

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

**Envolvimento de receptores NK-1 e NK-3 no comportamento
defensivo induzido pela estimulação elétrica da substância
cinzenta periaquedutal dorsal**

Ana Carolina Garcia Broiz

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras
de Ribeirão Preto – USP, como parte das
exigências para obtenção do título de
doutor em Ciências.
Área de concentração: Psicobiologia.

Ribeirão Preto

2011

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

**Envolvimento de receptores NK-1 e NK-3 no comportamento
defensivo induzido pela estimulação elétrica da substância
cinzenta periaquedutal dorsal**

Ana Carolina Garcia Broiz

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras
de Ribeirão Preto - USP, como parte das
exigências para obtenção do título de
doutor em Ciências.
Área de Concentração: Psicobiologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão

Ribeirão Preto

2011

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Broiz, Ana Carolina Garcia

Envolvimento de receptores NK-1 e NK-3 no comportamento defensivo induzido pela estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal. Ribeirão Preto, 2011.

88 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia. Orientador: Brandão, Marcus Lira.

1. receptores NK-1 e NK-3. 2. substância cinzenta periaquedutal dorsal. 3. spantide. 4. SB 222200. 5. medo incondicionado. 6. condicionamento contextual aversivo.

A minha querida família por estar sempre presente em minha vida dando todo apoio e incentivo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcus Lira Brandão pela orientação e apoio.

À banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura desta tese.

Aos professores do programa de Psicobiologia desta faculdade, que nos anos de convivência, muito me ensinaram, contribuindo para meu crescimento científico.

Ao Prof. Dr. Manoel Jorge Nobre do Espírito Santo pela atenção e apoio durante todo o processo.

À Dra. Julia Maria dos Santos pela contribuição na redação final deste trabalho.

Aos colegas de laboratório pelo convívio.

À Thalita pela ajuda no cuidado com os animais e pela amizade.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço.

RESUMO

RESUMO

BROIZ, A.C.G. **Envolvimento de receptores NK-1 e NK-3 no comportamento defensivo induzido pela estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal.** 2011. 88 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

A substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) é considerada uma das principais estruturas do teto mesencefálico envolvida no substrato neural da aversão a estímulos proximais. GABA e 5-HT são apontados como neurotransmissores envolvidos na modulação das respostas defensivas elaboradas na SCPd. Recentemente, mecanismos neurocinérgicos também têm sido propostos como mediadores das reações de defesa organizadas nessa estrutura. O objetivo do presente estudo foi avaliar o envolvimento dos receptores NK-1 e NK-3 da SCPd no comportamento defensivo induzido pela estimulação elétrica dessa região em ratos com e sem experiência prévia ao condicionamento contextual aversivo. Para isso, os limiares aversivos de congelamento e fuga foram medidos durante a estimulação elétrica da SCPd em ratos ingênuos e em animais submetidos previamente ao procedimento de condicionamento contextual aversivo. A mediação destas repostas defensivas pelos receptores NK-1 e NK-3 foi avaliada pela injeção local de spantide (100 pmol/0,2 µL) e SB 222200 (50 e 100 pmol/0,2 µL), antagonistas seletivos de receptores NK-1 e NK-3, respectivamente. Os resultados mostraram que a injeção intra-SCPd de spantide aumentou os limiares aversivos determinados pela estimulação elétrica da SCPd em animais ingênuos e com experiência aversiva prévia. Injeções similares de 100 pmol de SB 222200 na SCPd também causaram um aumento nos limiares de congelamento e fuga. Entretanto, esses efeitos devem ser atribuídos a um déficit motor causado por essa dose da droga, uma vez que SB 222200 na dose de 100 pmol, reduziu significativamente a atividade motora dos animais submetidos ao teste do campo aberto. Estes resultados sugerem que receptores NK-1, mas não NK-3, estão envolvidos na mediação do comportamento defensivo induzido pela estimulação elétrica da SCPd.

Palavras-chave: receptores NK-1 e NK-3, substância cinzenta periaquedutal dorsal, spantide, SB 222200, medo incondicionado, condicionamento contextual aversivo.

ABSTRACT

ABSTRACT

BROIZ, A.C.G. **Involvement of NK-1 and NK-3 receptors on the defensive behavior induced by electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray.** 2011. 88 p. Thesis (doctoral) – Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

The dorsal periaqueductal gray (dPAG) constitutes the main structure of the neural substrate for the defensive response to proximal aversive stimuli. It is well established that GABA and 5-HT are important neuromediators of the defense reaction at the dPAG level but neurokinin-mediated mechanisms have also been recently implicated in these processes. The aim of the present investigation was to examine the involvement of NK-1 and NK-3 receptors of the dPAG in the unconditioned defensive behaviors induced by electrical stimulation of the dPAG of rats with and without previous experience with contextual fear conditioning. For this, aversive thresholds were measured as the lowest intensity of electric current to produce freezing and escape behaviors using a procedure of gradual increases of the electrical stimulation of the dPAG. These thresholds were also measured in rats previously submitted to a contextual fear conditioning procedure. The mediation of these defensive responses by NK-1 and NK-3 receptors of the dPAG was evaluated by local injections of spantide (100 pmol/0.2 µL) and SB 222200 (50 and 100 pmol/0.2 µL), selective antagonists of NK-1 and NK-3 receptors, respectively. The present results showed that spantide injections into the dPAG increased the aversive thresholds (anti-aversive effects) determined by stimulation of the dPAG in naive and in animals subjected previously to the contextual fear conditioning. Similar injections of SB 222200 100 pmol into the dPAG increased the freezing and escape thresholds. However, this effect can be attributable to a motor deficit since this dose of SB 222200 decreased the exploratory activity of the animals subjected to the open field test. These results suggest that NK-1 receptors, but not NK-3 receptors, are involved in the mediation of the defensive behaviors induced by electrical stimulation of the dPAG.

Key words: NK-1 and NK-3 receptors, dorsal periaqueductal gray, spantide, SB 222200, unconditioned fear, contextual fear conditioning.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

1. Medo e Ansiedade.....	12
2. Medo Incondicionado e Condicionado.....	14
3. Estimulação Elétrica da Substância Cinzenta Periaquedutal.....	17
4. Mediação Neurocininérgica do Comportamento Defensivo.....	18

OBJETIVOS	25
------------------------	-----------

EXPERIMENTO I

MATERIAL E MÉTODOS.....	28
--------------------------------	-----------

1. Animais.....	28
2. Cirurgia.....	28
3. Equipamentos.....	29
4. Drogas.....	30
5. Microinjeções de Drogas.....	30
6. Procedimento Experimental.....	31
7. Histologia.....	32
8. Análise Estatística.....	32

RESULTADOS.....	35
------------------------	-----------

EXPERIMENTO II

MATERIAL E MÉTODOS.....	44
--------------------------------	-----------

1. Animais.....	44
-----------------	----

2. <i>Cirurgia</i>	44
3. <i>Equipamentos</i>	44
4. <i>Procedimento Experimental</i>	44
5. <i>Análise Estatística</i>	45
RESULTADOS	47
EXPERIMENTO III	
MATERIAL E MÉTODOS	50
1. <i>Animais</i>	50
2. <i>Cirurgia</i>	50
3. <i>Equipamentos</i>	50
4. <i>Drogas</i>	51
5. <i>Procedimento Experimental</i>	51
6. <i>Análise Estatística</i>	52
RESULTADOS	55
DISCUSSÃO	67
CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXO	88

INTRODUÇÃO

1. Medo e Ansiedade

O medo é uma reação emocional e primitiva do organismo frente a estímulos ameaçadores, especialmente aqueles relacionados à sua sobrevivência (FENDT; FANSELOW, 1999). É provocado por um estímulo ameaçador claramente identificável e que pode ser reconhecido de forma inata ou aprendida (DAVIS; WALKER; LEE, 1997; FENDT; FANSELOW, 1999).

Diversos estudos sobre a neurobiologia do medo e da ansiedade mostram que as respostas de medo de animais expostos a situações ameaçadoras dependem da intensidade e da distância do estímulo aversivo, sendo hierarquicamente organizadas em níveis de defesa (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). Assim, quando os animais se deparam com um perigo potencial, assumem um comportamento denominado de avaliação de risco. Quando os sinais de perigo tornam-se explícitos, porém distantes, a reação típica apresentada é o congelamento acompanhado por reações neurovegetativas. Já quando o perigo está próximo e explícito, ocorre o comportamento de luta ou fuga, quando essa é possível (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD et al., 1990). Neste sentido, as respostas de medo são desencadeadas em situações explícitas de ameaça e perigo (como, por exemplo, na presença do predador) e respostas de ansiedade são desencadeadas em situações que ofereçam perigo potencial (como, por exemplo, na ausência do predador, por sinais a ele associados, como, por exemplo, seu odor) (BRANDÃO et al., 2005; BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD et al., 1990).

A ansiedade pode ser definida como um estado subjetivo de apreensão ou tensão, difuso ou vago, frequentemente acompanhado por alterações autonômicas,

como aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca, da respiração e urgência de micção ou defecação (BRANDÃO, 2004).

Os distúrbios de ansiedade estão entre os mais prevalentes problemas de saúde mental em humanos (BRANDÃO et al., 2008). Modelos animais de ansiedade (como, por exemplo, condicionamento clássico, sobressalto potencializado pelo medo, teste do campo aberto e labirinto em cruz elevado) possibilitam reproduzir em laboratório, aspectos da sintomatologia da ansiedade em humanos, além de possibilitar o estudo de possíveis tratamentos para esse distúrbio (BRANDÃO et al., 2008). Além disso, esses modelos contribuem para elucidar a participação de diferentes estruturas encefálicas e mecanismos neuroquímicos envolvidos na mediação das respostas defensivas (BRANDÃO et al., 2008; CARVALHO et al., 2005).

O teste do campo aberto foi um dos primeiros procedimentos experimentais utilizados na tentativa de estudar o comportamento emocional em animais. Foi descrito pela primeira vez em meados da década de 1930 por Carl Hall (HALL, 1934). Originalmente, consistia de uma arena circular montada sob uma bateria de lâmpadas e alto-falantes de forma que o animal era exposto simultaneamente à luz intensa e a ruídos fortes, estímulos claramente aversivos (WALSH; CUMMINS, 1976; BRANDÃO, 2004).

Por estar historicamente relacionado às pesquisas sobre o comportamento emocional, o campo aberto é um dos modelos ainda utilizados em estudos psicofarmacológicos para avaliar o potencial ansiolítico de drogas, assim como os efeitos dessas sobre a locomoção e sedação (CHOLERIS et al., 2001; PRUT; BELZUNG, 2003). Basicamente, o teste consiste em colocar o animal em uma arena (circular ou quadrada) para o registro da exploração desse ambiente pelo mesmo.

Esse comportamento é determinado pela distância percorrida pelo animal dentro da arena durante determinado período de tempo assim como o número de levantamentos sobre as patas traseiras (WALSH; CUMMINS, 1976; PRUT; BELZUNG, 2003).

Os efeitos de diferentes drogas têm sido investigados através do teste do campo aberto, incluindo compostos com efeitos ansiolíticos (como, por exemplo, benzodiazepínicos), estimulantes (tais como a anfetamina e cocaína) e sedativos (por exemplo, neurolépticos) (PRUT; BELZUNG, 2003). Um aumento da locomoção pode ser considerado um efeito estimulante, enquanto que a diminuição da locomoção e do número de levantamentos estão relacionados à sedação ou prejuízo motor (CHOLERIS et al., 2001; PRUT; BELZUNG, 2003). Assim, este modelo torna-se uma alternativa útil para o estudo da ação das drogas neurocinérgicas (spantide e SB 222200) utilizadas nesse estudo.

2. Medo Incondicionado e Condicionado

Quando um estímulo aversivo é capaz de desencadear respostas reflexas, é considerado um estímulo incondicionado (WALLACE; ROSEN, 2001). Está bem estabelecido na literatura que os animais exibem comportamentos de alerta, esquiva, congelamento, luta ou fuga como respostas defensivas à presença de predadores ou mesmo à exposição ao odor de predadores (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; WALLACE; ROSEN, 2001). Essas características indicam um estado de medo incondicionado.

A estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) é um modelo animal amplamente utilizado como procedimento de medo

incondicionado. Em animais, estudos sobre a neurobiologia do medo e da ansiedade têm mostrado que o aumento gradual na intensidade de corrente elétrica aplicada na SCPd induz, de maneira gradual, uma série de respostas defensivas características, tais como alerta, congelamento e fuga (SCHENBERG et al., 2001; MAGIEREK et al., 2003). Em geral, essas respostas são acompanhadas por antinocicepção (FENDT; FANSELOW, 1999; CASTILHO; BRANDÃO, 2001), alterações na pressão arterial média, nas frequências cardíaca e respiratória e por outras alterações autonômicas, tais como piloereção, micção e defecação (FENDT; FANSELOW, 1999).

O comportamento de congelamento desencadeado pela estimulação elétrica da SCPd é definido como uma imobilidade tensa acompanhada por exoftalmia e/ou defecação e micção (VAN ERP et al., 1993; BRANDÃO et al., 2003; MAGIEREK et al., 2003), não é contexto-dependente e é interpretado como uma resposta preparatória para a fuga, uma vez que a antecede (VIANNA et al., 2001a; VIANNA; LANDEIRA-FERNANDEZ; BRANDÃO, 2001b; VIANNA et al., 2003).

O comportamento de fuga desencadeado pela estimulação elétrica da SCPd é caracterizado por uma atividade motora intensa e não coordenada acompanhada de corridas, saltos e galopes, alternada com períodos de imobilidade tensa ou congelamento (OLIVEIRA et al., 2007; BRANDÃO et al., 2008; GRAEFF, 2004). Após esse comportamento, ou seja, após a interrupção da passagem de corrente elétrica, é observado um comportamento típico denominado congelamento pós-estimulação (OLIVEIRA et al., 2007; BROIZ; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2008; BRANDÃO et al., 2008). Essa resposta defensiva é caracterizada por imobilidade persistente do animal e parece estar envolvido com o processamento das informações aversivas para estruturas mais rostrais, como, por exemplo, a amígdala (RUIZ-MARTINEZ; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2006; VIANNA et al., 2001a).

Ao contrário do congelamento incondicionado, o congelamento condicionado é uma forma de condicionamento clássico, onde o animal é treinado a associar um estímulo neutro (como, por exemplo, apresentação de luz, som ou o próprio contexto em que o animal se encontra) a um estímulo aversivo incondicionado (EI), tal como um choque elétrico nas patas. Após alguns pareamentos, a apresentação do estímulo neutro sinaliza a ocorrência do EI e atua como um estímulo condicionado (EC) desencadeando a resposta de congelamento (DAVIS, 1992; FENDT; FANSELOW, 1999; LEDOUX, 2000). Portanto, esse tipo de condicionamento é resultado de uma aprendizagem associativa do tipo pavloviano (DAVIS, 1992; LEDOUX, 2000).

O medo condicionado contextual vem sendo amplamente estudado (MAGIEREK et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007; BROIZ; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2008). De acordo com esse modelo, a aprendizagem é avaliada pela capacidade do EC (no caso, o contexto) em produzir a resposta condicionada em antecipação à ocorrência do EI (GEWIRTZ; DAVIS, 2000). Quando os animais são re-expostos a esse mesmo contexto apresentam um intenso congelamento associado a um aumento na frequência cardíaca, micção, defecação e vocalizações ultrassônicas (FENDT; FANSELOW, 1999; LEMAN; DIELENBERG; CARRIVE, 2003). A duração desse comportamento varia com a intensidade e o número de EIs oferecidos (FANSELOW, 2000). O estudo do medo condicionado contextual faz-se importante para a investigação das bases biológicas subjacentes ao medo e para o entendimento da neurobiologia dos distúrbios associados ao medo em humanos.

3. Estimulação Elétrica da Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP)

A SCP é uma estrutura que se manteve aparentemente estável ao longo da evolução, diferindo muito pouco entre as espécies de mamíferos. Localiza-se no mesencéfalo, margeando o aqueduto cerebral. Rostralmente é contínua com a substância cinzenta que margeia o 3º ventrículo no hipotálamo (BANDLER; CARRIVE; DEPAULIS, 1991; CARRIVE, 1993). Morfologicamente, a SCP do rato foi dividida, inicialmente, em quatro sub-regiões: medial, dorsal, dorsolateral e ventrolateral (BEITZ, 1985). Posteriormente, Carrive (1993) e Bandler e Shipley (1994) propuseram a divisão da SCP em quatro colunas longitudinais que se estendem ao longo do eixo rostrocaudal: colunas dorsomedial (SCPdm), dorsolateral (SCPdl), lateral (SCPl) e ventrolateral (SCPvl).

Evidências sugerem que a coluna ventrolateral da SCP integra respostas condicionadas a estímulos aversivos (VIANNA et al., 2001a), bem como está associada à inibição autonômica e somatomotora do organismo em resposta a estímulos viscerais (CARRIVE, 1993). A coluna lateral está associada com a ativação autonômica e somatomotora do organismo em resposta a um estímulo superficial ou cutâneo (CARRIVE, 1993; BANDLER; SHIPLEY, 1994). As colunas dorsomedial e dorsolateral juntas têm sido denominadas de substância cinzenta periaquedutal dorsal (BANDLER; SHIPLEY, 1994).

A SCPd aparece como um dos principais substratos neurais para a integração de estímulos aversivos que induzem respostas defensivas (VIANNA; LANDEIRA-FERNANDEZ; BRANDÃO, 2001b; BRANDÃO et al., 2008). As respostas defensivas de congelamento e fuga geradas pela estimulação elétrica da SCPd são similares às aquelas evocadas no animal em condições naturais de perigo (CARRIVE, 1993).

Por sua natureza impactante, tem-se sugerido que as respostas defensivas de congelamento e fuga induzidas pela estimulação elétrica da SCPd estejam relacionadas com ataques de pânico em humanos (GRAEFF, 2002, 2004; BRANDÃO et al., 2008; MAGIEREK et al., 2003). A estimulação elétrica da SCPd em humanos produziu sentimentos de medo intenso, pânico, terror, sensação de morte iminente, aumento das frequências cardíaca e respiratória, sudorese e piloereção (NASHOLD; WILSON; SLAUGHTER, 1969). Dessa forma, o procedimento de estimulação elétrica de SCPd tem sido reconhecido como um modelo animal para o estudo da neurobiologia dos distúrbios do medo e ansiedade como o transtorno de pânico (GRAEFF, 2002, 2004; BRANDÃO et al., 2003; MAGIEREK et al., 2003).

O transtorno de pânico é caracterizado pela ocorrência súbita e inesperada de ataques de pânico, que podem ter frequência de vários ataques em um mesmo dia até poucos ataques ao longo de um ano (MEZZASALMA et al., 2004). É considerado uma manifestação extrema de medo incondicionado, causado por ativação espontânea do sistema luta/fuga, o qual é ativado em circunstâncias normais apenas por estímulos aversivos ou ameaçadores (DEAKIN, 1998).

4. Mediação Neurocinérgica do Comportamento Defensivo

Diversos neurotransmissores como GABA, serotonina, ligantes opióides, histamina e neuropeptídeos têm sido implicados na modulação e/ou regulação dos substratos neurais da aversão na SCPd (BRANDÃO et al., 1999). Dentre os neuropeptídeos, as neurocininas, em especial, a Substância P (SP) tem ocupado lugar de destaque (REGOLI, 1987).

A SP foi descoberta por Von Euler e Gaddum no ano de 1931, presente em extratos de cérebro e intestino de equinos, dos quais foi extraída para construir a preparação P, tendo como características apresentar efeito hipotensor, bem como produzir contrações musculares (REGOLI; BOUDON; FAUCHÉRE, 1994). Em 1970 a sequência de aminoácidos da SP foi determinada quando Chang e Leeman a purificaram e sequenciaram como undecapeptídeo com a seguinte sequência de aminoácidos: Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ (MAGGI, 1995; JANECKA et al., 2005). Esse peptídeo pertence à família de neuropeptídeos conhecida como taquicininas, largamente distribuído no sistema nervoso central (SNC), principalmente nas áreas envolvidas nas respostas de medo (como, por exemplo, amígdala, hipocampo e SCP) (DE ARAÚJO; HUSTON; BRANDÃO, 2001a; RUPNIAK et al., 2003). Na SCPd, esse peptídeo foi encontrado em quantidades significativas nas porções lateral e ventral com densa imunoreatividade nos corpos celulares e dendritos (BARBARESI, 1998).

Vários estudos apontam o envolvimento da SP em processos relacionados à dor, estresse, medo, ansiedade, aprendizagem e memória (DREW; MITCHELL; VAUGHAN, 2005; EBNER et al., 2008; MONGEAU et al., 1998; CHAHL, 2006; HASENOHRL et al., 2000). Há evidências obtidas em estudos neuroquímicos que mostram alterações no conteúdo de SP em regiões cerebrais de animais submetidos a estímulos estressores, como, por exemplo, imobilização, isolamento social e choques nas patas (MONGEAU et al., 1998; RUPNIAK et al., 2000). Estes estudos têm mostrado alterações na neurotransmissão por SP no sistema mesolímbico, hipocampo, septo, SCP e hipotálamo de animais expostos a tais eventos aversivos (MONGEAU et al., 1998; RUPNIAK et al., 2000).

Há também evidências de que injeções centrais de SP produzem comportamentos defensivos e alterações cardiovasculares em animais (DUARTE; TESTOLIN; DE LIMA, 2004). Microinjeções de SP na SCPd produziram aversão condicionada ao contexto (AGUIAR; BRANDÃO, 1994), efeito tipo-ansiolítico no labirinto em cruz elevado (LCE) (AGUIAR; BRANDÃO, 1994; AGUIAR; BRANDÃO, 1996; DUARTE; TESTOLIN; DE LIMA, 2004) e redução nas vocalizações ultrassônicas na faixa de 22 kHz (BASSI et al., 2007a). Porém, quando injetada no hipocampo dorsal, causou efeito do tipo-ansiolítico em animais testados no LCE e no campo aberto (CARVALHO et al., 2008).

Diversos autores têm sugerido que os efeitos da SP dependem de qual porção terminal deste peptídeo interage com os receptores. Assim, tem-se que a injeção da porção C-terminal na SCPd causou efeitos aversivos em animais testados no LCE (DE ARAÚJO; HUSTON; BRANDÃO, 2001a). Além disso, foi observado aumento da pressão arterial e taquicardia, efeitos autonômicos característicos da reação de defesa, além de provocar aversão condicionada ao contexto (DUARTE; TESTOLIN; DE LIMA, 2004). Por outro lado, a porção N-terminal deste peptídeo promoveu efeitos distintos do fragmento C-terminal. Quando injetado na SCPd, foram observados efeitos anti-aversivos em ratos testados no LCE (DE ARAÚJO, HUSTON, BRANDÃO, 2001a,b; DUARTE; TESTOLIN; DE LIMA, 2004).

Na década de 1980, após intensa investigação farmacológica, Regoli (1987) propôs a existência de três tipos de receptores para as neurocininas (NK): NK-1, NK-2 e NK-3. Estes foram mais tarde identificados por clonagem molecular e análise de sequências em várias espécies de mamíferos (JANECKA et al., 2005; REGOLI, 1987).

Estudos moleculares, comportamentais e farmacológicos com receptores NK-1, têm mostrado sua presença em várias regiões cerebrais, tais como tálamo, hipotálamo, amígdala, SCP, *nucleus accumbens*, hipocampo e núcleos da rafe (SARIA, 1999; YIP; CHAHL, 2001). O conhecimento das funções fisiológicas destes receptores aponta para o envolvimento da SP em diversos distúrbios tais como doença de Parkinson, doença de Huntington, esquizofrenia, ansiedade, depressão (KRAMER et al., 1998; BONDY et al., 2003; DABLEH et al., 2005), fobias (MICHELGARD et al., 2007), narcolepsia (STRITTMATTER et al., 1996) e epilepsia (LIU et al., 1999).

Desde os anos oitenta, são feitas modificações nas sequências de peptídios para a geração de antagonistas seletivos, e dentre os já produzidos, o primeiro e um dos mais utilizados é o antagonista para receptores NK-1, Spantide I (MAGGI et al., 1991; MAGGI, 1995; SARIA, 1999). Posteriormente, foram sintetizados dois derivados, tão potentes e seletivos como o anterior, que ficaram conhecidos como Spantide II e Spantide III (MAGGI et al., 1991; JANECKA et al., 2005).

Estudos recentes sugerem que os níveis de ansiedade, em animais, podem ser modulados via receptores NK-1 e NK-2 no SNC (HAGAN et al., 1993; WALSH et al., 1995; DUARTE; TESTOLIN; DE LIMA, 2004). Em ratos, o bloqueio de receptores NK-1 tem mostrado ação do tipo-ansiolítica em diferentes testes animais de ansiedade (como, por exemplo, LCE) (TEIXEIRA et al., 1996) e no teste de interação social (FILE, 1997). Em estudos com camundongos knockout, o mesmo foi observado no LCE e em testes de vocalizações induzidas pela separação maternal (RUPNIAK et al., 2000; SANTARELLI et al., 2001). Efeitos antidepressivos também foram relatados com estes antagonistas de receptores NK-1 (EBNER et al., 2008). O estudo da administração dos antagonistas NK-1, NK-2 e NK-3, respectivamente, CP-

96,345; SR 48968 e SR 142801, mostrou diminuição do tempo de imobilidade desses animais durante o teste do nado forçado quando comparado aos animais controle. Os efeitos destes antagonistas foram similares àqueles produzidos por antidepressivos clássicos, como amitriptilina e desipramina (DABLEH et al., 2005).

