

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

Envolvimento de receptores dopaminérgicos da área tegmental ventral
e do complexo basolateral da amígdala na aquisição e na expressão
do medo condicionado

Amanda Ribeiro de Oliveira

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

- 2010 -

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

Envolvimento de receptores dopaminérgicos da área tegmental ventral
e do complexo basolateral da amígdala na aquisição e na expressão
do medo condicionado

Amanda Ribeiro de Oliveira

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

- 2010 -

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

Oliveira, Amanda Ribeiro de

Envolvimento de receptores dopaminérgicos da área tegmental ventral e do complexo basolateral da amígdala na aquisição e na expressão do medo condicionado. Ribeirão Preto, 2010.

93 f.; 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. Medo Condicionado. 2. Sobressalto Potencializado pelo Medo. 3. Congelamento. 4. Microdiálise. 5. Dopamina. 6. Área Tegmental Ventral. 7. Complexo Basolateral da Amígdala.

*Aos meus pais Laercio e Regina (in memorian),
e ao meu irmão Lucas.*

Dedico.

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

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

Ao Me. Adriano Edgar Reimer, pela colaboração ao longo deste estudo e auxílio com as figuras.

Ao Dr. Carlos Eduardo de Macedo, pelos ensinamentos sobre microdiálise.

À Dra. Milene C. Carvalho e à Profa. Dra. Maria Angélica Souza Silva, pelo auxílio com a cromatografia.

Aos colegas do laboratório, pelo convívio e colaboração.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Agradeço.

RESUMO

OLIVEIRA, A.R. **Envolvimento de receptores dopaminérgicos da área tegmental ventral e do complexo basolateral da amígdala na aquisição e na expressão do medo condicionado.** 2010. 93 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O condicionamento Pavloviano é um dos paradigmas mais utilizados para estudar as bases biológicas das emoções, assim como da aprendizagem e memória. A dopamina (DA) é um dos principais neurotransmissores envolvidos na mediação de estados de medo e ansiedade. Um conjunto crescente de evidências dá suporte à hipótese de que a ativação da via mesocorticolímbica, proveniente de neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (ATV), é particularmente sensível à estimulação aversiva. Entre as regiões inervadas por esta via, o complexo basolateral da amígdala (BLA) é um componente essencial dos circuitos neurais do medo condicionado. Assim, o presente estudo explorou o envolvimento de mecanismos DA da ATV e do BLA, através do uso de agonistas e antagonistas de receptores DA, na aquisição e expressão do medo condicionado à luz. Não houve efeito das drogas DA no sobressalto potencializado pelo medo (SPM), quando injetadas na ATV antes do condicionamento, indicando que os receptores DA da ATV não participam da aquisição do medo condicionado à luz. Ao contrário, quando injetado na ATV antes do teste, quimpirole (agonista D₂) reduziu o SPM, enquanto as demais drogas não tiveram efeito. A administração de SCH 23390 (antagonista D₁) no BLA não produziu efeitos no SPM, indicando que os receptores D₁ do BLA não parecem envolvidos na expressão do SPM. Já a administração de sulpirida (antagonista D₂) no BLA inibiu o SPM produzido pela luz. Além disso, a expressão do medo condicionado foi associada a um aumento do congelamento e dos níveis extracelulares de DA no BLA, ambos inibidos com a administração de quimpirole na ATV. A capacidade do quimpirole em diminuir o SPM e o congelamento condicionado parece ser resultado de sua ação em auto-receptores D₂ da ATV. A ativação desses receptores diminui os níveis de dopamina em áreas que recebem terminações da via mesocorticolímbica. Os resultados com a sulpirida realçam a importância dos receptores D₂ do BLA na expressão do medo condicionado Pavloviano.

Palavras-chave: Medo Condicionado; Sobressalto Potencializado pelo Medo; Congelamento; Microdiálise; Dopamina; Área Tegmental Ventral; Complexo Basolateral da Amígdala.

ABSTRACT

OLIVEIRA, A.R. **Involvement of dopaminergic receptors of ventral tegmental area and basolateral amygdala in the acquisition and expression of conditioned fear.** 2010. 93 p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

The Pavlovian fear conditioning is one of the most used paradigms to study the biological basis of emotion, as well as of learning and memory. Dopamine (DA) is one of the most important neurotransmitters involved in mechanisms underlying states of fear and anxiety. A growing body of evidence supports the hypothesis that excitation of the mesocorticolimbic pathway, originating from DA neurons in the ventral tegmental area (VTA), is particularly sensitive to fear-arousing stimuli. Among the forebrain regions innervated by this pathway, the basolateral amygdala (BLA) is an essential component of the neural circuitry of conditioned fear. The present study explored the involvement of VTA and BLA DA receptors, using DA agonists and antagonists, in the acquisition and expression of conditioned fear to a light conditioned stimulus (CS). None of the drugs used produced significant effects on fear-potentiated startle (FPS) when injected in VTA before conditioning, indicating that VTA DA receptors are not involved in the acquisition of conditioned fear to a light-CS. In contrast, when injected before the test session, intra-VTA quinpirole (D₂ agonist) significantly reduced FPS, whereas the other drugs had no effect. Intra-BLA SCH 23390 (D₁ antagonist) did not produce significant effects on FPS, indicating that BLA D₁ receptors do not appear to be involved in the expression of FPS. On the other hand, intra-BLA sulpiride (D₂ antagonist) inhibited FPS produced by light-CS previously paired with footshocks. Also, conditioned fear was associated with increased freezing and DA levels in the BLA, both inhibited by intra-VTA quinpirole. Quinpirole's ability to decrease FPS and conditioned freezing may be the result of an action on VTA D₂ presynaptic autoreceptors. The activation of those receptors decreases dopamine levels in terminal fields of the mesocorticolimbic pathway. Sulpiride's results stress the importance of BLA D₂ receptors in the fear-activating effects of the Pavlovian conditioning.

Keywords: Conditioned Fear; Fear-Potentiated Startle; Freezing; Microdialysis; Dopamine; Ventral Tegmental Area; Basolateral Amygdala.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
1.1. CONDICIONAMENTO AVERSIVO CLÁSSICO.....	11
1.1.1. SOBRESSALTO POTENCIALIZADO PELO MEDO.....	12
1.1.2. CONGELAMENTO CONDICIONADO.....	15
1.1.3. MICRODIÁLISE <i>IN VIVO</i>	16
1.2. NEUROTRANSMISSÃO DOPAMINÉRGICA.....	17
1.2.1. ÁREA TEGMENTAL VENTRAL.....	20
1.2.2. COMPLEXO BASOLATERAL DA AMÍGDALA.....	20
1.2.3. DOPAMINA E MEDO.....	21
2. OBJETIVOS.....	25
3. EXPERIMENTO I: ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D ₁ E D ₂ DA ÁREA TEGMENTAL VENTRAL NA AQUISIÇÃO E EXPRESSÃO DO MEDO CONDICIONADO À LUZ.....	27
3.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1.1. ANIMAIS.....	28
3.1.2. CIRURGIA.....	28
3.1.3. EQUIPAMENTOS.....	29
3.1.4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	32
3.1.5. DROGAS.....	33
3.1.6. MICROINJEÇÃO DE DROGAS.....	34
3.1.7. HISTOLOGIA.....	35
3.1.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
3.2. RESULTADOS.....	36
3.2.1. SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO.....	36
3.2.2. AGONISTA D ₁ – SKF 38393.....	37
3.2.3. ANTAGONISTA D ₁ – SCH 23390.....	39
3.2.4. AGONISTA D ₂ – QUIMPIROLE.....	41
3.2.5. ANTAGONISTA D ₂ – SULPIRIDA.....	43
4. EXPERIMENTO II: EFEITOS DO MEDO CONDICIONADO À LUZ SOBRE OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE DOPAMINA NO COMPLEXO BASOLATERAL DA AMÍGDALA.....	45
4.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1.1. ANIMAIS.....	46
4.1.2. CIRURGIA.....	46
4.1.3. EQUIPAMENTOS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	46
4.1.4. HISTOLOGIA.....	49
4.1.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4.2. RESULTADOS.....	50

4.2.1. SÍTIOS DE MICRODIÁLISE.....	50
4.2.2. MEDO CONDICIONADO.....	51
5. EXPERIMENTO III: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE QUIMPIROLE NA ÁREA TEGMENTAL VENTRAL SOBRE OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE DOPAMINA DO COMPLEXO BASOLATERAL DA AMÍGDALA ASSOCIADOS AO MEDO CONDICIONADO À LUZ.....	53
5.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
5.1.1. ANIMAIS	54
5.1.2. CIRURGIA.....	54
5.1.3. EQUIPAMENTOS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	54
5.1.4. DROGAS.....	55
5.1.5. MICROINJEÇÃO DE DROGAS.....	55
5.1.6. HISTOLOGIA.....	55
5.1.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
5.2. RESULTADOS.....	56
5.2.1. SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO E MICRODIÁLISE.....	56
5.2.2. MEDO CONDICIONADO.....	57
6. EXPERIMENTO IV: ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D ₁ E D ₂ DO COMPLEXO BASOLATERAL DA AMÍGDALA NA EXPRESSÃO DO MEDO CONDICIONADO À LUZ.....	59
6.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
6.1.1. ANIMAIS	60
6.1.2. CIRURGIA.....	60
6.1.3. EQUIPAMENTOS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	60
6.1.4. DROGAS.....	60
6.1.5. MICROINJEÇÃO DE DROGAS.....	61
6.1.6. HISTOLOGIA.....	61
6.1.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
6.2. RESULTADOS.....	62
6.2.1. SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO.....	62
6.2.2. ANTAGONISTA D ₁ – SCH 23390.....	63
6.2.3. ANTAGONISTA D ₂ – SULPIRIDA.....	65
7. DISCUSSÃO.....	67
8. CONCLUSÕES.....	76
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
ANEXO I.....	91
ANEXO II.....	93

1. INTRODUÇÃO

Em 1872, em sua obra “*The expression of the emotions in man and animals*”, Charles Darwin deu início ao estudo dos aspectos biológicos das emoções, atualmente um importante campo das Neurociências. Nesse livro, Darwin demonstra que os animais expressam o significado de suas emoções por meio de comportamentos funcionalmente importantes no processo de adaptação do indivíduo ao ambiente. A idéia de situar os comportamentos e as emoções a eles subjacentes em um quadro evolutivo favoreceu a Biologia Comparada, de forma que o estudo das estratégias comportamentais apresentadas pelas diversas espécies animais, incluindo o homem, para expressar o significado de suas emoções revolucionou esse campo de estudo.

Sob este ângulo, a ansiedade e o medo têm suas raízes nas reações de defesa dos animais, verificadas em resposta aos perigos comumente encontrados no ambiente em que vivem. Ao longo do processo evolutivo, os mecanismos e os circuitos neurais relacionados ao comportamento defensivo foram sendo selecionados e acabaram por contribuir para o sucesso evolutivo das espécies atualmente existentes. Assim, apesar do comportamento defensivo e da natureza dos sinais de ameaça variar entre as espécies, algumas estratégias comportamentais padronizadas são adotadas em função dos diferentes níveis de ameaça com os quais os animais defrontam-se no seu ambiente. Quando um animal é confrontado com uma ameaça ao seu bem estar ou a sua integridade física, ele apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de defesa (GRAEFF; BRANDÃO, 1999). Dentre essas respostas destacam-se a interrupção do comportamento motor em curso, dilatação da pupila, vocalização, hiper-reatividade a estímulos sensoriais, alterações na frequência cardíaca, pressão sanguínea e frequência respiratória, aumento da vigilância e atenção, além de alterações nas expressões faciais em primatas (DAVIS et al., 1991, 1997). Já a ameaça pode ser representada por um estímulo inato, como um predador ou um agressor da mesma espécie, ou

por estímulos aprendidos, que por associação repetida com estímulos dolorosos ou outras sensações igualmente desagradáveis adquirem propriedades aversivas condicionadas (GRAEFF; BRANDÃO, 1999).

Apesar de sua complexidade, o medo pode ser objetivamente estudado em laboratório por meio da análise das respostas exibidas por animais expostos a diversas situações aversivas. Atualmente, no estudo da psicobiologia do medo destacam-se três abordagens. A primeira delas é a utilização das respostas comportamentais moduladas pelo medo como modelo para entender de que maneira as emoções influenciam o comportamento. Segunda, experiências aversivas são rapidamente aprendidas e lembradas por muito tempo e, desta forma, o condicionamento aversivo torna-se um excelente modelo para tentar desvendar os processos e mecanismos subjacentes à aprendizagem e memória. Terceira, a investigação das bases neuroanatômicas e neuroquímicas do medo é um pré-requisito para o desenvolvimento de estratégias para tratar os distintos distúrbios de ansiedade em humanos (FENDT; FANSELOW, 1999).

Sendo assim, cresce a importância das pesquisas com animais voltadas para a busca das raízes biológicas subjacentes ao medo, tendo especial destaque as abordagens envolvendo o condicionamento aversivo clássico, um dos paradigmas mais usados no estudo das bases biológicas das emoções e da aprendizagem e memória.

1.1. CONDICIONAMENTO AVERSIVO CLÁSSICO

Aprender as relações entre eventos aversivos e estímulos ambientais que predizem tais eventos é essencial para a sobrevivência de organismos em todo o reino animal. O condicionamento aversivo clássico é um exemplo dessa forma de aprendizagem reconhecido como modelo para investigação dos mecanismos neurobiológicos do medo em diversas espécies e para entendimento das raízes biológicas dos distúrbios associados ao medo em humanos.

Durante a fase de aquisição do medo condicionado, um estímulo inicialmente neutro é pareado a um estímulo aversivo e adquire as propriedades aversivas deste, sendo então

denominado estímulo condicionado (CS). Já na fase de expressão, o estímulo condicionado é apresentado sozinho e passa a provocar respostas condicionadas de medo (PEZZE; FELDON, 2004). Sons, luzes, odores e estímulos táteis têm sido utilizados como estímulos condicionados. Esses estímulos variam de alguns segundos a alguns minutos de duração e são chamados estímulos condicionados discretos, unimodais ou explícitos. Além disso, no exame da circuitaria neural envolvida na aquisição e armazenamento de informações aversivas e na evocação de respostas defensivas, pode-se interferir antes ou após o procedimento de condicionamento, afetando desta forma a aquisição do medo condicionado ou sua expressão, respectivamente (FENDT; FANSELOW, 1999).

No Laboratório de Neuropsicofarmacologia do Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia da FFCLRP-USP, utilizamos um paradigma de medo condicionado no qual o sujeito é treinado a associar um estímulo inicialmente neutro (luz) a um estímulo aversivo incondicionado (US – choques nas patas). Após alguns pareamentos, o estímulo neutro torna-se um estímulo condicionado (CS - luz) e, por si só, é capaz de eliciar estados de medo. Tais estados de medo são avaliados por meio de análise comportamental com a utilização de modelos animais como o sobressalto potencializado pelo medo e o congelamento condicionado, e também por meio de análise neuroquímica de alterações nas concentrações de neurotransmissores em regiões específicas do encéfalo.

1.1.1. SOBRESSALTO POTENCIALIZADO PELO MEDO

O padrão básico da resposta de sobressalto consiste em uma contração muscular generalizada, iniciando-se pela boca, olhos e pescoço, e expandindo-se por todo o corpo, produzindo um movimento abrupto de agachamento em resposta a um estímulo repentino e intenso, que pode ser de natureza tátil, visual ou acústica. Além disso, é observada a interrupção dos comportamentos em curso e também a aceleração dos batimentos cardíacos e da frequência respiratória (FLESHLER, 1965; KOCK, 1999).

A topografia da resposta de sobressalto apresenta pouca variação entre as diversas espécies de mamíferos estudadas (FLESHLER, 1965). Em ratos e humanos, primeiramente os olhos se fecham, os ombros se curvam para frente e para cima, enquanto o tamanho corporal como um todo diminui. A superfície dorsal do pescoço é protegida com a contração dos músculos aí localizados, característica essa muito importante para vertebrados terrestres, uma vez que o ponto mais vulnerável ao ataque por predadores é essa região. A visão e o olfato estão dirigidos para frente e a medula espinal é pouco protegida por ossos e músculos. Em razão disso, qualquer movimento repentino, que resulte em estimulação tátil, acústica e/ou vestibular, produzirá a resposta de sobressalto (YEOMANS; FRANKLAND, 1996).

Em ratos, a resposta de sobressalto pode ter sua latência e sua magnitude alteradas pela intensidade do estímulo eliciador (PILZ et al., 1987), pelo intervalo interestímulo (DAVIS, 1970), pelo comportamento motor em curso, além de ser variável entre indivíduos (PLAPPERT et al., 1993). Ao lado disso, devido ao fato do sobressalto constituir uma resposta de proteção, é intuitivo esperar que ele seja aumentado em situações aversivas. Brown e colaboradores (1951) demonstraram que a amplitude da resposta de sobressalto para um estímulo acústico em ratos pode ser aumentada por meio da apresentação de um estímulo condicionado (ex. luz) que tenha sido previamente pareado com um estímulo aversivo, como choques nas patas. Tal fenômeno é denominado "potencialização da resposta de sobressalto pelo medo" (Fig. 1), e tem sido reproduzido utilizando-se estímulos condicionados acústico, visual ou contextual, com o sobressalto sendo provocado tanto por um som forte quanto por um jato de ar (BROWN et al., 1951; OLIVEIRA et al., 2006; REIMER et al., 2008).

O modelo do sobressalto potencializado pelo medo (SPM) oferece diversas vantagens como método de análise dos efeitos de diferentes manipulações sobre o medo. Devido ao fato da potencialização consistir em uma diferença na amplitude do sobressalto de um mesmo sujeito na presença (tentativas luz-som) e ausência (tentativas só-som) de um estímulo condicionado, ela torna-se uma medida sensível, pois reduz os problemas causados pela variabilidade da resposta

entre os sujeitos. Esse teste permite a avaliação de efeitos específicos (redução do sobressalto nas tentativas luz-som) e não-específicos (redução do sobressalto nas tentativas só-som), de maneira que tanto o perfil quantitativo quanto o qualitativo da ação de drogas podem ser avaliados. Além disso, não há apresentação de choques no dia do teste e, portanto, os efeitos observados não podem ser explicados em termos de alterações na reatividade ao choque. A separação entre as sessões treino e a sessão teste permite a avaliação da atuação da droga tanto na aprendizagem (aquisição) quanto no desempenho (expressão) do animal. Além disso, o sobressalto potencializado pelo medo não envolve nenhum operante óbvio, uma vez que o animal não é instado a executar uma resposta voluntária para indicar medo ou ausência deste (DAVIS, 1979, 1990, 1993). Assim, este modelo torna-se uma alternativa útil para comparação com outros métodos freqüentemente utilizados para avaliar a ação de drogas no medo e na ansiedade. Mais especificamente, o sobressalto potencializado pelo medo mostrou-se sensível à ação ansiolítica dos benzodiazepínicos e tem sido considerado um modelo do transtorno de ansiedade generalizada (BERG; DAVIS, 1984; BRODKIN et al., 2002; SANTOS et al., 2005).

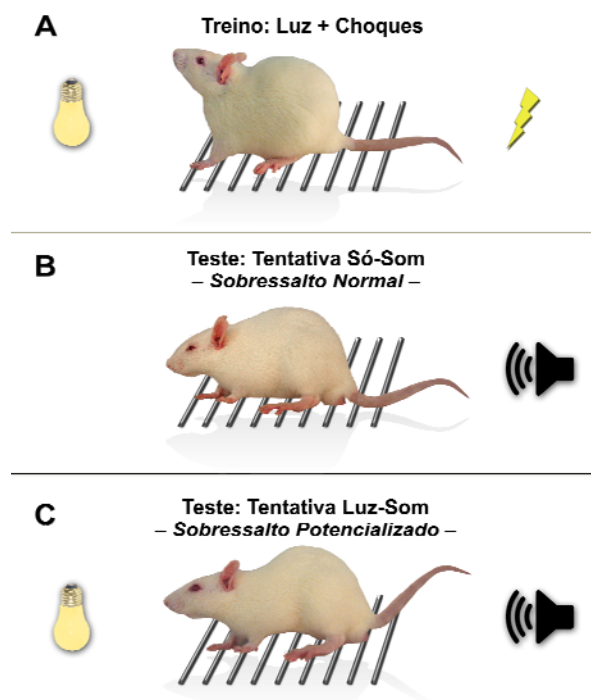


Figura 1. Paradigma da potencialização do sobressalto pelo medo. **A.** Sessão de Condicionamento: 10 pareamentos de luz e choque nas patas. **B-C.** Sessão Teste: 30 apresentações de som (tentativas só-som) intercaladas de forma aleatória com 30 apresentações de luz e som (tentativas luz-som).

1.1.2. CONGELAMENTO CONDICIONADO

Outro indicador de medo em animais é o comportamento de congelamento, que é a reação de defesa mais comum em ratos e camundongos. O congelamento consiste em um padrão comportamental complexo e coordenado, caracterizado pela ausência de todos os movimentos corporais, exceto movimentos respiratórios (BOLLES; COLLIER, 1976; BRANDÃO et al., 2008; FANSELOW, 1991). Além disso, no congelamento observamos um alto nível de alerta e considerável tonicidade muscular. Esse comportamento ocorre em uma postura de agachamento próximo a alguma proteção disponível, como os cantos de uma câmara de observação (FANSELOW, 1991).

Em roedores, o congelamento é uma resposta com alto valor adaptativo para evitar um perigo potencial, uma vez que as movimentações tornam esses animais mais visíveis e presas mais fáceis para os ataques de predadores (FENDT; FANSELOW, 1999). Alterações inesperadas no ambiente são suficientes para causar congelamento (HOFER, 1970). O congelamento reflete medo e pode ser produzido por um estímulo neutro que tenha sido previamente pareado a um estímulo aversivo (FANSELOW; BOLLES, 1979). O comportamento de congelamento também pode ser desencadeado por estimulação elétrica e/ou química de algumas estruturas encefálicas, como a substância cinzenta periaquedutal e os colículos inferiores (KRIEGER; GRAEFF, 1985; MELO et al., 1992; REIMER et al., 2009).

Existe um crescente interesse na utilização do congelamento condicionado como medida de medo, visto que ele constitui parte proeminente do comportamento defensivo de roedores. Medidas diretas de congelamento a estímulos condicionados discretos começaram a ser efetuadas no final da década de 1970, no laboratório de Robert Bolles. Esses estudos demonstraram que a quantidade de congelamento varia com a intensidade e com o número de choques recebidos pelos animais. Assim, enquanto que a apresentação de um único estímulo incondicionado durante a sessão de condicionamento pode gerar congelamento condicionado na

sessão teste, um treino mais intenso pode facilmente gerar uma resposta de maior magnitude (FANSELOW; BOLLES, 1979).

1.1.3. MICRODIÁLISE *IN VIVO*

Há mais de 30 anos a técnica de microdiálise vem sendo utilizada para amostragens *in vivo* em estudos de diversas áreas como fisiologia, farmacologia e patologia. Estudos pioneiros que levaram ao advento da microdiálise intra-encefálica incluem aqueles de Bhattacharya e Feldberg (1958a,b), que tiveram sucesso ao perfundir o sistema ventricular de gatos anestesiados por meio da introdução de uma cânula no ventrículo lateral esquerdo e coleta do efluente por meio de outra cânula localizada na cisterna magna ou no aqueduto encefálico. A primeira versão de uma sonda de microdiálise propriamente dita foi desenvolvida por Delgado e colaboradores (1972) e ficou conhecida como dialitrodo, usada para perfusão intra-encefálica de longa duração em macacos acordados. A técnica de microdiálise, como é conhecida hoje, foi primeiramente descrita em trabalho de Ungerstedt e Pycock (1974) onde foi originalmente empregada para medida das concentrações de neurotransmissores no encéfalo de ratos. No entanto, apenas após 1980 tornou-se possível analisar a química cerebral de forma quantitativa.

Na microdiálise, uma sonda concêntrica, originariamente moldada em um capilar, é implantada em uma área encefálica selecionada. Essa sonda consiste de uma membrana semipermeável que rodeia duas finas cânulas através das quais líquido fisiológico flui dentro e fora da porção contendo a membrana semipermeável. Compostos presentes no fluido extracelular atingem o líquido de perfusão por difusão. O dialisado é recolhido e analisado para determinação da identidade e concentrações das moléculas que estavam no fluido extracelular (Fig. 2) (BOURNE, 2003; FILLENZ, 2005; PLOCK; KLOFT, 2005).

A microdiálise encontra-se atualmente bem estabelecida na pesquisa em neurociência comportamental, sendo usada para monitorar a quantidade de neurotransmissores, metabólitos e outros compostos endógenos no espaço extracelular de regiões específicas do encéfalo de

animais acordados. A combinação desta técnica com uma variedade de métodos de detecção altamente sensíveis tem provado ser uma valiosa ferramenta para o estudo da neuroquímica encefálica subjacente a estados de medo e ansiedade (MACEDO et al., 2005a,b; MARTINEZ et al., 2008; ZANOVELI et al., 2009).

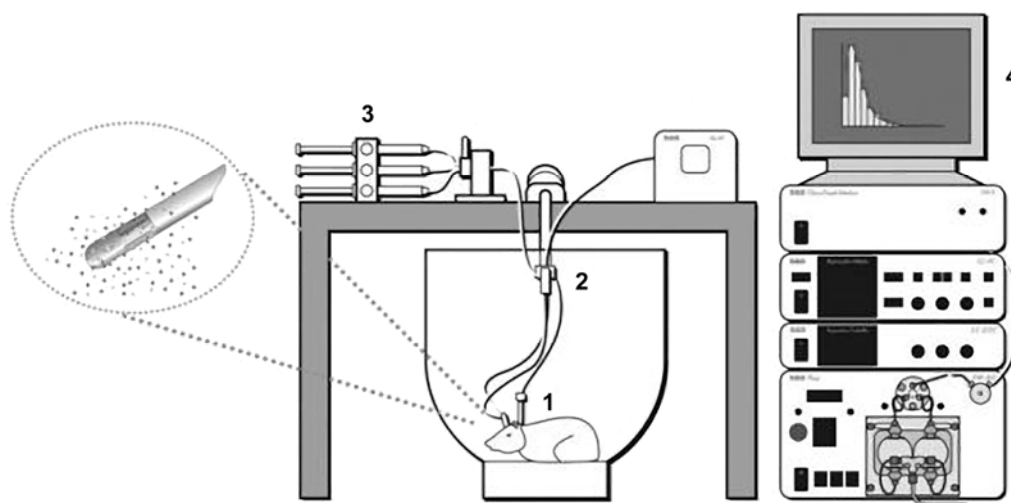


Figura 2. Desenho esquemático do sistema de microdiálise *in vivo*. 1. Sonda de microdiálise; 2. Braço com alavanca giratória; 3. Bomba de microinjeção; 4. Sistema de análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Modificado de Miranda (2007).

1.2. NEUROTRANSMISSÃO DOPAMINÉRGICA

A dopamina (DA), um neurotransmissor da família das catecolaminas, é sintetizada pela ação da enzima tirosina hidroxilase, que converte o aminoácido tirosina em L-DOPA o qual, por sua vez, é descarboxilado para formar a dopamina. Os neurônios dopaminérgicos apresentam dois modos distintos de atividade: tônica, que ocorre através do disparo espontâneo destes neurônios, e fásica, representada pelo padrão explosivo de disparos em resposta a estímulos relevantes. O término da ação da DA no encéfalo pode envolver sua recaptação e posterior metabolismo através da enzima monoaminaoxidase (MAO), que converte a DA em ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), ou sua conversão em ácido homovanílico (HVA), provavelmente no espaço extraneuronal, através da ação sequencial da catecol-O-metiltransferase e da MAO (CARLSSON; WALDECK, 1958; ELSWORTH; ROTH, 1997).

Os receptores dopaminérgicos são glicoproteínas com sete domínios transmembrana, ligadas à proteína G e, portanto, pertencentes à superfamília dos receptores metabotrópicos. Cinco receptores dopaminérgicos farmacologicamente distintos já foram identificados e encontram-se divididos em duas subfamílias, D₁ e D₂ (CALLIER et al., 2003; KEBABIAN; CALNE, 1979; MONSMA et al., 1990; SIBLEY; MONSMA, 1992). Na subfamília D₁ temos os receptores D₁ e D₅, que estão ligados a uma proteína G estimulatória (G_s) por meio da qual ativam a enzima adenil ciclase, resultando no aumento dos níveis intracelulares de AMPc. Como consequência, proteínas quinase dependentes de AMPc são ativadas e induzem a fosforilação de outras proteínas celulares. Além disso, existem evidências de que os receptores D₁ e D₅ também modulem a atividade de canais de cálcio, potássio e sódio. Já na subfamília D₂ temos os receptores D₂, D₃ e D₄ que, por meio de uma proteína G inibitória (G_i), inibem a atividade da adenil ciclase. Esses receptores também podem estar ligados a outros sistemas de segundos mensageiros, cuja ativação pode resultar em inibição da taxa de renovação do fosfatidil inositol, ativação de canais de potássio e inibição de canais de cálcio, ativação da proteína quinase C, liberação de ácido araquidônico, entre outras ações (CALLIER et al., 2003; MONSMA et al., 1990; SIBLEY; MONSMA, 1992).

A liberação de DA é modulada por receptores pré-sinápticos localizados no corpo celular, dendritos ou terminais nervosos de células dopaminérgicas, denominados auto-receptores. A estimulação de auto-receptores da região somatodendrítica diminui a taxa de disparos destes neurônios, enquanto a estimulação de auto-receptores dos terminais nervosos inibe a síntese e a liberação de DA. Todos esses auto-receptores são classificados como receptores da subfamília D₂, e mostram-se cerca de dez vezes mais sensíveis aos efeitos da dopamina ou da apomorfina, um agonista dopaminérgico direto e inespecífico, que os receptores pós-sinápticos. Desta forma, em baixas doses, os efeitos de agentes dopaminérgicos mediados por auto-receptores são predominantes, resultando em uma diminuição da função dopaminérgica. Em altas doses,

entretanto, ocorre também estimulação pós-sináptica o que pode levar ao aumento da função dopaminérgica (ELSWORTH; ROTH, 1997; SKIRBOLL et al., 1979).

As vias dopaminérgicas ascendentes do sistema nervoso central de mamíferos podem ser divididas em: mesoestriatal (ou nigroestriatal), que tem origem predominante na substância negra do mesencéfalo e inerva o estriado dorsal, em particular os núcleos caudado e putame; mesocortical, que surge predominantemente na área tegmental ventral (ATV) e projeta-se sobretudo para o córtex pré-frontal; e mesolímbica, que também tem origem predominante na ATV e inerva estruturas do sistema límbico, incluindo núcleo accumbens, amígdala e hipocampo (Fig. 3) (GARDNER; ASHBY JR, 2000; OADES; HALLIDAY, 1987). Existe, contudo, um significativo grau de heterogeneidade quanto às origens anatômicas e aos alvos de projeção dessas vias (MOORE; BLOOM, 1978; WISE, 2009). O córtex cingulado, por exemplo, aparece como parte integrante tanto da via mesolímbica quanto da via mesocortical (GARDNER; ASHBY JR, 2000; OADES; HALLIDAY, 1987). A via dopaminérgica mesoestriatal tem sido classicamente associada com o controle da movimentação voluntária (DAMIER et al., 1999; ÖZER et al., 1997). Por outro lado, diferentes condições fisiológicas e patológicas como alerta, estresse, adição a drogas, e distúrbios neuropsiquiátricos têm sido associadas a alterações nas vias mesolímbica e mesocortical (FINLAY et al., 1995; GOLDSTEIN; DEUTCH, 1992; VOLKOW et al., 2002).

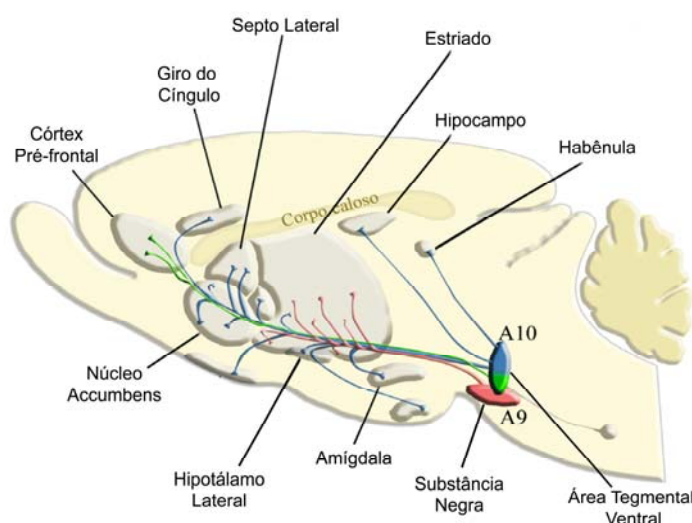


Figura 3. Representação das vias dopaminérgicas mesolímbica (azul), mesocortical (verde) e mesoestriatal (vermelho), em encéfalo de rato. Modificado de Brandão (2008).

1.2.1. ÁREA TEGMENTAL VENTRAL

A área tegmental ventral (ATV) é um dos núcleos da formação reticular. Situa-se na parte ventral do tegmento mesencefálico, dorsomedialmente à substância negra e ventralmente ao núcleo rubro. A ATV contém neurônios ricos em dopamina, sendo que os sistemas dopaminérgicos mesocortical e mesolímbico têm sua origem nesta região (ALBANESE; MINCIACCHI, 1983; OADES; HALLIDAY, 1987).

Na ATV, receptores D₁ estão presentes em densidades de moderada a baixa, e os subtipos D₁ e D₅ já foram nela localizados. Densidade expressiva de receptores da subfamília D₂ foi relatada na ATV de roedores. Dentre os subtipos, a maior densidade é de D₂; D₃ ocorre moderadamente e D₄ parece ausente (LEVEY et al., 1993; MISSALE et al., 1998).

A ATV envia projeções ascendentes para muitas regiões encefálicas incluindo o córtex préfrontal, o núcleo accumbens, os núcleos da base, a formação hipocampal e a amígdala (ALBANESE; MINCIACCHI, 1983; LI et al., 2009; OADES; HALLIDAY, 1987; SIMON et al., 1979).

Estudos comportamentais mostraram que a estimulação elétrica da ATV em gatos induz respostas defensivas (STEVENS; LIVERMORE, 1978). Acredita-se que os neurônios da ATV façam parte da circuitaria neural subjacente a estados emocionais aversivos. Em razão disso, o estudo do papel da ATV em comportamentos emocionais com valência negativa tem despertado grande interesse.

1.2.2. COMPLEXO BASOLATERAL DA AMÍGDALA

A amígdala, localizada bilateralmente no lobo temporal anterior do encéfalo é, na verdade, um complexo de muitos núcleos. Pitkänen e colaboradores (1997), baseados em estudos de neuroquímica e citoarquitetura, e na presença de fibras de projeção em ratos, identificaram 13 regiões distintas na amígdala. Os núcleos de maior relevância para o medo e a ansiedade parecem ser o núcleo lateral, o núcleo basal, o núcleo basal acessório e o núcleo central, sendo os

três primeiros muitas vezes agrupados para formar o complexo basolateral da amígdala (BLA) (LEDOUX, 2000; 2003; PARÉ et al., 2004).

