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

ADRIANO EDGAR REIMER

**Envolvimento de mecanismos glutamatérgicos da substância
cinzenta periaquedutal dorsal e do hipotálamo medial no medo
condicionado à luz**

**RIBEIRÃO PRETO
-2012-**

ADRIANO EDGAR REIMER

**Envolvimento de mecanismos glutamatérgicos da substância
cinzenta periaquedutal dorsal e do hipotálamo medial no medo
condicionado à luz**

**Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo como parte das
exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.**

Área de Concentração: Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão

**RIBEIRÃO PRETO
-2012-**

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

Reimer, Adriano Edgar

Envolvimento de mecanismos glutamatérgicos da substância cinzenta periaquedutal dorsal e do hipotálamo medial no medo condicionado à luz, Ribeirão Preto, 2012. 123p. :il.; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP – Área de Concentração: Psicobiologia.
Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão.

1. Substância cinzenta periaquedutal dorsal. 2. Hipotálamo medial. 3. Glutamato. 4. Medo condicionado. 5. Sobressalto potencializado pelo medo. 6. Congelamento.

Nome: REIMER, Adriano Edgar

Título: Envolvimento de mecanismos glutamatérgicos da substância cinzenta periaquedutal dorsal e do hipotálamo medial no medo condicionado à luz

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

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

*A meus pais, Fátima e Cristiano,
pela confiança, dedicação e apoio
irrestritos.*

Dedico.

Ao Prof. Dr. Marcus Lira Brandão, pela orientação, incentivo, paciência e exemplo.
Aos membros da banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura e correção desta tese
Aos colegas de laboratório, pelo convívio e apoio.
À minha avó Isabel e minha irmã Cristiane pelo carinho e torcida.
À Amanda de Oliveira, pelo auxílio, paciência e modelo de dedicação.
Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Agradeço.

RESUMO

REIMER, A.E. Envolvimento de mecanismos glutamatérgicos da substância cinzenta periaquedutal dorsal e do hipotálamo medial no medo condicionado à luz. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A substância cinzenta periaquedutal dorsal (dPAG) e o hipotálamo medial (MH) são duas estruturas encefálicas que estão envolvidas na elaboração de estados aversivos e expressão de respostas defensivas. A estimulação elétrica da dPAG ou do MH produz uma série de respostas comportamentais que se assemelham às respostas defensivas induzidas pela presença de um predador. Esses mesmos comportamentos podem ser eliciados com a microinjeção local de agonistas glutamatérgicos nessas estruturas, indicando o envolvimento de aminoácidos excitatórios na expressão das respostas defensivas incondicionadas. Apesar disso, a participação destas estruturas no medo condicionado ainda é pouco conhecida. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o envolvimento da mediação glutamatérgica da dPAG e de núcleos do MH – núcleo anterior (AH) e núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) – na expressão do medo condicionado à luz. Para isso, foram avaliados os efeitos de agonistas e antagonistas glutamatérgicos (AMPA/Cainato e NMDA) administrados nessas estruturas no teste do sobressalto potencializado pelo medo (SPM) e na medida de congelamento condicionado. Ratos *Wistar* machos com cânulas-guias implantadas na dPAG, AH ou PMd foram submetidos ao condicionamento aversivo (pareamentos luz+choque). Vinte e quatro horas depois, esses animais receberam injeções intra-dPAG, AH ou PMd de NMDA ou ácido caínico (agonistas NMDA e AMPA/Cainato, respectivamente) ou AP7 ou NBQX (antagonistas NMDA e AMPA/Cainato, respectivamente) e foram submetidos ao teste do SPM. A resposta de congelamento condicionado foi avaliada na mesma sessão. Eventuais alterações motoras foram avaliadas no teste do campo aberto. A administração dos agonistas glutamatérgicos na dPAG promoveu efeitos pró-aversivos no SPM e congelamento condicionado. NBQX sozinho não produziu nenhum efeito significativo, ao passo que o AP7 diminuiu somente o congelamento condicionado. Entretanto, ambos os antagonistas bloquearam os efeitos dos respectivos agonistas. Já a administração dos agonistas e antagonistas glutamatérgicos no AH e PMd, em doses que não afetaram a atividade motora, não produziu efeitos significativos na resposta de congelamento condicionado e SPM. Os presentes resultados sugerem a participação de aminoácidos excitatórios da dPAG, mas não do MH, na expressão do medo condicionado à luz.

Palavras-chave: Substância cinzenta periaquedutal dorsal; Hipotálamo medial; Glutamato; Medo condicionado; Sobressalto potencializado pelo medo; Congelamento.

ABSTRACT

REIMER, A.E. Involvement of glutamatergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray matter and medial hypothalamus in conditioned fear to the light. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The dorsal periaqueductal gray matter (dPAG) and the medial hypothalamus (MH) are two brain structures that are involved in the elaboration of aversive states and expression of defensive responses. Electrical stimulation of the dPAG or MH produces a series of behavioral responses that resemble those defensive responses triggered in the presence of a predator. These same behaviors can be elicited with the local microinjection of glutamate agonists into these structures, indicating the involvement of excitatory amino acids in the expression of unconditioned fear responses. Nevertheless, the involvement of these structures in fear conditioning is still unknown. The objective of this study was to evaluate the involvement of glutamatergic mediation of the dPAG and MH nuclei – anterior nucleus (AH) and dorsal pre-mammillary nucleus (PMd) – in the expression of conditioned fear to the light. Thus, we evaluated the effects of glutamatergic agonists and antagonists (AMPA/Kainate and NMDA) administered into these structures in fear potentiated startle (FPS) and conditioned freezing responses to the light. Male Wistar rats with guide-cannulae implanted in the dPAG, AH or PMd were subjected to aversive conditioning (light+shock pairings). Twenty-four hours later, the animals were injected intra-dPAG, AH or PMd with NMDA or kainic acid (NMDA and AMPA/Kainate agonists, respectively) or AP7 or NBQX (NMDA and AMPA/Kainate antagonists, respectively) and were subjected to the FPS test. The conditioned freezing response was measured in the same session. Potential motor effects were evaluated with the open-field test. The administration of glutamate agonists into the dPAG promoted pro-aversive effects in the FPS and conditioned freezing. NBQX produced no significant effect *per se*, whereas AP7 only decreased conditioned freezing. Both antagonists blocked the effects of the respective agonist. On the other hand, the administration of glutamatergic agonists and antagonists into AH and PMd, in doses that did not affect motor activity, produced no significant effects on conditioned fear responses. The present results suggest the involvement of mechanisms mediated by excitatory amino acids of the dPAG, but not of the MH, in the expression of conditioned fear responses to light.

Keywords: Dorsal periaqueductal gray matter; Medial hypothalamus; Glutamate; Fear conditioning; Fear potentiated startle; Conditioned freezing.

LISTA DE SIGLAS

- Estruturas encefálicas*

AH	<i>Anterior hypothalamic nucleus</i> Núcleo anterior do hipotálamo medial
dPAG	<i>Dorsal periaqueductal gray matter</i> Substância cinzenta periaquedutal dorsal
MH	<i>Medial hypothalamus</i> Hipotálamo medial
PAG	<i>Periaqueductal gray matter</i> Substância cinzenta periaquedutal
PMd	<i>Premammillary nucleus, dorsal part</i> Núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo
PnC	<i>Caudal pontine reticular nucleus</i> Núcleo reticular caudal da ponte
VMHDM	<i>Ventromedial hypothalamic nucleus</i> Núcleo ventromedial do hipotálamo, parte dorsomedial

- Demais siglas

CS	<i>Conditioned stimulus</i> Estímulo condicionado
SEA	Sistema encefálico da aversão
SIC	Sistema de inibição comportamental
US	<i>Unconditioned stimulus</i> Estímulo incondicionado

* siglas baseadas na nomenclatura adotada por Paxinos e Watson (2007).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal	17
1.2. Hipotálamo Medial	20
1.3. Neurotransmissão Glutamatérgica	23
2. OBJETIVOS	27
3. EXPERIMENTO I - Envolvimento da Neurotransmissão Glutamatérgica da dPAG no Medo Condicionado à Luz.....	29
3.1. Material e Métodos	29
3.1.1. Animais	29
3.1.2. Cirurgia	29
3.1.3. Drogas	30
3.1.4. Microinjeções	31
3.1.5. Equipamentos	31
3.1.6. Procedimento Experimental	34
3.1.7. Histologia	36
3.1.8. Análise Estatística	36
3.2. Resultados	37
3.2.1. Localização dos Sítios de Microinjeção	37
3.2.2. Receptores AMPA/Cainato	38
3.2.3. Receptores NMDA	41
3.3. Discussão	44
4. EXPERIMENTO II - Envolvimento da Neurotransmissão Glutamatérgica do AH e do PMd no Medo Condicionado à Luz	52
4.1. Material e Métodos	52
4.1.1. Animais	52
4.1.2. Cirurgia	52
4.1.3. Drogas	52
4.1.4. Microinjeções	53
4.1.5. Equipamentos, Procedimento Experimental, Histologia	53
4.1.6. Análise Estatística	53
4.2. Resultados	53

4.2.1. Núcleo Anterior do Hipotálamo Medial (AH)	53
4.2.1.1 Localização dos Sítios de Microinjeção	53
4.2.1.2. Receptores AMPA/Cainato	54
4.2.1.3. Receptores NMDA	57
4.2.2. Núcleo Pré-Mamilar Dorsal do Hipotálamo (PMd)	60
4.2.2.1. Localização dos Sítios de Microinjeção	60
4.2.2.2. Receptores AMPA/Cainato	61
4.2.2.3. Receptores NMDA	64
4.3. Discussão	67
5. DISCUSSÃO GERAL	73
6. CONCLUSÕES.....	77
BIBLIOGRAFIA	79
APÊNDICE	93
APÊNDICE A - Avaliação do Paradigma de Medo Condicionado	93
APÊNDICE B - Efeitos dos Agonistas e Antagonistas Glutamatérgicos no AH e PMd no Teste do Campo Aberto – Doses Adicionais	97
APÊNDICE C - Artigo: Glutamatergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray matter modulate the expression of conditioned freezing and fear-potentiated startle.....	111
ANEXO.....	123

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Diante de um estímulo ameaçador que possa comprometer sua integridade física, os animais manifestam um complexo conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de defesa e um estado emocional de medo. Tais respostas defensivas e seus circuitos neurais foram sendo selecionados e acabaram por contribuir para o sucesso evolutivo das espécies atualmente existentes. Dentre essas respostas, destacam-se a interrupção do comportamento motor em curso, vocalização, midríase, hipersensibilidade a estímulos sensoriais, alterações na frequência cardíaca, pressão sanguínea e frequência respiratória, aumento da atenção, além de alterações nas expressões faciais em primatas (BLANCHARD; BLANCHARD, 1969a; 1969b; BOLLES, 1970; NISSEN, 1946; RIESS, 1945).

Qual comportamento de defesa é adotado em uma dada situação de perigo depende da espécie do animal e da relação espacial e temporal existente entre o animal e o perigo (BLANCHARD; FLANNELLY; BLANCHARD, 1986; MCNAUGHTON; CORR, 2004). Mas, apesar do comportamento defensivo e da natureza dos sinais de ameaça variarem entre as espécies animais, algumas estratégias comportamentais padronizadas são adotadas em função dos diferentes níveis de ameaça com os quais os animais defrontam-se no seu ambiente. Tais riscos podem ser representados por estímulos aversivos incondicionados, como um predador ou um agressor da mesma espécie (BLANCHARD; BLANCHARD, 1971; BLANCHARD; MAST; BLANCHARD, 1975), ou por estímulos inicialmente neutros que por associação com estímulos dolorosos ou outras sensações igualmente desagradáveis adquirem propriedades aversivas condicionadas (DAVIS, 1992; FANSELOW, 1984; LEDOUX, 2000).

Apesar de sua complexidade, o medo pode ser estudado em laboratório por meio da análise das respostas defensivas exibidas por animais expostos a diversas situações aversivas.

Por exemplo, o medo incondicionado pode ser avaliado por meio da análise qualitativa e quantitativa da resposta defensiva induzida pela exposição do animal ao seu predador natural ou pela estimulação elétrica ou química de estruturas encefálicas que regulam o comportamento defensivo (BLANCHARD; BLANCHARD, 1971; BOLLES, 1970; REIMER; DE OLIVEIRA; BRANDÃO, 2009). Por outro lado, no paradigma do medo condicionado o sujeito é treinado a associar um estímulo inicialmente neutro a um estímulo aversivo incondicionado (US), como choques nas patas. Após alguns pareamentos, o estímulo neutro torna-se um estímulo condicionado (CS) e, por si só, é capaz de eliciar estados de medo (BOLLES; COLLIER, 1976; FENDT; FANSELOW, 1999; REIMER; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2008). Sons, luzes, odores e estímulos táteis podem ser usados como estímulos condicionados nestes tipos de experimentos (DAVIS, 2001; FENDT; FANSELOW, 1999). Diversos estudos mostraram que fármacos utilizados na clínica para o tratamento de ansiedade patológica são capazes de alterar as respostas comportamentais exibidas frente a estímulos condicionados em diferentes modelos animais (DAVIS, 2006; DAVIS et al., 1993; GLOVER; DAVIS, 2008). Essas evidências indicam que uma desregulação dos mecanismos relacionados à elaboração e expressão de respostas de medo condicionado pode estar subjacente a determinados distúrbios de ansiedade como, por exemplo, o transtorno de ansiedade generalizada.

Em experimentos envolvendo o paradigma do condicionamento aversivo, o congelamento condicionado é uma resposta comumente avaliada em roedores. A resposta de congelamento consiste em uma imobilidade tensa que os animais apresentam tendo por finalidade impedir de serem vistos pelo predador quando a fuga ou a esquiva não são viáveis. Este comportamento, complexo e coordenado, é definido como a ausência de todos os movimentos corporais, exceto os respiratórios (BOLLES, 1970; BOLLES; COLLIER, 1976;

NISSEN, 1946). No congelamento observamos um alto nível de alerta e considerável tonicidade muscular.

Estudos anteriores mostraram que a magnitude do congelamento segue geralmente uma relação monotônica com o estado de medo apresentado pelo indivíduo. Desta forma, o tempo de congelamento condicionado tende a variar linearmente com a intensidade e número de choques recebidos na sessão treino (BLANCHARD; BLANCHARD, 1969a). Assim, enquanto que a apresentação de um único estímulo incondicionado durante a sessão treino pode gerar congelamento condicionado, um treinamento mais intenso pode facilmente gerar uma resposta condicionada de maior magnitude (BLANCHARD; BLANCHARD, 1969a; FANSELOW; BOLLES, 1979).

Outra resposta defensiva importante é o reflexo de sobressalto, uma resposta rápida e estereotipada, que envolve a contração de músculos da face e do corpo e a dorsiflexão da cabeça e do pescoço, evocada pela apresentação súbita de estímulos inesperados e intensos que podem ser de natureza acústica, tátil ou vestibular (BROWN; KALISH; FARBER, 1951; FLESHLER, 1965; KOCH, 1999). Essa resposta possui alto valor adaptativo, uma vez que o reflexo de sobressalto protege uma área de grande vulnerabilidade, a região dorsal do pescoço, contra golpes ou ataques predatórios, no breve período de tempo antes que uma ação evasiva defensiva possa ser realizada (YEOMANS; FRANKLAND, 1995).

A amplitude da resposta de sobressalto a um estímulo acústico em ratos pode ser aumentada por meio da apresentação de um estímulo condicionado (por exemplo, luz) que tenha sido previamente pareado com um estímulo aversivo como um choque nas patas (BROWN et al., 1951). Essa condição é denominada "resposta de sobressalto potencializada pelo medo" (Figura 1) e ocorre também quando se utiliza um estímulo condicionado auditivo ou olfatório, com o sobressalto podendo ser provocado tanto por um som intenso quanto por um jato de ar (BROWN et al., 1951; DAVIS; ASTRACHAN, 1978; DE OLIVEIRA;

REIMER; BRANDÃO, 2006; 2009; PASCHALL; DAVIS, 2002; REIMER et al., 2008; ROSEN et al., 1991). O sobressalto potencializado pelo medo em ratos apresenta uma considerável especificidade temporal uma vez que a magnitude do sobressalto é máxima quando o estímulo condicionado e o estímulo eliciador do sobressalto ocorrem dentro de uma janela temporal idêntica ao intervalo entre o estímulo neutro e o estímulo aversivo incondicionado apresentados na sessão treino (DAVIS et al., 1993).

Figura 1. Desenho esquemático do paradigma da potencialização do sobressalto pelo medo. Dias 1 e 2: Sessões de balanceamento, com apresentações do estímulo eliciador do sobressalto. Dia 3: Sessão de treino, com apresentação pareada do estímulo neutro e do estímulo incondicionado aversivo. Dia 4: Sessão teste, com apresentação do estímulo eliciador do sobressalto na presença e na ausência do estímulo condicionado. Note a diferença entre a amplitude do sobressalto nas condições só-som e luz-som. Modificado de Rodriguiz e Wetsel (2006).

A apresentação pareada do estímulo neutro e do choque nas patas leva ao desenvolvimento de um estado condicionado de medo que age incrementando a reação de sobressalto ao som (BROWN et al., 1951). Assim, no modelo da potencialização do sobressalto pelo medo, o aumento da amplitude desse reflexo é considerado como sendo o índice de medo condicionado (DAVIS et al., 1993). Alguns estudos têm indicado, no entanto, uma relação não-monotônica entre a amplitude do sobressalto potencializado pelo medo e a intensidade dos choques apresentados na sessão treino. Choques moderados levam a uma potencialização máxima do sobressalto enquanto que choques intensos reduzem essa potencialização (DAVIS; ASTRACHAN, 1978; SANTOS et al., 2005; WALKER et al., 1997; WALKER; DAVIS, 1997).

Por fim, se a resposta de sobressalto potencializada reflete medo, é de se esperar que drogas que reduzam o medo ou ansiedade em outras situações atenuem ou bloqueiem essa resposta. Consistente com essas expectativas, Davis (1979) observou que a administração de diazepam, um benzodiazepínico utilizado no tratamento de ansiedade patológica, produz uma redução dose-dependente da potencialização da resposta de sobressalto. Posteriormente, observou-se que outras drogas utilizadas na clínica, como flurazepan e buspirona, também reduzem a resposta de sobressalto potencializada pelo medo (DAVIS et al., 1993).

Diversos estudos vêm empregando diferentes metodologias de forma combinada para a avaliação do estado de medo condicionado em laboratório, por exemplo, avaliando a amplitude da resposta de sobressalto juntamente com a mensuração do tempo de congelamento condicionado (DE OLIVEIRA et al., 2006; FENDT, 2001; LUYTEN et al., 2011; MCNISH; GEWIRTZ; DAVIS, 1997; REIMER et al., 2008; SANTOS et al., 2005). Observa-se que variados repertórios comportamentais podem ser associados aos estados aversivos gerados por estímulos condicionados e, dessa forma, é de se esperar que essas

repostas dependam da participação de circuitarias e estruturas encefálicas distintas, mas que em algum momento se sobreponham (MCNISH et al., 1997; ZHAO; DAVIS, 2004).

Trabalhos anteriores indicaram que o processamento central da informação de natureza aversiva e a expressão de respostas defensivas ficariam a cargo de dois sistemas encefálicos distintos, o sistema encefálico da aversão (SEA) e o sistema de inibição comportamental (SIC). Historicamente, os mecanismos associados às respostas a estímulos aversivos incondicionados têm sido relacionados ao SEA, representado primariamente pela substância cinzenta periaquedutal (PAG), hipotálamo medial (MH) e complexo amigdalóide (BRANDÃO et al., 2003; GRAEFF, 1981). Já o SIC, composto basicamente pelo hipocampo, córtices entorrinal, subicular e cíngulo posterior e área septal, responderia aos estímulos aversivos condicionados (GRAY; MCNAUGHTON, 2000). Apesar dessa divisão, torna-se cada vez mais evidente que o envolvimento de determinada estrutura pode não estar restrito a um único sistema, participando do processamento de uma única categoria de estímulo aversivo – seja ele incondicionado ou condicionado. A exemplo disso, estudos recentes vêm evidenciando a participação de estruturas que compõe o SEA, especialmente a PAG e o MH, tanto em respostas a situações aversivas incondicionadas, como frente a estímulos aversivos condicionados (CASTILHO; BRANDÃO, 2001; CEZÁRIO et al., 2008; PAVESI; CANTERAS; CAROBREZ, 2011; REIMER et al., 2009).

1.1. Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal

A PAG é uma estrutura mesencefálica que circunda o aqueduto cerebral desde a porção dorsolateral do tronco encefálico até a comissura posterior. A PAG apresenta conexões recíprocas com vários sistemas ascendentes e descendentes e pode influenciar e ser influenciada por estruturas relacionadas ao controle das respostas sensoriais, motoras,

autônomicas e límbicas (BANDLER; CARRIVE, 1988; BANDLER; KEAY, 1996; CARRIVE; BANDLER, 1991). A PAG possui uma intrincada rede de conexões que se torna ainda mais complicada se levarmos em conta a presença de diversos sistemas neurotransmissores atuando nessa região. Glutamato, aspartato, GABA, acetilcolina, serotonina, histamina, noradrenalina, encefalinas, neurotensina, óxido nítrico e substância P já foram descritos como neurotransmissores nesta estrutura (AGUIAR; BRANDÃO, 1994; BEITZ, 1990; CHIAVEGATTO; SCAVONE; CANTERAS, 1998; FOGAÇA et al., 2012; JURGENS; LU, 1993b; MONASSI; HOFFMANN; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 1994).

A PAG pode ser subdividida, devido a sua heterogeneidade funcional, em colunas neurais longitudinais orientadas no eixo rostrocaudal: coluna dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral (Figura 2) (BANDLER; KEAY, 1996; BANDLER; SHIPLEY, 1994; DEPAULIS; BANDLER, 1991). Seguindo as considerações de Lovick (1991), a PAG dorsal (dPAG) compreenderia as colunas dorsomedial, dorsolateral e lateral da PAG, ao passo que as áreas ventrais ao aqueduto cerebral e laterais ao núcleo dorsal da rafe constituiriam a PAG ventral.

Figura 2. Subdivisão esquemática da substância cinzenta periaquedutal nas colunas: dorsomedial, dm; dorsolateral, dl; lateral, l; e ventrolateral, vl. aq, aqueduto. O destaque da região dorsolateral ilustra a disposição colunar da estrutura. Modificado de Keay e Bandler (2004).

As estimulações elétrica e química de regiões específicas da PAG evidenciaram que este substrato neural participa da elaboração de uma grande variedade de funções, incluindo: modulação da dor (BASBAUM; FIELDS, 1984; REYNOLDS, 1969), respostas autonômicas (DE MENEZES et al., 2008), vocalização (JURGENS; LU, 1993a), comportamento sexual (OGAWA; KOW; PFAFF, 1992), controle respiratório (SUBRAMANIAN; BALNAVE; HOLSTEGE, 2008) e diferentes padrões de comportamento defensivo, como congelamento, ataque defensivo, fuga e imobilidade tônica (BANDLER; DEPAULIS, 1988; BRANDÃO; DE AGUIAR; GRAEFF, 1982; MONASSI et al., 1994). Tem-se observado, ainda, que as diferentes colunas da PAG coordenam padrões distintos de reações fisiológicas e comportamentais críticas para a sobrevivência do animal (BANDLER; KEAY, 1996).

A dPAG tem importante papel na elaboração de estados aversivos. A estimulação elétrica dessa estrutura, em ratos, elicia comportamentos defensivos como alerta, congelamento e fuga explosiva (BRANDÃO et al., 1982; REIMER et al., 2009). As eferências da dPAG em direção ao núcleo cuneiforme, o qual se projeta à medula ventrolateral, seriam requeridas para a evocação desses comportamentos (MITCHELL; DEAN; REDGRAVE, 1988; REDGRAVE et al., 1988). Tais reações defensivas são acompanhadas por alterações autonômicas como aumento na frequência cardíaca e na pressão arterial, piloereção, midríase, micção e defecação (BRANDÃO et al., 1999; BRANDÃO et al., 1994). Já a lesão da dPAG diminui a resposta incondicionada que segue o choque nas patas (KIM; RISON; FANSELOW, 1993).