Estudos experimentais com antagonistas de receptores NK-1 têm provido suporte à exploração da potencial utilidade clínica destes compostos no tratamento de certas patologias, como êmese, enxaqueca, inflamação periférica e distúrbios psiquiátricos (LONGMORE; HILL; HARGREAVES, 1997; RIBEIRO et al., 1999; SARIA, 1999; RUPNIAK et al., 2000; CHAHL, 2006).

A distribuição de receptores NK-3 no SNC de várias espécies animais é intensa. Diversas áreas cerebrais apresentam esses receptores, tais como o córtex cerebral, amígdala, hipocampo, tálamo, hipotálamo, SCP e *locus coeruleus* (MAGGI, 1995; DING et al., 1996; RIBEIRO et al., 1999; MASSI; PANOCKA; DE CARO, 2000; YIP; CHAHL, 2001). Em algumas áreas, ocorre sobreposição com a distribuição dos receptores NK-1 (DABLEH et al., 2005).

O primeiro antagonista peptídico para receptores NK-3 sintetizado foi o [Trp⁷, βAla⁸] NKA [4-10] (R486), o qual apresentou baixa afinidade para esses receptores. Em seguida, surgiu o GR138676, que apresentou afinidade tanto por receptores NK-3 como para NK-1. O R-820, por outro lado, apresentou maior afinidade por receptores NK-3, porém, com baixa solubilidade em água, dificultando sua administração intracerebroventricular (MASSI; PANOCKA; DE CARO, 2000). Já em 1995, o primeiro potente e seletivo antagonista não-peptídico para receptores NK-3 foi sintetizado e recebeu o nome de SR-142801. Posteriormente, outros compostos foram sintetizados, como por exemplo, o SB-223412. Contudo, estes compostos apresentavam moderada penetração no SNC de ratos, o que dificultava a

investigação do seu papel fisiológico, assim como, o seu potencial terapêutico (SARAU et al., 2000). Para resolver este problema, um análogo foi sintetizado, e recebeu o nome de SB 222200 (MASSI; PANOCKA; DE CARO, 2000; SARAU et al., 2000). Esse antagonista atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, mostra alta seletividade e afinidade para receptores NK-3, o que faz dele uma ferramenta útil e apropriada para a investigação do papel fisiológico de receptores NK-3 em diversos modelos animais.

Estudos recentes com agonistas e antagonistas de receptores NK-3 mostraram resultados contraditórios. Salomé et al. (2006), evidenciou que o bloqueio desses receptores mostra efeitos do tipo-ansiolítico e antidepressivo em gerbilos submetidos, respectivamente, aos modelos de interação social e imobilidade tônica, enquanto que o mesmo efeito foi observado com a administração de agonistas desses receptores nos animais sujeitos ao teste do LCE (RIBEIRO et al., 1999). Da mesma forma, efeito antidepressivo foi obtido com agonistas NK-3 em camundongos (PANOCKA et al., 2001), porém em ratos, este mesmo efeito foi obtido apenas com antagonistas (DABLEH et al., 2005). Injeções do agonista de receptores NK-3, senktide, intra-SCPd causaram aumento significativo no comportamento exploratório de ratos, acompanhado por hiperalgesia e aumento no número de vocalizações ultrassônicas na faixa de 22 kHz (BASSI et al., 2009). Diante de evidências do envolvimento de receptores NK-1 e NK-3 na modulação da reação de defesa, o presente estudo tem o objetivo de investigar os efeitos da administração intra-SCPd de antagonistas desses receptores sobre a aversão induzida pela estimulação elétrica da SCPd em ratos com e sem experiência aversiva prévia.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar o papel da mediação neurocinérgica da SCPd no medo condicionado e no medo incondicionado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o papel da mediação neurocinérgica através de receptores NK-1 e NK-3 da SCPd sobre a expressão de respostas defensivas induzidas pela estimulação elétrica dessa estrutura em ratos.
- Estudar a mediação por mecanismos neurocinérgicos da SCPd em animais expostos concomitantemente ao condicionamento de medo contextual e estimulação elétrica da SCPd.

EXPERIMENTO I

*Efeitos do Spantide, SB 222200 e Senktide sobre o comportamento defensivo
induzido pela estimulação elétrica da SCPd*

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

No experimento I foram utilizados 68 ratos Wistar machos, pesando entre 250 a 280g, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo - *Campus* Ribeirão Preto. Esses animais foram alojados em grupos de 4 animais por caixa de polipropileno (32 × 42 × 18 cm), forradas com maravalha e com livre acesso à água e alimento durante todo o período de experimento. Os animais foram mantidos no biotério setorial do Laboratório de Neuropsicofarmacologia com temperatura controlada ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo de iluminação artificial claro/escuro de 12/12 h, com início do período claro às 07:00 horas. Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo e executados em conformidade com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC).

2. CIRURGIA

Os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal (i.p.), com tribromoetanol (Sigma, MO, EUA) na dose de 250 mg/Kg. Após tricotomia na região da cabeça, foram fixados a um aparelho estereotáxico (David-Kopf, Tujunga, USA) pelo rochedo temporal e incisivos superiores, sendo a barra dos incisivos ajustada a 3,3 mm abaixo da linha interaural. Em seguida, foi realizada a antissepsia com álcool iodado a 1% e uma injeção subcutânea de 0,2 mL de lidocaína 2% (SS White, RJ, Brasil) foi aplicada na região da incisão. Já com a superfície craniana exposta foram feitos dois orifícios, com o auxílio de um perfurador ósseo, para fixação de parafusos de aço inoxidável que ancoraram a prótese de acrílico ao crânio do animal. Logo após, um orifício foi feito para a implantação de um quimitrodo unilateral feito com uma cânula-guia de aço inoxidável (0,6 mm de diâmetro externo e 15 mm de comprimento) ligada a um eletrodo bipolar na SCPd. O eletrodo foi feito com fio de aço inoxidável, com

160 µm de diâmetro, isolado, exceto no corte transversal da ponta, a qual se estendia 1 mm abaixo da porção final da cânula-guia. O fio do eletrodo foi conectado a um pino macho ligado a um cabo elétrico flexível, usado para a estimulação elétrica encefálica. Considerando-se lâmbda como referência e angulação de 16°, as coordenadas utilizadas de acordo com o atlas Paxinos e Watson (2007) foram: ântero-posterior (AP) = 0,1 mm, médio-lateral (ML) = 1,9 mm e dorso-ventral (DV) = 5,2 mm. O quimitrodo foi fixado ao crânio com resina acrílica (JET, Brasil) e cada cânula-guia recebeu um fio de aço inoxidável para protegê-la de obstrução. Esse fio só foi retirado no momento da sessão experimental.

Para evitar infecções após a cirurgia, cada animal recebeu uma injeção de Pentabiótico veterinário (60.000 UI; Fort Dodge, Brasil), via intramuscular, e uma injeção do anti-inflamatório e analgésico Banamine (flunixinina meglumina, Schering-Plough Veterinária, Brasil), via subcutânea, ambos na dose de 0,2 mL. Os animais retornaram para o biotério e os experimentos só foram realizados 5 dias após a cirurgia.

3. EQUIPAMENTOS

3.1. Caixa Experimental

Para o procedimento de estimulação elétrica da SCPd foi utilizada uma caixa experimental (25 × 25 × 15 cm), feita com paredes de acrílico preto, com exceção do teto e da parede frontal que foram feitas com acrílico transparente. O piso da caixa contém 36 barras de aço inoxidável com 2 mm de diâmetro, espaçadas 1 cm uma das outras. O compartimento experimental foi iluminado por uma lâmpada fluorescente de 40 W (80 lux no nível do piso). A caixa experimental ficava em cima de uma bancada ao lado do estimulador de corrente contínua.

3.2. Estimulador e Osciloscópio

Para o procedimento de estimulação elétrica da SCPd foi utilizado um estimulador de corrente contínua de onda senoidal (ESF-12, DelVecchio, Brasil). A corrente de estimulação foi monitorada a partir da medida da queda de tensão em um resistor de 1 K Ω com o auxílio de um osciloscópio (Philips, E.U.A).

4. DROGAS

As drogas utilizadas neste estudo foram antagonista de receptor NK-1: acetato SP - [D-Arg¹, D-Trp^{7,9}, Leu¹¹] – Substância P (Spantide I, Sigma, Brasil), antagonista de receptores NK-3: (S) - 3 - metil - 2 - fenil - N - (1 - fenilpropil) - 4 - quinolinecarboxamida (SB 222200, Sigma, Brasil) e agonista de receptores NK- 3 : succinil – [Asp⁶, Me – Phe⁸] SP₆₋₁₁ (Senktide, Sigma, Brasil).

Spantide e senktide foram diluídos em PBS (tampão fosfato salina – pH 7,4) e SB 222200 foi primeiramente dissolvido em DMSO (dimetil sulfoxido, Sigma, Brasil) e diluído em PBS. As doses utilizadas foram de 100 pmol/0,2 μ L para o spantide, 50 pmol/0,2 μ L e 100 pmol/0,2 μ L para o SB 222200 e 50 pmol para o senktide. As doses das drogas, assim como o tempo de espera após as microinjeções foram baseadas em estudos anteriores deste laboratório (BASSI et al., 2007a,b; BASSI et al., 2009).

5. MICROINJEÇÕES DE DROGAS

Um volume total de 0,2 μ L foi usado para injeções das drogas na SCPd. Os animais controle receberam o mesmo volume de PBS ou DMSO. A agulha de injeção usada foi uma fina agulha dental conectada a uma seringa Hamilton de 5 μ L através de um tubo de polietileno. A agulha de injeção foi introduzida através da

cânula-guia, até ultrapassá-la em 1 mm. As soluções foram injetadas na SCPd (0,2 $\mu\text{L}/\text{min}$), através de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, South Natick, MA, E.U.A). O deslocamento de uma bolha de ar dentro do tubo de polietileno (PE-10; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, E.U.A) conectando a seringa à agulha intracerebral foi usado para monitorar a microinjeção. A agulha foi mantida no local por 1 minuto após a microinjeção para evitar o refluxo da droga.

6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

6.1. Medida dos Limiares Aversivos

Cinco dias após a cirurgia estereotáxica para implantação do quimitrodo, cada animal passou por um período de 5 minutos de habituação antes do início da sessão. Em seguida, a SCPd foi estimulada eletricamente com a corrente elétrica apresentada em intervalos de 1 minuto com intensidade aumentada em passos de 5 μA para determinação dos limiares aversivos de congelamento e fuga.

O limiar de congelamento foi operacionalmente definido como a menor intensidade de corrente capaz de produzir imobilidade durante a estimulação elétrica. A intensidade de corrente que produziu corridas (galopes) ou saltos em duas tentativas consecutivas foi considerada como limiar de fuga. Os animais com limiar de fuga acima de 120 μA (pico a pico) foram descartados do estudo. Para investigar os efeitos comportamentais da última estimulação elétrica que produziu o comportamento de fuga, os animais permaneceram na caixa experimental por 8 minutos, sem estimulação, durante os quais o comportamento de congelamento foi anotado. Este comportamento é referido como congelamento pós-estimulação, conforme descrito anteriormente (VIANNA et al., 2001a; VIANNA; LANDEIRA-

FERNANDEZ; BRANDÃO, 2001b).

Essas medidas foram consideradas como linha de base e em seguida os animais receberam uma injeção intracerebral de PBS, spantide, SB 222200 ou senktide na SCPd.

Dez minutos após as microinjeções, os animais foram novamente expostos à caixa experimental e novos limiares defensivos de congelamento e fuga foram determinados pela estimulação elétrica da SCPd, assim como o tempo de congelamento pós-estimulação.

7. HISTOLOGIA

Ao final dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral (500 mg/Kg, i.p., VETEC, Brasil) e a seguir, o corante Azul de Evans (2%) foi microinjetado na SCPd no mesmo volume das drogas anteriormente utilizadas. Em seguida, os animais foram perfundidos por via intracardíaca com solução salina (0,9%) seguida de solução de formalina (4%). Os encéfalos foram removidos e mantidos em sacarose (30%) por, pelo menos, três dias. Com o auxílio de um criostato (CM 1800, Leica, Alemanha) foram feitos cortes histológicos dos encéfalos em secções coronais de 60 µm. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e corados com violeta de cresila (5%, Sigma) segundo protocolo de *Nissl*, para localização do ponto exato onde estava a ponta do eletrodo e o sítio de microinjeção das drogas de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2007).

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

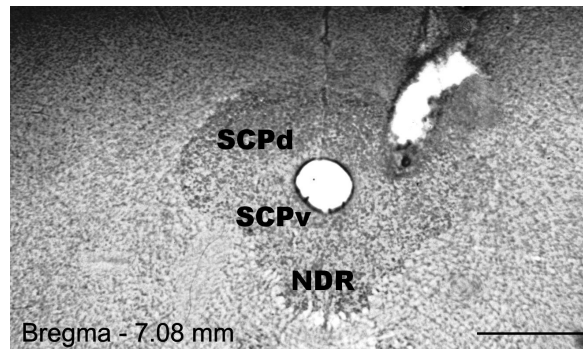
Os dados são apresentados como média + EPM. Para cada droga, os valores referentes às diferenças pré e pós-tratamentos sobre os limiares aversivos foram

analisados por meio do teste t de Student e a duração do tempo de congelamento pós-estimulação foi analisada através do teste t de Student para grupos independentes ou pela ANOVA de uma via quando três ou mais grupos foram comparados. Diferenças significativas entre grupos foram avaliadas através do teste *post-hoc* de Bonferroni. Um valor de p igual ou menor que 0,05 foi considerado significativo.

RESULTADOS

A figura 1 mostra uma fotomicrografia representativa de um corte histológico dos sítios de estimulação elétrica na SCPd em ratos (A) e os sítios de microinjeção em diagramas modificados do Atlas de Paxinos e Watson (2007) (B).

A.



B.

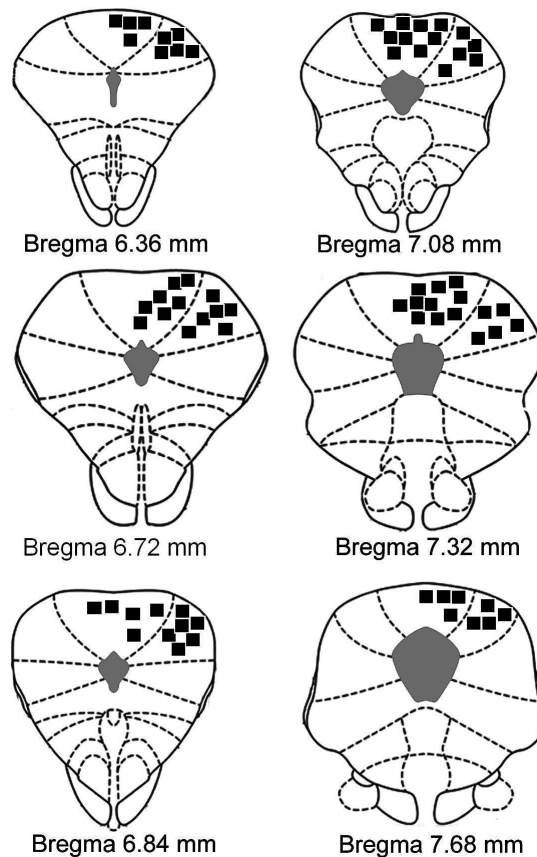


Figura 1. Fotomicrografia ilustrando a ponta do eletrodo (A) e os sítios de microinjeção das drogas (B) localizados na substância cinzenta periaquedutal dorsal. Vários sítios de microinjeção foram omitidos devido à sobreposição dos pontos. SCPd = substância cinzenta periaquedutal dorsal; SCPv = substância cinzenta periaquedutal ventral; NDR = núcleo dorsal da rafe. Barra com escala de 800 μ m.

A Figura 2 apresenta o efeito do spantide sobre os limiares aversivos e o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPd de ratos ingênuos. Os resultados referentes aos limiares de congelamento e fuga são apresentados como a diferença dos limiares entre o teste e a linha de base (Δ). A média dos limiares aversivos de congelamento e fuga dos animais tratados com PBS (controle) ou spantide está representada nas figuras 2A e 2B, respectivamente. O teste *t* de Student mostrou que o tratamento com spantide promoveu aumento significativo nos limiares de congelamento ($t_{(1,18)} = 6,72$; $p < 0,05$) e fuga ($t_{(1,18)} = 5,77$; $p < 0,05$), mas não houve efeito do tratamento sobre o tempo de congelamento pós-estimulação ($t_{(1,18)} = 0,40$; $p > 0,05$). Os valores dos limiares na linha de base para congelamento ($t_{(1,18)} = 0,16$; $p > 0,05$) e fuga ($t_{(1,18)} = 0,56$; $p > 0,05$) não foram estatisticamente diferentes (tabela 1).

Tabela 1. Média \pm EPM dos valores de linha de base (μ A) correspondentes aos limiares de congelamento e fuga determinados em grupos de animais que foram microinjetados na SCPd com PBS, spantide, DMSO, SB 222200 50 μ mol, SB 222200 100 μ mol e senktide 50 μ mol.

Tratamentos	Congelamento	Fuga
PBS	58,00 \pm 5,84	75,00 \pm 7,72
Spantide	61,50 \pm 6,46	69,50 \pm 5,89
DMSO	71,50 \pm 5,53	77,50 \pm 5,34
SB 222200 50 μ mol	57,00 \pm 5,18	63,50 \pm 5,48
SB 222200 100 μ mol	59,50 \pm 6,03	66,00 \pm 6,58
Senktide	52,78 \pm 4,62	57,78 \pm 4,62

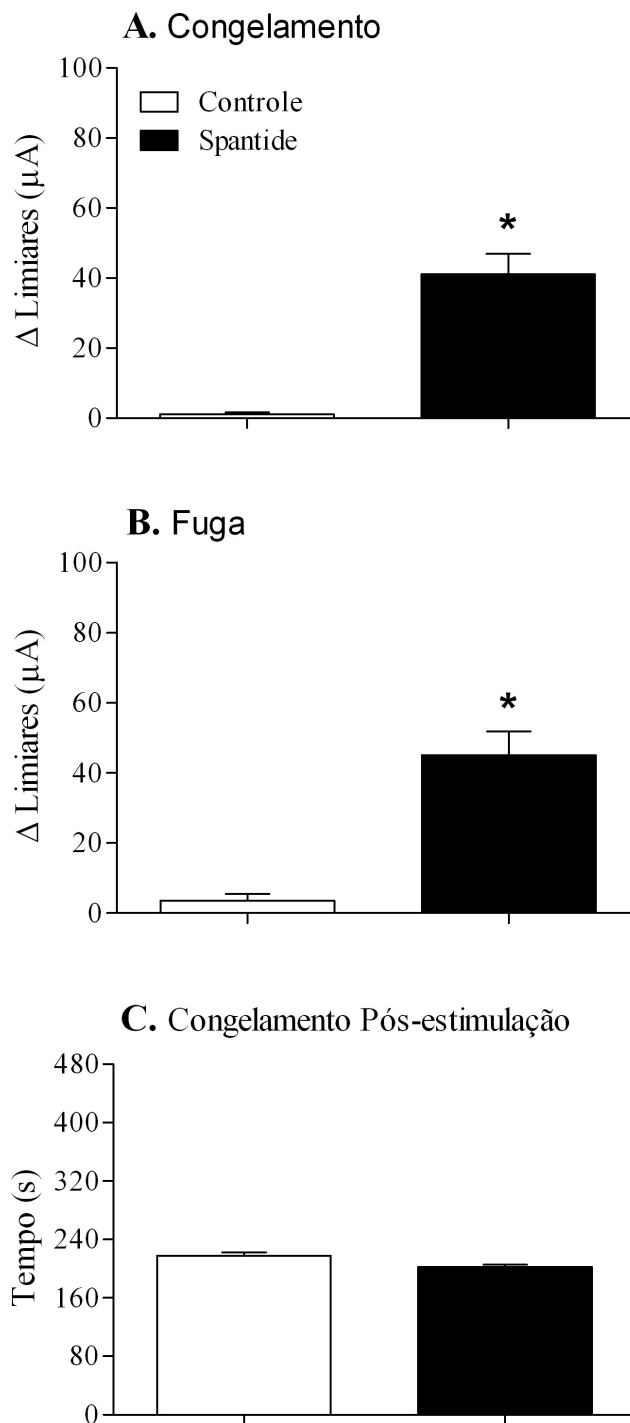


Figura 2. Efeitos do spantide sobre os limiares aversivos determinados pela estimulação elétrica da SCPd em animais ingênuos. Resultados apresentados como média + EPM da diferença entre os limiares aversivos (teste - linha de base) para congelamento (A) e fuga (B) em animais tratados com PBS e spantide (100 μ mol). C. Tempo de congelamento pós-estimulação. N =10 para ambos os grupos. *P < 0,05, em relação ao grupo controle, de acordo com o Teste *t* de Student.

A Figura 3 apresenta as médias + EPM dos limiares aversivos de congelamento e fuga, assim como o tempo de congelamento pós-estimulação determinados pela estimulação elétrica da SCPd em animais ingênuos microinjetados com DMSO (controle), SB 222200 50 pmol ou SB 222200 100 pmol na SCPd. Os resultados referentes aos limiares de congelamento e fuga são apresentados como diferença dos limiares entre o teste e a linha de base (Δ). A média dos limiares aversivos de congelamento e fuga dos animais está representada nas figuras 3A e 3B e o tempo de congelamento pós-estimulação em 3C. A análise de variância (ANOVA) de uma via, aplicada a estes dados mostrou que os tratamentos causaram aumento significativo nos limiares de congelamento ($F_{(2,27)} = 15,44$; $p < 0,05$) e fuga ($F_{(2,27)} = 10,97$; $p < 0,05$), mas não promoveram alterações no tempo de congelamento pós-estimulação ($F_{(2,27)} = 1,63$; $p > 0,05$). Comparações *post-hoc* revelaram que o SB 222200 100 pmol promoveu aumento nos limiares de congelamento e fuga ($p < 0,05$). A linha de base para os limiares de congelamento ($F_{(2,27)} = 1,92$; $p > 0,05$) e (fuga $F_{(2,27)} = 1,64$; $p > 0,05$) não foram diferentes estatisticamente (Tabela 1).

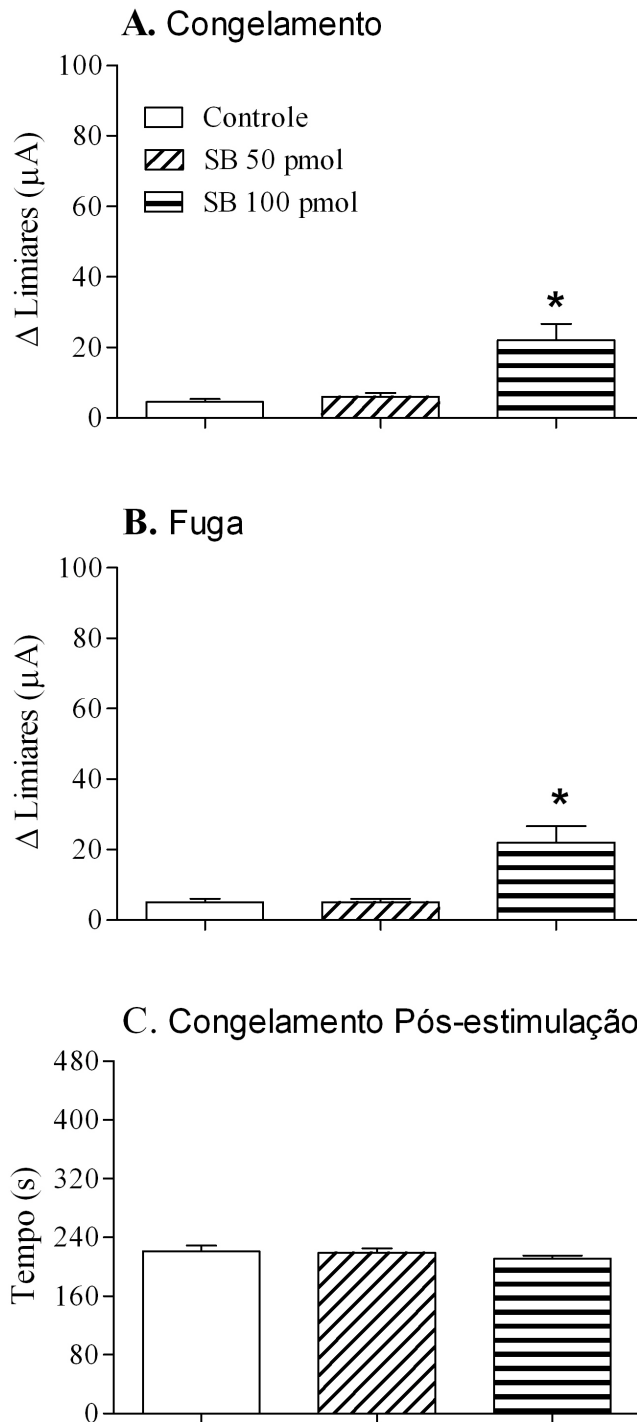


Figura 3. Efeitos do SB 222200 sobre os limiares aversivos determinados pela estimulação elétrica da SCPd em animais ingênuos. Resultados apresentados como média + EPM da diferença entre os limiares aversivos (teste - linha de base) para congelamento (A) e fuga (B) em animais tratados com DMSO (controle), SB 222200 (50 pmol) e SB 222200 (100 pmol). C. Tempo de congelamento pós-estimulação. N= 10 para todos os grupos. *P < 0,05, em relação ao grupo controle (teste *post-hoc* de Bonferroni).

