

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Daniele Cristina de Aguiar

“Envolvimento das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral e do núcleo pré-mamilar dorsal na elaboração de respostas defensivas”

RIBEIRÃO PRETO
2008

Daniele Cristina de Aguiar

“Envolvimento das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral e do núcleo pré-mamilar dorsal na elaboração de respostas defensivas”

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Aluna: Daniele Cristina de Aguiar

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

RIBEIRÃO PRETO

2008

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

Aguiar, Daniele Cristina de
Envolvimento das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral e do núcleo pré-mamilar dorsal na elaboração de respostas defensivas Ribeirão Preto, 2008.

145 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Guimarães, Francisco Silveira.

1. Comportamento defensivo. 2. Óxido nítrico. 3. Glutamato. 4. Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral. 5. Núcleo pré-mamilar dorsal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniele Cristina de Aguiar

Envolvimento das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral e do núcleo pré-mamilar dorsal na elaboração de respostas defensivas

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Profa. Dra. Leda Menescal de Oliveira

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Newton Sabino Canteras

Instituição: ICB-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Instituição: CCB-UFSC

Assinatura: _____

Para Paulo, Maria José, Gisele e Natália.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães, pela orientação deste trabalho, por sua disposição de nos ensinar sempre que necessário e pela sua amizade ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Hélio Zangrossi Jr. por ter disponibilizado o laboratório para a realização desses experimentos e pelas discussões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Aos Profs. Antônio de Pádua Carobrez, Hélio Zangrossi Jr, Leda Menescal de Oliveira e Newton Sabino Canteras, que aceitaram o convite para compor a banca examinadora, de modo a dedicarem tempo à avaliação deste trabalho.

À Eleni Tamburus Gomes pela incansável dedicação com o auxílio dos experimentos imunoistoquímicos deste trabalho, assim como por sua amizade.

Ao José Carlos de Aguiar, pelos seus preciosos ensinamentos que permitiram a execução deste trabalho, assim como por sua amizade.

À minha grande família, pela compreensão e apoio.

Ao Bruno, companhia agradável e inesperada, pelo seu carinho, companheirismo, apoio e por nossa amizade.

Aos meus amigos pela amizade, carinho e apoio nos momentos mais difíceis.

Aos meus companheiros de laboratório, pela convivência e oportunidade de trabalharmos juntos.

Ao Tadeu Franco Vieira e Afonso Paulo Padovan pelo auxílio técnico e principalmente por me ajudarem com a manipulação do gato em todos os momentos que precisei.

Aos profissionais da secretária, Sonia Maria Stefanelli, Fátima Helena Ferreira Petean e José Waldik Ramón por me auxiliarem nos aspectos administrativos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)- Processo: 04/09648-4, pelo apoio financeiro.

RESUMO

AGUIAR, D.C. **Envolvimento das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral e do núcleo pré-mamilar dorsal na elaboração de respostas defensivas.** 2008.145f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O óxido nítrico (NO), sintetizado pela sintase do óxido nítrico neuronal (NOSn), possui um papel modulador em reações defensivas, possivelmente facilitando a ansiedade. A NOSn está localizada em estruturas envolvidas com reações defensivas, como por exemplo, a substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl) e o núcleo pré-mamilar dorsal (PMd). Antagonistas de receptores NMDA (rNMDA) de glutamato e inibidores da NOS injetados intra-SCPdl produzem efeitos ansiolíticos. A exposição a estímulos ameaçadores induz a ativação de células produtoras de NO nesta região. A SCPdl recebe uma densa projeção do PMd, também envolvido com reações de defesa. Lesões bilaterais desse núcleo abolem a expressão de respostas defensivas durante a exposição ao predador. Pouco se sabe a respeito dos neurotransmissores envolvidos na mediação desses comportamentos pelo PMd, o qual também expressa receptores ionotrópicos de glutamato. Assim, o objetivo geral do presente trabalho foi de investigar a participação do NO e do glutamato na SCPdl e no PMd nas respostas defensivas. Para tanto, testou-se a hipótese de que a administração de inibidores da NOSn (7-nitroindazole, 7-NI, ou N-propil-L-arginina, NP) intra-SCPdl atenuaria as respostas defensivas promovidas pela exposição a um evento ameaçador inato, um gato. Verificou-se também, a hipótese de que o tratamento com AP-7 (antagonista de rNMDA) ou NP intra-SCPdl poderiam diminuir as reações comportamentais defensivas, além do número de células ativadas, bem como a ativação de neurônios NOSn positivos em regiões relacionadas com o comportamento defensivo após a exposição ao gato. A ativação neuronal foi verificada pela detecção da imunorreatividade à proteína c-FOS (IR-Fos) e a presença da NOS através da imunorreatividade à proteína NOS. Por último, testou-se a hipótese de que o tratamento com AP-7 ou NP intra-PMd atenuaria as reações comportamentais promovidas pela presença do gato. A exposição ao gato promoveu respostas defensivas que foram atenuadas pelo tratamento intra-SCPdl com inibidores da NOSn e com o AP7. Adicionalmente, houve aumento das células IR-Fos da SCPdl, no PMd e no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), e aumento na porcentagem de células duplas (% duplas) marcadas na SCP e no PMd. O tratamento com AP-7 e com o NP intra-SCPdl atenuou a ativação celular na SCP e no PVN observada pela exposição ao gato, enquanto que houve aumento nas células IR-Fos e na % duplas no PMd. Além disso, observamos que o tratamento de AP-7 ou NP intra-PMd também atenuou as reações defensivas observadas pela exposição ao predador. Em conclusão, os resultados do presente trabalho sugerem que o antagonismo da neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica na SCPdl e no PMd pode atenuar as respostas comportamentais induzidas pela exposição ao predador. Além disso, a administração intra-SCPdl de AP-7 ou NP é capaz de reduzir a ativação celular promovida pela exposição ao gato nesta estrutura, sem alterar, ou mesmo aumentando, essa ativação em outras regiões relacionadas com o comportamento defensivo como o PMd.

ABSTRACT

AGUIAR, D.C. **Participation of glutamatergic and nitrgic neurotransmission in defensive behaviors modulated by dorsolateral periaqueductal gray and dorsal premammillar nucleus.** 2008.145 f. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Nitric oxide (NO) is synthesized by NO synthase (NOSn) and plays a role in defensive reactions, probably increasing anxiety responses. NOSn containing neurons are localized in different regions of the central nervous system related to defensive behavior such as the dorsolateral periaqueductal grey (dlPAG) and the dorsal premammillary nucleus (PMd). Glutamate antagonists and NOS inhibitors injected into the dlPAG induce anxiolytic responses. Exposure to an innate fear stimulus (live cat) induces defensive reactions and activation of NO producing neurons in this region. The dlPAG receives inputs from the PMd, which appears to be related to defensive reactions. Bilateral ibotenic acid lesions of the PMd virtually eliminate the expression of defensive responses. Little is known about the neurotransmitters responsible for the behavioral responses mediated by the PMd, which also expresses ionotropic glutamate receptors. The aim of this study was to verify the involvement of NO and glutamate neurotransmission in defensive reactions modulated by dlPAG and PMd. First, we tested the hypothesis that the injection of NOS inhibitors, 7-NI or NP, directly into the dlPAG would attenuate defensive reactions induced by exposure to a live predator. We also tested the hypothesis that the injection of AP-7 (glutamate NMDA-receptor antagonist) or NP into the dlPAG would attenuate the behavioral responses and cellular activation following exposure to a live predator. c-Fos expression was employed as a marker of neuronal functional activation whereas NOSn immunohistochemistry was used to detect the presence of NOS neurons. Finally, we tested the hypothesis that the injection of AP-7 or NP into the PMd would attenuate the defensive reactions induced by a live cat. Cat exposure induced fear responses which were attenuated by NOS inhibitors or AP-7 when injected into the dlPAG. The cat exposure increased cFos positive cells in both sides of dlPAG, PMd and in the periventricular nucleus (PVN). It also increased the percentage of double stained cells (% DS) in the dlPAG and in the PMd. Pretreatment with AP-7 or NP in the dlPAG decreased the cellular effects induced by predator exposure in the dlPAG and PVN, while increased the number of cFos positive cells and % DS in the PMd. Moreover, pretreatment with AP-7 or NP into the PMd also attenuated the behavioral responses induced by live cat. These results suggest that inhibition of glutamate or nitric oxide neurotransmission in the dlPAG and the PMd can attenuate behavioral responses to threatening stimuli. Additionally, AP-7 or NP pretreatment in the dlPAG was able to reduce the cellular effects induced by predator exposure in this structure. These treatments, however, did no change and even increased the cellular effects in other regions related to defensive reactions such as the PMd.

Lista de Abreviaturas

AHN – núcleo hipotalâmico anterior	LCE – labirinto em cruz elevado
AmMe – amígdala medial	mGluR – receptores metabotrópicos de glutamato
AMPA - α amino-3-hidroxi 5- metil 4- isoxazolepropionato	Mg⁺² – íons magnésio
ANOVA – análise de variância	NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
AP-7 - ácido 2-amino-7-fosfoheptanócio	7-NI – 7 Nitroindazole
BOA – bulbo olfatório anterior	NMDA – N-metil- D-aspartato
BNST – núcleo intersticial da estria terminal	NO – óxido nítrico
Ca⁺² – íons cálcio	NOS – óxido nítrico sintase
GCs – guanilato ciclase solúvel	nNOS – óxido nítrico sintase neuronal
CHMD – circuito hipotalâmico medial de defesa	NP – N-propyl- ω -L-arginina
CPF – córtex pré-frontal	PDE – enzimas fosfodiesterases
CRH – hormônio liberador de corticotrofinas	PKG – proteínas quinases dependentes de GMPc
dmHVM – porção dorsomedial do hipotálamo ventromedial	PSD – proteína densidade pós-sináptica
DMSO – dimetilsulfóxido	PMd – núcleo pré-mamilar dorsal
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial	PVN – núcleo paraventricular
EPM – erro padrão da média	PVNmg – porção magnocelular do PVN
ERDF – fator de relaxamento derivado do endotélio	PVNp – porção parvocelular do PVN
GABA – ácido gamma-aminobutírico	PTZ – pentilenotretazol
GTP – guanosina trifosfato	rNMDA – receptores NMDA
GMPc – guanosina monofostato cíclico	SCP – substância cinzenta periaquedutal
i.c.v. – intra-cerebroventricular	SCPd – SCP dorsal
iGluR – receptores ionotrópicos de glutamato	SCPdl – SCP dorsolateral
iNOS – óxido nítrico sintase induzida	SNC – sistema nervoso central
	Zn⁺² – íons zinco

