duração de 1 s, foram administrados por meio de um gerador de choques (Albarsh Instruments, Brasil). Uma lâmpada vermelha de 6 W e uma câmera de vídeo (Everfocus, EUA), instaladas no interior de cada câmara de isolamento acústico, permitiram a observação do animal durante o condicionamento. Uma luz proveniente de uma lâmpada branca de 6 W, localizada no teto da caixa, serviu como estímulo condicionado (CS).

Caixas de sobressalto: Para as sessões de balanceamento e teste foram utilizadas duas caixas experimentais idênticas, medindo internamente $16,5 \times 7,5 \times 7,5$ cm, construídas em aço inoxidável e suspensas em uma armação de PVC (Fig. 7B). Estas caixas encontram-se abrigadas em duas câmaras de atenuação sonora ($64 \times 60 \times 40$ cm), fabricadas em madeira e com um revestimento acústico de espuma (Med Associates, EUA). A resposta de sobressalto foi registrada por meio de uma plataforma sensível à pressão (estabilímetro, PHM250-60, Med Associates, EUA). O sobressalto do animal gerou movimentos nesta plataforma que foram captados por sensores como deslocamento de corrente e então amplificados, gerando um sinal

analógico que foi digitalizado e analisado por um programa computacional (Startle Reflex, versão 4.10, Med Associates). A apresentação dos estímulos, o tipo, a duração, a intensidade e a amplitude dos mesmos também foram computadorizados por meio de uma interface (Dig 729, Med Associates). A resposta de sobressalto foi medida durante os primeiros 100 ms após a apresentação do estímulo sonoro, que consistiu em um ruído branco de intensidade de 100 dB e duração de 50 ms, com *rise-decay* de 5 ms, sendo liberado por um alto-falante localizado a 10 cm de distância da caixa contendo o animal. O ruído de fundo foi apresentado pelo mesmo alto-falante e consistiu em um ruído branco de 55 dB. Uma lâmpada vermelha de 6 W e uma câmera de vídeo permitiram a observação do animal durante as sessões de balanceamento e de teste. Uma lâmpada branca de 6 W, localizada no teto de cada caixa, serviu como estímulo condicionado. As plataformas foram calibradas no início de cada sessão para garantir igual nível de sensibilidade ao longo dos experimentos.

Figura 7. Fotografia da caixa de condicionamento [A] e da caixa de sobressalto [B] nas quais foram realizados os procedimentos para o teste do sobressalto potencializado pelo medo.

3.7.2. Procedimentos

Sessões de balanceamento: Foram realizadas duas sessões de balanceamento. Os animais foram colocados na caixa de sobressalto acústico e, 5 minutos após, receberam 30 estímulos sonoros de intensidade de 100 dB com um intervalo fixo de 30 s entre cada estímulo. A amplitude média do sobressalto ao longo das 30 tentativas de estímulos sonoros da última sessão de balanceamento foi utilizada para alocar homogeneamente os animais aos diversos grupos dos experimentos.

Sessão de condicionamento: Os animais foram colocados na caixa de condicionamento e, após 5 minutos de habituação, foram submetidos a 10 associações de luz (CS) e choque nas patas (US). Cada tentativa consistiu em 4 segundos de luz e o choque foi apresentado no último segundo de cada apresentação do CS. O choque de intensidade de 0,6 mA, teve duração de 1 s e o intervalo entre os pareamentos foi variável em 2 minutos (faixa de 1-3 minutos). Os choques e os estímulos condicionados foram liberados através de uma interface controlada por um *software* instalado em um computador em uma sala adjacente.

Sessão teste: No dia seguinte à sessão de condicionamento, os animais foram avaliados no teste do sobressalto potencializado pelo medo (SPM). Cada animal foi então colocado na caixa experimental sobre a plataforma e, após 5 minutos de habituação, recebeu um total de 60 estímulos sonoros na intensidade de 100 dB, sendo que 30 apresentações consistiram apenas no estímulo sonoro (tentativas só-som) e foram intercaladas aleatoriamente com 30 apresentações de som precedido por luz (tentativas luz-som). As amplitudes das respostas de sobressalto de cada animal foram registradas e armazenadas no disco rígido do computador e, posteriormente, transferidas para planilhas do Excel para análise dos dados. A resposta de congelamento foi registrada por câmeras de vídeo e analisada posteriormente. O congelamento foi operacionalmente definido neste trabalho como a ausência total de movimentos do corpo e das vibrissas por um período mínimo de 6 segundos.

3.7.3. Delineamento Experimental

Os ratos permaneceram no biotério setorial para habituação por cerca de dois dias. Em seguida, ocorreram as duas sessões de balanceamento (SB1 e SB2, com um intervalo de 24 h entre elas), nas quais o animal foi exposto a 30 estímulos sonoros após um período de 5 minutos de habituação. Foi analisada a amplitude média do sobressalto ao longo das 30 tentativas de estímulos sonoros da SB2 para alocar homogeneamente os animais aos grupos dos experimentos. Os animais passaram então pela cirurgia e recuperação pós-cirúrgica. Após este período, os animais foram colocados em outra caixa para a sessão de condicionamento (SC), onde foram submetidos a 10 associações de luz (estímulo condicionado) e choque nas patas (estímulo incondicionado). No dia seguinte, os animais receberam microinjeção de sulpirida no CI e, cinco minutos depois teve início à sessão teste do SPM. Nesta, foram apresentados 60 estímulos sonoros, sendo que 30 apresentações consistiram apenas no estímulo sonoro (tentativas só-som) e foram intercaladas aleatoriamente com 30 apresentações de som precedido por luz (tentativas luz-som) (Fig. 8). Neste teste, foram analisadas as amplitudes das respostas de sobressalto, bem como o tempo de congelamento dos animais.

Figura 8. Esquema representativo do delineamento dos experimentos com o teste do sobressalto potencializado pelo medo (SPM). SB1 = sessão de balanceamento 1; SB2 = sessão de balanceamento 2; CI = colículo inferior; SC = sessão de condicionamento.

3.8. Histologia

Ao fim dos experimentos, os animais foram anestesiados com 3 g/kg de uretana. A seguir, o corante Azul de Evans (2%) foi microinjetado no CI no mesmo volume das drogas que foram utilizadas. Os animais foram perfundidos por via intracardíaca com salina 0,9%, seguida de formalina 4%, para fixação do tecido encefálico. Os encéfalos foram removidos, mantidos na solução de formalina por 3 horas e, posteriormente, transferidos para uma solução de sacarose 30%, onde permaneceram por 48 h. Os encéfalos seguiram para um criostato onde foram congelados e cortados em secções de 60 μ m. Os cortes foram colocados em lâminas previamente gelatinizadas e, depois de secos, foram corados com violeta de cresila (5%, Sigma) segundo o protocolo de *Nissl*, para que os sítios das microinjeções pudessem ser verificados, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007).

3.9. Análise Estatística

Os dados são apresentados como média + EPM, sendo analisados pelo programa computacional SigmaStat 3.11 (Systat Software Inc, EUA). Para análise dos dados do teste do LCE, bem como dos dados do campo aberto, foram utilizadas análises de variância (ANOVAs) de uma via. Para análise dos dados do teste do SPM foi utilizada uma ANOVA de duas vias com medidas repetidas, com tratamentos (droga e salina) e condições (só-som e luz-som) como fatores. Após as análises de variância seguiu-se, no caso de significância estatística, o teste de *Newman-Keuls*. Para análise dos dados de congelamento foi utilizado o teste *t de Student*. Um valor de *p* inferior a 0,05 foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

Apenas os animais cujo exame histológico mostrou que as cânulas-guia para microinjeção de drogas foram localizadas bilateralmente dentro do CI foram utilizados no presente estudo. A figura 9 apresenta uma fotomicrografia representativa da localização dos sítios de microinjeção dentro do CI. Além disso, é ilustrada a disposição desses sítios no CI em diferentes secções transversais do encéfalo de ratos segundo o atlas de Paxinos e Watson (2007).

Figura 9. Fotomicrografia representativa mostrando a localização dos sítios de microinjeção bilaterais dentro do colículo inferior (CI) [A]. Representação da disposição desses sítios no CI nas diferentes secções transversais do encéfalo de ratos segundo o atlas de Paxinos e Watson (2007) [B]. Aq, aqueduto; cic, comissura colículo inferior; SCP, substância cinzenta periaquedutal; NDR, núcleo dorsal da rafe. O número de pontos é menor do que o número de animais utilizados devido a várias sobreposições.

4.1. Receptores D₂ do CI na expressão do medo incondicionado e condicionado

4.1.1. Teste do labirinto em cruz elevado

A figura 10 apresenta os resultados referentes às medidas tradicionais do teste do LCE para animais que receberam administração bilateral intra-CI de salina (controle) ou quimpirole nas doses de 0,5; 1,0 ou 2,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção. O número de animais por grupo foi igual a 7 para qui0,5; 8 para controle e qui2,0; e 10 para qui1,0. A figura 10A apresenta a média do número de entradas nos braços fechados para os tratamentos. A ANOVA de uma via revelou efeito significativo do tratamento sobre o número de entradas nos braços fechados [$F(3,29) = 4,03$, $p < 0,05$]. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a administração intra-CI de quimpirole nas doses 1,0 e 2,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção foi eficaz em diminuir a entrada nos braços fechados quando comparada ao grupo controle ($p < 0,05$). A figura 10B apresenta a média do número de entradas nos braços abertos entre os tratamentos. Já a figura 10C apresenta a média em porcentagem do tempo de permanência dos animais nos braços abertos em relação ao tempo total do teste. A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo do tratamento em relação ao número de entradas [$F(3,29) = 2,14$, $p > 0,05$] ou à porcentagem de tempo despendido nos braços abertos [$F(3,29) = 0,78$, $p > 0,05$].