A Figura 4 apresenta o efeito do senktide sobre os limiares aversivos e o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPd em ratos sem experiência aversiva prévia. Os resultados referentes aos limiares de congelamento e fuga são apresentados como a diferença dos limiares entre o teste e a linha de base (Δ). A média dos limiares aversivos de congelamento e fuga dos animais tratados está representada nas figuras 4A e 4B e o tempo de congelamento pós-estimulação na figura 4C. O teste *t* de Student mostrou que os tratamentos não mudaram significativamente os limiares de congelamento ($t_{(1,16)} = 1,26$; $p > 0,05$) e fuga ($t_{(1,16)} = 0,17$; $p > 0,05$), assim como o tempo de congelamento pós-estimulação ($t_{(1,16)} = 2,04$; $p > 0,05$). Os valores de linha de base para congelamento ($t_{(1,16)} = 0,83$; $p > 0,05$) e fuga ($t_{(1,16)} = 2,02$; $p > 0,05$) não foram estatisticamente diferentes (Tabela 1).

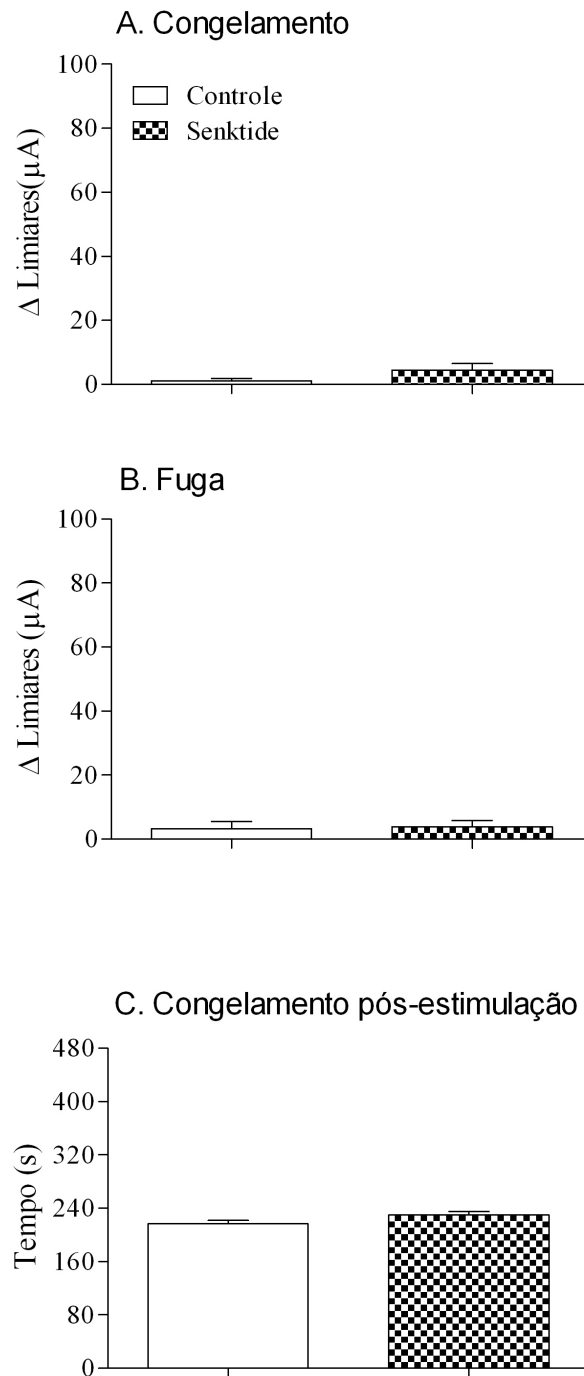


Figura 4. Efeitos do senktide sobre os limiares aversivos determinados pela estimulação elétrica da SCPd em animais ingênuos. Resultados apresentados como média + EPM da diferença entre os limiares aversivos (teste - linha de base) para congelamento (A) e fuga (B) em animais tratados com PBS (controle) e senktide (50 pmol). C. Tempo de congelamento pós-estimulação. N = 9 para ambos os grupos.

EXPERIMENTO II

*Influência do Spantide e do SB 222200 100 pmol sobre o comportamento
exploratório de animais no campo aberto*

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

No experimento II foram utilizados 24 ratos Wistar machos, pesando entre 250 e 280 g, conforme descrito no experimento I.

2. CIRURGIA

Conforme descrito no experimento I.

3. EQUIPAMENTOS

3.1. Campo Aberto

Este aparato experimental consiste de uma arena circular feita de acrílico transparente, com 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura. O compartimento experimental foi mantido em uma sala isolada e iluminada com uma lâmpada incandescente (80 lux no nível do piso). A arena foi colocada sobre uma base dividida em 12 compartimentos de igual tamanho, sendo a área central composta por 4 compartimentos e a periferia composta por 8 compartimentos. Uma câmera de vídeo acoplada a um circuito de TV registrava o comportamento dos animais durante todo o experimento.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Antes de ser exposto ao aparato experimental, cada animal foi colocado em uma caixa forrada com maravalha, onde recebeu a microinjeção intra-SCPd de DMSO, spantide ou SB 222200, ambas drogas na dose de 100 pmol/0,2 µL. Em seguida, cada animal foi colocado no centro do campo aberto permanecendo por 10 minutos. O comportamento exploratório dos animais foi analisado através das

seguintes medidas: número de cruzamentos, levantamentos e tempo de permanência no centro ou na periferia da arena.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média + EPM. Os valores referentes às medidas comportamentais dos animais no campo aberto após os tratamentos foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via. Diferenças significativas entre grupos foram avaliadas através do teste *post-hoc* de Bonferroni. Um valor de p igual ou menor que 0,05 foi considerado significativo.

RESULTADOS

A figura 5 apresenta os efeitos do spantide e do SB 222200 na dose de 100 pmol sobre o comportamento exploratório dos animais no campo aberto. A ANOVA de uma via mostrou uma diminuição no número de cruzamentos ($F_{(2,21)} = 11,56$; $p < 0,05$) e levantamentos ($F_{(2,21)} = 3,74$; $p < 0,05$). A análise *post-hoc* mostrou que houve redução desses comportamentos nos animais tratados com SB 222200.

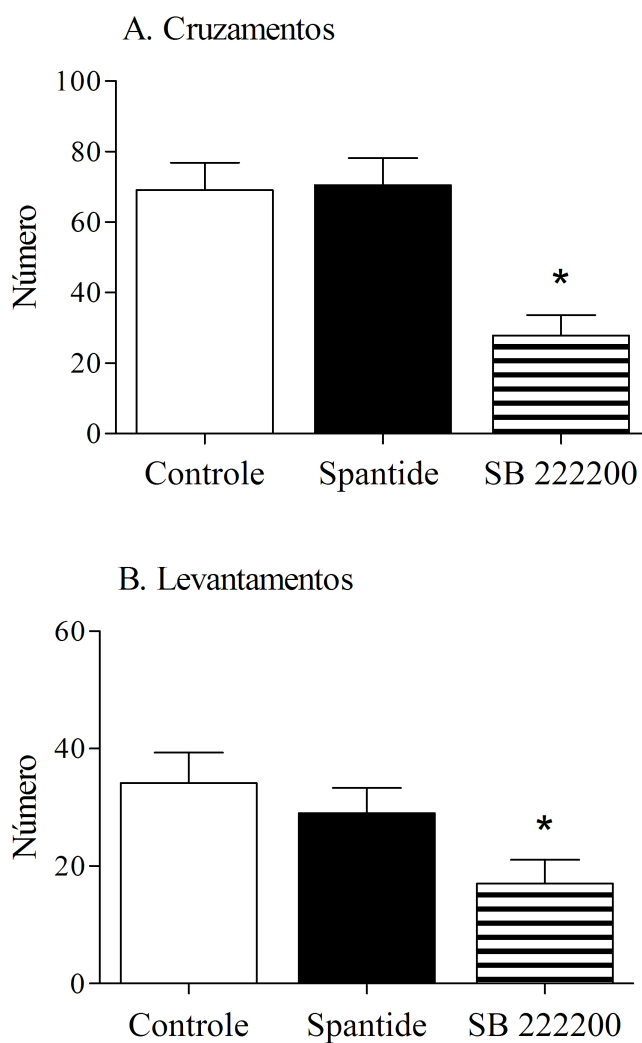


Figura 5. Número de cruzamentos (A) e levantamentos (B) no teste do campo aberto. Os animais receberam microinjeções de PBS ou spantide 100 pmol na SCPd. Resultados apresentados como média + EPM. N= 8 para todos os grupos. *P < 0,05, em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida teste Bonferroni).

EXPERIMENTO III

*Influência do condicionamento contextual sobre os efeitos do Spantide, SB
222200 e Senktide no comportamento defensivo induzido pela estimulação
elétrica da SCPd*

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

No experimento III foram utilizados 58 ratos Wistar machos, pesando entre 250 e 280 g, conforme descrito no experimento I.

2. CIRURGIA

Conforme descrito no experimento I.

3. EQUIPAMENTOS

3.1. Caixa de Condicionamento Contextual Aversivo

O teste de condicionamento de medo contextual aversivo utilizado neste estudo foi o pareamento de choques elétricos nas patas no ambiente da caixa experimental. Para isso, foi utilizada uma caixa de esquiva (30 × 48 × 25 cm) feita com paredes de acrílico preto, exceto o teto e parede frontal constituídos de acrílico transparente. O piso contém 36 barras de aço inoxidável de 2 mm de diâmetro espaçadas por 1 cm uma das outras. Este ambiente foi denominado “mesmo contexto”. Associada à caixa havia uma fonte de choque AC (Albarsh Instruments, Brasil) com regulador de intensidade que permitiu a apresentação dos choques elétricos nas patas dos animais. Acoplado a caixa havia um processador e uma placa I/O (Insight Equipamentos, Brasil).

A caixa de esquiva encontrava-se inserida em uma câmara de atenuação acústica feita de compensado de madeira e revestida de Eucatex, com uma janela (15,5 × 15,5 cm) na porta que permitia a visualização dos animais e iluminada por uma lâmpada vermelha de 15 W em seu interior.

3.2. Arena Circular

Para a medida do tempo de congelamento contextual e limiares aversivos no “contexto diferente” foi utilizada uma arena circular (60 cm de diâmetro e 50 cm de altura) feita de acrílico transparente com o compartimento experimental iluminado por uma lâmpada fluorescente de 40W (80 lux no nível do piso). A arena encontrava-se em cima de uma bancada ao lado do estimulador de corrente contínua.

4. DROGAS

Como descrito no experimento I, exceto para o SB 222200 que foi utilizado neste experimento somente na dose de 50 pmol.

5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1. Medo Condicionado Contextual

5.1.1. Treino

Um dia após a estimulação elétrica para a determinação dos limiares aversivos, os animais foram submetidos ao condicionamento de medo contextual (choques elétricos inescapáveis nas patas). Este procedimento tem sido rotineiramente usado neste laboratório (BROIZ; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2008; OLIVEIRA et al., 2007; VIANNA et al., 2001a, VIANNA; LANDEIRA-FERNANDEZ; BRANDÃO, 2001b).

O congelamento é consistentemente produzido apenas em animais colocados no contexto onde receberam previamente choque nas patas. Cada animal foi colocado na caixa experimental e depois de 5 minutos de habituação, recebeu 10 choques nas patas (0,6 mA, 1s). Cada animal foi removido da caixa dois minutos após o último choque. A sessão treino durou 15 minutos.

5.2. Microinjeção

Conforme descrita no experimento I.

Foi realizada 24 horas após o condicionamento contextual aversivo e 10 minutos antes do início da sessão teste. Cada grupo recebeu uma injeção de PBS, DMSO, spantide, SB 222200 ou senktide. Em seguida, os animais foram colocados na caixa experimental para avaliação das respostas defensivas.

5.3. Teste

Nesta etapa do experimento III os animais foram divididos em dois grupos:

Mesmo Contexto – animais testados no mesmo contexto onde anteriormente receberam choques nas patas (caixa de esquiwa).

Contexto Diferente – animais testados em um contexto diferente daquele em que receberam choques nas patas (arena circular).

As sessões-teste foram conduzidas sem apresentação de choques nas patas. A medida usada para avaliar o medo contextual foi o tempo que os ratos passaram em congelamento durante a sessão de 3 minutos. O congelamento foi definido como a ausência total de movimento do corpo, exceto pela respiração. Em seguida, os limiares aversivos de congelamento e fuga, assim como, o tempo de congelamento pós-estimulação foram redeterminados para avaliação da reatividade da SCPd à estimulação elétrica.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média + EPM. Os valores referentes ao tempo de congelamento contextual, limiares aversivos e tempo de congelamento pós-estimulação foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) de

duas vias, considerando tratamentos (PBS, DMSO, spantide, SB 222200 e senktide) e contextos (mesmo e diferente) como fatores. Diferenças significativas entre grupos foram avaliadas com o teste *post-hoc* de Bonferroni. Um valor de p igual ou menor que 0,05 foi considerado significativo.

RESULTADOS

A figura 6 refere-se ao teste do condicionamento de medo contextual aversivo medido pelo tempo de congelamento apresentado pelos animais durante os três primeiros minutos da sessão teste. Os dados são apresentados como média + EPM de tempo de congelamento em animais com experiência aversiva prévia, tratados com PBS (controle) ou spantide no mesmo contexto e no contexto diferente. A ANOVA de duas vias mostrou que o contexto teve um efeito significativo na duração do congelamento ($F_{(1,36)} = 38,06$; $p < 0,05$). Também houve efeito significativo do tratamento ($F_{(1,36)} = 30,43$; $p < 0,05$) e interação entre contextos \times tratamentos ($F_{(1,36)} = 29,02$; $p < 0,05$). Análise *post-hoc* mostrou que o spantide diminuiu a expressão do medo condicionado contextual no mesmo contexto comparado ao grupo tratado com PBS.

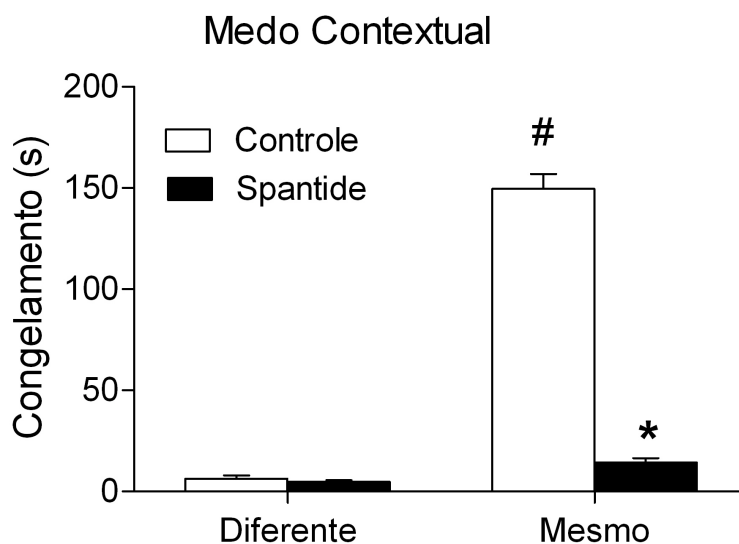


Figura 6. Efeitos do condicionamento de medo contextual em ratos tratados com PBS (controle) ou spantide (100 pmol) submetidos ao mesmo contexto ou ao contexto diferente onde receberam previamente choques nas patas. Resultados apresentados como média + EPM do tempo de congelamento contextual (segundos). N= 10 para todos os grupos em ambos os contextos. *P < 0,05 em relação ao grupo controle testado no mesmo contexto. # P < 0,05 em relação à diferença do correspondente grupo testado no contexto diferente (ANOVA de duas vias), teste *post-hoc* de Bonferroni.

As Figuras 7A e 7B apresentam os efeitos do PBS (controle) e do spantide sobre os limiares aversivos de congelamento e fuga determinados pela estimulação elétrica da SCPd em animais submetidos ao condicionamento contextual aversivo e testados no mesmo contexto ou no contexto diferente, respectivamente. A análise de variância (ANOVA) de duas vias mostrou um efeito significativo do tratamento nos limiares de congelamento e fuga ($F_{(1,36)} = 52,84$ e $51,02$; $p < 0,05$ respectivamente). Não houve efeito do contexto ($F_{(1,36)} = 1,30$ e $1,52$, para congelamento e fuga, respectivamente; $p > 0,05$) ou interação entre tratamento \times contexto ($F_{(1,36)} = 0,99$ e $1,07$, para congelamento e fuga, respectivamente; $p > 0,05$). Análise *post-hoc* revelou que o spantide aumentou os limiares aversivos de congelamento e fuga em ambos os contextos ($p < 0,05$). A Figura 7C mostra a duração do congelamento pós-estimulação. A ANOVA indicou que não houve efeitos significativos dos tratamentos ($F_{(1,36)} = 0,83$; $p > 0,05$), contextos ($F_{(1,36)} = 0,69$; $p > 0,05$) ou interação condições \times tratamentos ($F_{(1,36)} = 0,90$, $p > 0,05$). Os valores de linha de base para os limiares de congelamento ($F_{(1,36)} = 1,04$; $p > 0,05$) e fuga ($F_{(1,36)} = 0,72$; $p > 0,05$) não foram estatisticamente diferentes como mostra a tabela 2.

Tabela 2. Média \pm EPM dos valores de linha de base (μ A) correspondentes aos limiares de congelamento e fuga determinados em grupos de animais que receberam microinjeções de PBS, spantide, DMSO, SB 222200 50 μ mol e senktide na SCPd em ratos que foram submetidos anteriormente ao condicionamento de medo contextual, testados no mesmo contexto ou no contexto diferente.

Tratamentos	Mesmo Contexto		Contexto Diferente	
	Congelamento	Fuga	Congelamento	Fuga
PBS	58,00 \pm 4,55	65,00 \pm 4,78	61,00 \pm 6,23	67,50 \pm 6,25
Spantide	49,50 \pm 4,63	58,00 \pm 4,85	55,00 \pm 4,66	61,00 \pm 5,10
DMSO	71,50 \pm 5,53	77,50 \pm 5,34	72,50 \pm 8,01	78,00 \pm 8,04
SB 222200 50 μmol	57,00 \pm 7,84	63,00 \pm 8,05	67,50 \pm 6,51	74,50 \pm 6,81
Senktide	52,78 \pm 4,62	57,78 \pm 4,62	51,11 \pm 4,67	56,11 \pm 4,67

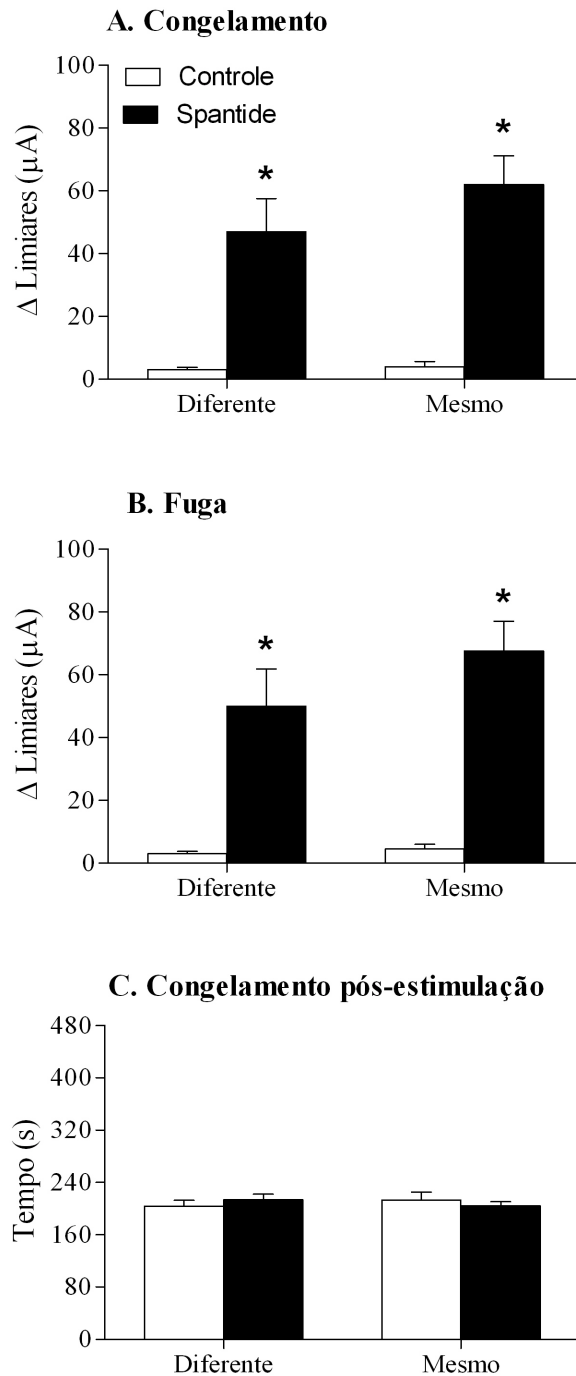


Figura 7. Efeitos do spantide sobre os limiares aversivos determinados pela estimulação elétrica da SCPd em ratos submetidos ao mesmo contexto ou ao contexto diferente onde receberam previamente choques nas patas. Diferenças médias entre limiares de congelamento (A) e fuga (B) determinados antes e após microinjeções de PBS (controle) e spantide na SCPd em ratos. C: congelamento pós-estimulação. Resultados expressos como média + EPM. N= 10 para todos os grupos em ambos os contextos. *P < 0,05 em relação ao grupo controle testado no mesmo contexto e no contexto diferente. (ANOVA de duas vias), teste *post-hoc* de Bonferroni.

Como o SB 222200 100 pmol causou um déficit na atividade locomotora de animais ingênuos, como podemos notar nos resultados do campo aberto (Experimento II), esta dose não foi testada em animais com experiência aversiva prévia. Apenas a dose de 50 pmol foi microinjetada em animais submetidos ao condicionamento de medo contextual.

A Figura 8 refere-se ao teste do condicionamento de medo contextual aversivo medido pelo tempo de congelamento apresentado pelos animais durante os três primeiros minutos da sessão teste. Os dados são apresentados como média + EPM de tempo de congelamento em animais com experiência aversiva prévia, tratados com DMSO (controle) ou SB 222200 no mesmo contexto e no contexto diferente. A ANOVA de duas vias mostrou efeitos significativos dos contextos ($F_{(1,36)} = 87,45$; $p < 0,05$), interação entre tratamentos \times contextos ($F_{(1,36)} = 7,49$; $p < 0,05$), mas não houve efeitos significativos dos tratamentos ($F_{(1,36)} = 3,99$; $p > 0,05$). Comparações *post-hoc* evidenciaram que o congelamento foi altamente dependente do contexto previamente pareado com choques ($p < 0,05$).

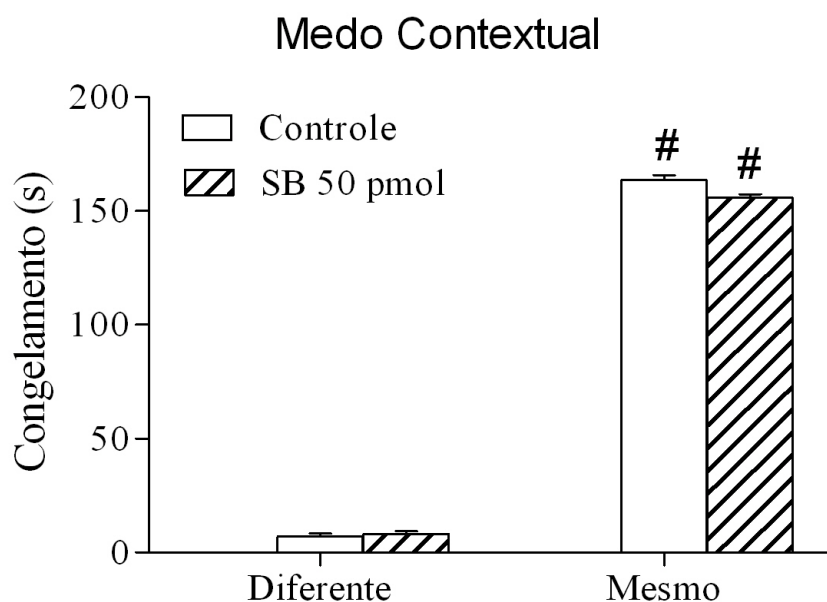


Figura 8. Efeitos do condicionamento de medo contextual medido em ratos tratados com DMSO (controle) ou SB 222200 (50 μ mol) submetidos ao mesmo contexto ou ao contexto diferente onde receberam previamente choques nas patas. Resultados expressos como média + EPM. N= 10 para todos os grupos em ambos os contextos. [#] P < 0,05 em relação à diferença dos correspondentes grupos testados no contexto diferente (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni).