Comparativamente ao envolvimento da dPAG no medo incondicionado, a participação dessa estrutura no medo condicionado ainda é pouco conhecida. Castilho e colaboradores (2001) mostraram que a administração do benzodiazepínico midazolam na dPAG causa redução do congelamento e antinocicepção condicionados. Na mesma direção, em estudos recentes de nosso laboratório mostramos efeitos antiaversivos da microinjeção do agonista

GABAérgico muscimol na dPAG no medo condicionado ao contexto (REIMER et al., 2008) e à luz (REIMER, 2008), avaliados por meio do sobressalto potencializado pelo medo e do congelamento condicionado. Assim, é de grande interesse o estudo do envolvimento de substratos neurais do teto mesencefálico, comumente associados a respostas inatas de defesa, nas respostas a estímulos aversivos condicionados. Tal qual a dPAG, outra estrutura que é classicamente associada a respostas incondicionadas de medo, o MH, parece também participar da elaboração das repostas defensivas frente a estímulos condicionados.

1.2. Hipotálamo Medial

O hipotálamo é uma estrutura localizada na porção ventral do diencefalo, posicionado lateralmente ao terceiro ventrículo, encontrando-se acima da hipófise, limitado dorsalmente, em sua maior extensão, pela zona incerta. Essa estrutura é composta por três zonas longitudinais distintas (periventricular, medial e lateral), subdivididas em quatro níveis ou regiões organizadas no eixo rostrocaudal (pré-óptica, anterior, tuberal e mamilar) (Figura 3).

Figura 3. Representação esquemática da organização morfológica do hipotálamo com divisões em zonas e regiões. As áreas preenchidas representam os núcleos hipotalâmicos avaliados no presente estudo. AH, núcleo anterior; PMd, núcleo pré-mamilar dorsal. Devido à complexidade, as demais siglas encontram-se no Anexo A desta tese. Modificado de Simerly (2004).

Numerosos dados da literatura apontam um papel importante do hipotálamo na integração de respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais (CANTERAS, 2002; INGRAM, 1939; REICHLIN et al., 1976). Tais trabalhos já pontuaram a participação do hipotálamo na regulação do sistema endócrino, cardiovascular, termorregulatório, no comportamento alimentar, bem como sendo uma estrutura chave na mediação de comportamentos defensivo-agressivos.

Comparativamente ao que se observa com a estimulação da dPAG, uma série de trabalhos verificou que a estimulação do MH também é capaz de induzir um padrão de respostas somatomotoras e autonômicas que se assemelha ao comportamento de animais diante de seus predadores naturais (AZEVEDO; VERAS-SILVA, 1987; LAMMERS et al., 1988a; LIPP; HUNSPERGER, 1978). Apesar disso, Bandler (1982) mostrou, a partir da estimulação química da dPAG e do MH, uma participação diferencial destas estruturas na elaboração e expressão do comportamento de defesa. Trabalhos posteriores também verificaram que a estimulação elétrica do MH não elicia comportamento de congelamento (MILANI; GRAEFF, 1987), observável com a estimulação da dPAG (BRANDÃO et al., 1982; REIMER et al., 2009). Ainda, a resposta de fuga evocada com a manipulação do MH mostra-se mais coordenada e dirigida ao escape do aparato experimental (BRANDÃO et al., 1986; DI SCALA; SCHMITT; KARLI, 1984; MILANI; GRAEFF, 1987; SILVEIRA; GRAEFF, 1992), em contraste à resposta explosiva verificada com a estimulação da dPAG (BANDLER; DEPAULIS, 1988; BRANDÃO et al., 1982; BRANDÃO et al., 1986; REIMER et al., 2009). Além disso, diferenças entre os padrões de expressão de c-Fos induzidos pela estimulação do MH e da dPAG são também observadas (SILVEIRA et al., 1995).

Trabalhos subsequentes com técnicas imunoistoquímicas contribuíram para a caracterização de quais núcleos hipotalâmicos fariam parte de um circuito envolvido na integração de respostas a estímulos aversivos. Observou-se que os núcleos anterior (AH),

ventromedial, em sua porção dorsomedial (VMHDM), e pré-mamilar dorsal (PMd) são recrutados durante a elaboração de comportamentos defensivos frente a estímulos aversivos incondicionados, como a exposição ao predador natural (BLANCHARD et al., 2005; CANTERAS et al., 1997; CEZÁRIO et al., 2008). Na mesma direção, foi verificado que a lesão ou inativação destes núcleos, especialmente o PMd, é capaz de reduzir ou abolir as respostas de congelamento e fuga durante a exposição a um predador (BLANCHARD et al., 2003; CEZÁRIO et al., 2008).

Os núcleos que compõe o circuito hipotalâmico de defesa mostram-se interconectados e relacionam-se com outras estruturas, enviando e recebendo projeções a estruturas do sistema límbico como o complexo amigdalóide, e do teto mesencefálico como a dPAG – estruturas essas sabidamente envolvidas no processamento de informação de caráter aversivo (CANTERAS, 2002; GRAEFF, 2004; VIANNA; BRANDÃO, 2003). As conexões com estas estruturas evidenciam ainda mais a posição estratégica do circuito hipotalâmico de defesa para a integração de respostas defensivas.

Apesar do grande número de trabalhos versando sobre o papel do MH no medo incondicionado, pouco se sabe a respeito da participação dessa estrutura no medo condicionado. Alguns trabalhos apontam para um envolvimento diferencial dos núcleos do MH no medo condicionado. Zhao e colaboradores (2009) verificaram uma redução na amplitude do sobressalto potencializado pelo medo após a infusão de um antagonista neurocininérgico no VMHDM. De forma semelhante, a inativação com o agonista GABAérgico muscimol do AH e do VMHDM causaram redução do sobressalto potencializado pelo medo (utilizando luz como estímulo condicionado), efeito não observado para o PMd (SANTOS; MACEDO; BRANDÃO, 2008). O PMd, por outro lado, parece estar envolvido na resposta condicionada de medo quando o contexto associado ao predador age como estímulo condicionado (CEZÁRIO et al., 2008). Assim, dada a diversidade de núcleos e

a assimétrica participação destes na elaboração de estados aversivos, é de nosso interesse avaliar o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica no AH e no PMd nas respostas defensivas frente a estímulos aversivos condicionados.

1.3. Neurotransmissão Glutamatérgica

Um grande número de estudos tem avaliado os efeitos de diversos agonistas e antagonistas de neurotransmissores, administrados sistemicamente ou diretamente nas estruturas que compõe o SEA, com o objetivo de caracterizar os mecanismos neuroquímicos envolvidos no controle dos comportamentos defensivos (BRANDÃO et al., 1986; FERREIRA-NETTO; BORELLI; BRANDÃO, 2005; JARDIM; GUIMARAES, 2004; KRIEGER; GRAEFF, 1985; PANDOSSIO; BRANDÃO, 1999).

O aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e tem sido relacionado a diversos processos fisiológicos e/ou patológicos que incluem aprendizado e memória (IZQUIERDO et al., 1992), desenvolvimento e plasticidade neural (MICHAELIS, 1998), convulsões e distúrbios neurodegenerativos (MELDRUM, 2000), além de ansiedade e depressão (JANE; LODGE; COLLINGRIDGE, 2009; MURROUGH, 2012; NISWENDER; CONN, 2010).

O glutamato exerce suas funções através de várias classes de receptores, que podem ser classificados em dois grandes grupos: os receptores metabotrópicos, ligados a proteína G, e os receptores ionotrópicos, acoplados a um canal iônico. Os receptores ionotrópicos, por sua vez, podem ser subdivididos em três classes baseado na sua farmacologia: receptores de alfa amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA), de cainato e de N-metil-D-aspartato (NMDA). Os receptores AMPA e cainato são, entretanto, comumente tratados como a mesma entidade (AMPA/Cainato ou não-NMDA) (BRANN, 1995; WATKINS; JANE, 2006). Mecanismos mediados por aminoácidos excitatórios atuando nos distintos receptores

poderiam estar relacionados a diferentes respostas comportamentais. De fato, algumas evidências sugerem que, no teto mesencefálico, a ativação de receptores AMPA/Cainato mediará a resposta de congelamento enquanto que receptores NMDA seriam responsáveis pela resposta de fuga em ratos (FERREIRA-NETTO et al., 2005; PANDOSSIO; BRANDÃO, 1999). Ainda, Walker e Davis (2002b) e Zimmerman e Maren (2010) mostraram que as respostas a estímulos condicionados aversivos parecem depender dos receptores do tipo AMPA/Cainato da amígdala, enquanto que os receptores NMDA desta estrutura estariam relacionados aos processos de extinção do medo.

Perturbações na neurotransmissão glutamatérgica parecem estar subjacentes às alterações afetivas e mnemônicas de diversos distúrbios neurológicos e psiquiátricos. Evidências anteriores indicam que a administração de riluzole, um inibidor da liberação de glutamato, diminui a ansiedade em pacientes diagnosticados com transtorno de ansiedade generalizada (MATHEW et al., 2005). Além disso, exposições de um animal a estímulos aversivos parecem gerar um aumento pronunciado nos níveis de glutamato nas estruturas que compõem o SEA (MILLAN, 2003; MOGHADDAM, 2002; VENTON et al., 2006). Ainda, microinjeções de glutamato em estruturas do teto mesencefálico como dPAG e colículo inferior causam comportamentos de congelamento e fuga (CARDOSO; COIMBRA; BRANDÃO, 1994; KRIEGER; GRAEFF, 1985). Assim, tem sido sugerido que os receptores glutamatérgicos do teto mesencefálico agiriam mediando o comportamento defensivo (FERREIRA-NETTO et al., 2005). Somando-se a isso, todos os tipos de receptores glutamatérgicos encontram-se presentes na dPAG (ALBIN et al., 1990; TOLLE et al., 1993).

Além do envolvimento de mecanismos glutamatérgicos nas reações de defesa eliciadas no teto mesencefálico, existem evidências de que os aminoácidos excitatórios também participem destas respostas no MH. Microinjeções de agonistas AMPA/Cainato e NMDA nesta estrutura também provocam reações de defesa, entretanto, as respostas observadas são

mais coordenadas e menos explosivas quando comparadas àquelas respostas observadas com a estimulação da dPAG (MILANI; GRAEFF, 1987; SILVEIRA; GRAEFF, 1992). Não obstante, da mesma forma ao que se observa na dPAG, todos os tipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos também são detectados no MH (EYIGOR; CENTERS; JENNES, 2001).

Assim, dada a importância da dPAG e do MH na geração de estados emocionais aversivos e na expressão de comportamentos defensivos, o entendimento de como essas estruturas estão envolvidas no medo condicionado seria de relevância para a melhor compreensão da neurobiologia do medo e da ansiedade. Ainda, de acordo com trabalhos recentes de nosso laboratório, existem evidências do envolvimento de mecanismos GABAérgicos da dPAG (REIMER, 2008; REIMER et al., 2008) e do MH (SANTOS et al., 2008) no medo condicionado de forma análoga ao que se observa no medo incondicionado. Dessa forma, nossa hipótese é de que a neurotransmissão glutamatérgica nestas estruturas também possa estar subjacente à expressão das respostas defensivas frente a estímulos condicionados.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Neste estudo investigamos a participação da neurotransmissão glutamatérgica da substância cinzenta periaquedutal dorsal e do hipotálamo medial (núcleos anterior e pré-mamilar dorsal) na expressão do medo condicionado à luz. Para isso, os efeitos da administração de agonistas e antagonistas de receptores AMPA/Cainato e NMDA foram analisados no teste do sobressalto potencializado pelo medo e na resposta condicionada de congelamento. Eventuais alterações motoras provocadas pelas drogas foram avaliadas no teste do campo aberto.

O estudo foi dividido em dois experimentos principais:

- Experimento I: Envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica da dPAG no medo condicionado:
 - Etapa I: Efeitos de agonistas e antagonistas de receptores AMPA/Cainato na expressão do sobressalto potencializado pelo medo e do congelamento condicionado à luz;
 - Etapa II: Efeitos de agonistas e antagonistas de receptores NMDA na expressão do sobressalto potencializado pelo medo e do congelamento condicionado à luz.
- Experimento II: Envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica do MH (núcleos AH e PMd) no medo condicionado:
 - Etapa I: Efeitos de agonistas e antagonistas de receptores AMPA/Cainato na expressão do sobressalto potencializado pelo medo e do congelamento condicionado à luz;
 - Etapa II: Efeitos de agonistas e antagonistas de receptores NMDA na expressão do sobressalto potencializado pelo medo e do congelamento condicionado à luz.

EXPERIMENTO I

3. EXPERIMENTO I - Envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica da dPAG no medo condicionado à luz

3.1. Material e métodos

3.1.1. Animais

Foram utilizados 207 ratos *Wistar* machos (*Rattus norvegicus*), com peso entre 270 e 300 g, provenientes do biotério central do *campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram agrupados (quatro animais por caixa) em gaiolas de polipropileno medindo 40 × 33 × 17 cm, forradas com maravalha, tendo livre acesso à água e alimento. Os animais foram mantidos em um biotério setorial com temperatura controlada a 23° C ± 1° C e um programa de iluminação artificial com ciclo claro-escuro de 12 × 12 h, com início do período claro às 7:00 h. Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo. Este trabalho faz parte de um projeto temático aprovado pela Comissão de Ética do Uso de Animais, CEUA, da USP de Ribeirão Preto (protocolos 06.1.123.8.53.9 e 11.1.308.53.9).

3.1.2. Cirurgia

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com cloridrato de cetamina (Agener, Brasil) na dose de 100 mg/Kg, 1 mL/Kg, e cloridrato de xilazina (Calier, Brasil) na dose de 7,5 mg/Kg, 1 mL/Kg, sendo levados a um aparelho estereotáxico (David-Kopf, EUA) onde tiveram o crânio fixado pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Após tricotomia do campo cirúrgico, uma injeção subcutânea de 0,2 mL de lidocaína 2% (Harvey, Brasil) foi aplicada sob a epiderme. Após a incisão, o tecido subcutâneo foi removido, assim como o periósteo (por raspagem, com auxílio de pinça e algodão embebido em peróxido de hidrogênio 3%). Já com a superfície craniana exposta e ajustada em posição horizontal, entre *bregma* e

lambda, dois orifícios foram feitos nos ossos parietais com o uso de uma broca elétrica (Foredom, EUA) para fixação de parafusos destinados a ancorar a prótese ao crânio do animal. Seguindo-se as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (2007), um orifício foi feito para implante de uma cânula de microinjeção, a qual é construída a partir de uma agulha de aço inoxidável, com 14 mm de comprimento e 0,4 mm de diâmetro interno. Esta cânula foi direcionada à dPAG (angulação de 16°; anteroposterior = +0,1 mm, médio-lateral = +1,9 mm e dorsoventral = -4,3 mm em relação ao *lambda*). Em seguida, o crânio foi revestido com acrílico dental (JET, Brasil) para fixação da cânula e um fio de aço inoxidável foi introduzido nesta para evitar entupimentos. Ao término da cirurgia cada animal recebeu, por via intramuscular, uma injeção de 0,2 mL de Pentabiótico, um antibiótico veterinário polivalente (Fort Dodge, Brasil), com o intuito de prevenir possíveis infecções e uma injeção do analgésico e anti-inflamatório Banamine (Flunixinina meglumina; Schering-plough, Brasil) (0,02 mL/0,3 mL) por via subcutânea. Cinco dias após a cirurgia foi dada continuidade ao procedimento experimental.

3.1.3. Drogas

Os seguintes agonistas e antagonistas de receptores glutamatérgicos foram utilizados: 2-carboxi-3-carboximetil-4-isopenilpirrolidina (ácido caínico, Sigma, EUA), agonista seletivo para receptores AMPA/Cainato (7,5, 30 e 60 pmol/0,2 µL); 2,3-dioxi-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzeno[f]quinoxalina-sufonamida (NBQX, Sigma, EUA), antagonista de receptores AMPA/Cainato (20 nmol/0,2 µL); N-metil-D-aspartato (NMDA, Sigma, EUA), agonista específico de receptores NMDA (0,5, 1,0 e 2,0 nmol/0,2 µL) e ácido 2-amino-7-fosfono-heptanóico (AP7, Sigma, EUA), antagonista seletivo para receptores NMDA (2 nmol/0,2 µL). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de salina. As doses das drogas foram selecionadas levando-se em conta o fato de não produzirem comportamentos defensivos observáveis com base em experimentos piloto e em estudos deste

e de outros laboratórios (AGUIAR; GUIMARAES, 2009; FENDT, 2000; FERREIRA-NETTO et al., 2005; MOLCHANOV; GUIMARAES, 2002; NOBRE; LOPES; BRANDÃO, 2004; VIANNA et al., 2001b). Além disso, as doses dos agonistas glutamatérgicos utilizadas neste estudo são bem mais baixas do que aquelas utilizadas em estudos com lesão neuroquímica (AVANZI et al., 2003; JARRARD, 1983).

3.1.4. Microinjeções

Uma agulha dental foi utilizada para a microinjeção das drogas. A agulha foi conectada a um tubo de polietileno PE-10 e a uma microsseringa Hamilton (Hamilton, EUA) graduada de 10 μ L. Em seguida, a agulha foi inserida na cânula guia, até que sua extremidade inferior ultrapassasse em 1,0 mm a cânula guia. Cada droga foi injetada na dPAG (0,2 μ L/1 min), com a ajuda de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, EUA). O deslocamento de uma bolha de ar no tubo de polipropileno 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. A administração das drogas ocorreu 10 min antes do início dos testes. Quando os animais receberam duas microinjeções, o antagonista foi administrado 10 min antes da administração do agonista. Como notado em trabalho anterior, o raio de difusão de um líquido com volume de 0,5 μ L é de aproximadamente 1,0 mm (ALLEN et al., 2008; MYERS, 1966). Neste trabalho, um volume de 0,2 μ L foi utilizado de forma que a infusão da droga ficasse supostamente restrita à estrutura alvo.

3.1.5. Equipamentos

Caixas de Condicionamento: Durante o procedimento de condicionamento foram utilizadas duas caixas idênticas medindo 20 $\times$ 20 $\times$ 25 cm (caixa A). A parede do fundo, assim como as duas paredes laterais, é de alumínio, e o teto e a porta, de acrílico transparente.

O assoalho das caixas é constituído por barras de metal de 5 mm de diâmetro, distando 1,5 cm entre si. Estas caixas encontram-se encerradas em duas câmaras de atenuação acústica ($45 \times 45 \times 45$ cm) feitas de compensado de madeira e revestidas por Eucatex (Figura 4A). Os choques elétricos, de intensidade de 0,6 mA e duração de 1 s, foram administrados por meio de um gerador de choques (Albarsh, Brasil). Uma lâmpada vermelha de 6 W e uma câmara de vídeo, instaladas no interior de cada câmara de isolamento acústico, permitiram a observação do animal durante o condicionamento. A luz proveniente de uma lâmpada branca de 6 W, localizada no teto de cada caixa, foi utilizada como estímulo condicionado.

Caixas de Medida do Sobressalto: Durante as sessões de balanceamento e teste foram utilizadas duas caixas experimentais idênticas, construídas em aço inoxidável e suspensas em uma armação de PVC, medindo internamente $16,5 \times 7,5 \times 9,5$ cm (caixa B). Estas caixas encontram-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, EUA) (Figura 4B). A resposta de sobressalto é registrada por meio de uma plataforma sensível à pressão (estabilímetro, PHM250-60, Med Associates, EUA). O sobressalto do animal gera movimentos nesta plataforma que são captados por sensores como deslocamento de corrente e então amplificados, gerando um sinal analógico que é digitalizado e analisado por um programa computacional (*Startle Reflex*, versão 4.10, Med Associates, EUA). A apresentação dos estímulos, o tipo, a duração, a intensidade e a amplitude dos mesmos também são computadorizados por meio de uma interface (Dig 729, Med Associates, EUA). 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, 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 com 60 cm de diâmetro, cuja parede era constituída por uma placa de acrílico transparente, com 50 cm de altura. O piso da arena era dividido em 12 seções (Figura 4C). A arena encontrava-se em uma sala com iluminação controlada (30 lux no piso da arena) e ruído de fundo constante, produzido por um aparelho de ar condicionado. Os comportamentos emitidos pelos animais foram registrados por uma câmera de vídeo posicionada acima da arena.

Figura 4. Fotografias das caixas experimentais utilizadas no experimento de medo condicionado. Em **A**, caixa de condicionamento e em **B**, caixa de sobressalto. Em **C**, arena utilizada para o teste do campo aberto.

3.1.6. Procedimento Experimental

O delineamento experimental seguido no presente estudo é descrito a seguir e apresentado esquematicamente na Figura 5.

Sessões de Balanceamento: Foram realizadas duas sessões de balanceamento nas quais os animais foram colocados na caixa experimental B e, 5 minutos após, receberam 30 estímulos sonoros de intensidade de 100 dB com um intervalo fixo de 30 s entre cada estímulo. A amplitude média do sobressalto ao longo das 30 tentativas de estímulos sonoros da última sessão de balanceamento foi utilizada para alocar homogeneamente os animais aos diversos grupos dos experimentos. Além de permitir a distribuição dos animais em seus respectivos grupos, a sessão de balanceamento também é destinada a familiarizar os animais com as caixas experimentais e, assim, reduzir possíveis variações na resposta de sobressalto.

Sessão de Condicionamento: Após o período de recuperação da cirurgia, foi dado início ao condicionamento aversivo. Os animais foram colocados na caixa A e, após 5 minutos de adaptação, 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 através de uma interface controlada por um programa computacional instalado em um computador em uma sala adjacente.

Sessão Teste: No dia seguinte à sessão de condicionamento, os animais foram avaliados no teste do sobressalto potencializado pelo medo. 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 consistiram apenas no estímulo sonoro (tentativas só-som) e foram intercaladas aleatoriamente com 30 apresentações de som precedido por luz (tentativas luz-som). As amplitudes das respostas de

sobressalto de cada animal foram registradas e armazenadas no disco rígido do computador e, posteriormente, transferidas para planilhas do programa computacional Excel (Microsoft, EUA) para análise dos dados. A sessão teste foi registrada por câmeras de vídeo (Everfocus, EUA), permitindo assim a discriminação de todos os comportamentos emitidos pelos animais, com o sinal enviado a um monitor em uma sala adjacente através de um circuito interno de TV e gravado em DVDs para posterior análise. A resposta de congelamento emitida pelos animais durante a sessão do teste de sobressalto foi quantificada. Esta resposta foi operacionalmente definida neste trabalho como a ausência total de movimentos do corpo e das vibrissas, com exceção daqueles relacionados à respiração, por um período mínimo de 6 segundos.

Teste do campo aberto: Para avaliar possíveis alterações motoras ou a apresentação de respostas defensivas produzidas pelas drogas utilizadas foi realizado o teste do campo aberto. Inicialmente os animais passavam por um período de adaptação à arena, com duração de 10 minutos, a fim de familiarizar os animais com o aparato experimental e assim, reduzir possíveis variações decorrentes do comportamento exploratório. Na sequência, os animais receberam a administração local de drogas. Passados 10 minutos da microinjeção, os animais eram recolocados na arena, onde permaneciam por mais 30 minutos. Durante esse período foi registrado o número de cruzamentos (resposta de cruzar com as quatro patas uma das seções do assoalho da arena) e levantamentos (resposta de erguer-se sobre as patas traseiras, mantendo as dianteiras elevadas, contra as paredes ou sem apoio no meio da arena).

Figura 5. Delineamento Experimental. (A) Teste do sobressalto potencializado pelo medo. (B) Teste de atividade motora no campo aberto.

3.1.7. Histologia

Ao fim dos experimentos, os animais foram sacrificados com a administração do anestésico uretana (3 g/Kg). A seguir, o corante Azul de Evans (2%) foi microinjetado na dPAG no mesmo volume das drogas anteriormente utilizadas. Em seguida, os animais foram perfundidos intracardiacamente com salina 0,9% seguida de formalina. Os encéfalos foram removidos, mantidos na solução de formalina por no mínimo 3 horas e, posteriormente, transferidos para uma solução de sacarose a 30%. Os encéfalos foram congelados e cortados em secções de 60 μ m. Posteriormente foram montadas lâminas que receberam a coloração de Nissl, com o corante violeta de Cresila (Sigma, EUA), para que os sítios das microinjeções pudessem ser confirmados, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007).

3.1.8. Análise Estatística

Os dados são apresentados como média + EPM, tendo sido analisados pelo programa computacional SigmaStat 3.11 (Systat, EUA). Para análise dos dados do teste de sobressalto

potencializado pelo medo foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas. O fator 1 referiu-se ao *tratamento* e o fator 2 à *condição* (só-som $\times$ luz-som). No caso de significância estatística, foi aplicado o teste *post-hoc* de *Newman-Keuls*. Para análise do tempo de congelamento condicionado e das medidas motoras foram utilizadas ANOVAs de uma via para os tratamentos. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo.