SUMÁRIO

Introdução	11
1. Comportamento Defensivo	12
2. Substratos Neurais do Comportamento Defensivo	16
2.1 Substância Cinzenta Periaquedutal	16
2.2 Núcleo pré-mamilar dorsal	17
3. Neurotransmissores envolvidos na mediação de respostas aversivas	20
3.1. Neurotransmissão Glutamatérgica	20
3.2. Neurotransmissão Nitrérgica	24
Objetivos	29
Objetivo Geral	30
Objetivos Específicos	30
Materiais e Métodos	31
1. Animais	32
2. Drogas	32
3. Cirurgia estereotáxica	33
4. Caixa de exposição ao gato	33
5. Procedimento Experimental	34
5.1 Manipulação	34
5.2 Microinjeção	34
5.3 Exposição na Caixa	35
5.4 Grupos Experimentais.....	35
<u>Experimento 1</u> : Efeito do tratamento de inibidores da NOSn intra-SCPdl em ratos expostos a um gato.....	35
<u>Experimento 2</u> : Efeito do tratamento de AP-7 intra-SCPdl sobre a dupla marcação Fos+NOSn em diferentes regiões encefálicas de ratos expostos a um gato	36
<u>Experimento 3</u> : Efeito do tratamento de NP intra-SCPdl sobre a dupla marcação Fos+NOSn em diferentes regiões encefálicas de ratos expostos a um gato.....	36
<u>Experimento 4</u> : Efeito do tratamento de AP-7 ou NP intra-PMd em ratos expostos a um gato.....	37
6. Histologia	37
7. Histoquímica	38

8 Análise dos Resultados	40
Resultados	43
<u>Experimento 1</u> : Efeito do tratamento de inibidores da NOSn intra-SCPdl em ratos expostos a um gato	44
<u>Experimento 2</u> : Efeito do tratamento de AP-7 intra-SCPdl sobre a dupla marcação Fos+NOSn em diferentes regiões encefálicas de ratos expostos a um gato	51
<u>Experimento 3</u> : Efeito do tratamento de NP intra-SCPdl sobre a dupla marcação Fos+NOSn em diferentes regiões encefálicas de ratos expostos a um gato	60
<u>Experimento 4</u> : Efeito do tratamento de AP-7 ou NP intra-PMd em ratos expostos a um gato.....	69
Experimento 4 A: Efeito do tratamento de AP-7 intra-PMd em ratos expostos a um gato	69
Experimento 4 B: Efeito do tratamento de NP intra-PMd em ratos expostos a um gato	72
Discussão	76
Conclusões	89
Referências Bibliográficas	91
Anexo	106

1. Comportamento Defensivo

A idéia de que a origem biológica das emoções humanas baseia-se nas respostas defensivas que os animais apresentam frente a estímulos ameaçadores foi sugerida pela primeira vez por Darwin (DARWIN, 1872). A partir desta perspectiva, tem-se proposto que as bases neurobiológicas das emoções relacionadas aos transtornos de ansiedade podem ser encontradas nos sistemas neurais que organizam a defesa do animal (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; BLANCHARD et al., 1990; GRAEFF, 1994; GRAY, 1982; GRAY; MCNAUGHTON, 2000).

O comportamento defensivo pode ser observado nas diferentes espécies de mamíferos, e constitui-se pelo conjunto de reações que os animais apresentam frente a situações que promovem risco à sobrevivência como, por exemplo, a presença de predadores e perigos provenientes do próprio ambiente (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; BLANCHARD et al., 1990). Nesse sentido, a utilização de estressores naturais permite uma maior precisão na evocação dos estados emocionais e dos comportamentos defensivos, e o aprimoramento da utilização dos modelos animais nas análises de estados relacionados com medo e ansiedade (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; HENDRIE; WEISS; EILAM, 1996; RODGERS, 1997). Assim, o modelo de exposição ao predador tem sido uma forma de verificar o impacto de fatores ameaçadores e estressantes sobre a atividade encefálica, além de verificar a possível relação entre o comportamento defensivo e as diferentes psicopatologias, tais como, transtorno de pânico e estresse pós-traumático (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003; BLANCHARD et al., 1990; BLANCHARD et al., 1997; BLANCHARD et al., 2001; CANTERAS et al., 1997; KAVALIERS; CHOLERIS, 2001; MCGREGOR et al., 2004). Além disso, este modelo também é utilizado como um modelo de medo inato

(BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006; BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; CANTERAS, 2003; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001).

Em roedores, a exposição a um predador natural, o gato, promove comportamentos específicos como fuga, congelamento, comportamentos de esquivas e avaliações de risco, ataques defensivos, além de induzir analgesia e ativação autonômica (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD et al., 1990). Ainda, observam-se reduções significativas na atividade locomotora em geral, nos comportamentos não defensivos (auto-limpeza e reprodução) e mudança (quando possível) para lugares mais seguros onde é possível monitorar a presença do predador (APFELBACH et al., 2005; BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; MCGREGOR et al., 2002). Esses comportamentos, também podem ser observados com estímulos mais sutis como, por exemplo, a presença do odor do predador (APFELBACH et al., 2005; MCGREGOR et al., 2002). Porém, a exposição de ratos frente ao gato induz respostas defensivas mais intensas, geralmente acompanhadas de congelamento e vocalizações ultra-sônicas, quando comparadas com a exposição ao odor de gato, a qual promove comportamentos mais relacionados com avaliação de risco (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989). Além disso, a exposição ao gato induz respostas muito resistentes à habituação e um forte condicionamento contextual ao local da exposição, bem como efeitos ansiogênicos em animais posteriormente expostos a outros modelos de ansiedade como o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (ADAMEC et al., 1999; ADAMEC; SHALLOW, 1993; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003; BLANCHARD; BLANCHARD, 1989).

O modelo de exposição ao gato foi validado farmacologicamente a partir de resultados que mostraram que o tratamento crônico com fármacos de ação ansiolítica e panicolítica inibiram tanto a esquivas quanto a fuga, enquanto que a administração de fármacos de ação apenas ansiolítica, como os benzodiazepínicos, inibiu preferencialmente a esquivas (BLANCHARD et al.,

1997; GRIEBEL et al., 1995). Esses efeitos também foram observados nos modelos que empregam o odor de gato. Zangrossi e File (1992) mostraram que o efeito ansiogênico induzido pela exposição ao odor de gato é reduzido pela administração prévia de clordiazepóxido em animais expostos ao LCE ou ao modelo da caixa claro-escuro. Estes autores observaram também que o tratamento com esse ansiolítico clássico não altera as respostas diretamente induzidas pelo odor do gato (ZANGROSSI; FILE, 1992). Em outros estudos, observou-se que o tratamento agudo com benzodiazepínicos reduz comportamentos de avaliação de risco, aumenta a aproximação e o contato com o odor (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2004).

Com relação aos sistemas neurais responsáveis pelo controle do comportamento de defesa, estes podem ser organizados em duas dimensões comportamentais: a distância defensiva, proposta inicialmente por Blanchard et al. (1988) e a direção defensiva (MCNAUGHTON; CORR, 2004). Sendo que a distância defensiva baseia-se na hierarquia funcional das estruturas que determinam o comportamento apropriado em relação ao perigo, enquanto que na direção defensiva há uma distinção funcional entre os comportamentos que afastam ou aproximam o animal de uma fonte de perigo.

A partir desta idéia, sugeriu-se uma clara distinção (funcional, comportamental e farmacológica) entre medo e ansiedade. O medo possui a função de mover o animal para longe do perigo, promove comportamentos de luta, fuga e congelamento e é insensível a drogas ansiolíticas. Por outro lado, a ansiedade tem como função mover o animal em direção ao perigo quando o animal está em uma situação de conflito (aproximação ou esquiva), aumentando comportamentos de avaliação de risco, sendo estas manifestações sensíveis às drogas ansiolíticas (MCNAUGHTON; CORR, 2004). Diferentemente da teoria original de Gray (1982), a distinção entre medo e ansiedade não dependeria da natureza do estímulo condicionado ou incondicionado

utilizado. Considerando-se ainda estas propostas, os substratos neurais do medo e ansiedade estariam representados pelas mesmas estruturas, as quais estariam organizadas paralelamente, hierarquicamente e de maneira simétrica, porém com níveis de ativação de acordo com a distância defensiva, ou seja, pequenas distâncias ativariam estruturas mais caudais, como a substância cinzenta periaquedutal (SCP) e distâncias maiores ativando estruturas mais corticais, como o córtex pré-frontal (CPF) (MCNAUGHTON; CORR, 2004). De acordo com essa hipótese, recentemente Mobbs et al (2007) observaram que, também em humanos, circuitos neurais distintos estão envolvidos em situações de perigo distal e proximal, evidenciando a SCP como a principal estrutura envolvida em situações de perigos proximais.

Assim, estudos que empregam a imunistoquímica para a proteína Fos, uma proteína transcrita a partir do gene de expressão imediata *c-fos* e amplamente utilizada como ferramenta para mapeamento funcional de neurônios (CHAUDHURI, 1997; MORGAN; CURRAN, 1989), observaram que a exposição de ratos ao gato ou ao seu odor, aumenta a expressão de Fos em regiões como a SCP e no núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) do hipotálamo (CANTERAS et al., 1997; CANTERAS; GOTO, 1999). Esse aumento, no entanto, também pode ser observado em outras estruturas relacionadas com os transtornos de ansiedade, como diversos núcleos da amígdala, hipotálamo medial e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006; CANTERAS et al., 1997; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2004). Muitas estruturas que são ativas nesses modelos também apresentam maior expressão de Fos após a exposição ao modelo de ansiedade do LCE (DUNCAN; KNAPP; BREESE, 1996; SILVEIRA; SANDNER; GRAEFF, 1993) e após injeções sistêmicas de diferentes classes de drogas ansiogênicas (SINGEWALD; SALCHNER; SHARP, 2003; SINGEWALD; SHARP, 2000), sustentando a hipótese de que as estruturas responsáveis pelo comportamento defensivo são as mesmas responsáveis pelos transtornos de ansiedade.

2. Substratos Neurais do Comportamento Defensivo

2.1 Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP):

A SCP é constituída por pequenos neurônios que circundam o aqueduto mesencefálico (Sylvius) e, ao longo do processo evolutivo, sofreu poucas modificações (CARRIVE, 1993). Esta estrutura não é homogênea, pois vários estudos demonstraram que reações emocionais distintas são desencadeadas em suas diferentes subdivisões, sendo que a especificidade anatômica e funcional pode ser organizada na forma de quatro colunas longitudinais que se estendem ao longo do eixo rostro-caudal: colunas dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral (BANDLER et al., 2000).