As Figuras 9A e 9B apresentam os efeitos do SB 222200 sobre os limiares aversivos de congelamento e fuga, respectivamente, determinados pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd em animais submetidos ao condicionamento contextual aversivo e testados no mesmo contexto e no contexto diferente. A ANOVA de duas vias mostrou que não houve efeitos significativos dos contextos nos limiares de congelamento e fuga ($F_{(1,36)} = 2,12$ e $1,01$; $p > 0,05$, respectivamente), tratamentos ($F_{(1,36)} = 0,65$ e $0,12$; $p > 0,05$) em ambas as situações, ou interação entre tratamentos \times contextos ($F_{(1,36)} = 0,03$ e $0,24$ para congelamento e fuga, respectivamente; $p > 0,05$). Os valores de linha de base para os limiares de congelamento ($F_{(1,36)} = 1,10$; $p > 0,05$) e fuga ($F_{(1,36)} = 0,79$; $p > 0,05$) não foram diferentes estatisticamente (Tabela 2). A Figura 9C apresenta a média de tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPd de ratos com experiência aversiva prévia. A ANOVA indicou que não houve diferenças significativas de tratamentos ($F_{(1,36)} = 0,003$; $p > 0,05$), contextos ($F_{(1,36)} = 3,55$; $p > 0,05$) ou interação contextos \times tratamentos ($F_{(1,36)} = 0,24$; $p > 0,05$) em todas as condições.

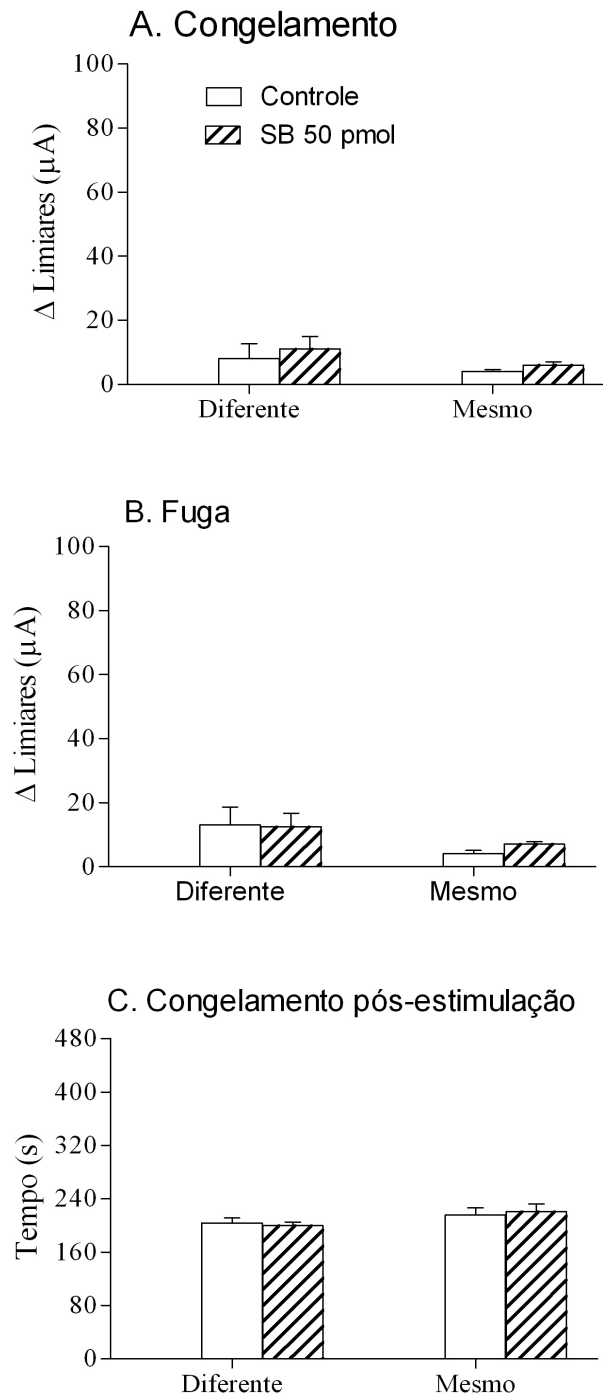


Figura 9. Efeitos do SB 222200 sobre os limiares aversivos determinados pela estimulação elétrica da SCPd em ratos submetidos ao mesmo contexto ou ao contexto diferente onde receberam previamente choques nas patas. Diferenças médias entre limiares de congelamento (A) e fuga (B) determinados antes e após microinjeções de DMSO (controle) e SB 222200 50 pmol na SCPd. C: congelamento pós-estimulação. Resultados expressos como média + EPM. N= 10 para todos os grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos.

A Figura 10 refere-se ao teste do condicionamento de medo contextual aversivo medido pelo tempo de congelamento apresentado pelos animais durante os três primeiros minutos da sessão teste. Os dados são apresentados como média + EPM de tempo de congelamento em animais com experiência aversiva prévia, tratados com PBS (controle) ou senktide no mesmo contexto e no contexto diferente. ANOVA de duas vias mostrou efeitos significativos dos contextos ($F_{(1,32)} = 10,0$; $p < 0,05$), mas não houve efeitos significativos dos tratamentos ($F_{(1,32)} = 7,59$; $p > 0,05$) e da interação entre tratamentos \times contextos ($F_{(1,32)} = 0,04$; $p > 0,05$). Comparações *post-hoc* evidenciaram que o congelamento foi altamente dependente do contexto previamente pareado com choques ($p < 0,05$).

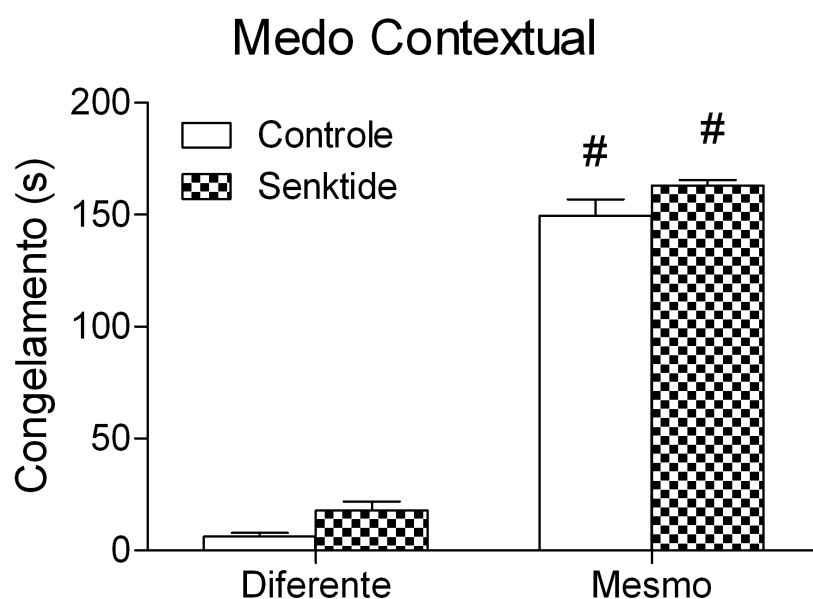


Figura 10. Efeitos do condicionamento de medo contextual em ratos tratados com PBS (controle) ou senktide (50 pmol) submetidos ao mesmo contexto ou ao contexto diferente onde receberam previamente choques nas patas. Resultados expressos como média + EPM do tempo de congelamento contextual em segundos. $N = 9$ para todos os grupos. # $P < 0,05$ em relação à diferença dos correspondentes grupos testados no contexto diferente (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni).

As Figuras 11A e 11B apresentam os efeitos do senktide sobre os limiares aversivos de congelamento e fuga, respectivamente, determinados pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd em animais submetidos ao condicionamento contextual aversivo e testados no mesmo contexto e no contexto diferente. A ANOVA de duas vias mostrou que não houve efeitos significativos dos contextos nos limiares de congelamento e fuga ($F_{(1,32)} = 0,50$ e $0,25$, respectivamente; $p > 0,05$), tratamentos ($F_{(1,32)} = 0,19$ e $0,15$; $p > 0,05$ em ambas as situações), ou interação entre tratamentos \times contextos ($F_{(1,32)} = 0,97$ e $0,82$ para congelamento e fuga, respectivamente; $p > 0,05$). Os valores de linha de base para os limiares de congelamento ($F_{(1,32)} = 2,19$; $p > 0,05$) e fuga ($F_{(1,32)} = 2,52$; $p > 0,05$) não foram diferentes estatisticamente (Tabela 2). A Figura 11C apresenta a média de tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPd de ratos com experiência aversiva prévia. A ANOVA indicou que não houve diferenças significativas de tratamentos ($F_{(1,32)} = 0,05$; $p > 0,05$), contextos ($F_{(1,32)} = 0,09$; $p > 0,05$) ou interação contextos \times tratamentos ($F_{(1,32)} = 0,60$, respectivamente; $p > 0,05$) em todas as condições.

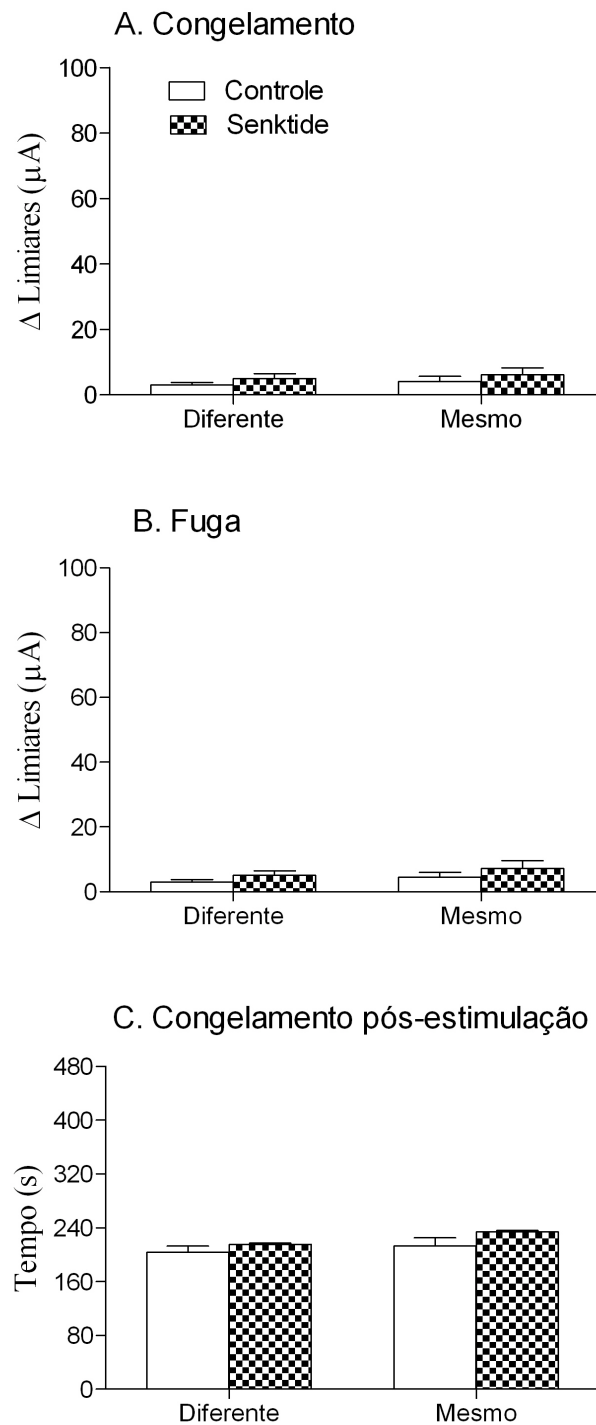


Figura 11. Efeitos do senktide sobre os limiares aversivos determinados pela estimulação elétrica da SCPd em ratos submetidos ao mesmo contexto ou ao contexto diferente onde receberam previamente choques nas patas. Diferenças médias entre limiares de congelamento (A) e fuga (B) determinados antes e após microinjeções de PBS (controle) e senktide (50 pmol) na SCPd. C: congelamento pós-estimulação. Resultados expressos como média + EPM. N= 9 para todos os grupos em ambos os contextos. Não houve diferença significativa entre os grupos.

DISCUSSÃO

A substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) apresenta um papel fundamental na mediação do comportamento defensivo e no sistema motivacional do medo, integrando respostas ativas a estímulos incondicionados. A estimulação elétrica da SCPd provoca três tipos de respostas defensivas: o congelamento, a fuga e o congelamento pós-fuga (MAGIEREK et al., 2003; VIANNA; LANDEIRA-FERNANDEZ; BRANDÃO, 2001b). O congelamento desencadeado pela estimulação elétrica da SCPd é uma resposta a estímulos aversivos inatos e não é contexto-dependente (GRAEFF, 2004; MAGIEREK et al., 2003; VIANNA; LANDEIRA-FERNANDEZ; BRANDÃO, 2001b; VIANNA et al., 2003). A fuga é caracterizada por corrida vigorosa e saltos, alternada com períodos de imobilidade tensa ou congelamento (BRANDÃO et al., 2003; GRAEFF, 2004; MAGIEREK et al., 2003; VIANNA; LANDEIRA-FERNANDEZ; BRANDÃO, 2001b; VIANNA et al., 2003). O congelamento pós-fuga é caracterizado por intenso congelamento, acompanhado frequentemente de defecação e micção (VIANNA; LANDEIRA-FERNANDEZ; BRANDÃO, 2001a,b). Neste estudo, a estimulação elétrica foi aplicada em passos de 5 μ A e com o aumento progressivo de intensidade de corrente elétrica, os animais subitamente paravam, ficavam imóveis e apresentavam reações autonômicas como defecação e micção. Com intensidade de corrente elétrica mais elevada, os animais apresentavam corrida acompanhada de reações autonômicas. O comportamento de congelamento sempre precedeu a ocorrência do comportamento de fuga.

O substrato neural da aversão na SCPd é modulado por alguns neurotransmissores, dentre eles a substância P (SP), bem como em certas regiões do sistema nervoso central (SNC), tais como a amígdala, hipotálamo medial e SCPd (AGUIAR; BRANDÃO, 1994; 1996; DE ARAÚJO; HUSTON; BRANDÃO, 2001a,b).

Vários estudos mostram que injeções deste neurotransmissor na SCPd produzem comportamentos defensivos como ativação comportamental, efeito do tipo-ansiogênico no labirinto em cruz elevado (LCE) (AGUIAR; BRANDÃO, 1996; BASSI et al., 2007a; DUARTE; TESTOLIN; DE LIMA, 2004) e alterações nas vocalizações ultrassônicas na faixa de 22 kHz (BASSI et al., 2007a). A SP também funciona como um estímulo aversivo incondicionado no teste de aversão incondicionada ao lugar (AGUIAR, BRANDÃO, 1994).

Os efeitos biológicos da SP são mediados por três tipos diferentes de receptores, NK-1, NK-2 e NK-3 (REGOLI, 1987). A síntese, de vários agonistas e antagonistas peptídicos e não-peptídicos, tem permitido uma avaliação mais segura do papel fisiológico e do envolvimento da SP em diversas patologias (LONGMORE; HILL; HARGREAVES, 1997). Os resultados obtidos no presente estudo mostram que a injeção do antagonista de receptores NK-1 spantide na SCPd de animais ingênuos, elevou os limiares aversivos de congelamento e fuga, uma ação claramente antiaversiva, indicando o envolvimento destes receptores na modulação do medo incondicionado na SCPd. O efeito antiaversivo obtido com spantide nesse trabalho ocorreu sem alteração da atividade locomotora, visto que não houve alterações significativas nas medidas comportamentais obtidas no teste do campo aberto, o que reforça a proposta de um papel pró-aversivo dos receptores NK-1 da SCPd. Além disso, esta descoberta corrobora e amplia a proposta do envolvimento do sistema de neurocininas na modulação do comportamento defensivo e que o subtipo de receptor NK-1 pode ser um importante alvo neuroquímico com potencial para o tratamento da ansiedade.

Os resultados obtidos nesse estudo apóiam a noção de que mecanismos mediados pelos receptores NK-1 e NK-3 têm distintos papéis na SCPd. A

participação de receptores NK-3 na reação de defesa pode ser descartada já que as injeções do antagonista SB 222200 e do agonista senktide não alteraram significativamente os limiares aversivos. Em vista disso, tem sido proposto que efeitos diferentes são produzidos pela estimulação dos receptores NK-1 e NK-3 na SCPd. Na SCPd as injeções de agonistas NK-1 promoveram efeitos do tipo-ansiolíticos, enquanto que injeções de antagonistas promoveram efeitos do tipo-ansiolíticos no LCE (BASSI et al., 2007a,b). Em outros estudos sobre o envolvimento de receptores NK-3 da SCPd, em modelos animais de ansiedade como medida de vocalizações ultrassônicas, bem como no LCE, os resultados obtidos mostraram que agonistas e antagonistas desses receptores não produziram efeitos significativos (BASSI et al., 2009; MASSI; PANOCCA; DE CARO, 2000; RIBEIRO et al., 1999).

Contrastando com os efeitos mediados pelo receptor NK-1, os receptores NK-3 na SCPd modulam respostas nociceptivas (BASSI et al., 2009). Neste estudo, o agonista NK-3 senktide promoveu um aumento significativo do comportamento exploratório no LCE, observado pelas análises das medidas comportamentais (como, por exemplo, frequência de entradas nos braços abertos e fechados), um efeito acompanhado por hiperalgesia e um aumento no número de vocalizações ultrassônicas na faixa de 22 kHz. Os efeitos nociceptivos, o aumento da atividade locomotora, e emissões de vocalizações ultrassônicas provocadas por injeções locais de senktide foram reduzidas por pré-injeções do antagonista NK-3 SB 222200 (50 pmol/0,2 µL) na SCPd.

No presente estudo o antagonista NK-3, SB 222200 na dose de 50 pmol/0,2 µL não causou efeitos significativos nos limiares aversivos determinados pelo aumento gradual de corrente elétrica aplicada na SCPd. Na dose de 100 pmol/0,2 µL o SB 222200 aumentou os limiares aversivos de congelamento e fuga. Contudo, este

efeito pode ser atribuído a um déficit motor, uma vez que a atividade exploratória foi diminuída em animais submetidos ao teste do campo aberto. Este teste claramente mostra que os efeitos do SB 222200 afetaram a atividade locomotora, diminuindo o número de cruzamentos e levantamentos. Estes efeitos evidenciam a falta de envolvimento dos receptores NK-3 da SCPd com processos de medo ou ansiedade organizados nesta estrutura. Estes receptores, provavelmente, estão envolvidos com processos de dor e atividade exploratória e não com processos de medo ou expressão de comportamentos defensivos associados à ansiedade (BASSI et al., 2009).

O estudo da interação entre medo condicionado e incondicionado em animais de laboratório tem-se mostrado muito útil para a compreensão da neurobiologia da ansiedade, tendo em vista que mostra um paralelismo com o que se tem discutido em termos de consequências afetivas e comportamentais da interação desses dois tipos de medo. Estudos que utilizam choques nas patas como estímulo incondicionado, associado a um estímulo neutro (som ou luz) ou a um ambiente em particular (contexto) têm mostrado que a amplitude da resposta do sobressalto ao som é significativamente aumentada pelo medo moderado (DAVIS; ASTRACHAN, 1978; SANTOS et al., 2005). Outros estudos mostram a influência da intensidade do estímulo estressor nas respostas defensivas e apontam que a associação de eventos estressores diferentes pode causar aumento do medo (MAISONNETTE; MORATO; BRANDÃO, 1993; MARITJENA et al., 1997).

O medo contextual é evocado quando um meio ambiente específico (ou contexto) é repetidamente pareado com um estímulo desagradável ou aversivo. Ratos que recebem choques inescapáveis nas patas no interior de uma caixa experimental, quando retornam a este contexto aversivo, apresentam intenso

congelamento contexto-dependente (condicionado), permanecendo nessa condição por alguns minutos (VIANNA et al., 2001a; VIANNA; LANDEIRA-FERNANDEZ; BRANDÃO, 2001b; OLIVEIRA et al., 2007; BROIZ; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2008). Este congelamento tem sido associado ao transtorno de ansiedade generalizada (BRANDÃO et al., 2008).

Parece razoável assumir que animais apresentam uma reação de defesa mais intensa a um estímulo incondicionado que ativa a SCPd se isto ocorreu em um ambiente que foi previamente pareado com choques. De fato, comportamentos defensivos são hierarquicamente organizados e diferentes comportamentos de medo são provocados por estímulos aversivos de diferentes intensidades (BLANCHARD; BLANCHARD, 1969; 1972). Por exemplo, o medo moderado pode ser resultado de um estímulo ameaçador potencial ou distal, enquanto que o medo intenso poderia ser o resultado de um estímulo aversivo forte ou muito próximo (SANTOS et al., 2005). Estas respostas podem ser dissociadas farmacologicamente. De fato, a administração intraperitoneal do benzodiazepínico midazolam, não produziu efeito significativo sobre a resposta de sobressalto acústico em condições de medo intenso, mas causou efeito tipo-ansiolítico sobre a resposta de sobressalto potencializado pelo medo contextual moderado (SANTOS et al., 2005).

Em um trabalho anterior já havíamos observado que ratos expostos a um estímulo contextual aversivo apresentaram intensa resposta de congelamento em comparação com a resposta de medo incondicionado desencadeado pela estimulação elétrica da SCPd em ratos (BROIZ; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2008). No presente estudo, a injeção do antagonista NK-1 spantide aumentou significativamente os limiares aversivos de congelamento e fuga, enquanto que a injeção do antagonista NK-3 SB 222200 não produziu efeitos significativos sobre

esses limiares aversivos quando medidos em ratos que passaram pelo condicionamento de medo contextual. Como efeitos similares foram obtidos em animais com experiência aversiva prévia, nossos resultados sugerem que receptores NK-1, mas não receptores NK-3, estão envolvidos na expressão da resposta defensiva induzida pela estimulação elétrica da SCPd em ratos submetidos ao condicionamento de medo contextual, ou seja, a mediação por receptores NK-1 na SCPd independe do animal receber a estimulação elétrica na presença ou ausência de estímulos condicionados de medo. Em animais sem experiência aversiva prévia, a injeção do antagonista NK-3, SB 222200, na dose de 100 pmol, aumentou os limiares aversivos. Porém este efeito foi influenciado pelo déficit na atividade motora como demonstrado pelos animais submetidos ao teste do campo aberto. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem o envolvimento dos receptores NK-1 na expressão do comportamento defensivo induzido pela estimulação elétrica da SCPd em animais submetidos ou não ao procedimento de condicionamento de medo contextual.

O congelamento pós-estimulação da SCPd não é considerado uma resposta condicionada ao contexto no qual ocorreu a estimulação elétrica (OLIVEIRA et al., 2007; BROIZ; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2008). De acordo com estudos anteriores deste laboratório, este congelamento persiste quando o animal é colocado em um contexto diferente logo após a estimulação da SCPd (VIANNA et al., 2001a, VIANNA; LANDEIRA-FERNANDEZ; BRANDÃO, 2001b). Os receptores NK-1 e NK-3 na SCPd não parecem estar envolvidos na modulação deste tipo de congelamento, uma vez que as injeções dos antagonistas destes receptores não alteraram significativamente esta resposta nem em animais ingênuos nem em animais com experiência aversiva prévia. Este congelamento parece ter uma mediação

neuroquímica diferente do congelamento evocado pela estimulação elétrica direta da SCPd, uma vez que lesões eletrolíticas ou a inativação com muscimol do complexo amigdalóide reduziram o congelamento pós-estimulação, mas não afetaram o comportamento de congelamento e fuga induzidos pela estimulação da SCPd (OLIVEIRA et al., 2004; RUIZ-MARTINEZ; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2006). O congelamento pós-estimulação da SCPd parece estar envolvido com a transferência de informações aversivas para estruturas localizadas rostralmente, provavelmente para a amígdala. Assim, é possível que os comportamentos de congelamento e fuga consistam de vias de saída para o medo incondicionado e o congelamento pós-estimulação elétrica da SCPd consista de um processo de aquisição de informações aversivas que ascendem a estruturas localizadas em um nível mais rostral em relação à SCPd. É provável que a SCPd integre as informações sensoriais, retransmitindo estas informações para a amígdala, na qual ocorre o reconhecimento do estímulo ameaçador. A amígdala avalia estímulos ameaçadores ou contextos aversivos, em termos do grau de ameaça que estes representam ao organismo, enquanto a substância cinzenta periaquedutal realiza respostas de seleção das informações aversivas e coordenação das respostas defensivas (GRAEFF et al., 1993). Tem-se sugerido que a conexão entre SCPd e o complexo amigdalóide deve modular de fato a ocorrência do comportamento de congelamento decorrente do processamento de informações de natureza aversiva (FAROOK, et al., 2004; GRAEFF et al., 1993).