A dopamina é encontrada na amígdala em concentrações apreciáveis (INGLIS; MOGHADDAM, 1999; YOUNG; RESS, 1998). As projeções dopaminérgicas para amígdala têm origem principalmente na ATV (OADES; HALLIDAY, 1987). Ambas as subfamílias de receptores, D₁ e D₂, estão presentes na amígdala (LEVEY et al., 1993; MISSALE et al., 1998).

Vários estudos atribuem à amígdala o papel de receber informações acerca de sinais de perigo e avaliá-los quanto ao seu grau de ameaça para o organismo. Desta forma, a amígdala parece atuar como uma espécie de interface sensório-afetiva na reação de defesa, isto é, funcionaria como um filtro de sinais sensoriais com conotação afetiva. O BLA é o principal sítio de recepção desses sinais, enquanto o núcleo central é a principal estação de saída para as respostas autonômicas, endócrinas e somáticas associadas ao medo (DAVIS, 1992; FENDT; FANSELOW, 1999; LEDOUX et al., 1988; LEDOUX, 2000).

1.2.3. DOPAMINA E MEDO

Vários neurotransmissores têm sido implicados no medo. Dentre eles figuram aminas biogênicas, como a noradrenalina e a serotonina, aminoácidos como o GABA e a glicina, peptídeos como o fator de liberação da corticotrofina, o ACTH e a colecistocinina, e esteróides como a corticosterona (GRAEFF; BRANDÃO, 1999). Considerável esforço tem sido feito no intuito de relacionar circuitos encefálicos específicos com o medo e a ansiedade. Estudos sobre a regulação desses circuitos por neuromoduladores são úteis na medida em que podem ser de relevância terapêutica para os distúrbios de ansiedade (BRANDÃO et al., 1994, 1999, 2003; MILLAN, 2003).

A dopamina parece ser um dos neuromoduladores mais ativos em mecanismos subjacentes a estados de medo e ansiedade (MILLAN, 2003). A associação de alterações na transmissão dopaminérgica e situações ameaçadoras tem sido demonstrada em numerosos

trabalhos. Mecanismos dopaminérgicos têm sido associados à produção e elaboração do estresse agudo e crônico (FEENSTRA et al., 1995; FINLAY et al., 1995). Na realidade, alterações na transmissão dopaminérgica sempre ocorrem em consequência da exposição de animais a uma ampla variedade de estressores (GOLDSTEIN et al., 1996). Além disso, outras evidências sugerem que mecanismos dopaminérgicos são também importantes na mediação de diferentes aspectos da memória afetiva, como sua formação, evocação e expressão (PEZZE; FELDON, 2004).

Apesar das inúmeras evidências de um envolvimento secundário da dopamina em estados de medo estudos comportamentais visando esclarecer o envolvimento da dopamina e de seus receptores nessa condição têm relatado efeitos ansiolíticos, ansiogênicos ou ausência de efeitos com o uso de agonistas e antagonistas dopaminérgicos em diferentes modelos animais de ansiedade (DAVIS et al., 1993; GARCIA et al., 2005; GREBA; KOKKINIDIS, 2000; INOUE et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2006; REIS et al., 2004; RODGERS et al., 1994). Sugere-se que tais efeitos dependam da natureza do estímulo aversivo, isto é, o sinal modulatório do mecanismo dopaminérgico no comportamento defensivo dependeria do tipo de estímulo emocional eliciador da resposta.

Quanto, especificamente, à mediação química da resposta de sobressalto, já foi demonstrado, em nosso laboratório, que mecanismos serotoninérgicos e GABAérgicos, participam da elaboração do medo condicionado ao contexto e a certos estímulos condicionados explícitos, como a luz (AVANZI; BRANDÃO, 2001; AVANZI et al., 2003; BORELLI et al., 2005; REIMER et al., 2008; SANTOS et al., 2005, 2006; SILVA et al., 2002, 2004). O envolvimento de outros neurotransmissores tem sido pouco analisado, havendo uma carência evidente de estudos que investiguem a participação de mecanismos dopaminérgicos tanto na aquisição quanto na expressão do medo condicionado a estímulos com diversos significados biológicos. Em uma tentativa de preencher tal lacuna, demonstramos por meio da administração intraperitonal de agonistas e antagonistas dopaminérgicos que os receptores D₂ parecem tomar

parte na expressão do medo condicionado à luz, mas não na sua aquisição (OLIVEIRA et al., 2006). A caracterização de quais vias dopaminérgicas estão envolvidas na aquisição e na expressão do medo condicionado permanece, no entanto, pouco clara. Disso decorre a necessidade de estudos com agonistas e antagonistas específicos dos receptores D₁ e D₂ administrados em estruturas encefálicas chave, a fim de esclarecer a real participação dos mecanismos dopaminérgicos nos diversos tipos de medo condicionado.

Um conjunto crescente de evidências converge atualmente para a idéia de que a ativação das vias mesocortical e mesolímbica, originadas a partir de neurônios dopaminérgicos na ATV, é particularmente sensível a estimulações ambientais aversivas e pode ser importante para o desenvolvimento de respostas exageradas de medo (DEUTCH et al., 1985; GREBA et al., 2001; GUARRACI; KAPP, 1999; GUARRACI et al., 2000). Por exemplo, a estimulação elétrica da ATV potencializa a resposta de sobressalto acústico e sua lesão neurotóxica pós-treino bloqueia a potencialização do sobressalto pelo medo (BOROWSKI; KOKKINIDIS, 1996). A ativação de neurônios da ATV por estímulos aversivos parece modular o medo e a ansiedade por meio de suas projeções ascendentes. Uma vez que a amígdala aparece como uma estrutura essencial para a aquisição e a expressão do medo condicionado (FANSELOW; LEDOUX, 1999; FENDT; FANSELOW, 1999; LEDOUX, 2000; MAREN; FANSELOW, 1996; MAREN, 2000) e recebe, através do BLA, projeções dopaminérgicas dos neurônios da ATV (BRINLEY-REED; MCDONALD, 1999; KRETTEK; PRICE, 1978; WALLACE et al., 1992), essas duas áreas tornam-se alvos interessantes para o estudo do envolvimento de mecanismos dopaminérgicos no medo e na ansiedade.

Apesar de, como visto anteriormente, já terem sido identificados pelo menos cinco subtipos de receptores dopaminérgicos (MILLAN, 2003; VALLONE et al., 2000), a divisão inicial desses receptores nas subfamílias D₁ e D₂ (KEBABIAN; CALNE, 1979) tem fornecido maior motivação para pesquisas com intuito de definir o papel funcional específico desses receptores no medo. Assim, para ampliar a avaliação sobre o envolvimento de mecanismos

dopaminérgicos nos estados aversivos, estudamos aqui o envolvimento dos receptores D₁ e D₂ da ATV e do BLA na aquisição e expressão do medo condicionado usando o paradigma do condicionamento aversivo clássico. Tal avaliação farmacológica é feita com o uso do agonista D₁ SKF 38393 (BOROWSKI; KOKKINIDIS, 1998; KAMEI, et al., 1995), do antagonista D₁ SCH 23390 (HYTELL, 1983; LAMONT; KOKKINIDIS, 1998), do agonista D₂ quimpirole (LEVANT et al., 1992; SEEMAN; SCHAUS, 1991), e do antagonista D₂ sulpirida (GUARRACI et al., 2000; STANDISH-BARRY et al., 1983).

2. OBJETIVOS

Neste trabalho estudamos o envolvimento dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ da área tegmental ventral e do complexo basolateral da amígdala na aquisição e na expressão do medo condicionado à luz. Os efeitos do SKF 38393 e do quimpirole, agonistas seletivos de receptores D₁ e D₂ respectivamente, e do SCH 23390 e da sulpirida, antagonistas dopaminérgicos específicos de receptores D₁ e D₂ respectivamente, foram analisados por meio da utilização do teste do sobressalto potencializado pelo medo. Possíveis déficits no desempenho motor dos animais causados pelas drogas foram avaliados nos testes do campo aberto e do rotarod. Os efeitos do medo condicionado à luz sobre os níveis extracelulares de dopamina no complexo basolateral da amígdala, e a influência da área tegmental ventral sobre esses efeitos, também foram estudados por meio da utilização de procedimentos de microdiálise *in vivo* concomitantemente à análise do congelamento condicionado.

O presente estudo foi desenvolvido em quatro fases:

- Experimento I: Envolvimento dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ da **área tegmental ventral** na aquisição e expressão do medo condicionado à luz;
- Experimento II: Efeitos do medo condicionado à luz sobre os níveis extracelulares de dopamina no **complexo basolateral da amígdala**;
- Experimento III: Efeitos da administração de quimpirole na **área tegmental ventral** sobre os níveis extracelulares de dopamina do **complexo basolateral da amígdala** associados ao medo condicionado à luz;
- Experimento IV: Envolvimento dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ do **complexo basolateral da amígdala** na expressão do medo condicionado à luz.

3. EXPERIMENTO I: ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D₁ E D₂ DA ÁREA TEGMENTAL VENTRAL NA AQUISIÇÃO E EXPRESSÃO DO MEDO CONDICIONADO À LUZ

3.1. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1. ANIMAIS

Foram utilizados 236 ratos *Wistar* machos, com peso médio de 260 gramas, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto. Os animais foram agrupados (cinco animais por caixa) em gaiolas de polipropileno (30 × 32 × 18 cm), forradas com maravalha, tendo livre acesso à água e alimento. Os animais foram mantidos em um biotério setorial com temperatura controlada de 23 °C ± 1 °C e um programa de iluminação artificial com ciclo claro-escuro 12 h × 12 h, com início do período claro às 7:00 horas. Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo. Os animais foram transportados individualmente até a sala experimental em uma caixa de polipropileno forrada com maravalha, medindo 28 × 17 × 13 cm.

3.1.2. CIRURGIA

Os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal (i.p.), com tribromoetanol (Sigma, MO, EUA) na dose de 250 mg/Kg. Após a tricotomia do campo cirúrgico, foram levados a um aparelho estereotáxico (David Kopf, CA, EUA) onde tiveram o crânio fixado pelo rochedo temporal e incisivos superiores, sendo a barra dos incisivos ajustada a 2,5 mm abaixo da linha interaural. Em seguida, foi realizada a limpeza do campo cirúrgico com iodo a 1% em solução alcoólica e uma injeção subcutânea de 0,2 mL de lidocaína 2% (SS White, RJ, Brasil) foi aplicada na área de incisão. Foi realizada uma incisão longitudinal e o tecido subcutâneo foi removido, assim como o perióstio (por raspagem, com o uso de pinça e algodão). Já com a

superfície craniana exposta, dois orifícios foram feitos nos ossos parietais com a utilização de uma broca elétrica, para fixação de parafusos de aço inoxidável que ancoraram a prótese ao crânio do animal. Logo após, dois outros orifícios foram feitos para implante das cânulas-guia construídas a partir de agulhas comerciais de aço inoxidável de 0,7 mm de diâmetro externo e 14 mm de comprimento. As cânulas-guia foram direcionadas à área tegmental ventral segundo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (2007): ântero-posterior = -5,8 mm do bregma, médio-lateral = $\pm 0,8$ mm da sutura sagital, dorso-ventral = -7,6 mm da superfície craniana. Em seguida, o crânio foi revestido com acrílico dental (JET, SP, Brasil) para fixação das cânulas-guia, que foram seladas com fios de aço inoxidável para protegê-las de obstrução. Ao término da cirurgia cada animal recebeu, por via intramuscular, uma injeção de 0,2 mL de Pentabiótico (Fort Dodge, SP, Brasil) 60.000 UI, com o intuito de prevenir possíveis infecções e, por via subcutânea, uma injeção de 0,2 mL do antiinflamatório Banamine (Schering-Plough, RJ, Brasil). Os animais, após serem retirados do estereotáxico, foram recolocados em suas gaiolas para um período de cinco dias de recuperação pós-cirúrgica.

3.1.3. EQUIPAMENTOS

Caixas de Condicionamento: Durante o procedimento de condicionamento foram utilizadas duas caixas idênticas medindo 20 × 20 × 25 cm (caixa A). A parede do fundo e as duas paredes laterais eram de alumínio, e o teto e a porta, de acrílico transparente. O assoalho das caixas era constituído por barras de metal de 5 mm de diâmetro, distando 1,5 cm entre si. Estas caixas encontravam-se encerradas em duas câmaras de atenuação acústica (45 × 45 × 45 cm) feitas de compensado de madeira e revestidas por Eucatex (Fig. 4 - esquerda). Os choques elétricos, de intensidade de 0,6 mA e duração de 1 s, foram administrados por meio de um gerador de choques (Albarsh Instruments, SP, Brasil). Uma lâmpada vermelha de 6 W e uma câmera de vídeo (Everfocus, CA, EUA), instaladas no interior de cada câmara de isolamento acústico, permitiram a observação do animal durante o condicionamento. Uma luz proveniente

de uma lâmpada branca de 6 W, localizada no teto de cada caixa, serviu como estímulo condicionado.

Caixas de Medida do Sobressalto: Durante as sessões de balanceamento e teste foram utilizadas duas caixas de restrição idênticas, construídas em aço inoxidável e suspensas em uma armação de PVC, medindo internamente $16,5 \times 7,5 \times 7,5$ cm (caixa B). Estas caixas encontravam-se abrigadas em duas câmaras de atenuação sonora ($64 \times 60 \times 40$ cm), fabricadas em madeira, possuindo um revestimento acústico de espuma (ENV-018S; Med Associates, VT, EUA) (Fig. 4 - direita). A resposta de sobressalto foi registrada por meio de uma plataforma sensível à pressão (estabilímetro - PHM250-60; Med Associates). O sobressalto do animal gerava movimentos nesta plataforma que foram captados por sensores como deslocamento de corrente e então amplificados, gerando um sinal analógico que foi digitalizado e analisado por um programa computacional (Startle Reflex, versão 4.10; Med Associates). A apresentação dos estímulos, o tipo, a duração, a intensidade e a amplitude dos mesmos também foram computadorizados por meio de uma interface (Dig 729; Med Associates). A resposta de sobressalto foi medida durante os primeiros 100 ms após a apresentação do estímulo sonoro, que consistiu em um ruído branco de intensidade de 100 dB e duração de 50 ms, com *rise-decay* de 5 ms, sendo liberado por um alto-falante localizado a 10 cm de distância da caixa contendo o animal. O ruído de fundo foi apresentado pelo mesmo alto-falante e consistiu em um ruído branco de 55 dB. Uma lâmpada vermelha de 6 W e uma câmera de vídeo (Everfocus), instaladas no interior das câmaras de isolamento acústico, permitiram a observação do animal durante as sessões de balanceamento e teste. Uma lâmpada branca de 6 W, localizada no teto de cada caixa, serviu como estímulo condicionado. As plataformas foram calibradas no início de cada sessão para garantir igual nível de sensibilidade ao longo dos experimentos.

Arena: Para o teste do campo aberto foi utilizada uma arena circular de acrílico transparente (60 cm de diâmetro e 50 cm de altura), colocada sobre uma base dividida em 12

quadrantes (Fig. 5 - esquerda). Os comportamentos emitidos pelos animais foram registrados por uma câmera de vídeo (Everfocus) posicionada acima da arena.

Rotarod: Para o teste da coordenação motora dos animais foi utilizado um rotarod (Rota-Rod 7750; Ugo Basile, VA, Itália). Este equipamento era constituído por um eixo cilíndrico dividido por cinco discos e girava a quatro rotações por minuto, em sessões experimentais de três minutos (Fig. 5 - direita).



Figura 4. Fotografias das caixas experimentais utilizadas para avaliação do medo condicionado. **Esquerda** - Caixa de condicionamento (caixa A). **Direita** - Caixa de sobressalto (caixa B).

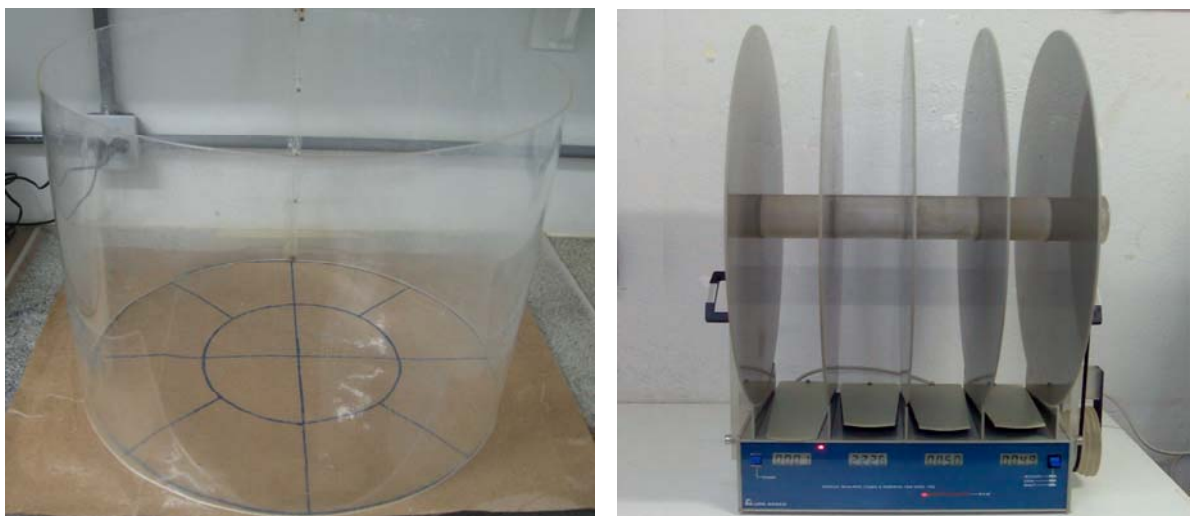


Figura 5. Fotografias dos equipamentos utilizados para avaliação do desempenho motor dos ratos. **Esquerda** - Arena. **Direita** - Rotarod.

3.1.4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Teste do sobressalto potencializado pelo medo:

Sessões de Balanceamento: Ao início dos experimentos, foram realizadas duas sessões de balanceamento nas quais os animais foram colocados na caixa B e, 5 minutos após, receberam 30 estímulos sonoros de intensidade de 100 dB com um intervalo fixo de 30 s entre cada estímulo. Cada sessão de balanceamento durou 15 minutos. A amplitude média do sobressalto ao longo das 30 tentativas de estímulos sonoros da última sessão de balanceamento foi utilizada para distribuir, de maneira homogênea, os animais nos diversos grupos do experimento.

Sessão de Condicionamento: Cinco dias após a cirurgia, ocorreu o condicionamento aversivo. Nessa sessão, após 5 minutos de terem sido colocados na caixa A, os animais foram submetidos a 10 associações de luz (CS) e choque nas patas (US). Cada tentativa consistiu em 4 segundos de luz e o choque foi apresentado no último segundo de cada apresentação do CS. O choque de intensidade de 0,6 mA, teve duração de 1 s e o intervalo entre os pareamentos foi variável em 2 min (faixa de 1-3 min). Os choques e os estímulos condicionados foram liberados por meio de uma interface controlada por um *software* instalado em um computador em uma sala adjacente. A sessão de condicionamento durou em média 20 minutos.

Sessão Teste: No dia seguinte à sessão de condicionamento, os animais foram avaliados no teste do sobressalto potencializado pelo medo. Cada animal foi então colocado na caixa B sobre a plataforma e, após 5 minutos de adaptação, recebeu um total de 60 estímulos sonoros na intensidade de 100 dB, sendo que 30 apresentações consistiam apenas no estímulo sonoro (tentativas só-som) e foram intercaladas aleatoriamente com 30 apresentações de som precedido por luz (tentativas luz-som). Esta sessão teve duração de 32 minutos. As amplitudes das respostas de sobressalto de cada animal foram registradas e armazenadas no disco rígido do computador e, posteriormente, transferidas para planilhas do Excel (Microsoft Corporation, WA, EUA) para análise dos dados.

Teste do Campo Aberto:

Um dos estudos da ação das drogas dopaminérgicas sobre o desempenho motor dos animais foi realizado com o teste do campo aberto. Cada animal foi colocado em uma arena por um período de 10 minutos para adaptação. Em seguida, o animal foi retirado, recebeu microinjeção de droga ou salina e, transcorrido o tempo de espera de cada droga, o animal foi recolocado na arena para a sessão teste que teve duração de 30 minutos. Os registros comportamentais foram realizados minuto a minuto, e consistiram das medidas de cruzamentos (resposta de cruzar com as quatro patas um dos quadrantes do assoalho da arena), levantamentos (resposta de erguer-se sobre as duas patas traseiras, mantendo as duas dianteiras elevadas, com ou sem apoio na parede da arena) e autolimpeza (higiene, com as patas dianteiras, da cabeça e/ou do corpo).

Teste do Rotarod:

Os efeitos dos diversos tratamentos sobre o desempenho motor dos animais foram também avaliados no teste do rotarod. Os animais foram submetidos a uma sessão treino no rotarod, na qual foram recolocados no equipamento após cada queda, até tornarem-se capazes de nele permanecer por um período contínuo de três minutos. Vinte e quatro horas após o treino, os animais foram submetidos a um pré-teste no qual apenas os animais capazes de permanecerem no rotarod por pelo menos um minuto foram submetidos ao teste. Os animais selecionados receberam, então, microinjeção de droga ou salina e, 15, 25 e 35 minutos após, foram recolocados no rotarod para registro das latências para queda, com tempo máximo de permanência de três minutos em cada uma das tentativas.

3.1.5. DROGAS

As drogas utilizadas foram: o agonista de receptores dopaminérgicos da subfamília D₁, SKF 38393 (SKF), o antagonista D₁, SCH 23390 (SCH), o agonista de receptores

dopaminérgicos da subfamília D₂, quimpirole (QUI) e o antagonista D₂, sulpirida (SUL). Todas as drogas foram adquiridas da Sigma (MO, EUA). SCH 23390, SKF 38393 e quimpirole foram dissolvidos em salina fisiológica (0,9%). Sulpirida foi primeiramente misturado a Tween 80 - 2% (Sigma) e, em seguida, também dissolvido em salina fisiológica (0,9%).

Todas as drogas foram administradas bilateralmente na ATV na dose de 1,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção, cinco minutos antes do início das sessões. Os animais receberam duas injeções no teste do SPM, uma antes do condicionamento e outra antes do teste. Assim, para cada droga, os animais foram distribuídos em quatro grupos: salina-salina (SAL/SAL), droga-salina (SKF/SAL, SCH/SAL, QUI/SAL, SUL/SAL), salina-droga (SAL/SKF, SAL/SCH, SAL/QUI, SAL/SUL), e droga-droga (SKF/SKF, SCH/SCH, QUI/QUI, SUL/SUL). Devido aos resultados obtidos com o quimpirole administrado antes do teste do SPM, uma dose menor dessa droga (0,5 µg/0,2 µL/sítio) foi também testada nessa mesma condição. Para os experimentos de desempenho motor, apenas uma injeção de salina ou droga foi administrada em cada animal. As doses e os tempos de espera foram selecionados com base em dados da literatura (BOROWSKI; KOKKINIDIS, 1996; EMMI et al., 1995; LAMONT; KOKKINIDIS, 1998; MUNRO; KOKKINIDIS, 1997; NADER; LEDOUX, 1999b).

3.1.6. MICROINJEÇÃO DE DROGAS

Durante o procedimento de microinjeção, os animais permaneceram livres em uma caixa de polipropileno forrada com maravalha, medindo 28 × 17 × 13 cm. Uma agulha dental 1 mm maior do que a cânula-guia foi utilizada. A agulha estava conectada a um tubo de polietileno (PE-10; Becton-Dickinson, NJ, EUA) e a uma seringa Hamilton graduada de 10 µL. As drogas foram bilateralmente injetadas na ATV em um volume constante de 0,2 µL, durante um período de 1 min de microinjeção, com o auxílio de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, MA, EUA). O deslocamento de uma bolha de ar no interior do tubo de polietileno foi utilizado para

monitorar a microinjeção. Após o término da infusão, a agulha foi mantida por mais 1 min para evitar refluxo da droga pela cânula-guia.

3.1.7. HISTOLOGIA

Ao final dos experimentos, os animais receberam uma sobredose de hidrato de cloral (500 mg/Kg, i.p.) e, a seguir, o corante Azul de Evans (2%) foi microinjetado na ATV no mesmo volume das drogas anteriormente utilizadas. A seguir, os animais foram perfundidos por via intracardiaca com salina 0,9% seguida de formalina 4%, para fixação do tecido encefálico. Os encéfalos foram removidos das caixas cranianas, mantidos em frascos contendo a solução de formalina por 3 horas e, posteriormente, transferidos para uma solução de sacarose 30%, onde permaneceram por 48 h a 4 °C. A seguir os encéfalos foram congelados em um criostato para realização de cortes histológicos em secções coronais de 60 µm. Os cortes foram colocados em lâminas previamente gelatinizadas e, depois de secos, foram corados com violeta de cresila (5%, Sigma) segundo protocolo de *Nissl*, para que os sítios das microinjeções pudessem ser verificados, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007).

3.1.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média+EPM e foram analisados com o programa estatístico SigmaStat 3.11 (Systat Software Inc, IL, EUA). Para análise dos dados do teste de sobressalto potencializado pelo medo foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, onde o fator 1 referiu-se aos tratamentos e o fator 2 às condições (só-som × luz-som). A mesma análise foi utilizada para o teste do rotarod, onde o fator 1 referiu-se também aos tratamentos e o fator 2 aos tempos (15 × 25 × 35 min). Após as análises de variância seguiu-se, no caso de significância estatística, o teste de *Newman-Keuls*. Para análise das medidas de cruzamentos, levantamentos e autolimpeza do teste do campo aberto foi utilizado o teste *t de Student*. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo.

3.2. RESULTADOS

3.2.1. SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO

Os dados apresentados referem-se aos animais cujo exame histológico mostrou que as cânulas-guia para microinjeção de drogas atingiram bilateralmente a ATV. A Figura 6A mostra um corte histológico representativo da microinjeção na ATV. A Figura 6B indica os pontos de microinjeção em secções de mesencéfalo de ratos de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007).

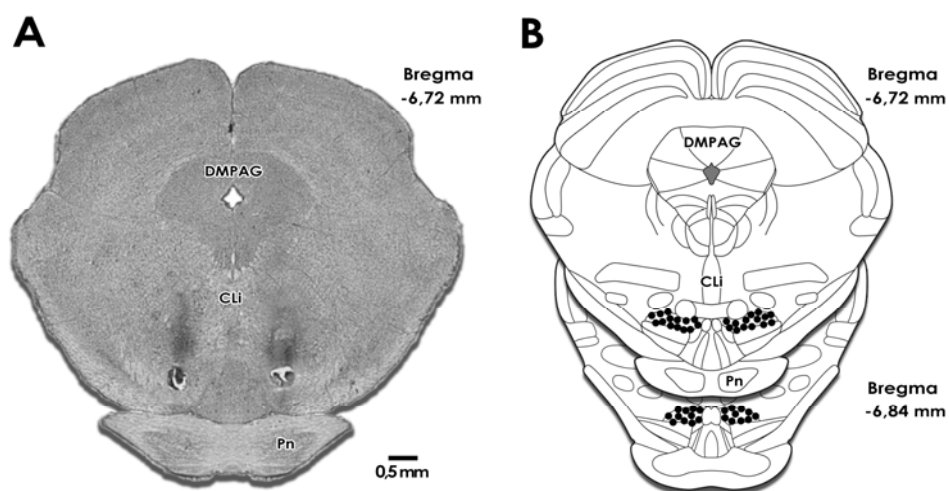


Figura 6. Fotomicrografia com sítios representativos da localização das cânulas-guia na área tegmental ventral - ATV (A) e os sítios de microinjeção em diagramas de secções de mesencéfalo de ratos de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007) (B). O número de pontos indicados é menor que o número de animais utilizados devido a várias sobreposições. Barra = 0,5 mm. DMPAG = Substância cinzenta periaquedutal dorsomedial; CLi = Núcleo caudal linear da rafe; Pn = Núcleo pontino.

3.2.2. AGONISTA D₁ – SKF 38393

A Figura 7A apresenta os resultados referentes ao desempenho, no teste do sobressalto potencializado pelo medo, de animais que receberam administração intra-ATV de salina + salina (SAL/SAL), SKF 38393 + salina (SKF/SAL), salina + SKF 38393 (SAL/SKF) ou SKF 38393 + SKF 38393 (SKF/SKF), antes das sessões de condicionamento e teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *tratamento*, $F_{(3,47)} = 0,95$; $p > 0,05$. A mesma análise revelou efeito significativo no fator *condição* (só-som × luz-som), $F_{(1,47)} = 108,10$; $p < 0,05$. Não houve interação significativa entre os dois fatores (tratamento × condição), $F_{(3,47)} = 1,21$; $p > 0,05$. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a luz potencializou a resposta de sobressalto ao som em todos os grupos ($p < 0,05$).

A Figura 7B mostra os resultados referentes à atividade motora no rotarod de animais que receberam administração intra-ATV de salina ou SKF 38393 (1,0 µg/0,2 µL) antes do teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo para os fatores *tratamento* (salina × SKF 38393), $F_{(1,36)} = 0,01$; $p > 0,05$; e *tempo* (15 min × 25 min × 35 min), $F_{(2,36)} = 0,16$; $p > 0,05$. Não houve também interação estatisticamente significativa entre os dois fatores (tratamento × tempo), $F_{(2,36)} = 2,72$; $p > 0,05$.

As Figuras 7C, 7D e 7E apresentam as médias de atividade dos animais no campo aberto para os comportamentos de cruzamento, levantamento e autolimpeza, respectivamente. O teste *t de Student* não revelou diferenças significativas entre os grupos para cruzamentos ($t_{(18)} = 0,06$; $p > 0,05$), levantamentos ($t_{(18)} = 0,20$; $p > 0,05$) ou autolimpeza ($t_{(18)} = 1,26$; $p > 0,05$).

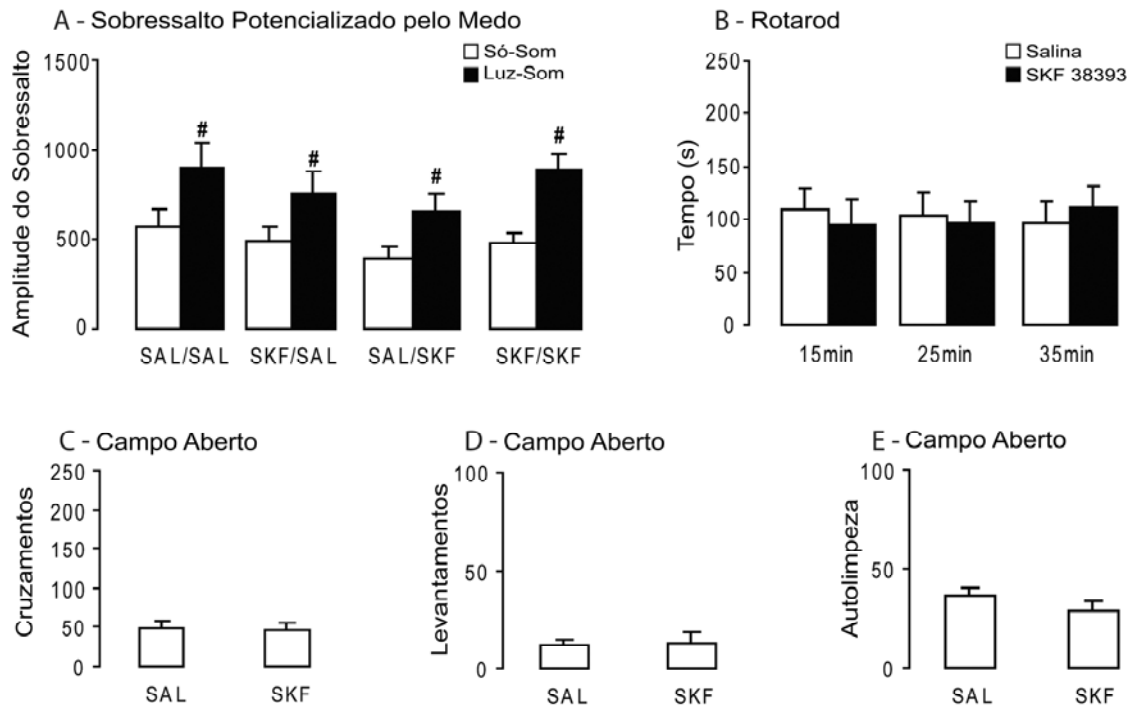


Figura 7. Efeitos da microinjeção de SKF 38393 (1,0 µg/0,2 µL) na área tegmental ventral (ATV) antes do condicionamento (SKF/SAL), do teste (SAL/SKF) ou de ambos (SKF/SKF), em relação ao grupo controle (SAL/SAL), sobre a amplitude do sobressalto nas condições só-som e luz-som (A). Desempenho motor dos animais que receberam salina ou SKF 38393 (1,0 µg/0,2 µL) na ATV nos testes do rotarod (B) e do campo aberto (C-E). Média + EPM. # Significância estatística em relação à condição só-som ($p < 0,05$, teste de *Newman-Keuls*). $n = 13$ para SAL/SAL, SKF/SAL e SKF/SKF, e $n = 12$ para SAL/SKF no teste do sobressalto potencializado pelo medo. $n = 10$ para todos os grupos nos testes do rotarod e do campo aberto.

3.2.3. ANTAGONISTA D₁ – SCH 23390

A Figura 8A apresenta os resultados referentes ao desempenho, no teste do sobressalto potencializado pelo medo, de animais que receberam administração intra-ATV de salina + salina (SAL/SAL), SCH 23390 + salina (SCH/SAL), salina + SCH 23390 (SAL/SCH) ou SCH 23390 + SCH 23390 (SCH/SCH), antes das sessões de condicionamento e teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *tratamento*, $F_{(3,43)} = 0,14$; $p > 0,05$. A mesma análise revelou efeito significativo no fator *condição* (só-som \times luz-som), $F_{(1,43)} = 81,86$; $p < 0,05$. Não houve interação significativa entre os dois fatores (tratamento \times condição), $F_{(3,43)} = 0,76$; $p > 0,05$. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a luz potencializou a resposta de sobressalto ao som em todos os grupos ($p < 0,05$).

A Figura 8B mostra os resultados referentes à atividade motora no rotarod de animais que receberam administração intra-ATV de salina ou SCH 23390 (1,0 μ g/0,2 μ L) antes do teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo para os fatores *tratamento* (salina \times SCH 23390), $F_{(1,36)} = 0,01$; $p > 0,05$; e *tempo* (15 min \times 25 min \times 35 min), $F_{(2,36)} = 0,60$; $p > 0,05$. Não houve também interação estatisticamente significativa entre os dois fatores (tratamento \times tempo), $F_{(2,36)} = 1,00$; $p > 0,05$.