Figura 10. Efeitos da microinjeção bilateral intra-CI de salina ou quimpirole (nas doses de 0,5; 1,0 ou 2,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção) durante os 5 min do teste do LCE. As medidas tradicionais: número de entrada nos braços fechados [A] e abertos [B] e a porcentagem do tempo de permanência dos animais nos braços abertos em relação ao tempo total [C] estão representadas. * Significância estatística em relação ao grupo controle (salina; $p < 0,05$, teste de *Newman-Keuls*). Média + EPM. $n = 7$ para qui0,5; 8 para controle e qui2,0; e 10 para qui1,0.

A figura 11 apresenta os resultados referentes às medidas complementares do teste do LCE para os mesmos animais. A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo do tratamento em relação à autolimpeza [$F(3,29) = 0,88$, $p > 0,05$]; farejamento [$F(3,29) = 1,81$, $p > 0,05$]; mergulho da cabeça [$F(3,29) = 2,60$, $p > 0,05$]; esticamento [$F(3,29) = 0,26$, $p > 0,05$]; rastejamento [$F(3,29) = 2,33$, $p > 0,05$]; exploração das extremidades abertas [$F(3,29) = 2,18$, $p > 0,05$] e espreitamento [$F(3,29) = 1,46$, $p > 0,05$]. A ANOVA de uma via revelou efeito significativo do tratamento em relação ao número de levantamentos [$F(3,29) = 4,90$, $p < 0,05$]. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a administração intra-CI de quimpirole nas doses de 1,0 e 2,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção foi eficaz em diminuir o número de levantamentos dos animais quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 11. Efeitos da injeção bilateral intra-CI de salina ou quimpirole (nas doses de 0,5; 1,0 ou 2,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção) durante os 5 min do teste do LCE. As medidas complementares: autolimpeza [A], farejamento [B], mergulho da cabeça [C], esticamento [D], rastejamento [E], levantamento [F], exploração das extremidades abertas [G] e espreitamento [H] estão representadas. * Significância estatística em relação ao controle (salina; $p < 0,05$, teste de *Newman-Keuls*). Média + EPM. $n = 7$ para qui0,5; 8 para controle e qui2,0; e 10 para qui1,0.

A figura 12 apresenta os resultados referentes às medidas tradicionais do teste do LCE para os animais que receberam administração bilateral intra-CI de salina+tween (2%) (controle) ou sulpirida nas doses de 1,0; 2,0 ou 4,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção. O número de animais por grupo foi igual a 9 para sul2,0 e sul4,0; 10 para sul1,0 e 11 para controle. A figura 12A apresenta a média do número de entradas nos braços fechados para os tratamentos. A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo dos tratamentos sobre o número de entradas nos braços fechados [$F(3,35) = 1,18$, $p > 0,05$]. A figura 12B apresenta a média do número de entradas nos braços abertos para os tratamentos. Já a figura 12C apresenta a média em porcentagem do tempo de permanência dos animais nos braços abertos em relação ao tempo total. A ANOVA de uma via revelou efeito significativo do tratamento em relação ao número de entradas [$F(3,35) = 4,35$, $p < 0,05$] e à porcentagem de tempo despendido nos braços abertos [$F(3,35) = 3,69$, $p < 0,05$]. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a administração intra-CI de sulpirida nas doses de 2,0 e 4,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção foi eficaz em diminuir tanto o número de entradas como a porcentagem de permanência nos braços abertos quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 12. Efeitos da injeção bilateral intra-CI de salina + tween (2%) ou sulpirida (nas doses de 1,0; 2,0 ou 4,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção) durante os 5 min do teste do LCE. As medidas tradicionais: número de entrada nos braços fechados [A] e abertos [B], e a porcentagem do tempo de permanência dos animais nos braços abertos em relação ao tempo total [C] estão representadas. * Significância estatística em relação ao controle (salina + tween 2%; $p < 0,05$, teste de *Newman-Keuls*). Média + EPM. $n = 9$ para sul2,0 e sul4,0; 10 para sul1,0 e 11 para controle.

A figura 13 apresenta os resultados referentes às medidas complementares do teste do LCE para os mesmos animais. A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo do tratamento em relação ao farejamento [$F(3,35) = 0,36$, $p > 0,05$]; mergulho da cabeça [$F(3,35) = 2,21$, $p > 0,05$]; esticamento [$F(3,35) = 1,64$, $p > 0,05$]; rastejamento [$F(3,35) = 2,09$, $p > 0,05$] ou levantamento [$F(3,35) = 1,10$, $p > 0,05$]. A ANOVA de uma via, porém, revelou efeito significativo do tratamento em relação à autolimpeza [$F(3,35) = 5,15$, $p < 0,05$]; exploração das extremidades abertas [$F(3,35) = 2,82$, $p < 0,05$] e espreitamento [$F(3,35) = 2,97$, $p < 0,05$]. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a administração intra-CI de sulpirida na dose de $4,0 \mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção foi eficaz em aumentar a autolimpeza quando comparado ao grupo controle e aos grupos tratados que receberam as doses de 1,0 e de 2,0 ($p < 0,05$). A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* também revelou que a administração intra-CI de sulpirida na dose de 2,0 e $4,0 \mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção foi eficaz em diminuir a exploração das extremidades abertas quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 13. Efeitos da injeção bilateral intra-CI de salina + tween (2%) ou sulpirida (nas doses de 1,0; 2,0 ou 4,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção) durante os 5 min do teste do LCE. As medidas complementares: a quantidade de autolimpeza [A], farejamento [B], mergulho da cabeça [C], esticamento [D], rastejamento [E], levantamento [F], exploração das extremidades abertas [G] e espreitamento [H] estão representadas. * Significância estatística em relação ao controle (salina + tween 2%; $p < 0,05$, teste de *Newman-Keuls*). Média + EPM. $n = 9$ para sul2,0 e sul4,0; 10 para sul1,0 e 11 para controle.

4.1.2. Teste do campo aberto

As figuras 14 e 15 apresentam os resultados referentes aos primeiros 10 minutos de teste do campo aberto, servindo como controle dos efeitos das drogas para o teste do LCE. Na figura 14, os animais receberam administração bilateral intra-CI de salina ou quimpirole nas doses de 0,5; 1,0 ou 2,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção. O número de animais por grupo foi igual a 12 para o controle; 9 para qui0,5 e qui2,0; 8 para qui1,0. A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo do tratamento em relação aos cruzamentos [$F(3,34) = 0,80, p > 0,05$]; levantamentos [$F(3,34) = 0,75, p > 0,05$]; autolimpeza [$F(3,34) = 1,38, p > 0,05$] e imobilidade [$F(3,34) = 2,66, p > 0,05$].

Na figura 15, os animais receberam administração bilateral intra-CI de salina+tween (2%) ou sulpirida nas doses de 1,0; 2,0 ou 4,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção. O número de animais por grupo foi igual a 18 para o controle; 11 para sul1,0 e 10 para sul2,0 e sul4,0. A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo do tratamento em relação aos cruzamentos [$F(3,46) = 2,40, p > 0,05$]; levantamentos [$F(3,46) = 0,17, p > 0,05$] e autolimpeza [$F(3,46) = 0,13, p > 0,05$]. No entanto, a ANOVA de uma via revelou efeito significativo do tratamento em relação à imobilidade [$F(3,46) = 6,36, p < 0,05$]. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a administração intra-CI de sulpirida na dose de 2,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção foi eficaz em aumentar a imobilidade quando comparado ao grupo controle e aos grupos tratados com a dose de 1,0 e 4,0 ($p < 0,05$).

Figura 14. Efeitos da injeção bilateral intra-CI de salina ou quimpirole (nas doses de 0,5; 1,0 ou 2,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção) durante os primeiros 10 min de teste do campo aberto. A média do número de cruzamentos [A], levantamentos [B] e autolimpeza [C], bem como o tempo de imobilidade [D] estão representados. $n = 8$ para qui1,0; 9 para qui0,5 e qui2,0; e 12 para controle.

Figura 15. Efeitos da injeção bilateral intra-CI de salina + tween (2%) ou sulpirida (nas doses de 1,0; 2,0 ou 4,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção) durante os primeiros 10 min de teste do campo aberto. A média do número de cruzamentos [A], levantamentos [B] e autolimpeza [C], bem como o tempo de imobilidade [D] estão representados. * Significância estatística em relação ao controle (salina + tween 2%; $p < 0,05$, teste de *Newman-Keuls*). Média + EPM. $n = 10$ para sul2,0 e sul4,0; 11 para sul1,0 e 18 para controle.

As figuras 16 e 17 apresentam os resultados referentes aos 30 minutos de teste do campo aberto para os mesmos animais, servindo como controle para eventuais efeitos motores causados pelas drogas no teste do SPM. Na figura 16, os animais receberam administração bilateral intra-CI de salina ou quimpirole nas doses de 0,5; 1,0 ou 2,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção. A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo do tratamento em relação aos cruzamentos [$F(3,34) = 2,46, p > 0,05$]; levantamentos [$F(3,34) = 1,40, p > 0,05$] e autolimpeza [$F(3,34) = 1,07, p > 0,05$]. No entanto, a ANOVA de uma via revelou efeito significativo do tratamento em relação à imobilidade [$F(3,34) = 4,74, p < 0,05$]. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a administração intra-CI de quimpirole na dose de 2,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção foi eficaz em aumentar a imobilidade quando comparada ao grupo controle ($p < 0,05$).

Na figura 17, os animais receberam administração bilateral intra-CI de salina+tween (2%) ou sulpirida nas doses de 1,0, 2,0 ou 4,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção. A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo do tratamento em relação aos cruzamentos [$F(3,46) = 2,06, p > 0,05$]; levantamentos [$F(3,46) = 0,53, p > 0,05$], autolimpeza [$F(3,46) = 0,13, p > 0,05$] e imobilidade [$F(3,46) = 2,50, p > 0,05$].

Figura 16. Efeitos da injeção bilateral intra-CI de salina ou quimpirole (nas doses de 0,5; 1,0 ou 2,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção) durante os 30 min de teste do campo aberto. A média do número de cruzamentos [A], levantamentos [B] e autolimpeza [C], bem como o tempo de imobilidade [D] estão representados. * Significância estatística em relação ao controle (salina; $p < 0,05$, teste de *Newman-Keuls*). Média + EPM. $n = 8$ para qui1,0; 9 para qui0,5 e qui2,0; e 12 para controle.