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho sugerem o envolvimento de diferentes receptores neurocininérgicos na regulação dos comportamentos incondicionados e condicionados de medo. Os receptores NK-1, mas não os receptores NK-3, modulam os comportamentos defensivos induzidos pela

estimulação elétrica da SCPd em animais ingênuos ou com experiências aversivas prévias. O congelamento pós-estimulação não foi afetado por nenhuma das drogas injetadas na SCPd, sugerindo que a informação aversiva que ascende da SCPd para estruturas superiores do cérebro não é mediado por mecanismos neurocinérgicos. Além disso, os dados obtidos nesse estudo associam os mecanismos NK-3 da SCPd com a locomoção ou com o aumento dos comportamentos exploratórios. Esta ativação psicomotora pode estar associada com o processo de informação sensorial, no qual os mecanismos NK-3 também estão envolvidos, como revelou estudos prévios deste laboratório (BASSI et al., 2009).

Acreditamos que o estudo dos efeitos dos antagonistas de receptores NK-1 e NK-3 na SCPd sobre o medo condicionado e incondicionado, aí organizados, traz uma contribuição importante para a nossa compreensão da integração de estados aversivos no SNC e, sobretudo do funcionamento destes substratos neurais de defesa em animais com experiência aversiva prévia. Estudos adicionais que venham esclarecer o envolvimento destes receptores na modulação da reação de defesa organizada na SCPd podem ter alguma implicação clínica.

CONCLUSÕES

- Mecanismos neurocininérgicos estão envolvidos na mediação de comportamentos defensivos evocados pela estimulação elétrica da SCPd.
- A mediação dos comportamentos defensivos de congelamento e fuga desencadeados em animais ingênuos e com experiência aversiva prévia submetidos à estimulação elétrica da SCPd depende dos receptores NK-1, mas não de receptores NK-3.
- Mecanismos mediados pelos receptores NK-1 e NK-3 possuem distintos papéis na organização de comportamentos defensivos na SCPd de animais ingênuos e com experiência aversiva prévia.
- Mecanismos mediados por receptores NK-3 da SCPd parecem estar envolvidos com a locomoção ou comportamento exploratório.
- Receptores NK-1 e NK-3 não estão envolvidos na modulação do congelamento pós-estimulação elétrica da SCPd, que reflete a transferência de informações de natureza aversiva para estruturas encefálicas rostrais como a amígdala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M.S.; BRANDÃO, M.L. Conditioned place aversion produced by microinjection of substance P into the periaqueductal gray of rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 5, p. 369-373, 1994.

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

BANDLER, R.; CARRIVE, P.; DEPAULIS, A. Emerging principles of organization of the midbrain periaqueductal gray matter. In A. Depaulis e R. Bandler (Eds). *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. **Plenum Press**, New York, p. 1-8, 1991.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M.T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends in Neuroscience**, v. 17, n. 9, p. 379-389, 1994.

BARBARESI, P. Immunocytochemical localization of Substance P receptor in rat periaqueductal gray matter: a light and electron microscopic study. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 398, n. 4, p. 473-490, 1998.

BASSI, G.S.; NOBRE, M.J.; CARVALHO, M.C.; BRANDÃO, M.L. Substance P injected into the dorsal periaqueductal gray causes anxiogenic effects similar to the long-term isolation as assessed by ultrasound vocalizations measurements. **Behavior Brain Research**, v. 182, n. 2, p. 301-30, 2007a.

BASSI, G.S.; NOBRE, M.J.; DE ARAÚJO, J.E.; BRANDÃO, M.L. Anxiogenic effects of activation of NK-1 receptors of the dorsal periaqueductal gray as assessed by the elevated plus-maze, ultrasound vocalizations and tail-flick tests. **Neuropeptides**, v. 41, p. 365-374, 2007b.

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

BEITZ, A.J. The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 237, n. 4, p. 445-459, 1985.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Crouching as an index of fear. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 67, p. 370-375, 1969.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Effects of hippocampal lesions on the rat's reaction to a cat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.78, n.1, p.77-82, 1972.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Review of Psychology**, v. 39, p. 43-68, 1988.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 103, n.1, p. 70-82, 1989.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; RODGERS, J.; WEISS, S.M. The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 14, n. 4, p. 463-472, 1990.

BONDY, B.; BAGHAI, T.C.; MINOV, C.; SCHÜLE, C.; SCHWARZ, M.J.; ZWANZGER, P.; RUPPRECHT, R.; MÖLLER, H.-J. Substance P serum levels are increased in major depression: preliminary results. **Biological Psychiatry**, v. 53, n. 6, p. 538-542, 2003.

BRANDÃO, M.L.; ANSEOLI, V.Z.; PANDOSSIO, J.E.; DE ARAÚJO, J.E.; CASTILHO, V.M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 863-875, 1999.

BRANDÃO, M.L.; VIANNA, D.M.; MASSON, S.; SANTOS, J. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. **Revista Brasileira Psiquiatria**, v. 25, n. 2, p. 36-41, 2003.

BRANDÃO, M.L. As bases biológicas do comportamento: introdução à neurociência. São Paulo: EPU, 2004, 224 p.

BRANDÃO, M.L.; BORELLI, K.G.; NOBRE, M.J.; SANTOS, J.M.; ALBRECHET-SOUZA, L.; OLIVEIRA, A.R., MARTINEZ, R.C. Gabaergic regulation of the neural organization of the fear in the midbrain tectum. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1299-1311, 2005.

BRANDÃO, M.L.; ZANOVELI, J.M.; RUIZ-MARTINEZ, R.C.; OLIVEIRA, L.C.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 89, n. 1, p. 76-84, 2008.

BROIZ, A.C.; OLIVEIRA, L.C.; BRANDÃO, M.L. Regulation of conditioned and unconditioned fear in rats by 5-HT_{1A} receptors in the dorsal periaqueductal gray. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 89, p. 76-84, 2008.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: Functional representation and neural organization. **Behavioural Brain Research**, v. 58, n. 1-2, p. 27-47, 1993.

CARVALHO, M.C.; ALBRECHET-SOUZA, L.; MASSON, S.; BRANDÃO, M.L. Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 12, p. 1857-1866, 2005.

CARVALHO, M.C.; MASSON, S.; BRANDÃO, M.L.; DE SOUZA SILVA, M.A. Anxiolytic-like effects of substance P administration into the dorsal, but not ventral, hippocampus and its influence on serotonin. **Peptides**, v. 29, p. 1191-1200, 2008.

CASTILHO, V.M.; BRANDÃO, M.L. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT_{2A} receptors in rats. **Psychopharmacology**, v. 155, p. 154-162, 2001.

CHAHN, L.A. Tachykinins and neuropsychiatric disorders. **Current Drug Targets**, v. 7, n. 8, p. 993-1003, 2006.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A.W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 235-260, 2001.

DABLEH, L.J.; YASHPAL, K.; ROCHFORD, J.; HENRY, J.L. Antidepressant-like effects of neurokinin receptor antagonists in the forced swim test in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, p. 99-105, 2005.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. **Annual Reviews of Neuroscience**, v. 15, p. 353-375, 1992.

DAVIS, M.; ASTRACHAN, D.I. Conditioned fear and startle magnitude: Effects of different footshock and backshock intensities used in training. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v. 4, p. 95-103, 1978.

DAVIS, M.; WALKER, D.L.; LEE, Y. Amygdala and bed nucleus of the stria terminalis: differential roles in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B: Biological Sciences**, v. 352, p. 1675-1687, 1997.

DEAKIN, J.W. The role of serotonin in depression and anxiety. **European Psychiatry**, v. 13, n. 2, p. 57-63, 1998.

DE ARAÚJO, J.E.; HUSTON, J.P.; BRANDÃO, M.L. Opposite effects of substance P fragments C (anxiogenic) and N (anxiolytic) injected into dorsal periaqueductal gray. **European Journal of Pharmacology**, v. 432, p. 43-51, 2001a.

DE ARAÚJO, J.E.; HUSTON, J.P.; BRANDÃO, M.L. Place aversion induced by microinjections of C-fragment of substance P into the dorsal periaqueductal gray of rats is mediated by tachykinin NK1 receptors. **Peptides**, v. 22, p. 1447-1452, 2001b.

DING, Y-Q.; SHIGEMOTO, R.; TAKADA, M.; OHISHI, H.; NAKANISHI, S.; MIZUNO, N. Localization of the neuromedin K receptor (NK3) in the central nervous system of the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 364, p. 290-310, 1996.

DREW, G.M.; MITCHELL, V.A.; VAUGHAN, C.W. Postsynaptic actions of substance P on rat periaqueductal grey neurons in vitro. **Neuropharmacology**, v. 49, p. 587-595, 2005.

DUARTE, F.S.; TESTOLIN, R.; DE LIMA, T.C.M. Further evidence on the anxiogenic-like effect of substance P evaluated in the elevated plus-maze in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 154, p. 501-510, 2004.

EBNER, K.; SINGEWALD, G.M.; WHITTLE, N.; FERRAGUTI, F.; SINGEWALD, N. Neurokinin I receptor antagonism promotes active stress coping via enhanced septal 5-HT transmission. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 1929-1941, 2008.

FANSELOW, M.S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behavior Brain Research**, v. 110, n. 1-2, p. 73-81, 2000.

FAROOK, J.M.; WANG, Q.; MOOCHHALA, S.M.; ZHU, Z.Y.; LEE, L.; WONG, P.T.-H. Distinct regions of periaqueductal gray (PAG) are involved in freezing behavior in hooded PVG rats on the cat-freezing test apparatus. **Neuroscience Letters**, v. 354, p. 139-142, 2004.

FENDT, M.; FANSELOW, M.S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience Behavior Reviews**, v. 23, p. 743-760, 1999.

FILE, S.E. Anxiolytic action of a neurokinin 1 receptor antagonist in the social interaction test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 58, n. 3, p. 747-752, 1997.

GEWIRTZ, C.J.; DAVIS, M. Using pavlovian Higher-Order conditioning paradigm to investigate the neural substrates of emotional learning and memory. **Learning & Memory**, v. 7, p. 257-266, 2000.

GRAEFF, F.G.; SILVEIRA, M.C.L.; NOGUEIRA, R.L.; AUDI, E.A.; OLIVEIRA, R.M.W. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behavioural Brain Research**, v. 58, p. 123-131, 1993.

GRAEFF, F.G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology (Berlin)**, v.163, n. 3-4, p. 467-476, 2002.

GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 239-259, 2004.

HAGAN, R.M.; BERESFORDA, I.J.M. ; STABLESA, J.; DUPEREA, J.; STUBBSA, C.M.; ELLIOTTA, P.J.; SHELDRIKKB, R.L.G.; CHOLLETC, A.; KAWASHIMAC, E.; MCELROYD, A.B.; WARDD, P. Characterisation, CNS distribution and function of NK2 receptors studies using potent NK2 receptors antagonists. **Regulatory Peptides**, v. 46, p. 9-19, 1993.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, p. 385-403, 1934.

HASENOHRL, R.U.; DE SOUZA-SILVA, M.A.; NIKOLAUS, S.; TOMAZ, C.; BRANDÃO, M.L.; SCHWARTING, R.K.; HUSTON, J.P. Substance P and its role in neural mechanisms governing learning, anxiety and functional recovery. **Neuropeptides**, v. 34, n. 5, p. 272-80, 2000.

JANECKA, A.; POELS, J.; FICHNA, J.; STUDZIAN, K.; BROECK, J.V. Comparison of antagonist activity of spantide family at human neurokinin receptors measured by aequorin luminescence-based functional calcium assay. **Regulatory Peptides**, v. 131, p. 23-28, 2005.

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

LEDOUX, J.F. Emotion circuits in the brain. **Annual Review in Neuroscience**, v. 23, p. 155-184, 2000.

LEMAN, S.; DIELENBERG, R.A; CARRIVE, P. Effect of dorsal periaqueductal gray lesion on cardiovascular and behavioural responses to contextual conditioned fear in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 143, p. 169-176, 2003.

LIU, H.; CAO, Y.; BASBAUM, A.I.; MAZARATI, A.M.; SANKAR, R.; WASTERLAIN, C.G. Resistance to excitotoxin-induced seizures and neuronal death in mice lacking the preprotachykinin A gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 96, n. 21, p. 12096-12101, 1999.

LONGMORE, J.; HILL, R.G.; HARGREAVES, R.J. Neurokinin-receptor antagonists: pharmacological tools and therapeutic drugs. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 75, p. 612-621, 1997.

MAGGI, C.A.; PATACCHINI, R.; FEN, D.M.; FOLKERS, K. Activity of spantide I and spantide II at various tachykinin receptors and NK2 tachykinin receptor subtypes. **European Journal of Pharmacology**, v. 199, p. 127-129, 1991.

MAGGI, C.A. The mammalian tachykinin receptors (Review). **General Pharmacology**, v. 26, n. 5, p. 911-944, 1995.

MAGIEREK, V.; RAMOS, P.L.; SILVEIRA-FILHO, N.G.; NOGUEIRA, R.L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Context fear conditioning inhibits panic-like behavior elicited by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray. **NeuroReport**, v. 14, n. 12, p. 1641-1644, 2003.

MAISONNETTE, S.S.; MORATO, S.; BRANDÃO, M.L. Role of resocialization and of 5-HT1A receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus maze test. **Physiology and Behavior**, v. 54, p. 753-758, 1993.

MARITJENA, I.D.; CALVO, N.; VOLOSIN, M.; MOLINA, V.A. Prior exposure to a brief restraint session facilitates the occurrence of fear in response to a conflict situation: behavioral and neurochemical correlates. **Brain Research**, v. 752, p. 136-142, 1997.

MASSI, M.; PANOCCA, I.; DE CARO, G. The psychopharmacology of tachykinin NK3 receptors in laboratory animals. **Peptides**, v. 21, p. 1597-1609, 2000.

MEZZASALMA, M.A.; VALENÇA, A.M.; LOPES, F.L.; NASCIMENTO, I.; ZIN, W.A.; NARDI, A.E. Neuroanatomia do transtorno de pânico. **Revista Brasileira Psiquiatria**, v. 26, n. 3, p. 202-206, 2004.

MICHELGÅRD, Å.; APPEL, L.; PISSIOTA, A.; FRANS, FRANS, Ö.; LÅNGSTRÖM, B.; BERGSTRÖM, M.; FREDRIKSON, M. Symptom provocation in specific phobia affects the substance P neurokinin-1 receptor system. **Biological Psychiatry**, v. 61, p. 1002-1006, 2007.

MONGEAU, R.; MARSDEN, C.A. Effect of imipramine treatments on the 5-HT1A-receptor-mediated inhibition of panic-like behaviours in rats. **Psychopharmacology**, v. 131, p. 321-328, 1997.

MONGEAU, R.; MARSDEN, C.A.; DE OCA, B.M.; FANSELOW, M.S. Differential effects of neurokinin-1 receptor activation in subregions of the periaqueductal gray matter on conditional and unconditional fear behaviors in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 112, n. 5, p. 1125-1135, 1998.

NASHOLD, B.S.; WILSON, W.P.; SLAUGHTER, D.G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **Journal of Neurosurgery**, v. 30, p. 14-24, 1969.

OLIVEIRA, L.C.; NOBRE, M.J.; BRANDÃO, M.L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Role of amygdala in conditioned and unconditioned fear generated in the periaqueductal gray. **NeuroReport**, v. 15, p. 2281-2285, 2004.

OLIVEIRA, L.C.; BROIZ, A.C.; MACEDO, C.E.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M.L. 5-HT₂ receptor mechanisms of the dorsal periaqueductal gray in the conditioned and unconditioned fear in rats. **Psychopharmacology**, v. 191, p. 253-262, 2007.

PANOCKA, I.; MASSI, M.; LAPO, I.; SWIDERSKI, T.; KOWALCZYK, M.; SADOWSKI, B. Antidepressant-type effect of the NK3 tachykinin receptor agonist aminosenktide in mouse lines differing in endogenous opioid system activity. **Peptides**, v. 22, p. 1037–1042, 2001.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5^a Edition. San Diego: Academic Press, 2007.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

REGOLI, D. Pharmacological receptors for SP and neurokinins. **Life Sciences**, v. 40, p.109-117, 1987.

REGOLI, D.; BOUDON, A.; FAUCHÉRE, J.L. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. **Pharmacological Reviews**, v. 46, n. 4, p. 551-599, 1994.

RIBEIRO, S.J.; TEIXEIRA, R.M.; CALIXTO, J.B.; DE LIMA, T.C.M. Tachykinin NK3 receptor involvement in anxiety. **Neuropeptides**, v. 33, n. 2, p.181-188, 1999.

RUIZ-MARTINEZ, R.C.; OLIVEIRA, A.R.; BRANDÃO, M.L. Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 85, n. 1, p. 58-65, 2006.

RUPNIAK, N.M.J.; CARLSON, E.C.; HARRISON, T.; OATES, B.; SEWARD, E.; OWEN, S.; DE FELIPE, C.; HUNT, S.; WHEELDON, A. Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P(NK1) receptors attenuates neonatal vocalization in guinea-pigs and mice. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 1413-1421, 2000.

RUPNIAK, N.M.J.; WEBB, J.K.; FISHER, A.; SMITH, D.; BOYCE, S. The substance P (NK1) receptor antagonist L-760735 inhibits fear conditioning in gerbils. **Neuropharmacology**, v. 44, p. 516-523, 2003.

SALOMÉ, N.; STEMMELIN, J.; COHEN, C.; GRIEBEL, G. Selective blockade of NK2 or NK3 receptors produces anxiolytic- and antidepressant-like effects in gerbils. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 533–539, 2006.

SANTARELLI, L.; GOBBI, G.; DEBS, P.C.; SIBILLE, E.L.; BLIER, P.; HEN, R.; HEATH, M.J.S. Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decrease anxiety-related behaviors and increase serotonergic function. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 98, n. 4, p. 912-1917, 2001.

SANTOS, J.M.; GÁRGARO, A.C.; OLIVEIRA, A.R.; MASSON, S.; BRANDÃO, M.L. Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing behavior and fear-potentiated startle. **European Neuropsychopharmacology**, v.15, p. 239-246, 2005.

SARAU, H.M.; GRISWOLD, D.E.; BUSH, B.; POTTS, W.; SANDHU, P.; LUNDBERG, D.; FOLEY, J.J.; SCHMIDT, D.B.; WEBB, E.F.; MARTIN, L.D.; LEGOS, J.J.; WHITMORE, R.G.; BARONE, F.C.; MEDHURST, A.D.; LUTTMANN, M.A.; GIARDINA, G.A.M.; HAY, D.W.P. Nonpeptide tachykinin receptor antagonists. II. Pharmacological and pharmacokinetic profile of SB-222200, a central nervous system penetrant, potent and selective NK-3 receptor antagonist. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295, n. 1, p. 373-381, 2000.

SARIA, A. The tachykinin NK1 receptor in the brain: pharmacology and putative functions. **European Journal of Pharmacology**, v. 375, p. 51-60, 1999.

SCHENBERG, L.C.; BITTENCOURT, A.S.; SUDRÉ, E.C.M.; VARGAS, L.C. Modeling panic attacks. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 647-659, 2001.

STRITTMATTER, M.; ISENBERG, E.; GRAUER, M.T.; HAMANN, G.; SCHIMRIGK, K. CFS substance P somatostatin and monoaminergic transmitter metabolites in patients with narcolepsy. **Neuroscience Letters**, v. 218, n. 2, p. 99-102, 1996.

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

VAN ERP, A.M.; KRUK, M.R.; MEELIS, W.; VEENING, J.G. Periaqueductal gray lesions do not affect grooming, induced electrically in the hypothalamic paraventricular area in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 59, n. 1-2, p. 95-101, 1993.

VIANNA, D.M.L.; GRAEFF, F.G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M.L. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not enhance freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. **Learning and Memory**, v. 8, p. 164-169, 2001a.

VIANNA, D.M.L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M.L. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. **Neuroscience Biobehavioral Review**, v. 25, p. 711-719, 2001b.

VIANNA, D.M.L.; BORELLI, K.G.; FERREIRA-NETO, C.; MACEDO, C.E.; BRANDÃO, M.L. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. **Brain Research Bulletin**, v. 62, p. 179-189, 2003.

WALLACE, K.J.; ROSEN, J.B. Neurotoxic lesions of the lateral nucleus of the amygdala decrease conditioned fear of a predator odor: Comparison with electrolytic lesions. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 3619-3627, 2001.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

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

YIP, J.; CHAHL, L.A. Localization of NK1 and NK3 receptors in guinea-pig brain. **Regulatory Peptides**, v. 98, p. 55-62, 2001.

*De acordo com: Manual de Referências e Citações Bibliográficas do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, baseado nas normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

ANEXO

Manuscript Number:

Title: ROLE OF THE NEUROKININ-MEDIATED MECHANISMS ON THE DEFENSIVE BEHAVIOR INDUCED BY ELECTRICAL STIMULATION OF THE DORSAL PERIAQUEDUCTAL GRAY

Article Type: Research Paper

Section/Category: Systems

Keywords: NK-1 and NK-3 receptors; dorsal periaqueductal gray; spantide; SB 222200; unconditioned fear; contextual fear conditioning.

Corresponding Author: Dr Marcus L Brandao, Ph.D Corresponding

Author's Institution: University of São Paulo

First Author: Ana C Broiz, Dr

Order of Authors: Ana C Broiz, Dr; Gabriel S Bassi, MsC; Maria A Souza-Silva, PhD; Marcus L Brandao, Ph.D

Abstract: The dorsal periaqueductal gray (dPAG) is the main output structure for the defensive response to proximal aversive stimulation. Panic-like responses, such as freezing and escape behaviors, often result when this structure is electrically stimulated. Freezing also ensues after termination of the dPAG stimulation (post-stimulation freezing - PSF), which has been associated with panic disorder. GABA and 5-HT have been proposed as the main neuromediators of these defense reactions. Neurokinins, such as Substance P, also play a role; however, it is unclear how the distinct types of neurokinin receptors are involved in the expression of these fear responses. This study investigated the role of NK-1 and NK-3 receptors in the unconditioned defensive behaviors induced by electrical stimulation of the dPAG of rats, with and without previous experience with contextual fear conditioning (CFC). Spantide (100 pmol/0.2 µL) and SB 222200 (50 and 100 pmol/0.2 µL), selective antagonists of NK-1 and NK-3 receptors, respectively, were injected into the dPAG. Injection of spantide had anti-aversive effects as determined by stimulation of the dPAG in naïve animals and in animals subjected previously to CFC. SB 222200 also increased these aversive thresholds but only at doses that caused a motor deficit as assessed in the open field. Moreover, neither spantide nor SB 222200 influenced the PSF. The results suggest that NK-1 receptors are mainly involved in the mediation of the defensive behaviors induced by electrical stimulation of the dPAG. Since dPAG-evoked PSF was not affected by intra-dPAG injections of either spantide or SB 222200, it is suggested that neurokinin-mediated mechanisms are not involved in the processing of ascending aversive information from the dPAG.

**ROLE OF THE NEUROKININ-MEDIATED MECHANISMS ON THE
DEFENSIVE BEHAVIOR INDUCED BY ELECTRICAL STIMULATION OF
THE DORSAL PERIAQUEDUCTAL GRAY**

^{1,2}Ana Carolina Broiz, ^{1,2}Gabriel Shimizu Bassi ³Maria Angelica De Souza Silva and
^{1,2}Marcus Lira Brandão

¹ Instituto de Neurociências e Comportamento – INeC, Campus USP, 14040-901
Ribeirão Preto, SP, Brasil.

²Laboratório de Psicobiologia, Faculdade Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto,
FFCLRP, Universidade de São Paulo (USP), 14040-901, Ribeirão Preto, SP Brasil.

³Center for Behavioral Neuroscience, University of Duesseldorf, Universitaetsstr.1,
40225 Duesseldorf, Germany

Correspondence: ML Brandão, at the same address as above
e-mail: mbrandao@usp.br

Abstract

The dorsal periaqueductal gray (dPAG) is the main output structure for the defensive response to proximal aversive stimulation. Panic-like responses, such as freezing and escape behaviors, often result when this structure is electrically stimulated. Freezing also ensues after termination of the dPAG stimulation (post-stimulation freezing – PSF). GABA and 5-HT have been proposed as the main neuromediators of these defense reactions. Neurokinins also play a role; however, it is unclear how the distinct types of neurokinin receptors are involved in the expression of these fear responses. This study investigated the role of NK-1 and NK-3 receptors in the unconditioned defensive behaviors induced by electrical stimulation of the dPAG of rats, with and without previous experience with contextual fear conditioning (CFC). Spantide (100 pmol/0.2 μL) and SB 222200 (50 and 100 pmol/0.2 μL), selective antagonists of NK-1 and NK-3 receptors, respectively, were injected into the dPAG. Injection of spantide had anti-aversive effects as determined by stimulation of the dPAG in naïve animals and in animals subjected previously to CFC. SB 222200 also increased these aversive thresholds but only at doses that caused a motor deficit. Moreover, neither spantide nor SB 222200 influenced the PSF. The results suggest that NK-1 receptors are mainly involved in the mediation of the defensive behaviors organized in the dPAG. Since dPAG-evoked PSF was not affected by intra-dPAG injections of either spantide or SB 222200, it is suggested that neurokinin-mediated mechanisms are not involved in the processing of ascending aversive information from the dPAG.