As Figuras 8C, 8D e 8E apresentam as médias de atividade dos animais no campo aberto para os comportamentos de cruzamento, levantamento e autolimpeza, respectivamente. O teste *t de Student* não revelou diferença significativa entre os grupos para cruzamentos ($t_{(18)} = 0,50$; $p > 0,05$), levantamentos ($t_{(18)} = 1,38$; $p > 0,05$) ou autolimpeza ($t_{(18)} = 2,04$; $p > 0,05$).

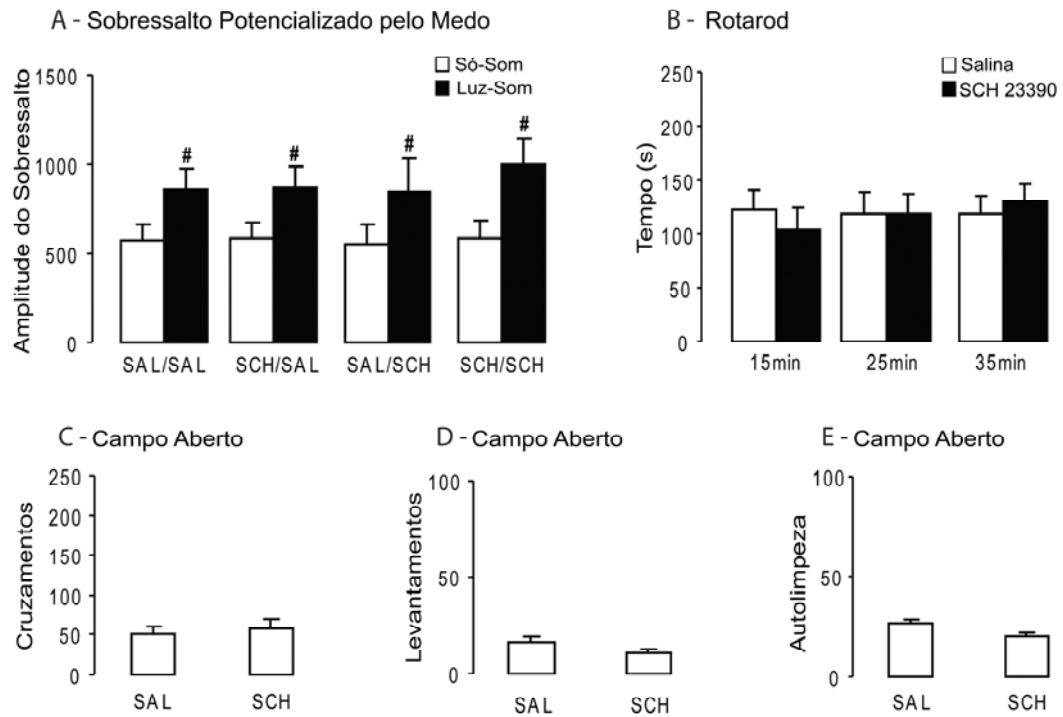


Figura 8. Efeitos da microinjeção de SCH 23390 (1,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$) na área tegmental ventral (ATV) antes do condicionamento (SCH/SAL), do teste (SAL/SCH) ou de ambos (SCH/SCH), em relação ao grupo controle (SAL/SAL), sobre a amplitude do sobressalto nas condições só-som e luz-som (A). Desempenho motor dos animais que receberam salina ou SCH 23390 (1,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$) na ATV nos testes do rotarod (B) e do campo aberto (C-E). Média + EPM. # Significância estatística em relação à condição só-som ($p < 0,05$, teste de *Newman-Keuls*). $n = 12$ para SAL/SAL, SCH/SAL e SCH/SCH, e $n = 11$ para SAL/SCH no teste do sobressalto potencializado pelo medo. $n = 10$ para todos os grupos nos testes do rotarod e do campo aberto.

3.2.4. AGONISTA D₂ – QUIMPIROLE

A Figura 9A apresenta os resultados referentes ao desempenho, no teste do sobressalto potencializado pelo medo, de animais que receberam administração intra-ATV de salina + salina (SAL/SAL), quimpirole + salina (QUI/SAL), salina + quimpirole (SAL/QUI) ou quimpirole + quimpirole (QUI/QUI), antes das sessões de condicionamento e teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo nos fatores *tratamento*, $F_{(3,56)} = 4,41$; $p < 0,05$ e *condição* (só-som × luz-som), $F_{(1,56)} = 98,87$; $p < 0,05$. Houve também interação significativa entre os dois fatores (tratamento × condição), $F_{(3,56)} = 3,38$; $p < 0,05$. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a luz potencializou a resposta de sobressalto ao som em todos os grupos, $p < 0,05$. A mesma análise não mostrou diferenças significativas entre os grupos para a condição só-som, $p > 0,05$; mas revelou que a amplitude do sobressalto nas tentativas luz-som dos animais que receberam quimpirole antes do teste (SAL/QUI) ou antes do condicionamento e do teste (QUI/QUI) foi menor do que aquela dos animais controle (SAL/SAL), $p < 0,05$. Devido a esses resultados obtidos com 1,0 µg de quimpirole quando administrado antes do teste do SPM, uma segunda dose de quimpirole (0,5 µg/0,2 µL/sítio de microinjeção) foi também avaliada nessa mesma condição (dados não apresentados graficamente). A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou, neste caso, efeito significativo no fator *tratamento*, $F_{(1,28)} = 3,24$; $p > 0,05$. A mesma análise revelou efeito significativo no fator *condição* (só-som × luz-som), $F_{(1,28)} = 59,31$; $p < 0,05$. Não houve interação significativa entre os dois fatores (tratamento × condição), $F_{(1,28)} = 0,66$; $p > 0,05$. O teste *post hoc* de *Newman-Keuls* revelou que a luz potencializou a resposta de sobressalto ao som nos dois grupos, $p < 0,05$. Desta forma, em contraste com o resultado obtido com 1,0 µg de quimpirole, 0,5 µg não causou alterações significativas na expressão do SPM.

A Figura 9B mostra os resultados referentes à atividade motora no rotarod de animais que receberam administração intra-ATV de salina ou quimpirole (1,0 µg/0,2 µL) antes do teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *tratamento*

(salina × quimpirole), $F_{(1,36)} = 0,82$; $p > 0,05$. A mesma análise revelou efeito significativo no fator *tempo* (15 min × 25 min × 35 min), $F_{(2,36)} = 6,99$; $p < 0,05$. Não houve, no entanto, interação significativa entre os dois fatores (tratamento × tempo), $F_{(2,36)} = 0,03$; $p > 0,05$. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou aumento do tempo de permanência dos animais no rotarod aos 35 minutos em relação à permanência aos 15 e aos 25 minutos, $p < 0,05$.

As Figuras 9C, 9D e 9E apresentam as médias de atividade dos animais no campo aberto para os comportamentos de cruzamento, levantamento e autolimpeza, respectivamente. O teste *t de Student* não revelou diferenças significativas entre os grupos para cruzamentos ($t(18) = 1,60$; $p > 0,05$), levantamentos ($t(18) = 0,02$; $p > 0,05$) ou autolimpeza ($t(18) = 1,81$; $p > 0,05$).

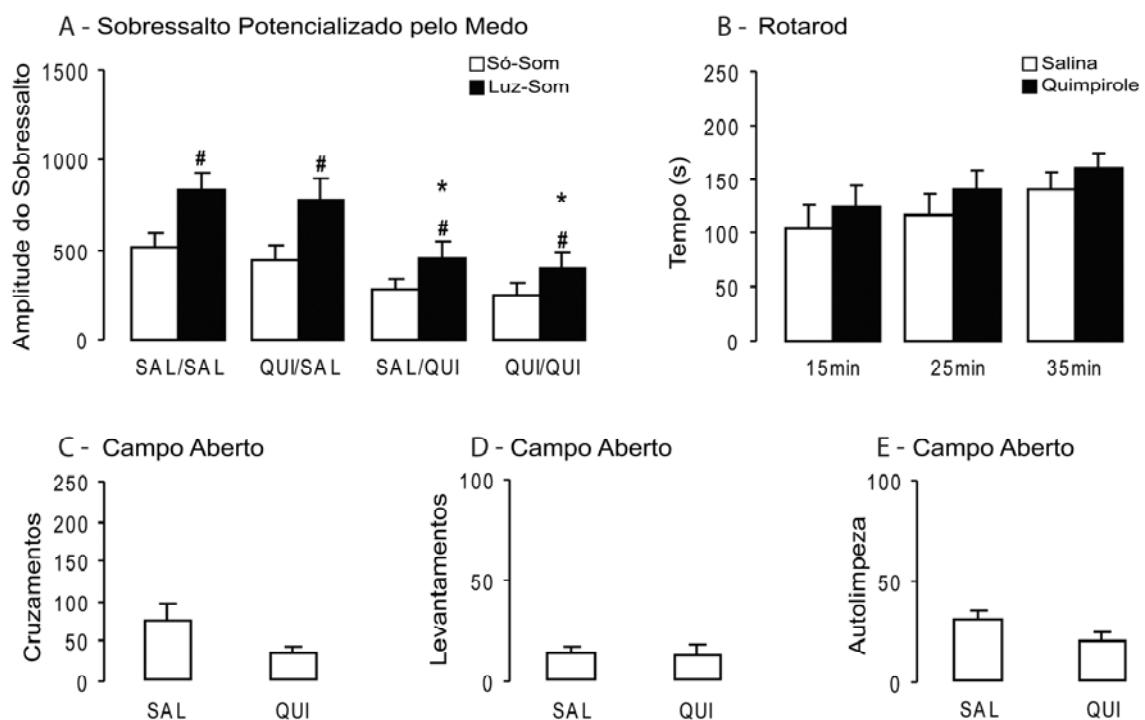


Figura 9. Efeitos da microinjeção de quimpirole (1,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$) na área tegmental ventral (ATV) antes do condicionamento (QUI/SAL), do teste (SAL/QUI) ou de ambos (QUI/QUI), em relação ao grupo controle (SAL/SAL), sobre a amplitude do sobressalto nas condições só-som e luz-som (A). Desempenho motor dos animais que receberam salina ou quimpirole (1,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$) na ATV nos testes do rotarod (B) e do campo aberto (C-E). Média + EPM. [#] Significância estatística em relação à condição só-som. * Significância estatística em relação a mesma condição no grupo controle ($p < 0,05$, teste de *Newman-Keuls*). $n = 15$ para todos os grupos no teste do sobressalto potencializado pelo medo. $n = 10$ para todos os grupos nos testes do rotarod e do campo aberto.

3.2.5. ANTAGONISTA D₂ – SULPIRIDA

A Figura 10A apresenta os resultados referentes ao desempenho, no teste do sobressalto potencializado pelo medo, de animais que receberam administração intra-ATV de salina + salina (SAL/SAL), sulpirida + salina (SUL/SAL), salina + sulpirida (SAL/SUL) ou sulpirida + sulpirida (SUL/SUL), antes das sessões de condicionamento e teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *tratamento*, $F_{(3,59)} = 0,28$; $p > 0,05$. A mesma análise revelou efeito significativo no fator *condição* (só-som × luz-som), $F_{(1,59)} = 109,79$; $p < 0,05$. Não houve interação significativa entre os dois fatores (tratamento × condição), $F_{(3,59)} = 0,99$; $p > 0,05$. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a luz potencializou a resposta de sobressalto ao som em todos os grupos ($p < 0,05$).

A Figura 10B mostra os resultados referentes à atividade motora no rotarod de animais que receberam administração intra-ATV de salina ou sulpirida (1,0 µg/0,2 µL) antes do teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo para os fatores *tratamento* (salina × sulpirida), $F_{(1,36)} = 0,001$; $p > 0,05$; e *tempo* (15 min × 25 min × 35 min), $F_{(2,36)} = 0,55$; $p > 0,05$. Não houve também interação estatisticamente significativa entre os dois fatores (tratamento × tempo), $F_{(2,36)} = 0,94$; $p > 0,05$.

As Figuras 10C, 10D e 10E apresentam as médias de atividade dos animais no campo aberto para os comportamentos de cruzamento, levantamento e autolimpeza, respectivamente. O teste *t de Student* não revelou diferenças significativas entre os grupos para cruzamentos ($t_{(18)} = 0,64$; $p > 0,05$), levantamentos ($t_{(18)} = 0,51$; $p > 0,05$) ou autolimpeza ($t_{(18)} = 1,41$; $p > 0,05$).

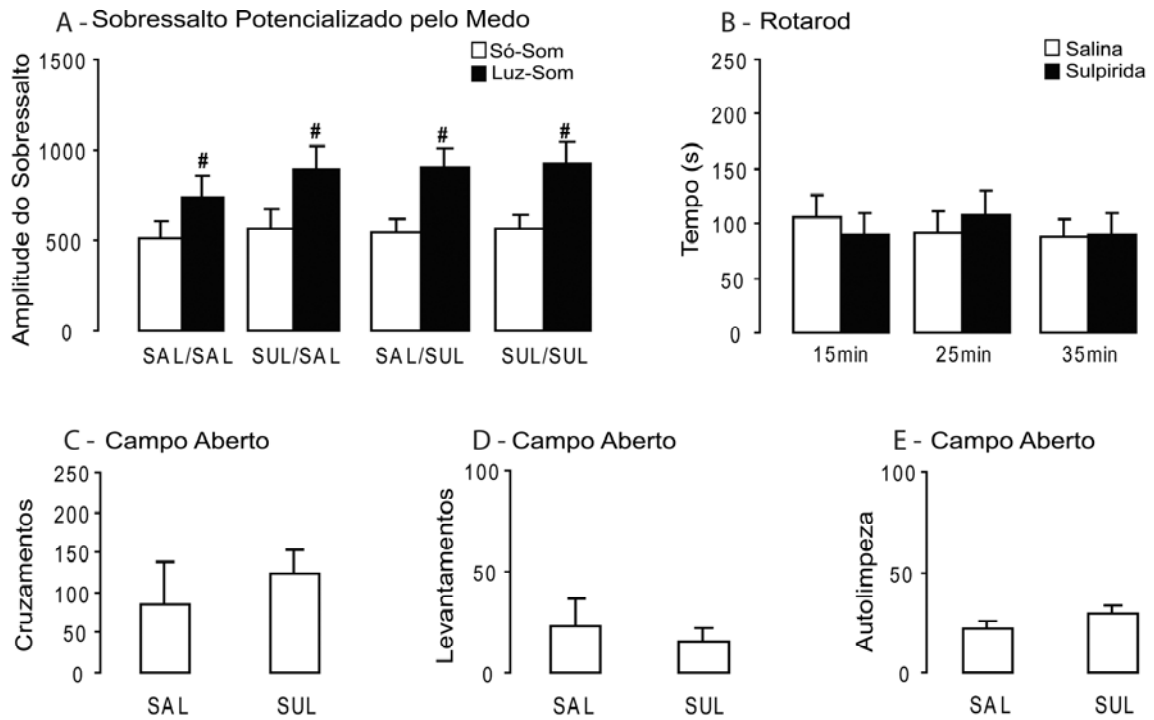


Figura 10. Efeitos da microinjeção de sulpirida ($1,0 \mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$) na área tegmental ventral (ATV) antes do condicionamento (SUL/SAL), do teste (SAL/SUL) ou de ambos (SUL/SUL), em relação ao grupo controle (SAL/SAL), sobre a amplitude do sobressalto nas condições só-som e luz-som (A). Desempenho motor dos animais que receberam salina ou sulpirida ($1,0 \mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$) na ATV nos testes do rotarod (B) e do campo aberto (C-E). Média + EPM. # Significância estatística em relação à condição só-som ($p < 0,05$, teste de *Newman-Keuls*). $n = 16$ para SAL/SAL, SAL/SUL e SUL/SUL, e $n = 15$ para SUL/SAL no teste do sobressalto potencializado pelo medo. $n = 10$ para todos os grupos nos testes do rotarod e do campo aberto.

4. EXPERIMENTO II: EFEITOS DO MEDO CONDICIONADO À LUZ SOBRE OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE DOPAMINA NO COMPLEXO BASOLATERAL DA AMÍGDALA

4.1. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1. ANIMAIS

Foram utilizados 10 ratos *Wistar* machos, com peso médio de 280 gramas, mantidos em grupos de dois animais por caixa sob as mesmas condições descritas para o Experimento I.

4.1.2. CIRURGIA

Foram utilizados os mesmos procedimentos cirúrgicos descritos para o Experimento I. Entretanto, desta vez houve implante unilateral de uma cânula-guia para sonda de microdiálise direcionada ao complexo basolateral da amígdala segundo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (2007): ântero-posterior = -2,3 mm do bregma, médio-lateral = \pm 5,5 mm da sutura sagital, dorso-ventral = -7,0 mm da superfície craniana, com a barra dos incisivos ajustada a 3,3 mm abaixo da linha interaural.

4.1.3. EQUIPAMENTOS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Condicionamento Aversivo: Foram utilizadas as mesmas caixas descritas para o Experimento I (Fig. 4 - esquerda). A sessão de condicionamento também foi idêntica àquela descrita para o Experimento I, com exceção dos animais do grupo controle (não condicionados), que foram submetidos a 10 exposições à luz e 10 choques nas patas, apresentados desta vez de forma não pareada.

Teste de Medo Condicionado (Microdiálise e Congelamento Condicionado): No dia seguinte à sessão de condicionamento, os animais tiveram o tempo de congelamento e os níveis extracelulares de dopamina no BLA avaliados no teste de medo condicionado à luz-CS. Os

animais foram mantidos isolados em gaiolas viveiro construídas em acrílico transparente e forradas com maravalha, tendo livre acesso a água e alimento. Uma sonda de microdialise (CMA 12; CMA/Microdialysis AB, Stockholm, Suécia; Fig. 11 - esquerda) que possibilitava a troca de moléculas entre o tecido nervoso e o meio interno da membrana, foi inserida na cânula-guia direcionada ao BLA. Tubos com 0,12 mm de diâmetro interno (FEP Tubing; CMA/Microdialysis AB) foram conectados nas extremidades da sonda, constituindo uma via de entrada para a solução de Ringer (em mM: NaCl, 147,0; KCl, 4,0; CaCl₂, 2,2) em fluxo constante de 1,5 µL/min (Bomba de microinjeção; BAS, IN, EUA) e outra de saída do dialisado. Após um período de 2 horas de equilíbrio, nove amostras de dialisado foram coletadas manualmente a intervalos regulares de 30 min, em tubos contendo 3 µL de uma solução de ácido perclórico (HClO₄ - 0,05 M). Os níveis basais de dopamina, anteriores a qualquer procedimento, foram definidos por meio da coleta de três amostras de dialisado. Em seguida, teve início o teste de medo condicionado, com exposição dos animais à luz-CS. A sessão teste foi conduzida sem apresentação de choques nas patas. Durante esse procedimento foram utilizadas duas caixas idênticas de acrílico transparente medindo 20 × 23 × 31 cm (Fig. 11 - direita) e com o assoalho constituído por barras de metal de 5 mm de diâmetro, distando 1 cm entre si. Cada animal foi então transferido para essa caixa e, após 10 minutos de adaptação, recebeu um total de 10 apresentações de luz, com duração de 4 s cada e intervalo variável de 2 min (faixa 1-3 min). Em seguida os animais foram recolocados nas gaiolas viveiro. Foram coletados dialisados a cada 30 min até 180 min compondo um total de seis amostras experimentais por animal. O critério comportamental utilizado para avaliar o medo condicionado foi o tempo de congelamento durante o teste de medo condicionado à luz-CS, correspondendo ao primeiro dialisado experimental. O congelamento foi operacionalmente definido como ausência total de movimentos do animal, exceto aqueles relacionados à respiração.

Determinação de dopamina por cromatografia líquida de alta eficiência: A quantidade de dopamina contida em cada dialisado foi analisada usando um sistema de cromatografia

líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) com detecção eletroquímica. Esse sistema era constituído por um detector eletroquímico (BAS, IN, EUA) acoplado a uma coluna de fase reversa (Nucleosil 150 × 3,2 mm, C-18, com tamanho de partículas de 5 µm; Supelco Inc., MO, EUA) e a uma bomba de baixa pulsação (PM-92e; BAS). A sensibilidade fixada para o detector eletroquímico foi de 500 pA e o potencial de oxidação utilizado foi de 650 mV (eletrodo de referência Ag⁺/AgCl). A fase móvel, constituída de 50 mM NaH₂PO₄, 0,1 mM Na₂-EDTA, 0,5 mM octilsulfato de sódio, e 15% metanol (pH ajustado para 5,5), foi filtrada e bombeada através do sistema em um fluxo de 700 µL/min. O volume por amostra de dialisado injetado foi de 40 µL. Essa configuração permitiu a análise de DA no dialisado em uma única corrida, com duração aproximada de 10 minutos. O sistema de HPLC era integrado a um sistema de aquisição de dados, ChromGraph™ Control (BAS). A quantificação da DA contida no dialisado foi realizada por meio da utilização de regressão linear obtida a partir da área de cinco padrões com concentrações distintas e conhecidas de DA. Todos os reagentes utilizados para HPLC foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) ou da Sigma (MO, EUA).

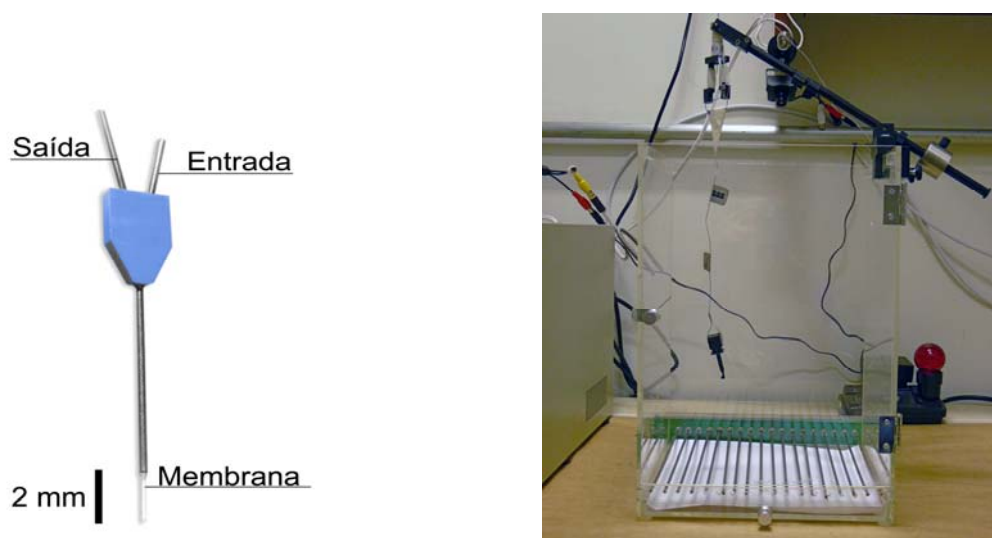


Figura 11. Esquerda - Sonda para microdiálise. Imagem modificada do sítio www.microdialysis.se/Basic_Research. Direita - Caixa de teste utilizada durante avaliação do medo condicionado à luz-CS.

4.1.4. HISTOLOGIA

Foram utilizados os mesmos procedimentos descritos para o Experimento I.

4.1.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados com o programa estatístico SigmaStat 3.11 (Systat Software Inc). Os dados referentes à quantidade de DA coletada no BLA são apresentados como média±EPM da porcentagem dos valores basais calculados como média das três primeiras amostras consecutivas coletadas imediatamente antes do teste de medo condicionado à luz-CS. Foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, onde o fator 1 referiu-se aos grupos (controle × condicionado) e o fator 2 ao tempo (tempo das amostras de dialisados). Após a análise de variância seguiu-se, no caso de significância estatística, o teste de *Newman-Keuls*. Os dados referentes ao tempo de congelamento condicionado são apresentados como média+EPM. Para análise do congelamento, foi utilizado o *teste t de Student*. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo.

4.2. RESULTADOS

4.2.1. SÍTIOS DE MICRODIÁLISE

Os dados apresentados referem-se aos animais cujo exame histológico mostrou que a cânula-guia para sonda de microdiálise atingiu o BLA. A Figura 12A mostra um corte histológico representativo do sítio de microdiálise no BLA. A Figura 12B indica as posições das sondas de microdiálise no BLA em secções de encéfalo de ratos de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007).

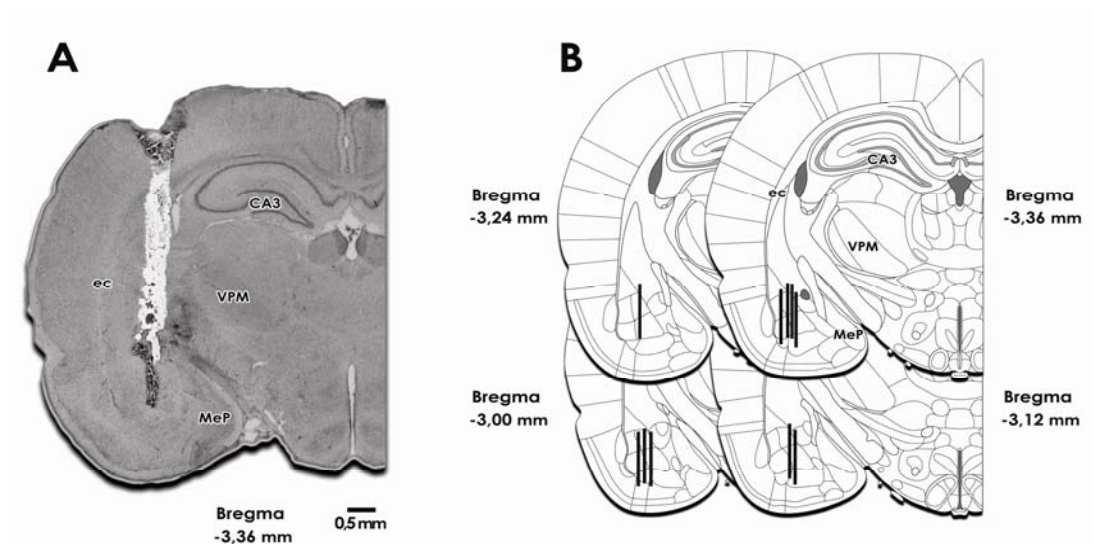


Figura 12. Fotomicrografia com sítio representativo da localização da cânula-guia para sonda de microdiálise no complexo basolateral da amígdala - BLA (A) e posições das sondas de microdiálise em diagramas de secções de encéfalo de ratos de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007) (B). Barra = 0,5 mm. CA3 = Região CA3 do hipocampo; ec = Cápsula externa; VPM = Núcleo posteromedial ventral do tálamo; MeP = Núcleo medial posterior da amígdala.

4.2.2. MEDO CONDICIONADO

Os níveis extracelulares basais de dopamina, anteriores a qualquer procedimento, foram definidos como a média de três amostras consecutivas de dialisados. A Figura 13A apresenta o curso temporal dos níveis extracelulares de DA no BLA de animais previamente submetidos ao condicionamento aversivo em comparação ao controle. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *grupo* (controle × condicionado), $F_{(1,64)} = 0,83$; $p > 0,05$. A mesma análise revelou efeito significativo no fator *tempo*, $F_{(8,64)} = 5,18$; $p < 0,05$. Houve interação significativa entre os dois fatores (*grupo* × *tempo*), $F_{(8,64)} = 3,30$; $p < 0,05$. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou um aumento dos níveis extracelulares de DA nas amostras referentes aos tempos 30 e 60 min, em animais previamente submetidos ao condicionamento aversivo em comparação com as demais amostras desse mesmo grupo e em comparação com as respectivas amostras do grupo controle ($p < 0,05$).

A Figura 13B mostra os resultados referentes ao tempo de congelamento condicionado dos mesmos animais submetidos ao procedimento de microdiálise no BLA. O teste *t de Student* revelou diferença significativa entre os *grupos* ($t_{(8)} = 11,74$; $p < 0,05$), mostrando um aumento expressivo no tempo de congelamento do grupo condicionado em comparação ao grupo controle.

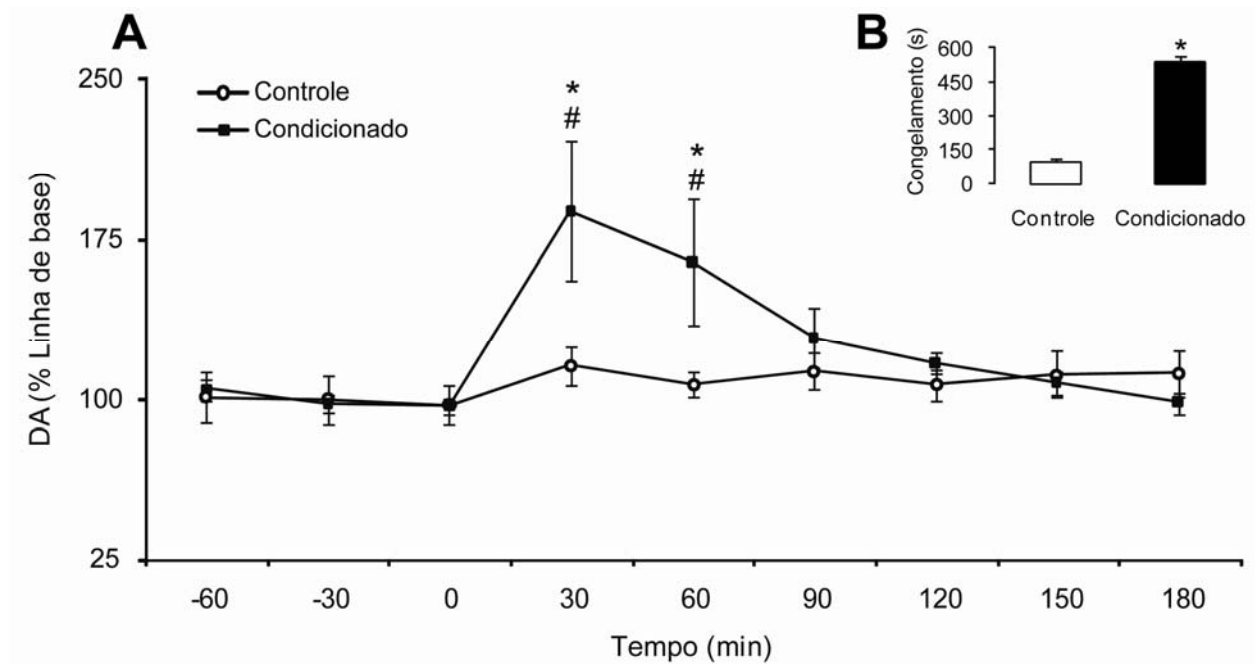


Figura 13. Níveis extracelulares de dopamina (DA) nos dialisados do complexo basolateral da amígdala (BLA) antes (-60, -30, 0), durante (30) e depois (60, 90, 120, 150, 180) da exposição dos animais ao teste de medo condicionado à luz-CS. Média \pm EPM em relação aos níveis basais (média das três primeiras amostras de dialisado consecutivas, considerada como 100%) (A). Tempo de congelamento durante o teste de medo condicionado à luz-CS dos mesmos animais submetidos à microdialise. Média + EPM (B). # Significância estatística em relação à linha de base. * Significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, teste de *Newman-Keuls*). $n = 5$ para os dois grupos.

5. EXPERIMENTO III: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE QUIMPIROLE NA ÁREA TEGMENTAL VENTRAL SOBRE OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE DOPAMINA DO COMPLEXO BASOLATERAL DA AMÍGDALA ASSOCIADOS AO MEDO CONDICIONADO À LUZ

5.1. MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1. ANIMAIS

Foram utilizados 11 ratos *Wistar* machos, com peso médio de 280 gramas, mantidos em grupos de dois animais por caixa sob as mesmas condições descritas para o Experimento I.

5.1.2. CIRURGIA

Foram utilizados os mesmos procedimentos cirúrgicos descritos para o Experimento I. Entretanto, desta vez os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com a associação de cloridrato de cetamina (100 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (7,5 mg/Kg). Além disso, no presente experimento, houve implante unilateral de uma cânula-guia para sonda de microdiálise direcionada ao complexo basolateral da amígdala segundo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (2007): ântero-posterior = -2,3 mm do bregma, médio-lateral = \pm 5,5 mm, dorso-ventral = -7,0 mm, e de uma cânula-guia para microinjeção de drogas direcionada à área tegmental ventral: ântero-posterior = -5,8 mm do bregma, médio-lateral = \pm 0,8 mm, dorso-ventral = -7,6 mm, com a barra dos incisivos ajustada a 3,3 mm abaixo da linha interaural.

5.1.3. EQUIPAMENTOS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Condicionamento Aversivo: Foram utilizadas as mesmas caixas e o mesmo procedimento experimental descritos para o condicionamento realizado no Experimento I.

Teste de Medo Condicionado (Microdiálise e Congelamento Condicionado): O mesmo procedimento experimental descrito para o Experimento II foi aqui utilizado com adição de uma microinjeção de salina ou quimpirole na ATV imediatamente antes do teste de medo condicionado a luz-CS.

Determinação de dopamina por cromatografia líquida de alta eficiência: Idem Experimento II.

5.1.4. DROGAS

A droga utilizada foi o agonista de receptores D₂ quimpirole administrado unilateralmente na ATV na dose de 1,0 µg/0,2 µL por sítio de microinjeção. A dose e o tempo de espera foram selecionados com base no Experimento I.

5.1.5. MICROINJEÇÃO DE DROGAS

O procedimento de microinjeção de droga foi idêntico àquele utilizado no Experimento I.

5.1.6. HISTOLOGIA

Idem Experimento I.

5.1.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Idem Experimento II.

5.2. RESULTADOS

5.2.1. SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO E MICRODIÁLISE

Os dados apresentados referem-se aos animais cujo exame histológico mostrou que a sonda de microdiálise atingiu o BLA e a cânula-guia para microinjeção atingiu a ATV. As Figuras 14A e 14C mostram cortes histológicos representativos dos sítios de microdiálise no BLA e de microinjeção na ATV, respectivamente. As Figuras 14B e 14D indicam as posições das sondas de microdiálise no BLA e das microinjeções na ATV em secções de encéfalo de ratos de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007), respectivamente.