Figura 17. Efeitos da injeção bilateral intra-CI de salina + tween (2%) ou sulpirida (nas doses de 1,0; 2,0 ou 4,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção) durante os 30 min de teste do campo aberto. A média do número de cruzamentos [A], levantamentos [B] e autolimpeza [C], bem como o tempo de imobilidade [D] estão representados. Média + EPM. $n = 10$ para sul2,0 e sul4,0; 11 para sul1,0 e 18 para controle.

4.1.3. Teste do sobressalto potencializado pelo medo

A figura 18 apresenta os resultados referentes às medidas do teste do SPM para os animais que receberam administração bilateral intra-CI de salina + tween (2%) (controle) ou sulpirida na dose de 4,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção. O número de animais por grupo foi igual a 12 para controle; e 11 para sul4,0. A figura 18A apresenta a média da amplitude de sobressalto durante a apresentação apenas do estímulo sonoro (só-som) e durante a apresentação pareada do estímulo visual e sonoro (luz-som) dos mesmos animais. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo para o fator condição [$F(1,45) = 14,27$, $p < 0,05$], mas não para o fator tratamento [$F(1,21) = 2,02$, $p > 0,05$] ou para interação entre os dois fatores (tratamento x condição) [$F(1,45) = 1,51$, $p > 0,05$]. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a luz foi eficaz em potencializar a resposta de sobressalto quando comparado à condição só-som ($p < 0,05$). A figura 18B apresenta a média do tempo de congelamento dos mesmos animais. O teste-*t de Student* não revelou diferenças no congelamento para os animais que receberam salina + tween (2%) ou sulpirida na dose de 4,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção, [$t(21) = 0,31$, $p > 0,05$].

A Sobressalto Potencializado pelo Medo **B****Congelamento**

Figura 18. Efeitos da injeção bilateral intra-CI de salina + tween (2%) ou sulpirida na dose 4,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção no teste do SPM. A média da amplitude de sobressalto na condição só-som e na condição luz-som [A], e a média do tempo de congelamento dos animais [B] estão representados. # Significância estatística em relação à condição só-som ($p < 0,05$, teste de *Newman-Keuls*). Média + EPM. $n = 12$ para controle e 11 para sul4,0.

4.2. Receptores D₁ do CI na expressão do medo incondicionado

4.2.1. Teste do labirinto em cruz elevado

A figura 19 apresenta os resultados referentes às medidas tradicionais do teste do LCE para os animais que receberam administração bilateral intra-CI de salina (controle) ou SKF nas doses de 1,0 ou 2,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção. O número de animais por grupo foi igual a 8 para skf2,0; 9 para skf1,0; 10 para o controle. A figura 19A e 19B apresentam as médias do número de entradas nos braços fechados e abertos para os tratamentos, respectivamente. Já a figura 19C apresenta a média em porcentagem do tempo de permanência dos animais nos braços abertos em relação ao tempo total do teste. A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo do tratamento sobre o número de entradas nos braços fechados [$F(2,24) = 3,07$, $p > 0,05$] ou nos braços abertos [$F(2,24) = 0,20$, $p > 0,05$], ou sobre a porcentagem de tempo despendido nos braços abertos [$F(2,24) = 0,06$, $p > 0,05$].

Figura 19. Efeitos da injeção bilateral intra-CI de salina ou SKF (nas doses de 1,0 ou 2,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção) durante os 5 min do teste do LCE. As medidas tradicionais: número de entrada nos braços fechados [A] e abertos [B], e a porcentagem do tempo de permanência dos animais nos braços abertos em relação ao tempo total [C] estão representadas. Média + EPM. $n = 10$ para controle; 9 para skf1,0; e 8 para skf2,0.

A figura 20 apresenta os resultados referentes às medidas complementares do teste do LCE para os mesmos animais. Os animais receberam administração bilateral intra-CI de salina ou SKF nas doses de 1,0 ou 2,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção. A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo do tratamento em relação a nenhuma das medidas avaliadas: autolimpeza [$F(2,24) = 1,16, p > 0,05$]; farejamento [$F(2,24) = 0,41, p > 0,05$]; mergulho da cabeça [$F(2,24) = 0,70, p > 0,05$]; esticamento [$F(2,24) = 0,02, p > 0,05$]; rastejamento [$F(2,24) = 0,76, p > 0,05$]; levantamentos [$F(2,24) = 0,60, p > 0,05$]; exploração das extremidades abertas [$F(2,24) = 0,14, p > 0,05$] e espreitamento [$F(2,24) = 0,94, p > 0,05$].

Figura 20. Efeitos da injeção bilateral intra-CI de salina ou SKF (nas doses de 1,0 ou 2,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção) durante os 5 min do teste do LCE. As medidas complementares: autolimpeza [A], farejamento [B], mergulho da cabeça [C], esticamento [D], rastejamento [E], levantamento [F], exploração das extremidades abertas [G] e espreitamento [H] estão representadas. Média + EPM. $n = 10$ para controle; 9 para skf1,0; e 8 para skf2,0.

A figura 21 apresenta os resultados referentes às medidas tradicionais do teste do LCE para os animais que receberam administração bilateral intra-CI de salina ou SCH nas doses de 1,0; 2,0 ou 4,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção. O número de animais por grupo foi igual a 10 sch1,0 e sch4,0; 12 para sch2,0; e 17 para o controle. A figura 21A e 21B apresenta as médias do número de entradas nos braços fechados e abertos para os tratamentos, respectivamente. Já a figura 21C apresenta a média em porcentagem do tempo de permanência dos animais nos braços abertos em relação ao tempo total do teste. A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo do tratamento sobre o número de entradas nos braços fechados [$F(3,45) = 1,62$, $p > 0,05$] ou nos braços abertos [$F(3,45) = 0,95$, $p > 0,05$], ou sobre a porcentagem de tempo despendido nos braços abertos [$F(3,45) = 0,76$, $p > 0,05$].

Figura 21. Efeitos da injeção bilateral intra-CI de salina ou SCH (nas doses de 1,0; 2,0 ou 4,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção) durante os 5 min do teste do LCE. As medidas tradicionais: número de entrada nos braços fechados [A] e abertos [B], e a porcentagem do tempo de permanência dos animais nos braços abertos em relação ao tempo total [C] estão representadas. Média + EPM. $n = 17$ para controle; 12 para sch2,0; e 10 para sch1,0 e sch4,0.

A figura 22 apresenta os resultados referentes às medidas complementares do teste do LCE para os mesmos animais. Os animais receberam administração bilateral intra-CI de salina ou SCH nas doses de 1,0; 2,0 ou 4,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção. A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo do tratamento em relação à autolimpeza [$F(3,45) = 0,73$, $p > 0,05$]; farejamento [$F(3,45) = 0,57$, $p > 0,05$]; mergulho da cabeça [$F(3,45) = 2,30$, $p > 0,05$]; esticamento [$F(3,45) = 0,25$, $p > 0,05$]; levantamento [$F(3,45) = 1,50$, $p > 0,05$]; exploração das extremidades abertas [$F(3,45) = 0,14$, $p > 0,05$] e espreitamento [$F(3,45) = 0,15$, $p > 0,05$]. A ANOVA de uma via revelou efeito significativo do tratamento em relação ao número de rastejamento [$F(3,45) = 3,59$, $p < 0,05$]. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a administração intra-CI de SCH nas doses de 1,0 e 2,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção foi eficaz em diminuir o rastejamento dos animais quando comparado ao grupo sch4,0 ($p < 0,05$). No entanto, nenhuma diferença foi observada em relação ao grupo controle ($p > 0,05$).

Figura 22. Efeitos da injeção bilateral intra-CI de salina ou SCH (nas doses de 1,0; 2,0 ou 4,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção) durante os 5 min do teste do LCE. As medidas complementares: autolimpeza [A], farejamento [B], mergulho da cabeça [C], esticamento [D], rastejamento [E], levantamento [F], exploração das extremidades abertas [G] e espreitamento [H] estão representadas. Média + EPM. n = 17 para controle; 12 para sch2,0; e 10 para sch1,0 e sch4,0.

4.2.2. Teste do campo aberto

As figuras 23 e 24 apresentam os resultados referentes aos 10 minutos de teste do campo aberto, servindo como controle dos efeitos das drogas para o teste do LCE. Na figura 23, os animais receberam administração bilateral intra-CI de salina ou SKF nas doses de 1,0 ou 2,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção. O número de animais por grupo foi igual a 8 para skf1,0 e skf2,0; e 11 para controle. A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo do tratamento em relação aos cruzamentos [$F(2,24) = 2,93$, $p > 0,05$]; levantamentos [$F(2,24) = 0,49$, $p > 0,05$]; autolimpeza [$F(2,24) = 0,08$, $p > 0,05$] e imobilidade [$F(2,24) = 1,68$, $p > 0,05$].

Na figura 24, os animais receberam administração bilateral intra-CI de salina ou SCH nas doses de 1,0; 2,0 ou 4,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção. O número de animais por grupo foi igual a 9 para sch4,0; 10 para sch1,0; 14 para sch2,0; e 15 para o controle. A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo do tratamento em relação à autolimpeza [$F(3,44) = 0,97$, $p > 0,05$]. No entanto, a ANOVA de uma via revelou efeito significativo do tratamento em relação aos cruzamentos [$F(3,44) = 3,91$, $p < 0,05$]; levantamentos [$F(3,44) = 2,89$, $p < 0,05$] e imobilidade [$F(3,44) = 3,38$, $p < 0,05$]. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a administração intra-CI de SCH na dose de 4,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção foi eficaz em diminuir o cruzamento e levantamento em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Além disso, essa dose foi capaz de aumentar a imobilidade quando comparado com o grupo ($p < 0,05$).

Figura 23. Efeitos da injeção bilateral intra-CI de salina ou SKF (nas doses de 1,0 ou 2,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção) durante os 10 min de teste do campo aberto. A média do número de cruzamentos [A], levantamentos [B] e autolimpeza [C], bem como o tempo de imobilidade [D] estão representados. $n = 8$ para skf1,0 e skf2,0; e 11 para controle.