**ROLE OF THE NEUROKININ-MEDIATED MECHANISMS ON THE
DEFENSIVE BEHAVIOR INDUCED BY ELECTRICAL STIMULATION OF THE
DORSAL PERIAQUEDUCTAL GRAY**

^{1,2}Ana Carolina Broiz, ^{1,2}Gabriel Shimizu Bassi ³Maria Angelica De Souza Silva and
^{1,2}Marcus Lira Brandão

¹ Instituto de Neurociências e Comportamento – INeC, Campus USP, 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

² Laboratório de Psicobiologia, Faculdade Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, FFCLRP, Universidade de São Paulo (USP), 14040-901, Ribeirão Preto, SP Brasil.

³ Center for Behavioral Neuroscience, University of Duesseldorf, Universitaetsstr.1, 40225 Duesseldorf, Germany

Correspondence: ML Brandão, at the same address as above
e-mail: mbrandao@usp.br

Abstract

The dorsal periaqueductal gray (dPAG) is the main output structure for the defensive response to proximal aversive stimulation. Panic-like responses, such as freezing and escape behaviors, often result when this structure is electrically stimulated. Freezing also ensues after termination of the dPAG stimulation (post-stimulation freezing – PSF). GABA and 5-HT have been proposed as the main neuromediators of these defense reactions. Neurokinins also play a role; however, it is unclear how the distinct types of neurokinin receptors are involved in the expression of these fear responses. This study investigated the role of NK-1 and NK-3 receptors in the unconditioned defensive behaviors induced by electrical stimulation of the dPAG of rats, with and without previous experience with contextual fear conditioning (CFC). Spantide (100 pmol/0.2 µL) and SB 222200 (50 and 100 pmol/0.2 µL), selective antagonists of NK-1 and NK-3 receptors, respectively, were injected into the dPAG. Injection of spantide had anti-aversive effects as determined by stimulation of the dPAG in naïve animals and in animals subjected previously to CFC. SB 222200 also increased these aversive thresholds but only at doses that caused a motor deficit. Moreover, neither spantide nor SB 222200 influenced the PSF. The results suggest that NK-1 receptors are mainly involved in the mediation of the defensive behaviors organized in the dPAG. Since dPAG-evoked PSF was not affected by intra-dPAG injections of either spantide or SB 222200, it is suggested that neurokinin-mediated mechanisms are not involved in the processing of ascending aversive information from the dPAG.

Key words: NK-1 and NK-3 receptors, dorsal periaqueductal gray, spantide, SB 222200, unconditioned fear, contextual fear conditioning.

Introduction

A brain aversion system made up of the dorsal PAG (dPAG), dorsomedial hypothalamus and amygdala has been associated with unconditioned fear (Graeff et al., 1986; Graeff 1990, 2004). Electrical or chemical stimulation of the dorsal periaqueductal gray (dPAG) causes a characteristic pattern of active defense reaction with alertness, freezing and escape responses, along with autonomic changes that resemble anxiety disorder (Graeff et al. 1990, 2004; Brandão et al., 2003; Borelli et al., 2004). Indeed, panic attacks have been related to the deregulation of the dPAG (Graeff 1990, 2004), dorsomedial hypothalamus (Johnson and Shekhar, 2006) and temporopolar cortex (Reiman et al., 1989). On the other hand, the hippocampus, amygdala and ventrolateral periaqueductal gray (vPAG) have been associated with conditioned fear. Malfunctioning of this system appears to be associated with generalized anxiety disorder (Gray and McNaughton, 2000). It seems that these two defensive systems are not entirely independent and some interaction between them may exist. For example, it has been proposed that anxiety states generated at the amygdala level may inhibit panic attacks elicited by activation of the neural substrates of aversion in the dPAG (Graeff 1990, 2004). However, against this hypothesis is the fact that panic attacks are frequently preceded by anticipatory anxiety (Graeff, 2002). Thus, we thought that it would be of interest to know the extent to which animals under fear conditioning react to the stimulation of the dPAG.

Defensive behaviors are hierarchically organized and different behaviors within this class are induced by aversive stimuli and can vary as a function of distance from a predator. This results in the concept of three levels of danger – namely potential (uncertain), distal and proximal threat –, each evoking a different type of defense reaction (Blanchard and Blanchard, 1990). It has been suggested that a particular emotion would be associated with a given level of defense. Stated in pathophysiological terms, the first level of defense has been related to generalized anxiety disorder (GAD), the second being implicated in specific phobias and the third with panic disorder (PD) (Deakin and Graeff 1991; Gray and MacNaughton 2000). Although the present knowledge of the neural substrate of these defense strategies is incomplete, there have been attempts to relate each level of defense with brain structures thought to be critical for the expression of the corresponding defense reaction. The vigorous, undirected flight elicited by proximal danger would be related to panic, the critical structure being the dPAG. In this context, it has been shown that there are two types of freezing behavior induced by direct stimulation

of the dPAG: one bound to the stimulus and another one appears when this stimulation terminates (Vianna et al., 2001; Brandão et al., 2008). The first type of freezing appears as a preparatory response for escape (immediate defensive responses) and the post-stimulation freezing (PSF) is related to the processing of aversive information that is relayed to higher structures (Borelli et al., 2005; Ruiz-Martinez et al., 2006; Brandão et al., 2008).

Substance P (SP) is an endogenous neurokinin (NK) present in the central nervous system and periphery (Severini et al., 2002; Pennefather et al. 2004; De Felipe et al., 1998; Gold et al., 2003; Commons, 2010). In mammals, SP is most abundant in the central nervous system, where it is widely distributed in brain regions involved in the regulation of affective behavior and the mediation of stress responses, such as the amygdala, septum, hippocampus, hypothalamus and periaqueductal gray (PAG) (Maeno et al., 1993; Barbaresi, 1998; Commons and Valentino, 2002; Hietala et al., 2005; Rigby et al., 2005; Nagano et al, 2006). It is known to be active in several behavioral processes such as reinforcement, learning, memory, fear and anxiety (Huston and Hasenohrl, 1995; Hasenohrl et al., 2000; Drew et al., 2005; Chahl, 2006). Three neurokinin receptors have so far been identified, the NK-1, NK-2 and NK-3 (Regoli, 1997; Janecka et al., 2005). SP binds to the three receptors, but the higher affinity is to NK-1 receptor (Mantyh, 2002).

Substantial concentrations of SP have been found in the dPAG (Li et al., 1990; Barbaresi, 1998). There is much evidence in support of the contention that SP is involved in stress-, depression- and anxiety-related behaviors (Kramer et al., 1998; Bondy et al., 2003; Hokfelt et al., 2003; Dableh et al., 2005; McLean, 2005). The anxiogenic effects of SP in the dPAG appear to be mediated by NK-1 receptors (Mongeau et al, 1998; De Araújo et al, 2001; Duarte et al., 2004). The observation that NK-1 receptor antagonists may be effective in the treatment of depression in patients with symptoms of anxiety has led to research efforts aimed at the development of therapies for both depression and anxiety (Kramer et al., 1998; Santarelli et al., 2001). NK-3 receptors, like NK-1 receptors, have been found mainly in cortical regions, including the frontal, parietal and cingulate cortex, various nuclei of the amygdala, the hippocampus and also in midbrain structures such as the PAG (Maggi, 1995; Ribeiro et al., 1999; Massi et al., 2000; Langlois et al., 2001). Recent developments of selective NK-3 agonists and antagonists, such as senktide and SB 222200, respectively, have contributed to our understanding of the pathophysiological roles of this receptor (Ribeiro et al, 1999; Langlois et al., 2001; Meltzer and Prus, 2006). It has been shown that NK-3 receptor agonists have anxiolytic-

and antidepressant-like effects in mice and rats, while a NK-3 antagonist was reported to be anxiogenic in mice (Teixeira et al., 1996; Kramer et al., 1998; Massi et al., 2000).

The involvement of NK-1 and NK-3 receptors in the defensive behavior induced by stimulation of the dPAG has not yet been thoroughly examined. In this study we measured the effects of intra-dPAG injections of antagonists of NK-1 and NK-3 receptors on the freezing, escape and PSF during stimulation of the dPAG in rats with and without previous aversive experience. We also monitored changes in motor activity caused by these injections using the open field test. Unraveling of the roles of NK-1 and NK-3 mechanisms in the components of defensive behaviors organized in the dPAG will help to shed light on the functions of the neural substrates of fear and anxiety at the midbrain level.

Methods

Animals

One hundred forty-four male Wistar rats weighing 250-280 g from the animal house of the Campus of Ribeirão Preto of the University of São Paulo were used. They were transported to a local vivarium in the laboratory where they were housed in groups of four per cage (40 × 30 × 25 cm). The animals were maintained under constant temperature (22 ± 1° C) and on a 12-h light/12-h dark cycle (07:00 - 19:00 lights on). After surgery these animals were maintained in pairs in Plexiglas-walled cages and given free access to food and water throughout the experiment. All experimental procedures were analyzed and approved by the Committee for Animal Care and Use of the University of São Paulo, Campus of Ribeirão Preto (No. 09.1.84.54.7). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in this study.

Surgery

The animals were anaesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg, i.p.) and fixed in a stereotaxic frame (David Kopf, Tujunga, CA). The upper incisor bar was set at 3.3 mm below the interaural line such that the skull was horizontal between bregma and lambda. A chemitrode made of a stainless steel guide cannula (o.d. 0.6 mm, i.d. 0.4 mm) glued to a brain electrode was aimed at the dPAG. The electrode was made of stainless steel wire, 160 µm in diameter, insulated except at the cross-section, and was introduced with a 16° angle towards the dPAG, with lambda serving as the reference for the following

coordinates: antero-posterior (AP) = 0.1 mm; medio-lateral (ML) = 1.9 mm. The dorso-ventral (DV) = 5.2 mm, taken from the surface of the skull. For all groups the electrode and cannula were fixed to the skull by means of acrylic resin and two stainless steel screws. The electrode wire was connected to a male pin so that it could be plugged into an amphenol socket at the end of a flexible electrical cable and used for brain stimulation. At the end of the surgery each guide-cannula was sealed with a stainless steel wire to protect it from obstruction.

Drugs

The following drugs were used: the NK-1 receptor antagonist spantide (SPA; [D-Arg1, D-Trp7, 9, Leu11] – SP acetate) (Sigma, Brazil) and NK-3 receptor antagonist SB 222200 (S) - 3 – methyl – 2 – phenyl – N – (1- phenylpropyl) – 4 – quinolinecarboxamide) (Sigma,USA). Spantide was dissolved and diluted to the desired concentration with phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) and the SB 222200 was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO 7.5% - vehicle, Sigma, Brazil) and diluted with phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4). Spantide was injected at the dose of 100 µmol/0.2 µL and SB 222200 at doses of 50 and 100 µmol/ 0.2 µL. The doses of the drugs and of DMSO used for dilution were chosen based on previous studies (Bassi et al., 2007 a,b; Bassi et al., 2009).

This study was divided into two parts with independent groups of animals. The first part examined the effects of microinjections of spantide and SB 222200 into the dPAG on the defensive reaction induced by electrical stimulation of this region of naïve rats. In the second part, the effects of these drugs on the defensive behavior induced by electrical stimulation of the dPAG were assessed in rats placed either in the same context where they previously received footshocks or in a different context. The open field test was used to examine motor effects of a drug dose when it produces a general impairment in the animal's performance in the dPAG stimulation procedure.

Microinjection Procedure

A total volume of 0.2 µL was used for drug injections into the dPAG. Control animals received the same volume of vehicle. The injection needle was a thin dental needle (0.3 mm, o.d.) connected to a 5 µL Hamilton syringe by means of a polyethylene tube. The injection needle was introduced through the guide cannula until its lower end was 1 mm below the guide cannula. The solutions were prepared shortly before use and injected into

the dPAG (0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$), driven by an infusion pump (Harvard Apparatus, South Natick, MA, U.S.A.). The displacement of an air bubble inside the polyethylene (PE-10; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.) tubing connecting the syringe needle to the intracerebral needle was used to monitor the microinjection. The needle was held in place for an additional 1 min to maximize diffusion away from the needle tip.

Experiment I: Effects of spantide and SB 222200 on the aversive thresholds determined by electrical stimulation of the dPAG.

One week after surgery, the animals were placed in an experimental box, which consisted of a cage (25 \times 25 \times 15 cm) with lateral walls and ceiling made of black and transparent Plexiglas, respectively, and floor made of 15 stainless bars with 2.0 mm diameter spaced 12 mm apart. The chamber was illuminated with a 40 W fluorescent lamp (80 lux at the arena floor level). The animals were allowed a 5 min period of habituation in the box at the beginning of each session. Afterwards, the brain was electrically stimulated by means of a sine wave stimulator (Del Vecchio, Brazil). The stimulation current was monitored by measuring the voltage drop across a 1K Ω resistor with an oscilloscope (Philips, USA). Brain stimulation (AC, 60 Hz, 10 s) was presented at 1 min intervals with the current intensity increasing by steps of 5 μA for measurements of the aversion thresholds.

Freezing threshold was operationally defined as the lowest intensity producing interruption of the ongoing behavior longer than 6 seconds and attentive postures towards the surroundings (Coimbra and Brandão 1993; Maissonette et al. 1996). The current intensity producing running (gallop) or jumping in two successive trials was considered to be the escape threshold. These measures were confirmed in another consecutive ascending series of electrical stimulation. A cut-off intensity of 120 μA (peak-to-peak) for the electrical stimulation was used. In order to investigate the behavioral effects of the electrical stimulation that triggered the escape behavior, the animals remained in the experimental box for another 8 min, without any stimulation, during which period the freezing behavior was recorded. This post-stimulation period is referred to as dPAG – evoked post-stimulation freezing (PSF) (Vianna et al. 2001a,b).

Soon after the measurements of these baseline values, each animal was wrapped in a cloth and a thin dental needle was introduced through the guide cannula until its lower end was 1 mm below the guide cannula. Then the animals received either PBS (N=10), DMSO (N=10), Spantide (N=10), SB 222200 50 μmol (N=10) or SB 222200 100 μmol

(N=10). Ten minutes afterwards, the aversive thresholds as well as the time spent in freezing after the dPAG stimulation were determined again. The most effective drug doses and waiting time after injections were selected from previous studies of this laboratory (Bassi et al., 2007a, b; Bassi et al., 2009).

Experiment II: Effects of spantide and SB 222200 on the aversion thresholds determined by dPAG electrical stimulation of rats under contextual conditioned fear.

Differently from Experiment I, in this study the animals were submitted to contextual conditioning sessions and the drug effects on the freezing and escape thresholds of electrical stimulation of the dPAG were determined on the testing day of the contextual fear conditioning (CFC).

Training: One week after the surgery, the control measurements of freezing and escape thresholds were determined by the same dPAG stimulation procedure as described in Experiment I. The animals were then submitted to contextual fear conditioning according to parameters routinely used in this laboratory (Santos et al. 2005; Ruiz-Martinez et al. 2008; Zanoveli et al. 2010). Briefly, they were placed in the experimental cage described above (training cage) and 6 min later each rat received 10 footshocks (0.6 mA, 1s) with a variable intertrial interval of 15 to 45 s. The shocks were delivered through the training cage floor by a constant current generator delivering scrambled stimulation (Albarsh Instruments, Brazil). Stimulus presentation was controlled by a microprocessor and an input/output board (Insight Equipment, Brazil). Each animal was removed 2 minutes after the last shock and returned to its home cage. Each training session lasted for 15 min.

Testing: The testing sessions were conducted without presentation of footshocks in the chamber described above (same context) or in a different context which consisted of a circular arena (60 cm in diameter and 50 cm high) made of acrylic. Ten minutes before the session in the same or different context each animal received an injection of either PBS (N=10), DMSO (N=10), spantide (N=10) or SB 222200 50 μ mol (N=10) into the dPAG, for each treatment group tested in the different context and the groups tested in the same context. The measure used to assess contextual fear was the time spent freezing during the test period of 3 minutes. Freezing was operationally defined as the total absence of movements of the body and vibrissa with the exception of those necessary for respiration. The animals were then submitted to 3-minute periods of electrical stimulation of the dPAG for the determination of the aversion thresholds and the time of post-stimulation freezing under the effects of the drugs injected into the dPAG.

Open field: Effects of spantide and SB 222200

As a control for the precedent experiments the effects of the treatment with spantide 100 pmol and SB 222200 100 pmol were evaluated on spontaneous locomotor activity. For this purpose, additional groups of rats were tested individually in the open field test.

Open field: It consisted of a transparent circular enclosure with 60 cm in diameter and 50 cm high, situated in an isolated room. The arena was divided into 12 areas by black lines of which a central zone comprised four compartments of the floor area and the residual area constituted the peripheral zone. The floor of the apparatus was divided in rays and concentric circles of approximately equal area. The illumination was maintained by an incandescent lamp (50 lux at the open field floor). The animals received either DMSO (N=8) or spantide 100 pmol or SB 222200 100 pmol (N=8) into the dPAG and immediately afterwards were gently placed in the center of the apparatus. The following behavioral responses were measured and analyzed during testing sessions of 10 minutes: number of crossings (entry into the adjacent floor section with the four paws between center and periphery of open field), and rearing (partial or total rearing onto the wall of open field). The open field was washed with a 20% water-alcohol solution before behavioral testing to eliminate possible bias due to odors left by previous rats.

Histology

On completion of the experiments, the animals were overdosed with urethane and perfused intracardially with saline followed by buffered 10% formalin. After this, Evans Blue (2%) was microinjected into the dPAG at the same volume as drug microinjections in order to mark the drug injection site. The brains were removed and maintained in formalin solution for one day and then were maintained in sucrose 30% for another three days. Serial 60- μ m brain sections were cut using a microtome, thaw-mounted on gelatinized slides and Nielsen-stained in order to localize the sites of injections according to the Paxinos and Watson atlas (1997).

Analysis of Results

The data are presented as mean + S.E.M. In Experiment I aversion threshold differences between pre- and post-treatments and duration of post-stimulation freezing were subjected to a Student's *t*-test or one-way ANOVA. In Experiment II, the duration of the conditioned freezing was subjected to a one-way ANOVA and the differences (testing

sessions – baseline) in the aversion thresholds and duration of the dPAG-evoked post-stimulation freezing were subjected to a two-way ANOVA, with treatment and contexts used as the factors. The factor treatment refers to injections of PBS, DMSO, spantide or SB 222200 into the dPAG. The factor context refers to the same and different contexts. Differences of multiple means were assessed with the Bonferroni's t-test ($P < 0.05$). In the open field test measures of locomotor activity were subjected to a one-way ANOVA ($P < 0.05$).

Results

As the intensity of the current applied to the dPAG increased, the animals suddenly stopped, became immobile and often urinated and defecated. With higher intensities, this freezing behavior was followed by vigorous running and jumping. A representative site of stimulation and microinjection into the dPAG is shown in Fig 1A. The electrode tips and the injection sites were situated inside the dorsolateral and in dorsomedial divisions of the PAG.

Effects of Spantide

Fig. 2 shows the mean (+SEM) variation in the freezing (A) and escape (B) thresholds determined by electrical stimulation of the dPAG across baseline and test phases in the groups of animals injected with PBS and spantide into the dPAG of rats. Student's *t*-tests applied on these data showed that treatments caused significant increases in the freezing ($t_{1,18} = 6.72$, $p < 0.05$) and escape ($t_{1,18} = 5.77$, $p < 0.05$) thresholds, but no significant effect of treatments was found on the duration of dPAG post-stimulation freezing ($t_{1,18} = 0.40$, $p > 0.05$). The baseline values for freezing ($t_{1,18} = 0.16$, $p > 0.05$) and escape ($t_{1,18} = 0.56$, $p > 0.05$) thresholds were not statistically different in Experiment I (Table 1).

Fig. 3A illustrates the mean (+SEM) duration of freezing for the animals submitted to the contextual conditioning procedure and treated with PBS and spantide before the testing sessions. Two-way ANOVA showed that context had a significant effect on freezing duration ($F_{1,36} = 38.06$, $p < 0.05$). There were also significant effects of treatment ($F_{1,36} = 30.43$, $p < 0.05$) and interaction between contexts \times treatments ($F_{1,36} = 29.02$, $p < 0.05$). *Post hoc* analysis showed that spantide decreased the expression of conditioned freezing compared to PBS-treated rats. It was also noticed that along with this reduction in freezing, rats did not show any reduction in motor activity compared to the controls (see

below). Figs. 3B and 3C show the effects of PBS and spantide on the mean change across baseline and test sessions of freezing and escape thresholds, respectively. Two-way ANOVA revealed a significant effect of treatment on the freezing and escape thresholds ($F_{1,36} = 52.84$ and 51.02 , respectively; $p < 0.05$ in both cases). There was no effect of context ($F_{1,36} = 1.30$ and 1.52 , for freezing and escape, respectively; $p_s > 0.05$) or interaction between treatment \times context ($F_{1,36} = 0.99$ and 1.07 , for freezing and escape, respectively; $p_s > 0.05$). *Post-hoc* analyses revealed that spantide increased the freezing and escape thresholds in both contexts ($p_s < 0.05$). Fig 3D shows the duration of the dPAG-evoked PSF. ANOVA indicated that there were no significant effects of treatment ($F_{1,36} = 0.83$, $p > 0.05$), contexts ($F_{1,36} = 0.69$, $p > 0.05$) or context \times treatments interaction ($F_{1,36} = 0.90$, $p > 0.05$). The baseline values for freezing ($F_{1,36} = 1.04$, $p > 0.05$) and escape ($F_{1,36} = 0.72$, $p > 0.05$) thresholds were not statistically different in Experiment II (Table 2).

Effects of SB 222200

Fig. 4 shows the mean (+SEM) variation in the freezing and escape thresholds determined by electrical stimulation of the dPAG across baseline and test phases of the groups of naïve animals injected with DMSO, SB 222200 50 μmol or SB 222200 100 μmol into the dPAG. One-way ANOVA showed that treatments caused significant increases in the freezing ($F_{2,27} = 15.44$, $p < 0.05$) and escape ($F_{2,27} = 10.97$, $p < 0.05$) thresholds, but no effect of treatments was found on the duration of dPAG post-stimulation freezing ($F_{2,27} = 1.63$, $p > 0.05$). *Post-hoc* comparisons revealed that SB 222200 100 μmol increased both types of defensive thresholds ($p < 0.05$). The baseline values for freezing ($F_{2,27} = 1.92$, $p > 0.05$) and escape ($F_{2,27} = 1.64$, $p > 0.05$) thresholds were not statistically different in Experiment I (Table 1).

Fig 5 shows the effects of controls, spantide 100 μmol and SB 222200 100 μmol on the locomotor activity in the open field. One-way ANOVA applied on these data showed that treatments caused significant reduction in the number of crossings ($F_{2,21} = 11.56$, $p < 0.05$) and rearings ($F_{2,21} = 3.74$, $p < 0.05$). *Post-hoc* comparisons revealed that SB 222200 100 μmol caused significant changes in locomotor activity, decreasing the number of crossings and rearings.

Since SB 222200 100 μmol caused a motor deficit in Experiment I, this dose was not tested in Experiment II, so that only DMSO and SB 222200 50 μmol were used in animals subjected to the fear conditioning procedure. Fig. 6A illustrates the mean duration

of freezing for the animals under these treatments and subjected to the CFC. Two-way ANOVA showed a significant effect of context ($F_{1,36} = 87.45$, $p < 0.05$), but there was no significant effects of treatments ($F_{1,36} = 3.99$, $p > 0.05$), indicating that freezing behavior was highly dependent on the context previously paired with shock. Fig. 6B and 6C show the drug effects on the freezing and escape thresholds, respectively, as determined by the procedure of electrical stimulation of the dPAG under CFC. Two-way ANOVA revealed no significant effect of context on the freezing and escape thresholds ($F_{1,36} = 2.12$ and 1.01 for freezing and escape, respectively; $p > 0.05$), treatments ($F_{1,36} = 0.65$ and 0.12 , $p < 0.05$ in both situations), or interaction between treatment \times context ($F_{1,36} = 0.03$ and 0.24 for freezing and escape, respectively; $p < 0.05$). The baseline values for freezing ($F_{1,36} = 1.10$, $p > 0.05$) and escape ($F_{1,36} = 0.79$, $p > 0.05$) thresholds were not statistically different in Experiment II (Table 2). Fig 6D presents the mean duration of freezing after dPAG stimulation in rats that passed by the CFC procedure. ANOVA indicated that there were no significant effects of treatment ($F_{1,36} = 0.003$, $p > 0.05$), context ($F_{1,36} = 3.55$, $p > 0.05$) or context \times treatments interaction ($F_{1,36} = 0.003$, 3.55 and 0.24 ; respectively, $p > 0.05$ in all conditions).