A estimulação elétrica da SCP promove reações defensivas em gatos (FERNANDEZ DE MOLINA; HUNSPERGER, 1959), enquanto que em humanos produz ansiedade intensa, sentimentos de pânico, terror e de morte iminente (NASHOLD; WILSON; SLAUGHTER, 1969). Como a estimulação elétrica pode estimular tanto corpos neuroniais como fibra de passagem, Bandler (1982) utilizou a técnica de microinjeção de aminoácidos excitatórios (AAE, os quais excitam apenas corpos celulares) e demonstrou que a SCP de gatos mediava reações defensivas integradas (BANDLER, 1982). Além disso, essa região está envolvida na integração de outras funções, como por exemplo, dor, controle cardiovascular, respiratório, vocalizações e comportamentos sexuais (BEHBEHANI, 1995; LOVICK, 2000).

Em ratos, a estimulação da porção dorsal da SCP (SCPd) também possui propriedades aversivas, pois ratos treinados aprendem rapidamente a interromper a estimulação elétrica dessa estrutura (SCHENBERG; GRAEFF, 1978). A estimulação da SCPd também produz comportamentos incondicionados, como reações de escape ou fuga, congelamento e alterações autonômicas (como elevação da pressão arterial e da frequência cardíaca, sudorese e piloereção), que são remanescentes de ataques de pânico experimentais e clínicos em humanos (BANDLER;

CARRIVE, 1988; BECKETT; MARSDEN, 1995; KRIEGER; GRAEFF, 1985; SCHENBERG et al., 2001). Nesse sentido, a SCPd comandaria respostas de luta ou fuga em condições de medo extremo (DEAKIN; GRAEFF, 1991), e devido à semelhança entre as reações humanas e animais, a estimulação dessa estrutura tem sido proposta como um modelo experimental de ataques de pânico (GRAEFF, 1994; LOVICK, 2000).

Como já mencionado anteriormente, observa-se um aumento da expressão da proteína Fos na SCP, especialmente na SCPd, de ratos expostos a situações de perigo iminente como, por exemplo, a exposição ao gato ou ao seu odor (BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006; CANTERAS; GOTO, 1999; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2002). Além disso, a lesão da SCPd reduziu as respostas defensivas promovidas pelo odor do gato (DIELENBERG; LEMAN; CARRIVE, 2004). Esses resultados sugerem que a porção dorsal da SCP possui uma função essencial na elaboração dos comportamentos defensivos relacionados a diferentes estressores, principalmente aqueles que possuem um componente psicológico (dependem do processamento do CPF), uma vez que essa região não possui aferências medulares ou espinhais diretas, mas recebe projeções do CPF medial (FLOYD et al., 2000).

2.2. Núcleo pré-mamilar dorsal (PMd):

Os sistemas hipotalâmicos são bem conhecidos por integrarem comportamentos críticos para a sobrevivência da espécie, ocupando uma função central na integração das respostas defensivas antipredatórias (BLANCHARD et al., 2003; CANTERAS, 2003, 2002; CANTERAS et al., 1997; CANTERAS; RIBEIRO-BARBOSA; COMOLI, 2001). Desde os trabalhos pioneiros de Hess e Brugger (1943), observa-se que a estimulação elétrica de várias regiões hipotalâmicas promove um padrão de respostas somatomotoras e autonômicas, as quais são semelhantes ao comportamento observado nos animais frente a perigos naturais (BRUTUS; SHAIKH; SIEGEL,

1985; FUCHS; EDINGER; SIEGEL, 1985; HESS; BRUGGER, 1943; SILVEIRA; GRAEFF, 1992; YARDLEY; HILTON, 1986).

O hipotálamo é composto de três zonas longitudinais distintas (periventricular, medial e lateral) divididas em quatro níveis rostro-caudal ou regiões (pré-óptica, anterior, tuberal e mamilar) (CANTERAS, 2002). Especificamente, a zona hipotalâmica medial compreende uma série de grupos celulares bem definidos que possuem uma importante função em iniciar comportamentos motivados específicos (CANTERAS, 2002; CANTERAS; RIBEIRO-BARBOSA; COMOLI, 2001; CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995). Esta região compreende dois circuitos hipotalâmicos, sendo que o primeiro compreende o núcleo hipotalâmico anterior (AHN), a porção dorsomedial do hipotálamo ventromedial (dmHVM) e o núcleo pré-mamilar dorsal (PMd), os quais estão altamente interconectados e segregados do segundo circuito, que por sua vez, compreende a área pré-óptica medial, porção ventrolateral do hipotálamo ventromedial e os núcleos pré-mamilares tuberal e ventral (CANTERAS; SWANSON, 1992; SIMERLY; SWANSON, 1988). De acordo com Canteras (2002), o primeiro circuito hipotalâmico participaria da integração de respostas defensivas inatas em resposta a perigos ambientais, e constituiria o circuito hipotalâmico medial de defesa (CHMD). Já o segundo, o circuito hipotalâmico dimórfico estaria associado com comportamentos reprodutivos e agonísticos sociais (CANTERAS, 2003, 2002).

Tanto a estimulação elétrica quanto a estimulação química do CHMD produz respostas defensivas autonômicas e somatomotoras que se assemelham ao comportamento do animal em situações de perigo (CANTERAS, 2002). Diferentemente da resposta comportamental explosiva observada após a estimulação química da SCP, a resposta defensiva induzida pela estimulação do hipotálamo medial é caracterizada por locomoção rápida com tentativas de escape direcionada (BRANDAO et al., 1986; DI SCALA; SCHMITT; KARLI, 1984; SCHMITT et al., 1985;

SILVEIRA; GRAEFF, 1992). De maneira semelhante à SCP, ratos expostos ao gato ou ao seu odor tiveram aumento da expressão de Fos em sítios hipotalâmicos mediais específicos, sendo que o PMd foi a região que apresentou maior expressão. (CANTERAS et al., 1997).

Curiosamente, este é um dos sítios hipotalâmicos mais responsivos a estímulos ameaçadores (BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006; BLANCHARD et al., 2003; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2004) e, tanto lesões eletrolíticas, quanto neurotóxicas do PMd promovem reduções significativas do comportamento defensivo de ratos expostos tanto ao odor quanto à presença do gato (BLANCHARD et al., 2003; CANTERAS et al., 1997). Por outro lado, não foram observadas alterações comportamentais em situações que não estão relacionadas com a presença do predador, como por exemplo, o LCE e o condicionamento ao contexto (BLANCHARD et al., 2003; CANTERAS et al., 1997; CANTERAS; SWANSON, 1992).

A análise das conexões do PMd, através de estudos de marcação anterógrada e retrógrada (COMOLI; RIBEIRO-BARBOSA; CANTERAS, 2000), mostraram que essa região recebe importantes aferências de sítios diencefálicos, incluindo áreas específicas da região perifornical, região retinoceptiva da área hipotalâmica lateral, AHN, dmHVM. Além disso, vários sítios telencefálicos (núcleo intersticial da estria terminal (BNST), áreas pré-límbicas e infra-límbicas, núcleo septal lateral) também possuem projeções moderadas para esta região. Por outro lado, apenas alguns sítios do tronco encefálico parecem fornecer projeções para esta região, como por exemplo, a SCPdl e núcleo tegmental ventral (CANTERAS; SWANSON, 1992). Dentre as aferências que o PMd possui, a SCP é o principal alvo, sendo que o padrão dessa projeção coincide com padrão de ativação da SCP quando os animais são expostos ao gato ou ao seu odor (CANTERAS; GOTO, 1999; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001). Um padrão similar

de ativação foi observado após a administração de drogas panicogênicas (SINGEWALD; SHARP, 2000).

3. Neurotransmissores envolvidos na mediação de respostas aversivas

Os circuitos neuroanatômicos responsáveis pelas respostas de medo e ansiedade são modulados por vários sistemas de neurotransmissores químicos. Esses incluem vários neurotransmissores, como por exemplo, hormônio liberador de corticotrofinas (CRH), neuropeptídeo Y, substância P, transmissores monoaminérgicos (noradrenalina, serotonina e dopamina), ácido gamma-aminobutírico (GABA), glutamato e óxido nítrico (NO) (BERGINK; VAN MEGEN; WESTENBERG, 2004; CAROBREZ, 2003; DEAKIN; GRAEFF, 1991; GUIMARAES et al., 2005; HARRO, 2006; KALUEFF; NUTT, 2007).

3.1. Neurotransmissão Glutamatérgica:

O glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) (JAVITT, 2004), sendo liberado a partir de terminais pré-sinápticos em resposta à despolarização neuronal, e recaptado nestes próprios terminais por transportadores de AAE, localizados tanto em neurônios quanto em células gliais. No interior das células gliais o glutamato é convertido em glutamina e liberado no fluido extracelular, onde é recaptado para o terminal pré-sináptico, e convertido novamente em glutamato via ação da enzima glutaminase neuronal (AMARA; FONTANA, 2002).

Através de estudos farmacológicos, sugeriu-se, pela primeira vez, a existência de múltiplos receptores para o glutamato (MCLENNAN; HUFFMAN; MARSHALL, 1968). Posteriormente, através da clonagem dos primeiros receptores glutamatérgicos, confirmou-se a classificação obtida previamente por meios farmacológicos (HOLLMANN; HEINEMANN,

1994; HOLLMANN et al., 1989). Atualmente, os receptores de glutamato dividem-se em dois grandes grupos: os receptores metabotrópicos (mGluR) e os receptores ionotrópicos (iGluR), (NAKANISHI, 1992; OZAWA; KAMIYA; TSUZUKI, 1998). Os mGluR regulam a neurotransmissão tanto pré, como pós-sináptica e são divididos em três grupos (Grupo I, II e III), de acordo com o acoplamento de segundo mensageiros e sensibilidade ao ligante (SPOOREN et al., 2003). Já os iGluR são diferenciados de acordo com a seletividade de derivados sintéticos do glutamato, constituindo três subtipos: o N-metil-D-aspartato (NMDA), o α amino-3-hidroxi 5-metil 4-isoxazolepropionato (AMPA) e o cainato (WATKINS, 2000).

Os receptores NMDA (rNMDA) são compostos de múltiplas subunidades, incluindo pelo menos uma subunidade NR1 e uma ou mais subunidades modulatórias chamadas de NR2A-NR2D e NR3A-NR3B (JAVITT, 2004; NISHI et al., 2001). Esses receptores são extremamente permeáveis ao Ca^{+2} , possuem sítios neuromodulatórios para glicina, e sítios regulatórios que são sensíveis a poliaminas, Zn^{+2} , prótons e agentes redutores, como a glutatona (YAMAKURA; SHIMOJI, 1999). Os rNMDA são bloqueados pelo Mg^{+2} , de maneira sensível à voltagem, o qual se liga em um sítio dentro do canal (NOWAK et al., 1984).