Figura 24. Efeitos da injeção bilateral intra-CI de salina ou SCH (nas doses de 1,0; 2,0 ou 4,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção) durante os 10 min de teste do campo aberto. A média do número de cruzamentos [A], levantamentos [B] e autolimpeza [C], bem como o tempo de imobilidade [D] estão representados. * Significância estatística em relação ao controle (salina; $p < 0,05$, teste de *Newman-Keuls*). Média + EPM. $n = 9$ para sch4,0; 10 para sch1,0; 14 para sch2,0; e 15 para controle.

5. DISCUSSÃO

.....

Alterações na neurotransmissão dopaminérgica ocorrem após a exposição a uma grande variedade de estressores agudos, indicando uma associação entre essas alterações e desafios ameaçadores (ANISMAN et al., 1991; GOLDSTEIN et al., 1996). Dessa forma, avaliar o efeito da modulação dopaminérgica em uma estrutura envolvida no processamento de respostas defensivas, como o CI, torna-se importante para um melhor entendimento dos circuitos e mecanismos subjacentes à expressão de respostas defensivas e, conseqüentemente, das doenças associadas ao medo. A manipulação da neurotransmissão dopaminérgica foi feita no presente estudo por meio da microinjeção bilateral intra-CI de agonistas e antagonistas de receptores da família D₁ e D₂. Em seguida, os animais foram expostos aos testes do LCE, do SPM e/ou do campo aberto.

Os dados apresentados no presente estudo referem-se aos animais cujo exame histológico mostrou que as cânulas-guia para a microinjeção de drogas atingiram bilateralmente o CI. Uma distinção entre o efeito das drogas no núcleo central e no córtex externo do CI, ou com relação aos seus aspectos dorso/ventrais, não foi possível no presente estudo devido à ampla distribuição dos sítios de microinjeção por todo o CI. Além disso, devido à escolha da administração bilateral das drogas e, conseqüentemente, ao fato de que a localização das cânulas nem sempre foi equivalente nos hemisférios direito e esquerdo, tal análise foi impossibilitada. Desta forma, a discussão dos presentes resultados é feita considerando o CI como um todo.

5.1. Receptores D₂

Este estudo começou a ser desenvolvido avaliando-se a participação dos receptores dopaminérgicos da família D₂ devido à maior quantidade desses receptores no CI em relação aos receptores da família D₁ (HURD; SUZUKI; SEDVALL, 2001). Os resultados encontrados na avaliação do teste do LCE indicam que ratos tratados intra-CI com quimpirole nas doses de 1,0 e 2,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção apresentam uma diminuição no número de entradas nos braços fechados do aparato. Além disso, foi observada uma diminuição no número de levantamentos dos animais no mesmo teste. Com base nesses dados podemos sugerir um efeito no desempenho motor dos animais, o que poderia influenciar a avaliação da expressão das respostas defensivas no teste do LCE. Além disso, foi possível observar uma tendência de diminuição no número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos do LCE dos animais tratados com quimpirole, assim como no número de mergulhos da cabeça e exploração das extremidades abertas destes animais. Tal diminuição não foi, entretanto, estatisticamente significativa e, caso essa tendência viesse a ser confirmada, a interpretação do resultado como

pró-aversivo ficaria comprometida pelo efeito observado nos braços fechados. De fato, como observado em nosso estudo, Rodgers e colaboradores (1994) observaram que a administração intraperitoneal de quimpirole em camundongos não causou efeito sobre as respostas defensivas desses animais no LCE, porém comprometeu o desempenho motor no teste do LCE, devido à diminuição dos mesmos comportamentos, entradas nos braços fechados e número de levantamentos. Outros estudos que também avaliaram respostas incondicionadas e a injeção de agonista dopaminérgico, nesse caso com a administração de apomorfina (um agonista inespecífico), observaram um efeito anti-aversivo da droga (GARCIA et al., 2005; REIS et al., 2004). No entanto, por ser um agonista inespecífico, a apomorfina pode interagir tanto com os receptores dopaminérgicos D₁ quanto D₂. Além disso, dependendo da dose administrada, pode ser observada interação com sítios pré ou pós-sinápticos em vias dopaminérgicas distintas (SKIRBOLL; GRACE; BUNNEY, 1979; CLARKE; JAKUBOVIC; FIBIGER, 1988; FELDON; SHOFEL; WEINER, 1991).

Curiosamente, entretanto, quando o desempenho motor foi avaliado no teste do campo aberto, não encontramos quaisquer diferenças entre os grupos durante os dez primeiros minutos do teste. Esse tempo foi selecionado visando uma avaliação e caracterização mais estreita do comportamento motor considerando o tempo de exposição dos animais ao teste do LCE (cinco minutos). Uma tendência de aumento no tempo de imobilidade aparece para o grupo tratado com 2,0 µg de quimpirole. Tal tendência torna-se uma diferença significativa em relação ao controle apenas quando consideramos os trinta minutos totais do teste do campo aberto. Nenhuma diferença foi observada para o número de cruzamentos e levantamentos, independente do período do teste analisado, seja ele dez ou trinta minutos. Uma dose maior de quimpirole (4,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção) foi também administrada intra-CI visando-se encontrar alterações motoras mais consistentes. Porém efeitos similares referentes às doses de 1,0 e 2,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção foram observados (dados não apresentados).

No LCE, o repertório comportamental global expresso por ratos pode ser resultado de um conflito relacionado à dicotomia aproximação/evitação (MONTGOMERY, 1955; MCNAUGHTON; CORR, 2004; SALUM; ROQUE DA SILVA; MORATO, 2003). Afinal, a natureza da ameaça, se imediata ou potencial, determina a natureza da resposta: emissão ou supressão de uma ação (HANDLEY; MCBLANE, 1993). Sendo assim, a ativação do componente aversivo pelos sinais detectados a distância guiam o organismo para longe da ameaça presente nos braços abertos do teste (DEAKIN; GRAEFF, 1991). Por outro lado, há também a possibilidade da ativação do componente aproximação do sistema no qual o aumento

de entrada nos braços abertos poderia ser uma estratégia para conseguir informações de localização, identificação e confirmação da presença do perigo. Considerando esse conflito presente no teste do LCE e que cada teste, o labirinto e o campo aberto, estão associados a um tipo diferente de ameaça, podemos justificar a divergência de efeitos encontrados sobre o desempenho motor dos ratos neste estudo.

O fato de observarmos um efeito motor do quimpirole intra-CI possibilita o questionamento do envolvimento desses receptores do CI no desempenho motor. O CI é uma estrutura sensório-motora, distinguindo-se de outras estruturas do sistema auditivo no tronco encefálico por suas conexões com vias motoras (CASSEDAY; COVEY, 1996). Estudos indicam que o CI recebe projeções motoras do globo pálido (MORIIZUMI; HATTORI, 1991) e da substância negra *pars reticulata* (OLAZÁBAL; MOORE, 1989; CASTELLAN-BALDAN et al., 2006). Essa última estrutura é uma das principais fontes de dopamina no encéfalo, mandando projeções para o estriado e composito, portanto, a mais importante via motora dopaminérgica (CIVELLI; BUNZOW; GRANDY, 1993). Adicionalmente, lesões na substância negra *pars reticulata* aumenta a resposta defensiva induzida pela estimulação química ou elétrica do CI (COIMBRA; BRANDÃO, 1993; NOBRE; LOPES; BRANDÃO, 2004). Não foi possível, com este trabalho, caracterizar a localização dos receptores dopaminérgicos no CI, se estão localizados em neurônios aferentes ou eferentes. No entanto, abre-se caminho para a investigação e associação entre a dopamina, a resposta defensiva e o sistema motor.

Com relação aos resultados referentes à avaliação do teste do LCE com administração bilateral intra-CI de sulpirida nas doses de 2,0 e 4,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção, observamos uma diminuição no número de entradas e na porcentagem de permanência nos braços abertos dos animais tratados com sulpirida em relação ao grupo controle. Da mesma maneira, este tipo de efeito foi observado na análise da medida complementar de exploração das extremidades aberta, ou seja, a administração de sulpirida intra-CI diminui a frequência desse comportamento quando comparada com a administração de salina + tween (2%). Os efeitos da administração intra-CI de sulpirida sobre as medidas tradicionais e complementares do LCE apontam para uma ação pró-aversiva deste fármaco nesta estrutura. A diminuição no número de entradas e no tempo gasto nos braços abertos, assim como no número de exploração das extremidades abertas, não pode ser atribuída a uma mudança inespecífica na atividade motora porque não foi observado efeito sobre o número de entradas desses animais nos braços fechados do LCE. Além disso, não houve diferença entre os grupos sobre o número de cruzamentos e levantamentos no teste do campo aberto. O único efeito significativo observado nesse teste foi

um aumento do tempo de imobilidade para o grupo tratado com 2,0 µg de sulpirida nos dez primeiros minutos do teste. Esse efeito desaparece quando avaliamos os trinta minutos totais do teste do campo aberto. Tal efeito pontual de sulpirida sobre o tempo de imobilidade não invalida ou compromete a caracterização de um efeito pró-aversivo desta droga no teste do LCE, uma vez que a dose de 4,0 µg também diminuiu a exploração dos braços abertos sem alterar a atividade motora dos animais. Uma dose maior de sulpirida (8,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção) foi também administrada intra-CI visando-se avaliar a curva dose-reposta e associá-la ao desempenho motor. Efeitos similares referentes às doses de 2,0 e 4,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção foram observados (dados não apresentados).

Estudos acerca da ação da sulpirida administrada sistemicamente ou subcutaneamente mostraram efeitos divergentes em testes que avaliam respostas defensivas incondicionadas. No teste do LCE observou-se um efeito antiaversivo em camundongos e nenhum efeito em ratos (RODGERS; NIKULINA; COLE, 1994; GARCIA et al., 2005). Na avaliação da vocalização ultrassônica de 22 kHz houve ausência de efeito dessa droga (BARTOSZYK, 1998). No teste do “switch off à luz” um efeito pró-aversivo foi encontrado (REIS et al., 2004). Esta discrepância de resultados pode ser devido aos diferentes tipos de testes aplicados, tipos de animais utilizados e, principalmente, às doses e às vias de administração utilizadas. Nossos resultados sugerem que o efeito pró-aversivo observado por Reis e cols. (2004), com administração sistêmica de sulpirida no teste de “switch-off” à luz, pode ocorrer devido à ação dessa droga no CI.