Discussion

The dorsal periaqueductal gray (dPAG) is considered to be the output station for the responses of the so-called brain aversion system, which has been associated with the production of high fear states that resemble panic attacks (Brandão et al., 1999; Vianna et al., 2001). Replicating previous reports, in the present study we found that the stepwise increase of current of the electric stimulus applied to this region evoked the whole pattern of defense reaction, with freezing followed by escape responses and dPAG-evoked post-stimulation freezing.

Substance P (SP) has been implicated in the mediation of fear in the dPAG (De Araújo et al. 1999, 2001a). Local injections of SP into this region elicit a variety of anxiety-like behaviors in animals, including conditioned place aversion and a decrease in time spent in the open arms of the elevated plus maze, a widely used animal model of anxiety (Aguiar and Brandão, 1994; 1996; De Araújo et al., 1998, 2001b). Injections of a C-terminal fragment of substance P also induced behavioral activation with defensive characteristics (De Araújo et al. 1999, 2001b). Several studies have shown that the anxiogenic-like effects of substance P in the dPAG appear to be mediated by NK-1 receptors (Mongeau et al. 1998; De Araújo et al. 2001b; Duarte et al. 2004; Bassi et al.

2007b). Infusion of the NK-1 agonist SAR-MET-SP into the dPAG had anxiogenic-like effects in the EPM test, accompanied by antinociception (Bassi et al., 2007b). These data associate NK-1 mechanisms of the dPAG with the processing of proximal threatening stimulation or intense fear. Antinociception has been considered to be part of the defense reaction (see Brandão et al. 1999, for a review).

The present study extends the analysis of NK involvement in the defense reaction by comparing the effects of injection of the NK-1 receptor- antagonist spantide and the NK-3 receptor antagonist SB222200 into the dPAG (Regoli et al., 1994; Jenkinson et al., 2000; Yip and Chahl, 2001; Bassi et al., 2007, 2009). The antiaversive effects obtained with spantide in the present study support the hypothesis of a proaversive role of NK-1 receptors of the dPAG, and corroborate and extend the proposed involvement of the NK system in the modulation of defensive behavior. In fact, the observation that NK-1 receptor antagonists may be effective in the treatment of depression in patients with symptoms of appreciable anxiety has led to research efforts aimed at the development of NK-related therapeutics for both depression and anxiety (Kramer et al. 1998; Santarelli et al. 2001; Ranga and Krishnan 2002; Quartara and Altamura 2006). Further assays with NK-1 receptor antagonists in humans are still needed before a clear picture emerges regarding the use of these compounds in the clinics.

Whereas NK-1 receptors appear to be involved in the aversive effects of SP in the dPAG, the role of NK-2 and NK-3 receptors of this region in the modulation of fear is still unclear. The present results give support to the notion that NK-1- and NK-3-mediated mechanisms have distinct roles in the dPAG. Contrasting with the known fear-related processes mediated by NK-1 receptors, NK-3 receptors in the dPAG mediate nociceptive responses in this area (Bassi et al., 2009). In this latter study, senktide – a selective NK-3 agonist – elicited a significant increase in exploratory behavior in the elevated plus-maze, an effect accompanied by hyperalgesia and an increase in the number of 22 kHz ultrasonic vocalizations (USVs). The nociceptive effects, increased locomotor activity, and USV emissions elicited by local injections of senktide were reduced by prior injections of the selective NK-3 receptor antagonist SB222200 (50 pmol/0.2 µL) into the dPAG. In the present study this NK-3 antagonist at this same dose did not have significant effects on the aversion thresholds determined by gradual increases in the electrical current applied to the dPAG. At the dose of 100 pmol/0.2 µL SB 222200 increased the freezing and escape thresholds. However, this effect can be attributed to a motor deficit, since, as noted in the present study, it decreased the exploratory activity of the animals subjected to the open

field test. Also, in a previous study from this laboratory SB 222200 did not show any effect in the plus maze test at doses of 50 and 100 pmol, with the latter dose causing a reduction in the closed arm entries (Bassi et al., 2009, page 18). In this study, similar injections of the NK-3 agonist senktide into the dPAG increased the locomotor activity without causing any significant effect on the emotional variables of the elevated plus-maze test (Bassi et al., 2009). In line with this report, the present data show that SB 222200 selectively acted on the motor activity by decreasing the number of crossings and rearing. These effects are further evidence for the lack of involvement of NK-3 receptors of the dPAG with fear or anxiety-related processes. NK-3 receptors of the dPAG are most likely involved in pain processing and exploratory activity rather than with fear processing or expression of defensive behaviors, as already shown (Bassi et al. 2009). However, when applied systemically, the NK-3 agonist, senktide, was also shown to be pro-mnemonic in rats and mice and to increase ACh levels in the frontal cortex, amygdala and hippocampus of aged rats (Schäble et al, 2011; Zlomuzica et al 2008).

It seems reasonable to assume that animals show stronger defensive reaction to an unconditioned stimulus that activates the dPAG in an environment that has been previously paired with footshock. In fact, defensive behaviors are hierarchically organized and different behaviors within this class are provoked by aversive stimuli of different intensities (Blanchard et al. 1969, 1972). For example, moderate freezing might be the result of mild or distant threatening stimulation whereas intense freezing could be the outcome of stronger or nearer aversive stimulation (Santos et al., 2005). Rats under the conjoint presentation of such aversive stimulation, are even more afraid, as indicated by their higher freezing responses in comparison with dPAG-evoked unconditioned fear of rats placed in a context different from that where they received footshocks (Broiz et al. 2008). Indeed, midazolam did not produce any effect on the startle of rats at high fear conditioning, but had an anxiolytic-like effect on the contextual fear-potentiated startle (Santos et al., 2005). The novelty of the findings presented here is that whereas the injection of the antagonist NK-1 spantide increased the aversion thresholds, the NK-3 antagonist SB 222200 did not produce any significant effects on the aversion thresholds in rats that had experienced a conditioned fear procedure. In rats without previous aversive experience, 100 pmol of SB 222200 caused an increase in the aversive thresholds, which could be contaminated by motor impairments as shown by the open field test used as control. The present results suggest that NK-1 receptors are mainly involved in the

expression of the defensive behavior induced by electrical stimulation of the dPAG of rats that had previously experienced contextual fear conditioning.

The contextual fear is evoked when a specific environment (or context) is repeatedly paired with stimulation that is unpleasant or aversive. Mice that receive unavoidable shocks to the paws inside an experimental box exhibit intense context-dependent freezing (conditioned) when they are returned to this aversive context (Vianna et al., 2001a,b; Oliveira et al., 2007; Broiz et al., 2008). This freezing has been associated to generalized anxiety disorder (Brandão et al., 2008). Our results show that following intra-dPAG injections of spantide animals significantly reduced the time of contextual freezing, indicating a clear antiaversive effect. The lack of effect of the NK-3 antagonist SB 222200 on this conditioned freezing confirms the prediction that NK-1 and NK-3 receptors mediate different aspects of fear in the dPAG. Stressing this difference in the present study, the influence of conditioned aversive stimuli (context cues) on dPAG-evoked freezing behavior appears to be differentially mediated by neurokinin mechanisms within the dPAG. The effects of SB 222200 contrast with those attributed to the NK-1 receptor subtype in the dPAG in the control of pathological anxiety states.

The dPAG post-stimulation freezing is not a conditioned response to the context where the dPAG electrical stimulation was administered. Previous studies from this laboratory using the context shift procedure showed that this freezing behavior persists when the animal is placed in a different context soon after the dPAG stimulation (Vianna et al. 2001 a, b). Neither NK-1 nor NK-3 receptors of the dPAG seem to be involved in the modulation of the dPAG post-stimulation freezing, since no effect at all could be obtained after the injections of spantide and SB 222200 into the dPAG on this variable. The post-stimulation freezing undergoes a regulation different from the dPAG-evoked fear, since electrolytic lesions, or inactivation with muscimol of the amygdaloid complex, reduce the dPAG post-stimulation freezing, but do not affect dPAG-evoked freezing and escape (Oliveira et al. 2004; Ruiz-Martinez et al. 2006). The post-dPAG stimulation freezing mediates the aversive ascending information, which is probably relayed through the amygdala. Thus, ascending dPAG efferents seem to be activated during this condition and the lack of change in the thresholds for freezing and escape observed in amygdala-lesioned or -inactivated animals may be linked to the fact that the dPAG itself contains neural substrates for the production of unconditioned fear. Thus, although the dPAG-evoked freezing and dPAG-post-stimulation freezing are interrelated, they seem to have different neural substrates in the same way as dPAG-evoked freezing and escape behaviors appear

to have (Ferreira-Netto et al. 2005; Borelli et al. 2005; Oliveira et al., 2007; Broiz et al., 2008). It is likely that dPAG integrates the sensory information by transmitting this information for the amygdala, which allows the recognition of the threatening stimuli in fear-experienced animals.

In summary, the present results suggest that NK-1 receptors, but not NK-3 receptors, mediate the defensive behaviors induced by electrical stimulation of the dPAG of rats naive or rats with contextual fear conditioning experience. As dPAG post-stimulation freezing was not affected by any of these drugs injected into the dPAG, it is suggested that ascending aversive information from dPAG to higher structures in the brain is not under the control of neurokinin-mediated mechanisms. Moreover, the present data associate NK-3 mechanisms of the dPAG with the emergence of exploratory behavior. This psychomotor activation may be associated with the processing of sensory information, in which NK-3 mechanisms are also involved (Bassi et al. 2009).

Acknowledgements

This study was supported by FAPESP (11/00041-3). A.C.Broiz and G.S. Bassi are recipients of scholarships from CAPES and CNPq, respectively. M.L. Brandão is a research fellow from CNPq. M.A.De Souza Silva was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant DE 792/2-4.

References

- Aguiar, M.S., Brandão, M.L., 1996. Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of rats in the plus-maze test. *Physiol. Behav.* 60, 1183-1186.
- Aguiar, M.S., Brandão, M.L., 1994. Conditioned place aversion produced by microinjection of substance P into the periaqueductal gray of rats. *Behav. Pharmacol.* 5, 369-373.
- Barbaresi, P., 1998. Immunocytochemical localization of Substance P receptor in rat periaqueductal gray matter, a light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 398, 473-490.
- Bassi, G.S., Broiz, A.C., Gomez, M.Z., Brandão, M.L., 2009. Evidence for mediation of nociception by injection of the NK-3 receptor agonist, senktide, into the dorsal periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacol.* 204, 13-24.

- Bassi, G.S., Nobre, M.J., Carvalho, M.C., Brandão, M.L., 2007a. Substance P injected into the dorsal periaqueductal gray causes anxiogenic effects similar to the long-term isolation as assessed by ultrasound vocalizations measurements. *Behav. Brain Res.* 1822, 301-30.
- Bassi, G.S., Nobre, M.J., De Araújo, J.E., Brandão, M.L., 2007b. Anxiogenic effects of activation of NK-1 receptors of the dorsal periaqueductal gray as assessed by the elevated plus-maze, ultrasound vocalizations and tail-flick tests. *Neuropeptides* 41, 365-374.
- Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., 1972. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 81,281–290.
- Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., Rodgers, R.J., 1990. Pharmacological and neural control of antipredator defense in the rat. *Aggress. Behav.* 16,165-175.
- Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., 1969. Crouching as an index of fear. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 67, 370–375.
- Bondy, B., Baghai T.C., Minov, C., Schüle, C., Schwarz, M.J., Zwanzger, P., Rupprecht, R., Möller, H.J., 2003. Substance P serum levels are increased in major depression, preliminary results. *Biol. Psychiatry* 536, 538-542.
- Borelli, K.G., Nobre, M.J., Brandão, M.L., 2004. Effects of acute and chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77,557-566.
- Borelli, K.G., Ferreira-Netto, C., Coimbra, N.C., Brandão, M.L., 2005. Fos-like immunoreactivity in the brain associated with freezing or escape induced by inhibition of either glutamic acid decarboxylase or GABAA receptors in the dorsal periaqueductal gray. *Brain Res.* 105, 100-111.
- Brandão, M.L., Anseloni, V.Z., Pandóssio, J.E., De Araújo, J.E., Castilho, V.M., 1999. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 863-75.
- Brandão, M.L., Vianna, D.M., Masson, S., Santos, J., 2003. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. *Rev. Bras. Psiquiat.* 252, 36-41.
- Brandão, M.L., Zanoveli, J.M., Ruiz-Martinez, R.C., Oliveira, L.C., Landeira-Fernandez, J., 2008. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats, association with different types of anxiety. *Behav. Brain Res.* 89, 76-84.
- Broiz, A.C., Oliveira, L.C., Brandão, M.L., 2008. Regulation of conditioned and unconditioned fear in rats by 5-HT1A receptors in the dorsal periaqueductal gray. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 89, 76-84.

- Coimbra, N.C., Brandão, M.L., 1993. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behavior elicited by midbrain tectum stimulation. *Behav. Brain Res.* 59,131-139.
- Commons, K.G., 2010. Neuronal pathways linking substance P to drug addiction and stress. *Brain Res.* 1314, 175-82.
- Commons, K.G., Valentino, R.J. 2002. Cellular basis for the effects of substance P in the periaqueductal gray and dorsal raphe nucleus. *J. Comp. Neurol.* 447, 82-97.
- Chahl, L.A., 2006. Tachykinins and neuropsychiatric disorders. *Curr. Drugs Targets* 78, 993-1003.
- Dableh, L.J., Yashpal, K., Rochford, J., Henry, J.L., 2005. Antidepressant-like effects of neurokinin receptor antagonists in the forced swim test in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 507, 99-105.
- Davis, M., Astrachan, D.I., 1978. Conditioned fear and startle magnitude, Effects of different footshock and backshock intensities used in training. *J Exp Psychol Anim Behav Proc*, 4, 95-103.
- De Araújo, J.E., Brandão, M.L., Huston, J.P. 1999. Anxiogenic effects of substance P and its 7-11 C-terminal, but not the 1-7-N-terminal injected into the dorsal periaqueductal gray. *Peptides* 20, 1437-1444.
- De Araújo, J.E., Huston, J.P., Brandão, M.L., 1998. Aversive effects of the C-fragment of substance P in the dorsal periaqueductal gray matter. *Exp. Brain Res.* 123, 84-89.
- De Araújo, J.E., Huston, J.P., Brandão, M.L., 2001a. Opposite effects of substance P fragments C anxiogenic and N anxiolytic injected into dorsal periaqueductal gray. *Eur J. Pharmacol.* 432, 43-51.
- De Araújo, J.E., Huston, J.P., Brandão, M.L., 2001b. Place aversion induced by microinjections of C-fragment of substance P into the dorsal periaqueductal gray of rats is mediated by tachykinin NK1 receptors. *Peptides*, 22, 1447-1452.
- De Felipe, C., Herrero, J.F., O'Brien, J.A., Palmer, J.A., Doyle, C.A., Smith, A.J., Laird, J.M., Belmonte, C., Cervero, F., Hunt, S.P., 1998. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature* 392, 394-397.
- Deakin, J.F.W., Graeff, F.G., 1991. 5-HT and mechanisms of defence. *J. Psychopharmacol.* 5, 305-315.
- Drew, G.M., Mitchell, V.A., Vaughan, C.W., 2005. Postsynaptic actions of substance P on rat periaqueductal grey neurons in vitro. *Neuropharmacol.* 49, 587-595.

- Duarte, F.S., Testolin, R., De Lima, T.C.M., 2004. Further evidence on the anxiogenic-like effect of substance P evaluated in the elevated plus-maze in rats. *Behav. Brain Res.* 154, 501-510.
- Ferreira-Netto, C., Borelli, K.G., Brandão, M.L. 2005. Neural segregation of Fos-protein distribution in the brain following freezing and escape behaviors induced by injections of either glutamate or NMDA into the dorsal periaqueductal gray of rats. *Brain Res.* 1031, 151-163.
- Gadd CA, Murtra P, De Felipe C, Hunt, S.P., 2003. Neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the amygdala modulate morphine reward and anxiety behaviors in the mouse. *J. Neurosci.* 23:8271-8280.
- Graeff, F.G., 1990. Brain defense systems and anxiety, in Roth M., Burrow G.D., Noyes, R., (Eds.), *Handbook of anxiety*, vol 3, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 307-354.
- Graeff, F.G., 1991., Neurotransmitters in the dorsal periaqueductal gray and animal models of panic anxiety, in, Briley M., File S.E., (Eds.), *New concepts in anxiety*, Macmillan Press, London, pp. 288–312.
- Graeff, F.G., 2002. On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacol.* 163, 467-476.
- Graeff, F.G., 2004. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 239-259.
- Graeff, F.G., Brandão M.L., Audi, E.A., Schultz, M.T.B., 1986. Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. *Behav. Brain Res.* 21, 65-72.
- Gray, J.A., McNaughton, N., 2000. *The neuropsychology of anxiety* 2nd ed., Oxford University Press, Oxford.
- Hasenohrl, R.U., Souza-Silva, M.A., Nikolaus, S., Tomaz, C., Brandao, M.L., Schwarting, R.K., Huston, J.P., 2000. Substance P and its role in neural mechanisms governing learning, anxiety and functional recovery. *Neuropeptides* 34, 272-80.
- Hietal, J. et al. 2005. Visualization and quantification of neurokinin-1 NK-1 receptors in the human brain. *Mol Imaging Biol*, 7, 262-272.
- Hokfelt, T., Bartfai, T., Bloom, F., 2003. Neuropeptides, opportunities for drug discovery. *Lancet Neurol*, 28, 463-72.
- Huston, J.P., Hasenohrl, R.U., 1995. The role of neuropeptides in learning, focus on the neurokinin substance P. *Behav. Brain Res.* 66, 117-27.

- Janecka, A., Poels, J., Fichna, J., Studzian, K., Vanden Broeck, J., 2005. Comparison of antagonist activity of spantide family at human neurokinin receptors measured by aequorin luminescence-based functional calcium assay. *Regulat. Peptides* 131, 23-28.
- Jenkinson, K.M., Mann, P.T., Southwell, B.R., Furness, J.B., 2000 Independent endocytosis of the NK1 and NK3 tachykinin receptors in neurons of the rat myenteric plexus. *Neurosci* 100, 191-199.
- Johnson, P.L., Shekhar, A., 2006. Panic-prone state induced in rats with GABA dysfunction in the dorsomedial hypothalamus is mediated by NMDA receptors. *J. Neurosci.* 28,1015-1022.
- Kramer, M.S., Cutler, N., Feighner, J., Shrivastava, R., Carman, J., Sramek, J.J., Reines, S.A., Liu, G., Snavelly, D., Wyatt-Knowles, E., Hale, J.J., Mills, S.G., MacCoss, M., Swain, C.J., Harrison, T., Hill, R.G., Hefti, F., Scolnick, E.M., Cascieri, M.A., Chicchi, G.G., Sadowski, S., Williams, A.R., Hewson, L., Smith, D., Carlson, E.J., Hargreaves, R.J., Rupniak, N.M., 1998 Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* 281, 1640-1645.
- Langlois, X., Wintmolders, C., te Riele, P., Leysen, J.E., Jurzak, M., 2001. Detailed distribution of neurokinin 3 receptors in the rat, guinea pig and gerbil brain, a comparative autoradiographic study. *Neuropharmacol.* 40, 242-253.
- Li, Y.Q., Jia, H.G., Rao, Z.R., Shi, J.W. 1990. Serotonin-, substance P- or leucine-enkephalin-containing neurons in the midbrain periaqueductal gray and nucleus raphe dorsalis send projection fibers to the central amygdaloid nucleus in the rat. *Neurosci Lett*, 120, 124-7.
- Maeno, H., Kiyama, H., Tohyama, M., 1993. Distribution of the substance P receptor NK-1 receptor in the central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 18, 43-58.
- Maggi, C.A., 1995. The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol.* 26 5, 911-944.
- Maisonnette, S.S., Kawasaki, M.C., Coimbra, N.C., Brandão, ML. 1996. Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Res. Bull.* 40, 93-98.
- Maisonnette, S.S., Morato, S., Brandão, M.L., 1993. Role of resocialization and of 5-HT_{1A} receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus-maze test. *Physiol. Behav.* 54,753-758.
- Mantyh, P.W. 2002. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. *J. Clin. Psychiatr.* 63 Suppl 11, 6-10.

- Maritjena, I.D., Calvo, N., Volosin, M., Molina, V.A. 1997. Prior exposure to a brief restraint session facilitates the occurrence of fear in response to a conflict situation, behavioral and neurochemical correlates. *Brain Res.* 752, 136-142.
- Massi, M., Panocka, I., De Caro, G. 2000. The psychopharmacology of tachykinin NK3 receptors in laboratory animals. *Peptides* 21, 1597-1609.
- McLean, S. 2005. Do substance P and the NK1 receptor have a role in depression and anxiety? *Curr. Pharm. Des.* 1112, 1529-47.
- Meltzer, H., Prus, A., 2006. NK3 receptor antagonists for the treatment of schizophrenia. *Drug Discovery Today. Therapeutic Strategies* 3 4, 555-60.
- Mongeau, R., Marsden, C.A., De Oca, B.M., Fanselow, M.S., 1998. Differential effects of neurokinin-1 receptor activation in subregions of the periaqueductal gray matter on conditional and unconditional fear behaviors in rats. *Behav. Neurosci.* 1125, 1125-1135.
- Nagano, M., Saitow, F., Haneda, E., Konishi, S., Hayashi, M., Suzuki, H. 2006. Distribution and pharmacological characterization of primate NK-1 and NK-3 tachykinin receptors in the central nervous system of the rhesus monkey. *Br. J. Pharmacol.* 147, 316-323.
- Oliveira, L.C., Broiz, A.C., Macedo, C.E., Landeira-Fernandez, J., Brandão, M.L., 2007. 5-HT₂ receptor mechanisms of the dorsal periaqueductal gray in the conditioned and unconditioned fear in rats. *Psychopharmacol.* 191, 253-262.
- Oliveira, L.C., Nobre, M.J., Brandão, M.L., Landeira-Fernandez, J. 2004. Role of amygdala in conditioned and unconditioned fear generated in the periaqueductal gray. *NeuroReport*, 15, 2281-2285.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* San Diego, CA, Academic Press.
- Pennefather, J.N., Lecci, A., Candenas, M.L., Patak, E., Pinto, F.M., Maggi, C.A. 2004. Tachykinins and tachykinin receptors, a growing family. *Life Sci* 74 12, 1445-63.
- Quartara, L., Altamura, M. 2006. Tachykinin receptors antagonists, from research to clinic. *Curr. Drug Targets*, 7, 975-992.
- Ranga, K., Krishnan, R., 2002. Clinical experience with substance P receptor NK1 antagonists in depression. *J. Clin. Psychiatry* 6311, 25-29.
- Regoli, D., 1997. Pharmacological receptors for SP and neurokinins. *Life Sci.* 40, 109-117.
- Regoli, D., Boudon, A., Fauchere, J.L., 1994. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol. Rev.* 464, 551-599.

- Reiman, E.M., Raichle, M.E., Robins, E., 1989 Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. *Arch. Gen. Psychiatry* 46, 493–500.
- Ribeiro, S.J., Teixeira, R.M., Calixto, J.B., De Lima, T.C.M., 1999. Tachykinin NK3 receptor involvement in anxiety. *Neuropeptides*, 332, 181-188.
- Rigby, M., O'Donnell, R., Rupniak, N.M., 2005. Species differences in tachykinin receptor distribution, further evidence that the substance P NK1 receptor predominates in human brain. *J. Comp. Neurol.* 490, 335-353.
- Ruiz-Martinez, R.C., Oliveira, A.R., Brandão, M.L., 2006. Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. *Neurobiol. Learn. Mem.* 85, 58-65.
- Santarelli, L., Gobbi, G., Debs, P.C., Sibille, E.T., Blier, P., Hen, R., Heath, M.J., 2001. Genetic and pharmacological disruption of neurokinin I receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1912-1917.
- Santos, J.M., Gárgaro, A.C., Oliveira, A.R., Masson, S., Brandão, M.L., 2005. Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing behavior and fear-potentiated startle. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 15, 239-246.
- Schäble, S., Topic, B., Buddenberg, T., Petri, D., Huston, J.P., de Souza Silva, M.A. 2011. Neurokinin3-R agonism in aged rats has anxiolytic- antidepressant-, and promnestic-like effects and stimulates ACh release in frontal cortex, amygdala
- Severini, C., Improta, G., Falconieri-Erspamer, G., Salvadori, S., Erspamer, V., 2002. The tachykinin peptide family. *Pharmacol. Ver.*, 542, 285-322.
- Teixeira, R.M., Santos, A.R., Ribeiro, S.J., Calixto, J.B., Rae, G.A., De Lima, T.C., 1996. Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 311 1, 7-14.
- Vianna, D.M.L., Landeira-Fernandez J., Brandão, M.L., 2001b. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 711-719.
- Vianna, D.M.L., Landeira-Fernandez, J., Graeff, F.G., Brandão, M.L., 2001a. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. *Learn. Mem.* 8, 164-169.
- Walker, D.L., Cassella, J.V., Lee, Y., De Lima, T.C., Davis, M., 1997. Opposing roles of the amygdala and dorsolateral periaqueductal gray in fear-potentiated startle. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 743-753.