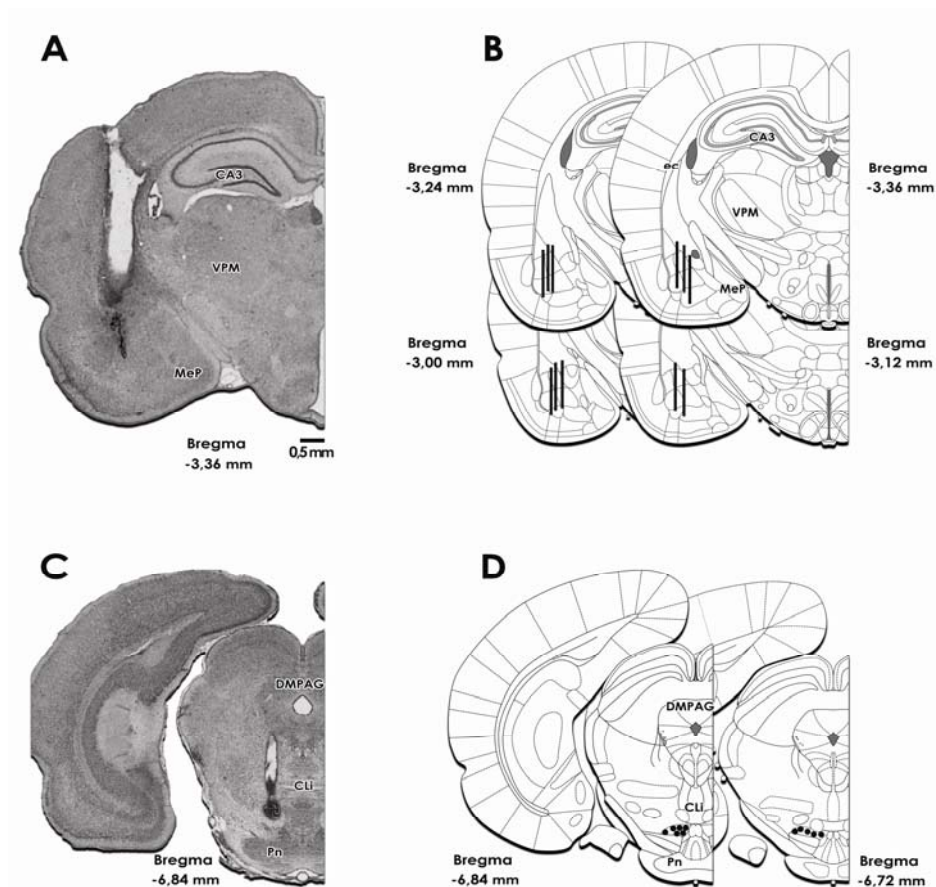


Figura 14. Fotomicrografia com sítio representativo da localização da sonda de microdiálise no complexo basolateral da amígdala – BLA (A), e da cânula-guia para microinjeção na área tegmental ventral - ATV (C). Posições das sondas de microdiálise no BLA (B) e sítios de microinjeção na ATV (D) em diagramas de secções de encéfalo de ratos de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007). Barra = 0,5 mm. CA3 = Região CA3 do hipocampo; ec = Cápsula externa; VPM = Núcleo posteromedial ventral do tálamo; MeP = Núcleo medial posterior da amígdala; DMPAG = Substância cinzenta periaquedutal dorsomedial; CLi = Núcleo caudal linear da rafe; Pn = Núcleo pontino.

5.2.2. MEDO CONDICIONADO

Os níveis extracelulares basais de dopamina, anteriores a qualquer procedimento, foram definidos como a média de três amostras consecutivas de dialisados. A Figura 15A apresenta o curso temporal dos níveis extracelulares de DA no BLA de animais previamente submetidos ao condicionamento aversivo e que receberam salina ou quimpirole na ATV antes do teste de medo condicionado. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *grupo* (salina × quimpirole), $F_{(1,72)} = 1,81$; $p > 0,05$. A mesma análise revelou efeito significativo no fator *tempo*, $F_{(8,72)} = 2,91$; $p < 0,05$. Houve interação significativa entre os dois fatores (*grupo* × *tempo*), $F_{(8,72)} = 3,36$; $p < 0,05$. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou um aumento dos níveis extracelulares de DA, nas amostras referentes aos tempos 30 e 60 min, em animais que receberam microinjeção de salina na ATV em comparação com as demais amostras desse mesmo grupo e em comparação com as respectivas amostras do grupo tratado com quimpirole ($p < 0,05$).

A Figura 15B mostra os resultados referentes ao tempo de congelamento condicionado dos mesmos animais submetidos ao procedimento de microdialise no BLA. O teste *t de Student* revelou diferença significativa entre os grupos ($t_{(9)} = 6,42$; $p < 0,05$), mostrando uma diminuição no tempo de congelamento do grupo tratado com quimpirole em comparação ao grupo controle.

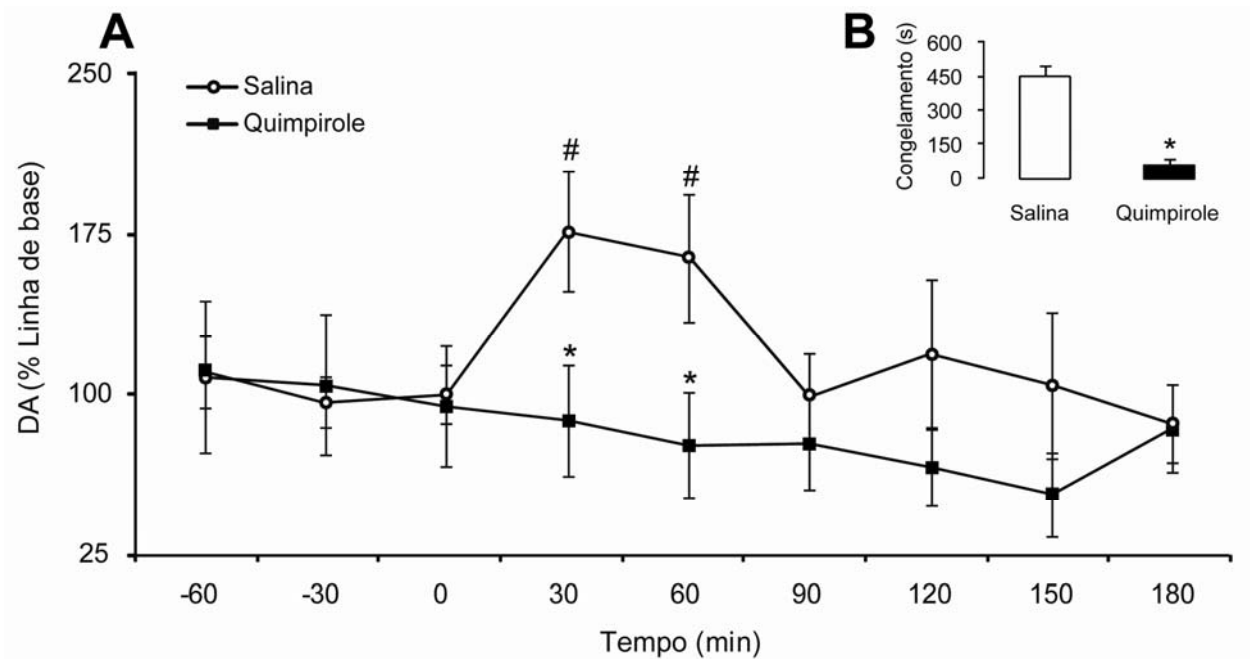


Figura 15. Níveis extracelulares de dopamina (DA) nos dialisados do complexo basolateral da amígdala (BLA) antes (-60, -30, 0), durante (30) e depois (60, 90, 120, 150, 180) da exposição dos animais ao teste de medo condicionado à luz-CS. Média \pm EPM em relação aos níveis basais (média das três primeiras amostras de dialisado consecutivas, considerada como 100%) (A). Tempo de congelamento durante o teste de medo condicionado à luz-CS dos mesmos animais submetidos à microdialise. Média + EPM (B). [#] Significância estatística em relação à linha de base. ^{*} Significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, teste de *Newman-Keuls*). $n = 6$ para o grupo salina e 5 para o grupo quimpirole.

6. EXPERIMENTO IV: ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D₁ E D₂ DO COMPLEXO BASOLATERAL DA AMÍGDALA NA EXPRESSÃO DO MEDO CONDICIONADO À LUZ

6.1. MATERIAL E MÉTODOS

6.1.1. ANIMAIS

Foram utilizados 76 ratos *Wistar* machos, com peso médio de 270 gramas, mantidos sob as mesmas condições descritas para o Experimento I.

6.1.2. CIRURGIA

Foram utilizados os mesmos procedimentos cirúrgicos descritos para o Experimento I. Entretanto, desta vez os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal (i.p.), com a associação de cloridrato de cetamina (100 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (7,5 mg/Kg). Além disso, no presente experimento, o implante bilateral de cânulas-guia foi direcionado ao complexo basolateral da amígdala, segundo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (2007): ântero-posterior = -2,3 mm do bregma, médio-lateral = \pm 5,5 mm da sutura sagital, dorso-ventral = -7,0 mm da superfície craniana, com a barra dos incisivos ajustada a 3,3 mm abaixo da linha interaural.

6.1.3. EQUIPAMENTOS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Idem Experimento I.

6.1.4. DROGAS

As drogas utilizadas foram o antagonista D₁ SCH 23390 (SCH) e o antagonista D₂ sulpirida (SUL), ambas adquiridas da Sigma (MO, EUA). SCH 23390 foi dissolvido em salina fisiológica (0,9%) e sulpirida foi primeiramente misturado a Tween 80 a 2% (Sigma) e, em

seguida, também dissolvido em salina fisiológica (0,9%). As drogas foram administradas bilateralmente no BLA nas doses de 1,0 e 2,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ por sítio de microinjeção, cinco minutos antes do início das sessões. As doses e os tempos de espera foram selecionados com base no Experimento I.

6.1.5. MICROINJEÇÃO DE DROGAS

O procedimento de microinjeção das drogas no BLA foi idêntico àquele realizado no Experimento I.

6.1.6. HISTOLOGIA

Idem Experimento I.

6.1.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do teste do sobressalto potencializado pelo medo e do rotarod foram analisados como descrito para o Experimento I. Para análise das medidas de cruzamentos, levantamentos e autolimpeza do teste do campo aberto foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) de uma via. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo.

6.2. RESULTADOS

6.2.1. SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO

Os dados apresentados referem-se aos animais cujo exame histológico mostrou que as cânulas-guia para microinjeção de drogas atingiram bilateralmente o BLA. A Figura 16A mostra um corte histológico representativo da microinjeção no BLA. A Figura 16B indica os pontos de microinjeção em secções de encéfalo de ratos de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007).

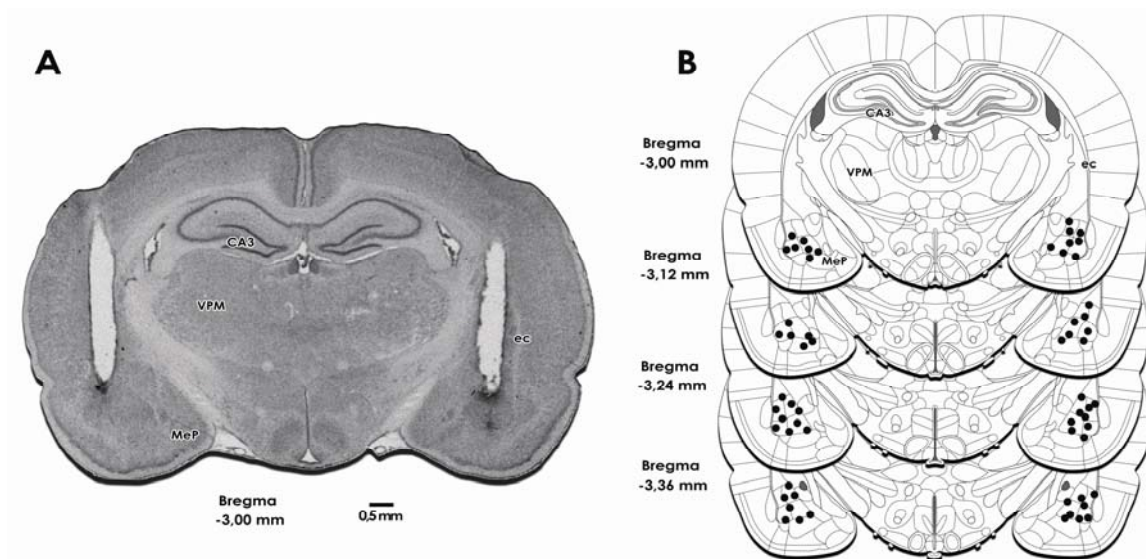


Figura 16. Fotomicrografia com sítios representativos da localização das cânulas-guia no complexo basolateral da amígdala - BLA (A) e os sítios de microinjeção em diagramas de secções de encéfalo de ratos de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007) (B). O número de pontos indicados é menor que o número de animais utilizados devido a sobreposições. Barra = 0,5 mm. CA3 = Região CA3 do hipocampo; VPM = Núcleo ventral posteromedial do tálamo; ec = Cápsula externa; MeP = Núcleo medial posterior da amígdala.

6.2.2. ANTAGONISTA D₁ – SCH 23390

A Figura 17A apresenta os resultados referentes ao desempenho, no teste do sobressalto potencializado pelo medo, de animais que receberam administração intra-BLA de salina (SAL), SCH 23390 1,0 µg/0,2 µL/sítio (SCH1) ou SCH 23390 2,0 µg/0,2 µL/sítio (SCH2), antes da sessão teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *tratamento* (salina × SCH1 × SCH2), $F_{(2,33)} = 0,99$; $p > 0,05$. A mesma análise revelou efeito significativo no fator *condição* (só-som × luz-som), $F_{(1,33)} = 48,66$; $p < 0,05$. Não houve interação significativa entre os dois fatores (tratamento × condição), $F_{(2,33)} = 0,41$; $p > 0,05$. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a luz potencializou a resposta de sobressalto ao som em todos os grupos ($p < 0,05$).

A Figura 17B mostra os resultados referentes à atividade motora no rotarod de animais que receberam administração intra-BLA de salina ou SCH 23390 (1,0 ou 2,0 µg/0,2 µL) antes do teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo para os fatores *tratamento* (salina × SCH1 × SCH2), $F_{(2,30)} = 0,07$; $p > 0,05$; e *tempo* (10 min × 20 min × 30 min), $F_{(2,30)} = 0,26$; $p > 0,05$. Não houve também interação estatisticamente significativa entre os dois fatores (tratamento × tempo), $F_{(4,30)} = 0,61$; $p > 0,05$.

As Figuras 17C, 17D e 17E apresentam as médias de atividade dos animais no campo aberto para os comportamentos de levantamento, cruzamento e autolimpeza, respectivamente. A ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas entre os grupos para cruzamentos ($F_{(2,15)} = 0,74$; $p > 0,05$), levantamentos ($F_{(2,15)} = 1,16$; $p > 0,05$) ou autolimpeza ($F_{(2,15)} = 2,08$; $p > 0,05$).

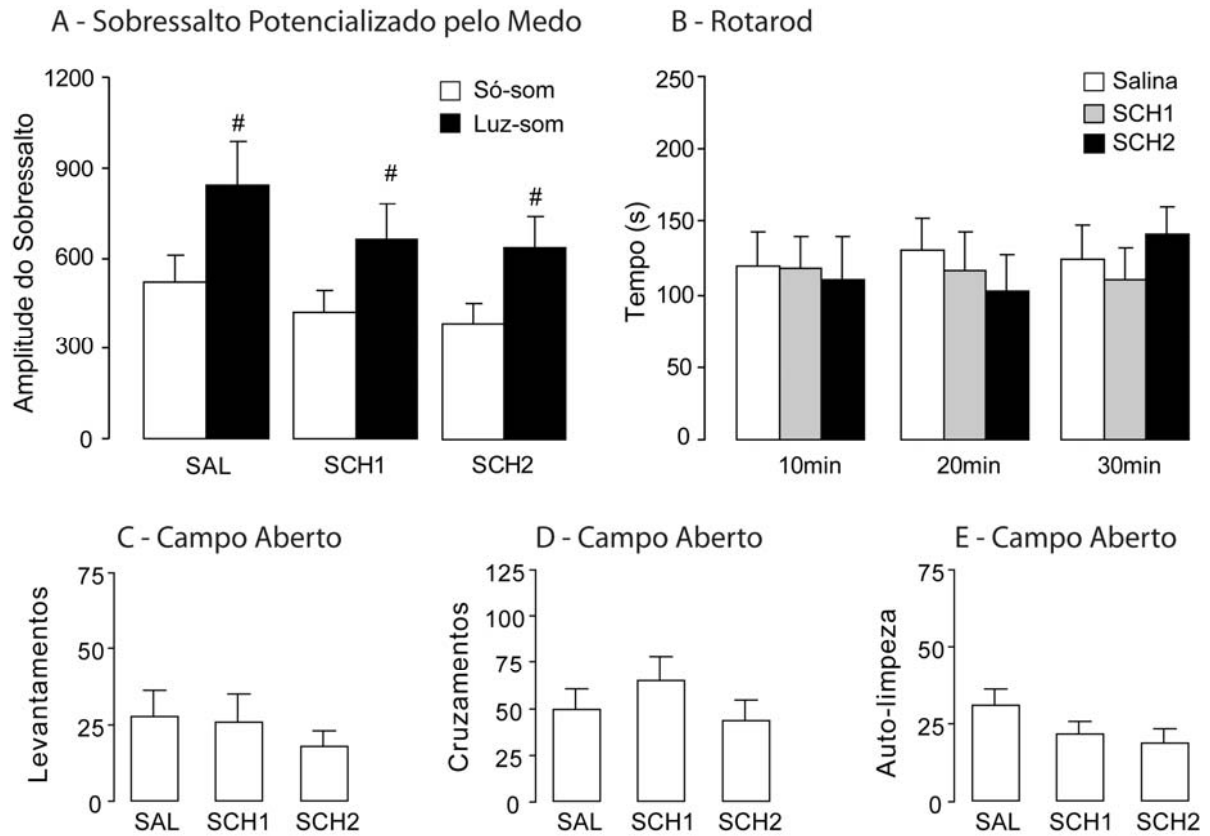


Figura 17. Efeitos da microinjeção de SCH 23390 1,0 ou 2,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ (SCH1, SCH2) no complexo basolateral da amígdala (BLA) antes do teste em relação ao grupo controle (SAL), sobre a amplitude do sobressalto nas condições só-som e luz-som (A). Desempenho motor dos animais que receberam salina ou SCH 23390 (1,0 ou 2,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$) no BLA nos testes do rotarod (B) e do campo aberto (C-E). Média + EPM. [#] Significância estatística em relação à condição só-som ($p < 0,05$, teste de *Newman-Keuls*). $n = 13, 11$ e 12 para SAL, SCH1 e SCH2, respectivamente, no teste do sobressalto potencializado pelo medo. $n = 6$ para todos os grupos nos testes do rotarod e do campo aberto.

6.2.3. ANTAGONISTA D₂ – SULPIRIDA

A Figura 18A apresenta os resultados referentes ao desempenho, no teste do sobressalto potencializado pelo medo, de animais que receberam administração intra-BLA de salina (SAL), sulpirida 1,0 µg/0,2 µL/sítio (SUL1) ou sulpirida 2,0 µg/0,2 µL/sítio (SUL2), antes da sessão teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *tratamento* (salina × SUL1 × SUL2), $F_{(2,37)} = 1,75$; $p > 0,05$. A mesma análise revelou efeito significativo no fator *condição* (só-som × luz-som), $F_{(1,37)} = 37,87$; $p < 0,05$. Houve interação significativa entre os dois fatores (*tratamento* × *condição*), $F_{(2,37)} = 3,94$; $p < 0,05$. A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a luz potencializou a resposta de sobressalto ao som nos grupos SAL e SUL1 ($p < 0,05$). A mesma análise não mostrou diferenças significativas entre os grupos para a condição só-som, $p > 0,05$; mas revelou que a amplitude do sobressalto nas tentativas luz-som dos animais que receberam sulpirida na dose de 2,0 µg/0,2 µL/sítio (SUL2) foi menor do que aquela dos animais controle (SAL), $p < 0,05$.

A Figura 18B mostra os resultados referentes à atividade motora no rotarod de animais que receberam administração intra-BLA de salina ou sulpirida (1,0 ou 2,0 µg/0,2 µL) antes do teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo para os fatores *tratamento* (salina × SUL1 × SUL2), $F_{(2,30)} = 0,07$; $p > 0,05$; e *tempo* (10 min × 20 min × 30 min), $F_{(2,30)} = 0,80$; $p > 0,05$. Não houve também interação estatisticamente significativa entre os dois fatores (*tratamento* × *tempo*), $F_{(4,30)} = 0,89$; $p > 0,05$.

As Figuras 18C, 18D e 18E apresentam as médias de atividade dos animais no campo aberto para os comportamentos de levantamento, cruzamento e autolimpeza, respectivamente. A ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas entre os grupos para cruzamentos ($F_{(2,15)} = 0,58$; $p > 0,05$), levantamentos ($F_{(2,15)} = 0,01$; $p > 0,05$) ou autolimpeza ($F_{(2,15)} = 0,24$; $p > 0,05$).

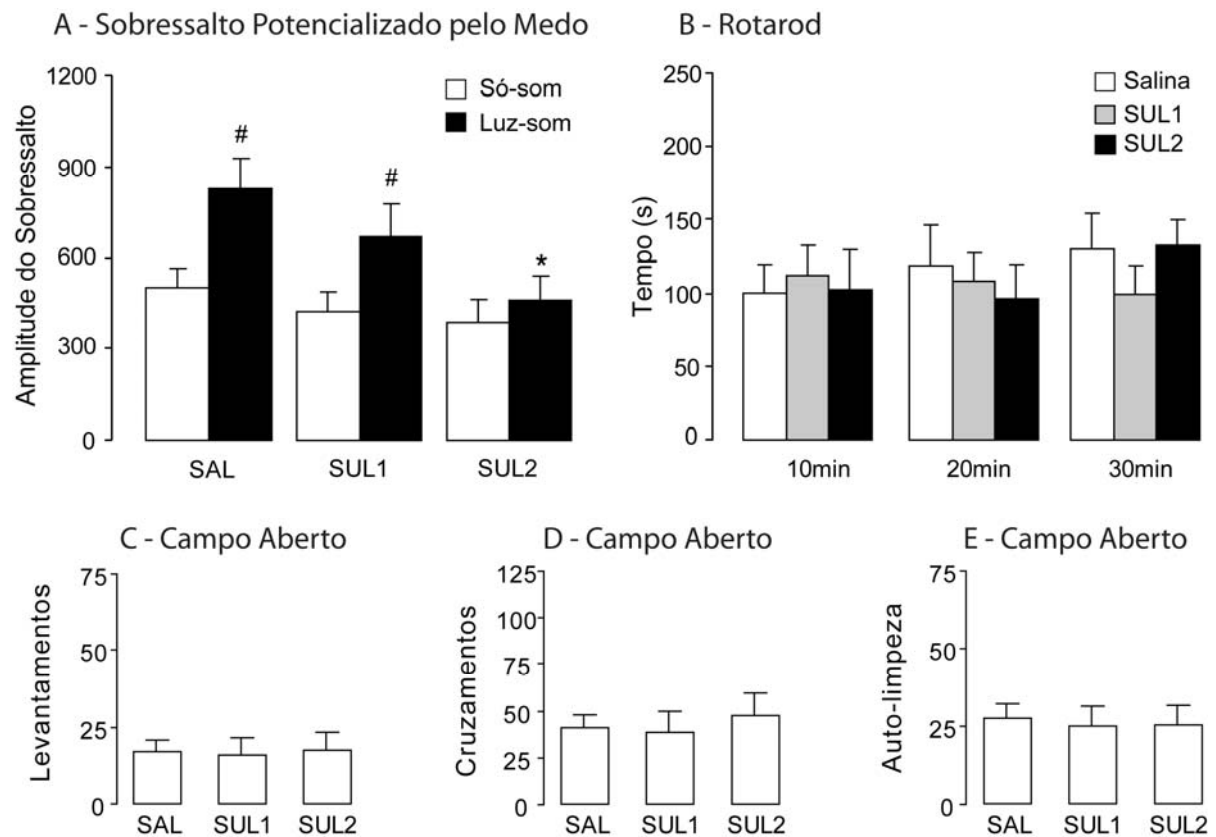


Figura 18. Efeitos da microinjeção de sulpirida 1,0 ou 2,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ (SUL1, SUL2) no complexo basolateral da amígdala (BLA) antes do teste em relação ao grupo controle (SAL), sobre a amplitude do sobressalto nas condições só-som e luz-som (A). Desempenho motor dos animais que receberam salina ou sulpirida (1,0 ou 2,0 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$) no BLA nos testes do rotarod (B) e do campo aberto (C-E). Média + EPM. [#] Significância estatística em relação à condição só-som. ^{*} Significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, teste de *Newman-Keuls*). $n = 14, 13$ e 13 para SAL, SUL1 e SUL2, respectivamente, no teste do sobressalto potencializado pelo medo. $n = 6$ para todos os grupos nos testes do rotarod e do campo aberto.

7. DISCUSSÃO

O conhecimento do modo pelo qual algumas estruturas encefálicas participam da elaboração de um determinado comportamento defensivo pode contribuir para o nosso entendimento sobre o funcionamento dos circuitos neurais subjacentes aos distúrbios de ansiedade. Considerável progresso tem sido feito na identificação dos processos neurais que regulam as respostas neurobiológicas provocadas por estímulos aversivos ambientais, e há um crescente conjunto de evidências que sugere que a via dopaminérgica mesocorticolímbica é um componente essencial dos circuitos neurais subjacentes aos estados de medo (BIGGIO et al., 1990; CUADRA et al., 1999, 2000; ESPEJO, 1997; FEENSTRA et al., 1995; INOUE et al., 1996, 2000; MORROW et al., 1999; NABESHIMA et al., 1986). Em vista disso, este estudo consiste em uma tentativa de melhorar o nosso entendimento de como mecanismos dopaminérgicos da área tegmental ventral e do complexo basolateral da amígdala podem modular o medo condicionado.

Com o Experimento I buscamos entender até que ponto os mecanismos dopaminérgicos da ATV estão envolvidos na aquisição de informações aversivas e na expressão de respostas defensivas no medo condicionado à luz-CS. A potencialização do sobressalto produzida por uma luz-CS previamente pareada com choques nas patas não foi alterada em animais que receberam microinjeção na ATV de SKF 38393, SCH 23390, quimpirole ou sulpirida antes do condicionamento. Estes dados indicam que os receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ da ATV não estão envolvidos na aquisição do medo condicionado à luz. Este resultado estende para a ATV achados anteriores de nosso laboratório demonstrando que a administração sistêmica de drogas dopaminérgicas que atuam nesses receptores não afeta a aquisição do medo condicionado à luz-CS avaliada pelo teste do SPM (OLIVEIRA et al., 2006). Os dados atuais, entretanto, não podem ser generalizados para todos os modelos de medo condicionado. Na verdade, Nader e LeDoux (1999b) mostraram que a administração pré-treino intra-ATV de quimpirole atenuou a aquisição

do congelamento condicionado em um paradigma de condicionamento de segunda ordem usando sons como CS. Assim, os mecanismos neuroquímicos ativados nesses casos parecem depender do tipo de resposta condicionada avaliada ou do estímulo condicionado (CS) utilizado.

Dados recentes de nosso laboratório mostraram que injeções sistêmicas de quimpirole atenuaram a expressão do medo condicionado à luz-CS (OLIVEIRA et al., 2006). O presente estudo implica a ATV nesse efeito uma vez que a administração pré-teste de quimpirole na ATV também atenuou a potencialização do sobressalto produzida pela luz-CS previamente pareada com choques nas patas. Os animais mostraram resposta basal normal de sobressalto acústico (tentativas só-som) após a administração de quimpirole, indicando que a diminuição no SPM não foi associada a prejuízos no processamento sensorial. Além disso, a ação observada do quimpirole não pode ser atribuída a efeitos motores inespecíficos, uma vez que essa droga não afetou o desempenho motor dos animais nos testes do campo aberto e do rotarod. Estes achados estão de acordo com estudos de outros laboratórios mostrando resultados similares (BOROWSKI; KOKKINIDIS, 1996; MUNRO; KOKKINIDIS, 1997). Ao contrário, SKF 38393, SCH 23390 e sulpirida não produziram qualquer efeito sobre a expressão da aprendizagem associativa causada pelo pareamento de luz-CS com choques nas patas no paradigma do SPM. Tais resultados precisam, no entanto, ser interpretados com cautela uma vez que apenas uma dose de SKF 38393, SCH 23390 e sulpirida foi utilizada aqui e outras doses devem ser empregadas em outros estudos dessa natureza.

O quimpirole tem sido descrito como um agonista pleno para receptores D₂ (LEVANT et al., 1992; SEEMAN; SCHAUS, 1991). Estudo anterior mostrou que o quimpirole, administrado em doses que agem em receptores D₂ pós-sinápticos, aumenta a atividade locomotora e os comportamentos estereotipados, como lambar e cheirar (KURASHIMA et al., 1995). Esses efeitos não foram observados no presente estudo, provavelmente porque a dose de quimpirole usada aqui (1,0 µg/0,2 µL/sítio) foi menor do que aquelas usualmente empregadas para ativação de receptores dopaminérgicos pós-sinápticos (NADER; LEDOUX, 1999b). Na verdade, apesar

dos receptores D_2 poderem ser tanto pré quanto pós-sinápticos, tem sido relatado que os receptores pré-sinápticos são de 6 a 10 vezes mais sensíveis a agonistas dopaminérgicos do que os pós-sinápticos (SKIRBOLL et al., 1979). Além disso, foi sugerido que auto-receptores dopaminérgicos do tipo D_2 localizados em corpos celulares e dendritos de neurônios da ATV inibem tonicamente a atividade dopaminérgica (WHITE; WANG, 1984a,b). Com base nessas evidências, sugerimos que a capacidade aqui relatada do quimpirole em diminuir a resposta defensiva é o resultado de sua ação em receptores dopaminérgicos D_2 pré-sinápticos na ATV, que diminuem os níveis de dopamina nos terminais sinápticos de neurônios originados a partir desta área. Uma dose menor de quimpirole ($0,5 \mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}/\text{sítio}$) foi também testada em nosso estudo, mas não mostrou efeitos significativos no SPM. Doses maiores não foram utilizadas devido aos efeitos motores que poderiam provocar e, assim, mascarar os efeitos específicos sobre o comportamento emocional.

Nossos resultados indicam que uma diminuição na ativação de receptores dopaminérgicos pós-sinápticos em estruturas que recebem projeções da ATV pode ser o resultado final de uma sucessão de eventos iniciados pelo quimpirole na ATV, que termina com a redução do medo condicionado. Diversas áreas prosencefálicas implicadas no medo e ansiedade, como amígdala, núcleo accumbens e córtex pré-frontal, são inervadas por fibras dopaminérgicas originárias na ATV (OADES; HALLIDAY, 1987; SWANSON, 1982). Portanto, o papel dos neurônios dopaminérgicos da ATV no SPM provavelmente envolve as suas projeções mesocorticolímbicas. Tendo em vista os resultados do quimpirole, um aumento do SPM poderia ser esperado após a administração do antagonista de receptores D_2 sulpirida na ATV. Uma possível razão para a ausência de efeitos da sulpirida no SPM poderia ser o fato de que o controle exercido sobre o medo condicionado pelos neurônios dopaminérgicos da ATV depende da ativação de outros receptores aí localizados de forma que o bloqueio dos receptores D_2 não resulta em qualquer efeito. Por outro lado, microinjeções de SCH 23390 e/ou sulpirida, que bloqueiam receptores D_1 e D_2 , respectivamente, em algumas das regiões que recebem

projeções dopaminérgicas da ATV podem vir a ter um efeito similar ao relatado aqui com a microinjeção de quimpirole na ATV, hipótese esta testada (para o BLA) no Experimento IV do presente estudo e discutida a seguir.

De maneira geral, os resultados do Experimento I ressaltam a importância dos neurônios dopaminérgicos da ATV na modulação do condicionamento aversivo Pavloviano. Além da demonstração da importância dos mecanismos dopaminérgicos da ATV no medo condicionado causado pela associação de um estímulo inicialmente neutro (luz) com choques nas patas, nossos resultados também indicam que essa circuitaria neural está principalmente envolvida na expressão de estados de medo, e não na aquisição do medo condicionado.

Com intuito de dar mais um passo no estudo do envolvimento da neurotransmissão dopaminérgica no medo condicionado, analisamos no Experimento II os efeitos desse condicionamento sobre os níveis extracelulares de dopamina no BLA concomitantemente à avaliação da resposta de congelamento condicionado. Verificamos que após uma sessão de dez pareamentos de luz e choques nas patas, quando re-expostos à luz-CS 24 horas após o condicionamento, os animais congelam significativamente mais do que ratos não condicionados. Associado a isso, foi observado aumento significativo na concentração de dopamina no BLA durante a fase de expressão do medo condicionado à luz-CS. Nessas condições, o BLA parece ser um alvo importante da neurotransmissão dopaminérgica originada na ATV.

No Experimento III, foi avaliada a participação da ATV no congelamento condicionado e no aumento dos níveis de dopamina no BLA decorrentes da exposição de ratos à luz-CS. Observamos que mais uma vez ocorreu aumento significativo na concentração de dopamina no BLA durante a fase de expressão do medo condicionado à luz-CS. A administração de quimpirole na ATV diminuiu tanto o congelamento condicionado quanto o aumento de dopamina no BLA causados pela exposição dos animais à luz-CS. Assim, esses dados reforçam a noção de que projeções dopaminérgicas ATV/BLA devem ser ativadas na expressão do medo condicionado a luz-CS.

Uma vez que projeções dopaminérgicas ATV/BLA parecem envolvidas na expressão do medo condicionado, buscamos com o Experimento IV esclarecer a participação dos receptores D_1 e D_2 do BLA na expressão de respostas de medo condicionado à luz-CS. O SPM produzido por uma luz-CS previamente pareada com choques nas patas não foi alterado em animais que receberam microinjeções pré-teste no BLA de SCH 23390. As doses de SCH 23390 aqui empregadas foram selecionadas com base em estudos anteriores que mostraram que a infusão na amígdala de 2,0 μ g de SCH 23390 afetou o medo condicionado (GUARRACI et al., 1999a,b; MACEDO et al., 2007). Os dados do presente estudo indicam que os receptores D_1 do BLA não parecem estar envolvidos na expressão do SPM e corroboram achados anteriores de nosso laboratório demonstrando que a administração sistêmica de drogas dopaminérgicas que agem em receptores da subfamília D_1 não afeta o medo condicionado à luz-CS avaliado pelo teste do SPM (OLIVEIRA et al., 2006). Isto não quer dizer que uma droga dopaminérgica injetada sistemicamente não atue no sistema nervoso central e que ações antagônicas em duas ou mais estruturas não possa resultar em falta de efeito. Os nossos resultados mostram ausência de efeito do SCH 23390 injetado no BLA. Efeitos em outras regiões da amígdala não podem, no entanto, ser descartados. Lamont e Kokkinids (1998) mostraram que a administração de SCH 23390 na amígdala atenuou a expressão do SPM. Com base nos sítios de microinjeção e no volume de infusão de 1,0 μ L utilizado por esses autores, parece que o SCH 23390 naquele estudo quase certamente interagiu com receptores D_1 provavelmente no núcleo central da amígdala.