Os receptores AMPA são canais permeáveis ao Na^{+} e K^{+} , compostos pelas subunidades GluR1-4 e atuam fortemente em união com os rNMDA (BORGES; DINGLELINE, 1998). A ativação desses receptores promove a despolarização necessária para a abertura dos canais NMDA (JAVITT, 2004). Já os receptores cainato são formados pelas subunidades Glu 5-7 e KA1-2 (BLEAKMAN; LODGE, 1998).

A presença de glutamato e enzimas envolvidas na sua síntese foram descritos em neurônios e terminais da SCP (BARBARESI, 2001; CLEMENTS et al., 1987). Receptores glutamatérgicos estão presentes ao longo de toda a SCP, mas possuem uma maior densidade na

coluna dorsolateral (ALBIN et al., 1990). Adicionalmente, observou-se a presença de receptores ionotrópicos de glutamato em diversas regiões hipotalâmicas, incluindo o PMd (EYIGOR; CENTERS; JENNES, 2001).

Diversas evidências sugerem que o glutamato desempenha um papel facilitador nas reações defensivas (BANDLER, 1982; DEPAULIS; BANDLER; VERGNES, 1989; SILVEIRA; GRAEFF, 1992; ZHANG; BANDLER; CARRIVE, 1990). Trabalhos iniciais mostraram a ocorrência de reações autonômicas, como por exemplo, aumento da pressão arterial e frequência cardíaca, acompanhadas de luta ou fuga, após a administração de glutamato ou agonistas glutamatérgicos na SCPdl de gatos (BANDLER; CARRIVE, 1988) e ratos (CARRIVE, 1993; KRIEGER; GRAEFF, 1985), e após a administração de AAE no hipotálamo medial de ratos (SILVEIRA; GRAEFF, 1992).

Posteriormente, observou-se que na SCPdl essas reações também podem ser desencadeadas por agonistas específicos dos rNMDA, como por exemplo, o NMDA (AGUIAR; MOREIRA; GUIMARAES, 2006; BITTENCOURT et al., 2004), bem como por agonistas de mGluR, o t-ACPd (MOLCHANOV; GUIMARAES, 1999). Essas reações foram acompanhadas por aumento da proteína Fos em regiões relacionadas com o comportamento defensivo (FERREIRA-NETTO; BORELLI; BRANDAO, 2005; MOLCHANOV, 2003). Adicionalmente, a administração de agonistas para o sítio glicina no rNMDA nesta mesma região induziu efeitos ansiogênicos no LCE (CAROBREZ; TEIXEIRA; GRAEFF, 2001; SCHMITT et al., 1995).

Por outro lado, o antagonismo dos rNMDA em várias estruturas do SNC, incluindo a SCPdl, induz efeitos ansiolíticos em diferentes modelos de ansiedade (GUIMARAES et al., 1991; JARDIM et al., 2005; JARDIM; GUIMARAES, 2004; MOLCHANOV; GUIMARAES, 2002; RESSTEL; CORREA; GUIMARAES, 2008), sugerindo a participação desses receptores na elaboração das respostas defensivas.

Nesse sentido, estudos que empregam modelos experimentais com relevâncias mais etológicas como, por exemplo, a exposição ao predador ou ao seu odor, observaram que a administração sistêmica do antagonista de rNMDA, MK801, atenuou os efeitos comportamentais induzidos pela exposição ao gato (BLANCHARD et al., 1992). Este efeito também foi observado após a administração por via intacerebroventricular (i.c.v.) de outro antagonista do rNMDA, o AP7 (BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006). Além disso, a administração sistêmica de antagonistas do rNMDA bloqueou as mudanças comportamentais desencadeadas pelo estresse de exposição ao predador no modelo do LCE (ADAMEC et al., 1999; BLUNDELL; ADAMEC; BURTON, 2005). Em conjunto, esses trabalhos reforçam a idéia do envolvimento dos rNMDA na elaboração das respostas defensivas, porém ainda não está claro se o bloqueio destes receptores em regiões específicas relacionadas com o comportamento defensivo como, a SCPdl, também produzirá efeitos antiaversivos no modelo de exposição ao predador.

Além da SCPdl, o PMd é uma das regiões mais responsivas durante a exposição ao predador (CANTERAS et al., 2008) e lesões excitotóxicas deste núcleo abolem as respostas defensivas observadas pela exposição ao predador (CANTERAS et al., 1997). Receptores ionotrópicos de glutamato estão presentes no PMd (EYIGOR; CENTERS; JENNES, 2001), porém pouco foi estudado sobre o papel da neurotransmissão glutamatérgica nesta região. Assim, verificou-se no presente trabalho, a hipótese de que o bloqueio dos rNMDA em regiões específicas, como na SCPdl ou no PMd, atenuaria as reações comportamentais defensivas observadas durante a exposição ao gato.

3.2. Neurotransmissão Nitrérgica:

O óxido nítrico (NO) é um neurotransmissor considerado atípico pelas suas características físico-químicas (GARTHWAITE, 1991). Identificado inicialmente como um fator de relaxamento derivado do endotélio (ERDF), o qual é responsável pelo relaxamento da musculatura lisa vascular induzido pela acetilcolina (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980), teve suas características químicas e biológicas caracterizadas somente alguns anos depois (IGNARRO et al., 1987; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987; PALMER et al., 1988).

O NO é um gás formado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) à partir da L-arginina num processo catalítico que resulta na formação estequiométrica de L-citrulina (BREDT; SNYDER, 1994). A NOS possui três isoformas: a endotelial (eNOS), responsável principalmente por ações cardiovasculares; a induzida (iNOS), encontrada originalmente em macrófagos e envolvida principalmente com processos imunológicos; e a neuronal (nNOS), localizada no SNC (GRIFFITH; STUEHR, 1995). Esta última é uma enzima constitutiva e sintetizada por uma pequena porcentagem de neurônios, e possui atividade dependente de cálcio e magnésio (cátions divalentes), de calmodulina e de co-fator nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH) (ZHANG; SNYDER, 1995). O NADPH doa elétrons a um sítio redutase da NOS e estes são transferidos para outro domínio, o sítio oxigenase, responsável por catalisar uma reação entre arginina e oxigênio, formando o NO e a citrulina (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

Caracterizada inicialmente como uma enzima citosólica, a nNOS pode encontrar-se ligada à membrana plasmática. Esta ligação ocorre provavelmente devido à presença de um domínio PDZ da nNOS, o qual se liga ao domínio PDZ de uma proteína de membrana, como a proteína intracitoplasmática de densidade pós-sináptica (PSD) 95, presente nos complexos rNMDA (BRENMAN et al., 1996). A PSD 95 é uma proteína associada à membrana que possui

três domínios PDZ. O primeiro e o segundo domínio ligam-se à extremidade terminal COOH das subunidades dos rNMDA (TOMITA; NICOLL; BREDT, 2001), enquanto que o terceiro domínio liga-se com o domínio PDZ da nNOS na terminação NH₂ (BRENMAN et al., 1996). Aparentemente, o agrupamento PDZ-PSD-95 confere maior eficácia para a ativação da nNOS decorrente do estímulo do rNMDA, pois ela estaria diretamente exposta ao influxo de cálcio decorrente da ativação desses receptores. De fato, Bredt e Snyder (1989) demonstraram que a ativação dos rNMDA pelo glutamato promoveu um aumento substancial na atividade da NOS em fatias de encéfalo (BREDT; SNYDER, 1989).

O NO possui diversas vias de sinalização, sendo que a principal no SNC ocorre através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), onde o NO se liga a um agrupamento heme. Esta enzima converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofostato cíclico, o GMPc (SNYDER; FERRIS, 2000). O aumento de GMPc induzido pelo NO ativa muitas moléculas efetoras como, por exemplo, proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG) e canais iônicos (FRIEBE; KOESLING, 2003). O término da ação do GMPc é realizado por enzimas fosfodiesterases (PDE) que catalisam a hidrólise do GMPc em GMP (BEAVO, 1995).

Por ser um gás, a identificação de estruturas onde o NO estaria presente no SNC foi realizada de forma indireta, através da marcação para sua enzima de síntese. Bredt, Hwang e Snyder (1990), por meio de ensaios de imunistoquímica para nNOS em encéfalos de ratos, demonstraram uma ampla distribuição no SNC como, por exemplo, cerebelo, SCP, colículos superior e inferior, giro denteado do hipocampo, BNST, camadas superficiais do córtex cerebral e bulbo olfatório (BREDT; HWANG; SNYDER, 1990).

A ampla distribuição da nNOS nas estruturas relacionadas com o comportamento de defesa, acrescido do fato de que ela está presente de forma significativa na SCPdl de modo a delimitá-la morfológicamente (ONSTOTT; MAYER; BEITZ, 1993), levou à hipótese de que o

NO poderia ter um papel em comportamentos relacionados à ansiedade. Neste sentido, Guimarães et al (1994) observaram que a administração de inibidores desta enzima intra-SCPdl promoviam efeitos ansiolíticos no LCE (GUIMARAES et al., 1994). Embora existam alguns resultados contraditórios (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARAES, 1997; QUOCK; NGUYEN, 1992), o efeito do tipo ansiolítico dos inibidores da NOS, também foi observado após a administração sistêmica (DUNN et al., 1998; EROGLU; CAGLAYAN, 1997; FARIA et al., 1997; VOLKE et al., 1995; WILEY; CRISTELLO; BALSTER, 1995), sugerindo que, de maneira semelhante ao glutamato, o NO facilite as respostas relacionadas à ansiedade.

Além de drogas que inibem a síntese de NO, inibidores da GC e inibidores de PDE promoveram, respectivamente, efeitos ansiolíticos em ratos e ansiogênicos em camundongos no LCE (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARAES, 2001; GUIMARAES et al., 2005; KURT et al., 2004; VOLKE; WEGENER; VASAR, 2003), sugerindo que o GMPc possa ser o mediador pelo qual o NO estaria facilitando as respostas relacionadas com ansiedade. Recentemente, efeitos do tipo ansiolíticos com inibidores da NOS também foram descritos em outras regiões do SNC que estão relacionadas com as respostas de medo e ansiedade como, por exemplo, o CPF, hipocampo ventral, amígdala medial (AmMe) e núcleo dorsal da rafe (FORESTIERO et al., 2006; RESSTEL; CORREA, 2006; SPIACCI et al., 2008; SPOLIDORIO et al., 2007).