- Yip, J., Chahl, L.A., 2001. Localization of NK1 and NK3 receptors in guinea-pig brain. *Regulat. Peptides* 98, 55-62.
- Zlomuzica, A., Dere, E., Huston, J.P., de Souza Silva, M.A., 2008. NK₃ receptor agonism promotes episodic-like memory in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 420-425.

LEGENDS TO THE FIGURES

Fig 1. Representative photomicrograph of electrode tips in the dorsal periaqueductal gray (A) and sites of injections into this region from the atlas of Paxinos and Watson (1997) (B). The number of points in the figure is less than the total number of rats used because of several overlaps. dPAG = dorsal periaqueductal gray; vPAG = ventral periaqueductal gray; DRN = dorsal raphe nucleus. Scale bar equal 800 μ m in A.

Fig 2. Mean (+SEM) differences in freezing (A) and escape (B) thresholds determined before and after microinjections of PBS and spantide 100 pmol into the dPAG of naïve rats. The time of post-stimulation freezing is depicted in C. N=10 for the PBS and spantide groups. *P < 0.05 in relation to the PBS group (Student's *t*-test).

Fig 3. Effects of contextual fear conditioning measured as duration (mean + SEM) of freezing (A) when rats were placed into a different or the same chamber where they had received footshock (10 x 0.6 mA, 1s). Mean (+SEM) differences in the freezing (B) and escape (C) thresholds determined before and after microinjections of PBS and spantide 100 pmol into the dPAG of rats placed in non-conditioned (different context) or same context where they received foot shocks previously. D: dPAG-evoked pos-stimulation freezing. N=10 for each treatment group tested in the different and in the same context. *P < 0.05, different from the group PBS tested in the same context (Student-*t* test). # P < 0.05, different from the corresponding group tested in the different context (two-way ANOVA).

Fig 4. Mean (+SEM) differences between freezing (A) and escape (B) thresholds determined before and after microinjections of DMSO, SB 222200 50 μ mol or SB 222200 100 μ mol into the dPAG of naïve rats. The time of pos-stimulation freezing is depicted in C. N=10 for each group. *P < 0.05 in relation to the DMSO group (ANOVA followed by Bonferroni test).

Fig 5. Number of crossings (A) and rearings (B) in the open-field test. The animals were injected with DMSO (N = 8), spantide 100 pmol or SB 222200 100 μ mol (N= 8) into the

dPAG. Data are expressed as mean + S.E.M. *P < 0.05 in relation to control group (ANOVA followed by Bonferroni test).

Fig 6. Effects of contextual fear conditioning measured as duration (mean + SEM) of freezing (A) when rats were placed into the same or different context chamber where they had received footshock (10 x 0.6 mA, 1s). Mean (+SEM) differences in the freezing (B) and escape (C) thresholds determined before and after microinjections of DMSO or SB 222200 50 µmol into the dPAG of rats placed in non-conditioned (different context) or same context where they received foot shocks previously. D: Post-stimulation freezing. N=10 for each treatment group tested in the different context and in the same context. *P < 0.05 different from the corresponding groups tested in the different context (two-way ANOVA followed by Bonferroni test).

Table 1. Mean ± S.E.M. of baseline values (µA) corresponding to the freezing and escape thresholds determined for the groups of animals that received injections of PBS, spantide, DMSO, SB 222200 50 µmol and SB 222200 100 µmol.

Treatments	Freezing	Escape
PBS	58.00 ± 5.84	70.00 ± 6.72
Spantide	61.50 ± 6.46	69.50 ± 5.89
DMSO	71.50 ± 5.53	76.00 ± 5.82
SB 222200 50 µmol	57.00 ± 5.18	63.50 ± 5.48
SB 222200 100 µmol	59.50 ± 6.03	66.00 ± 6.58

Table 2. Mean ± S.E.M. of baseline values (µA) corresponding to the freezing and escape thresholds determined for the groups of animals that received injections of PBS, spantide, DMSO and SB 222200 50 µmol into the dPAG were submitted afterwards to the contextual fear conditioning in the same and different contexts.

Treatments	Same context		Different context	
	Freezing	Escape	Freezing	Escape
PBS	58.00 ± 4.44	65.00 ± 4.78	61.00 ± 6.23	67.50 ± 6.25
Spantide	49.50 ± 4.63	58.00 ± 4.65	55.00 ± 4.66	61.00 ± 5.10

DMSO	71.50 ± 5.53	77.50 ± 5.34	72.50 ± 8.01	78.00 ± 8.04
SB 222200 50 µmol	57.00 ± 7.84	63.00 ± 8.05	67.50 ± 6.51	74.50 ± 6.81

PHOTOMICROGRAPH AND SITES OF INJECTIONS INTO THE dPAG

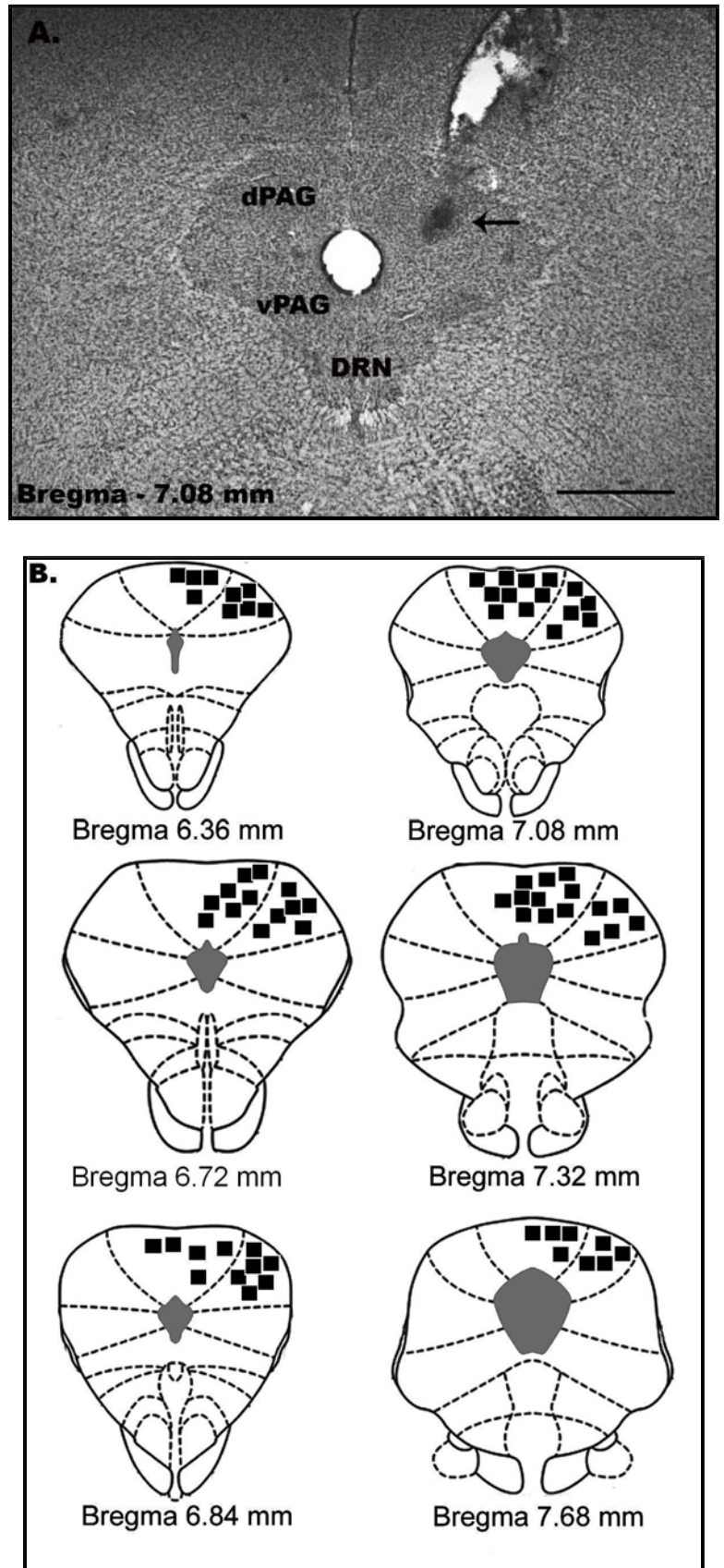


Figure 1

Figure 2

[Click here to download high resolution image](#)

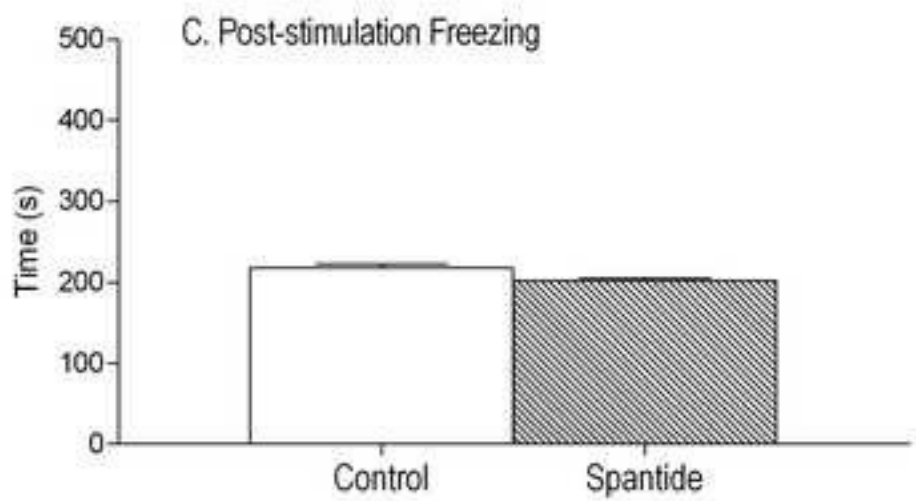
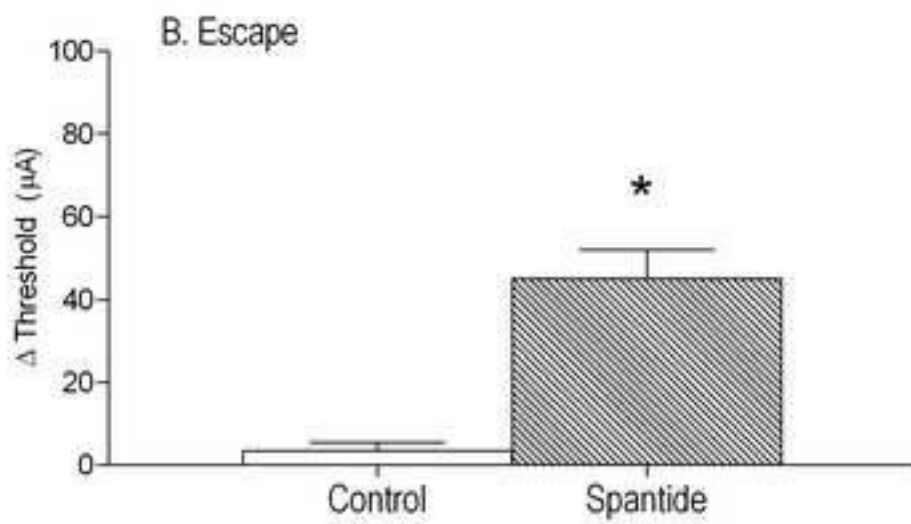
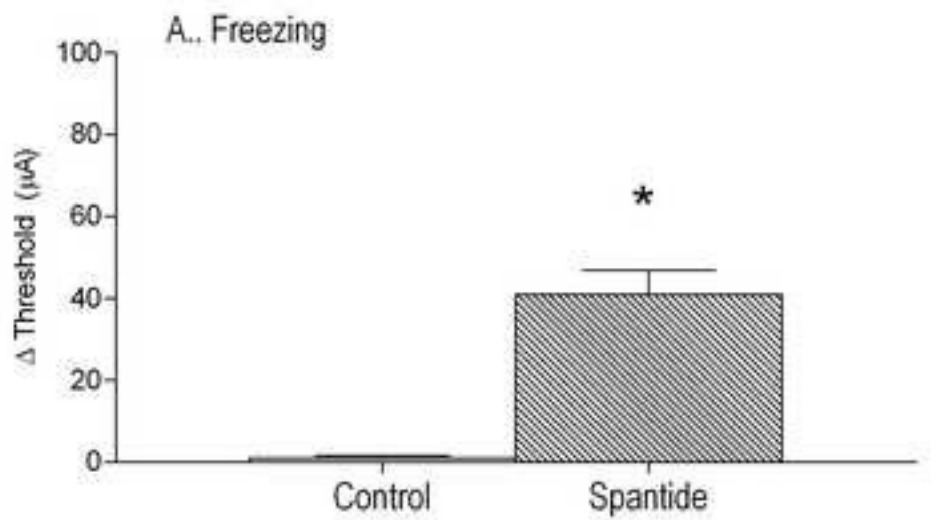


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

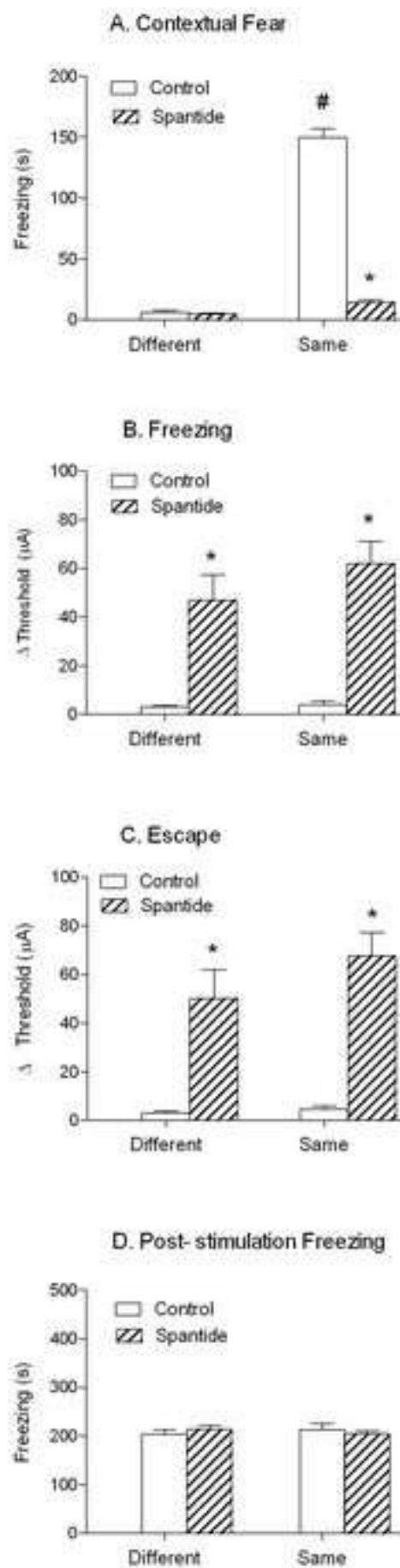


Figure 4

[Click here to download high resolution image](#)

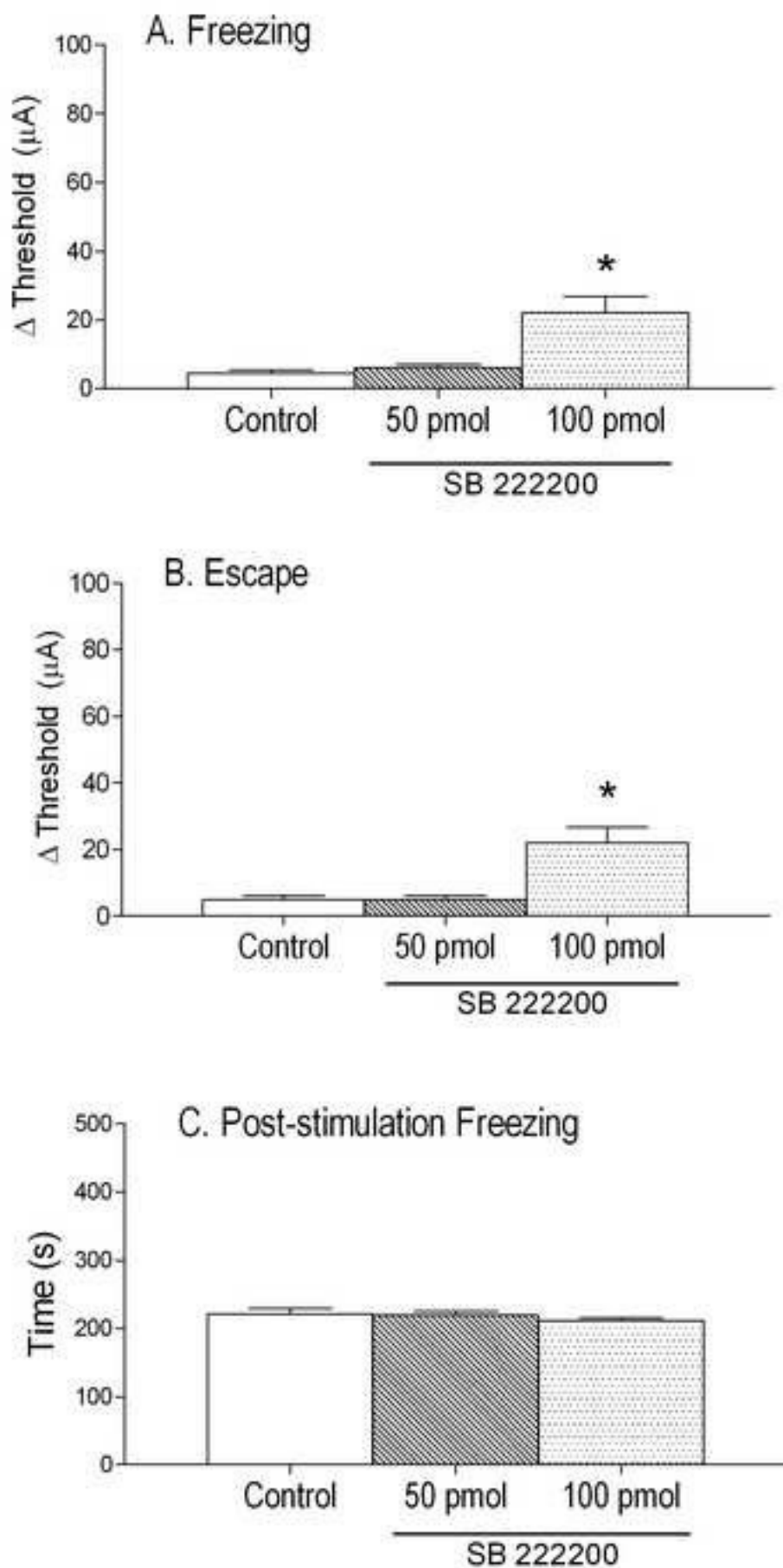


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

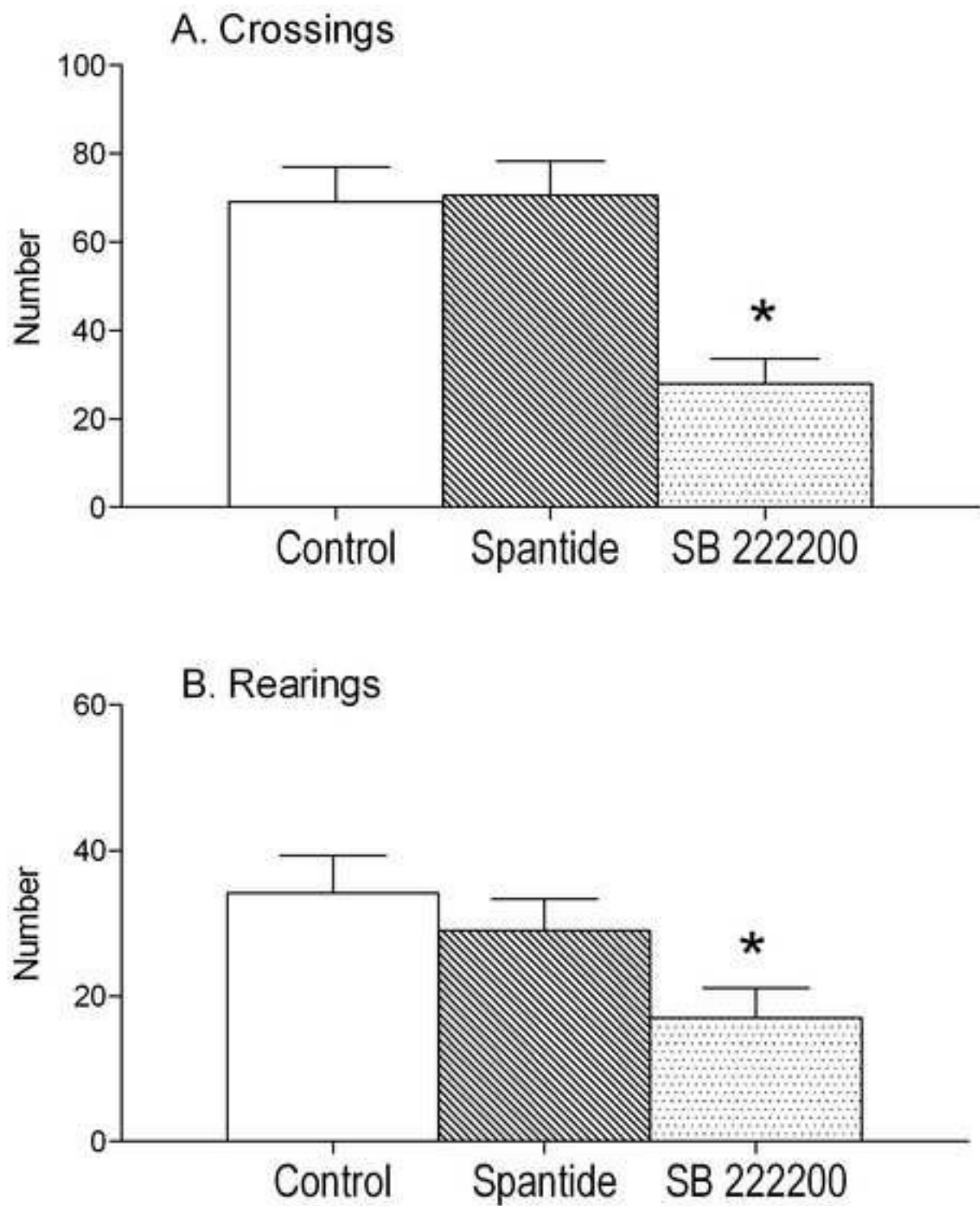
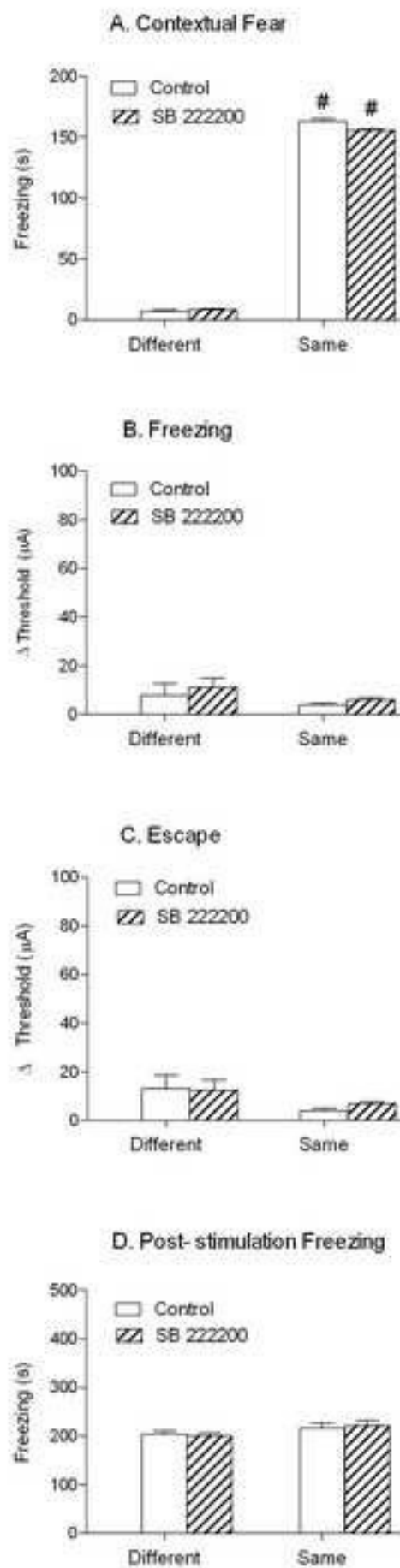


Figure 6
[Click here to download high resolution image](#)



***Highlights**

Research highlights

1. The dPAG stimulation fear was challenged with local injections of NK antagonists
2. The NK-1 antagonist spantide inhibited the fear reaction induced by dPAG stimulation
3. The dPAG stimulation fear was unchanged by the NK-3 antagonist SB222200
4. The dPAG post-stimulation freezing was not affected by both NK antagonists
5. NK-1, but not NK-3, receptors mediate the fear behaviors induced by dPAG stimulation