Por outro lado, microinjeções pré-teste de sulpirida no BLA inibiram de forma dose dependente o SPM produzido por uma luz-CS previamente pareada com choques nas patas. Os animais mostraram sobressalto acústico basal (só-som) normal após a administração de sulpirida, indicando que a diminuição do SPM não foi associada a prejuízos no processamento sensorial. Os resultados obtidos com a sulpirida também não podem ser atribuídos a efeitos inespecíficos, uma vez que esta mesma droga não afetou o desempenho motor dos animais nos testes do campo aberto e do rotarod. Técnicas de hibridização *in situ* já demonstraram que a amígdala apresenta

uma rica distribuição de receptores D₂ (MEADOR-WOODRUFF et al., 1991). A seletividade dos efeitos produzidos pelo antagonista D₂ sulpirida no presente estudo é também atestada pela ausência de efeitos da administração pré-teste no BLA do antagonista D₁, SCH 23390, no SPM. Estes achados salientam a importância dos receptores D₂ do BLA na mediação do condicionamento aversivo Pavloviano. Em outras palavras, os resultados da sulpirida sugerem que os receptores D₂ fazem parte dos mecanismos neuroquímicos no BLA subjacentes a esta resposta de medo condicionado. As injeções intra-BLA de sulpirida promoveram aqui efeitos similares àquele descrito anteriormente para microinjeções intra-ATV de quimpirole (Experimento I). Fazendo um paralelo entre as ações do quimpirole na ATV e da sulpirida no BLA podemos dizer que a capacidade do quimpirole em diminuir o SPM é resultado de sua ação em receptores D₂ pré-sinápticos na ATV que diminuem os níveis de dopamina em estruturas que recebem terminações nervosas dopaminérgicas originárias da ATV, dentre elas o BLA. Os presentes achados também indicam que a interferência com a capacidade do estímulo condicionado em ativar neurônios dopaminérgicos do BLA reduz o medo. Assim, o medo condicionado parece aumentar a neurotransmissão dopaminérgica no BLA. Esta hipótese é reforçada pelos dados da microdiálise que mostraram que uma luz-CS causa aumento dos níveis de DA no BLA de ratos previamente submetidos à apresentação pareada de luz e de choques nas patas (Experimento II), e que este aumento é inibido pela administração intra-ATV de quimpirole (Experimento III). Assim, o medo condicionado à luz-CS parece depender da ativação de conexões dopaminérgicas ATV/BLA e pode ser especificamente modulado por meio de manipulações deste sistema. O efeito da sulpirida, somado ao fato de que os receptores D₁ do BLA não parecem estar envolvidos na expressão do SPM, apóia a idéia de que os receptores D₂ do BLA regulam o medo condicionado.

Embora nossos resultados impliquem a via dopaminérgica ATV/BLA na expressão do medo, muito precisa ser feito para formar um quadro mais complexo das áreas que recebem projeções dopaminérgicas da ATV e que são também importantes na integração neural do medo

É importante ter em mente que diferenças metodológicas podem estar subjacentes a resultados conflitantes observados na literatura referente à investigação do envolvimento de sistemas dopaminérgicos no medo. Especificamente, manipulações farmacológicas do sistema dopaminérgico no dia do teste podem interferir com a resposta condicionada por meio de alterações do processamento do CS. No caso específico de nosso estudo essa possibilidade pode ser descartada dado que o quimpirole e a sulpirida não alteraram o processamento da luz como estímulo condicionado quando administrado antes da sessão treino. Outra fonte de erros pode advir do fato de que a maioria das manipulações dopaminérgicas causa alterações comportamentais incondicionadas. Dessa forma, tais alterações podem indiretamente competir com a expressão de respostas defensivas, levando à conclusão equivocada de que tais manipulações afetaram diretamente o medo. Contra essa possibilidade está a ausência de efeitos do quimpirole e da sulpirida sobre o desempenho motor dos animais avaliado no presente estudo pelos testes do campo aberto e do rotarod. Além disso, o quimpirole e a sulpirida não alteraram a resposta basal de sobressalto nas tentativas só-som do teste do SPM quando administrado antes da sessão teste.

Embora a via dopaminérgica mesolímbica seja mais comumente associada com os efeitos reforçadores de diversos estímulos, demonstramos aqui que projeções dopaminérgicas ATV/BLA são requeridas para o condicionamento aversivo clássico. Isso traz à tona a questão recorrente de como estímulos distintos são interpretados diferentemente como aversivos ou apetitivos. Não se pode descartar a possibilidade de que regiões específicas das áreas pertencentes à via mesolímbica respondam de forma diferente a eventos com distintos significados biológicos. Este, no entanto, pode não ser o caso, uma vez que a via mesolímbica

parece ser realmente uma via versátil, ativada por uma ampla gama de eventos salientes (HORVITZ, 2000). Uma interação entre a atividade dopaminérgica na via mesolímbica e outros sistemas mediados por outros neurotransmissores ou neurohormônios pode estar subjacente à resposta comportamental exibida pelos animais em função da condição em que se encontram, seja ela aversiva ou reforçadora. Assim, a ativação da via dopaminérgica ATV/BLA associada à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pode determinar os estados aversivos (SAPOLSKY, 2009).

De maneira geral, nossos achados são consistentes com a idéia de que manipulações de mecanismos dopaminérgicos da via mesolímbica diminuem o medo pois prejudicam a evocação da aprendizagem associativa aversiva (NADER; LEDOUX, 1999a,b). Ativação das funções atencional e cognitiva, por meio de mecanismos dopaminérgicos do sistema mesocorticolímbico, tem sido proposta como necessária para elaboração de respostas adaptativas objetivando lidar com ou sinalizar a presença de estímulos de natureza aversiva. Nossos achados podem ter implicações clínicas na medida em que destacam onde e como mecanismos dopaminérgicos mediados por receptores D_2 participam decisivamente na expressão do medo condicionado. Os resultados obtidos no Experimento I revelaram a importância dos neurônios dopaminérgicos da ATV na expressão do medo condicionado; já os resultados do Experimento IV com a sulpirida sugerem que, por meio de receptores D_2 , a dopamina interage com os mecanismos neurais do BLA que são ativados pelo medo condicionado. Assim, a expressão do medo condicionado parece envolver a ativação de mecanismos dopaminérgicos da ATV com conseqüente aumento da neurotransmissão dopaminérgica no BLA. Ambos os mecanismos – na ATV e no BLA – são mediados por receptores D_2 .

8. CONCLUSÕES

- Mecanismos dopaminérgicos da área tegmental ventral estão principalmente envolvidos na expressão, mas não na aquisição, do medo condicionado à luz-CS;
- A expressão do medo condicionado à luz-CS está associada a um aumento significativo nas concentrações extracelulares de dopamina no complexo basolateral da amígdala;
- O aumento na neurotransmissão dopaminérgica no complexo basolateral da amígdala no medo condicionado é dependente da atividade de neurônios da área tegmental ventral;
- Receptores D₂ do complexo basolateral da amígdala, mas não receptores D₁, modulam a expressão do sobressalto potencializado pelo medo causado pela associação luz/choques nas patas;
- A expressão do medo condicionado à luz-CS depende da ativação de conexões dopaminérgicas área tegmental ventral/complexo basolateral da amígdala e pode ser especificamente modulada por meio de manipulações deste sistema.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANESE, A.; MINCIACCHI, D. Organization of the ascending projections from the ventral tegmental area: a multiple fluorescent retrograde tracer study in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 216, p. 406-420, 1983.

AVANZI, V.; BRANDÃO, M.L. Activation of somatodendritic 5-HT_{1A} auto-receptors in the median raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. **Behavioral Brain Research**, v. 126, p. 175-184, 2001.

AVANZI, V.; SILVA, R.C.B.; MACEDO, C.E.; BRANDÃO, M.L. 5-HT mechanisms of median raphe nucleus in the conditioned freezing caused by light/foot-shock association. **Physiology & Behavior**, v. 78, p. 471-477, 2003.

BERG, W.K.; DAVIS, M. Diazepam blocks fear-enhanced startle elicited electrically from the brainstem. **Physiology & Behavior**, v. 32, p. 333-336, 1984.

BHATTACHARYA, B.K.; FELDBERG, W. Perfusion of cerebral ventricles: effects of drugs on outflow from the cistern and the aqueduct. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 13, p. 156-162, 1958a.

BHATTACHARYA, B.K.; FELDBERG, W. Perfusion of cerebral ventricles: assay of pharmacologically active substances in the effluent from the cisterna and the aqueduct. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 13, p. 163-174, 1958b.

BIGGIO, G.; CONCAS, A.; CORDA, M.G.; GIORGI, O.; SANNA, E.; SERRA, E. GABAergic and dopaminergic transmission in the rat cerebral cortex: effects of stress, anxiolytic and anxiogenic drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 48, p. 121-142, 1990.

BOLLES, R.C.; COLLIER, A.C. The effect of predictive cues on freezing in rats. **Animal Learning and Behavior**, v. 4, p. 6-8, 1976.

BORELLI, K.G.; GÁRGARO, A.C.; SANTOS, J.M.; BRANDÃO, M.L. Effects of inactivation of serotonergic neurons of the median raphe nucleus on learning and performance of contextual fear conditioning. **Neuroscience Letters**, v. 387, p. 105-110, 2005.

BOROWSKI, T.B.; KOKKINIDIS, L. Contribution of ventral tegmental area dopamine neurons to expression of conditional fear: effects of electrical stimulation, excitotoxin lesions, and quinpirole infusion on potentiated startle in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 110, p. 1349-1364, 1996.

BOROWSKI, T.B.; KOKKINIDIS, L. The effects of cocaine, amphetamine, and the dopamine D1 receptor agonist SKF 38393 on fear extinction as measured with potentiated startle: implications for psychomotor stimulant psychosis. **Behavioral Neuroscience**, v. 112, p. 952-965, 1998.

BOURNE, J.A. Intracerebral microdialysis: 30 years as a tool for the neuroscientist. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 30, p. 16-24, 2003.

BRANDÃO, M.L.; CARDOSO, S.H.; MELO, L.L.; MOTTA, V.; COIMBRA, N.C. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neuroscience and Biobehavioural Reviews**, v. 18, p. 339-346, 1994.

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

BRANDÃO, M.L.; TRONCOSO, A.C.; SILVA, M.A.S.; HUSTON, J.P. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 225-233, 2003.

BRANDÃO, M.L. **As Bases Biológicas do Comportamento: Introdução à neurociência**. Livro eletrônico-CNPq www.cnpq.br, 2008.

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. 188, p. 1-13, 2008.

BRINLEY-REED, M.; MCDONALD, A.J. Evidence that dopaminergic axons provide a dense innervation of specific neuronal subpopulation in the rat basolateral amygdala. **Brain Research**, v. 850, p. 127-135, 1999.

BRODKIN, J.; BUSSE, C.; SUKOFF, S.J.; VARNEY, M.A. Anxiolytic-like activity of the mGluR5 antagonist MPEP. A comparison with diazepam and buspirone. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 73, p. 359-366, 2002.

BROWN, J.S.; KALISH, H.I.; FARBER, I.E. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. **Journal of Experimental Psychology**, v. 41, p. 317-328, 1951.

CALLIER, S.; SNAPYAN, M.; CROM, S.; PROU, D.; VICENT, J.; VERNIER, P. Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. **Biology of the Cell**, v. 95, p. 489-502, 2003.

CARLSSON, A.; WALDECK, B. A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine). **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 44, p. 293-298, 1958.

CUADRA, G.; ZURITA, A.; LACERRA, C.; MOLINA, V. Chronic stress sensitizes frontal cortex dopamine release in response to a subsequent novel stressor: reversal by naloxone. **Brain Research Bulletin**, v. 48, p. 303-308, 1999.

CUADRA, G.; ZURITA, A.; MACEDO, C.E.; MOLINA, V.A.; BRANDÃO, M.L. Electrical stimulation of the midbrain tectum enhances dopamine release in the frontal cortex. **Brain Research Bulletin**, v. 52, p. 413-418, 2000.

DAMIER, P.; HIRSCH, E.C.; AGID, Y.; GRAYBIEL, A.M. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. **Brain**, v. 122, p. 1437-1448, 1999.

DARWIN, C. **The expression of the emotions in man and animals**. 1st. Edition. London: John Murray, 1872.

DAVIS, M. Effects of interstimulus interval length and variability on startle-response habituation in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 72, p. 177-192, 1970.

DAVIS, M. Diazepam and flurazepam: effects on conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. **Psychopharmacology**, v. 62, p. 1-7, 1979.

DAVIS, M. Animal models of anxiety based on classical conditioning: the conditioned emotional response (CER) and the fear-potentiated startle effect. **Pharmacology Therapy**, v. 47, p. 147-165, 1990.

DAVIS, M.; HITCHCOCK, J.M.; ROSEN, J.B. Neural mechanisms of fear conditioning measured with the acoustic startle reflex. In: MADDEN, J. **Neurobiology of Learning, Emotion and Affect**. New York: Raven Press, 1991. p. 67-95.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, p. 35-41, 1992.

DAVIS, M. Pharmacological analysis of fear-potentiated startle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 26, p. 235-260, 1993.

DAVIS, M.; FALLS, W.A.; CAMPEAU, S.; KIM, M. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. **Behavioural Brain Research**, v. 58, p. 175-198, 1993.

DAVIS, M.; WALKER, D.L.; LEE, Y. Roles of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 821, p. 305-331, 1997.

DELGADO, J.M.R.; DEFEUDIS, F.V.; ROTH, R.H.; RYUGO, D.K.; MITRUKA, B.M. Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 198, p. 9-21, 1972.

DEUTCH, A.Y.; TAM, S.Y.; ROTH, R.H. Footshock and conditioned stress increase 3, 4 dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in the ventral tegmental area but not the substantia nigra. **Brain Research**, v. 333, p. 143-146, 1985.

ELSWORTH, J.D.; ROTH, R.H. Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 144, p. 4-9, 1997.

EMMI, A.; CRESCIMANNO, G.; AMATO, G. Modifications of head turning and circling movement following sulpiride microinjections into nucleus accumbens in the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 38, p. 99-103, 1995.

ESPEJO, E.F. Selective dopamine depletion within the medial prefrontal cortex induces anxiogenic-like effects in rats placed on the elevated plus maze. **Brain Research**, v. 762, p. 281-284, 1997.

FANSELOW, M.S.; BOLLES, R.C. Triggering of the endorphin analgesic reaction by a cue previously associated with shock: reserval by naloxone. **Bulletin of Psychonomic Society**, v. 14, p. 88-90, 1979.

FANSELOW, M.S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**. New York: Plenum Press, 1991. p. 151-173.

FANSELOW, M.S.; LEDOUX, J.E. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. **Neuron**, v. 23, p. 229-232, 1999.

FEENSTRA, M.G.P.; BOTTERBLOM, M.H.A.; VAN UUM, J.F.M. Novelty-induced increase in dopamine release in the rat prefrontal cortex in vivo: inhibition by diazepam. **Neuroscience Letters**, v. 189, p. 81-84, 1995.

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

FILLENZ, M. In vivo neurochemical monitoring and the study of behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 949-962, 2005.

FINLAY, J.M.; ZIGMOND, M.J.; ABERCROMBIE, E.D. Increased dopamine and norepinephrine release in medial prefrontal cortex induced by acute and chronic stress: effects of diazepam. **Neuroscience**, v. 64, p. 619-628, 1995.

FLESHLER, M. Adequate acoustic stimulus for startle reaction in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 60, p. 200-207, 1965.

GARCIA, A.M.B.; MARTINEZ, R.; BRANDÃO, M.L.; MORATO, S. Effects of apomorphine on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiology & Behavior**, v. 85, p. 440-447, 2005.

GARDNER, E.L.; ASHBY JR, C.R. Heterogeneity of the mesotelencephalic dopamine fibers: physiology and pharmacology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, p. 115-118, 2000.

GOLDSTEIN, M.; DEUTCH, A.Y. Dopaminergic mechanisms in the pathogenesis of schizophrenia. **The FASEB Journal**, v. 6, p. 2413-2421, 1992.

GOLDSTEIN, L.E.; RASMUSSEN, A.M.; BUNNEY, B.S.; ROTH, R.H. Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 4787-4798, 1996.

GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L. **Neurobiologia das Doenças Mentais**. 4^a. Edição. São Paulo: Editora Lemos, 1999.

GREBA, Q.; KOKKINIDIS, L. Peripheral and intraamygdalar administration of the dopamine D₁ receptor antagonist SCH 23390 blocks fear-potentiated startle but not shock reactivity or the shock sensitization of acoustic startle. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, p. 262-272, 2000.

GREBA, Q.; GIFKINS, A.; KOKKINIDIS, L. Inhibition of amygdaloid dopamine D₂ receptors impairs emotional learning measured with fear-potentiated startle. **Brain Research**, v. 899, p. 218-226, 2001.

GUARRACI, F.A.; KAPP, B.S. An electrophysiological characterization of ventral tegmental area dopaminergic neurons during differential pavlovian fear conditioning in the awake rabbit. **Behavioural Brain Research**, v. 99, p. 169-179, 1999.

GUARRACI, F.A.; FROHARDT, R.J.; KAPP, B.S. Amygdaloid D₁ dopamine receptor involvement in Pavlovian fear conditioning. **Brain Research**, v. 827, p. 28-40, 1999a.

GUARRACI, F.A.; FROHARDT, R.J.; YANG, S.L.; KAPP, B.S. A functional role for dopamine transmission in the amygdala during conditioned fear. **Annual New York Academic of Sciences**, v. 877, p. 732-736, 1999b.

GUARRACI, F.A.; FROHARDT, R.J.; FALLS, W.A.; KAPP, B.S. The effects of intra-amygdaloid infusions of a D₂ dopamine receptor antagonist on Pavlovian fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, p. 647-651, 2000.

HOFER, M.A. Cardiac and respiratory function during sudden prolonged immobility in wild rodents. **Psychonomic Medicine**, v. 32, p. 633-647, 1970.

HORVITZ, J.C. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. **Neuroscience**, v. 96, p. 651-656, 2000.

HYTELL, J. SCH 23390-the first selective D₁ antagonist. **European Journal of Pharmacology**, v. 91, p. 153-154, 1983.

INGLIS, F.M.; MOGHADDAM, B. Dopaminergic innervation of the amygdala is highly responsive to stress. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, p. 1088-1094, 1999.

INOUE, T.; TSUCHIYA, K.; KOYAMA, T. Effects of typical and atypical antipsychotic drugs on freezing behavior induced by conditioned fear. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**, v. 55, p. 195-201, 1996.

INOUE, T.; IZUMI, T.; MAKI, Y.; MURAKI, I.; KOYAMA, T. Effect of the dopamine D_{1/5} antagonist SCH 23390 on the acquisition of conditioned fear. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 66, p. 573-578, 2000.

KAMEI, H.; KAMEYAMA, T.; NABESHIMA, T. Activation of both dopamine D₁ and D₂ receptors necessary for amelioration of conditioned fear stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 273, p. 229-233, 1995.

KEBABIAN, J.W.; CALNE, D.B. Multiple receptors for dopamine. **Nature**, v. 277, p. 93-96, 1979.

KOCK, M. The neurobiology of startle. **Progress in Neurobiology**, v. 59, p. 107-128, 1999.

KRETTEK, J.E.; PRICE, J.L. Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 178, p. 225-254, 1978.

KRIEGER, J.E.; GRAEFF, F.G. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 18, p. 61-67, 1985.

KURASHIMA, M.; YAMADA, K.; NAGASHIMA, M.; SHIRAKAWA, K.; FURUKAWA, T. Effects of putative dopamine D3 receptor agonists, 7-OH-DPAT, and quinpirole, on yawning, stereotypy, and body temperature in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 52, p. 503-508, 1995.

LAMONT, E.W.; KOKKINIDIS, L. Infusion of the dopamine D₁ receptor antagonist SCH 23390 into the amygdala blocks fear expression in a potentiated startle paradigm. **Brain Research**, v. 795, p. 128-136, 1998.

LEDOUX, J.E.; IWATA, J.; CICCHETTI, P.; REIS, D.J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **The Journal of Neuroscience**, v. 8, p. 2517-2529, 1988.

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

LEDOUX, J.E. The emotional brain, fear, and the amygdala. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 23, p. 727-738, 2003.

LEVANT, B.; GRIGORIADIS, D.E.; DESOUZA, E.B. Characterization of [3H]quinpirole binding to D2-like dopamine receptors in rat brain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 262, p. 929-935, 1992.

LEVEY, A.I.; HERSCH, S.M.; RYE, D.B.; SUNAHARA, R.K.; NIZNIK, H.B.; KITT, C.A.; PRICE, D.L.; MAGGIO, R.; BRANN, M.R.; CILIAK, B.J. Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 8861-8865, 1993.

LI, Y.; FANG, F.; WANG, X.; LEI, H. Neuronal projections from ventral tegmental area to forebrain structures in rat studied by manganese-enhanced magnetic resonance imaging. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 27, p. 293-299, 2009.

MACEDO, C.E.; CUADRA, G.; MOLINA, V.; BRANDÃO, M.L. Aversive stimulation of the inferior colliculus changes dopamine and serotonin extracellular levels in the frontal cortex: modulation by the basolateral nucleus of amygdala. **Synapse**, v. 55, p. 58-66, 2005a.

MACEDO, C.E.; MARTINEZ, R.C.R.; SILVA, M.A.S.; BRANDÃO, M.L. Increases in extracellular levels of 5-HT and dopamine in the basolateral, but not the central, nucleus of amygdala induced by aversive stimulation of the inferior colliculus. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 1131-1138, 2005b.

MACEDO, C.E.; MARTINEZ, R.C.; ALBRECHET-SOUZA, L.; MOLINA, V.A.; BRANDÃO, M.L. 5-HT₂- and D₁-mechanisms of the basolateral nucleus of the amygdala enhance conditioned fear and impair unconditioned fear. **Behavioural Brain Research**, v. 177, p. 100-108, 2007.

MAREN, S.; FANSELOW, M.S. The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? **Neuron**, v. 16, p. 237-240, 1996.

MAREN, S. Auditory fear conditioning increases CS-elicited spike firing in lateral amygdala neurons even after extensive overtraining. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 4047-4054, 2000.

MARTINEZ, R.C.R.; OLIVEIRA, A.R.; MACEDO, C.E.; MOLINA, V.A.; BRANDÃO, M.L. Involvement of dopaminergic mechanisms in the nucleus accumbens core and shell subregions in the expression of fear conditioning. **Neuroscience Letters**, v. 446, p. 112-116, 2008.

MEADOR-WOODRUFF, J.H.; MANSOUR, A.; HEALY, D.J.; KUEHN, R.; ZHOU, Q.Y.; BUNZOW, J.R.; AKIL, H.; CIVELLI, O.; WATSON, S.J. Comparison of the distributions of D₁ and D₂ dopamine receptor mRNAs in rat brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 5, p. 231-242, 1991.

MELO, L.L.; CARDOSO, S.H.; BRANDÃO, M.L. Antiaversive action of benzodiazepines on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Physiology & Behavior**, v. 51, p. 557-562, 1992.

MILLAN, M.J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress in Neurobiology**, v. 70, p. 83-244, 2003.

MIRANDA, M.I. Changes in neurotransmitter extracellular levels during memory formation. In: BERMÚDEZ-RATTONI, F. **Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging**. Boca Raton (FL): CRC Press, 2007. p. 129-155.

MISSALE, C.; NASH, S.R.; ROBINSON, S.W.; JABER, M.; CARON, M.G. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiological Reviews**, v. 78, p. 189-225, 1998.

MONSMA, F.J.; MAHAN, L.C.; McVITTIE, L.D.; GERFEN, C.R.; SIBLEY, D.R. Molecular cloning and expression of a D₁ dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 6723-6727, 1990.

MOORE, R.Y.; BLOOM, F.E. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. **Annual Reviews of Neuroscience**, v. 1, p. 126-169, 1978.

MORROW, B.A.; ELSWORTH, J.D.; RASMUSSEN, A.M.; ROTH, R.H. The role of mesoprefrontal dopamine neurons in the acquisition and expression of conditioned fear in the rat. **Neuroscience**, v. 92, p. 553-564, 1999.

MUNRO, L.J.; KOKKINIDIS, L. Infusion of quinpirole and muscimol into the ventral tegmental area inhibits fear-potentiated startle: implications for the role of dopamine in fear expression. **Brain Research**, v. 746, p. 231-238, 1997.

NABESHIMA, T.A.; KATOH, M.; HIRAMATSU, M.; KAMEYAMA, T. A role played by dopamine and opioid neuronal systems in stress-induced motor suppression (conditioned suppression of motility) in mice. **Brain Research**, v. 398, p. 354-360, 1986.

NADER, K.; LEDOUX, J.E. The dopaminergic modulation of fear: quinpirole impairs the recall of emotional memories in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 113, p. 152-165, 1999a.

NADER, K.; LEDOUX, J.E. Inhibition of the mesoamygdala dopaminergic pathway impairs the retrieval of conditioned fear associations. **Behavioral Neuroscience**, v. 113, p. 891-901, 1999b.

OADES, R.D.; HALLIDAY, G.M. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. **Brain Research**, v. 434, p. 117-65, 1987.

OLIVEIRA, A.R.; REIMER, A.E.; BRANDÃO, M.L. Dopamine D2 receptor mechanisms in the expression of conditioned fear. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 84, p. 102-111, 2006.

ÖZER, H.; EKINCI, A.C.; STARR, M.S. Dopamine D1- and D2-dependent catalepsy in the rat requires functional NMDA receptors in the corpus striatum, nucleus accumbens and substantia nigra pars reticulata. **Brain Research**, v. 777, p. 51-59, 1997.

PARÉ, D.; QUIRK, G.J.; LEDOUX, J.E. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. **Journal of Neurophysiology**, v. 92, p. 1-9, 2004.

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

PEZZE, M.A.; FELDON, J. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. **Progress in Neurobiology**, v.74, p. 301-320, 2004.

PILZ, P.K.; SCHNITZLER, H.U.; MENNE, D. Acoustic startle threshold of the albino rat (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 101, p. 67-72, 1987.

PITKÄNEN, A.; SAVANDER, V.; LEDOUX, J.E. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. **Trends in Neurosciences**, v. 20, p. 517-523, 1997.

PLAPPERT, C.F.; PILZ, P.K.D.; SCHNITZLER, H. Acoustic startle response and habituation in freezing and nonfreezing rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 107, p. 981-987, 1993.

PLOCK, N.; KLOFT, C. Microdialysis – theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 25, p. 1-24, 2005.

REIMER, A.E.; OLIVEIRA, A.R.; BRANDÃO, M.L. Selective involvement of GABAergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray and inferior colliculus on the memory of the contextual fear as assessed by the fear potentiated startle test. **Brain Research Bulletin**, v. 76, p. 545-550, 2008.

REIMER, A.E.; OLIVEIRA, A.R.; BRANDÃO, M.L. Involvement of GABAergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray and inferior colliculus on unconditioned fear. **Psychology & Neuroscience**, v. 2, p. 51-58, 2009.

REIS, F.L.V.; MASSON, S.; OLIVEIRA, A.R.; BRANDÃO, M.L. Dopaminergic mechanisms in the conditioned and unconditioned fear as assessed by the two-way avoidance and light switch-off tests. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 79, p. 359-365, 2004.

RODGERS, R.J.; NIKULINA, E.M.; COLE, J.C. Dopamine D₁ and D₂ receptor ligands modulate the behaviour of mice in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, p. 985-995, 1994.

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

SANTOS, J.M.; MARTINEZ, R.C.R.; BRANDÃO, M.L. Effects of acute and subchronic treatments with fluoxetine and desipramine on the memory of fear in moderate and high-intensity contextual conditioning. **European Journal of Pharmacology**, v. 542, p. 121-128, 2006.

SAPOLSKY, R. Any kind of mother in a storm. **Nature Neuroscience**, v. 12, p. 1355-1356, 2009.

SEEMAN, P.; SCHAUS, J.M. Dopamine receptors labelled by [3H]quinpirole. **European Journal of Pharmacology**, v. 203, p. 105-109, 1991.

SIBLEY, D.R.; MONSMA, F.J. Molecular biology of dopamine receptors. **Trends in Psychological Sciences**, v. 13, p. 61-69, 1992.

SILVA, R.C.B.; CRUZ, A.P.M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; AVANZI, V.; BRANDÃO, M.L. Distinct contributions of median raphe nucleus to contextual fear conditioning and fear potentiated startle. **Neural Plasticity**, v. 9, p. 233-247, 2002.

SILVA, R.C.B.; GÁRGARO, A.C.; BRANDÃO, M.L. Differential regulation of the expression of contextual freezing and fear-potentiated startle by 5-HT mechanisms of the median raphe nucleus. **Behavioural Brain Research**, v. 151, p. 93-101, 2004.

SIMON, H.; MOAL, M.; CALAS, A. Efferents and afferents of the ventral tegmental-A10 region studied after local injection of [3H]leucine and horseradish peroxidase. **Brain Research**, v. 178, p. 17-40, 1979.

SKIRBOLL, L.R.; GRACE, A.A.; BUNNEY, B.S. Dopamine auto and postsynaptic receptors: electrophysiological evidence for differential sensitivity to dopamine agonists. **Science**, v. 206, p. 80-82, 1979.

STANDISH-BARRY, H.M.A.S.; BOURAS, N.; BRIDGES, P.K.; WATSON, J.P. A randomized double blind group comparative study of sulpiride and amtryptiline in affective disorders. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 81, p. 258-260, 1983.

STEVENS, J.R.; LIVERMORE, A. Kindling of the mesolimbic dopamine system: animal model of psychosis. **Neurology**, v. 28, p. 36-46, 1978.

SWANSON, L.W. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 9, p. 321-353, 1982.

UNGERSTEDT, U.; PYCOCK, C. Functional correlates of dopamine neurotransmission. **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften**, v. 30, p. 44-55, 1974.

VALLONE, D.; PICETTI, R.; BORRELLI, E. Structure and function of dopamine receptors. **Neuroscience and Biobehavioural Reviews**, v. 24, p. 125-132, 2000.

VOLKOW, N.D.; FOWLER, J.S.; WANG, G.; GOLDSTEIN, R.Z. Role of dopamine, the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 78, p. 610-624, 2002.

WALLACE, D.M.; MAGNUSON, D.J.; GRAY, T.S. Organization of amygdaloid projections to brainstem dopaminergic, noradrenergic, and adrenergic cell groups in the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 28, p. 447-454, 1992.

WHITE, F.J. & WANG, R.Y. Differential effects of classical and atypical antipsychotic drugs on A9 and A10 dopamine neurons. **Science**, v. 221, p. 1054-1057, 1984a.

WHITE, F.J. & WANG, R.Y. Pharmacological characterization of dopamine autoreceptors in the rat ventral tegmental area: microiontophoretic studies. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 231, p. 275-280, 1984b.

WISE, R.A. Roles for nigrostriatal – not just mesocorticolimbic – dopamine in reward and addiction. **Trends in Neurosciences**, v. 32, p. 517-524, 2009.

YEOMANS, J.S.; FRANKLAND, P.W. The acoustic startle reflex: neurons and connections. **Brain Research Reviews**, v. 21, p. 301-314, 1996.

YOUNG, A.M.J.; REES, K.R. Dopamine release in the amygdaloid complex of the rat, studied by brain microdialysis. **Neuroscience Letters**, v. 249, p. 49-52, 1998.

ZANOVELI, J.M.; CARVALHO, M.C.; CUNHA, J.M.; BRANDÃO, M.L. Extracellular serotonin level in the basolateral nucleus of the amygdala and dorsal periaqueductal gray under unconditioned and conditioned fear states: a in vivo microdialysis study. **Brain Research**, v. 1294, p. 106-115, 2009.

Os dados do Experimento I, referentes ao efeito da administração de quimpirole (agonista D₂) na área tegmental ventral sobre a aquisição e expressão do medo condicionado à luz avaliado pelo teste de sobressalto potencializado pelo medo (Figura 9A), foram também analisados utilizando-se uma análise de variância (ANOVA) de três vias, onde o fator 1 referiu-se ao *pré-tratamento* (salina × quimpirole, antes da sessão de condicionamento), o fator 2 ao *tratamento* (salina × quimpirole, antes da sessão teste), e o fator 3 à *condição* (só-som × luz-som). Após a análise de variância seguiu-se, no caso de significância estatística, o teste de *Newman-Keuls*. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo.

A ANOVA de três vias revelou efeito significativo nos fatores *tratamento*, $F_{(1,112)} = 23,60$; $p < 0,05$ e *condição*, $F_{(1,112)} = 16,03$; $p < 0,05$. A mesma análise não revelou efeito significativo para o fator *pré-tratamento* $F_{(1,112)} = 0,68$; $p > 0,05$. Não houve interação significativa entre os fatores (*pré-tratamento* × *tratamento*, $F_{(1,112)} = 0,02$, $p > 0,05$; *pré-tratamento* × *condição*, $F_{(1,112)} = 0,000085$, $p > 0,05$; *tratamento* × *condição*, $F_{(1,112)} = 1,61$, $p > 0,05$; *pré-tratamento* × *tratamento* × *condição*, $F_{(1,112)} = 0,03$; $p > 0,05$). A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a luz potencializou a resposta de sobressalto ao som em todos os grupos (só-som × luz-som), $p < 0,05$. A mesma análise revelou que a amplitude do sobressalto dos animais que receberam quimpirole antes do teste (SAL/QUI e QUI/QUI) foi menor do que aquela dos animais que receberam salina (SAL/SAL e QUI/SAL), $p < 0,05$. Em razão disso, decidimos usar a ANOVA de duas vias com medidas repetidas na *condição* que se mostrou mais apropriada para o desenho experimental deste estudo. Efetivamente, a ANOVA de três vias não contempla a repetição do som (com e sem luz) ao longo da sessão teste.