De maneira geral, nossos resultados mostram que os receptores dopaminérgicos da família D₂ no CI estão envolvidos na expressão de respostas defensivas incondicionadas. A dopamina no CI parece regular a expressão dessas respostas. Afinal, o bloqueio da ativação dos receptores D₂ no CI facilitam (aumentam) as respostas defensivas incondicionadas. A ausência de um efeito oposto com a administração do agonista D₂, ou seja, diminuição das respostas incondicionadas de medo, pode ser devida à total ocupação e ativação dos receptores D₂ no CI por dopamina endógena. Outra possibilidade está relacionada com a ausência da caracterização dos receptores dopaminérgicos do CI, podendo os mesmos serem autorreceptores e/ou receptores pós-sinápticos. Dependendo do tipo de receptor no qual a droga se liga, uma resposta distinta pode ser observada (DE OLIVEIRA et al., 2009; 2011).

Para avaliar os efeitos da modulação dopaminérgica na expressão de respostas condicionadas de medo expusemos os animais ao teste do sobressalto potencializado pelo medo (SPM). Não utilizamos o quimpirole no teste do SPM, porque observamos efeitos motores no LCE. Somado a isso, a dose mais alta de quimpirole (qui2,0) aumentou o tempo de imobilidade

durante os 30 min do teste do campo aberto em relação ao grupo controle, o que dificultaria a interpretação de qualquer possível resultado encontrado no SPM.

Com relação à sulpirida, utilizamos apenas a dose de 4,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção desse antagonista D₂. Realizamos o experimento do SPM com apenas essa dose de sulpirida, por ser a dose dentre as testadas no LCE que apresentou efeito sobre o comportamento emocional sem afetar o desempenho motor dos animais. Os dados mostram que a amplitude da resposta de sobressalto diante da associação entre o estímulo condicionado (luz) e o som foi mais alta do que para a apresentação só do som na sessão teste. Esses resultados indicam que os animais apresentaram um sobressalto potencializado devido ao condicionamento aversivo prévio. No entanto, não foram observadas quaisquer diferenças entre os grupos controle e tratado com sulpirida para as respostas do sobressalto potencializado e de congelamento. Estes resultados indicam que o tratamento não influenciou a expressão das respostas condicionadas de medo. No teste do campo aberto, não foram observadas diferenças em nenhum dos comportamentos analisados considerando-se o teste com duração de 30 minutos. Esse resultado indica que o desempenho motor não causou nenhuma interferência nos resultados acima apresentados. O uso de uma dose maior, como por exemplo, a dose de 8,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção, ainda é uma opção para a avaliação da participação dos receptores da família D₂ na expressão do medo condicionado. De fato, essa dose produz efeito pró-aversivo no LCE e não afeta o desempenho motor dos animais.

Considerando apenas a resposta de amplitude de sobressalto acústico (condição só-som), nossos dados se assemelham aos encontrados na literatura. Esses estudos observaram que a modulação dopaminérgica parece não influenciar a amplitude de sobressalto. Tanto a injeção subcutânea de quimpireole (agonista D₂) ou apomorfina (agonista inespecífico de DA), quanto à injeção intra-CI de apomorfina ou haloperidol (antagonista D₂) não alteraram tal resposta (CAINE; GEYER; SWERDLOW, 1995; SALUM et al., 2006; SATAKE et al., 2012). Entretanto, o CI parece estar envolvido nas respostas de sobressalto acústico, pois quando esta estrutura é estimulada eletricamente ou quando seus níveis de GABA são reduzidos observam-se alterações na amplitude de sobressalto (LI; EVANS; FAINGOLD, 1998; NOBRE; LOPES; BRANDÃO, 2003). Quando o CI é lesado, no entanto, estudos relatam respostas divergentes sobre a resposta de amplitude de sobressalto acústico: aumento (LEITNER; COHEN, 1985; LEATON; KELSO, 2000), diminuição (GROVES; WILSON; BOYLE, 1974) ou ausência de efeito (HELDT; FALLS, 2003). Uma possível explicação está associada ao tempo de lesão em relação ao início do teste (HELDT; FALLS, 2003).

Ao considerarmos a condição em que houve condicionamento prévio (luz-som) ainda não temos evidências de uma participação da modulação dopaminérgica do CI. Em concordância com nossos dados está o estudo desenvolvido por De Oliveira e colaboradores (2006) no qual a administração intraperitoneal de sulpirida não influenciou as respostas condicionadas defensivas avaliadas durante o teste do SPM. No entanto, outros estudos que também administraram sulpirida intraperitonealmente, porém utilizaram testes de medo condicionado diferentes (esquiva ativa de duas vias e condicionamento a luz ou ao contexto) observaram um efeito antiaversivo (PONNUSAMY; NISSIM; BARAD, 2005; CARVALHO et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2013; DE SOUZA CAETANO et al., 2013). É notável que as respostas defensivas distintas observadas acima possam estar associadas aos diferentes tipos de teste e dosagem aplicada.

Nosso estudo não obteve evidências sobre o CI participar na expressão do medo condicionado por mecanismos dopaminérgicos relacionados aos receptores D₂. Essa é mais uma evidência para considerar a não participação do CI no processamento de respostas condicionadas de medo, considerando o pareamento luz (estímulo condicionado) e o choque nas patas (estímulo incondicionado). Em concordância com essa idéia estão os trabalhos de Reimer e cols. (2008), que mostraram que a injeção de GABA intra-CI não influencia o sobressalto potencializado pelo medo, e de Heldt e Falls (2003), cujos resultados referentes à lesão do CI mostraram que esta estrutura não é importante para as respostas de sobressalto potencializado pelo medo quando o estímulo incondicionado é pareado à luz, mas interfere quando o mesmo é pareado ao som.

Portanto, com base em nossos resultados e em evidências da literatura, podemos sugerir uma dissociação da participação de mecanismos dopaminérgicos em relação ao tipo de estímulo aversivo (incondicionado ou condicionado). Essa dissociação parece ser devida aos distintos substratos neurais subjacentes a organização dessas diferentes condições aversivas. Assim, os mecanismos dopaminérgicos que influenciam a expressão de respostas condicionadas de medo envolveriam estruturas encefálicas como a área tegmental ventral (NADER; LEDOUX, 1999; DE OLIVEIRA; REIMER; BRANDÃO, 2009; DE SOUZA CAETANOS et al., 2013), a amígdala (NADER; LEDOUX, 1999; GREBA; GIFKINS; KOKKINIDIS, 2001; PEZZE; FELDON, 2004; PEREZ DE LA MORA et al., 2012), o núcleo accumbens (PEZZE; FELDON, 2004; MARTINEZ, et al., 2008; ALBRECHET-SOUZA; CARVALHO; BRANDÃO, 2012), o córtex pré-frontal medial (PEZZE et al., 2003, 2004) e o núcleo caudado (WHITE; VIAUD, 1991). A modulação dopaminérgica em cada uma dessas estruturas subjaz a aquisição, expressão ou extinção do medo condicionado de maneira diferente, podendo envolver tanto os receptores

D₁ como D₂. Na maioria dessas estruturas o antagonismo de receptores D₂ produz um efeito antiaversivo quando avalia-se o medo condicionado.

Já na expressão de respostas incondicionadas de medo, haveria influência de mecanismos dopaminérgicos de algumas estruturas encefálicas também envolvidas no medo condicionado como a área tegmental ventral (PEREZ DE LA MORA et al., 2010), a amígdala (MACEDO et al., 2005a, 2005b, 2007; PEREZ DE LA MORA et al., 2010, 2012; ZARRINDAST, et al., 2011; BANANEJ, et al., 2012) e o córtex pré-frontal (CUADRA et al., 2000). Nosso estudo traz evidência para incluirmos o CI dentre essas estruturas no que diz respeito ao medo incondicionado, mas não ao condicionado. Além disso, destaca a participação de mecanismos dopaminérgicos dessa estrutura na elaboração de respostas defensivas incondicionadas envolvendo receptores da família D₂. Diferentes influências dopaminérgicas (agonismo ou antagonismo de receptores D₁ ou D₂) nas diferentes estruturas ocasionam diferentes tipos de resposta (antiaversiva, pró-aversiva ou nenhuma). O antagonismo de receptores D₂ intra-CI produziu um efeito pró-aversivo quando avaliamos o medo incondicionado. Esse efeito é oposto ao observado na maioria das estruturas quando avalia-se o medo condicionado. Portanto, parece que a influência dopaminérgica pode variar de maneira oposta dependendo da estrutura em que atua e do estímulo aversivo considerado.

5.2. Receptores D₁

Os resultados encontrados na avaliação do teste do LCE indicam que ratos tratados intra-CI com SKF nas doses de 1,0 e 2,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção não apresentam qualquer alteração nos comportamentos defensivos avaliados (tradicionais e complementares). Apesar de não observarmos nenhum efeito motor no teste do campo aberto, doses maiores não foram administradas pela impossibilidade de dissolução do SKF.

Os resultados encontrados na avaliação do teste do LCE indicam que ratos tratados intra-CI com SCH nas três doses testadas (1,0; 2,0 e 4,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção) não apresentam qualquer alteração nos comportamentos defensivos avaliados (tradicionais e complementares) em relação ao grupo controle. No entanto, observou-se um efeito motor causado pela maior dose (sch4,0) durante a avaliação dos 10 min no teste do campo aberto. Houve uma diminuição no número de cruzamentos e levantamentos, bem como um aumento da imobilidade em relação ao grupo controle.