3.2. Resultados

3.2.1. Localização dos Sítios de Microinjeção

Os dados apresentados referem-se aos animais cujo exame histológico mostrou que a cânula-guia atingiu a dPAG. A Figura 6A mostra uma fotomicrografia representativa da localização dos sítios de microinjeção nessa estrutura. A Figura 6B indica os pontos de microinjeção na dPAG em diagramas de mesencéfalo de ratos modificados do Atlas de Paxinos e Watson (2007).

Figura 6. Sítios de injeção na dPAG. Fotomicrografia representativa da localização dos sítios de microinjeção na dPAG de ratos (A). Em B estão indicados os sítios de microinjeção na dPAG em diagramas modificados do Atlas de Paxinos e Watson (2007). O número de pontos indicados é menor que o número de animais utilizados devido a várias sobreposições. SC = colículo superior. Pn = núcleo pontino. Barra igual a 0,5 mm.

3.2.2. Receptores AMPA/Cainato

Sobressalto Potencializado pelo Medo e Congelamento Condicionado

A Figura 7 apresenta os resultados referentes ao teste do sobressalto potencializado pelo medo e a medida de congelamento de animais que receberam microinjeções de agonista e antagonista de receptores AMPA/Cainato na dPAG.

A Figura 7A apresenta a média da amplitude de sobressalto dos animais que receberam microinjeções de ácido caínico (7,5, 30 ou 60 pmol/0,2 μ L) ou salina na dPAG dez minutos antes da sessão teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo nos fatores *tratamento*, $F_{(3,44)} = 2,85$; $p < 0,05$, e *condição*, $F_{(1,95)} = 49,37$; $p < 0,05$. A mesma análise revelou também interação significativa entre os dois fatores, $F_{(3,95)} = 6,49$; $p < 0,05$. A análise *post-hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a luz potencializou a resposta de sobressalto ao som nos grupos salina e ácido caínico 7,5 pmol ($p <$

0,05), enquanto que nos grupos tratados com ácido caínico 30 e 60 pmol a potencialização da resposta de sobressalto foi bloqueada ($p > 0,05$). A resposta de sobressalto nas tentativas só-som não foram diferentes entre os grupos ($p > 0,05$). A mesma análise mostrou uma diferença significativa da resposta de sobressalto na condição luz-som para o grupo tratado com ácido caínico 60 pmol em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$).

A Figura 7B mostra a média do tempo total de congelamento condicionado de animais que receberam microinjeções do agonista AMPA/Cainato na dPAG. A ANOVA de uma via revelou diferenças significativas entre os grupos $F_{(3,44)} = 5,46$; $p < 0,05$. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* revelou um aumento significativo na resposta de congelamento do grupo tratado com ácido caínico 60 pmol em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

A Figura 7C apresenta a média da amplitude de sobressalto dos animais que receberam microinjeções de NBQX (20 nmol), NBQX + ácido caínico (20 nmol e 60 pmol, respectivamente) ou salina na dPAG dez minutos antes da sessão teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *tratamento*, $F_{(2,36)} = 0,19$; $p > 0,05$. Esta mesma análise revelou diferenças significativas no fator *condição*, $F_{(1,77)} = 69,36$; $p < 0,05$. Não houve interação significativa entre os dois fatores, $F_{(2,77)} = 0,18$; $p > 0,05$. 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 ($p < 0,05$), ou seja, o antagonista NBQX não teve efeito por si só, mas foi capaz de bloquear a diminuição da potencialização do sobressalto causada pelo ácido caínico 60 nmol.

A Figura 7D mostra a média do tempo total de congelamento condicionado de animais que receberam microinjeções do antagonista AMPA/Cainato (NBQX 20 nmol), do antagonista concomitantemente com agonista (NBQX 20 nmol + ácido caínico 60 pmol) ou salina na dPAG dez minutos antes do teste. A ANOVA de uma via não revelou diferenças

significativas entre os grupos $F_{(2,36)} = 2,64$; $p > 0,05$, ou seja, mais uma vez o NBQX não apresentou efeitos por si só, mais foi capaz de bloquear o efeito do ácido caínico.

Teste do Campo Aberto

As Figuras 8A e 8B apresentam as médias de atividade no campo aberto para o número de cruzamentos e levantamentos, respectivamente, para os animais que receberam microinjeções de salina, NBQX 20 nmol e ácido caínico 60 pmol na dPAG. A ANOVA de

uma via aplicada aos tratamentos não revelou diferenças significativas para o número de cruzamentos, $F_{(2,21)} = 1,04$; $p > 0,05$ (Figura 8A) ou levantamentos $F_{(2,21)} = 2,93$; $p > 0,05$ (Figura 8B).

Figura 8. Receptores AMPA/Cainato da dPAG e efeitos motores no teste do campo aberto. Número de cruzamentos (A) e levantamentos (B) realizados por ratos que receberam microinjeções intra-dPAG de salina (SAL), NBQX (NBQX 20 nmol) ou ácido caínico (AC 60 pmol). Média + EPM. $n = 8$ para todos os grupos.

3.2.3. Receptores NMDA

Sobressalto Potencializado pelo Medo e Congelamento Condicionado

A Figura 9 apresenta os resultados referentes ao teste do sobressalto potencializado pelo medo e a medida de congelamento de animais que receberam microinjeções de agonista e antagonista de receptores NMDA na dPAG.

A Figura 9A apresenta a média da amplitude de sobressalto dos animais que receberam microinjeções de NMDA (0,5, 1,0 ou 2,0 nmol) ou salina na dPAG dez minutos antes da sessão teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo nos fatores *tratamento*, $F_{(3,43)} = 5,10$; $p < 0,05$, e *condição*, $F_{(1,93)} = 80,76$; $p < 0,05$, e também interação significativa entre os dois fatores, $F_{(3,93)} = 8,56$; $p < 0,05$. A análise *post-hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a luz potencializou a resposta de sobressalto ao som nos grupos salina, NMDA 0,5 e NMDA 1,0 nmol ($p < 0,05$). Já no grupo

que recebeu NMDA 2,0 nmol, a potencialização da resposta de sobressalto foi bloqueada ($p > 0,05$). A resposta de sobressalto nas tentativas só-som não foi diferente entre os grupos ($p > 0,05$). A mesma análise mostrou uma diminuição significativa do sobressalto na condição luz-som para o grupo tratado com NMDA 2,0 nmol e um aumento significativo para o grupo NMDA 1,0 nmol, ambos em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$).

A Figura 9B mostra a média do tempo total de congelamento condicionado de animais que receberam microinjeções de NMDA 0,5, 1,0 ou 2,0 nmol na dPAG. A ANOVA de uma via aplicada aos tratamentos revelou diferenças significativas entre os grupos $F_{(3,43)} = 7,41$; $p < 0,05$. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* revelou um aumento significativo na resposta de congelamento do grupo tratado com NMDA 2,0 nmol em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

A Figura 9C apresenta a média da amplitude de sobressalto dos animais que receberam microinjeções de AP7 (2 nmol), AP7 + NMDA 1,0 nmol, AP7 + NMDA 2,0 nmol ou salina na dPAG dez minutos antes da sessão teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *tratamento*, $F_{(3,47)} = 0,88$; $p > 0,05$. A mesma análise revelou efeito significativo no fator *condição*, $F_{(1,101)} = 85,98$; $p < 0,05$. Não houve interação significativa entre os dois fatores, $F_{(3,101)} = 0,51$; $p > 0,05$. 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 ($p < 0,05$), ou seja, o antagonista NMDA AP7 não apresentou efeitos significativos por si só, mas foi eficaz em bloquear os efeitos do NMDA.

A Figura 9D mostra a média do tempo total de congelamento condicionado de animais que receberam microinjeções do agonista e do antagonista NMDA na dPAG. A ANOVA de uma via aplicada aos tratamentos revelou diferenças significativas entre os grupos $F_{(3,47)} = 6,65$; $p < 0,05$. O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* revelou uma diminuição significativa na

resposta de congelamento do grupo tratado com AP7 em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Mais uma vez é possível observar que o AP7 bloqueou o efeito do NMDA.

Figura 9. Receptores NMDA da dPAG e medo condicionado. (A) Efeitos da microinjeção intra-dPAG de salina (SAL) ou NMDA (NMDA 0,5, 1,0 e 2,0 nmol) e (C) salina (SAL), AP7 (AP7 2,0 nmol) e AP7 mais NMDA (AP7 2,0 nmol + NMDA 1,0 nmol e AP7 2,0 nmol + NMDA 2,0 nmol) sobre a amplitude do sobressalto nas condições só-som e luz-som. (B e D) Efeitos dos tratamentos previamente citados sobre o tempo de congelamento condicionado. Média + EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com salina; # $p < 0,05$ em relação à condição só-som. ($p < 0,05$, *Newman-Keuls*). $n = 13$ para SAL, NMDA 1,0, NMDA 2,0, AP7 2,0 e AP7 2,0 + NMDA 1,0; $n = 12$ para AP7 2,0 + NMDA 2,0; $n = 8$ para NMDA 0,5.

Teste do Campo Aberto

As Figuras 10A e 10B apresentam as médias de atividade no campo aberto para o número de cruzamentos e levantamentos, respectivamente, para os animais que receberam

microinjeções de salina, AP7 2,0 nmol e NMDA 2,0 nmol na dPAG. A ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas para cruzamentos ($F_{(2,21)} = 0,18$; $p > 0,05$; Figura 10A) ou levantamentos ($F_{(2,21)} = 0,54$; $p > 0,05$; Figura 10B).

Figura 10. Receptores NMDA da dPAG e efeitos motores no teste do campo aberto. Número de cruzamentos (A) e levantamentos (B) realizados por ratos que receberam microinjeções intra-dPAG de salina (SAL), AP7 (AP7 2,0 nmol) ou NMDA (NMDA, 2,0 nmol). Média + EPM. $n = 8$ para todos os grupos.

3.3. Discussão

O envolvimento de estruturas do teto mesencefálico, como a PAG, os colículos inferiores e os colículos superiores, na mediação de comportamentos defensivos e no sistema motivacional de medo encontra-se atualmente bem estabelecido. Diversos estudos têm mostrado que aumentos graduais na estimulação elétrica da dPAG eliciam inicialmente uma resposta de alerta, seguida pela resposta de congelamento e finalmente por uma fuga explosiva (BRANDÃO et al., 1982; BRANDÃO et al., 1985; REIMER et al., 2009; VIANNA et al., 2001a). Além disso, respostas defensivas também podem ser observadas com a microinjeção de agonistas glutamatérgicos nesta estrutura (BANDLER; CARRIVE, 1988; BANDLER; DEPAULIS, 1988). Por outro lado, a participação da dPAG em estados de medo condicionado é bem menos compreendida e vem se tornando alvo de diversos estudos, dada sua importância para o entendimento da neurobiologia do medo e ansiedade (BRANDÃO et

al., 1999; CASTILHO; MACEDO; BRANDÃO, 2002; REIMER et al., 2008; WALKER; DAVIS, 1997). Somado a isso, são poucos os trabalhos que relacionam a mediação glutamatérgica na dPAG a respostas de medo condicionado.

No que diz respeito ao envolvimento dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA/Cainato da dPAG no medo condicionado, verificamos que o ácido caínico, de forma dose-dependente, reduziu a potencialização da resposta de sobressalto. A menor dose utilizada no presente estudo (7,5 pmol) não produziu efeitos no sobressalto potencializado pelo medo. A administração de uma dose intermediária (30 pmol) diminuiu a potencialização da resposta de sobressalto e a maior dose (60 pmol) reduziu ainda mais essa resposta. Efeitos similares foram observados em trabalhos anteriores (FENDT, 2000; WALKER; DAVIS, 1997). Além disso, confirmando estudos prévios, a administração do antagonista AMPA/Cainato NBQX não alterou a resposta de sobressalto (ZHAO et al., 2009; ZHAO; DAVIS, 2004). No entanto, em nosso estudo, a coadministração de NBQX e ácido caínico reverteu os efeitos provocados pelo agonista.

Com relação ao envolvimento dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da dPAG no medo condicionado, a administração de NMDA na dose menor (0,5 nmol) não causou efeitos significativos, a dose intermediária (1,0 nmol) aumentou a potencialização da resposta de sobressalto enquanto a maior dose (2,0 nmol) reduziu essa potencialização. Novamente, a administração intra-dPAG do antagonista de receptores NMDA, AP7, não produziu efeitos sobre a amplitude do sobressalto, mas foi capaz de reverter os efeitos observados com o agonista. Apesar de usada somente uma única dose dos antagonistas glutamatérgicos, outros trabalhos utilizando doses similares ou menores observaram efeitos em outros testes comportamentais (AGUIAR; GUIMARAES, 2009; MOLCHANOV; GUIMARAES, 2002), indicando que a ausência de efeitos dos antagonistas não é resultado do uso de doses baixas.

É conhecido que a administração intra-dPAG de glutamato ou seus agonistas pode produzir resposta de congelamento (BANDLER; DEPAULIS, 1988; FERREIRA-NETTO et al., 2005). Entretanto, pouco se sabe a respeito do envolvimento da medição glutamatérgica da dPAG na resposta de congelamento condicionado. Em nossos experimentos, observamos que a manipulação da neurotransmissão glutamatérgica também alterou a expressão dessa resposta. Doses baixas dos agonistas ácido caínico (7,5 pmol) e NMDA (0,5 nmol) não alteraram enquanto que as doses maiores (ácido caínico 60 pmol e NMDA 2,0 nmol) incrementaram o tempo de congelamento condicionado. A administração do antagonista de receptores NMDA, AP7, por outro lado, foi capaz de reduzir essa resposta. Já o antagonista NBQX não produziu efeitos significativos quando administrado de forma isolada. Mais uma vez os efeitos pró-aversivos produzidos pelo ácido caínico e NMDA foram prevenidos pelo pré-tratamento com os respectivos antagonistas, confirmando o envolvimento seletivo dos receptores AMPA/Cainato e NMDA nessa ação.

Embora não tenhamos observado nenhum efeito significativo com NBQX nas doses aqui utilizadas, outro estudo mostrou que uma dose mais elevada desse antagonista foi capaz de produzir aumento da resposta de sobressalto potencializado pelo medo (FENDT, 2000). Em nossas mãos, em experimentos piloto, NBQX em doses maiores do que as usadas neste trabalho causaram déficits motores que impossibilitaram uma análise do medo condicionado. A ausência de efeitos sobre a resposta de sobressalto potencializado pelo medo, com a administração dos antagonistas de receptores AMPA/Cainato e NMDA na dPAG sugere que a neurotransmissão glutamatérgica não seria crítica para essa resposta. No entanto, um papel dos mecanismos glutamatérgicos nesta resposta não pode ser descartado, uma vez que a ativação de receptores glutamatérgicos da dPAG com agonistas AMPA/Cainato e NMDA produziram efeitos significativos sobre a potencialização da resposta de sobressalto. Uma interpretação plausível desses achados seria que a mediação da potencialização da resposta de

sobressalto seria multifacetada, dependendo de uma interação entre a mediação glutamatérgica e outros mecanismos mediados por outros neurotransmissores. Esse cenário é baseado em estudos anteriores demonstrando a modulação do sobressalto potencializado, na dPAG, através de mecanismos neurocininérgicos (ZHAO et al., 2009) e GABAérgicos (REIMER et al., 2008). Assim, mecanismos mediados por aminoácidos excitatórios da dPAG poderiam influenciar, mas não seriam requeridos para a expressão do sobressalto potencializado pelo medo.

Em nosso estudo, foram utilizadas doses de drogas que não produziram reações defensivas *per se*. Isso foi importante pois a ativação da dPAG por agonistas glutamatérgicos é capaz de eliciar comportamentos de congelamento e fuga e essas respostas poderiam interferir inespecificamente com os comportamentos de congelamento condicionado e com a potencialização da resposta de sobressalto. Os resultados do teste do campo aberto indicam que essas drogas não alteraram a capacidade motora dos animais e, portanto, não influenciaram as medidas de medo condicionado. Trabalhos anteriores utilizando-se de microinjeções de NBQX, ácido caínico, AP7 ou NMDA na dPAG, nas mesmas doses deste estudo, também não revelaram alterações na atividade motora dos animais (FENDT, 2000; MOLCHANOV; GUIMARAES, 2002). De qualquer forma, as respostas incondicionadas de defesa produzidas pelos agonistas glutamatérgicos são observadas somente com concentrações maiores de ácido caínico e NMDA (BANDLER; DEPAULIS, 1988; DEPAULIS; BANDLER; VERGNES, 1989; FERREIRA-NETTO et al., 2005). Cabe também ressaltar aqui que as drogas utilizadas não alteraram a resposta basal de sobressalto nas tentativas só-som, indicando que não houve interferência com o processamento da informação sensorial.

Nossos resultados são similares a estudos anteriores (FENDT, 2000; WALKER; DAVIS, 1997) nos quais foi relatado que a microinjeção intra-dPAG de agonistas

glutamatérgicos, em doses altas, causa uma redução da expressão do sobressalto potencializado pelo medo, o que em um primeiro momento poderia apontar para um efeito antiaversivo dessa manipulação nesse modelo. No entanto, estudos deste e de outros laboratórios indicam que diferentes estados de medo, produzidos por fármacos ou por distintas formas de condicionamento, podem contribuir para uma potencialização ou para a redução da resposta de sobressalto (DAVIS; ASTRACHAN, 1978; REIMER et al., 2008; SANTOS et al., 2005; WALKER; DAVIS, 1997). Assim, o que se observa é que estados moderados de medo causam uma potencialização máxima da resposta de sobressalto enquanto que estados de medo intenso podem abolir essa potencialização, seguindo uma relação não-monotônica entre a intensidade do medo e a amplitude da resposta. Nossa hipótese é que a apresentação do estímulo condicionado aversivo (luz) gera um estado de medo que é intensificado com o aumento da neurotransmissão glutamatérgica na dPAG. Esse estado de medo intenso provocaria um déficit de desempenho, reduzindo a resposta de sobressalto e, talvez, propiciando uma resposta defensiva mais adequada para essa determinada situação. Corroborando essa hipótese, observamos que as injeções de doses maiores dos agonistas AMPA/Cainato e NMDA na dPAG foram capazes de aumentar o comportamento de congelamento condicionado, indicando um aumento dos níveis de medo experimentado por esses animais, e não um efeito antiaversivo como poderia ser interpretado apenas com os resultados do teste do sobressalto. Uma melhor compreensão desta função não-monotônica entre a resposta de sobressalto e distintos estados de medo pode ampliar nosso entendimento de como os animais alternam possíveis comportamentos defensivos de acordo com as situações aversivas nas quais estes se encontram.

Ainda, com relação à circuitaria recrutada na redução da potencialização da resposta de sobressalto, uma possibilidade é a de que estados de medo intenso, os quais podem ser provocados por um condicionamento com choques de alta intensidade, promoveriam a

liberação de aminoácidos excitatórios na dPAG e esta estrutura influenciaria diretamente o núcleo reticular caudal da ponte (PnC), um relé obrigatório no circuito primário do sobressalto acústico (DAVIS et al., 1982; YEOMANS; FRANKLAND, 1995), reduzindo a potencialização da resposta de sobressalto. Essa série de eventos se mostra plausível uma vez que a PAG mantém conexões com o PnC (CAMERON et al., 1995; FENDT; KOCH; SCHNITZLER, 1994; ZHAO et al., 2009) e recebe projeções glutamatérgicas de estruturas-chave na modulação da resposta de sobressalto, como o complexo amigdalóide (especialmente o núcleo central) e outros centros envolvidos no processamento de estímulos aversivos condicionados, como o córtex cingulado (BEART et al., 1990; KÁLEN; KARLSON; WIKLUND, 1985). Assim, caso o condicionamento aversivo com choques intensos fosse adotado, esperar-se-ia que a manipulação farmacológica da dPAG com antagonistas glutamatérgicos revertesse a redução da potencialização da resposta de sobressalto causada pelo medo intenso.

É razoável sugerir a existência de certa competição entre a expressão das respostas de congelamento condicionado e de sobressalto potencializado, dependendo dos níveis de medo. A dPAG parece ser uma estrutura chave neste processo de comutação, uma vez que níveis intensos de medo gerados pela administração de agonistas glutamatérgicos reduzem o sobressalto potencializado em favor do aumento da resposta de congelamento e de, talvez, outras respostas defensivas condicionadas não avaliadas nesse estudo. Esta hipótese é apoiada pelo fato de que lesões da dPAG previnem o déficit no sobressalto potencializado pelo medo causado por um treino com choques intensos nas patas (WALKER; DAVIS, 1997), indicando uma participação desta estrutura neste processo. Outros estudos também têm sugerido um importante papel da PAG em influenciar a seleção de um dado comportamento entre outras respostas adaptativas. Por exemplo, a administração de morfina na coluna lateral da PAG produz a comutação entre os comportamentos maternal e de caça predatória (MOTA-ORTIZ

et al., 2012; SUKIKARA et al., 2006). Além disso, estudos de nosso laboratório já confirmaram o papel da dPAG na comutação entre os comportamentos de alerta, congelamento e fuga em animais submetidos à estimulação elétrica ou química desta região (BRANDÃO et al., 1982; FERREIRA-NETTO et al., 2005; MARTINEZ; DE OLIVEIRA; BRANDÃO, 2006; REIMER et al., 2009). Assim, nossos dados podem prover mais uma evidência do envolvimento da dPAG, e da mediação glutamatérgica, na seleção de repostas adaptativas frente a diferentes tipos/níveis de ameaça.

De forma geral, nossos resultados mostram que os receptores AMPA/Cainato e NMDA da dPAG estão envolvidos na expressão do medo condicionado. A dose menor de NMDA aumentou a potencialização do sobressalto, ao passo que doses altas dos agonistas AMPA/Cainato e NMDA inibiram tal potencialização. O aumento do congelamento devido ao tratamento com NMDA e ácido cáínico indica que a inibição da potencialização do sobressalto com as doses altas desses agonistas glutamatérgicos reflete um déficit de desempenho e não uma diminuição do medo.

EXPERIMENTO II

4. EXPERIMENTO II - Envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica do AH e do PMd no medo condicionado à luz

4.1. Material e métodos

4.1.1. Animais

Foram utilizados 291 ratos *Wistar* machos (*Rattus norvegicus*), com peso entre 270 e 300 g, mantidos sob as mesmas condições descritas para o Experimento I.

4.1.2. Cirurgia

Foram utilizados os mesmos procedimentos cirúrgicos descritos para o Experimento I. As coordenadas para a implantação das cânulas-guia foram: no AH – anteroposterior = -1,0 mm, médio-lateral = +0,4 mm e dorsoventral = -6,3 mm em relação ao *bregma*; no PMd – anteroposterior = -3,9 mm, médio-lateral = +0,4 mm e dorsoventral = -9,2 mm em relação ao *bregma*, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007).

4.1.3. Drogas

Foram utilizadas as mesmas drogas do Experimento I. As doses utilizadas para os agonistas e antagonistas de receptores glutamatérgicos foram: ácido caínico (30 pmol/0,2 µL); NBQX (10 nmol/0,2 µL); NMDA (0,25, 1,0 e 2,0 nmol/0,2 µL) e AP7 (2,0 e 4,0 nmol/0,2 µL). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de salina. As doses das drogas foram selecionadas com base em experimentos piloto e em estudos deste e de outros laboratórios (AGUIAR; GUIMARAES, 2011; JARDIM; GUIMARAES, 2004; NOBRE et al., 2004; SILVEIRA; GRAEFF, 1992; WALKER; DAVIS, 1997; ZHAO et al., 2009).

4.1.4. Microinjeções

O procedimento de microinjeção das drogas no AH e PMd foi similar àquele realizado no Experimento I. Entretanto, devido à localização bastante ventral de ambos os núcleos hipotalâmicos, a inserção da agulha de microinjeção ultrapassou em 2,0 mm a porção inferior da cânula-guia.

4.1.5. Equipamentos, Procedimento Experimental e Histologia

Idem Experimento I.

4.1.6. Análise Estatística

Os dados são apresentados como média + EPM, tendo sido analisados pelo programa computacional SigmaStat 3.11 (Systat, EUA). Para análise dos dados do teste de sobressalto potencializado pelo medo foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas. O fator 1 referiu-se ao *tratamento* e o fator 2 à *condição* (só-som × luz-som). No caso de significância estatística, foi aplicado o teste *post-hoc* de *Newman-Keuls*. Para análise do tempo de congelamento condicionado e das medidas motoras foram utilizadas ANOVAs de uma via ou o teste *t de Student* para os tratamentos. Um valor de *p* inferior a 0,05 foi considerado significativo.