Research report

Role of dopamine receptors in the ventral tegmental area in conditioned fear

Amanda Ribeiro de Oliveira^{a,b}, Adriano Edgar Reimer^{a,b}, Marcus Lira Brandão^{a,b,*}^a Laboratório de Psicobiologia, FFCLRP - USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil^b Instituto de Neurociências & Comportamento - INeC, Campus USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 November 2008

Received in revised form

29 November 2008

Accepted 2 December 2008

Available online 7 December 2008

Keywords:

Ventral tegmental area

Fear potentiated startle

SKF 38393

SCH 23390

Quinpirole

Sulpiride

ABSTRACT

The increased startle reflex in the presence of a stimulus that has been previously paired with footshock has been termed fear-potentiated startle (FPS) and is considered a reliable index of anxiety. Some studies have suggested an association between stressful situations and alterations in dopaminergic (DA) transmission. Many studies converge on the hypothesis that the mesocorticolimbic pathway, originating from DA neurons in the ventral tegmental area (VTA), is particularly sensitive to fear-arousing stimuli. The present study explored the involvement of VTA DA receptors in the acquisition and expression of conditioned fear to a light conditioned stimulus (CS). We evaluated the effects of intra-VTA administration of SKF 38393 (D₁ agonist), SCH 23390 (D₁ antagonist), quinpirole (D₂ agonist), and sulpiride (D₂ antagonist) on FPS. All drugs were administered bilaterally into the VTA (1.0 μg/0.2 μl/site). Locomotor activity/exploration and motor coordination were evaluated in the open-field and rotarod tests. None of the drugs produced significant effects on FPS when injected before conditioning, indicating that VTA DA receptors are not involved in the acquisition of conditioned fear to a light-CS. In contrast, when injected before the test session, quinpirole significantly reduced FPS, whereas the other drugs had no effect. Quinpirole's ability to decrease FPS may be the result of an action on VTA D₂ presynaptic autoreceptors that decrease dopamine levels in terminal fields of the mesocorticolimbic pathway. Altogether, the present results suggest the importance of VTA DA neurons in the fear-activating effects of Pavlovian conditioning. In addition to demonstrating the importance of dopaminergic mechanisms in the motivational consequences of footshock, the present findings also indicate that these neural circuits are mainly involved in the expression, rather than acquisition, of conditioned fear.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

A sudden and unexpected burst of noise triggers a whole-body response consisting of skeletal muscle contraction known as the acoustic startle reflex [13,26]. The biological functions of acoustic startle are determined by the reduction of the latency of a flight reaction and/or protection from a predator's attack from behind by contraction of the dorsal neck muscles [13,26,39,52]. When the startle-inducing noise occurs in the presence of a conditioned stimulus (CS) that has been paired with an aversive unconditioned stimulus (US), for example a footshock, the startle response is enhanced. This increase in the startle reflex is taken as an index of fear and is termed fear-potentiated startle (FPS) [8]. FPS is sensitive to the anxiolytic action of benzodiazepines and has been considered a model of generalized anxiety disorder [2,35,40,43,49,52].

Although considerable work has been done relating specific circuits of the brain to fear conditioning, less is known about its regulation by neuromodulators, the understanding of which

would be therapeutically relevant for fear-related diseases [5–7,30]. Dopamine (DA) is one of the neuromodulators most active on the mechanisms underlying states of fear and anxiety. The association between changes in DA transmission and threatening challenges has been demonstrated by numerous reports. Dopaminergic mechanisms have been related to the production and elaboration of acute and chronic stress [12]. In fact, alterations in DA transmission always occur following exposure to a wide variety of acute stressors [1,17]. Additionally, recent evidence suggests that dopaminergic mechanisms are significant for different aspects of affective memory, namely its formation, expression, and retrieval [38].

The aforementioned findings could be taken as evidence for a secondary involvement of DA in fear-like states elicited by acute aversive stimuli. However, behavioral studies aimed at assessing the involvement of DA in anxiety have reported anxiolytic-like, anxiogenic-like, and lack of effects with the use of dopaminergic agonists and antagonists in animal models of anxiety [9,15,18,23,35,41,42]. These effects have been shown to depend on the nature of the aversive stimulus (i.e., the signal of the dopaminergic mechanism modulating defensive behavior will depend on the type of emotional stimuli triggering the coping reaction).

* Corresponding author. Fax: +55 16 3602 4830.

E-mail address: mbrandao@usp.br (M.L. Brandão).

Moreover, a growing body of evidence supports the hypothesis that excitation of the mesocorticolimbic pathway, originating from DA neurons in the ventral tegmental area (VTA), is particularly sensitive to fear-arousing environmental stimuli and may be important for the development of exaggerated fear responding [10,19–21]. VTA neurons likely modulate fear and anxiety through their ascending projections. In fact, electrical stimulation of the VTA potentiates the acoustic startle reflex, and posttraining neurotoxic VTA lesion blocks FPS [3].

Although at least five DA receptor subtypes are now recognized [30,48], the initial identification of D₁ and D₂ receptors [25] provided the major impetus to define specific functional roles for DA receptor subtypes. In a recent study using systemic injections of DA agonists and antagonists, we showed that D₂ receptors are involved in the expression, but not acquisition, of conditioned fear to a light-CS [35]. To further examine the dopaminergic mediation of aversive states, the present study evaluated the involvement of VTA DA receptors in the acquisition and expression of conditioned fear using the FPS test. This pharmacological assessment was performed with intra-VTA administration of the D₁ agonist SKF 38393 [4,24,42], the D₁ antagonist SCH 23390 [14,18,22,36], the D₂ agonist quinpirole [28,44], and the D₂ antagonist sulpiride [21,46,50,51].

2. Materials and methods

2.1. Animals

Two hundred twenty-one naive male Wistar rats from the animal house of the Campus of Ribeirão Preto, University of São Paulo, were used. The animals, weighing 250–270 g each, were housed in groups of five per cage, under a 12 h:12 h dark/light cycle (lights on at 07:00 h) at 23 ± 1 °C, and given free access to food and water. The experiments were carried out during the light phase of the cycle and were performed in compliance with the recommendations of the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior and were in accordance with the United States National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

2.2. Surgery

Animals were anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg, i.p.) and fixed in a stereotaxic frame (David Kopf, Tujunga, CA). The upper incisor bar was set 2.5 mm below the interaural line, such that the skull was horizontal between bregma and lambda. Bilateral guide cannulae, through which an injection needle could be inserted for drug applications, were stereotaxically implanted over the VTA. Taking bregma as the reference point, the following coordinates were used: anterior/posterior –5.8 mm, medial/lateral ±0.8 mm, dorsal/ventral –7.6 mm [37]. The guide cannulae terminated 1 mm above the target area in the VTA. The cannulae were fixed to the skull with acrylic resin and two stainless steel screws. At the end of surgery, each guide cannula was sealed with a stainless steel wire to protect it from blockage. In addition, the animals received an intramuscular injection of penicillin G benzathine (Pentabiotic, 600,000 IU, 0.2 mL; Fort Dodge, Brazil). Afterward, the rats were allowed 5 days to recover from the surgical procedure. Each animal was subjected to only one of the tests described below.

2.3. Apparatus and procedure

2.3.1. Fear-potentiated startle

Matching: To record the amplitude of the acoustic startle response, two separate stabilimeter devices were used simultaneously. The rats were placed into a stabilimeter consisting of a wire mesh cage (16.5 cm × 7.5 cm × 7.5 cm) suspended within a polyvinyl chloride plastic frame firmly placed on a response platform by four thumb screws. The floor of the stabilimeter consisted of six 5.0 mm diameter stainless steel bars spaced 1.5 cm apart. Each stabilimeter and platform was located independently inside ventilated plywood sound-attenuating chambers (64 cm × 60 cm × 40 cm). The rats' startle reaction generated pressure on the response platform that generated analog signals that were amplified, digitized, and analyzed by Startle Reflex software (version 4.10, Med Associates, St. Albans, VT) provided by the equipment manufacturer. The presentation and sequencing of the acoustic stimuli were also controlled by the same software and an appropriate interface (Med Associates). A loudspeaker located 10 cm behind the wire mesh cage was used to deliver both the acoustic startle stimulus (100 dB; 50 ms burst of white noise; rise–decay time, 5 ms) and continuous background noise (55 dB). The startle reaction was recorded within a time window of 100 ms after the startle stimulus onset. Calibration procedures using a device provided by the manufacturer that emulates the rat were conducted before the experiments to ensure statistically equivalent sensitivities of the response platforms. The rats' behavior was recorded by a video

camera (Everfocus, Duarte, CA) positioned behind the stabilimeter. The video signal was relayed to a monitor in another room via a closed circuit. A 6W red light bulb located inside the isolation chamber provided illumination for the camera. For the first 2 days, the animals were placed in the stabilimeter for a 5 min habituation period and afterwards received a total of 30 startle stimuli with an interstimulus interval of 30 s. Each matching session was 15 min in duration. For each treatment, the animals were assigned to control and drug groups to produce, as close as possible, the same average startle amplitude based on the last matching day before training began.

Training: Animals were conditioned to a light-CS in a cage (20 cm × 20 cm × 25 cm) with side and back walls constructed of stainless steel and the ceiling and front door made of transparent Plexiglas. The grid floor of this cage consisted of stainless-steel rods spaced 1.5 cm apart. The cage was located within a ventilated and sound-attenuated chamber (45 cm × 45 cm × 45 cm). After recovery from surgery, animals were placed in the training cage, and each rat received 10 CS-US pairings 5 min later using a 4 s light-CS coterminating with a 1 s, 0.6 mA footshock-US. The shocks were delivered through the training cage floor by a constant current generator built with a scrambler (Albarsh Instruments, Brazil). The CS was a white light presented through a 6W, 127 V bulb located in the ceiling of the chamber. Stimulus presentation was controlled by a microprocessor and an input/output board (Insight Equipment, Brazil). The intertrial interval varied randomly between 60 and 180 s. The duration of each training session was about 20 min.

Testing: Test sessions were conducted in the same cages used for matching. The rats' behavior was recorded by a video camera (Everfocus) positioned behind the cages, with the signal relayed to a monitor in another room via a closed circuit. The test session was conducted without footshock presentation. The animals then were placed into the startle test cages. After 5 min of habituation to the test cages, the rats were presented with 60 startle stimuli (noise bursts) with a 30 s interstimulus interval. The startle stimulus intensity was 100 dB. Half of the startle stimuli were presented in the absence of the CS (noise-alone trials) to provide a baseline, and the other half was presented in the presence of the CS (light-noise trials). In the light-noise trials, the startle stimulus was presented at the last second of a 4 s presentation of the light-CS, similar to the training sessions. The duration of the test session was 32 min. Startle response amplitudes collected from this experiment were stored on a computer and transferred to Microsoft Excel tables for offline analysis.

2.3.2. Motor performance

Open-field: Locomotor activity and exploration were evaluated in the open-field test. This experiment was conducted in an arena consisting of a circular enclosure made of Plexiglas (60 cm diameter, 50 cm height), with the floor divided into 12 sections. The following behavioral responses were recorded every minute for 30 min: number of crossings (number of floor sections traversed), number of rearings (standing with the forelegs raised in the middle of the arena or against the walls), and groomings (cleaning the head and/or body with the forelegs for 10 s). The rats' behavior was recorded by a video camera positioned in front of the arena. The animals were first habituated to the arena for 10 min prior to treatments. After drug injection, animals were placed again in the middle of the arena and left for a 30 min period of free exploration.

Rotarod: Effects on motor coordination produced by drug treatments were also evaluated with a rotarod apparatus (Ugo Basile Rota-Rod, 7750). The day before testing, animals were placed on the rotarod (4 rotations per minute). Each time the rat fell off the rotarod, it was immediately placed back onto the rotarod until it achieved 3 min of continuous stability. On the next day before testing, the rats were placed on the rotarod again. Only animals that were able to maintain their equilibrium on the rotarod for 60 s were retained for saline or drug administrations. Testing then commenced, and the time spent on the rotarod was measured three times at 15, 25, and 35 min after microinjections. Rotarod performance was the time taken for the animal to fall from the rod. Animals were removed from the rotarod after 3 min, which was used as the maximal time for the test.

2.4. Drugs

The following drugs were used: D₁ agonist (±)-SKF-38393 hydrochloride (SKF), D₁ antagonist R(+)-SCH-23390 hydrochloride (SCH), D₂ agonist (–)-quinpirole hydrochloride (QUI), D₂ antagonist (–)-sulpiride (SUL). All drugs were purchased from Sigma (St. Louis, MO) and dissolved in physiological saline (SAL, 0.9%) shortly before use. Physiological saline served as the vehicle control. All drugs (1.0 μg) were administered bilaterally into the VTA at a constant volume of 0.2 μl/site. Rats always received two injections in the FPS test, one before training and the other before testing. Thus, for each drug, rats were randomly distributed into four groups: saline–saline (SAL–SAL), drug–saline (SKF + SAL, SCH + SAL, QUI + SAL, SUL + SAL), saline–drug (SAL + SKF, SAL + SCH, SAL + QUI, SAL + SUL), and drug–drug (SKF + SKF, SCH + SCH, QUI + QUI, SUL + SUL). The animals received the treatments 5 min before training and testing sessions. For the motor performance experiments, only one injection of saline or drug was administered at the same doses and time of injections. The doses and time of injections were based on previous studies [3,11,16,31,33].

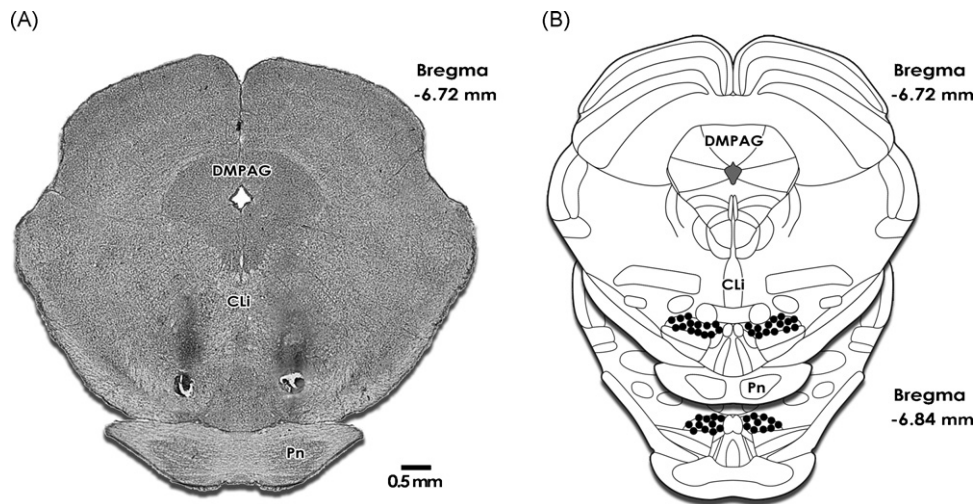


Fig. 1. Photomicrograph showing representative injection sites into the ventral tegmental area (A) and outline of the injection sites (B) on cross-sections from the Paxinos and Watson atlas [37]. The number of points in the figure is less than the total number of rats used because of several overlaps. Scale bar = 0.5 mm. DMPAG, dorsomedial periaqueductal gray; CLi, caudal linear nucleus of the raphe; Pn, pontine nuclei.

2.5. Microinjection procedure

The injection needle was a thin dental needle (0.3 mm, outside diameter) connected to a 10 μ L 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 cannula. The solutions were injected into the VTA using an infusion pump (Harvard Apparatus, South Natick, MA). The displacement of an air bubble inside the polyethylene catheter (PE-10; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) connecting the syringe needle to the intracerebral needle was used to monitor the microinjection. The microinjection duration was 1 min, and the needle was kept in place for an additional 1 min to maximize diffusion away from the needle tip.

2.6. Histology

Upon completion of the experiments, animals were given a lethal dose of chloral hydrate (500 mg/kg, i.p.), and 0.2 μ L of Evans Blue (2%) was microinjected into the VTA to mark the position of the microinjection sites. Afterwards, rats were perfused transcardially with 0.9% saline followed by 4% paraformaldehyde. Brains were

removed from the skulls and maintained in paraformaldehyde solution for 2 h, after which the brains were cryoprotected in 30% sucrose until soaked. Serial 60 μ m brain coronal sections were cut using a freezing microtome and mounted on gelatin-coated slides and stained with cresyl violet (5%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to localize the positions of the microinjection sites according to the atlas of Paxinos and Watson [37].

2.7. Statistical analysis

Data are expressed as mean + SEM. For each drug treatment, a two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) was conducted on the mean startle response, with treatment (drug, control) as the between-subjects factor and trial-type (noise-alone, light-noise) as the within-subjects factor. A two-way repeated-measures ANOVA was also used for the rotarod data, with treatment (drug, control) as the between-subjects factor, and trials (15, 25, 35 min) as the within-subjects factor. Significant comparisons were followed by Newman-Keuls *post hoc* test. Analysis of locomotor activity in the open-field was performed with Student's *t*-test on the number of crossings, rearings, and groomings. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

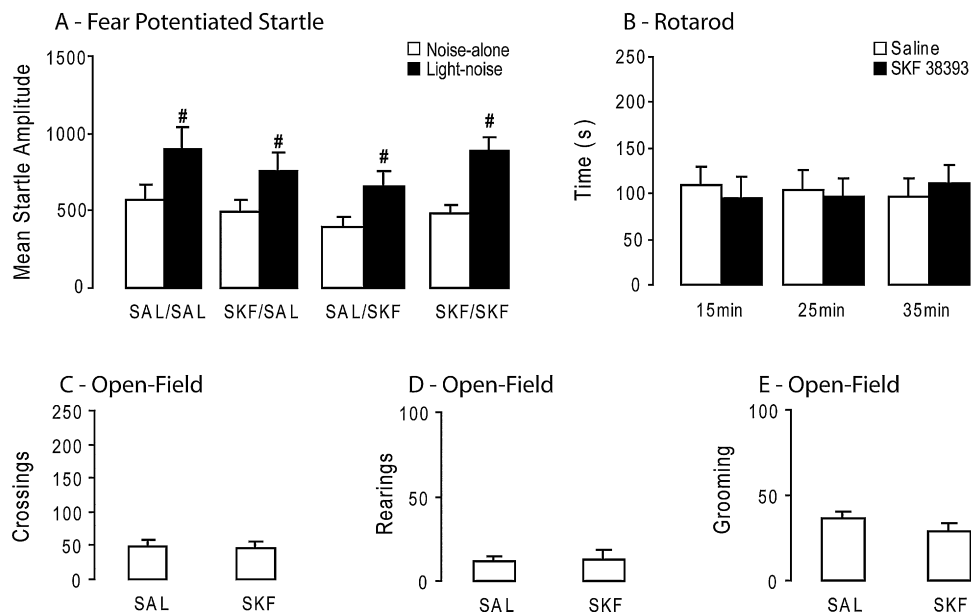


Fig. 2. Mean startle amplitude of rats treated with SKF 38393 (1.0 μ g/0.2 μ L) before training, testing, or both sessions (A). Motor performance of animals treated with SKF 38393 in the rotarod (B) and open-field (C–E) tests. # Different from noise-alone condition ($p < 0.05$, Newman-Keuls test). Mean + SEM. $n = 13$ for SAL + SAL, SKF + SAL, and SKF + SKF groups and $n = 12$ for the SAL + SKF group in the fear-potentiated startle tests. $n = 10$ for all groups in the rotarod and open-field tests. Each animal was subjected to only one of the tests.

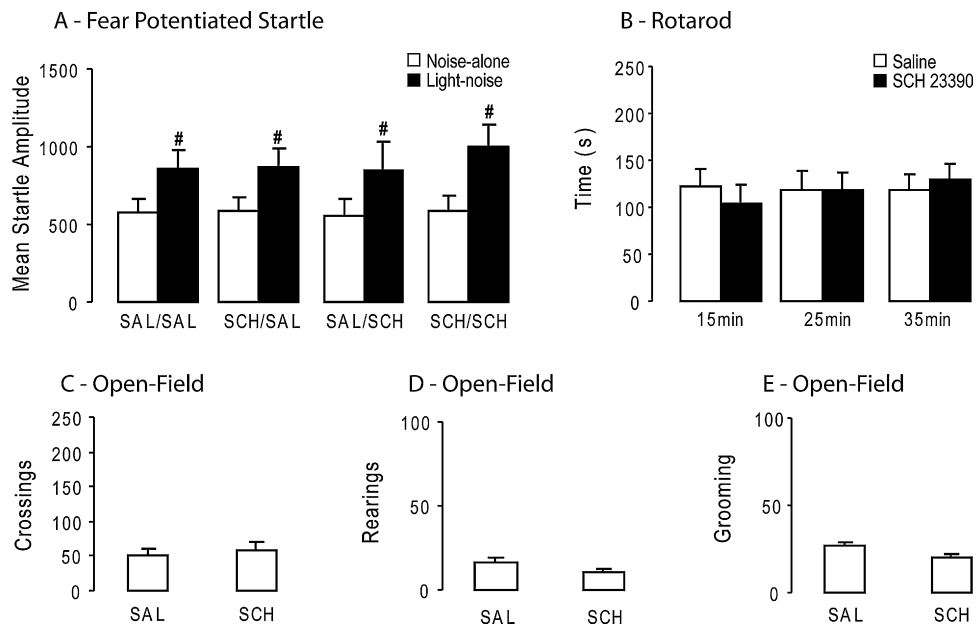


Fig. 3. Mean startle amplitude of rats treated with SCH 23390 (1.0 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$) before training, testing, or both sessions (A). Motor performance of animals treated with SCH 23390 in the rotarod (B) and open-field (C-E) tests. [#]Different from noise-alone condition ($p < 0.05$, Newman-Keuls test). Mean + SEM. $n = 12$ for SAL + SAL, SCH + SAL, and SCH + SCH groups and $n = 11$ for the SAL + SCH group in the fear-potentiated startle tests. $n = 10$ for all groups in the rotarod and open-field tests. Each animal was subjected to only one of the tests.

3. Results

The injection sites of all animals used in this study were located inside the VTA. A photomicrograph of a representative injection site and the histological localization of injection sites in the VTA depicted on diagrams of the Paxinos and Watson atlas [37] are shown in Fig. 1.

Fig. 2A shows the mean startle amplitude of animals that received intra-VTA administrations of saline and SKF 38393 before the training or testing sessions. Two-way repeated-measures ANOVA revealed a significant effect of trial-type ($F(1,47) = 108.10$; $p < 0.05$). No significant effects of treatment ($F(3,47) = 0.95$; $p > 0.05$)

and no treatment \times trial-type interaction ($F(3,47) = 1.21$; $p > 0.05$) were observed. *Post hoc* comparisons with the Newman-Keuls test revealed that the light-CS enhanced the startle response to noise in all groups ($p < 0.05$). Fig. 2B displays the data of the animals treated with SKF 38393 in the rotarod test. Two-way repeated-measures ANOVA revealed no significant effects of treatment ($F(1,36) = 0.92$; $p > 0.05$) or trials ($F(2,36) = 0.16$; $p > 0.05$) and no treatment \times trials interaction ($F(2,36) = 2.72$; $p > 0.05$). In the open-field test (Fig. 2C-E), Student's *t*-test did not reveal any significant effects of treatment on the number of crossings ($t(18) = 0.06$; $p > 0.05$), rearings ($t(18) = 0.20$; $p > 0.05$), or groomings ($t(18) = 1.26$; $p > 0.05$).

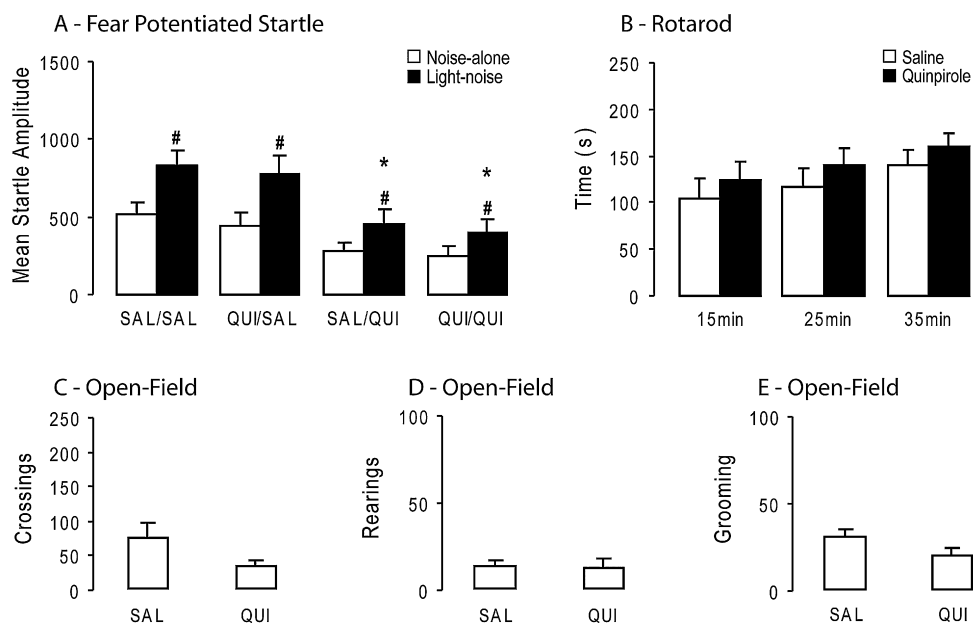


Fig. 4. Mean startle amplitude of rats treated with quinpirole (1.0 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$) before training, testing, or both sessions (A). Motor performance of animals treated with quinpirole in the rotarod (B) and open-field (C-E) tests. [#]Different from noise-alone condition. ^{*}Different from control group ($p < 0.05$, Newman-Keuls test). Mean + SEM. $n = 15$ for all groups in the fear-potentiated startle tests. $n = 10$ for all groups in the rotarod and open-field tests. Each animal was subjected to only one of the tests.

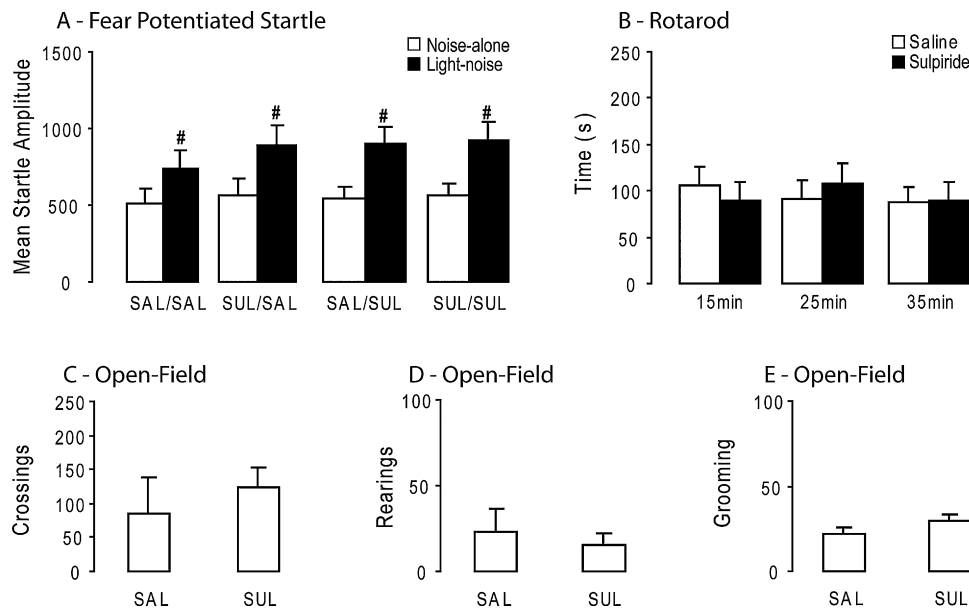


Fig. 5. Mean startle amplitude of rats treated with sulpiride (1.0 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$) before training, testing, or both sessions (A). Motor performance of animals treated with sulpiride in the rotarod (B) and open-field (C–E) tests. # Different from noise-alone condition ($p < 0.05$, Newman–Keuls test). Mean + SEM. $n = 16$ for SAL + SAL, SAL + SUL, and SUL + SUL groups and $n = 15$ for the SUL + SAL group in the fear-potentiated startle tests. $n = 10$ for all groups in the rotarod and open-field tests. Each animal was subjected to only one of the tests.

Fig. 3A shows the mean startle amplitude for animals that received intra-VTA administrations of saline and SCH 23390 before the training or testing sessions. Two-way repeated-measures ANOVA revealed a significant effect of trial-type ($F(1,143) = 81.86$; $p < 0.05$). No significant effects of treatment ($F(3,43) = 0.14$; $p > 0.05$) and no treatment \times trial-type interaction ($F(3,43) = 0.76$; $p > 0.05$) were observed. *Post hoc* comparisons with Newman–Keuls test revealed that the light-CS enhanced the startle response to noise in all groups ($p < 0.05$). Fig. 3B displays the data of the animals treated with SCH 23390 in the rotarod test. Two-way repeated-measures ANOVA revealed no significant effects of treatment ($F(1,36) = 0.01$; $p > 0.05$) or trials ($F(2,36) = 0.60$; $p > 0.05$) and no treatment \times trials interaction ($F(2,36) = 1.00$; $p > 0.05$). In the open-field test (Fig. 3C–E), Student's *t*-test did not reveal any significant effects of treatment on the number of crossings ($t(18) = 0.50$; $p > 0.05$), rearings ($t(18) = 1.38$; $p > 0.05$), or groomings ($t(18) = 2.04$; $p > 0.05$).

Fig. 4A shows the mean startle amplitude for animals that received intra-VTA administrations of saline and quinpirole before the training or testing sessions. Two-way repeated-measures ANOVA revealed significant effects of treatment ($F(3,56) = 4.41$; $p < 0.05$) and trial-type ($F(1,56) = 98.87$; $p < 0.05$) and a significant treatment \times trial-type interaction ($F(3,56) = 3.38$; $p < 0.05$). *Post hoc* comparisons with Newman–Keuls test revealed that the light-CS enhanced the startle response to noise in all groups ($p < 0.05$). The startle reflex to noise alone was not statistically different among groups ($p > 0.05$). The startle reflex to light–noise was attenuated by quinpirole in the SAL + QUI and QUI + QUI groups compared with controls (SAL + SAL; $p < 0.05$). Considering these effects of 1.0 μg quinpirole injected into the VTA before FPS testing, we examined the effect of a second dose of quinpirole (0.5 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}/\text{site}$) in the same procedure (data not shown graphically). Two-way repeated-measures ANOVA revealed a significant effect of trial-type ($F(1,28) = 59.31$; $p < 0.05$) but no significant effect of treatment ($F(1,28) = 3.24$; $p > 0.05$) and no treatment \times trial-type interaction ($F(1,28) = 0.66$; $p > 0.05$). *Post hoc* comparisons with Newman–Keuls test revealed that the light-CS enhanced the startle response to noise in both groups ($p < 0.05$). In contrast to the 1.0 μg dose of quinpirole, 0.5 μg did not cause

significant changes in the expression of FPS. Fig. 4B displays the data obtained with the animals treated with quinpirole in the rotarod test. Two-way repeated-measures ANOVA showed no effects of treatment ($F(1,36) = 0.82$; $p > 0.05$), a significant effect of trials ($F(2,36) = 6.99$; $p < 0.05$), and no treatment \times trials interaction ($F(2,36) = 0.03$; $p > 0.05$). *Post hoc* comparisons with Newman–Keuls test revealed significant differences between the 15 and 25 min trials compared with the 35 min trial ($p < 0.05$). Student's *t*-test did not reveal any significant effects of treatment on the number of crossings ($t(18) = 1.60$; $p > 0.05$), rearings ($t(18) = 0.02$; $p > 0.05$), or groomings ($t(18) = 1.81$; $p > 0.05$) in the open-field test (Fig. 4C–E).

Fig. 5A shows the mean startle amplitude of animals that received intra-VTA administrations of saline and sulpiride before the training or testing sessions. Two-way repeated-measures ANOVA revealed a significant effect of trial-type ($F(1,59) = 109.79$; $p < 0.05$). No significant effects of treatment ($F(3,59) = 0.28$; $p > 0.05$) and no treatment \times trial-type interaction ($F(3,59) = 0.99$; $p > 0.05$) were observed. *Post hoc* comparisons with Newman–Keuls test revealed that the light-CS enhanced the startle response to noise in all groups ($p < 0.05$). Fig. 5B displays the data of the animals treated with sulpiride in the rotarod test. Two-way repeated-measures ANOVA revealed no significant effects of treatment ($F(1,36) = 0.001$; $p > 0.05$) or trials ($F(2,36) = 0.55$; $p > 0.05$) and no treatment \times trials interaction ($F(2,36) = 0.94$; $p > 0.05$). In the open-field test (Fig. 5C–E), Student's *t*-test did not reveal any significant effects of treatment on the number of crossings ($t(18) = 0.64$; $p > 0.05$), rearings ($t(18) = 0.51$; $p > 0.05$), or groomings ($t(18) = 1.41$; $p > 0.05$).

4. Discussion

Elucidation of the mode by which a given brain structure participates in the production of a specific emotional behavior may contribute to our knowledge of the functioning of the neural circuitries underlying anxiety disorders. The present study explored how dopaminergic mechanisms in the VTA modulate anxiety-like states. More specifically, the present findings reveal the extent to which dopaminergic mechanisms in the VTA mediate the acqui-

sition of information and the expression of responses in the conditioned fear response to an explicit cue.

The FPS produced by a light-CS previously paired with footshocks did not change in animals that received pretraining VTA injections of SKF 38393, SCH 23390, quinpirole, or sulpiride. These data indicate that VTA DA receptors are not involved in the acquisition of FPS. This result extends to the VTA previous findings from our laboratory demonstrating that systemic dopaminergic drugs do not affect the acquisition of conditioned fear to a light-CS evaluated by the FPS test [35]. The present data, however, cannot be generalized to all conditioned fear models. Indeed, Nader and LeDoux showed that pretraining intra-VTA administration of quinpirole attenuated acquisition of second-order conditioned freezing using sound as the CS [32]. Thus, the neurochemical mechanisms activated in this case appear to depend on the type of conditioned response or the explicit cue used as the CS.

Systemic injections of quinpirole have been shown to attenuate the expression of conditioned fear to a light-CS [35]. The present study implicates the VTA in this effect because local injections of quinpirole, when administered before the test sessions, into this nucleus also attenuated FPS produced by a light-CS previously paired with footshock. Rats showed normal baseline acoustic startle responding after quinpirole administration, indicating that the decrease in FPS was not associated with impaired sensory gating. The obtained effects of quinpirole also cannot be attributed to non-specific effects because this drug did not affect motor performance in the open-field and rotarod tests. These findings are consistent with studies from other laboratories showing similar results [3,31]. In contrast, SKF 38393, SCH 23390, and sulpiride did not produce any effect on the expression of associative learning produced by pairings of the light-CS with footshock in the FPS paradigm. The present results have to be interpreted with caution since only one dose of the SKF, SCH 23390 and sulpiride was used here and other doses should be used in other studies on this topic.

Quinpirole has been reported to be a full agonist at D₂ receptor sites [28,44]. Earlier studies showed that quinpirole, administered at doses acting at postsynaptic DA receptors, increased locomotor activity and stereotyped behavior, such as sniffing and licking [27]. The dose of quinpirole used in the present study (1.0 µg/0.2 µl/site) was lower than the doses typically used to activate postsynaptic DA receptors [32,33]. Indeed, although D₂ receptors are found both pre- and postsynaptically, presynaptic sites have been shown to be between 6 and 10-times more sensitive to DA agonists than postsynaptic sites [45]. Dopamine D₂ autoreceptors located on cell bodies and dendrites in the VTA tonically inhibit DA neural activity in rats exposed to aversive situations [50,51]. Based on this evidence, we suggest that quinpirole's ability to decrease the fear response is the result of an action on VTA D₂ presynaptic dopaminergic receptors that decrease dopamine levels in the terminal fields of DA neurons originating in the VTA. A lower dose of quinpirole (0.5 µg/0.2 µl/site) was also tested but revealed no effects on FPS. Higher doses were not used because of motor side effects.