A ausência de efeito observada para a administração intra-CI das drogas da família D₁ pode estar relacionada à pequena quantidade desses receptores no CI (CONTRERAS, et al.,

1987; WAMSLEY et al., 1989; HURD; SUZUKI; SEDVALL, 2001). Além disso, nenhum efeito sobre as respostas incondicionadas foi observado em estudos que administraram agonistas e/ou antagonistas D_1 intraperitonealmente (RODGERS; NIKULINA; COLE, 1994; REIS et al., 2004). Rodgers e colaboradores (1994) mostraram resultados semelhantes aos apresentados no nosso estudo. Camundongos que receberam sistemicamente SKF e SCH e foram expostos ao LCE não apresentaram variações nos comportamentos defensivos avaliados. Ainda como no nosso estudo, eles também observaram um efeito motor após administração de SCH. Portanto, não obtivemos qualquer evidência de efeitos das drogas da família D_1 sobre o medo incondicionado, sugerindo a não participação desses receptores do CI na modulação da resposta defensiva incondicionada.

A avaliação do SPM (teste que visa avaliar as respostas condicionadas defensivas) e a análise do campo aberto total (duração de 30 min) não foram realizadas após a microinjeção das drogas (agonista e antagonista) da família D_1 no CI. Ausências de tais análises comportamentais basearam-se nos resultados obtidos e também na literatura envolvida. Não observamos o envolvimento dos receptores da família D_1 nas respostas defensivas incondicionadas e, sabemos que há pouca quantidade desses receptores no CI (CONTRERAS, et al., 1987; WAMSLEY, et al., 1989; HURD; SUZUKI; SEDVALL, 2001). Alguns estudos mostram um efeito antiaversivo após a administração i.p. de SCH sobre as respostas defensivas condicionadas. No entanto, vale ressaltar que essa administração foi pré-treino e visou avaliar a aquisição da resposta condicionada e não a expressão como é o caso do nosso estudo. Nenhum efeito sobre as respostas comportamentais foram observadas com a modulação D_1 e a expressão do medo condicionado (DE OLIVEIRA; REIMER; BRANDÃO, 2006; REIS et al., 2004). Além disso, não encontramos evidências da participação de receptores D_2 do CI nas respostas condicionadas de defesa, mesmo observando um efeito sobre as incondicionadas.

Em suma, os dados obtidos indicam existência de uma modulação dopaminérgica envolvendo receptores da família D_2 no CI na expressão de respostas incondicionadas de medo. Dopamina no CI parece ser importante para regular a expressão dessas respostas. No entanto, não obtivemos evidências de que tal modulação no CI esteja envolvida na expressão de respostas condicionadas de medo. Além disso, nenhuma evidência foi encontrada sobre a participação dos receptores dopaminérgicos da família D_1 no CI na expressão de respostas incondicionadas de medo. Portanto, a neurotransmissão dopaminérgica no CI sobre a expressão de respostas defensivas parece ocorrer por meio de receptores da família D_2 , com ação seletiva na modulação de respostas incondicionadas de medo.

6. CONCLUSÕES

.....

- Mecanismos dopaminérgicos no CI parecem regular a expressão de respostas incondicionadas de medo.
- Os receptores dopaminérgicos da família D_2 no CI, mas não da família D_1 , estão envolvidos na expressão dessas respostas incondicionadas de medo.
- Ainda não há evidências de que os receptores dopaminérgicos da família D_2 do CI estejam envolvidos na expressão das respostas condicionadas de medo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J. C. Crossed and descending projections to the inferior colliculus. *Neuroscience Letters*, v. 19, p. 1–5, 1980.
- ALBRECHET-SOUZA, L. CARVALHO, M.C.; BRANDÃO, M.L. D₁-like receptors in the nucleus accumbens shell regulate the expression of contextual fear conditioning and activity of the anterior cingulate cortex in rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, p. 1–13, 2012.
- ANISMAN H.; ZALCMAN, S., SHANKS, N.; ZUHARKO, R. Multisystem regulation of performance deficits induced by stressors: an animal model of depression. In: Boulton A, Baker GB, Martin-Iverson MT, editors. *Animal models in psychiatry*, vol. II. Clifton (NJ): Human Press; 1991, p. 1–60.
- ANSELONI, V.Z.; BRANDÃO, M.L. Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. *Behavioural Pharmacology*, v. 8, p. 533–540, 1997.
- BAGRI, A.; DI SCALA, G.; SANDNER, G. Wild running elicited by microinjections of bicuculline or morphine into the inferior colliculus of rats: lack of effect of periaqueductal gray lesions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 41, p. 727–732, 1992.
- BANANEJ, M.; KARIMI-SORI, A. ZARRINDAST, M.R.; AHMADI, S. D₁ and D₂ dopaminergic systems in the rat basolateral amygdala are involved in anxiogenic-like effects induced by histamine. *Journal of Psychopharmacology*, v. 26, p. 564–574, 2012.
- BARNETT, S.A. *The rat: A study in behavior*. Chicago, IL: Aldine; 1966.
- BARTOSZYK, G.D. Anxiolytic effects of dopamine receptor ligands: I. Involvement of dopamine autoreceptors. *Life Sciences*, v. 62, p. 649–663, 1998.
- BEITZ, A. J. Relationship of glutamate and aspartate to the periaqueductal gray-raphe magnus projection: analysis using immunocytochemistry and microdialysis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 38, p. 1755–1765, 1990.
- BLANCHARD, R.J.; FLANNELLY, K.J.; BLANCHARD, D.C. Defensive reactions of laboratory and wild *Rattus Norvegicus*. *Journal Comparative Psychology*, v. 100, p. 101–107, 1986.
- BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G., BLANCHARD, R.J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 25, p. 205–218, 2001.
- BOLLES, R.C.; COLLIER, A.C. The effect of predictive cues on freezing in rats. *Animal Learning and Behavior*, v. 4, p. 6–8, 1976.
- BRAND, A.; URBAN, A.; GROTHE, B. Duration tuning in the mouse auditory midbrain. *Journal of Neurophysiology*, v. 84, p. 1790–1799, 2000.
- BRANDÃO, M.L.; TOMAZ, C.; BORGES, P.C.; COIMBRA, N.C. BRAGRI, A. Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. *Physiology & Behavior*, v. 44, 361–365, 1988.

- BRANDÃO, M.L.; MELO, L.L.; CARDOSO, S.H. Mechanisms of defense in the inferior colliculus. *Brain Research*, v. 58, p. 49–55, 1993.
- BRANDÃO, M.L.; CARDOSO, S.H.; MELO, L.L.; MOTTA, V.; COIMBRA, N.C. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 18, p. 339–346, 1994.
- BRANDÃO, M. L.; ANSELONI, V. Z.; PANDÓSSIO, J. E.; ARAÚJO, J. E. DE; CASTILHO, V. M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 23, p. 863–875, 1999.
- BRANDÃO, M. L. Comportamento emocional. In: _____ (Org.). *As bases biológicas do comportamento: introdução à neurociência*. São Paulo: E.P.U., 2004. p. 117–140.
- BRANDÃO, M.L.; BORELLI, K.G.; NOBRE, M.J.; SANTOS, J.M.; ALBRECHET-SOUZA, L.; DE OLIVEIRA, A.R.; MARTINEZ, R.C. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 29, p. 1299–1311, 2005.
- BROWN, J.S.; KALISH, H.I; FARBER, I.E. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. *Journal of Experimental Psychology*, v. 41, p. 317–328, 1951.
- CAINE, S.B.; GEYER, M.A.; SWERDLOW, N.R. Effects of D₃/D₂ dopamine receptor agonists and antagonists on prepulse inhibition of acoustic startle in the rat, *Neuropsychopharmacology*, v. 12, p. 139–145, 1995.
- CALLIER, S.; SNAPYAN, M.; CROM, S.; PROU, D.; VICENT, J.; VERNIER, P. Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biology of the Cell*, v. 95, p. 489–502, 2003.
- CARDENAS, F.; LAMPREA, M.R.; MORATO, S. Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*, v. 122, p. 169–174, 2001.
- CARDOSO, S.H.; COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. *Behavioural Brain Research*, v. 63, p. 17–24, 1994.
- CARRIVE, P. Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. *Brain Research*, v. 858, p. 440–445, 2000.
- CARVALHO, J.D.M.; DE OLIVEIRA, A.R.; SILVA, R.C.B.; BRANDÃO, M.L. A comparative study on the effects of the benzodiazepine midazolam and the dopamine agents, apomorphine and sulpiride, on rat behavior in the two-way avoidane test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 92, p. 351–356, 2009.
- CASSEDAY, J.H.; EHRLICH, D.; COVEY, E. Neural tuning for sound duration: role of inhibitory mechanisms in the inferior colliculus. *Science*, v. 264, p. 847–850, 1994.
- CASSEDAY, J.H.; COVEY, E. A neuroethological theory of the operation of the inferior colliculus. *Brain, Behavior and Evolution*, v. 47, p. 311–336, 1996.