4.2. Resultados

4.2.1. Núcleo Anterior do Hipotálamo Medial (AH)

4.2.1.1. Localização dos Sítios de Microinjeção

Os dados apresentados referem-se aos animais cujo exame histológico mostrou que a cânula-guia atingiu o AH. A Figura 11A mostra uma fotomicrografia representativa dos sítios

de microinjeção nessa estrutura A Figura 11B indica os pontos de microinjeção no AH em diagramas de encéfalo de ratos modificados do Atlas de Paxinos e Watson (2007).

Figura 11. Sítios de injeção no AH. Fotomicrografia representativa da localização dos sítios de microinjeção no AH de ratos (A). Em B estão indicados os sítios de microinjeção no AH em diagramas modificados do Atlas de Paxinos e Watson (2007). O número de pontos indicados é menor que o número de animais utilizados devido a várias sobreposições. AH = núcleo anterior do hipotálamo medial. PaV = núcleo paraventricular do hipotálamo. LV = ventrículo lateral. CPu = *caudato putamen*. Barra igual a 1,0 mm.

4.2.1.2. Receptores AMPA/Cainato

Sobressalto Potencializado pelo Medo e Congelamento Condicionado

A Figura 12 exibe os resultados referentes ao teste do sobressalto potencializado pelo medo e à medida de congelamento de animais que receberam microinjeções do agonista e antagonista de receptores AMPA/Cainato no AH.

A Figura 12A apresenta a média da amplitude de sobressalto dos animais que receberam microinjeções de ácido caínico (30 pmol) ou salina no AH dez minutos antes da sessão teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo no fator *condição*, $F_{(1,55)} = 33,74$; $p < 0,05$. A mesma análise não revelou efeitos significativos para *tratamento*, $F_{(1,26)} = 1,58$; $p > 0,05$, ou interação entre os dois fatores, $F_{(1,55)} = 0,23$; $p >$

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 12B mostra a média do tempo total de congelamento condicionado de animais que receberam microinjeções de ácido cáinico (30 pmol) no AH. O teste *t de Student* não revelou diferenças significativas entre os grupos $t_{(26)} = 0,54$; $p > 0,05$.

A Figura 12C apresenta a média da amplitude de sobressalto dos animais que receberam microinjeções de NBQX (10 nmol) ou salina no AH dez minutos antes da sessão teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *tratamento*, $F_{(1,24)} = 0,75$; $p > 0,05$. Esta mesma análise revelou diferenças significativas no fator *condição*, $F_{(1,51)} = 38,02$; $p < 0,05$. Não houve interação significativa entre os dois fatores, $F_{(1,51)} = 2,52$; $p > 0,05$. 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 12D mostra a média do tempo total de congelamento condicionado de animais que receberam microinjeções do antagonista AMPA/Cainato (NBQX 10 nmol) ou salina no AH dez minutos antes do teste. O teste *t de Student* não revelou diferenças significativas entre os grupos $t_{(24)} = 1,64$; $p > 0,05$.

Figura 12. Receptores AMPA/Cainato do AH e medo condicionado. **(A)** Efeitos da microinjeção intra-AH de salina (SAL) ou ácido caínico (AC 30 pmol) e **(C)** salina (SAL) ou NBQX (NBQX 10 nmol) sobre a amplitude do sobressalto nas condições só-som e luz-som. **(B e D)** Efeitos dos tratamentos previamente citados sobre o tempo de congelamento condicionado. Média + EPM. # $p < 0,05$ em relação à condição só-som ($p < 0,05$, *Newman-Keuls*). $n = 13$ para SAL e NBQX 10; $n = 15$ para AC 30.

Teste do Campo Aberto

As Figuras 13A e 13B apresentam as médias de atividade no campo aberto para o número de cruzamentos e levantamentos, respectivamente, para os animais que receberam microinjeções de salina, NBQX (10 nmol) ou ácido caínico (30 pmol) no AH. A ANOVA de uma via aplicada aos tratamentos não revelou diferenças significativas para cruzamentos, $F_{(2,24)} = 1,67$; $p > 0,05$ (Figura 13A) e levantamentos, $F_{(2,24)} = 0,90$; $p > 0,05$ (Figura 13B).

Figura 13. Receptores AMPA/Cainato do AH e efeitos motores no teste do campo aberto. Número de cruzamentos (A) e levantamentos (B) realizados por ratos que receberam microinjeções intra-AH de salina (SAL), NBQX (NBQX 10 nmol) ou ácido caínico (AC 30 pmol). $n = 9$ para todos os grupos. Média + EPM.

4.2.1.3. Receptores NMDA

Sobressalto Potencializado pelo Medo e Congelamento Condicionado

A Figura 14 exibe os resultados referentes ao teste do sobressalto potencializado pelo medo e a medida de congelamento de animais que receberam microinjeções do antagonista e agonista de receptores NMDA no AH.

A Figura 14A apresenta a média da amplitude de sobressalto dos animais que receberam microinjeções de NMDA (1,0 ou 2,0 nmol) ou salina no AH dez minutos antes da sessão teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo no fator *condição*, $F_{(1,75)} = 37,27$; $p < 0,05$. A mesma análise revelou efeito significativo para *tratamento*, $F_{(2,35)} = 3,74$; $p < 0,05$, mas não para a interação entre os dois fatores, $F_{(2,75)} = 2,48$; $p > 0,05$. 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 ($p < 0,05$). Além disso, a potencialização da resposta de sobressalto observada no grupo NMDA 1,0 nmol é diferente daquela observada com o grupo NMDA 2,0 nmol ($p < 0,05$). Nenhuma diferença, entretanto, foi observada em relação ao grupo controle ($p > 0,05$).

A Figura 14B mostra a média do tempo total de congelamento condicionado de animais que receberam microinjeções do agonista NMDA (1,0 ou 2,0 nmol) no AH. A ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas entre os grupos $F_{(2,35)} = 0,75$; $p > 0,05$.

A Figura 14C apresenta a média da amplitude de sobressalto dos animais que receberam microinjeções do antagonista AP7 (2,0 ou 4,0 nmol) ou salina no AH dez minutos antes da sessão teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *tratamento*, $F_{(2,32)} = 0,28$; $p > 0,05$. Esta mesma análise revelou diferenças significativas no fator *condição*, $F_{(1,69)} = 58,57$; $p < 0,05$. Não houve interação significativa entre os dois fatores, $F_{(2,69)} = 1,04$; $p > 0,05$. 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 14D mostra a média do tempo total de congelamento condicionado de animais que receberam microinjeções do antagonista AP7 (2,0 ou 4,0 nmol) ou salina no AH dez minutos antes do teste. A ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas entre os grupos $F_{(2,32)} = 0,31$; $p > 0,05$.

Figura 14. Receptores NMDA do AH e medo condicionado. **(A)** Efeitos da microinjeção intra-AH de salina (SAL) ou NMDA (NMDA 1,0 e 2,0 nmol) e **(C)** salina (SAL) ou AP7 (AP7 2,0 e 4,0 nmol) sobre a amplitude do sobressalto nas condições só-som e luz-som. **(B e D)** Efeitos dos tratamentos previamente citados sobre o tempo de congelamento condicionado. Média + EPM. # $p < 0,05$ em relação à condição só-som. ($p < 0,05$, *Newman-Keuls*). $n = 13$ para SAL, NMDA 1,0; AP7 2,0; $n = 12$ para NMDA 2,0; $n = 9$ para AP7 4,0.

Teste do Campo Aberto

As Figuras 15A e 15B apresentam as médias de atividade no campo aberto para o número de cruzamentos e levantamentos, respectivamente, para os animais que receberam microinjeções de salina, AP7 4,0 nmol e NMDA 2,0 nmol no AH. A ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas para cruzamentos, $F_{(2,24)} = 1,58$; $p > 0,05$ (Figura 15A) e levantamentos $F_{(2,24)} = 0,64$; $p > 0,05$ (Figura 15B).

Figura 15. Receptores NMDA do AH e efeitos motores no teste do campo aberto. Número de cruzamentos (A) e levantamentos (B) realizados por ratos que receberam microinjeções intra-AH de salina (SAL), AP7 (AP7 4,0 nmol) ou NMDA (NMDA 2,0 nmol). $n = 9$ para todos os grupos. Média + EPM.

4.2.2. Núcleo Pré-Mamilar Dorsal do Hipotálamo (PMd)

4.2.2.1. Localização dos Sítios de Microinjeção

Os dados apresentados referem-se aos animais cujo exame histológico indicou a localização da cânula no PMd. A Figura 16A mostra uma fotomicrografia representativa dos sítios de microinjeção nessa estrutura. A Figura 18B indica os pontos de microinjeção no PMd em diagramas de encéfalo de ratos modificados do Atlas de Paxinos e Watson (2007).

Figura 16. Sítios de injeção no PMd. Diagrama de corte coronal sobreposto a fotomicrografia representativa da localização dos sítios de microinjeção no PMd de ratos (A). Em B estão indicados os sítios de microinjeção no PMd em diagramas modificados do Atlas de Paxinos e Watson (2007). O número de pontos indicados é menor que o número de animais utilizados devido a várias sobreposições. PMd = núcleo pré-mamilar dorsal. LV = ventrículo lateral. 3V = terceiro ventrículo. Barra igual a 1,0 mm.

4.2.2.2. Receptores AMPA/Cainato

Sobressalto Potencializado pelo Medo e Congelamento Condicionado

A Figura 17 mostra os resultados referentes ao teste do sobressalto potencializado pelo medo e a medida do tempo de congelamento de animais que receberam microinjeções do agonista e antagonista de receptores AMPA/Cainato no PMd.

A Figura 17A apresenta a média da amplitude de sobressalto dos animais que receberam microinjeções de ácido cáinico (30 pmol) ou salina no PMd dez minutos antes da sessão teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo no fator *condição*, $F_{(1,43)} = 51,34$; $p < 0,05$. A mesma análise não revelou efeitos significativos para *tratamento*, $F_{(1,20)} = 0,14$; $p > 0,05$, ou interação entre os dois fatores, $F_{(1,43)} = 0,01$; $p >$

0,05. A análise *post-hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a luz potencializou a resposta de sobressalto em todos os grupos ($p < 0,05$).

A Figura 17B mostra a média do tempo total de congelamento condicionado de animais que receberam microinjeções do agonista AMPA/Cainato, ácido caínico (30 pmol) no PMd. O teste *t de Student* não revelou diferenças significativas entre os grupos $t_{(20)} = 0,60$; $p > 0,05$.

A Figura 17C apresenta a média da amplitude de sobressalto dos animais que receberam microinjeções de NBQX (10 nmol) ou salina no PMd dez minutos antes da sessão teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *tratamento*, $F_{(1,22)} = 0,18$; $p > 0,05$. Esta mesma análise revelou diferenças significativas no fator *condição*, $F_{(1,47)} = 41,82$; $p < 0,05$. Não houve interação significativa entre os dois fatores, $F_{(1,47)} = 0,32$; $p > 0,05$. 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 17D mostra a média do tempo total de congelamento condicionado de animais que receberam microinjeções do antagonista AMPA/Cainato (NBQX 10 nmol) ou salina no PMd dez minutos antes do teste. O teste *t de Student* não revelou diferenças significativas entre os grupos $t_{(22)} = 0,36$; $p > 0,05$.

Figura 17. Receptores AMPA/Cainato do PMd e medo condicionado. **(A)** Efeitos da microinjeção intra-PMd de salina (SAL) ou ácido cáínico (AC 30 pmol) e **(C)** salina (SAL) ou NBQX (NBQX 10 nmol) sobre a amplitude do sobressalto nas condições só-som e luz-som. **(B e D)** Efeitos dos tratamentos previamente citados sobre o tempo de congelamento condicionado. Média + EPM. # $p < 0,05$ em relação à condição só-som ($p < 0,05$, *Newman-Keuls*). $n = 12$ para SAL e NBQX 10; $n = 10$ para AC 30.

Teste do Campo Aberto

As Figuras 18A e 18B apresentam as médias de atividade no campo aberto para o número de cruzamentos e levantamentos, respectivamente, para os animais que receberam microinjeções de salina, NBQX (10 nmol) e ácido cáínico (30 pmol) no PMd. A ANOVA de uma via aplicada aos tratamentos não revelou diferenças significativas para cruzamentos, $F_{(2,24)} = 0,10$; $p > 0,05$ (Figura 18A) ou levantamentos, $F_{(2,24)} = 1,73$; $p > 0,05$ (Figura 18B).

Figura 18. Receptores AMPA/Cainato do PMd e efeitos motores no teste do campo aberto. Número de cruzamentos (**A**) e levantamentos (**B**) realizados por ratos que receberam microinjeções intra-PMd de salina (SAL), NBQX (NBQX 10 nmol) ou ácido caínico (AC 30 pmol). $n = 9$ para todos os grupos. Média + EPM.

4.2.2.3. Receptores NMDA

Sobressalto Potencializado pelo Medo e Congelamento Condicionado

A Figura 19 exibe os resultados referentes ao teste do sobressalto potencializado pelo medo e a medida de congelamento de animais que receberam microinjeções do antagonista e agonista de receptores NMDA no PMd.

A Figura 19A apresenta a média da amplitude de sobressalto dos animais que receberam microinjeções de NMDA (0,25 nmol) ou salina no PMd dez minutos antes da sessão teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo no fator *condição*, $F_{(1,47)} = 47,10$; $p < 0,05$. A mesma análise não revelou efeito significativo para *tratamento*, $F_{(1,22)} = 0,35$; $p > 0,05$, ou para interação entre os dois fatores, $F_{(1,47)} = 0,79$; $p > 0,05$. 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 19B mostra a média do tempo total de congelamento condicionado de animais que receberam microinjeções do agonista NMDA (0,25 nmol) no PMd. O teste *t de Student* não revelou diferenças significativas entre os grupos $t_{(22)} = 0,87$; $p > 0,05$.

A Figura 19C apresenta a média da amplitude de sobressalto dos animais que receberam microinjeções do antagonista AP7 (2,0 ou 4,0 nmol) ou salina no PMd dez minutos antes da sessão teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeito significativo no fator *tratamento*, $F_{(2,33)} = 0,11$; $p > 0,05$. Esta mesma análise revelou diferenças significativas no fator *condição*, $F_{(1,71)} = 56,13$; $p < 0,05$. Não houve interação significativa entre os dois fatores, $F_{(2,71)} = 1,45$; $p > 0,05$. 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 19D mostra a média do tempo total de congelamento condicionado de animais que receberam microinjeções do antagonista AP7 (2,0 ou 4,0 nmol) ou salina no PMd dez minutos antes do teste. A ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas entre os grupos $F_{(2,33)} = 0,54$; $p > 0,05$.

Figura 19. Receptores NMDA do PMd e medo condicionado. **(A)** Efeitos da microinjeção intra-PMd de salina (SAL) ou NMDA (NMDA 0,25 nmol) e **(C)** salina (SAL) e AP7 (AP7 2,0 e 4,0 nmol) sobre a amplitude do sobressalto nas condições só-som e luz-som. **(B e D)** Efeitos dos tratamentos previamente citados sobre o tempo de congelamento condicionado. Média + EPM. # $p < 0,05$ em relação à condição só-som. ($p < 0,05$, *Newman-Keuls*). $n = 12$ para todos os grupos.

Teste do Campo Aberto

As Figuras 20A e 20B apresentam as médias de atividade no campo aberto para o número de cruzamentos e levantamentos, respectivamente, para os animais que receberam microinjeções de salina, AP7 (4,0 nmol) e NMDA (0,25 nmol) no PMd. A ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas para cruzamentos, $F_{(2,24)} = 0,90$; $p > 0,05$ (Figura 20A) ou levantamentos, $F_{(2,24)} = 0,71$; $p > 0,05$ (Figura 20B).

Figura 20. Receptores NMDA do PMd e efeitos motores no teste do campo aberto. Número de cruzamentos (A) e levantamentos (B) realizados por ratos que receberam microinjeções intra-PMd de salina (SAL), AP7 (AP7 4,0 nmol) ou NMDA (NMDA 0,25 nmol). $n = 9$ para todos os grupos. Média + EPM.

4.3. Discussão

O hipotálamo desempenha um papel importante na expressão de diferentes respostas autonômicas e comportamentais necessárias à sobrevivência do indivíduo e da espécie (CANTERAS, 2002; REICHLIN et al., 1976; SILVEIRA; GRAEFF, 1992). Um circuito hipotalâmico de defesa tem sido definido como crítico para a integração de respostas autonômicas, endócrinas e comportamentais às ameaças predatórias. Esse circuito, composto pelos núcleos AH, VMHDM e PMd, parece ser recrutado durante a expressão de respostas defensivas e sua lesão ou inativação, particularmente do PMd, reduz significativamente as reações de defesa frente a estímulos incondicionados, como a exposição ao predador natural (CANTERAS, 2002; CANTERAS et al., 2008; CEZÁRIO et al., 2008; DI SCALA et al., 1984). Entretanto, se e como esse circuito está envolvido na elaboração de respostas defensivas a estímulos condicionados unimodais, e a neurotransmissão subjacente a essas respostas, ainda é pouco conhecido.

No presente trabalho foi avaliada a participação da neurotransmissão glutamatérgica do AH e PMd na expressão do medo condicionado à luz. A escolha desses núcleos foi realizada com base em evidências comportamentais, farmacológicas e imunoistoquímicas do

envolvimento do AH e PMd na mediação de respostas a estímulos condicionados (CANTERAS, 2002; CARVALHO-NETTO et al., 2010; CEZÁRIO et al., 2008; PAGANI; ROSEN, 2009; SANTOS et al., 2008). Ainda, a relação do AH e PMd com a dPAG – outra estrutura estudada nesse trabalho – e com o complexo amigdalóide – área de grande importância para o medo condicionado – foi levada em consideração para a escolha desses núcleos.

Em nosso estudo não foram observadas alterações na resposta de sobressalto potencializada pelo medo a partir de manipulações da neurotransmissão glutamatérgica do AH. A administração intra-AH dos agonistas e antagonistas de receptores AMPA/Cainato e NMDA não produziu alterações significativas na resposta de sobressalto potencializada pelo medo ou na resposta de congelamento condicionado. As doses das drogas utilizadas não comprometeram o desempenho motor dos animais no teste do campo aberto.

Acerca dos resultados com a manipulação farmacológica do PMd, novamente não foram encontradas alterações na resposta de sobressalto potencializado pelo medo e congelamento condicionado com a administração local dos agonistas e antagonistas AMPA/Cainato e NMDA. Novamente as doses das drogas utilizadas não produziram efeitos motores, como observado no teste do campo aberto.

De acordo com estudos anteriores, os núcleos AH e PMd – reconhecidos por seu envolvimento nas respostas defensivas incondicionadas – parecem também participar da elaboração do comportamento de defesa frente a estímulos condicionados, quando o CS é o contexto e o US é a exposição ao predador (CANTERAS et al., 2008; CARVALHO-NETTO et al., 2010; CEZÁRIO et al., 2008). Dessa forma, existem evidências de que o circuito hipotalâmico de defesa seria recrutado não apenas frente a estímulos aversivos incondicionados, mas também durante o processamento de memórias aversivas condicionadas. Em nosso estudo observamos que os fármacos que agem sobre a mediação

glutamatérgica não produziram efeitos nas respostas condicionadas de medo quando administrados no MH. Doses maiores das drogas aqui utilizadas poderiam causar alterações nas respostas de medo condicionado, entretanto, observamos que doses maiores causam alterações motoras que impedem a avaliação do medo condicionado à luz (Apêndice B desta tese). Sendo assim, é razoável sugerir que a neurotransmissão glutamatérgica do AH e PMd não tomaria parte na expressão de respostas condicionadas de medo quando o US é o choque nas patas e o CS é uma luz.

De fato, alguns trabalhos indicam que o envolvimento do circuito hipotalâmico de defesa na expressão de repostas de medo condicionado parece ser pontual ou restrito. Pagani e Rosen (2009) mostraram que a lesão química ou eletrolítica do AH não afeta o congelamento condicionado contextual (com a aplicação de choques nas patas como US), indicando que essa estrutura não seria crítica para a expressão de respostas condicionadas de medo. Neste mesmo trabalho a lesão eletrolítica do PMd reduziu a resposta de congelamento condicionado. Apesar disso, dado que a lesão eletrolítica poderia estar afetando fibras de passagem, não fica totalmente esclarecido o envolvimento dessa estrutura no medo condicionado contextual, quando este não é associado com ameaça predatória. Adicionalmente, outro estudo indicou que a lesão do PMd não altera a resposta de congelamento que acompanha o choque nas patas, mas reduz significativamente as respostas defensivas frente ao odor do predador (BLANCHARD et al., 2003). De acordo com os trabalhos supracitados é apropriado sugerir que o MH esteja associado, em maior grau, a respostas defensivas condicionadas frente à ameaça predatória.

Deve haver cautela na comparação entre diferentes modelos animais que avaliam respostas defensivas a estímulos condicionados. Dada a diversidade de técnicas empregadas e, principalmente, a variedade de estímulos utilizados como US ou CS em experimentos de medo condicionado, nem sempre os resultados observados podem ser comparáveis. Diversos

estudos reforçam a possibilidade de que diferentes modalidades de condicionamento aversivo, utilizando distintos CS, recrutem diferentes estruturas. Phillips e LeDoux (1992) observaram que a lesão da amígdala inibe a expressão do medo condicionado, independente da modalidade de estímulo condicionado utilizado (contexto ou estímulo auditivo), ao passo que a lesão do hipocampo afeta somente a resposta condicionada ao contexto. Riedel e colaboradores (1997) mostraram que a lesão do núcleo accumbens reduz a resposta de congelamento condicionado ao contexto, mas não altera essa resposta quando o estímulo condicionado é um estímulo unimodal. Ainda, Shi e Davis (2001) observaram que as lesões pós-treino do corpo geniculado lateral e do núcleo lateral posterior do tálamo bloqueiam a expressão do sobressalto potencializado pelo medo quando o CS é um estímulo luminoso, mas não alteram as respostas de sobressalto ou congelamento frente a estímulos condicionados contextuais.

Da mesma forma, a natureza do US pode levar a ativação de estruturas e circuitarias diferentes. De fato, é razoável que procedimentos de condicionamento utilizando estímulos desagradáveis ou dolorosos, como choques nas patas, ativem áreas e circuitaria diferentes daquelas recrutadas pela exposição da presa ao seu predador natural. Assim, os vários núcleos do complexo amigdalóide apresentam uma ativação diferencial de acordo com as propriedades aversivas dos estímulos incondicionados. Tal ativação diferencial pode resultar, por exemplo, no recrutamento de diferentes mecanismos para a expressão das respostas condicionadas de medo. De fato, diversos trabalhos indicam a participação do núcleo central da amígdala em respostas condicionadas de medo quando o US é o choque nas patas e, sua lesão reduz significativamente as respostas de congelamento condicionado e de sobressalto potencializado (GOOSENS; MAREN, 2001; HITCHCOCK; DAVIS, 1991; ROOZENDAAL; KOOLHAAS; BOHUS, 1990; WALKER; DAVIS, 2002b). Interessantemente, um recente estudo (MARTINEZ et al., 2011) mostrou que o núcleo central não estaria envolvido no

processamento da resposta condicionada ao contexto associado ao predador. Em vez disso, outros núcleos do complexo amigdalóide, como o núcleo basomedial posterior e o núcleo lateral, tomariam parte nessa resposta defensiva condicionada. Adicionalmente, Blanchard e colaboradores (2005) observaram que a lesão do núcleo medial da amígdala reduz o congelamento condicionado quando o US é a exposição ao predador, mas não quando o estímulo aversivo é o choque nas patas. Assim, fica claro que muitos estudos ainda se fazem necessários para o entendimento de como a informação condicionada aversiva é processada por diferentes estruturas e circuitarias.

Em nosso trabalho manipulações da neurotransmissão glutamatérgica do AH e PMd não afetaram a expressão das respostas de sobressalto e congelamento condicionado. A participação destas estruturas, em particular o AH, na modulação do medo condicionado à luz-CS não pode, entretanto, ser excluída. Estudo anterior desse laboratório observou alterações na expressão da resposta de sobressalto potencializada pelo medo a partir da estimulação (com semicarbazida, um inibidor da síntese de GABA) e inativação do AH (com muscimol, um agonista GABA-A) (SANTOS et al., 2008). Assim, ainda que nossos dados não indiquem a participação do AH e PMd no medo condicionado à luz, não pode ser descartada a hipótese de que outros mediadores químicos dessas estruturas tomem parte nas respostas a estímulos condicionados não relacionados à ameaça predatória.