De maneira oposta, a injeção de doadores de NO na SCPdl produz reações de fuga e ativação de áreas relacionadas à ansiedade (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARAES, 2001; DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARAES, 2000). Estes efeitos também foram observados após a administração intra-SCPdl de um análogo do GMPc, o 8-Bromo-cGMP (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARAES, 2001). Adicionalmente, a exposição a eventos aversivos, como o estresse de restrição, promoveu um aumento da expressão do RNA mensageiro e da proteína da nNOS

em regiões relacionadas com a elaboração de respostas defensivas (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARAES, 2001; DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARAES, 2000).

Com relação à exposição ao predador, observou-se que a exposição ao gato produziu aumento da atividade da NOS e aumento de GMPc na SCPdl (CHIAVEGATTO; SCAVONE; CANTERAS, 1998), sugerindo que este neurotransmissor também seja importante para a modulação de respostas defensivas. Além disso, a exposição ao gato induziu a ativação de células NADPH-diaforase (NADPH-d) positivas na SCPdl e no PMd (BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006), técnica histoquímica que é aceita na literatura para identificar a presença de NOS (VINCENT; KIMURA, 1992). Dessa forma, como o PMd e a SCPdl desempenham um papel fundamental na mediação de respostas defensivas a eventos ameaçadores proximais e inatos (BLANCHARD et al., 2003; CANTERAS, 2003, 2002; CAROBREZ; TEIXEIRA; GRAEFF, 2001; GUIMARAES et al., 2005; MCNAUGHTON; CORR, 2004; SEWARDS; SEWARDS, 2002), testou-se também a hipótese de que a inibição da NOS nestas estruturas produziria efeitos antiaversivos no modelo de exposição ao predador.

Considerando-se que o NO e o glutamato parecem participar na regulação dos estados emocionais relacionados com medo e ansiedade, e a estreita relação existente entre a ativação dos receptores NMDA e a síntese de NO, seria possível prever a existência de um mecanismo regulatório recíproco entre o NO e o glutamato, através da ativação desses receptores na modulação de respostas defensivas mediadas pela SCPdl. Considerando-se essa possibilidade, resultados anteriores de nosso laboratório demonstraram que o pré-tratamento com AP7 bloqueou as respostas defensivas observadas após a injeção de um doador de NO quando injetados na SCPdl (MOREIRA; MOLCHANOV; GUIMARAES, 2004), porém o pré-tratamento com drogas que interferem com a neurotransmissão nitrérgica não bloquearam as respostas de fuga induzidas pelo agonista de receptores NMDA (AGUIAR; MOREIRA; GUIMARAES, 2006). Em conjunto,

esses dados sugerem que o NO exerce um papel modulatório sobre as reações de defesa, possivelmente facilitando a neurotransmissão glutamatérgica.

Neste sentido, dados de nosso laboratório demonstraram que a administração i.c.v. de AP-7, além de promover efeitos antiaversivos no modelo de exposição ao gato, também reduziu a porcentagem de neurônios nitrérgicos ativados neste modelo em regiões como a SCPdl e no PMd (BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006). Por fim, iremos verificar também se o bloqueio dos rNMDA ou da NOS na SCPdl, irá atenuar a ativação neuronal como também reduzir a ativação de células NOS positivas observadas após a exposição ao predador, em áreas relacionadas com o comportamento defensivo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Estender as investigações do envolvimento das neurotransmissões mediadas por NO ou rNMDA de glutamato na SCPdl e investigar o envolvimento dessas neurotransmissões no PMd em reações defensivas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a hipótese de que o tratamento com os inibidores da NOS, 7 nitroindazole (7-NI) e N-propyl- ω -L-arginina (NP), intra-SCPdl poderia reduzir as reações comportamentais defensivas após a exposição a um evento ameaçador inato, um gato.
- Testar a hipótese de que o tratamento com AP-7 (antagonista de receptores NMDA) ou NP, intra-SCPdl poderia diminuir as reações comportamentais defensivas, além do número de células ativadas, como também a ativação de neurônios NOSn positivos em regiões relacionadas com o comportamento defensivo após a exposição ao gato.
- Testar a hipótese de que o tratamento com AP-7 ou NP intra-PMd atenuaria as reações comportamentais defensivas após a exposição ao gato.

Materiais e Métodos

1. Animais

Foram utilizados:

- Ratos Wistar machos, 230-290 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Farmácia da USP-Ribeirão Preto.
- Gato macho adulto (3-5 Kg), proveniente do Biotério Central da USP-Ribeirão Preto.

Os ratos foram mantidos em grupos de 5 animais por gaiola, com livre acesso à água e comida, em biotério do Laboratório de Farmacologia do Comportamento coordenado pelo Prof. Dr. Hélio Zangrossi Jr., sob ciclo claro-escuro de 12 h (início às 7:00 h) e temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Os ratos submetidos à cirurgia estereotáxica foram mantidos aos pares.

2. Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- Ácido 2-amino-7-fosfoheptanócio (AP-7, RBI): 2 nmol/0,2 μl (dose retirada de Molchanov e Guimarães, 2002), dissolvido em salina 0,9 % estéril.
- 7 Nitroindazole (7-NI, Sigma): 100 e 200 nmol/0,2 μl (doses retiradas de Joca e Guimarães, 2006), dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO-100%)
- N-propyl- ω -L-arginina (NP, TOCRIS): 1, 10 ou 100 nmol/0,2 μl (RESSTEL; CORREA, 2006), dissolvido em salina 0,9 % estéril.
- Pentilenotretazol (PTZ, Sigma): 55 mg/Kg. Esta droga foi utilizada como controle positivo para os ensaios de imunistoquímica para c-Fos, dissolvida em salina 0,9 % estéril.

3. Cirurgia Estereotáxica

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol 2,5 % (10 mL/Kg, i.p.) e fixados a um aparelho estereotáxico (David-Kopff). Uma cânula (11 mm), dirigida para SCPdl (coordenadas: AP-lambda 0 mm, L-1,9 mm, P-4 mm, ângulo-16°) (PAXINOS; WATSON, 1997), ou uma cânula (14 mm) dirigida para o PMd (coordenadas: AP-bregma -3,9 mm, L -0,6 mm, P -8,2 mm, Paxinos e Watson, 1997), foi fixada ao crânio com cimento acrílico, conforme descrito em trabalhos prévios (Guimarães *et al.*, 1991). Após a recuperação da anestesia, os animais foram alojados no biotério até seu restabelecimento (5-7 dias).

4. Caixa de Exposição ao Gato

Caixa de acrílico (100 x 22 x 35 cm) dividida em dois compartimentos por uma grade metálica (1 cm de distância entre as barras de metal). O compartimento onde o rato foi colocado é subdividido ao meio por uma linha imaginária (via o software Ethovision, ver abaixo), de forma que foi possível delimitar a área próxima ao compartimento do gato e a área distante do compartimento do predador.

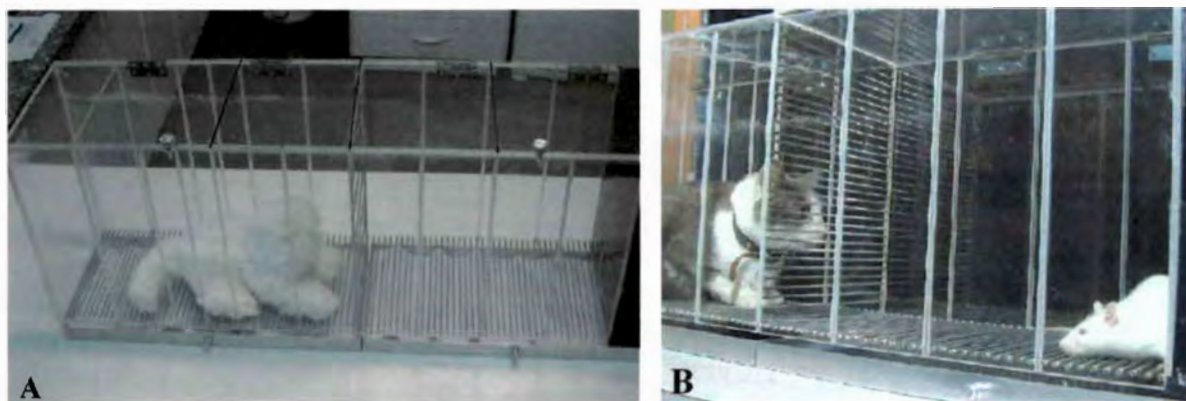


Figura 1: A - Caixa de exposição com o brinquedo e B - Rato exposto ao predador (gato) no compartimento longe do gato.

5. Procedimento Experimental

5.1. Manipulação

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: expostos ao gato e expostos a um gato de brinquedo. Nos três dias que antecederam o teste, uma vez ao dia, os animais foram habituados ao aparato por 10 minutos. Nos experimentos que envolviam posterior análise histoquímica, os animais foram divididos em três grupos experimentais: expostos ao gato, expostos a um gato de brinquedo e grupo ingênuo (naive), sendo que os animais expostos à caixa foram operados e manipulados pelo experimentador durante 5 minutos, uma vez ao dia, nos três dias que antecederam o teste. Tal procedimento consistiu em colocar os animais na mesma caixa onde receberam posteriormente a microinjeção e manipulá-los. Após o período de manipulação os animais foram habituados ao aparato por 10 minutos. O objetivo da manipulação foi diminuir a expressão de c-Fos induzida por esse procedimento. O grupo naive permaneceu em sua caixa até a perfusão.

5.2. Microinjeção

Antes de serem expostos à caixa do gato, os animais receberam uma microinjeção intra-SCPdl ou intra-PMd de salina ou de droga através de uma microagulha introduzida na cânula-guia. A microagulha estava conectada a uma microseringa Hamilton de 10 μ l por meio de um tubo de polietileno. A microinjeção foi realizada com auxílio de uma bomba de infusão (Kd Scientific, Boston, USA) em tempo e volume constantes a 0.2 μ l/30seg. A agulha permaneceu na posição de injeção durante os 30 segundos subseqüentes, para evitar o refluxo da solução. Após a injeção, os animais permaneceram em uma caixa individual por 10 minutos antes da sessão experimental.

5.3. Exposição na Caixa

No dia do experimento, o grupo exposto ao brinquedo foi colocado em um dos compartimentos da caixa e o gato de brinquedo em outro por 10 min. O grupo exposto ao gato foi colocado nas mesmas condições. O grupo naive permaneceu em sua caixa até a perfusão. Os experimentos foram filmados, posteriormente analisados pelo experimentador e com auxílio do software Ethovision (versão 1.9).

5.4 Grupos Experimentais:

Experimento 1: Efeito do tratamento com inibidores da NOSn intra-SCPdl em ratos expostos a um gato.