The present results indicate that a decrease in postsynaptic DA receptor activation may be the cause of quinpirole's ability to decrease FPS, suggesting that interference with the ability of the fear-evoking CS to activate mesocorticolimbic DA neurons reduces fear. A number of forebrain areas implicated in fear and anxiety, such as the amygdala, nucleus accumbens, and prefrontal cortex, are innervated by DA fibers originating in the VTA [34,47]. Therefore, the role of VTA DA neurons in FPS likely involves their mesocorticolimbic projections. In view of the quinpirole result, an enhanced FPS was expected following the injections of the D₂ receptor antagonist sulpiride into the VTA. A possible reason for the lack of effect of sulpiride would be that the control exerted on conditioned fear by VTA DA neurons is phasic, not tonic. However, microinjections of SCH 23390 and/or sulpiride, which block D₁ and

D₂ receptors, respectively, into some of these VTA DA terminal fields may have an effect similar to the one reported here for intra-VTA quinpirole microinjections. This hypothesis is supported by recent data from our laboratory showing that an aversive CS increases DA levels in the core and shell subregions of the nucleus accumbens [29] and basolateral nucleus of the amygdala (unpublished data).

Importantly, several procedural confounds may underlie the conflicting results of studies exploring dopaminergic systems and fear. Specifically, pharmacological or anatomical manipulations of the dopaminergic system on the test day could interfere with conditioned responding by altering CS processing. Arguing against this possibility is the result from our study that quinpirole did not change the response to the light-CS when given to rats before training sessions. Another source of faulty interpretation might be that most dopaminergic manipulations cause unconditioned changes in behavior. Thus, these changes could indirectly compete with the expression of fear responses, leading to the mistaken conclusion that these dopaminergic manipulations directly affected fear. Again, arguing against this possibility is the lack of effects of quinpirole on motor performance assessed in the present study by the open-field and rotarod tests. Additionally, quinpirole did not change the baseline response to noise-alone in the FPS test when presented during pretesting sessions.

The present findings are consistent with the hypothesis that activation of D₂-mediated mechanisms in the VTA decreases fear by impairing the retrieval of a learned association between a light-CS and a footshock-US [32,33]. Heightened attentional and cognitive function of dopaminergic mechanisms in the mesocorticolimbic system have been proposed to set up adaptive responses to cope with or signal the presence of aversive stimuli. These findings may have clinical implications for understanding how stress affects and influences anxiety-related behaviors. Although the quinpirole results implicate VTA DA neurons in fear expression, a specific role in FPS for DA areas that receive projections from the VTA remains to be demonstrated. Injections of dopaminergic drugs into the basolateral nucleus of the amygdala of rats submitted to the FPS paradigm are currently being conducted in our laboratory.

Taken together, the present results stress the importance of VTA DA neurons in the fear-activating effects of Pavlovian conditioning. In addition to demonstrating the importance of dopaminergic mechanisms in the motivational consequences of footshock, the present results also indicate that these neural circuits are mainly involved in the expression of fear states rather than in the acquisition of conditioned fear.

Acknowledgements

Research was supported by FAPESP (Proc. No. 06/06354-5) and CNPq (Proc. No. 472030/2007). A.R. Oliveira holds a Doctor scholarship from FAPESP, and A.E. Reimer holds a Doctor scholarship from CNPq.

References

- [1] Anisman H, Zalcman S, Shanks N, Zucharko R. Multisystem regulation of performance deficits induced by stressors: an animal model of depression. In: Boulton AA, Baker GB, Martin-Iverson MT, editors. *Animal models in psychiatry*, vol. II. Clifton: Human Press; 1991. p. 1–59.
- [2] Berg WK, Davis M. Diazepam blocks fear-enhanced startle elicited electrically from the brainstem. *Physiol Behav* 1984;32:333–6.
- [3] Borowski TB, Kokkinidis L. Contribution of ventral tegmental dopamine neurons to expression of conditional fear: effects of electrical stimulation, excitotoxic lesions, and quinpirole infusion on potentiated startle in rats. *Behav Neurosci* 1996;110:1349–64.
- [4] Borowski TB, Kokkinidis L. The effects of cocaine, amphetamine, and the dopamine D₁ receptor agonist SKF 38393 on fear extinction as measured with potentiated startle: implications for psychomotor stimulant psychosis. *Behav Neurosci* 1998;112:952–65.

- [5] Brandão ML, Cardoso SH, Melo LL, Motta V, Coimbra NC. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav Rev* 1994;18:339–46.
- [6] Brandão ML, Anseloni VZ, Pandóssio JE, De Araújo JE, Castilho VM. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci Biobehav Rev* 1999;23:863–75.
- [7] Brandão ML, Trancoso AC, da Souza Silva MA, Huston JP. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. *Eur J Pharmacol* 2003;463:225–33.
- [8] Brown JS, Kalish HI, Farber IE. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. *J Exp Psychol* 1951;41:317–28.
- [9] Davis M, Falls WA, Campeau S, Kim M. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav Brain Res* 1993;58:175–98.
- [10] Deutch AY, Tam SY, Roth RH. Footshock and conditioned stress increase 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in the ventral tegmental area but not the substantia nigra. *Brain Res* 1985;333:143–6.
- [11] Emmi A, Crescimanno G, Amato G. Modifications of head turning and circling movement following sulpiride microinjections into nucleus accumbens in the rat. *Brain Res Bull* 1995;38:99–103.
- [12] Feenstra MGP, Botterblom MHA, Van Uum JFM. Novelty-induced increase in dopamine release in the rat prefrontal cortex in vivo: inhibition by diazepam. *Neurosci Lett* 1995;189:81–4.
- [13] Fleshler M. Adequate acoustic stimulus for startle reaction in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 1965;60:200–7.
- [14] Fletcher GH, Starr MS. Intracerebral SCH 23390 and catalepsy in the rat. *Eur J Pharmacol* 1988;149:175–8.
- [15] Garcia AMB, Martinez R, Brandão ML, Morato S. Effects of apomorphine on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiol Behav* 2005;85:440–7.
- [16] Gifkins A, Greba Q, Kokkinidis L. Ventral tegmental area dopamine neurons mediate the shock sensitization of acoustic startle: a potential site of action for benzodiazepine anxiolytics. *Behav Neurosci* 2002;116:785–94.
- [17] Goldstein LE, Rasmusson AM, Bunney BS, Roth RH. Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. *J Neurosci* 1996;16:4787–98.
- [18] Greba Q, Kokkinidis L. Peripheral and intramygdalar administration of the dopamine D₁ receptor antagonist SCH 23390 blocks fear-potentiated startle but not shock reactivity or the shock sensitization of acoustic startle. *Behav Neurosci* 2000;114:262–72.
- [19] Greba Q, Gifkins A, Kokkinidis L. Inhibition of amygdaloid dopamine D₂ receptors impairs emotional learning measured with fear-potentiated startle. *Brain Res* 2001;899:218–26.
- [20] Guarraci FA, Kapp BS. An electrophysiological characterization of ventral tegmental area dopaminergic neurons during differential Pavlovian fear conditioning in the awake rabbit. *Behav Brain Res* 1999;99:169–79.
- [21] Guarraci FA, Frohardt RJ, Falls WA, Kapp BS. The effects of intra-amygdaloid infusions of a D₂ dopamine receptor antagonist on Pavlovian fear conditioning. *Behav Neurosci* 2000;114:647–51.
- [22] Hyttel J. SCH 23390: the first selective dopamine D₁ antagonist. *Eur J Pharmacol* 1983;91:153–4.
- [23] Inoue T, Izumi T, Maki Y, Muraki I, Koyama T. Effect of the dopamine D_{1/5} antagonist SCH 23390 on the acquisition of conditioned fear. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;66:573–8.
- [24] Kamei H, Kameyama T, Nabeshima T. Activation of both dopamine D₁ and D₂ receptors necessary for amelioration of conditioned fear stress. *Eur J Pharmacol* 1995;273:229–33.
- [25] Keabian JW, Calne DB. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 1979;277:93–6.
- [26] Koch M. The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol* 1999;59:107–28.
- [27] Kurashima M, Yamada K, Nagashima M, Shirakawa K, Furukawa T. Effects of putative dopamine D₃ receptor agonists, 7-OH-DPAT, and quinpirole, on yawning, stereotypy, and body temperature in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;52:503–8.
- [28] Levant B, Grigoriadis DE, Desouza EB. Characterization of [³H]quinpirole binding to D₂-like dopamine receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;262:929–35.
- [29] Martinez RC, Oliveira AR, Macedo CE, Molina VA, Brandão ML. Involvement of dopaminergic mechanisms in the nucleus accumbens core and shell subregions in the expression of fear conditioning. *Neurosci Lett* 2008;446:112–6.
- [30] Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 2003;70:83–244.
- [31] Munro LJ, Kokkinidis L. Infusion of quinpirole and muscimol into the ventral tegmental area inhibits fear-potentiated startle: implications for the role of dopamine in fear expression. *Brain Res* 1997;746:231–8.
- [32] Nader K, LeDoux J. The dopaminergic modulation of fear: quinpirole impairs the recall of emotional memories in rats. *Behav Neurosci* 1999;113:152–65.
- [33] Nader K, LeDoux JE. Inhibition of the mesoamygdala dopaminergic pathway impairs the retrieval of conditioned fear associations. *Behav Neurosci* 1999;113:891–901.
- [34] Oades RD, Halliday GM. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* 1987;434:117–65.
- [35] Oliveira AR, Reimer AE, Brandão ML. Dopamine D₂ receptor mechanisms in the expression of conditioned fear. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;84:102–11.
- [36] Ozer H, Ekinici AC, Starr MS. Dopamine D₁- and D₂-dependent catalepsy in the rat requires functional NMDA receptors in the corpus striatum, nucleus accumbens and substantia nigra pars reticulata. *Brain Res* 1997;777:51–9.
- [37] Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Academic Press; 2005.
- [38] Pezze MA, Feldon J. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Prog Neurobiol* 2004;74:301–20.
- [39] Pilz PKD, Schnitzler HU. Habituation and sensitization of the acoustic startle response in rats: amplitude, threshold and latency measures. *Neurobiol Learn Mem* 1996;66:67–79.
- [40] Reimer AE, Oliveira AR, Brandão ML. Selective involvement of GABAergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray and inferior colliculus on the memory of the contextual fear as assessed by the fear potentiated startle test. *Brain Res Bull* 2008;76:545–50.
- [41] Reis FLV, Masson S, Oliveira AR, Brandão ML. Dopaminergic mechanisms in the conditioned and unconditioned fear as assessed by the two-way avoidance and light switch-off tests. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;79:359–65.
- [42] Rodgers RJ, Nikulina EM, Cole JC. Dopamine D₁ and D₂ receptor ligands modulate the behaviour of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;49:985–95.
- [43] Santos JM, Gárgaro AC, Oliveira AR, Masson S, Brandão ML. Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing behavior and fear-potentiated startle. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005;15:239–46.
- [44] Seeman P, Schaus JM. Dopamine receptors labelled by [³H]quinpirole. *Eur J Pharmacol* 1991;203:105–9.
- [45] Skirboll LR, Grace AA, Bunney BS. Dopamine auto and postsynaptic receptors: electrophysiological evidence for differential sensitivity to dopamine agonists. *Science* 1979;206:80–2.
- [46] Standish-Barry HMAS, Bouras N, Bridges PK, Watson JP. A randomized double blind group comparative study of sulpiride and amytropyline in affective disorder. *Psychopharmacology (Berl)* 1983;81:258–60.
- [47] Swanson LW. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull* 1982;9:321–53.
- [48] Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 2000;24:125–32.
- [49] Walker DL, Cassela JV, Lee Y, De Lima TCM, Davis M. Opposing roles of the amygdala and dorsolateral periaqueductal gray in fear-potentiated startle. *Neurosci Biobehav Rev* 1997;21:743–53.
- [50] White FJ, Wang RY. Differential effects of classical and atypical antipsychotic drugs on A9 and A10 dopamine neurons. *Science* 1984;221:1054–7.
- [51] White FJ, Wang RY. Pharmacological characterization of dopamine autoreceptors in the rat ventral tegmental area: microiontophoretic studies. *J Pharmacol Exp Ther* 1984;231:275–80.
- [52] Yeomans JS, Frankland PW. The acoustic startle reflex: neurons and connections. *Brain Res Rev* 1996;21:301–14.



Dopamine Receptors in the Basolateral Amygdala Regulate the Expression of Conditioned Fear

Journal:	<i>Psychopharmacology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	original investigation
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Brandao, Marcus; FFCLRP, Campus, Laboratorio de Psicobiologia Oliveira, Amanda; USP, Psychology Reimer, Adriano; USP, Psychology Carvalho, Milene; USP, Psychology Macedo, Carlos; USP, Psychology Silva, Maria; University of Dusseldorf, Institute of Physiological Psychology
Keywords:	DOPAMINE, MICRODIALYSIS, AMYGDALA, FEAR CONDITIONING



1
2
3 **Dopamine Receptors in the Basolateral Amygdala Regulate the Expression of**
4
5 **Conditioned Fear**
6
7
8
9
10
11
12
13
14

15 **Amanda Ribeiro de Oliveira^{1,2}, Adriano Edgar Reimer^{1,2}, Carlos Eduardo Antunes**
16 **de Macedo^{1,2}, Milene Cristina de Carvalho^{1,2}, Maria Angélica de Souza Silva³,**
17 **Marcus Lira Brandão^{1,2}**
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 ¹ Laboratório de Psicobiologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP
28

29 ² Instituto de Neurociências & Comportamento, Campus USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.
30

31 ³ Center for Behavioral Neuroscience, Institute of Experimental Psychology, University of
32
33
34 Düsseldorf, Düsseldorf, Germany.
35
36
37
38
39
40
41
42

43 Correspondence: M.L. Brandão
44

45 E-mail: mbrandao@usp.br
46
47

48 Fax: +55 16 3602-4830
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Rationale: Dopamine (DA) plays an important role in mechanisms underlying states of fear and anxiety. Excitation of the mesocorticolimbic pathway may be important for the development of exaggerated fear responding. Among the forebrain regions innervated by this pathway, the amygdala is an essential component of the neural circuitry of conditioned fear. *Objectives:* The present study explored the involvement of basolateral amygdala (BLA) DA receptors in the expression of conditioned fear to a light conditioned stimulus (CS). *Methods:* We evaluated the effects of SCH 23390 (D₁ antagonist) and sulpiride (D₂ antagonist) injections into the BLA on fear-potentiated startle (FPS). Locomotor activity was evaluated in the open-field and rotarod tests. *In vivo* microdialysis was also performed to measure DA levels in the BLA of conditioned and unconditioned rats that received saline or quinpirole (D₂ agonist) injections into the VTA. *Results:* SCH 23390 did not produce significant effects on FPS, indicating that BLA D₁ receptors are not involved in the expression of FPS. In contrast, sulpiride inhibited FPS produced by the light-CS that was previously paired with footshock. Sulpiride's ability to decrease FPS cannot be attributed to nonspecific effects because this drug did not affect motor performance. Conditioned fear increased freezing and DA levels in the BLA, and both effects were inhibited by intra-VTA quinpirole. *Conclusions:* These findings stress the importance of BLA D₂ receptors in the fear-activating effects of Pavlovian conditioning and indicate that interference with the ability of the fear-evoking CS to activate BLA D₂ receptors reduces the expression of fear.

Keywords: Basolateral amygdala, Dopamine, Fear-potentiated startle, Microdialysis

Introduction

Pavlovian fear conditioning is one of the most used paradigms to study the biological basis of emotion, learning, and memory. Although considerable work has been done relating specific circuits of the brain to conditioned fear, less is known about its regulation by neuromodulators, the understanding of which would be therapeutically relevant for fear-related diseases (Brandão et al. 1994, 1999, 2003, 2005; Millan 2003). Dopamine (DA) is significantly involved in mechanisms underlying states of fear and anxiety. The association between changes in DA transmission and threatening stimuli has been demonstrated by numerous studies. Dopaminergic mechanisms have been related to the central effects of acute and chronic stress (Feenstra et al. 1995; Finlay et al. 1995). Additionally, dopaminergic mechanisms are significant for different aspects of affective memory, namely its formation, retrieval, and expression (Pezze and Feldon 2004).

Excitation of the mesocorticolimbic pathway, originating from DA neurons in the ventral tegmental area (VTA), is particularly sensitive to fear-arousing environmental stimuli and may be important for the development of exaggerated fear responding (Deutch et al. 1985; Greba et al. 2001; Guarraci and Kapp 1999; Guarraci et al. 2000). In a recent study, we demonstrated that intra-VTA injection of quinpirole attenuated the expression of conditioned fear (Oliveira et al. 2009). Based on quinpirole's high affinity for D₂ presynaptic autoreceptors, we suggested that the reduction in fear was attributable to interference with the ability of the fear-evoking CS to activate mesocorticolimbic DA neurons. Therefore, the role of VTA DA neurons in FPS likely involves their mesocorticolimbic projections. Among the forebrain regions innervated by VTA DA neurons, the amygdala is an essential component of the neural

1
2
3 circuitry involved in conditional fear (Davis 1992; Fendt and Fanselow 1999; LeDoux
4
5 2000; LeDoux et al. 1988; Oades and Halliday 1987; Swanson 1982).
6
7

8 The present study further assessed the dopaminergic mediation of conditioned
9
10 fear in the basolateral amygdala (BLA) using the fear-potentiated startle (FPS)
11
12 paradigm. The acoustic startle reflex is a whole-body response, consisting of skeletal
13
14 muscle contraction in response to a sudden and unexpected burst of noise (Fleschler
15
16 1965; Koch 1999). The biological response to acoustic startle includes a decrease in the
17
18 latency of a flight reaction and protection from a predator's attack from behind by
19
20 contraction of the dorsal neck muscles (Fleschler 1965; Koch 1999; Pilz and Schnitzler
21
22 1996; Yeomans and Frankland 1996). When the startle-inducing noise occurs in the
23
24 presence of a conditioned stimulus (CS) paired with an aversive unconditioned stimulus
25
26 (US) (e.g., footshock), the startle response is enhanced. This increase in the startle reflex
27
28 is taken as an index of conditioned fear and is termed FPS (Brown et al. 1951; Davis et
29
30 al. 1993). FPS is sensitive to the anxiolytic action of benzodiazepines and has been
31
32 considered a model of generalized anxiety disorder (Berg and Davis 1984; Brodtkin et
33
34 al. 2002; Davis 1979; Reimer et al. 2008; Santos et al. 2005).
35
36
37
38
39

40
41 Although at least five DA receptor subtypes are now recognized (Millan 2003;
42
43 Vallone et al. 2000), the initial identification of D₁ and D₂ receptors (Kebabian and
44
45 Calne 1979) provided the major impetus to define specific functional roles for DA
46
47 receptor subtypes. To further examine the dopaminergic mediation of aversive states,
48
49 the present study evaluated the involvement of BLA DA receptors in the expression of
50
51 conditioned fear using the FPS test. This pharmacological assessment was performed
52
53 with intra-BLA administration of the D₁ antagonist SCH 23390 (Fletcher and Starr
54
55 1988; Greba and Kokkinidis 2000; Hyttel 1983) and the D₂ antagonist sulpiride
56
57
58 (Guarraci and Kapp 1999; Standish-Barry et al. 1983; White and Wang 1984a, b).
59
60

1
2
3 Based on the FPS results, the role of dopaminergic mechanisms in the BLA in
4
5 the expression of conditioned fear was also examined by a neurochemical study using *in*
6
7 *vivo* microdialysis.
8
9

10 11 12 **Materials and methods**

13 14 *Animals*

15
16
17 Ninety-seven naive male Wistar rats from the animal house of the Campus of
18
19 Ribeirão Preto, University of São Paulo, were used. The animals, weighing 260 to 280 g
20
21 each, were housed in groups of five per cage under a 12 h/12 h light/dark cycle (lights
22
23 on at 07:00 h) at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ with free access to food and water. The experiments were
24
25 performed during the light phase of the light/dark cycle and were performed in
26
27 compliance with the recommendations of the Brazilian Society of Neuroscience and
28
29 Behavior and were in accordance with the United States National Institutes of Health
30
31 Guide for Care and Use of Laboratory Animals.
32
33
34
35
36
37

38 39 *Surgery*

40
41 Animals were anesthetized with ketamine/xylazine (100/7.5 mg/kg,
42
43 intraperitoneal) and fixed in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, CA,
44
45 USA). The upper incisor bar was set 3.3 mm below the interaural line, such that the
46
47 skull was horizontal between bregma and lambda. For the FPS experiment, bilateral
48
49 guide cannulae, through which an injection needle could be inserted for drug injections,
50
51 were stereotaxically implanted over the BLA. For the microdialysis experiments, a
52
53 guide cannula for the dialysis probe (CMA/12; CMA/Microdialysis AB, Stockholm,
54
55 Sweden) was stereotaxically implanted over the BLA, and a guide cannula for the drug
56
57 injection was implanted over the VTA, both in the right hemisphere. With bregma as the
58
59
60

1
2
3 reference point for each plane, the following coordinates were used: BLA
4
5 (anterior/posterior, -2.3 mm; medial/lateral, ± 5.5 mm; dorsal/ventral, -7.0 mm) and
6
7 VTA (anterior/posterior, -5.8; medial/lateral, ± 0.8 ; dorsal/ventral, -7.6 mm; Paxinos and
8
9 Watson 2007). The cannulae were fixed to the skull with acrylic resin and two stainless
10
11 steel screws. At the end of surgery, each guide cannula was sealed with a stainless steel
12
13 wire to protect it from blockage. Afterward, the rats were allowed 5 days to recover
14
15 from the surgical procedure.
16
17
18
19
20
21

22 *Apparatus and procedure*

23 Fear-potentiated startle

24
25 Matching: To record the amplitude of the acoustic startle response, two separate
26
27 stabilimeter devices were used simultaneously. The rats were placed into a stabilimeter
28
29 consisting of a wire mesh cage (16.5 \times 7.5 \times 7.5 cm) suspended within a polyvinyl
30
31 chloride plastic frame firmly placed on a response platform by four thumb screws. The
32
33 floor of the stabilimeter consisted of six 5.0 mm diameter stainless steel bars spaced 1.5
34
35 cm apart. Each stabilimeter and platform was located independently inside ventilated
36
37 plywood sound-attenuating chambers (64 \times 60 \times 40 cm). The rats' startle reaction
38
39 generated pressure on the response platform that generated analog signals that were
40
41 amplified, digitized, and analyzed by Startle Reflex software (version 4.10; Med
42
43 Associates, St. Albans, VT, USA) provided by the equipment manufacturer. The
44
45 presentation and sequencing of the acoustic stimuli were also controlled by the same
46
47 software and an appropriate interface (Med Associates). A loudspeaker located 10 cm
48
49 behind the wire mesh cage was used to deliver both the acoustic startle stimulus (100
50
51 dB; 50 ms burst of white noise; rise-decay time, 5 ms) and continuous background noise
52
53 (55 dB). The startle reaction was recorded within a time window of 100 ms after the
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 startle stimulus onset. Calibration procedures using a device provided by the
4
5 manufacturer that emulates the rat were conducted before the experiments to ensure
6
7 equivalent sensitivities of the response platforms. The rats' behavior was recorded by a
8
9 video camera (Everfocus, Duarte, CA, USA) positioned behind the stabilimeter. The
10
11 video signal was relayed to a monitor in another room via a closed circuit. A 6 W red
12
13 light bulb located inside the isolation chamber provided illumination for the camera. For
14
15 the first 2 days, the animals were placed in the stabilimeter for a 5 min habituation
16
17 period and afterward received a total of 30 startle stimuli with an interstimulus interval
18
19 of 30 s. Each matching session was 15 min in duration. For each treatment, the animals
20
21 were assigned to control or drug groups to produce, as closely as possible, the same
22
23 average startle amplitude based on the last matching day.
24
25
26
27
28

29 Training: Animals were conditioned to a light-CS in a cage (20 × 20 × 25 cm)
30
31 with side and back walls constructed of stainless steel and the ceiling and front door
32
33 constructed of transparent Plexiglas. The grid floor of this cage consisted of stainless-
34
35 steel rods spaced 1.5 cm apart. The cage was located within a ventilated and sound-
36
37 attenuated chamber (45 × 45 × 45 cm). After recovery from surgery, animals were
38
39 placed in the training cage, and each rat received 10 CS-US pairings 5 min later using a
40
41 4 s light-CS coterminating with a 1 s, 0.6 mA footshock-US. The shocks were delivered
42
43 through the training cage floor by a constant current generator built with a scrambler
44
45 (Albarsh Instruments, Porto Alegre, RGS, Brazil). The CS was a white light presented
46
47 through a 6 W, 127 V bulb located in the ceiling of the chamber. Stimulus presentation
48
49 was controlled by a microprocessor and an input/output board (Insight Equipment,
50
51 Ribeirão Preto, SP, Brazil). The intertrial interval varied randomly between 60 s and
52
53 180 s. The duration of each training session was about 20 min.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Testing: Test sessions were conducted in the same cages used for matching. The
4
5 test session was conducted without footshock presentation. The animals were placed
6
7 into the startle test cages, and after 5 min of habituation, the rats were presented with 60
8
9 startle stimuli (noise bursts) with a 30 s interstimulus interval. The startle stimulus
10
11 intensity was 100 dB. Half of the startle stimuli were presented in the absence of the CS
12
13 (noise-alone trials) to provide a baseline, and the other half were presented in the
14
15 presence of the CS (light-noise trials). In the light-noise trials, the startle stimulus was
16
17 presented at the last second of a 4 s presentation of the light-CS, similar to the training
18
19 sessions. The duration of the test session was 32 min. Startle response amplitudes
20
21 collected from this experiment were stored on a computer and transferred to Microsoft
22
23 Excel tables for offline analysis.
24
25
26
27
28
29
30
31

32 Motor performance

33
34 Open-field: This experiment was conducted in an arena consisting of a circular
35
36 enclosure made of Plexiglas (60 cm diameter, 50 cm height), with the floor divided into
37
38 12 sections. The following behavioral responses were recorded every minute for 30
39
40 min: number of crossings (number of floor sections traversed), number of rearings
41
42 (standing with the forelegs raised in the middle of the arena or against the walls), and
43
44 groomings (cleaning the head or body with the forelegs for 10 s). The rats' behavior was
45
46 recorded by a video camera positioned over the arena. The animals were first habituated
47
48 to the arena for 10 min prior to treatments. After drug injection, animals were placed
49
50 again in the middle of the arena and left for a 30 min period of free exploration.
51
52
53

54
55 Rotarod: The effects of drug treatments on motor performance were also
56
57 evaluated with a rotarod apparatus (Rota-Rod 7750; Ugo Basile, Comerio, Italy). The
58
59 day before testing, animals were placed on the rotarod (four rotations per minute). Each
60

1
2
3 time the rat fell off the rotarod, it was immediately placed back onto the rotarod until it
4
5 achieved 3 min of continuous stability. On the next day, before testing, the rats were
6
7 again placed on the rotarod. Only animals that were able to maintain their equilibrium
8
9 on the rotarod for 60 s were retained for saline or drug administrations. Testing then
10
11 commenced, and the time spent on the rotarod was measured three times 10, 20, and 30
12
13 min after microinjections. Rotarod performance was the time taken for the animal to fall
14
15 from the rod. Animals were removed from the rotarod after 3 min, which was used as
16
17 the maximal time for the test.
18
19
20
21
22
23

24 Conditioned freezing and *in vivo* microdialysis

25
26
27 Training: Animals were subjected to fear conditioning to a light-CS as described
28
29 for the FPS experiment. An exception was the control unconditioned group that
30
31 received unpaired presentations of 10 light presentations and 10 footshocks.
32
33

34
35 Testing: On the next day, the microdialysis probe was inserted into the BLA and
36
37 was perfused with Ringer's solution (147.0 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂) at
38
39 a constant flow rate of 1.5 µl/min (Microinjection pump; BAS, West Lafayette, IN,
40
41 USA). Following a 2 h equilibrium period, dialysate samples were collected every
42
43 30 min into vials containing 3 µl perchloric acid solution (0.05 M) with
44
45 dihydroxybenzylamine as the internal standard. Control levels were defined as the
46
47 average of three baseline samples. After the collection of baseline samples (considered
48
49 100%), animals received saline or quinpirole injections into the VTA and were
50
51 subjected to the conditioned fear test. Dialysate samples were then collected for
52
53 180 min. The behavioral criterion used to assess conditioned fear was the time spent
54
55 freezing during a 20 min period. Freezing was defined as the total absence of movement
56
57 of the animal with the exception of respiration.
58
59
60

1
2
3 Dopamine assay: The amount of DA in the collected samples was analyzed
4
5 using high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with electrochemical
6
7 detection (BAS). The reverse phase ODS column was a Nucleosil 150 × 3.2 mm C-18,
8
9 with 5 µm particle size (Supelco Inc., MO, USA). The HPLC system consisted of a
10
11 BAS Epsilon electrochemical detector with a glass-carbon electrode and a pump (PM-
12
13 92e; BAS). The potential was set at 650 mV (compared with the Ag-AgCl reference
14
15 electrode). The mobile phase was composed of 50 mM NaH₂PO₄, 0.1 mM Na₂-EDTA,
16
17 0.5 mM *n*-octyl sodium sulfate, and 15% methanol (pH adjusted to 5.5) and was filtered
18
19 and pumped through the system at a flow rate of 700 µl/min. The injection volume was
20
21 40 µl. This set-up allowed the analysis of DA in the dialysate in a single run, which
22
23 lasted approximately 10 min.
24
25
26
27
28
29
30

31 *Drugs*

32
33 The following drugs were used: D₁ antagonist R(+)-SCH 23390 hydrochloride
34
35 (SCH), D₂ agonist (-)-quinpirole hydrochloride (QUI), and D₂ antagonist (-)-sulpiride
36
37 (SUL). All drugs were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and dissolved in
38
39 physiological saline (SAL, 0.9%) shortly before use. Physiological saline also served as
40
41 the vehicle control. All drugs (1.0 and 2.0 µg) were administered at a constant volume
42
43 of 0.2 µl/site. Rats always received an injection 5 min before the test sessions. The
44
45 doses and time of injections were based on a previous study from our laboratory
46
47 (Oliveira et al. 2009).
48
49
50
51
52
53
54

55 *Microinjection procedure*

56
57 The injection needle was a thin dental needle (0.3 mm, outer diameter)
58
59 connected to a 10 µl Hamilton syringe by means of a polyethylene tube. The injection
60

1
2
3 needle was introduced through the guide cannula until its lower end was 1 mm below
4
5 the cannula. The solutions were injected into the BLA or VTA using an infusion pump
6
7 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). The displacement of an air bubble inside the
8
9 polyethylene catheter (PE-10; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) connecting
10
11 the syringe needle to the intracerebral needle was used to monitor the microinjection.
12
13
14 The microinjection duration was 1 min, and the needle was kept in place for an
15
16 additional 1 min to maximize diffusion away from the needle tip.
17
18
19
20
21

22 *Histology*

23
24 Upon completion of the experiments, animals were given a lethal dose of chloral
25
26 hydrate (500 mg/kg, i.p.), and 0.2 μ l of Evans Blue (2%) was microinjected into the
27
28 BLA or VTA to mark the position of the microinjection sites. Afterward, rats were
29
30 perfused transcardially with 0.9% saline followed by 4% formalin. Brains were
31
32 removed from the skulls and maintained in formalin solution for 2 h, after which the
33
34 brains were cryoprotected in 30% sucrose until soaked. Serial 60 μ m brain coronal
35
36 sections were cut using a freezing microtome and mounted on gelatin-coated slides and
37
38 stained with cresyl violet (5%; Sigma) to localize the positions of the microinjection
39
40 sites according to the atlas of Paxinos and Watson (2007).
41
42
43
44
45
46
47

48 *Statistical analysis*

49
50 Data are expressed as mean \pm SEM. For each drug treatment, a two-way
51
52 repeated-measures analysis of variance (ANOVA) was conducted on the mean startle
53
54 response, with treatment (drug, control) as the between-subjects factor and trial-type
55
56 (noise-alone, light-noise) as the within-subjects factor. A two-way repeated-measures
57
58 ANOVA was also used for the rotarod data, with treatment (drug, control) as the
59
60

1
2
3 between-subjects factor and trials (10, 20, 30 min) as the within-subjects factor. Data for
4 the DA collected from the BLA were subjected to a two-way repeated-measures
5 ANOVA, with group (conditioned, control; drug, control) as the between-subjects factor
6 and time sample of the dialysate as the within-subjects factor. Significant comparisons
7 were followed by Newman-Keuls *post hoc* test. Analysis of motor performance in the
8 open-field test was performed with a one-way ANOVA on the number of crossings,
9 rearings, and groomings. The duration of conditioned freezing was subjected to
10 Student's *t*-test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 **Results**

25 *Fear-potentiated startle and motor performance*

26
27 The injection sites of all animals used in this study were located inside the BLA.
28
29 A photomicrograph of a representative injection site and the histological localization of
30 injection sites in the BLA depicted on diagrams from Paxinos and Watson (2007) are
31 shown in Fig. 1.
32
33
34
35
36
37

38 Fig. 2A shows the mean startle amplitude for animals that received intra-BLA
39 administrations of saline, SCH 23390 1.0 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$ (SCH1), or SCH 23390 2.0 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$
40 (SCH2) before the test session. Two-way repeated-measures ANOVA revealed a
41 significant effect of trial-type ($F_{1,33} = 48.66, p < 0.05$). No significant effects of
42 treatment ($F_{2,33} = 0.99, p > 0.05$) and no treatment \times trial-type interaction ($F_{2,33} = 0.41,$
43 $p > 0.05$) were observed. Newman-Keuls *post hoc* test revealed that the light-CS
44 enhanced the startle response to noise in all groups ($p < 0.05$). Fig. 2B shows the data of
45 the animals treated with SCH 23390 in the rotarod test. Two-way repeated-measures
46 ANOVA revealed no significant effects of treatment ($F_{2,30} = 0.07, p > 0.05$) or trials
47 ($F_{2,30} = 0.26, p > 0.05$) and no treatment \times trial interaction ($F_{4,30} = 0.61, p > 0.05$). In the
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 open-field test (Fig. 2C-E), one-way ANOVA did not reveal any significant effects of
4 treatment on the number of crossings ($F_{2,15} = 0.74, p > 0.05$), rearings ($F_{2,15} = 1.16, p >$
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

open-field test (Fig. 2C-E), one-way ANOVA did not reveal any significant effects of treatment on the number of crossings ($F_{2,15} = 0.74, p > 0.05$), rearings ($F_{2,15} = 1.16, p > 0.05$), or groomings ($F_{2,15} = 2.08, p > 0.05$).