DISCUSSÃO GERAL

5. DISCUSSÃO GERAL

O envolvimento da dPAG e do MH na mediação de comportamentos defensivos inatos e no sistema motivacional de medo encontra-se, de certa forma, bem estabelecido. Trabalhos clássicos e recentes têm revelado certa similaridade nas respostas obtidas a partir da estimulação e lesão dessas estruturas (BRANDÃO et al., 1982; CANTERAS et al., 1997; HUNSPERGER, 1956; REIMER et al., 2009; SILVEIRA; GRAEFF, 1992). Ainda que essas semelhanças existam, é preciso ressaltar a existência de algumas particularidades na expressão dos comportamentos eliciados pela estimulação da dPAG e MH. Por exemplo, a resposta de congelamento aparece somente durante a estimulação da dPAG (BRANDÃO et al.; REIMER et al., 2009) e não com a estimulação do MH (MILANI; GRAEFF, 1987). Além disso, a resposta de fuga apresenta-se mais coordenada a partir da estimulação do MH em relação àquela observada com a estimulação da dPAG (BRANDÃO et al., 1986; MILANI; GRAEFF, 1987; SILVEIRA; GRAEFF, 1992). Nessa mesma direção, a estimulação elétrica ou química é capaz de produzir distintos padrões de marcação da proteína Fos quando a área estimulada é a dPAG ou o MH (SILVEIRA et al., 1995). Assim, diversos trabalhos parecem indicar que o papel dos substratos da aversão da dPAG e MH são diferentes.

Nesse contexto, a participação da dPAG e do MH em estados de medo condicionado é menos compreendida e o envolvimento dos diversos mediadores químicos na expressão de respostas de medo condicionado nestas estruturas ainda é pouco estudado.

O presente estudo avaliou o envolvimento de receptores glutamatérgicos da dPAG e do MH (AH e PMd) na expressão do medo condicionado à luz. Nossos resultados indicaram que a mediação glutamatérgica na dPAG parece participar da modulação das respostas condicionadas de congelamento e sobressalto. Sugere-se que o incremento na neurotransmissão glutamatérgica atuaria no sentido de reduzir a resposta de sobressalto em favor da resposta de congelamento. A microinjeção dos antagonistas glutamatérgicos na

dPAG reverteram o déficit na potencialização da resposta de sobressalto e reduziram o aumento da resposta de congelamento causada pelos agonistas.

Já, no caso dos núcleos hipotalâmicos, alterações na neurotransmissão glutamatérgica no AH e PMd não alteraram de forma significativa a expressão das respostas de congelamento condicionado e sobressalto potencializado pelo medo. Estes resultados não excluem a participação destas estruturas no medo condicionado à luz, entretanto indicam que a mediação glutamatérgica parece não tomar parte na expressão de respostas a estímulos condicionados explícitos.

É importante notar que a expressão das respostas defensivas mediadas pela ação de aminoácidos excitatórios pode depender da ativação diferencial dos subtipos de receptores glutamatérgicos (WALKER; DAVIS, 2002b; WALKER; PASCHALL; DAVIS, 2005; ZIMMERMAN; MAREN, 2010). Apesar disso, em nosso trabalho, com a utilização de drogas que atuam especificamente nos receptores AMPA/Cainato ou nos receptores NMDA, os resultados obtidos não apontam para efeitos específicos para determinado tipo de receptor, uma vez que observamos efeitos parecidos, independente do subtipo de receptor estudado.

Cabe ressaltar ainda que a avaliação da resposta de congelamento aliada ao teste do sobressalto potencializado pelo medo se mostrou bastante conveniente. Essa abordagem metodológica, além de propiciar a utilização de um menor número de animais e minimizar variáveis em relação a testes realizados separadamente, traz evidências adicionais a respeito do estado de medo e possibilitaram, nesse estudo, o esclarecimento de resultados aparentemente conflitantes – como a diminuição da potencialização do sobressalto com a administração de agonistas glutamatérgicos na dPAG

Por fim, apesar das similaridades entre a participação de aminoácidos excitatórios da dPAG e MH na regulação de comportamentos defensivos a estímulos aversivos incondicionados, fica evidente com os resultados aqui obtidos a existência de uma

participação diferencial da neurotransmissão glutamatérgica da dPAG e do MH na expressão de respostas de medo condicionado à luz.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A mediação glutamatérgica da dPAG parece participar da modulação das respostas condicionadas de congelamento e sobressalto. Sugere-se que esta mediação atuaria no sentido de reduzir a resposta de sobressalto em favor da resposta de congelamento.

Os resultados sugerem um papel parecido dos mecanismos glutamatérgicos mediados por receptores NMDA e AMPA/Cainato da dPAG na expressão de respostas condicionadas de medo.

A mediação glutamatérgica do AH e do PMd parece não influenciar as respostas de medo condicionado à luz.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

AGUIAR, D. C.; GUIMARAES, F. S. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 11, p. 2418-2429, 2009.

_____. Blockade of NMDA or NO in the dorsal premammillary nucleus attenuates defensive behaviors. **Physiology and Behavior**, v. 103, n. 3-4, p. 279-283, 2011.

AGUIAR, M. S.; BRANDÃO, M. L. Conditioned Place Aversion Produced by Microinjections of Substance-P into the Periaqueductal Gray of Rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 369-373, 1994.

ALBIN, R. L. et al. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. **Neuroscience Letters**, v. 118, n. 1, p. 112-115, 1990.

ALLEN, T. A. et al. Imaging the spread of reversible brain inactivations using fluorescent muscimol. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 171, n. 1, p. 30-38, 2008.

AVANZI, V. et al. 5-HT mechanisms of median raphe nucleus in the conditioned freezing caused by light/foot-shock association. **Physiology and Behavior**, v. 78, n. 3, p. 471-477, 2003.

AZEVEDO, A. D.; VERAS-SILVA, A. S. Patterns of cardiovascular and respiratory responses evoked by stimulation of the defense area in the white-belly opossum (*Didelphis albiventris*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, n. 6, p. 845-850, 1987.

BANDLER, R. Induction of 'rage' following microinjections of glutamate into midbrain but not hypothalamus of cats. **Neuroscience Letters**, v. 30, n. 2, p. 183-188, 1982.

BANDLER, R.; CARRIVE, P. Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. **Brain Research**, v. 439, n. 1-2, p. 95-106, 1988.

BANDLER, R.; DEPAULIS, A. Elicitation of intraspecific defence reactions in the rat from midbrain periaqueductal grey by microinjection of kainic acid, without neurotoxic effects. **Neuroscience Letters**, v. 88, n. 3, p. 291-296, 1988.

BANDLER, R.; KEAY, K. A. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. **Progress in Brain Research**, v. 107, p. 285-300, 1996.

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

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annual Review of Neuroscience**, v. 7, p. 309-338, 1984.

BEART, P. M. et al. Excitatory amino acid projections to the periaqueductal gray in the rat: a retrograde transport study utilizing D[3H]aspartate and [3H]GABA. **Neuroscience**, v. 34, n. 1, p. 163-176, 1990.

BEITZ, A. J. Relationship of glutamate and aspartate to the periaqueductal gray-raphe magnus projection: analysis using immunocytochemistry and microdialysis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1755-1765, 1990.

BLANCHARD, D. C. et al. Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1243-1253, 2005.

BLANCHARD, D. C. et al. Dorsal premammillary nucleus differentially modulates defensive behaviors induced by different threat stimuli in rats. **Neuroscience Letters**, v. 345, n. 3, p. 145-148, 2003.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Crouching as an index of fear. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 67, n. 3, p. 370-375, 1969a.

_____. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 68, n. 1, p. 129-135, 1969b.

_____. Defensive reactions in the albino rat. **Learning and Motivation**, v. 2, n. 4, p. 351-362, 1971.

BLANCHARD, R. J.; FLANNELLY, K. J.; BLANCHARD, D. C. Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. **Journal of Comparative Psychology**, v. 100, n. 2, p. 101-107, 1986.

BLANCHARD, R. J.; MAST, M.; BLANCHARD, D. C. Stimulus control of defensive reactions in the albino rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 88, n. 1, p. 81-88, 1975.

BOLLES, R. C. Species-Specific Defense Reactions and Avoidance Learning. **Psychological Review**, v. 77, n. 1, p. 32-48, 1970.

BOLLES, R. C.; COLLIER, A. C. Effect of Predictive Cues on Freezing in Rats. **Animal Learning & Behavior**, v. 4, n. Na1, p. 6-8, 1976.

BRANDÃO, M. L. et al. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 6, p. 863-875, 1999.

BRANDÃO, M. L. et al. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 18, n. 3, p. 339-346, 1994.

BRANDÃO, M. L.; DE AGUIAR, J. C.; GRAEFF, F. G. GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 16, n. 3, p. 397-402, 1982.

BRANDÃO, M. L. et al. Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 3, p. 497-501, 1986.

BRANDÃO, M. L. et al. 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, n. 1-3, p. 225-233, 2003.

BRANDÃO, M. L. et al. Chlordiazepoxide and morphine reduce pressor response to brain stimulation in awake rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 23, n. 6, p. 1069-1071, 1985.

BRANN, D. W. Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. **Neuroendocrinology**, v. 61, n. 3, p. 213-225, 1995.

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, n. 5, p. 317-328, 1951.

CAMERON, A. A. et al. The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. II. Descending projections. **Journal of Comparative Neurology**, v. 351, n. 4, p. 585-601, 1995.

CANTERAS, N. S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 3, p. 481-491, 2002.

CANTERAS, N. S. et al. Severe Reduction of Rat Defensive Behavior to a Predator by Discrete Hypothalamic Chemical Lesions. **Brain Research Bulletin**, v. 44, n. 3, p. 297-305, 1997.

CANTERAS, N. S. et al. Sensing danger through the olfactory system: The role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 7, p. 1228-1235, 2008.

CARDOSO, S. H.; COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. **Behavioural Brain Research**, v. 63, n. 1, p. 17-24, 1994.

CARRIVE, P.; BANDLER, R. Viscerotopic organization of neurons subserving hypotensive reactions within the midbrain periaqueductal grey: a correlative functional and anatomical study. **Brain Research**, v. 541, n. 2, p. 206-215, 1991.

CARVALHO-NETTO, E. F. et al. Evidence for the thalamic targets of the medial hypothalamic defensive system mediating emotional memory to predatory threats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 93, n. 4, p. 479-486, 2010.

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

CASTILHO, V. M.; MACEDO, C. E.; BRANDÃO, M. L. Role of benzodiazepine and serotonergic mechanisms in conditioned freezing and antinociception using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray as unconditioned stimulus in rats. **Psychopharmacology**, v. 165, n. 1, p. 77-85, 2002.

CEZÁRIO, A. F. et al. Hypothalamic sites responding to predator threats - the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 5, p. 1003-1015, 2008.

CHIAVEGATTO, S.; SCAVONE, C.; CANTERAS, N. S. Nitric oxide synthase activity in the dorsal periaqueductal gray of rats expressing innate fear responses. **Neuroreport**, v. 9, n. 4, p. 571-576, 1998.

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

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

_____. Fear-potentiated startle in rats. **Current Protocols in Neuroscience**, p. 11A.1-11A.11, 2001.

_____. Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle. **American Psychologist**, v. 61, n. 8, p. 741-756, 2006.

DAVIS, M.; ASTRACHAN, D. I. Conditioned fear and startle magnitude: effects of different footshock or backshock intensities used in training. **Journal of Experimental Psychology**, v. 4, n. 2, p. 95-103, 1978.

DAVIS, M. et al. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. **Behavioural Brain Research**, v. 58, n. 1-2, p. 175-198, 1993.

DAVIS, M. et al. A primary acoustic startle circuit: lesion and stimulation studies. **The Journal of Neuroscience**, v. 2, n. 6, p. 791-805, 1982.

DE MENEZES, R. C. et al. Microinjection of muscimol into the periaqueductal gray suppresses cardiovascular and neuroendocrine response to air jet stress in conscious rats. **American Journal of Physiology**, v. 295, n. 3, p. 881-890, 2008.

DE OLIVEIRA, A. R.; REIMER, A. E.; BRANDÃO, M. L. Dopamine D2 receptor mechanisms in the expression of conditioned fear. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 84, n. 1, p. 102-111, 2006.

_____. Role of dopamine receptors in the ventral tegmental area in conditioned fear. **Behavioural Brain Research**, v. 199, n. 2, p. 271-277, 2009.

DEPAULIS, A.; BANDLER, R. **The Midbrain periaqueductal gray matter : functional, anatomical, and neurochemical organization / edited by Antoine Depaulis and Richard Bandler**. New York : : Plenum Press, 1991. ISBN 0306440334.

DEPAULIS, A.; BANDLER, R.; VERGNES, M. Characterization of pretentorial periaqueductal gray matter neurons mediating intraspecific defensive behaviors in the rat by microinjections of kainic acid. **Brain Research**, v. 486, n. 1, p. 121-132, 1989.

DI SCALA, G.; SCHMITT, P.; KARLI, P. Flight induced by infusion of bicuculline methiodide into periventricular structures. **Brain Research**, v. 309, n. 2, p. 199-208, 1984.

EYIGOR, O.; CENTERS, A.; JENNES, L. Distribution of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the rat hypothalamus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 434, n. 1, p. 101-124, 2001.

FANSELOW, M. S. What Is Conditioned Fear. **Trends in Neurosciences**, v. 7, n. 12, p. 460-462, 1984.

FANSELOW, M. S.; BOLLES, R. C. Triggering of the Endorphin Analgesic Reaction by a Cue Previously Associated with Shock - Reversal by Naloxone. **Bulletin of the Psychonomic Society**, v. 14, n. 2, p. 88-90, 1979.

FENDT, M. Expression and conditioned inhibition of fear-potentiated startle after stimulation and blockade of AMPA/Kainate and GABA(A) receptors in the dorsal periaqueductal gray. **Brain Research**, v. 880, n. 1-2, p. 1-10, 2000.

_____. Injections of the NMDA receptor antagonist aminophosphonopentanoic acid into the lateral nucleus of the amygdala block the expression of fear-potentiated startle and freezing. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 11, p. 4111-4115, 2001.

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 5, p. 743-760, 1999.

FENDT, M.; KOCH, M.; SCHNITZLER, H. U. Lesions of the central gray block the sensitization of the acoustic startle response in rats. **Brain Research**, v. 661, n. 1-2, p. 163-173, 1994.

FERREIRA-NETTO, C.; BORELLI, K. G.; BRANDÃO, M. L. Neural segregation of Fos-protein distribution in the brain following freezing and escape behaviors induced by injections of either glutamate or NMDA into the dorsal periaqueductal gray of rats. **Brain Research**, v. 1031, n. 2, p. 151-163, 2005.

FLESHLER, M. Adequate acoustic stimulus for startle reaction in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 60, n. 2, p. 200-207, 1965.

FOGAÇA, M. V. et al. Fine-tuning of defensive behaviors in the dorsal periaqueductal gray by atypical neurotransmitters. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 357-365, 2012.

GLOVER, E.; DAVIS, M. Anxiolytic-like effects of morphine and buprenorphine in the rat model of fear-potentiated startle: tolerance, cross-tolerance, and blockade by naloxone. **Psychopharmacology**, v. 198, n. 2, p. 167-180, 2008.

GOOSENS, K. A.; MAREN, S. Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. **Learning & Memory**, v. 8, n. 3, p. 148-155, 2001.

GRAEFF, F. G. Minor tranquilizers and brain defense systems. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 14, n. 4-5, p. 239-265, 1981.

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

GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. Fundamentals of the septo-hippocampal system. In: MACKINTOSH, N. J.; MCGAUGH, J. L., *et al* (Ed.). **The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of septo-hippocampal system**: Oxford University Press, 2000. p.204-232.

HITCHCOCK, J. M.; DAVIS, M. Efferent pathway of the amygdala involved in conditioned fear as measured with the fear-potentiated startle paradigm. **Behavioral Neuroscience**, v. 105, n. 6, p. 826-842, 1991.

HUNSPERGER, R. W. Affective reaction from electric stimulation of brain stem in cats. **Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta**, v. 14, n. 1, p. 70-92, 1956.

INGRAM, W. R. The Hypothalamus: A Review of the Experimental Data. **Psychosomatic Medicine**, v. 1, n. 1, p. 48-91, 1939.

IZQUIERDO, I. et al. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. **Behavioral and Neural Biology**, v. 58, n. 1, p. 16-26, 1992.

JANE, D. E.; LODGE, D.; COLLINGRIDGE, G. L. Kainate receptors: pharmacology, function and therapeutic potential. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 1, p. 90-113, 2009.

JARDIM, M. C. et al. Role of glutamate ionotropic and benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus on anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 82, n. 1, p. 182-189, 2005.

JARDIM, M. C.; GUIMARAES, F. S. Role of glutamate ionotropic receptors in the dorsomedial hypothalamic nucleus on anxiety and locomotor behavior. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 79, n. 3, p. 541-546, 2004.

JARRARD, L. E. Selective hippocampal lesions and behavior: effects of kainic acid lesions on performance of place and cue tasks. **Behavioral Neuroscience**, v. 97, n. 6, p. 873-889, 1983.

JURGENS, U.; LU, C. L. The effects of periaqueductally injected transmitter antagonists on forebrain-elicited vocalization in the squirrel monkey. **European Journal of Neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 735-741, 1993a.

_____. Interactions between glutamate, GABA, acetylcholine and histamine in the periaqueductal gray's control of vocalization in the squirrel monkey. **Neuroscience Letters**, v. 152, n. 1-2, p. 5-8, 1993b.

KÁLEN, P.; KARLSON, M.; WIKLUND, L. Possible excitatory amino acid afferents to nucleus raphe dorsalis of the rat investigated with retrograde wheat germ agglutinin and D-[3H]aspartate tracing. **Brain Research**, v. 360, n. 1-2, p. 285-297, 1985.

KEAY, K. A.; BANDLER, R. Periaqueductal Gray. In: PAXINOS, G. (Ed.). **The Rat Nervous System** 3rd. CA, USA: Elsevier Academic Press, 2004. p.243-257. ISBN 978-0-12-547638-6.

KIM, J. J.; RISON, R. A.; FANSELOW, M. S. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. **Behavioral Neuroscience**, v. 107, n. 6, p. 1093-1098, 1993.

KOCH, M. The neurobiology of startle. **Progress in Neurobiology**, v. 59, n. 2, p. 107-128, 1999.

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, n. 1, p. 61-67, 1985.

LAMMERS, J. H. et al. Hypothalamic substrates for brain stimulation-induced attack, teeth-chattering and social grooming in the rat. **Brain Research**, v. 449, n. 1-2, p. 311-327, 1988a.

_____. Hypothalamic substrates for brain stimulation-induced patterns of locomotion and escape jumps in the rat. **Brain Research**, v. 449, n. 1-2, p. 294-310, 1988b.

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

LIPP, H. P.; HUNSPERGER, R. W. Threat, attack and flight elicited by electrical stimulation of the ventromedial hypothalamus of the marmoset monkey *Callithrix jacchus*. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 15, n. 4, p. 260-293, 1978.

LOVICK, T. A. Interactions between descending pathways from dorsal and ventrolateral periaqueductal gray matter in the rat. In: DEPAULIS, A. e BANDLER, R. (Ed.). **The midbrain periaqueductal gray matter functional, anatomical and neurochemical organization**. Illinois: Plenum Press, 1991. p.101-120. ISBN 0306440334, 9780306440335.

LUYTEN, L. et al. Optimization of a contextual conditioning protocol for rats using combined measurements of startle amplitude and freezing: the effects of shock intensity and different types of conditioning. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 194, n. 2, p. 305-311, 2011.

MARTINEZ, R. C. et al. Amygdalar roles during exposure to a live predator and to a predator-associated context. **Neuroscience**, v. 172, p. 314-328, 2011.

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

MATHEW, S. J. et al. Open-label trial of riluzole in generalized anxiety disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 12, p. 2379-2381, 2005.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: Fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 285-305, 2004.

MCNISH, K. A.; GEWIRTZ, J. C.; DAVIS, M. Evidence of Contextual Fear after Lesions of the Hippocampus: A Disruption of Freezing But Not Fear-Potentiated Startle. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 23, p. 9353-9360, 1997.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 4, p. 1007s-1015s, 2000.

MICHAELIS, E. K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. **Progress in Neurobiology**, v. 54, n. 4, p. 369-415, 1998.

MILANI, H.; GRAEFF, F. G. GABA-benzodiazepine modulation of aversion in the medial hypothalamus of the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 28, n. 1, p. 21-27, 1987.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress in Neurobiology**, v. 70, n. 2, p. 83-244, 2003.

MITCHELL, I. J.; DEAN, P.; REDGRAVE, P. The projection from superior colliculus to cuneiform area in the rat. II. Defence-like responses to stimulation with glutamate in cuneiform nucleus and surrounding structures. **Experimental Brain Research**, v. 72, n. 3, p. 626-639, 1988.

MOGHADDAM, B. Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. **Biological Psychiatry**, v. 51, n. 10, p. 775-787, 2002.

MOLCHANOV, M. L.; GUIMARAES, F. S. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**, v. 160, n. 1, p. 30-38, 2002.

MONASSI, C. R.; HOFFMANN, A.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Participation of the periaqueductal gray matter in the modulation of tonic immobility in the guinea pig. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 5, p. 1243-1248, 1994.

MOTA-ORTIZ, S. R. et al. The periaqueductal gray as a critical site to mediate reward seeking during predatory hunting. **Behavioural Brain Research**, v. 226, n. 1, p. 32-40, 2012.

MURROUGH, J. W. Ketamine as a novel antidepressant: from synapse to behavior. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 91, n. 2, p. 303-309, 2012.

MYERS, R. D. Injection of Solutions into Cerebral Tissue - Relation between Volume and Diffusion. **Physiology and Behavior**, v. 1, n. 2, p. 171-174, 1966.

NISSEN, H. W. "Freezing" Behavior in Rats. **Science**, v. 103, n. 2662, p. 27-27, 1946.

NISWENDER, C. M.; CONN, P. J. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 50, p. 295-322, 2010.

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

OGAWA, S.; KOW, L. M.; PFAFF, D. W. Effects of lordosis-relevant neuropeptides on midbrain periaqueductal gray neuronal activity in vitro. **Peptides**, v. 13, n. 5, p. 965-975, 1992.

PAGANI, J. H.; ROSEN, J. B. The medial hypothalamic defensive circuit and 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) induced fear: comparison of electrolytic and neurotoxic lesions. **Brain Research**, v. 1286, p. 133-146, 2009.

PANDOSSIO, J. E.; BRANDÃO, M. L. Defensive reactions are counteracted by midazolam and muscimol and elicited by activation of glutamate receptors in the inferior colliculus of rats. **Psychopharmacology**, v. 142, n. 4, p. 360-368, 1999.

PASCHALL, G. Y.; DAVIS, M. Olfactory-mediated fear-potentiated startle. **Behavioral Neuroscience**, v. 116, n. 1, p. 4-12, 2002.

PAVESI, E.; CANTERAS, N. S.; CAROBREZ, A. P. Acquisition of Pavlovian fear conditioning using β -adrenoceptor activation of the dorsal premammillary nucleus as an unconditioned stimulus to mimic live predator-threat exposure. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 5, p. 926-939, 2011.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 6th edition. Amsterdam: Elsevier, 2007. 456p. ISBN 9780123741219.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential Contribution of Amygdala and Hippocampus to Cued and Contextual Fear Conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, n. 2, p. 274-285, 1992.

REDGRAVE, P. et al. The projection from superior colliculus to cuneiform area in the rat. I. Anatomical studies. **Experimental Brain Research**, v. 72, n. 3, p. 611-625, 1988.

REICHLIN, S. et al. Hypothalamic Hormones. **Annual Review of Physiology**, v. 38, n. 1, p. 389-424, 1976.

REIMER, A. E. **Envolvimento de mecanismos GABAérgicos da substância cinzenta periaquedutal dorsal e do colículo inferior no medo condicionado e incondicionado**. 2008. 71p (Tese de Mestrado). Departamento de Psicologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

REIMER, A. E.; DE OLIVEIRA, A. R.; BRANDÃO, M. L. Involvement of GABAergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray and inferior colliculus on unconditioned fear. **Psychology and Neuroscience**, v. 2, n. 1, p. 51-58, 2009.

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, n. 5, p. 545-550, 2008.

REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v. 164, n. 3878, p. 444-445, 1969.

RIEDEL, G. et al. Nucleus accumbens lesions impair context, but not cue, conditioning in rats. **Neuroreport**, v. 8, n. 11, p. 2477-2481, 1997.

RIESS, B. F. A Possible Explanation of "Freezing" Behavior in Rats. **Science**, v. 102, n. 2657, p. 570-572, 1945.