- CASSEDAY, J.H.; EHRLICH, D.; COVEY, E. Neural measurement of sound duration: control by excitatory-inhibitory interactions in the inferior colliculus. *Journal of Neurophysiology*, v. 84, p. 1475–1487, 2000.
- CASTELLAN-BALDAN, L.; DA COSTA KAWASAKI, M.; RIBEIRO, S.J.; CALVO, F.; CORREA, V.M.; COIMBRA, N.C. Topographic and functional neuroanatomical study of GABAergic disinhibitory striatum-nigral inputs and inhibitory nigrocollicular pathways: neural hodology recruiting the substantia nigra, pars reticulata, for the modulation of the neural activity in the inferior colliculus involved with panic-like emotions. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v. 32, p. 1–27, 2006.
- CASTILHO, V. M.; AVANZI, V.; BRANDÃO, M. L. Antinociception elicited by aversive stimulation of the inferior colliculus. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v. 62, p. 425–431, 1999.
- CIVELLI, O.; BUNZOW, J.R.; GRANDY, D.K. Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 32, p. 281–307, 1993.
- CLARKE, P.B.S.; JAKUBOVIC, A.; FIBIGER, H.C. Anatomical analysis of the involvement of mesolimbic cortical dopamine in the locomotor stimulant action of D-amphetamine and apomorphine. *Psychopharmacology*, v. 96, p. 511–520, 1988.
- COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. *Behavioural Brain Research*, v. 59, p. 131–139, 1993.
- COLE, J.C.; RODGERS, R.J. An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro-6028) in the murine elevated plus-maze. *Behavioural Pharmacology*, v. 4, p. 573–580, 1993.
- CONTRERAS, P.C.; QUIRION, R.; GEHLERT, D.R.; CONTRERAS, M.L.; O'DONOHUE, T.L. Autoradiographic distribution of non-dopaminergic binding sites labeled by [³H]haloperidol in rat brain. *Neuroscience letters*, v. 75, p. 133–140, 1987.
- CRUZ, A. P. M.; ZANGROSSI JR., H. ; GRAEFF, F. G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade: implicações para seleção de drogas ansiolíticas. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, v. 13, p. 269–278, 1997.
- CRUZ, A. P. M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. In: J. Landeira-Fernandez & Sérgio Fukushima (Org.). *Métodos em Neurociência*. São Paulo: Manole, 2012. p. 192–217.
- CUADRA, G.; ZURITA, A.; MACEDO, C.E.; MOLINA, A.; BRANDÃO, M.L. Electrical stimulation of the midbrain tectum enhances dopamine release in the frontal cortex. *Brain Research Bulletin*, v. 52, p. 413–418, 2000.
- DARWIN, C. *The expression of the emotions in man and animals*. 1st. Edition. London: John Murray, 1872.
- DAVIS, M. Pharmacological analysis of fear-potentiated startle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 26, p. 235–260, 1993.

- DE OLIVEIRA, A.R.; REIMER, A.E.; BRANDÃO, M.L. Dopamine D₂ receptor mechanisms in the expression of conditioned fear. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v. 84, p. 102–111, 2006.
- DE OLIVEIRA, A.R.; REIMER, A.E.; BRANDÃO, M.L. Role of dopamine receptors in the ventral tegmental area in conditioned fear. *Behavioural Brain Research*, v. 199, p. 271–277, 2009.
- DE OLIVEIRA, A.R.; REIMER, A.E.; MACEDO, C.E.A.; CARVALHO, M.C.; SILVA, M.A.S.; BRANDÃO, M.L. Conditioned fear is modulated by D₂ receptor pathway connecting the ventral tegmental area and basolateral amygdala. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 95, p. 37–45, 2011.
- DE OLIVEIRA, A.R.; REIMER, A.E.; REIS, F.M.C.V.; BRANDÃO, M.L. Conditioned fear response is modulated by a combined action of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and dopamine activity in the basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology*, v. 23, p. 379–389, 2013.
- DE SOUZA CAETANO, K.A.; DE OLIVEIRA, A.R.; BRANDÃO, M.L. Dopamine D₂ receptors modulate the expression of contextual conditioned fear: role of the ventral tegmental area and the basolateral amygdala. *Behavioural Pharmacology*, v. 24, p. 264–274, 2013.
- DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. *Journal of Psychopharmacology*, v. 5, p. 305–315, 1991.
- DEAN, P.; REDGRAVE, P.; WESTBY, M. Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. *Trends in Neuroscience*, v. 12, p. 137–147, 1989.
- DRACTU, L.; LADER, M. Ansiedade: conceito, classificação e biologia. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, v. 42, p. 19–32, 1993.
- EMMI, A.; CRESCIMANNO, G.; AMATO, G. Modifications of head turning and circling movement following sulpiride microinjections into nucleus accumbens in the rat. *Brain Research Bulletin*, v. 38, p. 99–103, 1995.
- FAYE-LUND, H. Inferior colliculus and related descending pathways in rat. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, v. 93, p. 1–17, 1988.
- FANSELOW, M.S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter*. New York: Plenum Press. p. 151–173, 1991.
- FELDON, J.; SHOFEL, A.; WEINER, I. Latent inhibition is unaffected by direct dopamine agonists. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 38, p. 309–314, 1991.
- GARCIA, A.M.B.; MARTINEZ, R.; BRANDÃO, M.L.; MORATO, S. Effects of apomorphine on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiology & Behavior*, v. 85, p. 440–447, 2005.
- GEYER, M.A.; THOMSON, K.K.; BRAFF, D.; SWERDLOW, N.R. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl.)*, v. 156, p. 117–154, 2001.

- GOLDSTEIN, L.E.; RASMUSSEN, A.M.; BUNNEY, B.S.; ROTH, R.H. Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. *Journal of Neuroscience*, v. 16, p. 4787–4798, 1996.
- GRAEFF, F. G. Minor tranquilizers and brain defense systems. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 14, p. 239–265, 1981.
- GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L. *Neurobiologia das doenças mentais*. 4ª edição. São Paulo: Editora Lemos, 1999. 188 p.
- GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N. Fundamentals of the septo–hippocampal system. In: Gray JA, McNaughton N, editors. *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of septo–hippocampal system*, 2nd edition. Oxford: Oxford University Press; 2000. p. 204–232.
- GREBA, Q.; GIFKINS, A.; KOKKINIDIS, L. Inhibition of amygdaloid dopamine D₂ receptors impairs emotional learning measured with fear-potentiated startle. *Brain Research*, v. 899, p. 218–226, 2001.
- GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. *Nature Reviews Neuroscience*, v.13, p. 651–658, 2012.
- GROVES, P.M.; WILSON, C.J.; BOYLE, R.D. Brain stem pathways, cortical modulation, and habituation of the acoustic startle response. *Behavioral Biology*, v. 10, p. 391–418, 1974.
- HANDLEY, S.L.; MCBLANE, J.W. 5-HT drugs in animal models of anxiety. *Psychopharmacology*, v. 112, p. 13–20, 1993.
- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*, v. 327, p. 1–5, 1984.
- HELDT, S.A.; FALLS, W.A. Destruction of the inferior colliculus disrupts the production and inhibition of fear conditioned to an acoustic stimulus. *Behavioural Brain Research*, v. 144, p. 175–185, 2003.
- HITCHCOCK, J. M.; DAVIS, M. Fear-potentiated startle using an auditory conditioned stimulus: effect of lesions of the amygdala. *Physiology & Behavior*, v. 39, p. 403–408, 1987.
- HUFFMAN, R. F.; HENSON JR, O. W. The descending auditory pathway and acousticomotor systems: connections with the inferior colliculus. *Brain Research Reviews*, v. 15, p. 295–323, 1990.
- HURD, Y. L.; SUZUKI, M.; SEDVALL, G. C. D₁ and D₂ dopamine receptor mRNA expression in whole hemisphere sections of the human brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v. 22, p. 127–137, 2001.
- IINO, S.; KOBAYASHI, S.; MAEKAWA, S. Immunohistochemical localization of a novel acidic calmodulin-binding protein, NAP-22, in the rat brain. *Neuroscience*, v. 91, p. 1435–1444, 1999.

- KEBABIAN, J.W.; CALNE, D.B. Multiple receptors for dopamine. *Nature*, v. 277, p. 93–96, 1979.
- KOOB, G.F.; LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*, v. 24, p. 97–129, 2001.
- LAMPREA, M.R.; CARDENAS, F.P.; VIANNA, D.M.; CRUZ-MORALES, S.E.; BRANDÃO, M.L. The distribution of fos immunoreactivity in rat brain following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Research*, v. 950, p. 186–194, 2002.
- LEATON, R.N.; KELSO, J.M. The auditory pathways: startle amplitude and fear in an acoustic startle response paradigm in rats. *Psychobiology*, v. 28, p. 492–506, 2000.
- LEDoux, J.E.; FARB, C.; RUGGIERO, D.A. Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *The Journal of Neuroscience*, v. 10, p. 1043–1054, 1990.
- LEITNER, D.S.; COHEN, M.E. Role of the inferior colliculus in the inhibition of acoustic startle in the rat. *Physiology & Behavior*, v. 34, p. 65–70, 1985.
- LI, Y.; EVANS, M.S.; FAINGOLD, C.L. In vitro electrophysiology of neurons in subnuclei of rat inferior colliculus. *Hearing Research*, v. 121, p. 1–10, 1998.
- MACEDO, C.E.; MARTINEZ, R.C.R.; SILVA, M.A.S.; BRANDÃO, M.L. Increases in extracellular levels of 5-HT and dopamine in the basolateral, but not in the central, nucleus of amygdala induced by aversive stimulation of the inferior colliculus. *European Journal of Neuroscience*, v. 21, p. 1131–1138, 2005a.
- MACEDO, C.E.; CUADRA, G.; MOLINA, V.A.; BRANDÃO, M.L. Aversive stimulation of the inferior colliculus changes dopamine and serotonin extracellular levels in the frontal cortex: modulation by the basolateral nucleus of amygdala. *Synapse*, v. 55, p. 58–66, 2005b.
- MACEDO, C.E.; MARTINEZ, R.C.R.; ALBRECHET-SOUSA, L.; MOLINA, V.A.; BRANDÃO, M.L. 5-HT₂- and D₁-mechanisms of the basolateral nucleus of the amygdala enhance conditioned fear and impair unconditioned fear. *Behavioural Brain Research*, v. 177, p. 100–108, 2007.
- MALMIERCA, M.S.; ERNANDEZ, O.; REES, A. Intercollicular commissural projections modulate neuronal responses in the inferior colliculus. *European Journal of Neuroscience*, v. 21, p. 2701–2710, 2005.
- MARTÍNEZ, J.C.; CARDENAS, F.; LAMPREA, M.; MORATO, S. The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of elevated plus-maze. *Behavioural Processes*, v. 60, p. 15–26, 2002.
- MARTINEZ, R.C.R.; DE OLIVEIRA, A.R.; MACEDO, C.E.; MOLINA, V.A.; BRANDÃO, M.L. Involvement of dopaminergic mechanisms in the nucleus accumbens core and shell subregions in the expression of fear conditioning. *Neuroscience Letters*, v. 446, p. 112–116, 2008.