- Experimento 1 A:

Grupos experimentais:

- DMSO + brinquedo (0,2 μ L;n= 6)
- DMSO + gato (0,2 μ L;n=5)
- 7 NI + gato (100 ou 200 nmol/0,2 μ L;n=5)

- Experimento 1 B:

Grupos experimentais:

- sal + brinquedo (0,2 μ L; n= 5)
- sal + gato (0,2 μ L;n=5)
- NP + gato (1,10 ou 100 nmol/0,2 μ L;n=3-5)

Experimento 2: Efeito do tratamento com AP-7 intra-SCPdl sobre as respostas comportamentais e a dupla marcação Fos+NOSn em diferentes regiões encefálicas de ratos expostos a um gato.

Grupos experimentais:

- Salina + brinquedo (0,2 μ L;n= 9)
- AP-7 + brinquedo (2 nmol/0,2 μ L;n=10)
- Salina + gato (0,2 μ L;n=9)
- AP-7 + gato (2nmol/0,2 μ L;n=9)
- Naive (n=8)

Experimento 3: Efeito do tratamento com N-propyl-l-arginina intra-SCPdl sobre as respostas comportamentais e a dupla marcação Fos + NOSn em diferentes regiões encefálicas de ratos expostos a um gato.

Grupos experimentais:

- Salina + brinquedo (0,2 μ L;n= 4)
- NP + brinquedo (100 nmol/0,2 μ L;n=4)
- Salina + gato (0,2 μ L;n=5)
- NP + gato (100 nmol/0,2 μ L;n=6)
- Naive (n=6)

Experimento 4: Efeito do tratamento com AP-7 ou NP intra-PMd em ratos expostos a um gato.

- Experimento 4 A:

Grupos Experimentais:

- sal + brinquedo (0,2 μ L; n= 5)
- AP-7 + brinquedo (2 nmol/0,2 μ L; n= 6)
- sal + gato (0,2 μ L;n=5)
- AP-7 + gato (2 nmol/0,2 μ L;n=5)

- Experimento 4 B:

Grupos experimentais:

- Salina + brinquedo (0,2 μ L;n= 4)
- NP + brinquedo (100 nmol/0,2 μ L;n=7)
- Salina + gato (0,2 μ L;n=4)
- NP + gato (100 nmol/0,2 μ L;n=4)

6. Histologia

Ao término dos testes comportamentais dos experimentos 1 e 4, verificou-se o local da microinjeção. Os animais foram anestesiados com Uretana 25% (5ml/Kg) e sofreram perfusão intracardíaca com salina 0,9% e formol 10%. Os encéfalos foram removidos, estocados em formol 10% por 3 a 7 dias, e cortados ao nível do sítio de injeção, em secções de 50 μ m de espessura. Os cortes eram montados em lâminas de vidro gelatinizadas e eram analisadas para verificação do local da injeção com o auxílio de um microscópio (Olympus BX50), segundo os diagramas do Atlas Paxinos e Watson, 1997.

7. Histoquímica

Duas horas após o término da exposição ao gato, os animais pertencentes aos experimentos 2 e 3, foram anestesiados intraperitonealmente com Uretana (25%, 5 ml/Kg de peso) e perfundidos transcardiacamente com salina e paraformaldeído 4% fosfatado e tamponado em PBS 0,1 M, pH 7,4. Os encéfalos foram removidos e processados conforme procedimento descrito por De Oliveira (2001), com o objetivo de se obterem cortes representativos (apenas nos animais em que a cânula estava devidamente implantada na SCPdl), em duplicata, contendo as seguintes regiões: córtex cingulado (Cgl), pré-límbico (PrL) e infra-límbico (IL) do CPF medial (CPFm), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN; parvocelular PVNp, magnocelular PVNm), AmMe, PMd e SCPdl.

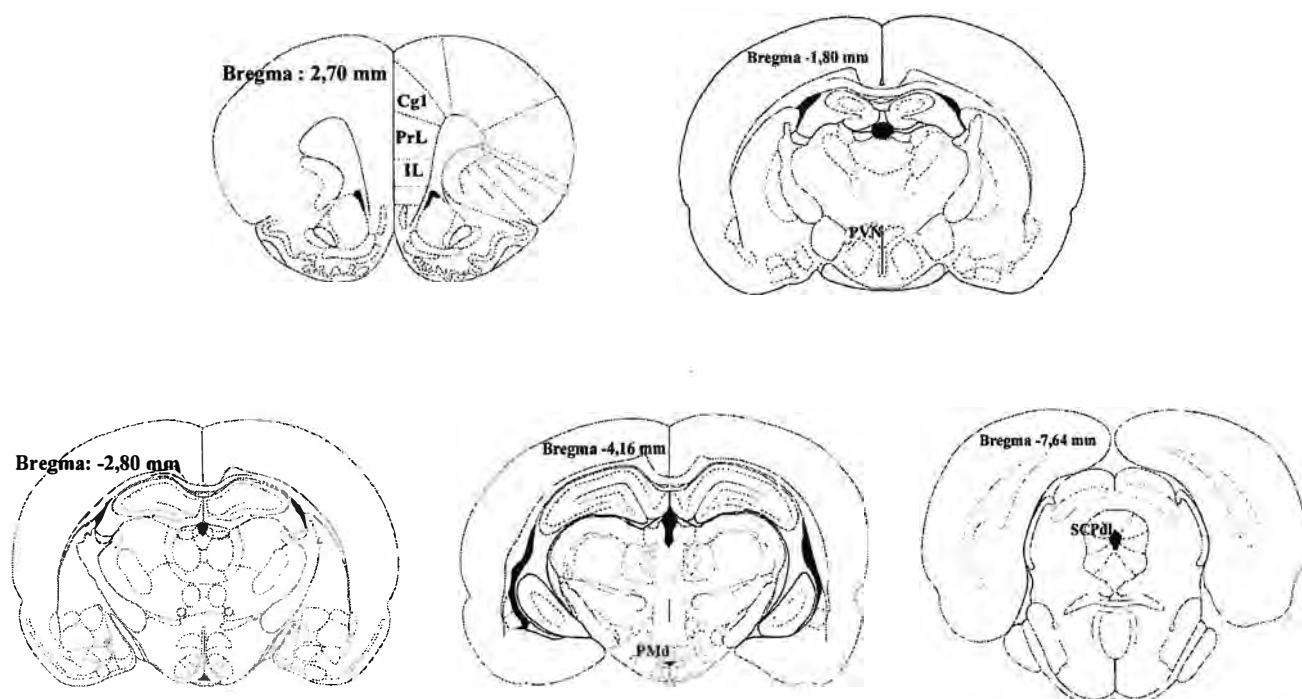


Figura 2: Diagrama do plano representativo das estruturas quantificadas (modificado de Paxinos e Watson, 1997)

As secções foram, então, submetidas aos ensaios para dupla marcação de acordo com a técnica empregada por De Oliveira (2001): 1. imunistoquímica para detecção da proteína Fos e, 2. no dia seguinte, a imunistoquímica para detecção da enzima NOSn.

- **Imunistoquímica para detecção da proteína Fos**

As secções foram inicialmente pré-tratadas com H₂O₂ 1% em TBS 0,05M durante 10 minutos, para redução da atividade da peroxidase endógena. Após 4 lavagens de 5 minutos cada, em TBS 0,05M (pH 7,4) as secções foram incubadas com soro albumina bovina (BSA) 1% em TBS 0,05M acrescido de Triton-X 0,02% (TBS-T), durante 20 minutos, para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas. Em seguida, as secções foram incubadas com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-Fos (1:1000, Santa Cruz Biotechnology). Após 15 h de incubação à temperatura ambiente, as secções foram novamente lavadas em TBS 0,05M (3 x 10 minutos) antes de serem incubadas com o anticorpo secundário biotilado (1:1000) por mais 1 hora. Os anticorpos foram diluídos em TBS-T + BSA, e todas as incubações realizadas à temperatura ambiente com agitação constante. Uma vez removido o anticorpo secundário, através de sucessivas lavagens em TBS 0,05M (3 x 5 minutos), as secções foram incubadas com o complexo ABC avidina-biotina-peroxidase (1:1500, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories), por 1 hora. A atividade da peroxidase foi revelada usando o tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (DAB) contendo H₂O₂ 0,02% e sulfato de níquel hexahidratado a 1%.

- **Imunistoquímica para detecção da enzima NOSn**

As secções foram incubadas com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-NOS 1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology). Após 15 h de incubação à temperatura ambiente, as secções

foram novamente lavadas em TBS 0,05M (3 x 10 minutos) antes de serem incubadas com o anticorpo secundário biotilado (1:1000) por mais 1 hora. Os anticorpos foram diluídos em TBS-T + BSA, e todas as incubações realizadas à temperatura ambiente com agitação constante. Uma vez removido o anticorpo secundário, através de sucessivas lavagens em TBS 0,05M (3 x 5 minutos), as secções foram incubadas com o complexo ABC avidina-biotina-peroxidase (1:1500, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories), por 1 hora. A atividade da peroxidase foi revelada usando o tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (DAB) contendo H₂O₂ 0,02%. Finalmente, após adequadamente lavadas, as lâminas foram distendidas em lâminas previamente gelatinizadas. Em seguida, as Lâminas foram desidratadas através de uma série de álcoois (70%, 80%, 95% e 100%, 5 minutos cada), clareadas no xilol (2 x 10 minutos) e cobertas com Permount e lamínulas.

8. Análise dos Resultados

Avaliação Comportamental

O comportamento dos animais foi gravado por uma câmera de vídeo localizada lateralmente à caixa, a uma distância aproximada de 50 cm; os vídeos foram analisados posteriormente pelo experimentador com o auxílio de um cronômetro, para determinar o tempo que o animal permanecia imóvel durante a exposição (tempo de imobilidade). O experimentador estava cego em relação aos tratamentos dos animais. Os experimentos também foram gravados por uma câmera de vídeo montada verticalmente em relação à caixa do gato. Posteriormente os vídeos dos experimentos foram analisados através do software Ethovision (versão 1.9, Noldus) e registrou-se o tempo de permanência e a distância percorrida pelo rato nos arredores do gato.