RODRIGUIZ, R. M.; WETSEL, W. C. Assessments of Cognitive Deficits in Mutant Mice. In: LEVIN, E. D. e BUCCAFUSCO, J. J. (Ed.). **Animal Models of Cognitive Impairment**. Boca Raton (FL): CRC Press, 2006. p.223-282. ISBN 0849328349.

ROOZENDAAL, B.; KOOLHAAS, J. M.; BOHUS, B. Differential effect of lesioning of the central amygdala on the bradycardiac and behavioral response of the rat in relation to conditioned social and solitary stress. **Behavioural Brain Research**, v. 41, n. 1, p. 39-48, 1990.

ROSEN, J. B. et al. A Direct Projection From the Central Nucleus of the Amygdala to the Acoustic Startle Pathway: Anterograde and Retrograde Tracing Studies. **Behavioral Neuroscience**, v. 105, n. 6, p. 817-825, 1991.

SANTOS, J. M. et al. Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing behavior and fear-potentiated startle. **European Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 239-246, 2005.

SANTOS, J. M.; MACEDO, C. E.; BRANDÃO, M. L. Gabaergic mechanisms of hypothalamic nuclei in the expression of conditioned fear. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, n. 3, p. 560-568, 2008.

SHI, C.; DAVIS, M. Visual pathways involved in fear conditioning measured with fear-potentiated startle: behavioral and anatomic studies. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 24, p. 9844-9855, 2001.

SILVEIRA, M. C.; GRAEFF, F. G. Defense reaction elicited by microinjection of kainic acid into the medial hypothalamus of the rat: antagonism by a GABAA receptor agonist. **Behavioral and Neural Biology**, v. 57, n. 3, p. 226-232, 1992.

SILVEIRA, M. C. et al. c-fos immunoreactivity in the brain following electrical or chemical stimulation of the medial hypothalamus of freely moving rats. **Brain Research**, v. 674, n. 2, p. 265-274, 1995.

SIMERLY, R. B. Anatomical Substrates of Hypothalamic Integration. In: PAXINOS, G. (Ed.). **The Rat Nervous System** 3rd. CA, USA: Elsevier Academic Press, 2004. p.335-368. ISBN 978-0-12-547638-6.

SUBRAMANIAN, H. H.; BALNAVE, R. J.; HOLSTEGE, G. The midbrain periaqueductal gray control of respiration. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 47, p. 12274-12283, 2008.

SUKIKARA, M. H. et al. A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 9, p. 2583-2589, 2006.

TOLLE, T. R. et al. The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. **Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 12, p. 5009-5028, 1993.

VENTON, B. J. et al. Dynamic amino acid increases in the basolateral amygdala during acquisition and expression of conditioned fear. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 3391-3398, 2006.

VIANNA, D. M.; BRANDÃO, M. L. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 5, p. 557-566, 2003.

VIANNA, D. M. et al. Defensive freezing evoked by electrical stimulation of the periaqueductal gray: comparison between dorsolateral and ventrolateral regions. **Neuroreport**, v. 12, n. 18, p. 4109-4112, 2001a.

VIANNA, D. M. et al. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. **Learning & Memory**, v. 8, n. 3, p. 164-169, 2001b.

WALKER, D. L. et al. Opposing roles of the amygdala and dorsolateral periaqueductal gray in fear-potentiated startle. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 743-753, 1997.

WALKER, D. L.; DAVIS, M. Involvement of the dorsal periaqueductal gray in the loss of fear-potentiated startle accompanying high footshock training. **Behavioral Neuroscience**, v. 111, n. 4, p. 692-702, 1997.

_____. Light-enhanced startle: further pharmacological and behavioral characterization. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 159, n. 3, p. 304-310, 2002a.

_____. The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 3, p. 379-392, 2002b.

WALKER, D. L.; PASCHALL, G. Y.; DAVIS, M. Glutamate receptor antagonist infusions into the basolateral and medial amygdala reveal differential contributions to olfactory vs. context fear conditioning and expression. **Learning & Memory**, v. 12, n. 2, p. 120-129, 2005.

WATKINS, J. C.; JANE, D. E. The glutamate story. **British Journal of Pharmacology**, v. 147 Suppl 1, p. S100-S108, 2006.

YEOMANS, J. S.; FRANKLAND, P. W. The acoustic startle reflex: neurons and connections. **Brain Research Reviews**, v. 21, n. 3, p. 301-314, 1995.

ZHAO, Z. et al. Effects of substance P in the amygdala, ventromedial hypothalamus, and periaqueductal gray on fear-potentiated startle. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 2, p. 331-340, 2009.

ZHAO, Z. W.; DAVIS, M. Fear-potentiated startle in rats is mediated by neurons in the deep layers of the superior colliculus/deep mesencephalic nucleus of the rostral midbrain through the glutamate non-NMDA receptors. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 46, p. 10326-10334, 2004.

ZIMMERMAN, J. M.; MAREN, S. NMDA receptor antagonism in the basolateral but not central amygdala blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 9, p. 1664-1670, 2010.

APÊNDICE

APÊNDICE A. Estudo Suplementar – Avaliação do Paradigma de Medo Condicionado

Dado que a resposta de congelamento foi utilizada como um índice adicional de medo durante o teste do sobressalto potencializado pelo medo, a resposta ao estímulo incondicionado eliciador do sobressalto poderia influenciar a resposta de congelamento condicionado. Além disso, a resposta de sobressalto também pode ser alterada com a apresentação de um estímulo luminoso intenso incondicionado no momento da apresentação do estímulo eliciador da resposta de sobressalto, um fenômeno conhecido por *light-enhanced startle* (WALKER; DAVIS, 2002a). Assim, para excluir qualquer influência do som e da luz como estímulos incondicionados na expressão das respostas de congelamento e sobressalto, respectivamente, grupos adicionais (não condicionado, pseudo-condicionado e condicionado) foram incluídos neste estudo.

Material e métodos

Animais

Foram utilizados 27 ratos *Wistar* machos (*Rattus norvegicus*), com peso entre 270 e 300 g, mantidos sob as mesmas condições descritas para os Experimentos I e II.

Equipamentos

Foram utilizados os equipamentos referentes ao teste de medo condicionado utilizados nos Experimentos I e II.

Procedimento

Sessões de Balanceamento: Foram realizadas duas sessões de balanceamento da mesma forma como nos Experimentos I e II.

Sessão de Condicionamento: No dia seguinte à última sessão de balanceamento, os animais foram divididos em três grupos, os quais foram submetidos a diferentes procedimentos:

- Grupo não condicionado: Os animais foram colocados na caixa A e, após 5 minutos de adaptação, foram submetidos a 10 apresentações de luz, com intervalo entre estímulos variando em 2 min (faixa 1-3 min). Cada tentativa consistiu em 4 segundos de luz e não houve apresentação de choques.
- Grupo pseudo-condicionado: Os animais foram colocados na caixa A e, após 5 minutos de adaptação, foram submetidos a 10 apresentações de luz e 10 apresentações de choques nas patas, sendo que essas apresentações eram randomizadas e não pareadas.
- Grupo condicionado: Da mesma forma que os grupos avaliados nos Experimentos I e II, os animais foram colocados na caixa A e, após 5 minutos de adaptação, foram submetidos a 10 associações de luz e choque nas patas. Cada tentativa consistiu em 4 segundos de luz e o choque foi apresentado no último segundo de cada apresentação do CS. O intervalo entre os pareamentos foi variável em 2 min (faixa de 1–3 min).

Sessão Teste: Realizada de acordo com os procedimentos descritos nos Experimentos I e II. No dia seguinte à sessão de condicionamento, os animais foram avaliados no teste do sobressalto potencializado pelo medo. Cada animal foi 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 consistiram apenas no estímulo sonoro (tentativas só–som) e foram intercaladas aleatoriamente com 30 apresentações de som precedido por luz (tentativas luz–som). Foram avaliadas as respostas de sobressalto e congelamento.

Análise Estatística

Os dados são apresentados como média + EPM, sendo analisados pelo programa computacional SigmaStat 3.11 (Systat, EUA). Para análise dos dados do teste de sobressalto potencializado pelo medo foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas. O fator 1 referiu-se ao *condicionamento* e o fator 2 à *condição* (só-som $\times$ luz-som). No caso de significância estatística, seguiu-se o teste *post-hoc* de *Newman-Keuls*. Para análise do tempo de congelamento condicionado foram utilizadas ANOVAs de uma via para os diferentes treinos. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo.

Resultados

A Tabela 1 exibe os resultados referentes ao teste do sobressalto potencializado pelo medo e a medida de congelamento de animais que foram submetidos aos diferentes tipos de condicionamento (não condicionado, pseudo-condicionado e condicionado). A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo no fator *condição*, $F_{(1,53)} = 22,37$; $p < 0,05$. A mesma análise também revelou efeitos significativos para o fator *condicionamento*, $F_{(2,24)} = 3,38$; $p < 0,05$. Houve interação entre os dois fatores, $F_{(2,53)} = 8,07$; $p < 0,05$. A análise *post-hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou que a luz potencializou a resposta de sobressalto ao som somente no grupo condicionado ($p < 0,05$). A resposta de sobressalto nas tentativas só-som não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$). A resposta de sobressalto nas tentativas luz-som foi maior no grupo condicionado em relação aos outros grupos ($p < 0,05$). Para análise do congelamento, a ANOVA de uma via aplicada aos diferentes condicionamentos revelou diferenças significativas entre os grupos $F_{(2,24)} = 12,06$; $p < 0,05$. A análise *post-hoc* com o teste de *Newman-Keuls* indicou um aumento da resposta de congelamento somente no grupo submetido ao treino com apresentação pareada de CS e US ($p < 0,05$).

Tabela 1. Amplitude da resposta de sobressalto nas tentativas só-som e luz-som e tempo de congelamento de animais submetidos a três protocolos de treino distintos

	Só-Som	Luz-Som	Congelamento (s)
Não condicionado	422,64±58,41	483,31±66,34	33,89±13,93
Pseudo-condicionado	467,68±63,15	535,65±61,27	54,89±16,59
Condicionado	509,56±54,29	864,11±117,59 ^{*#§}	540,00±141,19 ^{*#}

Os resultados são expressos como média ± E.P.M. $n = 10$ para todos os grupos. ^{*} $p < 0,05$, diferente do valor correspondente no grupo não condicionado. [#] $p < 0,05$, diferente do valor correspondente no grupo pseudo-condicionado. [§] $p < 0,05$, diferente da condição só-som.

Discussão

Nossos resultados mostraram que os parâmetros utilizados foram adequados para o estabelecimento de um condicionamento aversivo à luz. A ausência de efeitos do tipo pró-aversivo na resposta de sobressalto nas tentativas luz-som dos animais não condicionados e pseudo-condicionados indica que o incremento na resposta de sobressalto em nossos experimentos é devido aos efeitos aversivos condicionados da luz. Ainda, apesar da resposta de congelamento poder ser eliciada por estímulos incondicionados, esse não foi o caso em nosso estudo, uma vez que um aumento significativo dessa resposta foi observado somente nos animais que receberam apresentação pareada de luz e choques nas patas no dia do treino.

APÊNDICE B. Estudo Suplementar – Efeito dos Agonistas e Antagonistas Glutamatérgicos no AH e PMd no Teste do Campo Aberto (Doses Adicionais)

Em nossos experimentos de medo condicionado a administração de agonistas e antagonistas glutamatérgicos nos núcleos AH e PMd não provocou alterações significativas na resposta de congelamento condicionado ou no sobressalto potencializado pelo medo. Uma possibilidade para estes resultados seria a utilização de doses baixas das drogas, as quais seriam insuficientes para a alteração dos comportamentos examinados. Assim, doses maiores do que as utilizadas em nosso trabalho poderiam evidenciar a participação da neurotransmissão glutamatérgica do MH no medo condicionado. Em contrapartida, trabalhos anteriores indicaram que a estimulação elétrica ou química pode produzir alterações locomotoras e respostas defensivas incondicionadas que poderiam interferir com a expressão das respostas de medo condicionadas (BRANDÃO et al., 1986; MILANI; GRAEFF, 1987; SILVEIRA; GRAEFF, 1992). Para esclarecer tais dúvidas e justificar a escolha das doses das drogas utilizadas, investigamos se a administração de diferentes doses dos agonistas e antagonistas glutamatérgicos no AH e PMd alterariam a atividade motora dos animais no teste do campo aberto.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados 162 ratos *Wistar* machos (*Rattus norvegicus*), com peso entre 270 e 300 g, mantidos sob as mesmas condições descritas para os Experimentos I e II.

Cirurgia

Idem Experimento II.

Drogas

Foram utilizados: 2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenilpirrolidina (ácido caínico, Sigma, EUA), agonista seletivo para receptores AMPA/Cainato (30 e 60 pmol/0,2 µL); 2,3-dioxi-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzeno[f]quinoxalina-sufonamida (NBQX, Sigma, EUA), antagonista de receptores AMPA/Cainato (10 e 20 nmol/0,2 µL); N-metil-D-aspartato (NMDA, Sigma, EUA), agonista específico de receptores NMDA (0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 nmol/0,2 µL) e ácido 2-amino-7-fosfono-heptanóico (AP7, Sigma, EUA), antagonista seletivo para receptores NMDA (4,0 nmol/0,2 µL). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de salina. As doses das drogas foram selecionadas com base em experimentos piloto e em estudos deste e de outros laboratórios (AGUIAR; GUIMARAES, 2009; FENDT, 2000; FERREIRA-NETTO et al., 2005; MOLCHANOV; GUIMARAES, 2002; NOBRE et al., 2004; VIANNA et al., 2001b). Além disso, as doses dos agonistas glutamatérgicos utilizadas neste estudo são bem mais baixas que aquelas utilizadas em estudos com lesão neuroquímica (AVANZI et al., 2003; JARRARD, 1983).

Equipamentos

Foram utilizados os mesmos equipamentos referentes ao teste de atividade motora utilizados nos Experimentos I e II.

Procedimento experimental

Foi utilizado um protocolo similar àquele realizado no teste de atividade motora dos Experimentos I e II. Resumidamente, os animais foram colocados na arena por um período de 10 minutos. Na sequência, receberam a microinjeção da droga no AH ou PMd

e, após 10 minutos de intervalo, foram recolocados na arena, onde permaneceram por 30 minutos. A sessão foi registrada por câmeras de vídeo para posterior análise. A avaliação do teste do campo aberto foi realizada utilizando-se o programa computacional Anymaze (Stoelting Inc., EUA). Neste programa, a análise dos movimentos do animal no teste é realizada a partir da diferença de contraste visual entre o animal e o plano de fundo – no caso, o piso da arena. Com essa análise, foi possível avaliar a distância percorrida (total ou ao longo da sessão), o tempo de imobilidade total e o número de rotações do animal, no sentido horário e anti-horário, a partir do eixo rostrocaudal.

Histologia

Idem Experimentos I e II.

Análise Estatística

Para a avaliação das medidas coletadas pelo programa Anymaze, foram utilizadas ANOVAS de uma via para a distância total percorrida, tempo total de imobilidade e número de rotações. Para análise da distância percorrida ao longo da sessão, foi utilizada a ANOVA de duas vias com medidas repetidas. O fator 1 referiu-se ao *segmento do teste* (0-360 s, 361-720 s, 721-1080 s, 1081-1440 s e 1441-1800 s) e o fator 2 ao *tratamento*. No caso de significância estatística, foi aplicado o teste *post-hoc* de *Newman-Keuls*. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo.

Resultados

Núcleo Anterior do Hipotálamo (AH)

Receptores AMPA/Cainato

A Figura 1 apresenta as médias de atividade no campo aberto avaliadas com auxílio do programa computacional Anymaze. Foram avaliados o tempo total de imobilidade (Figura 1A), o número de rotações (Figura 1B) e a distância total percorrida (Figura 1C), dos animais que receberam microinjeções de salina, NBQX (10 e 20 nmol) e ácido caínico (30 e 60 pmol) no AH. A ANOVA de uma via aplicada aos tratamentos revelou diferenças significativas para imobilidade, $F_{(4,40)} = 5,04$; $p < 0,05$ (Figura 1A), rotações $F_{(4,40)} = 10,73$; $p < 0,05$ (Figura 1B) e distância percorrida, $F_{(4,40)} = 9,93$; $p < 0,05$ (Figura 1C). A análise *post-hoc* com o teste de *Newman-Keuls* indicou maior número de rotações, menor tempo de imobilidade e maior distância percorrida nos animais tratados com NBQX 20 nmol e ácido caínico 60 pmol em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

A Figura 1D apresenta a média da distância percorrida ao longo do teste, dividido em cinco blocos de seis minutos cada. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou diferenças significativas para os fatores *segmento do teste*, $F_{(4,160)} = 79,85$; $p < 0,05$, e *tratamento*, $F_{(4,40)} = 9,93$; $p < 0,05$. Não houve interação entre os fatores, $F_{(16,160)} = 1,11$; $p > 0,05$. A análise *post-hoc* com o teste de *Newman-Keuls* indicou uma distância maior percorrida pelos animais tratados com NBQX 20 pmol e ácido caínico 60 pmol comparados ao grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 1. Receptores AMPA/Cainato do AH e efeitos motores no teste do campo aberto. Avaliação do tempo total de imobilidade (**A**), número de rotações (**B**), distância total percorrida (**C**) e distância percorrida ao longo de cinco blocos (**D**), realizada por ratos que receberam microinjeções intra-AH de salina (SAL), NBQX (NBQX 10 e 20 nmol) ou ácido cáinico (AC 30 e 60 pmol). Média + EPM. * Diferente do grupo salina. n = 9 para todos os grupos.

Receptores NMDA

A Figura 2 apresenta as médias de atividade no campo aberto avaliadas com auxílio do programa computacional Anymaze. Foram avaliados o tempo total de imobilidade (Figura 2A), o número de rotações (Figura 2B) e a distância percorrida (Figura 2C), dos animais que receberam microinjeções de salina, AP7 (4,0 nmol) e NMDA (2,0 nmol) no AH. A ANOVA de uma via aplicada aos tratamentos não revelou diferenças significativas para imobilidade,

$F_{(2,24)} = 0,22$; $p > 0,05$ (Figura 2A), rotações $F_{(2,24)} = 1,15$; $p > 0,05$ (Figura 2B) ou distância percorrida, $F_{(2,24)} = 0,86$; $p > 0,05$ (Figura 2C).

A Figura 2D apresenta a média da distância percorrida ao longo do teste, dividido em cinco blocos de seis minutos cada. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou diferenças significativas para o fator *segmento do teste*, $F_{(4,96)} = 21,03$; $p < 0,05$. Não houve diferença significativa para o fator *tratamento*, $F_{(2,24)} = 0,16$; $p > 0,05$, ou interação entre os fatores $F_{(8,96)} = 1,72$; $p > 0,05$. A análise *post-hoc* com o teste de *Newman-Keuls* indicou diferenças nas distâncias percorridas entre o primeiro segmento de tempo e os demais ($p < 0,05$).

Figura 2. Receptores NMDA do AH e efeitos motores no teste do campo aberto. Avaliação do tempo total de imobilidade (A), número de rotações (B), distância total percorrida (C) e distância percorrida ao longo de cinco blocos (D), realizada por ratos que receberam microinjeções intra-AH de salina (SAL), AP7 (AP7 4,0 nmol) ou NMDA (NMDA 2,0 nmol). $n = 9$ para todos os grupos.

Núcleo Pré-Mamilar do Hipotálamo (PMd)

Receptores AMPA/Cainato

A Figura 3 apresenta as médias de atividade no campo aberto avaliadas com auxílio do programa computacional Anymaze. Foram avaliados o tempo total de imobilidade (Figura 3A), o número de rotações (Figura 3B) e a distância total percorrida (Figura 3C) dos animais

que receberam microinjeções de salina, NBQX (10 e 20 nmol) e ácido caínico (30 e 60 pmol) no PMd. A ANOVA de uma via aplicada aos tratamentos revelou diferenças significativas para imobilidade, $F_{(4,40)} = 4,37$; $p < 0,05$ (Figura 3A), rotações $F_{(4,40)} = 10,02$; $p < 0,05$ (Figura 3B) e distância percorrida, $F_{(4,40)} = 10,60$; $p < 0,05$ (Figura 3C). A análise *pos-hoc* com o teste de *Newman-Keuls* indicou uma maior distância percorrida, número de rotações e menor tempo de imobilidade nos animais tratados com NBQX 20 nmol e ácido caínico 60 pmol em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

A Figura 3D apresenta a média da distância percorrida ao longo do teste, dividido em cinco blocos de seis minutos cada. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou diferenças significativas para os fatores *segmento do teste*, $F_{(4,160)} = 86,81$; $p < 0,05$, e *tratamento*, $F_{(4,40)} = 10,60$; $p < 0,05$. Não houve interação entre os fatores, $F_{(16,160)} = 1,68$; $p > 0,05$. A análise *post-hoc* com o teste de *Newman-Keuls* indicou uma distância maior percorrida pelos animais tratados com NBQX 20 pmol e ácido caínico 60 pmol comparados ao grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 3. Receptores AMPA/Cainato do PMd e efeitos motores no teste do campo aberto. Avaliação do tempo total de imobilidade (**A**), número de rotações (**B**), distância total percorrida (**C**) e distância percorrida ao longo de cinco blocos (**D**), realizada por ratos que receberam microinjeções intra-PMd de salina (SAL), NBQX (NBQX 10 e 20 nmol) ou ácido cáínico (AC 30 e 60 pmol). Média + EPM. * Diferente do grupo salina. n = 9 para todos os grupos.

Receptores NMDA

A Figura 4 apresenta as médias de atividade no campo aberto avaliadas com auxílio do programa computacional Anymaze. Foram avaliados o tempo total de imobilidade (Figura 4A), o número de rotações (Figura 4B) e a distância percorrida (Figura 4C) dos animais que receberam microinjeções de salina, AP7 (4,0 nmol) e NMDA (0,25, 0,5 e 1,0 nmol) no PMd.

A ANOVA de uma via aplicada aos tratamentos revelou diferenças significativas para imobilidade, $F_{(4,40)} = 13,21$; $p < 0,05$ (Figura 4A), rotações $F_{(4,40)} = 8,04$; $p < 0,05$ (Figura 4B) e distância total percorrida, $F_{(4,40)} = 5,05$; $p < 0,05$ (Figura 4C). A análise *post-hoc* com o teste de *Newman-Keuls* indicou uma maior distância percorrida, número de rotações e menor tempo de imobilidade nos animais tratados com NMDA 0,5 e 1,0 nmol ($p < 0,05$).

A Figura 4D apresenta a média da distância percorrida ao longo do teste, dividido em cinco blocos de seis minutos cada. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou diferenças significativas para os fatores *segmento do teste*, $F_{(4,160)} = 58,09$; $p < 0,05$, e *tratamento*, $F_{(4,40)} = 5,05$; $p < 0,05$. Não houve interação entre os fatores, $F_{(16,160)} = 0,92$; $p > 0,05$. A análise *post-hoc* com o teste de *Newman-Keuls* indicou uma distância maior percorrida pelos animais tratados com NMDA 0,5 e 1,0 nmol comparados ao grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 4. Receptores NMDA do PMd e efeitos motores no teste do campo aberto. Avaliação do tempo total de imobilidade (**A**), número de rotações (**B**), distância total percorrida (**C**) e distância percorrida ao longo de cinco blocos (**D**), realizada por ratos que receberam microinjeções intra-PMd de salina (SAL), AP7 (4,0 nmol) ou NMDA (0,25, 0,5 e 1,0 nmol). Média + EPM. * Diferente do grupo salina. n = 9 para todos os grupos.

Discussão

Alterações na atividade motora, causadas pela administração de compostos que alteram a neurotransmissão glutamatérgica no MH já foram descritas na literatura. Silveira e Graeff (1992) observaram que a administração de ácido caínico (60 pmol) no MH de ratos

produz uma ativação comportamental, com aumento da atividade motora. Além disso, a estimulação elétrica dessa estrutura é capaz de induzir aumento da locomoção (LAMMERS et al., 1988b) e respostas como saltos e galope (MILANI; GRAEFF, 1987).

Nossos resultados confirmam que as doses das drogas utilizadas no Experimento II, tanto no AH como no PMd, não são capazes de provocar alterações locomotoras que poderiam interferir com a expressão das respostas condicionadas de medo.

A utilização de doses maiores de ácido caínico (60 pmol – AH e PMd), NBQX (20 nmol – AH e PMd) e NMDA (0,5 e 1,0 nmol – PMd) causaram alterações na atividade motora, evidenciada pelo aumento da distância percorrida, número de rotações e diminuição do tempo de imobilidade.