Fig. 3A shows the mean startle amplitude of animals that received intra-BLA administrations of saline, sulpiride 1.0 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$ (SUL1), or sulpiride 2.0 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$ (SUL2) before the test session. Two-way repeated-measures ANOVA revealed no significant effect of treatment ($F_{2,37} = 1.71, p > 0.05$) but a significant effect of trial-type ($F_{1,37} = 37.87, p < 0.05$) and a significant treatment \times trial-type interaction ($F_{2,37} = 3.94, p < 0.05$). Newman-Keuls *post hoc* test revealed that the light-CS enhanced the startle response to noise in the SAL and SUL1 groups ($p < 0.05$). The startle reflex to noise alone was not statistically different among groups ($p > 0.05$). The startle reflex to light-noise was attenuated by sulpiride in the SUL2 group compared with controls ($p < 0.05$). Fig. 3B displays the data from animals treated with sulpiride in the rotarod test. Two-way repeated-measures ANOVA revealed no significant effects of treatment ($F_{2,30} = 0.07, p > 0.05$) or trials ($F_{2,30} = 0.80, p > 0.05$) and no treatment \times trials interaction ($F_{4,30} = 0.89, p > 0.05$). In the open-field test (Fig. 3C-E), one-way ANOVA did not reveal any significant effects of treatment on the number of crossings ($F_{2,15} = 0.58, p > 0.05$), rearings ($F_{2,15} = 0.01, p > 0.05$), or groomings ($F_{2,15} = 0.24, p > 0.05$).

Conditioned freezing and in vivo microdialysis

The microdialysis probes of all animals used in this study were located in the BLA. The injection sites in the saline and quinpirole groups were located inside the VTA. Histological localization of probe and injection sites in the BLA and VTA, respectively, depicted on diagrams from Paxinos and Watson (2007), is shown in Fig. 4.

1
2
3 Fig. 5A illustrates the time-course of extracellular DA levels in the BLA in the
4 conditioned fear test in rats pre-exposed to paired (conditioned group) or unpaired
5 (control group) presentation of light and footshocks during a previous training session.
6 Two-way repeated-measures ANOVA revealed no significant effect of group ($F_{1,64} =$
7 $0.83, p > 0.05$) but a significant effect of time ($F_{8,64} = 5.18, p < 0.05$) and a significant
8 group \times time interaction ($F_{8,64} = 3.30, p < 0.05$). Newman-Keuls *post hoc* test revealed
9 an increase in extracellular DA levels at 30 and 60 min in the BLA in the conditioned
10 group after the animals were exposed to the light-CS. Fig. 5B shows the duration of
11 conditioned freezing exhibited by rats during the test session for the groups implanted
12 with a microdialysis probe in the BLA. Student's *t*-test revealed significant effects of
13 group on conditioned freezing, showing that rats previously subjected to paired
14 presentations of light and footshock (conditioned group) exhibited a robust increase in
15 the time spent freezing compared with controls ($t_8 = 11.74, p < 0.05$).
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 Fig. 6A illustrates the time-course of extracellular DA levels in the BLA of rats
35 conditioned to a light-CS that received intra-VTA injections of saline or quinpirole
36 before the test session. Two-way repeated-measures ANOVA revealed no significant
37 effect of group ($F_{1,72} = 1.81, p > 0.05$) but a significant effect of time ($F_{8,72} = 2.91, p <$
38 0.05) and a significant group \times time interaction ($F_{8,72} = 3.36, p < 0.05$). Newman-Keuls
39 *post hoc* test revealed an increase in extracellular DA levels at 30 and 60 min in the
40 BLA in rats that received intra-VTA saline and were exposed to the light-CS ($p < 0.05$).
41 *Post hoc* comparisons also showed that intra-VTA quinpirole blocked this increase in
42 extracellular DA levels caused by the light-CS ($p < 0.05$). Fig. 6B shows the duration of
43 conditioned freezing exhibited by rats during the test session for the groups implanted
44 with a microdialysis probe in the BLA that received intra-VTA injections of saline or
45 quinpirole. Student's *t*-test revealed significant effects of treatment on conditioned
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 freezing, indicating that quinpirole reduced the time that rats spent freezing in the
4
5 conditioned test compared with the saline group ($t_9 = 6.42, p < 0.05$).
6
7
8
9

10 Discussion

11
12 Considerable progress has been made in identifying the neural processes that
13 regulate neurobiological responses provoked by aversive environmental stimuli, and a
14 growing body of evidence suggests that the amygdala is an essential component of the
15 highly integrated neural circuitry underlying fear states. The present study explored how
16 dopaminergic mechanisms in the BLA modulate the expression of conditioned fear
17 responses to an explicit cue.
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 FPS produced by a light-CS previously paired with footshocks did not change in
28 animals that received pretest intra-BLA injections of SCH 23390, a D₁ antagonist. The
29 doses of SCH 23390 used here were selected on the basis of previous studies showing
30 that intra-amygdala infusion of 2.0 µg SCH 23390 affected conditioned fear (Guarraci
31 et al. 1999a, b; Macedo et al. 2007). The present data indicate that BLA D₁ receptors do
32 not appear to be involved in the expression of FPS and extend, to the BLA, previous
33 findings from our laboratory demonstrating that systemic dopaminergic D₁ drugs do not
34 affect conditioned fear to a light-CS evaluated by the FPS test (Oliveira et al. 2006).
35 Our results, however, cannot be generalized to other regions of the amygdala. Lamont
36 and Kokkinidis (1998) showed that intra-amygdalar SCH 23390 attenuated the
37 expression of FPS. Based on the microinjection sites and 1.0 µl infusion volume used
38 by these authors, the SCH 23390 used in that study may have interacted with DA D₁
39 receptors throughout the amygdala. SCH 23390 had no effects in the BLA in the present
40 study, suggesting that the effect reported by Lamont and Kokkinidis (1998) could be
41 attributable to an action within the central nucleus of the amygdala.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

However, intra-BLA pretest injections of sulpiride, a D₂ antagonist, dose-dependently inhibited FPS produced by a light-CS previously paired with footshocks. Rats showed normal baseline acoustic startle responding (noise-alone) after sulpiride administration, indicating that the decrease in FPS was not associated with impaired sensory gating. The observed effects of sulpiride also cannot be attributed to nonspecific effects because this drug did not affect motor performance in the open-field and rotarod tests. *In situ* hybridization has shown that the amygdala has a rich distribution of DA D₂ receptors (Meador-Woodruff et al. 1991). The selectivity of the effects produced by the D₂ antagonist sulpiride in the present study is further supported by the lack of effects of pretest intra-BLA injections of the D₁ antagonist SCH 23390 on FPS. These present findings stress the importance of BLA D₂ receptors in the fear-activating effects of Pavlovian conditioning.

CS-induced enhancement of acoustic startle amplitudes indicates the fear-evoking properties of the light acquired during classical conditioning, and the sulpiride results suggest that DA D₂ receptors contribute to the BLA neurocircuitry that mediates this excitatory conditioned fear response. In the present study, sulpiride had an effect similar to the one reported for intra-VTA quinpirole microinjections (Oliveira et al. 2009). The present data corroborate the possibility that quinpirole's ability to decrease FPS is the result of an action on VTA D₂ presynaptic dopaminergic receptors that decrease dopamine levels in the terminal fields of DA neurons originating in the VTA. The present results also indicate that interference with the ability of the fear-evoking CS to activate BLA DA neurons reduces fear. Thus, conditioned fear appears to increase DA metabolism in the BLA. This hypothesis is further supported by the present microdialysis data showing that a light-CS increased DA levels in the BLA in rats previously subjected to paired presentations of light and footshocks and that this

1
2
3 increase is inhibited by intra-VTA quinpirole administration. Thus, the fear response to
4
5 a light-CS depends on activation of VTA/BLA dopaminergic connections and can be
6
7 specifically modulated by manipulating this system. Although our results implicate a
8
9 VTA/BLA DA pathway in the expression of fear, a specific role for additional DA areas
10
11 that receive projections from the VTA in conditioned fear remains to be investigated. In
12
13 fact, an aversive CS also increases DA levels in the nucleus accumbens (Martinez et al.
14
15 2008).

16
17
18
19
20 Importantly, several procedural confounds may underlie the conflicting results
21
22 of studies exploring dopaminergic systems and fear. Specifically, pharmacological
23
24 manipulations of the dopaminergic system on the test day could interfere with
25
26 conditioned responding by altering CS processing. Arguing against this possibility are
27
28 the results from the present study showing that sulpiride did not change the baseline
29
30 response to noise-alone in the FPS test. Another source of discrepant interpretations
31
32 may be that most dopaminergic manipulations cause unconditioned changes in
33
34 behavior. Thus, these changes could indirectly compete with the expression of fear
35
36 responses, leading to the mistaken conclusion that these dopaminergic manipulations
37
38 directly affected fear. Again, arguing against this possibility is the lack of effects of
39
40 sulpiride on motor performance assessed by the open-field and rotarod tests in the
41
42 present study.

43
44
45
46
47
48 Although the mesolimbic dopaminergic pathway is more commonly associated
49
50 with the reinforcing effects of various stimuli, we demonstrate that dopaminergic
51
52 projections between the VTA/BLA are required for aversive Pavlovian conditioning.
53
54 These results raise the issue of how distinct stimuli are interpreted differently as
55
56 aversive or appetitive. One cannot rule out the possibility that specific regions of the
57
58 neural substrates belonging to the mesolimbic pathway respond differently to events
59
60

1
2
3 with distinct biological salience. This may not be the case, however, because the
4
5 mesolimbic pathway appears to be a versatile pathway, activated by a wide range of
6
7 salient events (Horvitz 2000). An interaction between dopaminergic activity in the
8
9 mesolimbic pathway and other systems mediated by other neurotransmitters or
10
11 neurohormones may underlie the behavioral response exhibited by animals depending
12
13 on the environmental context, whether aversive or reinforcing. Thus, activation of the
14
15 VTA/BLA dopaminergic projection associated with activation of the hypothalamic-
16
17 pituitary-adrenal axis may determine aversive states (Sapolsky 2009).
18
19
20
21

22 The present findings are consistent with data showing that blockade of D₂-
23
24 mediated mechanisms in the BLA decreases fear by impairing the retrieval of a learned
25
26 association between a light-CS and a footshock-US (Nader and LeDoux 1999a, b).
27
28 Heightened attentional and cognitive function of dopaminergic mechanisms in the
29
30 mesocorticolimbic system have been proposed to set up adaptive responses to cope with
31
32 or signal the presence of aversive stimuli. These findings may have clinical implications
33
34 by highlighting where and how mechanisms mediated by DA D₂ receptors participate
35
36 decisively in the expression of conditioned fear. Previous research from our laboratory
37
38 revealed the importance of VTA DA neurons in the expression of conditioned fear
39
40 (Oliveira et al. 2009). The present sulpiride results suggest that, through D₂ receptors,
41
42 DA interacts with the neural mechanisms in the BLA that mediate the Pavlovian fear-
43
44 conditioned increase in the amplitude of the acoustic startle reflex. Thus, activation of
45
46 the VTA upregulates the BLA DA system which, through a D₂-dependent mechanism,
47
48 controls the expression of conditioned fear. The effects of sulpiride, plus the fact that
49
50 BLA D₁ receptors do not appear to be involved in the expression of FPS, supports the
51
52 hypothesis that D₂ receptors at the level of the BLA regulate FPS caused by
53
54 light/footshock associations.
55
56
57
58
59
60

Acknowledgements

Research was supported by FAPESP (Proc No. 06/06354-5) and CNPq (Proc No. 472029/2006-0). A.R. Oliveira holds a Doctor scholarship from FAPESP, and A.E. Reimer holds a Doctor scholarship from CNPq. M.A. de Souza Silva was supported by a grant from Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG DE 792/2-4).

References

- Berg WK, Davis M (1984) Diazepam blocks fear-enhanced startle elicited electrically from the brainstem. *Physiol Behav* 32:333-336.
- Brandão ML, Cardoso SH, Melo LL, Motta V, Coimbra NC (1994) Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav Rev* 18:339-346.
- Brandão ML, Anseloni VZ, Pandóssio JE, De Araújo JE, Castilho VM (1999) Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci Biobehav Rev* 23:863-875.
- Brandão ML, Troncoso AC, de Souza Silva MA, Huston JP (2003) The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. *Eur J Pharmacol* 463:225-233.
- Brandão ML, Borelli KG, Nobre MJ, Santos JM, Albrechet-Souza L, Oliveira AR, Martinez RC (2005) Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1299-1311.
- Brodkin J, Busse C, Sukoff SJ, Varney MA (2002) Anxiolytic-like activity of the mGluR5 antagonist MPEP: a comparison with diazepam and buspirone. *Pharmacol Biochem Behav* 73:359-366.

- 1
2
3 Brown JS, Kalish HI, Farber IE (1951) Conditioned fear as revealed by magnitude of
4
5 startle response to an auditory stimulus. *J Exp Psychol* 41:317-328.
6
7
8 Davis M (1979) Diazepam and flurazepam: effects on conditioned fear as measured
9
10 with the potentiated startle paradigm. *Psychopharmacology (Berl)* 62:1-7.
11
12 Davis M (1992) The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for
13
14 animal models of anxiety. *Trends Pharmacol Sci* 13:35-41.
15
16
17 Davis M, Falls WA, Campeau S, Kim M (1993) Fear-potentiated startle: a neural and
18
19 pharmacological analysis. *Behav Brain Res* 58:175-198.
20
21
22 Deutch AY, Tam SY, Roth RH (1985) Footshock and conditioned stress increase 3,4-
23
24 dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in the ventral tegmental area but not
25
26 substantia nigra. *Brain Res* 333:143-146.
27
28
29 Feenstra MGP, Botterblom MHA, Van Uum JFM (1995) Novelty-induced increase in
30
31 dopamine release in the rat prefrontal cortex in vivo: inhibition by diazepam.
32
33 *Neurosci Lett* 189:81-84.
34
35
36 Fendt M, Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of
37
38 conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23:743-760.
39
40
41 Finlay JM, Zigmond MJ, Abercrombie ED (1995) Increased dopamine and
42
43 norepinephrine release in medial prefrontal cortex induced by acute and chronic
44
45 stress: effects of diazepam. *Neuroscience* 64:619-628.
46
47
48 Fleshler M (1965) Adequate acoustic stimulus for startle reaction in the rat. *J Comp*
49
50 *Physiol Psychol* 60:200-207.
51
52
53 Fletcher GH, Starr MS (1988) Intracerebral SCH 23390 and catalepsy in the rat. *Eur J*
54
55 *Pharmacol* 149:175-178.
56
57
58 Greba Q, Kokkinidis L (2000) Peripheral and intramygdalar administration of the
59
60 dopamine D₁ receptor antagonist SCH 23390 blocks fear-potentiated startle but

- 1
2
3 not shock reactivity or the shock sensitization of acoustic startle. Behav
4
5 Neurosci 114:262-272.
6
7
8 Greba Q, Gifkins A, Kokkinidis L (2001) Inhibition of amygdaloid dopamine D₂
9
10 receptors impairs emotional learning measured with fear-potentiated startle.
11
12 Brain Res 899:218-226.
13
14
15 Guarraci FA, Kapp BS (1999) An electrophysiological characterization of ventral
16
17 tegmental area dopaminergic neurons during differential Pavlovian fear
18
19 conditioning in the awake rabbit. Behav Brain Res 99:169-179.
20
21
22 Guarraci FA, Frohardt RJ, Yang SL, Kapp BS (1999a) A functional role for dopamine
23
24 transmission in the amygdala during conditioned fear. Ann N Y Acad Sci
25
26 877:732-736.
27
28
29 Guarraci FA, Frohardt RJ, Kapp BS (1999b) Amygdaloid D₁ dopamine receptor
30
31 involvement in Pavlovian fear conditioning. Brain Res 827:28-40.
32
33
34 Guarraci FA, Frohardt RJ, Falls WA, Kapp BS (2000) The effects of intra-amygdaloid
35
36 infusions of a D₂ dopamine receptor antagonist on Pavlovian fear conditioning.
37
38 Behav Neurosci 114:647-651.
39
40
41 Horvitz JC (2000) Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient
42
43 non-reward events. Neuroscience 96:651-656.
44
45
46 Hyttel J (1983) SCH 23390: the first selective dopamine D₁ antagonist. Eur J Pharmacol
47
48 91:153-154.
49
50
51 Keabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. Nature 277:93-96.
52
53
54 Koch M (1999) The neurobiology of startle. Prog Neurobiol 59:107-128.
55
56
57 Lamont EW, Kokkinidis L (1998) Infusion of the dopamine D₁ receptor antagonist SCH
58
59 23390 into the amygdala blocks fear expression in a potentiated startle
60
paradigm. Brain Res 795:128-136.

- 1
2
3 LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ (1988) Different projections of the central
4
5 amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned
6
7 fear. *J Neurosci* 8:2517-2529.
8
9
10 LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.
11
12 Macedo CE, Martinez RC, Albrechet-Souza L, Molina VA, Brandão ML (2007) 5-HT₂-
13
14 and D₁-mechanisms of the basolateral nucleus of the amygdala enhance
15
16 conditioned fear and impair unconditioned fear. *Behav Brain Res* 177:100-108.
17
18
19 Martinez RC, Oliveira AR, Macedo CE, Molina VA, Brandão ML (2008) Involvement
20
21 of dopaminergic mechanisms in the nucleus accumbens core and shell
22
23 subregions in the expression of fear conditioning. *Neurosci Lett* 446:112-116.
24
25
26 Meador-Woodruff JH, Mansour A, Healy DJ, Kuehn R, Zhou QY, Bunzow JR, Akil H,
27
28 Civelli O, Watson SJ Jr (1991) Comparison of the distributions of D₁ and D₂
29
30 dopamine receptor mRNAs in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 5:231-242.
31
32
33 Millan MJ (2003) The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol*
34
35 70:83-244.
36
37
38 Nader K, LeDoux JE (1999a) The dopaminergic modulation of fear: quinpirole impairs
39
40 the recall of emotional memories in rats. *Behav Neurosci* 113:152-165.
41
42
43 Nader K, LeDoux JE (1999b) Inhibition of the mesoamygdala dopaminergic pathway
44
45 impairs the retrieval of conditioned fear associations. *Behav Neurosci* 113:891-
46
47 901.
48
49
50 Oades RD, Halliday GM (1987) Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1.
51
52 Anatomy and connectivity. *Brain Res* 434:117-165.
53
54
55 Oliveira AR, Reimer AE, Brandão ML (2006) Dopamine D₂ receptor mechanisms in the
56
57 expression of conditioned fear. *Pharmacol Biochem Behav* 84:102-111.
58
59
60

- 1
2
3 Oliveira AR, Reimer AE, Brandão ML (2009) Role of dopamine receptors in the ventral
4 tegmental area in conditioned fear. *Behav Brain Res* 199:271-277.
5
6
7
8 Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th edn. Academic
9 Press, San Diego.
10
11
12 Pezze MA, Feldon J (2004) Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning.
13 *Prog Neurobiol* 74:301-320.
14
15
16
17 Pilz PKD, Schnitzler HU (1996) Habituation and sensitization of the acoustic startle
18 response in rats: amplitude, threshold and latency measures. *Neurobiol Learn*
19 *Mem* 66:67-79.
20
21
22
23
24 Reimer AE, Oliveira AR, Brandão ML (2008) Selective involvement of GABAergic
25 mechanisms of the dorsal periaqueductal gray and inferior colliculus on the
26 memory of the contextual fear as assessed by the fear potentiated startle test.
27 *Brain Res Bull* 76:545-550.
28
29
30
31
32
33
34 Santos JM, Gárgaro AC, Oliveira AR, Masson S, Brandão ML (2005). Pharmacological
35 dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing
36 behavior and fear-potentiated startle. *Eur Neuropsychopharmacol* 15:239-246.
37
38
39
40
41 Sapolsky R (2009) Any kind of mother in a storm. *Nature Neurosci* 12:1355-1356.
42
43
44 Standish-Barry HMAS, Bouras N, Bridges PK, Watson JP (1983) A randomized double
45 blind group comparative study of sulpiride and amitriptyline in affective
46 disorder. *Psychopharmacology (Berl)* 81:258-260.
47
48
49
50
51 Swanson LW (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions:
52 a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the
53 rat. *Brain Res Bull* 9:321-353.
54
55
56
57
58 Vallone D, Picetti R, Borrelli E (2000) Structure and function of dopamine receptors.
59 *Neurosci Biobehav Rev* 24:125-132.
60

1
2
3 White FJ, Wang RY (1984a) Differential effects of classical and atypical antipsychotic
4
5 drugs on A9 and A10 dopamine neurons. *Science* 221:1054-1057.
6
7

8 White FJ, Wang RY (1984b) Pharmacological characterization of dopamine
9
10 autoreceptors in the rat ventral tegmental area: microiontophoretic studies. *J*
11
12 *Pharmacol Exp Ther* 231:275-280.
13
14

15 Yeomans JS, Frankland PW (1996) The acoustic startle reflex: neurons and
16
17 connections. *Brain Res Rev* 21:301-314.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure Legends

Fig. 1. Photomicrograph showing representative injection sites in the basolateral amygdala (a) and outline of injection sites (b) on cross-sections from Paxinos and Watson (2007). The number of points in the figure is less than the total number of rats used because of several overlaps. Scale bar = 0.5 mm. CA3, field CA3 of the hippocampus; VPM, ventral posteromedial thalamic nucleus; ec, external capsule; MeP, medial amygdaloid nuclei.

Fig. 2. Mean startle amplitude of rats treated with SCH 23390 (1.0 and 2.0 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$) before testing session (a). Motor performance (mean + SEM) of animals treated with SCH 23390 in the rotarod (b) and open-field (c-e) tests. [#] $p < 0.05$, different from noise-alone condition (Newman-Keuls *post hoc* test). SAL, $n = 13$; SCH1, $n = 11$; SCH2, $n = 12$ in the fear-potentiated startle test. $n = 6$ for all groups in the rotarod and open-field tests.

Fig. 3. Mean startle amplitude of rats treated with sulpiride (1.0 and 2.0 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$) before the test session (a). Motor performance (mean + SEM) of animals treated with sulpiride in the rotarod (b) and open-field (c-e) tests. [#] $p < 0.05$, different from noise-alone condition; ^{*} $p < 0.05$, different from control group (Newman-Keuls *post hoc* test). SAL, $n = 14$; SUL1, $n = 13$; SUL2, $n = 13$ in the fear-potentiated startle test. $n = 6$ for all groups in the rotarod and open-field tests.

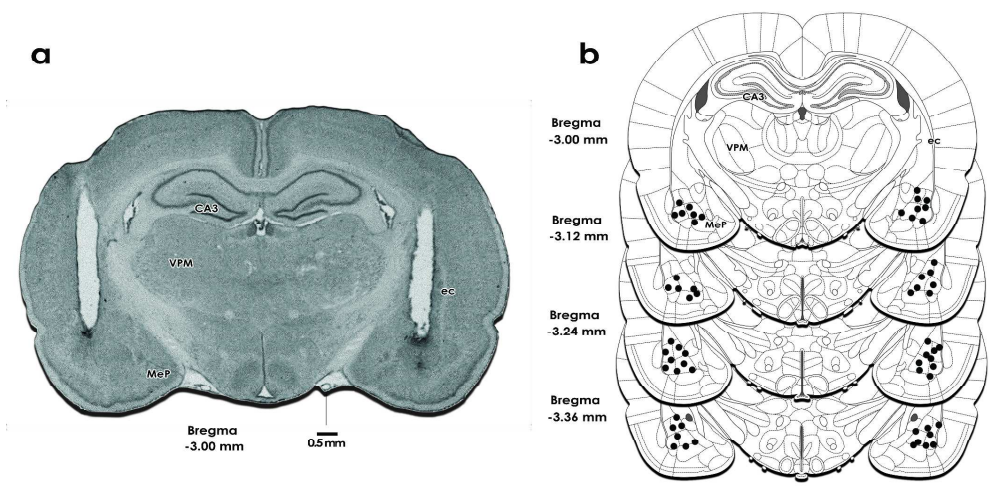
Fig. 4. Outline of probe locations in the basolateral amygdala (a) and injection sites in the ventral tegmental area (b) on cross-sections from Paxinos and Watson (2007). CA3,

1
2
3 field CA3 of the hippocampus; VPM, ventral posteromedial thalamic nucleus; ec,
4 external capsule; MeP, medial amygdaloid nuclei; DMPAG, dorsomedial
5
6
7 periaqueductal gray; CLi, caudal linear nucleus of the raphe; Pn, pontine nuclei.
8
9

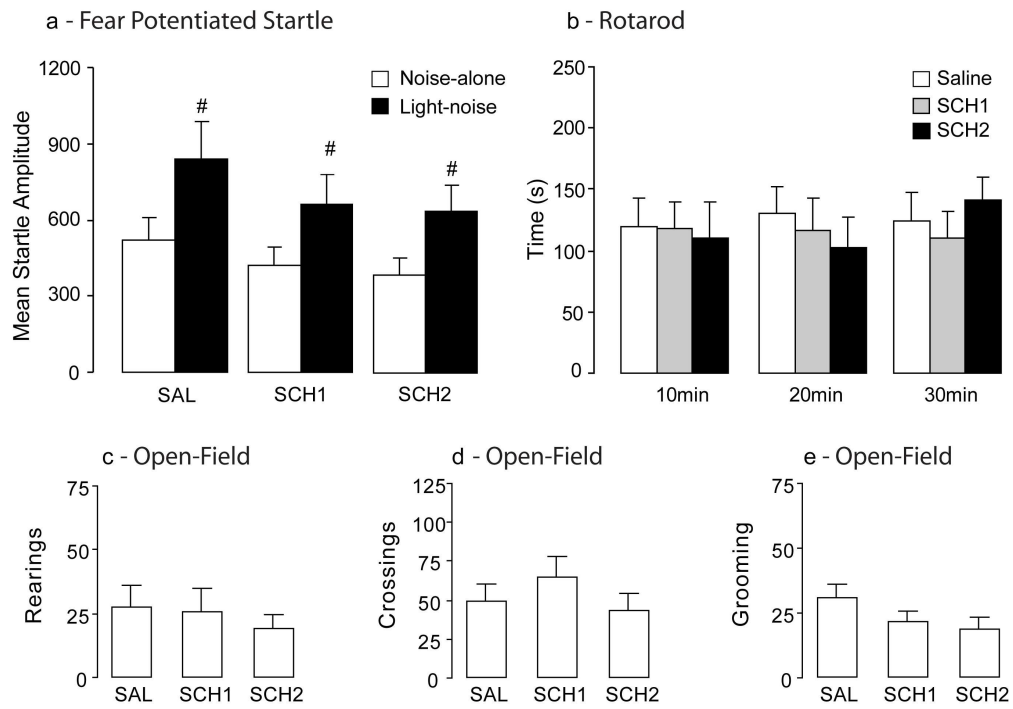
10
11
12 Fig. 5. Extracellular levels of dopamine (DA) in the BLA in rats previously subjected to
13 paired (conditioned) or unpaired (control) exposure to light and footshocks and exposed
14 to the light-CS in the fear conditioning test (a). Conditioned freezing behavior
15 (mean \pm SEM) during the 20 min period of the light-CS test session (b). $^{\#}p < 0.05$,
16 different from baseline (-60, -30, and 0 min); $*p < 0.05$, different from control group
17 (Newman-Keuls *post hoc* test). $n = 5$ for both groups.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

29 Fig. 6. Extracellular levels of dopamine (DA) in the BLA of rats previously subjected to
30 fear conditioning and receiving pretest intra-VTA injections of saline or quinpirole (a).
31 Conditioned freezing behavior (mean \pm SEM) during the 20 min period of the light-CS
32 test session (b). $^{\#}p < 0.05$, different from baseline (-60, -30, and 0 min); $*p < 0.05$,
33 different from control group (Newman-Keuls *post hoc* test). Saline, $n = 6$; quinpirole, n
34 = 5.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



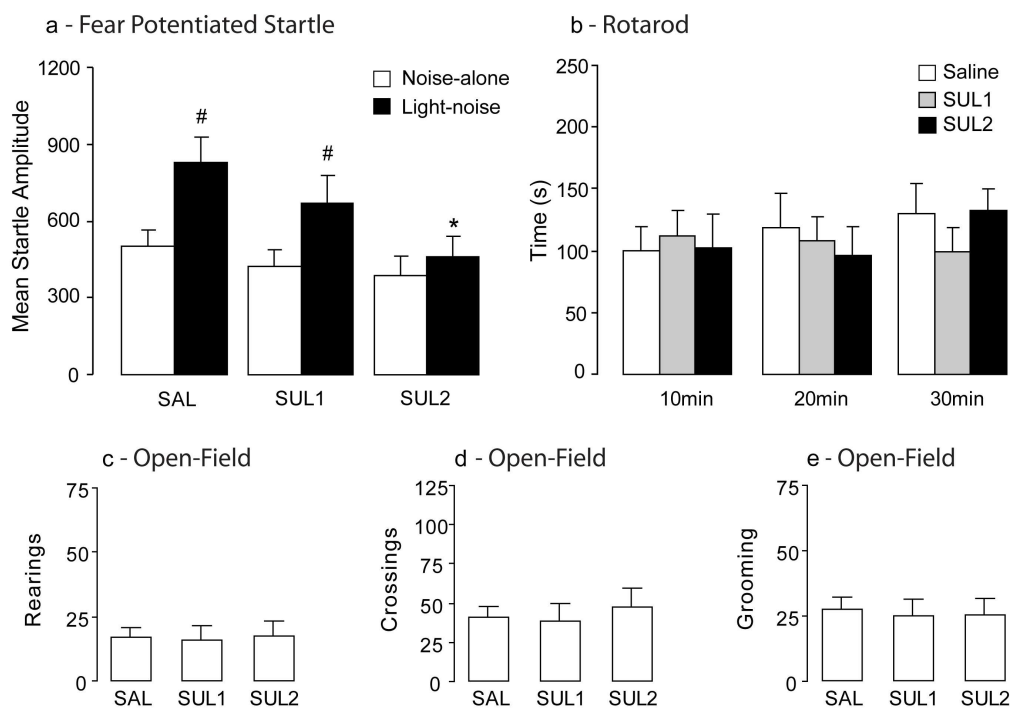
360x175mm (300 x 300 DPI)



230x161mm (300 x 300 DPI)

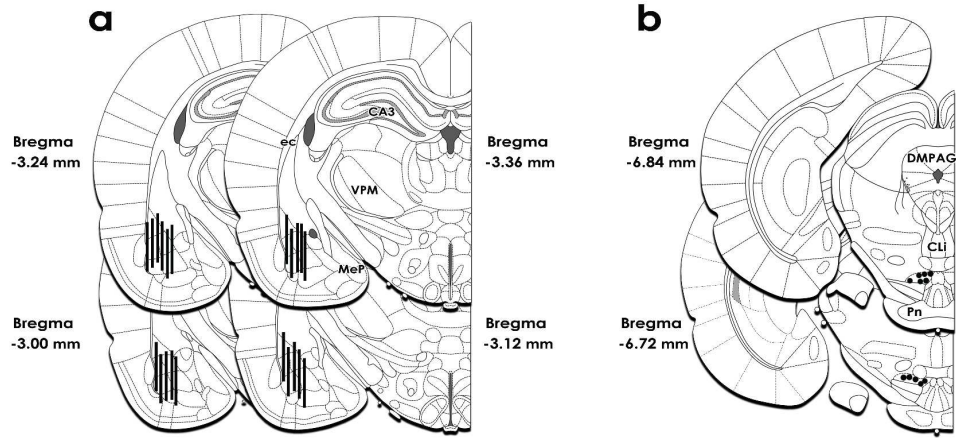
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



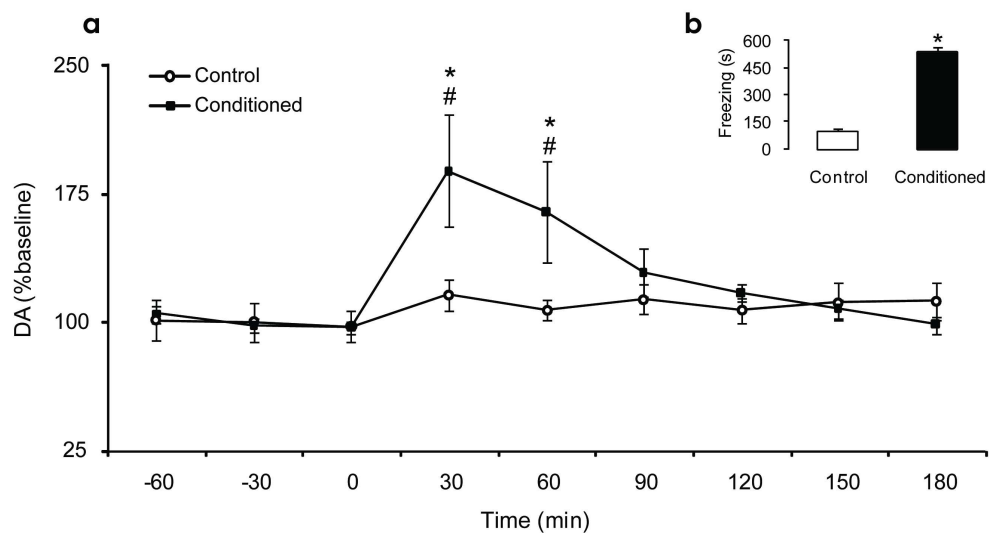
229x160mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

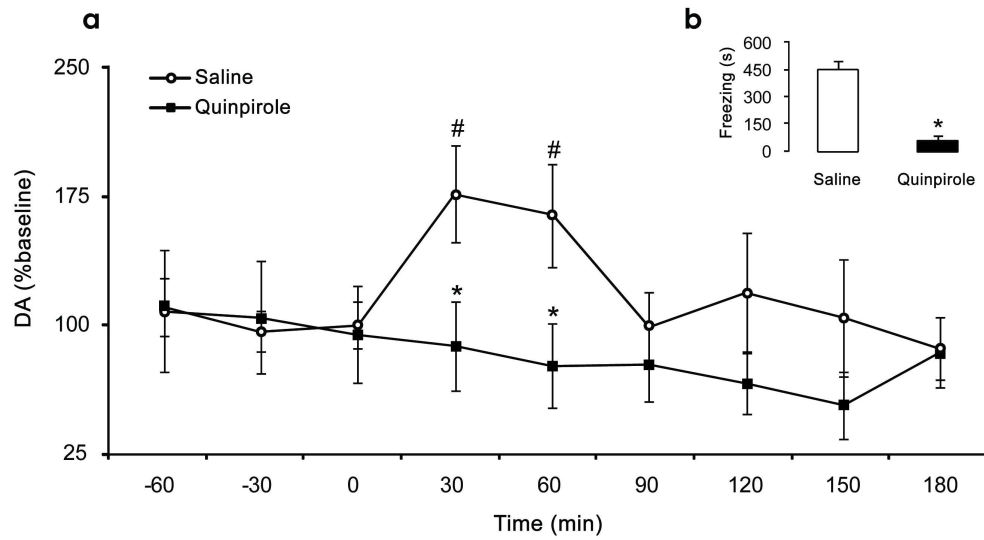


295x145mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



226x124mm (300 x 300 DPI)



226x125mm (300 x 300 DPI)