Quantificação

A imunorreatividade para Fos (Fos-IR) foi visualizada como um produto preto depositado no interior dos núcleos neuroniais. A imunorreatividade para a NOSn foi identificada por

coloração marrom no citoplasma, sendo os resultados expressos como a média de neurônios/secção/estrutura/ $0,1\text{mm}^2$ e como a porcentagem de neurônios duplamente marcados em relação ao número de neurônios NOSn positivos. A contagem e o cálculo foram realizados da maneira descrita por (BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006). O número de células apresentando Fos-IR e NOSn foi obtido de ambos os lados do cérebro, em toda a extensão da estrutura, para cada animal e para cada tratamento. A contagem, embora realizada com o auxílio de um sistema computadorizado de análise de imagem (Image Pro-Plus 4.0, Media Cybernetics), foi feita manualmente marcando-se os neurônios positivos para c-Fos e NOSn, bem como aqueles com dupla-marcação. O avaliador estava cego em relação aos grupos experimentais.

A localização antero-posterior (AP) da região analisada considerando o bregma como ponto zero foi a seguinte: CPF - AP: 2,70 mm, PVN - AP: -1,80 mm, AmMe - AP: -2,80 mm, PMd - AP: -4,16 mm, SCPdl - AP: -7,04 mm.

Análise Estatística

Os resultados foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M). O nível de significância foi $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada por meio do software SPSS para Windows (versão 6.0). Foi realizado o teste de Levene para verificar a homogeneidade de variâncias. Sempre que não houve homogeneidade de variâncias, a variável em questão passou por transformação logarítmica ($\log_{10}(\text{variável} + 1)$) a fim de que tal homogeneidade fosse alcançada, e re-submetida à análise estatística. Quando não houve homogeneidade entre os grupos, os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney. Cada experimento foi analisado de acordo com suas características, como descrito a seguir:

Experimento 1: Os resultados comportamentais foram comparados por Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Duncan quando apropriado.

Experimento 2: Os resultados comportamentais foram comparados por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de Duncan quando apropriado. Os fatores foram a exposição ao gato e o tratamento. Os resultados de histoquímica foram analisados por ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan quando apropriado. Nessa análise, cada grupo foi considerado como um tratamento diferente. Embora existissem dois fatores distintos (exposição ao gato e tratamento), o grupo naive não se enquadrava em nenhum dos fatores, limitando a utilização da ANOVA de duas vias.

Experimento 3: Os resultados referente a esse experimento foram analisados como descrito no experimento 2.

Experimento 4: Os resultados comportamentais do experimento 4 A foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan quando apropriado. Os resultados do experimento 4B foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney U quando apropriado. Nessa análise, cada grupo foi considerado como um tratamento diferente. Embora existissem dois fatores diferentes (exposição ao gato e droga), outro fator que limita a ANOVA de duas vias é o número reduzido de animais por grupo, o que aconteceu nesse experimento.

Experimento 1: Efeito do tratamento com inibidores da NOSn intra-SCPdl em ratos expostos a um gato.

Os animais expostos ao gato apresentaram reações defensivas como fuga inicial (análise qualitativa) seguida de congelamento. No experimento 1 A, os animais que receberam veículo e foram expostos ao gato permaneceram um tempo menor no compartimento próximo ao gato quando comparados aos seus respectivos controles (experimento 1 A $F_{(3,20)} = 4,7530$; $p < 0,05$ – Figura 3), não ocorrendo diferenças significativas entre os grupos com relação à distância percorrida pelos animais neste compartimento. No experimento 1 B, foram encontradas diferenças significativas com relação à distância percorrida no compartimento próximo ao gato, ou seja, os animais expostos ao gato percorreram uma distância menor nesse compartimento em relação aos animais expostos ao gato de brinquedo ($F_{(4,16)} = 6,37$ $p < 0,05$ – Figura 5). Não houve diferenças significativas com relação ao tempo de permanência neste compartimento, embora os animais expostos ao gato apresentem uma redução. Em ambos os experimentos, os animais tiveram um aumento significativo no tempo de imobilidade quando comparados aos animais expostos ao gato de brinquedo (experimento 1 A $F_{(3,20)} = 4,9728$ $p < 0,05$; experimento 1 B $F_{(4,16)} = 6,54$ $p < 0,05$ – Figuras 4 e 6 respectivamente).

Os tratamentos com os inibidores da NOSn, 7 NI e o NP, atenuaram as conseqüências comportamentais promovidas pela exposição ao predador na dose de 100 nmol. Os animais que receberam 7 NI nessa dose permaneceram um tempo significativamente maior no compartimento próximo ao gato quando comparados com os animais que receberam veículo e foram expostos ao gato (Figura 3 – $p < 0,05$; Duncan). Já o tratamento com o NP aumentou significativamente, em relação aos animais expostos ao gato, a distância percorrida pelos animais no compartimento próximo ao gato (Figura 5 – $p < 0,05$; Duncan).

A administração de 7-NI (100 nmol) não reduziu significativamente o tempo de imobilidade dos animais que receberam veículo e foram expostos ao gato, mas não diferiu do grupo DMSO/brinquedo (Figura 4). O tratamento com NP atenuou significativamente a imobilidade dos animais durante a exposição ao gato nas doses de 1 e 100 nmol (Figura 6 – $p < 0,05$; Duncan).

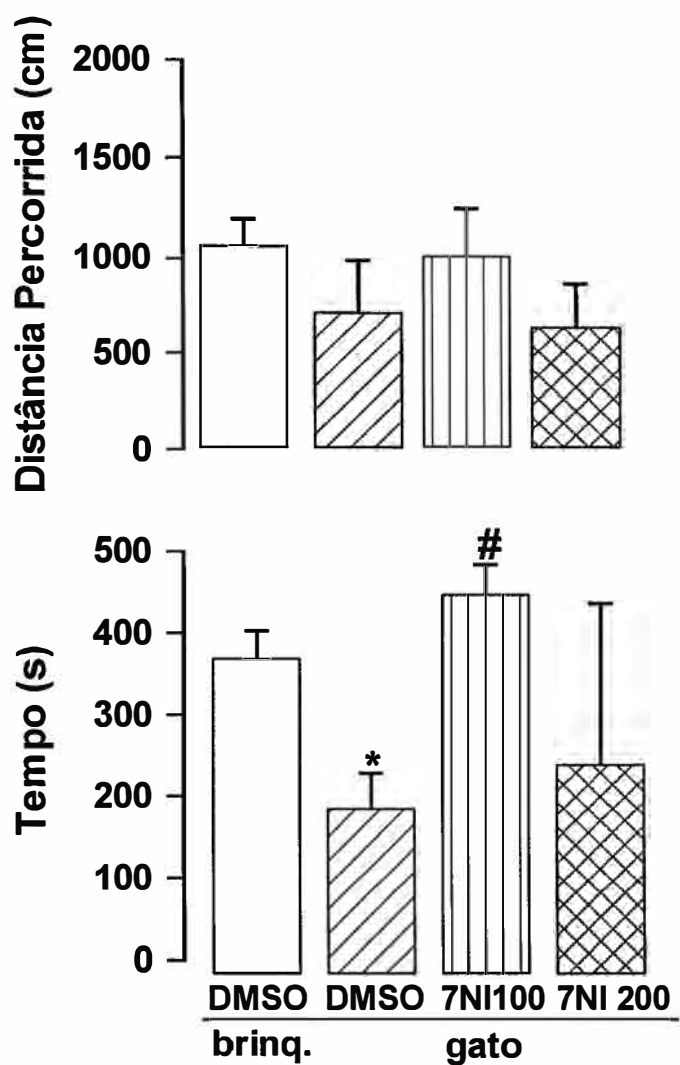


Figura 3: Efeito do 7-NI (100 e 200 nmol/0.2 μ L) intra-SCPdl sobre a distância percorrida (cm) e o tempo (s) de permanência no compartimento próximo ao gato por ratos (n=5-6) expostos ao brinquedo (brinq) ou ao gato. Os valores representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao grupo DMSO brinquedo, # $p < 0,05$ em relação ao grupo DMSO gato (ANOVA de uma via seguida de Duncan).

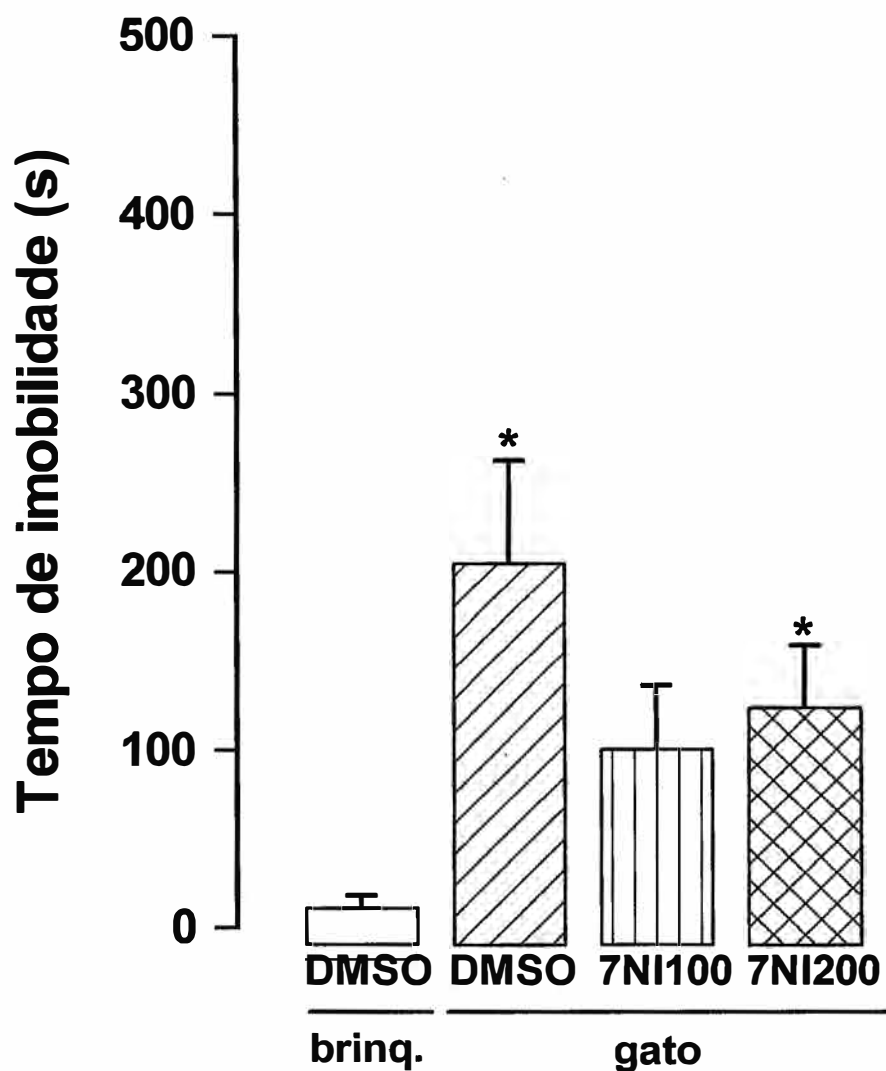


Figura 4: Efeito do 7-NI (100 e 200 nmol/0.2µL) intra-SCPdl sobre o tempo de imobilidade (s) de ratos (n=5-6) expostos ao brinquedo ou ao gato. Os valores representam a média ± E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao grupo DMSO brinquedo (ANOVA de uma via seguida de Duncan).