Os resultados do teste indicam que a administração do antagonista NBQX (20 nmol) no AH e PMd produziu aumento da locomoção da mesma forma que as doses altas dos agonistas ácido caínico e NMDA. Apesar disso, foi verificado que a administração de NBQX em ambas as estruturas avaliadas comprometeu a coordenação motora dos animais, alterando a marcha e provocando quedas. Por outro lado, observou-se que a administração dos agonistas glutamatérgicos produziu somente aumento da locomoção, sem comprometimento motor, e raros saltos. Adicionalmente, verificamos que a administração das doses altas dos agonistas glutamatérgicos nos núcleos do MH (ácido caínico no AH e ácido caínico e NMDA no PMd) produzia um estado de agitação nos animais, manifestado por mordidas nas bordas e tampa da caixa de transporte assim como tentativas de fuga. Tais comportamentos já foram observados em estudo anterior com a administração de bicuculina no MH (MILANI; GRAEFF, 1987).

Uma vez que doses altas das drogas aqui utilizadas causaram alterações locomotoras, fica evidente que o uso das mesmas, no teste de medo condicionado, ficaria inviável. Esses resultados reforçam os resultados observados no Experimento II, indicando que a neurotransmissão glutamatérgica parece não tomar parte da mediação das respostas de medo

condicionado à luz. Além disso, por mais que administração de doses maiores do agonista AP7 no MH pudesse alterar as respostas defensivas avaliadas neste estudo, esse parece não ser o caso, uma vez que o tratamento com doses semelhantes às utilizadas no Experimento II é capaz de alterar a expressão de respostas defensivas em outros testes comportamentais (AGUIAR; GUIMARAES, 2011; JARDIM et al., 2005).

Assim, podemos reafirmar que alterações motoras não prejudicaram o desempenho dos animais nos testes de medo condicionado no Experimento II, e que ficaria inviável a utilização de doses maiores, uma vez que o aumento da atividade motora dos animais poderia comprometer as respostas a estímulos condicionados.

Referências

AGUIAR, D. C.; GUIMARAES, F. S. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 11, p. 2418-2429, 2009.

_____. Blockade of NMDA or NO in the dorsal preammylary nucleus attenuates defensive behaviors. **Physiology and Behavior**, v. 103, n. 3-4, p. 279-283, 2011.

AVANZI, V. et al. 5-HT mechanisms of median raphe nucleus in the conditioned freezing caused by light/foot-shock association. **Physiology and Behavior**, v. 78, n. 3, p. 471-477, 2003.

BRANDÃO, M. L. et al. Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 3, p. 497-501, 1986.

FENDT, M. Expression and conditioned inhibition of fear-potentiated startle after stimulation and blockade of AMPA/Kainate and GABA(A) receptors in the dorsal periaqueductal gray. **Brain Research**, v. 880, n. 1-2, p. 1-10, 2000.

FERREIRA-NETTO, C.; BORELLI, K. G.; BRANDÃO, M. L. Neural segregation of Fos-protein distribution in the brain following freezing and escape behaviors induced by injections of either glutamate or NMDA into the dorsal periaqueductal gray of rats. **Brain Research**, v. 1031, n. 2, p. 151-163, 2005.

JARDIM, M. C. et al. Role of glutamate ionotropic and benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus on anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 82, n. 1, p. 182-189, 2005.

JARRARD, L. E. Selective hippocampal lesions and behavior: effects of kainic acid lesions on performance of place and cue tasks. **Behavioral Neuroscience**, v. 97, n. 6, p. 873-889, 1983.

LAMMERS, J. H. et al. Hypothalamic substrates for brain stimulation-induced patterns of locomotion and escape jumps in the rat. **Brain Res**, v. 449, n. 1-2, p. 294-310, 1988b.

MILANI, H.; GRAEFF, F. G. GABA-benzodiazepine modulation of aversion in the medial hypothalamus of the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 28, n. 1, p. 21-27, 1987.

MOLCHANOV, M. L.; GUIMARAES, F. S. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**, v. 160, n. 1, p. 30-38, 2002.

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

SILVEIRA, M. C.; GRAEFF, F. G. Defense reaction elicited by microinjection of kainic acid into the medial hypothalamus of the rat: antagonism by a GABAA receptor agonist. **Behavioral and Neural Biology**, v. 57, n. 3, p. 226-232, 1992.

VIANNA, D. M. et al. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. **Learning & Memory**, v. 8, n. 3, p. 164-169, 2001b.

APÊNDICE C.**Artigo:**

Glutamatergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray matter modulate the expression of conditioned freezing and fear-potentiated startle.

Reimer AE, de Oliveira AR, Brandão ML.

Neuroscience. 2012 Volume 219, 6 September 2012, Pages 72–81

GLUTAMATERGIC MECHANISMS OF THE DORSAL PERIAQUEDUCTAL GRAY MATTER MODULATE THE EXPRESSION OF CONDITIONED FREEZING AND FEAR-POTENTIATED STARTLE

A. E. REIMER,* A. R. DE OLIVEIRA AND M. L. BRANDÃO

Laboratório de Psicobiologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Instituto de Neurociências e Comportamento, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Abstract—It is well known that excitatory amino acids induce unconditioned fear responses when locally injected into the dorsal periaqueductal gray matter (dPAG). However, there are only few studies about the involvement of excitatory amino acids mediation in dPAG in the expression of conditioned fear. The present series of experiments evaluates the participation of AMPA/Kainate and NMDA glutamatergic receptors of dPAG in the expression of conditioned fear, assessed by the fear-potentiated startle (FPS) and conditioned freezing responses. Wistar rats were subjected to fear conditioning to light. Twenty-four hours later, they received intra-dPAG injections of kainic acid or NMDA (AMPA/Kainate and NMDA agonists) and 1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide disodium salt hydrate (NBQX) or D(–)-2-Amino-7-phosphonoheptanoic acid (AP7) (AMPA/Kainate and NMDA antagonists) and were submitted to the FPS test. Conditioned freezing response was simultaneously measured. Effects of drug treatment on motor activity were evaluated in the open-field test. Intra-dPAG injections of glutamatergic agonists enhanced conditioned freezing and promoted pro-aversive effects in the FPS. Lower doses of the agonists had no effect or enhanced FPS whereas higher doses disrupted FPS, indicating a non-monotonic relationship between fear and FPS. The antagonist NBQX had no significant effects while AP7 decreased conditioned freezing but did not affect FPS. Both antagonists reduced the effects of the agonists. The obtained results cannot be attributed to motor deficits. The results suggest an important role of the AMPA/Kainate and NMDA mechanisms of the dPAG in the expression of conditioned freezing and FPS. © 2012 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: fear conditioning, dorsal periaqueductal gray matter, AMPA/Kainate receptor, NMDA receptor, fear-potentiated startle, conditioned freezing.

INTRODUCTION

It is well established that the midbrain periaqueductal gray matter (PAG) is a key structure coordinating behavioral and physiological patterns of defensive reactions that are critical for survival (Depaulis and Bandler, 1991; Behbehani, 1995; Bandler and Keay, 1996; Vianna and Brandão, 2003). Electrical stimulation of PAG in neurosurgical patients produces neurovegetative changes and feelings of fear, terror and impending death (Nashold et al., 1969). In laboratory animals, gradual increases in the electrical stimulation of the dorsal part of PAG (dPAG) induces arousal, freezing and escape behavior, together with changes in autonomic responses, comparable to those observed in situations such as the confrontation of a prey with predators (Spiegel et al., 1954; Brandão et al., 1982; Canteras and Goto, 1999; Martínez et al., 2006; Reimer et al., 2009). This defensive repertoire induced by electrical stimulation of dPAG can also be mimicked by pharmacological manipulation of this structure. For example, previous studies from this and other laboratories showed that microinjections of excitatory amino acids (EAA) into the dPAG produce freezing and behavioral activation (Bandler and Carrive, 1988; Ferreira-Netto et al., 2005).

Glutamate seems to play an important role in the pathogenesis of anxiety (Bergink et al., 2004). Riluzole, a glutamate-release inhibitor, has been found to decrease anxiety symptoms in patients with generalized anxiety disorder (Mathew et al., 2005). Former studies confirmed that all types of glutamatergic receptors are present in the dPAG (Albin et al., 1990; Tölle et al., 1993). Glutamatergic receptors can be classified into metabotropic and ionotropic ones. The latter can be divided into AMPA/Kainate and NMDA, according to their sensitivities to the agonists (Monaghan et al., 1989). EAA mechanisms acting through these distinct receptors could be related to different behavioral responses. Indeed, some evidences suggest that activation of AMPA/Kainate receptors would mediate freezing response while NMDA would be responsible for escape behavior in rats (Pandossio and Brandão, 1999; Ferreira-Netto et al., 2005).

While the involvement of EAA mechanisms of dPAG in defensive behavior is mainly supported by numerous evidence obtained by studies on unconditioned fear

*Corresponding author. Address: Laboratório de Psicobiologia – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP 14090-901, Brazil. Tel: +55-16-3602-3838; fax: +55-16-3602-4830.

E-mail address: aereimer@usp.br (A. E. Reimer).

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; AP7, D(–)-2-Amino-7-phosphonoheptanoic acid; CS, conditioned stimulus; dPAG, dorsal periaqueductal gray matter; EAA, excitatory amino acids; FPS, fear-potentiated startle; KA, kainic acid; NBQX, 1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide disodium salt hydrate; PAG, periaqueductal gray matter; US, unconditioned stimulus.

responses, as predator–prey exposures or dPAG electrical or chemical stimulation (Brandão et al., 1982; Graeff et al., 1986; Dielenberg et al., 2001; Canteras, 2003; Ferreira-Netto et al., 2005), less is known regarding their involvement in conditioned fear responses. Therefore, the understanding of how the dPAG is called into action in conditioned fear would be of relevance to our better knowledge of the neurobiology of fear and anxiety. So, the present series of experiments evaluates the participation of AMPA/Kainate and NMDA glutamatergic receptors of dPAG in the expression of conditioned fear.

One of the most used techniques to measure conditioned fear is the fear-potentiated startle (FPS). In FPS, the acoustic startle response, a simple defense reaction which is elicited by sudden, intense acoustic stimuli, is increased in the presence of a stimulus that has been previously paired with shocks (Davis et al., 1993; Koch, 1999; Reimer et al., 2008; de Oliveira et al., 2011). Although some studies have already proposed a role for the PAG in the expression and modulation of the FPS, the results are to some extent contradictory. For example, lesions of PAG or intra-PAG microinjections of GABA-A agonists, can decrease FPS or have no effects (Fendt et al., 1996; Walker et al., 1997; Walker and Davis, 1997; Fendt, 2000; Reimer et al., 2008). On the other hand, it has been shown that electrical stimulation of the PAG or intra-PAG injections of GABA-A antagonists can enhance, decrease or leave FPS unchanged (Borowski and Kokkinidis, 1996; Fendt, 1998, 2000). Moreover, some works have demonstrated that it is possible to decrease the FPS by administering kainic acid (KA) intra-PAG prior to the testing (Walker et al., 1997; Walker and Davis, 1997; Fendt, 2000).

The aforementioned data indicate that more studies are necessary to clarify the involvement of dPAG in the FPS. Indeed, these apparently contradictory effects could be due to the fact that moderate fear levels produce maximal startle responses, whereas higher fear intensity can decrease the FPS magnitude (Davis and Astrachan, 1978; Walker and Davis, 1997; Santos et al., 2005). Because of these effects, some additional measures, as the evaluation of the conditioned freezing, which is an important response to cues associated with footshock (Leaton and Cranney, 1990; Fendt and Fanselow, 1999), could ensure the actual fear state measured on FPS test. So, in the present study we used both the FPS and the conditioned freezing responses to assess the participation of AMPA/Kainate and NMDA glutamatergic receptors of dPAG in the expression of conditioned fear.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Two-hundred and thirty-seven naive male Wistar rats from the animal facility of the University of São Paulo, *Campus* of Ribeirão Preto, were used. The animals, weighing 270–300 g at the beginning of the experiments, were housed in groups of four in plastic boxes (33 × 17 × 40 cm). The rats were maintained under a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) with room temperature at $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Food and water were available *ad libitum*. The experiments were carried out during the light phase of the

cycle. All the procedures were approved by the Committee for Animal Care and Use of University of São Paulo at Ribeirão Preto (No. 11.1.308.53.9) which is based on the United States National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Surgery

A detailed description of surgical procedure has been provided previously (Reimer et al., 2008, 2009). Briefly, animals were anesthetized with ketamine/xylazine (100/7.5 mg/kg, intraperitoneal; Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brazil) and fixed in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). The upper incisor bar was set at 3.0 mm below the interaural line, such that the skull was horizontal between *bregma* and *lambda*. Unilateral dPAG cannulation for drug injection was performed in the left hemisphere. In previous studies, we showed that unilateral microinjection into the dPAG is sufficient in changing defensive behavior (Reimer et al., 2008, 2009). Taking *lambda* as the reference point, the coordinates used were (Paxinos and Watson, 2007): anterior/posterior, +0.1 mm; medial/lateral, +1.9 mm; dorsal/ventral, −4.3 mm, angled medially 16° . At the end of surgery, animals received an injection of a polyvalent veterinary antibiotic (Pentabiotico, 0.2 ml, intramuscular; Fort Dodge, Campinas, SP, Brazil) and an injection of the anti-inflammatory and analgesic flunixin meglumine (Banamine, 2.5 mg/kg, subcutaneous; Schering-Plough, Cotia, SP, Brazil). Afterward, the rats were allowed 5 days to recover from the surgical procedure. The experimental design used in this study is described below and presented schematically in Fig. 1.

Fear-potentiated startle and conditioned freezing

Matching. To record the amplitude of the acoustic startle response, two separated stabilimeter devices were used simultaneously. The rats were placed into a wired-grid cage (16.5 × 7.5 × 7.5 cm) suspended within a PVC frame, which was firmly fixed to a response platform by four thumb screws. The floor of the cage consisted of six 3.2 mm diameter stainless steel bars spaced 1.0 cm apart. Each cage and platform was located independently inside ventilated sound-attenuating plywood-chambers (64 × 60 × 40 cm). The startle reaction of the rats generated a pressure on the response platform and analog signals were amplified, digitized and analyzed by a software (Startle Reflex, version 4.10; Med Associates, St. Albans, VT, USA) provided by the manufacturer of the equipment. 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 testing cage delivered both the startle stimulus (100 dB; 50 ms burst of white noise) and continuous background noise (55 dB). The startle reaction was recorded within a time window of 100 ms after the onset of the startle stimulus. Calibration procedures were conducted before the experiments to ensure statistically comparable startle magnitudes across the response platforms. A red light bulb (6 W) located inside the isolation chamber provided illumination for the camera. For the first 2 days, the animals were placed in the testing cage for 5 min of habituation period and afterward received a total of 30 startle stimuli with an interstimulus interval of 30 s. Each matching session was 20 min in duration, including habituation period. Matching sessions are intended to familiarize the animals with the test cage and decrease possible variations in the startle response. Animals were assigned to the different drug and control groups in a way that each group had similar average startle amplitude based on the last matching day.

Fig. 1. Experimental design. Timeline of the procedures for testing the involvement of glutamatergic receptors of dPAG in the expression of conditioned fear. Experimental scheme for fear-potentiated startle test and conditioned freezing (a) and evaluation of potential motor deficits caused by drugs administration (b). dPAG: dorsal periaqueductal gray matter.

Training. During the training a light, the conditioned stimulus (CS), was paired with footshock, an aversive unconditioned stimulus (US). Animals were conditioned to light-CS in a cage (20 × 20 × 25 cm) with side and back walls being 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 1.0 cm apart. The training cage was located within a ventilated and sound-attenuated chamber (45 × 45 × 45 cm) and was different from the testing cage to avoid conditioning to the context. After recovery from surgery, animals were placed in the training cage, and each rat received 10 CS–US pairings after a habituation-phase of 5 min using a 4 s, 6 W 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, Porto Alegre, RS, Brazil). The CS was a white light presented through a bulb (6 W, 127 V) located in the ceiling of the chamber. Stimulus presentation was controlled by a microprocessor and an input/output board (Insight Equipment, Ribeirão Preto, SP, Brazil). The inter-trial interval ranged randomly between 60 and 180 s. The duration of each training session was about 25 min, including habituation time. To attest the efficacy of conditioning on the expression of FPS and conditioned freezing response, two additional groups of animals were used. These rats received 10 presentations of light but no footshocks (unconditioned group) or 10 unpaired presentations of light and footshocks (pseudo-conditioned group) on the training day.

Testing. Test sessions were conducted without footshock presentation in the same cages used for matching. Twenty-four hours after training, rats received drug injection and after 10 min were placed into the startle testing cages. Animals that were treated with the antagonist plus the agonist had a 10-min interval between drugs administration. After 5 min of habituation, animals received 60 startle stimuli (noise bursts) with a 30 s inter-stimulus interval. Half of the startle stimuli were presented in the absence of the CS (i.e., noise-alone trials) to provide a baseline, and the other half were presented in the presence of the CS (i.e., light-noise trials). In the light-noise trials, the startle stimulus was presented in the last second of a 4 s presentation of light, similar to the training sessions. The noise-alone and light-noise trials were interspersed randomly. The duration of the test session, including habituation time, was 37 min. The behaviors of the animals were recorded by a video camera (Everfocus, Duarte, CA, USA) positioned behind the observation chambers, allowing for the discrimination of all behaviors, with the signal relayed to a monitor in another room via a closed circuit. Startle response

amplitudes collected from this experiment were stored on the hard disk of the computer, and transferred to Excel tables (Microsoft, Redmond, WA, USA) for the offline analysis. An additional measure used to assess conditioned fear was the time rats spent freezing during the testing session. Freezing was operationally defined as the total absence of movement of the body and vibrissa, except the ones required for respiration, for at least 6 s. Freezing behavior was monitored during the testing and it was subsequently scored from videotapes by a person who was blind with regard to the experimental condition of each animal. The results are presented as total time rats spent freezing during the test session.

Motor behavior

A different set of animals was used to assess effect of drug treatments on motor activity with 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 in 12 sections. The arena was located in a room with controlled and indirect illumination of 30 lux on the floor of the open-field. The number of crossings (number of floor sections traversed) and rearings (standing with the forelegs raised in the middle of the arena or against the walls) were examined in 1 min bins over the course of the session. The rats' behavior was recorded by a video camera positioned above 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.

Drugs

Drugs used were: 2-Carboxy-3-carboxymethyl-4-isopropenylpyrrolidine (KA; 7.5, 30 and 60 pmol); 1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide disodium salt hydrate (NBQX; 20 nmol); (R)-2-(Methylamino)succinic acid (NMDA; 0.5, 1.0 and 2.0 nmol); D(-)-2-Amino-7-phosphonoheptanoic acid (AP7; 2.0 nmol). All drugs were purchased from Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA) and were dissolved in physiological saline (0.9%) shortly before use. Physiological saline also served as vehicle control. All drugs were administered at a constant volume of 0.2 µl/site. Rats always received an injection 10 min before test sessions. In rats that received two drugs sequentially, antagonists were injected before their respective agonists, with a 10 min interval between injections. Drug doses were selected in order to not evoke overt defensive behavior, based on pilot experiments and

previous studies from this and other laboratories (Fendt, 2000; Moreira et al., 2004; Ferreira-Netto et al., 2005). Furthermore, the doses of the glutamatergic agonists used herein are below the range used in lesion studies (Jarrard, 1983; Avanzi et al., 2003).

Microinjection procedure

The injection needle was a thin dental needle (0.3 mm, o.d.) connected to a 10- μ L syringe (Hamilton Company, Reno, NV, USA) by means of a polyethylene tube (PE-10; Becton–Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). The injection needle was introduced into the guide-cannula until its lower end reached 1 mm below it. The solutions were injected into dPAG in a volume of 0.2 μ L during 1 min with the support of an infusion pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). The displacement of an air bubble inside the polyethylene was used to monitor the microinjection. The needle was held in place for an additional 1 min to maximize diffusion away from the tip of the needle. As noted earlier in previous studies, the radius of diffusion of a 0.5 μ L volume is about 1.0 mm (Myers, 1966). In the present work we used a 0.2 μ L drug volume, so drug diffusion is supposed to be restricted to the target structure.

Histology

At the end of the experiments, the rats were given a lethal dose of urethane (3 g/kg; Sigma–Aldrich) and 0.2 μ L of Evans Blue (2%) was microinjected into the dPAG in order to mark the position of the microinjection sites. Afterward, rats were perfused intracardially with 0.9% saline and 4% paraformaldehyde solutions. The brains were removed from the skulls, kept in paraformaldehyde solution for 2 h, and cryoprotected in 30% sucrose until they sank. Coronal 60 μ m slices were cut, mounted on gelatin-coated slides, and stained with Cresyl Violet (5%) to localize injection sites according to the atlas of Paxinos and Watson (2007).

Statistical analysis

The data are reported as mean + S.E.M. Two-way repeated-measures analyses of variance (ANOVAs) were used to analyze mean startle response, with treatments (drugs and its respective

control) as between-subjects factor and trial-type (noise-alone and light-noise) as within-subjects factor. One-way ANOVAs were conducted on the time of freezing and open-field data. Significant comparisons were followed by Newman–Keuls *post hoc* test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Microinjection sites

The injection sites of all animals used in this study were located inside the dPAG, mostly in the dorsolateral portion of the dPAG. A photomicrograph of a representative injection site and the histological localization of the injection sites in the dPAG, depicted on diagrams of the Paxinos and Watson atlas (2007), are shown in Fig. 2.

Fear-potentiated startle and conditioned freezing

AMPA/Kainate. Fig. 3 illustrates the effects of injections of saline, KA or NBQX into the dPAG, 10 min before the testing session, on FPS and conditioned freezing.

Fig. 3a shows the mean startle amplitude of rats that received intra-dPAG injections of saline or KA (7.5, 30 or 60 pmol/0.2 μ L). Two-way repeated-measures ANOVA revealed significant effects of treatment ($F_{3,44} = 2.85$; $p < 0.05$) and trial-type ($F_{1,95} = 49.37$; $p < 0.05$) and a significant treatment $\times$ trial-type interaction ($F_{3,95} = 6.49$; $p < 0.05$). *Post hoc* comparisons with Newman–Keuls test revealed that the light-CS enhanced the startle response to noise in rats that received saline and KA 7.5 pmol/0.2 μ L (KA 7.5; $p < 0.05$) but not in those animals treated with KA 30 and 60 pmol/0.2 μ L (KA 30 and KA 60; $p > 0.05$). The startle reflex to noise alone was not statistically different among groups ($p > 0.05$). The startle reflex to light-noise was attenuated by KA 60 compared with control ($p < 0.05$). Fig. 3b shows the mean freezing response of the same rats. One-way ANOVA showed significant

Fig. 2. Target sites for drug injections into the dPAG. Photomicrograph that shows representative injection site into the dorsal periaqueductal gray (a) and outline of injection sites on coronal sections from the Paxinos and Watson atlas (2007) (b). The number of points in the figure is less than the total number of rats used because several points overlap. dPAG = dorsal periaqueductal gray matter; SC = superior colliculus; Pn = pontine nuclei. Scale bar = 0.5 mm.

Fig. 3. AMPA/Kainate receptors in the dorsal periaqueductal gray (dPAG) and conditioned fear. Mean startle amplitude (a) and duration of freezing response (b) shown by rats that received intra-dPAG injections of saline (SAL; 0.9% NaCl) or kainic acid (KA 7.5, 30 or 60 pmol/0.2 μ l). Mean startle amplitude (c) and time of freezing response (d) shown by rats that received intra-dPAG injections of saline, NBQX (20 nmol/0.2 μ l) or NBQX + KA (NBQX 20 nmol and KA 60 pmol). Results are expressed as mean + S.E.M. [#] $p < 0.05$, different from noise-alone condition. ^{*} $p < 0.05$, different from saline group in the same condition. $n = 13$ for SAL, KA 60, NBQX 20 and NBQX 20 + KA 60; $n = 12$ for KA 7.5; $n = 10$ for KA 30.

effects of treatments on the freezing response ($F_{3,44} = 5.46$; $p < 0.05$). *Post hoc* comparisons with Newman–Keuls test revealed that KA 60 enhanced freezing response compared to control ($p < 0.05$).