- MASTERTON, R. B. Role of the central auditory system in hearing: The new direction. *Trends in Neuroscience*, v. 15, p. 280–285, 1992.
- MCNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 28, p. 285–305, 2004.
- MELO, L.L.; BRANDÃO, M.L. Role of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in the aversion induced by electrical stimulation of inferior colliculus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 51, p. 317–321, 1995.
- MELO, L.L.; PEREIRA, E.C.H.M.; PAGINI, C.H.; COIMBRA, N.C. BRANDÃO, M.L.; FERRARI, E.A.M. Effects of microinjections of apomorphine and haloperidol into the inferior colliculus on the latent inhibition of the conditioned emotional response. *Experimental Neurology*, v. 216, p. 16–21, 2009.
- MILLAN, M.J. The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology*, v. 70, p. 83–244, 2003.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. *Journal of Comparative & Physiological Psychology*, v. 48, p. 254–260, 1955.
- MOORE, R. Y.; BLOOM, F. E. Central catecholamine neuron systems: Anatomy and Physiology of the dopamine systems. *Annual Reviews Neuroscience*, v. 1, p. 129–169, 1978.
- MOREIRA, F.A.; MOLCHANOV, M.L.; GUIMARÃES, F.S. Flight reactions to nitric oxide in the inferior colliculus of rats depend on NMDA receptor activation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 76, p. 35–41, 2003.
- MORIIZUMI, T.; HATTORI, T. Pallidotectal projection to the inferior colliculus of the rat. *Experimental Brain Research*, v. 87, p. 223–226, 1991.
- NADER, K.; LEDOUX, J.E. Inhibition of the mesoamygdala dopaminergic pathway impairs the retrieval of conditioned fear associations. *Behavioral Neuroscience*, v. 113, p. 891–901, 1999.
- NOBRE, M.J.; LOPES, M.G.; BRANDÃO, M.L. Defense reaction mediated by NMDA mechanisms in the inferior colliculus is modulated by GABAergic nigro-collicular pathways. *Brain Research*, v. 999, p. 124–131, 2004.
- OLAZÁBAL, U.E.; MOORE, J.K. Nigrotectal projection to the inferior colliculus: horseradish peroxidase transport and tyrosine hydroxylase immunohisto-chemical studies in rats, cats, and bats. *Journal of Comparative Neurology*, v. 282, p. 98–118, 1989.
- OSAKI, M.Y.; CASTELLAN-BALDAN, L.; CALVO, F.; CARVALHO, A.D.; FELIPPOTTI, T.T.; DE OLIVEIRA, R.; UBIALI, W.A.; PASCHOALIN-MAURIN, T.; ELIAS-FILHO, D.H.; MOTTA, V.; DA SILVA, L.A.; COIMBRA, N.C. Neuroanatomical and neuropharmacological study of opioid pathways in the mesencephalic tectum: effect of mu(1)- and kappa-opioid receptor blockade on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Research*, v. 5, p. 179–192, 2003.
- PAXINOS, G.; WATSON, P. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6^a ed. Academic Press: London, UK, 2007.

- PEARSON EDUCATION, Inc. 2011. GEORGIA HIGHLANDS COLLEGE. Central Nervous System, by Thomas Harnden. Acesso em: 02/11/2013. Disponível em: <<http://www.highlands.edu/academics/divisions/scipe/biology/faculty/harnden/2121/images/arborvitae.jpg>>.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 14, p. 149–167, 1985.
- PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, v. 24, p. 198–216, 1986.
- PEREZ DE LA MORA, M; GALLEGOS-CARI, A.; ARIZMENDI-GARCIA, Y.; MARCELLINO, D.; FUXE, K. Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: structural and functional analysis. *Progress in Neurobiology*, v. 90, p. 198–216, 2010.
- PEREZ DE LA MORA, M; GALLEGOS-CARI, A.; CRESPO-RAMIREZ, M.; MARCELLINO, D.; HANSSON, A.C.; FUXE, K. Distribution of dopamine D₂-like receptors in the rat amygdala and their role in the modulation of unconditioned fear and anxiety. *Neuroscience*, v. 201, p. 252–266, 2012.
- PEREZ-GONZALEZ, D.; MALMIERCA, M.S.; MOORE, J. M.; HERNANDEZ, O.; COVEY, E. Duration selective neurons in the inferior colliculus of the rat: topographic distribution and relation of duration sensitivity to other response properties. *Journal of Neurophysiology*, v. 95, p. 823–836, 2006.
- PEZZE, M.A.; BAST, T.; FELDON, J. Significance of dopamine transmission in the rat medial prefrontal cortex for conditioned fear. *Cerebral Cortex*, v. 13, p. 371–380, 2003.
- PEZZE, M.A.; FELDON, J. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Progress in Neurobiology*, v. 74, p. 301–320, 2004.
- PONNUSAMY, R.; NISSIM, H.A.; BARAD, M. Systemic blockade of D₂-like dopamine receptors facilitates extinction of conditioned fear in mice. *Learning & Memory*, v. 12, p. 399–406, 2005.
- REIMER, A.E.; DE OLIVEIRA, A.R.; BRANDÃO, M.L. Selective involvement of GABAergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray and inferior colliculus on the memory of the contextual fear as assessed by the fear potentiated startle test. *Brain Research Bulletin*, v. 76, p. 545–550, 2008.
- REIMER, A.E.; DE OLIVEIRA, A.R.; BRANDÃO, M.L. Involvement of GABAergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray and inferior colliculus on unconditioned fear. *Psychology & Neuroscience*, v. 2, p. 51-58, 2009.
- REIS, F.L.V; MASSON, S.; DE OLIVEIRA, A.R.; BRANDÃO, M.L. Dopaminergic mechanisms in the conditioned and unconditioned fear as assessed by the two-way avoidance and light switch-off tests. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 79, p. 359–365, 2004.

- RODGERS, R.J.; NIKULINA, E.M.; COLE, J.C. Dopamine D₁ and D₂ receptor ligands modulate the behaviour of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 49, p. 985–995, 1994.
- SALUM, C.; ROQUE DA SILVA, A.C.; MORATO, S. Conflict as a determinant of rat behavior in three types of elevated plus-maze. *Behavioural Processes*, v. 63, p. 87–93, 2003.
- SALUM, C.; GUIMARÃES, F.S.; BRANDÃO, M.L.; DEL BEM, E.A. Dopamine and nitric oxide interaction on the modulation of prepulse inhibition of the acoustic startle response in the Wistar rat. *Psychopharmacology*, v. 185, p. 133–141, 2006.
- SATAKE, S.; YAMADA, K.; MELO, L.L.; SILVA, R.B. Effects of microinjections of apomorphine and haloperidol into the inferior colliculus on prepulse inhibition of the acoustic startle reflex in rat. *Neuroscience Letters*, v. 509, p. 60–63, 2012.
- SCHULLER, G.; COVEY, E.; CASSEDAY, J.H. Auditory pontine grey: connections and response properties in the horseshoe bat. *European Journal of Neuroscience*, v. 3, p. 648–662, 1991.
- SCHOFIELD, B.R.; CANT, N.B. Descending auditory pathways: projections from the inferior colliculus contact superior olivary cells that project bilaterally to the cochlear nuclei. *Journal of Comparative Neurology*, v. 409, p. 210–223, 1999.
- SIBLEY, D.R.; MONSMA, F.J. Molecular biology of dopamine receptors. *Trends in Psychological Sciences*, v. 13, p. 61–69, 1992.
- SILVEIRA, M. C. L.; SANDER, G.; GRAEFF, F. G. Induction of FOS immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behavioral Brain Research*, v. 56, p. 115–118, 1993.
- SKIRBOLL, L. R.; GRACE, A.A.; BUNNEY, B. S. Dopamine Auto – and Postsynaptic Receptors: Electrophysiological Evidence for Differential Sensitivity to Dopamine Agonists. *Science*, v. 206, p. 80–82, 1979.
- STUCHLIK, A.; REHAKOVA, L.; RAMBOUSEK, L.; SVOBODA, J.; VALES, K. Manipulation of D2 receptors with quinpirole and sulpiride affects locomotor activity before spatial behavior of rats in an active place avoidance task. *Neuroscience Research*, v. 58, p. 133–139, 2007.
- TOKUNAGA, A.; SUGITA, S.; OTANI, K. Auditory and non-auditory subcortical afferents to the inferior colliculus in the rat. *Journal fur Hirnforschung*, v. 25, p. 461–472, 1984.
- TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAL, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 44, p. 463–469, 1993.
- VAN DER WERF, J.F.; SEBENS, J.B.; KORF, J. Tracer and maximal specific binding of tritiated spiperone or N-n-propylnorapomorphine to quantify dopamine receptors in rat brain regions in vivo. *Life Sciences*, v. 39, p. 155–160, 1986.
- WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open-field test: a critical review. *Psychological Bulletin*, v. 83, p. 482–504, 1976.

- WAMSLEY, J.K.; GEHLERT, D.R.; FILLOUX, F.M.; DAWSON, T.M. Comparison of the distribution of D1 and D2 dopamine receptors in the rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v. 2, p. 119–137, 1989.
- WEINER, D.M.; LEVEY, A.I.; SUNAHARA, R.K. *et al.* D₁ and D₂ dopamine receptor mRNA in rat brain. *Neurobiology*, v. 88, p. 1859–1863, 1991.
- WHITE, N.M.; VIAUD, M. Localized intracaudate dopamine D₂ receptor activation during the post-training period improves memory for visual or olfactory conditioned emotional responses in rats. *Behavioral and Neural Biology*, v. 55, p. 255–269, 1991.
- WISE, R.A.; ROMPRE, P.P. Brain dopamine and reward. *Annual Review of Psychology*, v. 40, p. 191–225, 1989.
- YEOMANS, J. S.; FRANKLAND, P. W. The acoustic startle reflex: neurons and connections. *Brain Research Reviews*, v. 21, p. 301–314, 1996.
- ZARRINDAST, M.R.; SROUSHI, A.; BANANEJ, M. VOUSOOGHI, N.; HAMIDKHANIHA, S. Involvement of the dopaminergic receptors of the rat basolateral amygdala in anxiolytic-like effects of the cholinergic system. *European Journal of Pharmacology*, v. 672, p. 106–112, 2011.