Fig. 3c shows the mean startle amplitude of rats that received intra-dPAG injections of saline, NBQX (20 nmol/0.2 μ l) or NBQX plus KA (60 pmol/0.2 μ l). Two-way repeated-measures ANOVA revealed a significant effect of trial-type ($F_{1,77} = 69.36$; $p < 0.05$), but no treatment effects ($F_{2,36} = 0.19$; $p > 0.05$) or treatment $\times$ trial-type significant interaction ($F_{2,77} = 0.18$; $p > 0.05$). *Post hoc* comparisons with Newman–Keuls test revealed that the light-CS enhanced the startle response to noise in all groups ($p < 0.05$). Fig. 3d shows the mean freezing response of the same rats. One-way ANOVA showed no significant effects of treatments on the freezing response ($F_{2,36} = 2.64$; $p > 0.05$).

NMDA. Fig. 4 illustrates the effects of injections of saline, NMDA or AP7 into the dPAG, 10 min before the testing session, on FPS and conditioned freezing.

Fig. 4a shows the mean startle amplitude of rats that received intra-dPAG injections of saline or NMDA (0.5, 1.0 or 2.0 nmol/0.2 μ l). Two-way repeated-measures ANOVA revealed significant effects of treatment ($F_{3,43} = 5.10$; $p < 0.05$) and trial-type ($F_{1,93} = 80.76$; $p < 0.05$) and a significant treatment $\times$ trial-type interaction ($F_{3,93} = 8.56$; $p < 0.05$). *Post hoc* comparisons with Newman–Keuls test revealed that the light-CS enhanced the startle response to noise in rats that received saline and NMDA 0.5 and 1.0 nmol/0.2 μ l (NMDA 0.5 and NMDA 1.0; $p < 0.05$) but

not in those animals treated with NMDA 2.0 nmol/0.2 μ l (NMDA 2.0; $p > 0.05$). The startle reflex to noise alone was not statistically different among groups ($p > 0.05$). The startle reflex to light-noise was enhanced by NMDA 1.0 and attenuated by NMDA 2.0 compared with controls ($p < 0.05$). Fig. 4b shows the mean freezing response of the same rats. One-way ANOVA showed significant effects of treatments on the freezing response ($F_{3,43} = 7.41$; $p < 0.05$). *Post hoc* comparisons with Newman–Keuls test revealed that NMDA 2.0 enhanced freezing response compared to control ($p < 0.05$).

Fig. 4c shows the mean startle amplitude of rats that received intra-dPAG injections of saline, AP7 (2.0 nmol/0.2 μ l) or AP7 plus NMDA (1.0 or 2.0 nmol/0.2 μ l). Two-way repeated-measures ANOVA revealed a significant effect of trial-type ($F_{1,101} = 85.98$; $p < 0.05$), but no treatment effects ($F_{3,47} = 0.88$; $p > 0.05$) or treatment $\times$ trial-type significant interaction ($F_{3,101} = 0.51$; $p > 0.05$). *Post hoc* comparisons with Newman–Keuls test revealed that the light-CS enhanced the startle response to noise in all groups ($p < 0.05$). Fig. 4d shows the mean freezing response of the same rats. One-way ANOVA showed significant effects of treatments on the freezing response ($F_{3,47} = 6.65$; $p < 0.05$). *Post hoc* comparisons with Newman–Keuls test revealed that AP7 decreased freezing response compared to control ($p < 0.05$).

Motor behavior

We also evaluate whether glutamatergic agonists and antagonists affected motor activity of rats in the open-field

Fig. 4. NMDA receptors in the dorsal periaqueductal gray (dPAG) and conditioned fear. Mean startle amplitude (a) and duration of freezing response (b) shown by rats that received intra-dPAG injections of saline (SAL; 0.9% NaCl) or NMDA (0.5, 1.0 or 2.0 nmol/0.2 μ l). Mean startle amplitude (c) and time of freezing response (d) shown by rats that received intra-dPAG injections of saline, AP7 (2.0 nmol/0.2 μ l) or AP7 + NMDA (AP7 2.0 nmol and NMDA 1.0 or 2.0 nmol). Results are expressed as mean + S.E.M. # p < 0.05, different from noise-alone condition. * p < 0.05, different from saline group in the same condition. n = 13 for SAL, NMDA 1.0, NMDA 2.0, AP7 2.0 and AP7 2.0 + NMDA 1.0; n = 8 for NMDA 0.5; n = 12 AP7 2.0 + NMDA 2.0.

test. In this test we divided the animals in those treated with KA/NBQX or NMDA/AP7 (Fig. 5), in the same way we did with FPS test.

AMPA/Kainate. Fig. 5a, b shows the effects of injections of saline, KA (60 pmol) or NBQX (20 nmol) into the dPAG on motor performance in the open-field test.

One-way ANOVA did not reveal any significant effects of treatments on crossings ($F_{2,21} = 1.04$, $p > 0.05$; Fig. 5a) or rearings ($F_{2,21} = 2.93$, $p > 0.05$; Fig. 5b).

NMDA. Fig. 5c, d shows the effects of injections of saline, NMDA (2.0 nmol) or AP7 (2.0 nmol) into the dPAG on motor performance in the open-field test. One-way

Fig. 5. Glutamatergic receptors in the dorsal periaqueductal gray (dPAG) and motor effects in the open-field test. Number of crossings (a) and rearings (b) shown by rats that received intra-dPAG injections of saline (SAL; 0.9% NaCl), NBQX (20 nmol/0.2 μ l) or kainic acid (KA 60 pmol/0.2 μ l). Number of crossings (c) and rearings (d) shown by rats that received intra-dPAG injections of saline, AP7 (2.0 nmol/0.2 μ l) or NMDA (2.0 nmol/0.2 μ l). Results are expressed as mean + S.E.M. n = 8 for all groups.

Table 1. Startle amplitude in noise alone and light-noise conditions and time of freezing of animals submitted to three different training protocols results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. $n = 10$ for all groups

	Noise alone	Light-noise	Freezing (s)
Unconditioned	422.64 $\pm$ 58.41	483.31 $\pm$ 66.34	33.89 $\pm$ 13.93
Pseudo-conditioned	467.68 $\pm$ 63.15	535.65 $\pm$ 61.27	54.89 $\pm$ 16.59
Conditioned	509.56 $\pm$ 54.29	864.11 $\pm$ 117.59 ^{*,#,\$}	540.00 $\pm$ 141.19 ^{*,#}

* $p < 0.05$, different from the corresponding values in the unconditioned group.

$p < 0.05$, different from the corresponding values in the pseudo-conditioned group.

\$ $p < 0.05$, different from noise alone condition.

ANOVA did not reveal any significant effects of treatments on crossings ($F_{2,21} = 0.18$, $p > 0.05$; Fig. 5c) or rearings ($F_{2,21} = 0.54$, $p > 0.05$; Fig. 5d).

Analysis of conditioning paradigm

Given that freezing behavior was used as an additional index of fear during the FPS paradigm, the unconditioned response to noise could be a confound factor in the analysis of the conditioned freezing. For this reason, and to exclude any influence of the light as an US on the startle response, additional control groups (unconditioned, pseudo-conditioned and conditioned) were included in this study. Two-way repeated-measures ANOVA revealed significant effects of trial-type ($F_{1,53} = 22.37$; $p < 0.05$), conditioning ($F_{2,24} = 3.38$; $p < 0.05$) and a significant conditioning $\times$ trial-type interaction ($F_{2,53} = 8.07$; $p < 0.05$). *Post hoc* comparisons with Newman–Keuls test revealed that the light enhanced the startle response to noise only in rats that received paired presentations of light and footshocks during the training session (conditioned group; $p < 0.05$), but not in those animals that did not receive footshocks (unconditioned group) or in those that received unpaired light and footshocks presentations (pseudo-conditioned group) ($p > 0.05$). The startle reflex to noise alone was not statistically different among groups ($p > 0.05$). The startle reflex to light-noise was enhanced in the conditioned group compared with both other groups ($p < 0.05$) (Table 1). One-way ANOVA showed significant effects of conditioning on the freezing response ($F_{2,24} = 12.06$; $p < 0.05$). *Post hoc* comparisons with Newman–Keuls test revealed that conditioned group presented enhanced freezing response compared to unconditioned and pseudo-conditioned groups ($p < 0.05$) (Table 1).

DISCUSSION

It has been highly documented that structures of the mid-brain tectum, such as PAG, inferior colliculus and superior colliculus, participate of the generation of unconditioned fear responses (Brandão et al., 1982, 2005; Depaulis and Bandler, 1991; Reimer et al., 2009). On the other hand, the involvement of these structures in conditioned fear is less understood. Because of this, some attention has been given to this topic, due to its importance for the comprehension of the neurobiology of fear and anxiety. Recent studies have reported the participation of dPAG on fear conditioning, for example, administration of the GABA-A agonist muscimol or benzodiazepines into

the dPAG reduced the expression of conditioned fear responses (Castilho et al., 2002; Reimer et al., 2008). In the present study we observed that changes in glutamatergic mediation in the dPAG also caused significant effects in the expression of conditioned fear.

Local injections of KA into dPAG dose-dependently reduced the potentiation of the startle response. Similar effects were observed in previous studies (Walker et al., 1997; Walker and Davis, 1997; Fendt, 2000). Also, confirming previous studies, the administration of the AMPA/Kainate antagonist NBQX produced no effects on FPS (Zhao and Davis, 2004; Zhao et al., 2009). In our study, the conjoint administration of NBQX and KA inhibited the effects of this agonist, confirming the selective involvement of AMPA/Kainate receptors for this action. The administration of NMDA into dPAG produced non-monotonic effects in the startle potentiation: the lower dose did not cause any effect; an intermediate dose enhanced the startle response while the higher dose reduced the startle potentiation. The administration of the NMDA antagonist AP7 did not produce any effect in FPS, but inhibited the respective agonist effects, indicating a selective action of NMDA. The failure to influence FPS with injections of the antagonists of AMPA/Kainate and NMDA receptors into the dPAG suggest that they do not mediate this response. However, a role of the EAA mechanisms in the mediation of this response cannot be discarded because the activation of glutamatergic receptors in dPAG with AMPA/Kainate and NMDA agonists produced significant effects on the FPS. A plausible interpretation for these findings is the existence of a potential redundancy between the glutamatergic and other neurotransmitter systems in dPAG regulating the FPS. This scenario is based on previous studies demonstrating that FPS is also modulated by neurokinin (Zhao et al., 2009) and GABAergic (Reimer et al., 2008) mediated mechanisms in dPAG. Thus, the EAA mechanisms of dPAG could influence, but could not be required for, the expression of FPS.

In our experiments we also observed that manipulating the dPAG glutamatergic neurotransmission alters the expression of conditioned freezing behavior. Lower doses of the AMPA/Kainate and NMDA agonists did not change, but higher doses increased this response. These results indicate that fear is present, even enhanced, and that the effects of the glutamatergic agonists on FPS would reflect the switch to different behavioral strategies associated with high fear levels that not include the potentiation of the startle response. The pro-aversive effects of KA and NMDA were prevented by pretreatment with NBQX and AP7, respectively. In fact, administration of NMDA

antagonist AP7 decreased the conditioned freezing response. This result reflects an anti-aversive effect also found in a different study in which intra-dPAG AP7 decreased inhibitory avoidance behavior in the T-maze, a behavioral response also related with anxiety (Bertoglio and Zangrossi, 2006). On the other hand, AMPA/Kainate antagonist NBQX caused no effects on freezing behavior. Although we have not observed any significant effect with NBQX at the dose used here, another study showed that a higher dose (100 nmol) of this antagonist increased FPS (Fendt, 2000). In our hands, in a pilot experiment 50 nmol of NBQX caused motor deficits that precluded the conditioned fear analysis.

In our study, we used drug doses that did not produce overt defensive reactions *per se*. It was important for the present study because activation of the dPAG with glutamatergic agonists can produce freezing and escape behavior and these reactions might interfere non-specifically with the FPS and conditioned freezing responses. Such reactions were only reported after injections of higher concentrations of KA and NMDA (Bandler and Depaulis, 1988; Depaulis et al., 1989; Ferreira-Netto et al., 2005). In fact, only effects on the expression of conditioned fear, but no effects on motor activity, were observed herein after injections into dPAG, since the drugs did not affect rats' performance in the open-field test. Furthermore, in FPS experiments, rats showed normal baseline acoustic startle responding (noise-alone trials) after drugs administration, indicating that the changes in potentiation of the startle response (light-noise trials) were not related with impaired sensory gating.

While glutamatergic agonists dose dependently increased conditioned freezing, startle amplitude was enhanced in the presence of the CS and then reduced with higher doses of the agonists. Although this reduction on FPS could indicate a decrease in the conditioned fear, it does not seem to be the case. First, previous studies from this and other laboratories showed pro-aversive effects of glutamate or its agonists, when administered into dPAG, including the expression of freezing and escape behaviors (Bandler and Depaulis, 1988; Depaulis et al., 1989; Ferreira-Netto et al., 2005). Second, some studies have already shown that high shock intensities on the training day also decrease the startle potentiation suggesting that high fear levels interfere with FPS (Davis and Astrachan, 1978; Walker and Davis, 1997; Santos et al., 2005). Third, because KA and NMDA enhanced conditioned freezing, the effects on FPS cannot be attributed to a loss of fear but may instead reflect a failure of fear to be expressed through elevated startle responses. So, FPS seems to be non-monotonically related to fear: moderate fear levels may produce maximal FPS, whereas higher levels might switch animals to a different mode of defensive responding that does not include FPS as a component behavior. This non-monotonic function reflects a performance rather than a learning deficit.

It is reasonable to suggest that the expression of conditioned freezing and potentiated startle compete, depending on fear levels. The dPAG appears to be a key structure in this switch process since high fear levels caused by the activation of dPAG with glutamatergic

agonists decrease FPS in favor of enhancing freezing behavior. This hypothesis is supported by the fact that lesions of dPAG prevented the deficit in FPS caused by high footshock training (Walker and Davis, 1997). Other studies have also suggested an important functional role for the PAG in influencing the selection between adaptive behavioral responses. For example, studies using morphine-treated animals reported a role for the rostral lateral PAG in the switching between maternal behavior and prey hunting (Sukikara et al., 2006; Mota-Ortiz et al., 2012). Moreover, studies from our laboratory already demonstrated the role of dPAG in the switching from alertness to freezing and finally to escape behavior in animals subjected to electrical or chemical stimulation of this area (Brandão et al., 1982; Ferreira-Netto et al., 2005; Martinez et al., 2006; Reimer et al., 2009). Our present findings might suggest that the particular behavioral shift between FPS and conditioned freezing could also involve the dPAG. A more in-depth understanding of this role of the dPAG in selecting adaptive behavioral strategies may further our general understanding of the way in which animals respond to fear-eliciting stimuli and anxiety-provoking situations.

Conclusions

Taken together, the results suggest an important role of dPAG glutamatergic mechanisms in the expression of conditioned freezing and FPS. Also, it seems that the effects of glutamatergic activation in conditioned fear are mediated by both AMPA/Kainate and NMDA receptors. With the use of conditioned freezing response as an additional measure of conditioned fear it was possible to clarify the actual fear state measured on FPS test. So, we confirmed that the apparently contradictory effects observed for dPAG manipulation in the expression of FPS are most likely due to the fact that moderate fear levels produce maximal startle responses, whereas higher fear intensity decreases the FPS magnitude (Davis and Astrachan, 1978; Walker and Davis, 1997; Santos et al., 2005). The present data, together with previous findings from this laboratory (Castilho and Brandão, 2001; Castilho et al., 2002; Reimer et al., 2008), suggest the relevance of considering dPAG in the neurobiology of conditioned fear. Research in this field may lead to new insights into the pathophysiology and treatment of anxiety disorders.

ROLE OF FUNDING SOURCE

CNPq and FAPESP funded this study but had no further role in the study design, collection, analysis, and interpretation of the data, writing of the report, and decision to submit the paper for publication.

CONTRIBUTORS

A.E. Reimer was involved in the design of the study, performed and analyzed most of the experiments, interpreted the experimental results, and wrote the first draft of the manuscript. A.R. de Oliveira collaborated in the experimental work, data analysis, and preparation of the manuscript. M.L. Brandão was involved in the design of the

study and contributed to the interpretation of the data and writing of the manuscript. All of the authors approved the final manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

All of the authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments—Research was supported by FAPESP (Proc No. 11/00041-3) and CNPq (Proc No. 472029/2006-0). A.E. Reimer holds a Doctor scholarship from CNPq (Proc No. 143018/2008-6) and A.R. Oliveira holds a Post-Doctoral fellowship from FAPESP (Proc No. 10/50669-6).

REFERENCES

- Albin RL, Makowiec RL, Hollingsworth Z, Dure LSt, Penney JB, Young AB (1990) Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. *Neurosci Lett* 118:112–115.
- Avanzi V, Silva RCB, Macedo CE, Brandão ML (2003) 5-HT mechanisms of median raphe nucleus in the conditioned freezing caused by light/foot-shock association. *Physiol Behav* 78:471–477.
- Bandler R, Carrive P (1988) Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain Res* 439:95–106.
- Bandler R, Depaulis A (1988) Elicitation of intraspecific defence reactions in the rat from midbrain periaqueductal grey by microinjection of kainic acid, without neurotoxic effects. *Neurosci Lett* 88:291–296.
- Bandler R, Keay KA (1996) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. *Prog Brain Res* 107:285–300.
- Behbehani MM (1995) Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol* 46:575–605.
- Bergink V, van Megen HJGM, Westenberg HGM (2004) Glutamate and anxiety. *Eur Neuropsychopharmacol* 14:175–183.
- Bertoglio LJ, Zangrossi Jr H (2006) Involvement of dorsolateral periaqueductal gray N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors in the regulation of risk assessment and inhibitory avoidance behaviors in the rat elevated T-maze. *Behav Pharmacol* 17:589–596.
- Borowski TB, Kokkinidis L (1996) 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. *Behav Neurosci* 110:1349–1364.
- 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.
- Brandão ML, de Aguiar JC, Graeff FG (1982) GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. *Pharmacol Biochem Behav* 16:397–402.
- Canteras NS (2003) Critical analysis of the neural systems organizing innate fear responses. *Rev Bras Psiquiatr* 25(Suppl. 2):21–24.
- Canteras NS, Goto M (1999) Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport* 10:413–418.
- Castilho VM, Brandão ML (2001) Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT_{2A} receptors in rats. *Psychopharmacol* 155:154–162.
- Castilho VM, Macedo CE, Brandão ML (2002) Role of benzodiazepine and serotonergic mechanisms in conditioned freezing and antinociception using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray as unconditioned stimulus in rats. *Psychopharmacol* 165:77–85.
- Davis M, Astrachan DI (1978) Conditioned fear and startle magnitude: effects of different footshock or backshock intensities used in training. *J Exp Psychol Anim Behav* 4:95–103.
- Davis M, Falls WA, Campeau S, Kim M (1993) Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav Brain Res* 58:175–198.
- de Oliveira AR, Reimer AE, de Macedo CEA, de Carvalho MC, Silva MADs, Brandão ML (2011) Conditioned fear is modulated by D2 receptor pathway connecting the ventral tegmental area and basolateral amygdala. *Neurobiol Learn Mem* 95:37–45.
- Depaulis A, Bandler R (1991) The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical, and neurochemical organization. New York: Plenum Press.
- Depaulis A, Bandler R, Vergnes M (1989) Characterization of pretentorial periaqueductal gray matter neurons mediating intraspecific defensive behaviors in the rat by microinjections of kainic acid. *Brain Res* 486:121–132.
- Dielenberg RA, Hunt GE, McGregor IS (2001) “When a rat smells a cat”: the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience* 104:1085–1097.
- Fendt M (1998) Different regions of the periaqueductal gray are involved differently in the expression and conditioned inhibition of fear-potentiated startle. *Eur J Neurosci* 10:3876–3884.
- Fendt M (2000) Expression and conditioned inhibition of fear-potentiated startle after stimulation and blockade of AMPA/Kainate and GABA(A) receptors in the dorsal periaqueductal gray. *Brain Res* 880:1–10.
- Fendt M, Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23:743–760.
- Fendt M, Koch M, Schnitzler HU (1996) Lesions of the central gray block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. *Behav Brain Res* 74:127–134.
- Ferreira-Netto C, Borelli KG, Brandão ML (2005) Neural segregation of Fos-protein distribution in the brain following freezing and escape behaviors induced by injections of either glutamate or NMDA into the dorsal periaqueductal gray of rats. *Brain Res* 1031:151–163.
- Graeff FG, Brandão ML, Audi EA, Milani H (1986) Role of GABA in the anti-aversive action of anxiolytics. *Adv Biochem Psychopharmacol* 42:79–86.
- Jarrard LE (1983) Selective hippocampal lesions and behavior: effects of kainic acid lesions on performance of place and cue tasks. *Behav Neurosci* 97:873–889.
- Koch M (1999) The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol* 59:107–128.
- Leaton RN, Cranney J (1990) Potentiation of the acoustic startle response by a conditioned stimulus paired with acoustic startle stimulus in rats. *J Expl Psychol Anim Behav Process* 16:279–287.
- Martinez RCR, de Oliveira AR, Brandão ML (2006) Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. *Neurobiol Learn Mem* 85:58–65.
- Mathew SJ, Amiel JM, Coplan JD, Fitterling HA, Sackeim HA, Gorman JM (2005) Open-label trial of riluzole in generalized anxiety disorder. *Am J Psychiatry* 162:2379–2381.
- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29:365–402.
- Moreira FA, Molchanov ML, Guimarães FS (2004) Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacol* 171:199–203.
- Mota-Ortiz SR, Sukikara MH, Bittencourt JC, Baldo MV, Elias CF, Felicio LF, Canteras NS (2012) The periaqueductal gray as a critical site to mediate reward seeking during predatory hunting. *Behav Brain Res* 226:32–40.

- Myers RD (1966) Injection of solutions into cerebral tissue: relation between volume and diffusion. *Physiol Behav* 1:171–174. IN179.
- Nashold Jr BS, Wilson WP, Slaughter DG (1969) Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30:14–24.
- Pandossio JE, Brandão ML (1999) Defensive reactions are counteracted by midazolam and muscimol and elicited by activation of glutamate receptors in the inferior colliculus of rats. *Psychopharmacol* 142:360–368.
- Paxinos G, Watson C (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam: Elsevier.
- Reimer AE, de Oliveira AR, Brandão ML (2009) Involvement of GABAergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray and inferior colliculus on unconditioned fear. *Psychol Neurosci* 2:51–58.
- Reimer AE, Oliveira AR, Brandão ML (2008) 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* 76:545–550.
- Santos JM, Gárgaro AC, Oliveira AR, Masson S, Brandão ML (2005) Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing behavior and fear-potentiated startle. *Eur Neuropsychopharmacol* 15:239–246.
- Spiegel EA, Kletzklin M, Szekely EG (1954) Pain reactions upon stimulation of the tectum mesencephali. *J Neuropathol Exp Neurol* 13:212–220.
- Sukikara MH, Mota-Ortiz SR, Baldo MV, Felício LF, Canteras NS (2006) A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. *J Neurosci* 26:2583–2589.
- Tölle TR, Berthele A, Zieglgänsberger W, Seeburg PH, Wisden W (1993) The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. *J Neurosci* 13:5009–5028.
- Vianna DML, Brandão ML (2003) Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. *Braz J Med Biol Res* 36:557–566.
- Walker DL, Cassella JV, Lee Y, De Lima TC, Davis M (1997) Opposing roles of the amygdala and dorsolateral periaqueductal gray in fear-potentiated startle. *Neurosci Biobehav Rev* 21:743–753.
- Walker DL, Davis M (1997) Involvement of the dorsal periaqueductal gray in the loss of fear-potentiated startle accompanying high footshock training. *Behav Neurosci* 111:692–702.
- Zhao Z, Davis M (2004) Fear-potentiated startle in rats is mediated by neurons in the deep layers of the superior colliculus/deep mesencephalic nucleus of the rostral midbrain through the glutamate non-NMDA receptors. *J Neurosci* 24:10326–10334.
- Zhao Z, Yang Y, Walker DL, Davis M (2009) Effects of substance P in the amygdala, ventromedial hypothalamus, and periaqueductal gray on fear-potentiated startle. *Neuropsychopharmacol* 34:331–340.

(Accepted 1 June 2012)
(Available online 12 June 2012)

ANEXO

ANEXO A. Núcleos hipotalâmicos

FIGURE 1 Organization of the hypothalamus. A highly schematic representation of the morphological organization of the hypothalamus to show a simplified view of its zones, regions, areas, and nuclei. Abbreviations used: a, area; n, nucleus. Notes: *The supraoptic n. and n. circularis are best considered a displaced part of the periventricular zone. **Despite the location of the TMD in the periventricular zone, the connections and presumed function of both parts of the tuberomammillary n. are more closely related to the lateral zone.