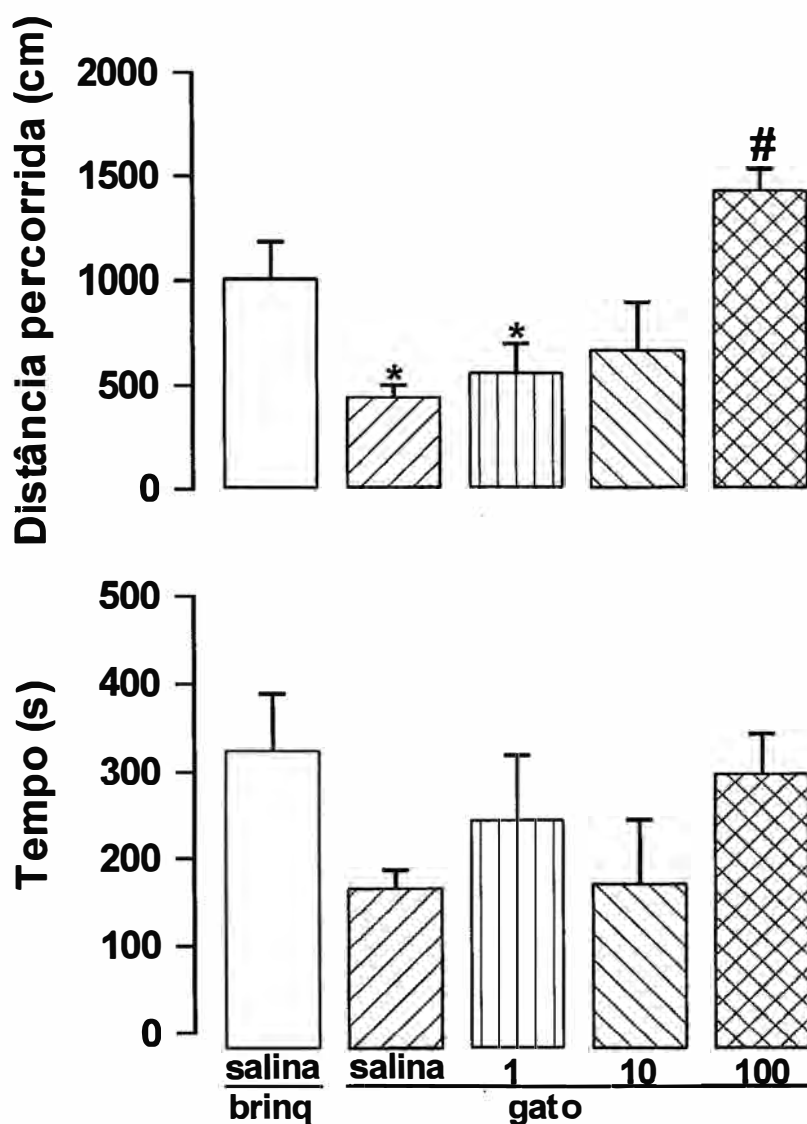


Figura 5: Efeito do NP (1,10 e 100 nmol/0,2 μ L) sobre a distância percorrida (cm) e o tempo de permanência (s) no compartimento próximo ao gato por ratos (n=3-5) expostos ao brinquedo ou ao gato. Os valores representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina brinquedo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina gato (ANOVA de uma via seguida de Duncan).

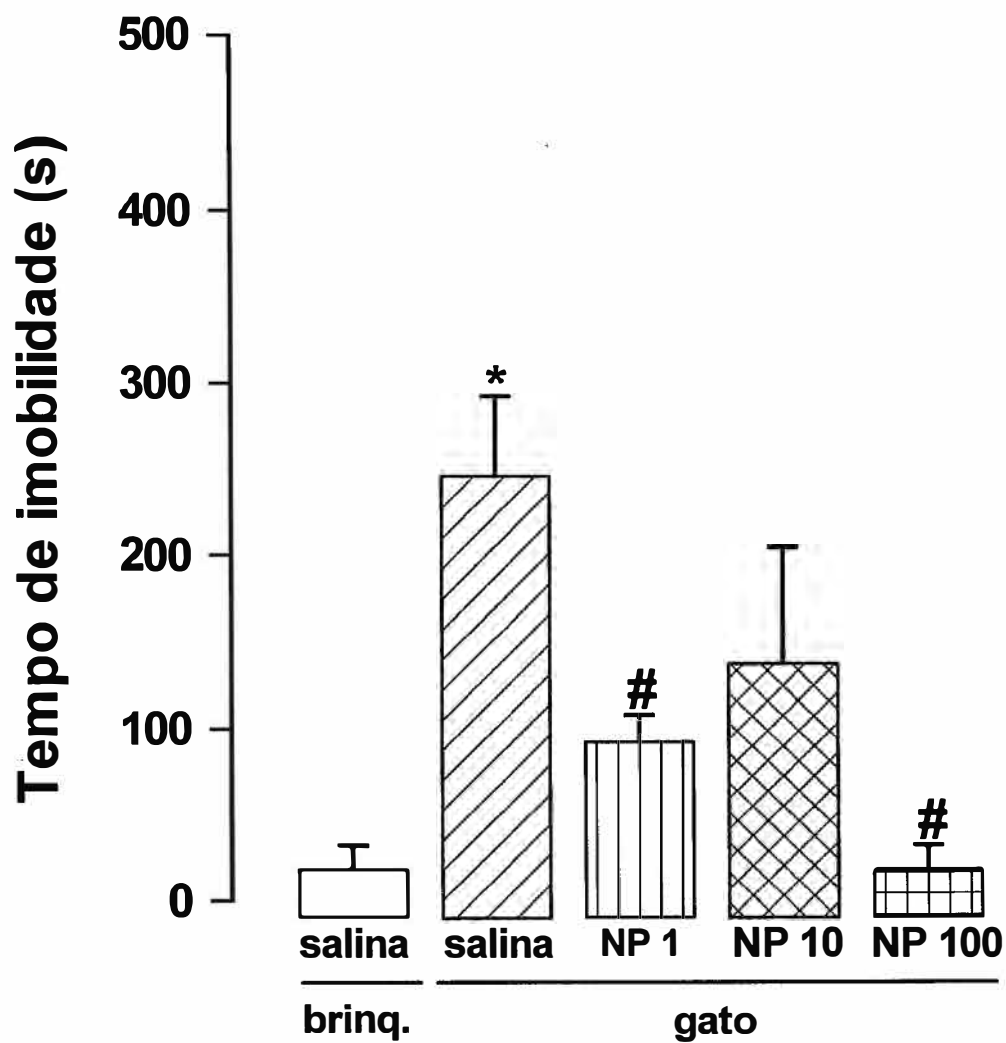


Figura 6: Efeito do NP (1, 10 e 100 nmol) sobre tempo de imobilidade (s) de ratos (n=3-5) expostos ao brinquedo (brinq.) ou ao gato. Os valores representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina brinquedo, # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina gato (ANOVA de uma via seguida de Duncan).

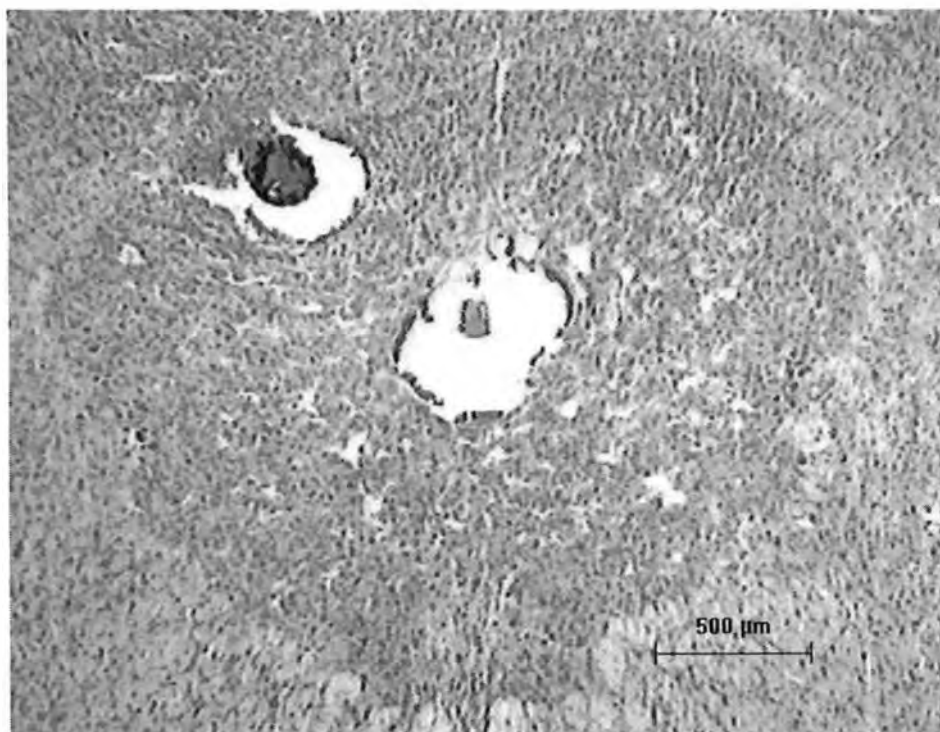


Figura 7: Fotomicrografia representativa do sítio de injeção da SCPdl.

Experimento 2: Efeito do tratamento de AP-7 intra-SCPdl sobre a dupla marcação Fos+NOSn em diferentes regiões encefálicas de ratos expostos a um gato

A exposição ao gato promoveu reações defensivas caracterizadas por redução significativa no tempo de permanência (fator exposição: $F_{(1,33)} = 24,335$; $p < 0,05$; fator droga: $F_{(1,33)} = 8,929$; $p < 0,05$; droga X exposição: $F_{(1,33)} = 5,062$; $p < 0,05$) e na distância percorrida (fator exposição: $F_{(1,33)} = 37,511$; $p < 0,05$; fator droga: $F_{(1,33)} = 11,569$; $p < 0,05$; droga X exposição: $F_{(1,33)} = 5,279$; $p < 0,05$) pelos animais no compartimento próximo ao gato em relação aos animais expostos ao gato de brinquedo (Figura 8). Esses animais apresentaram imobilidade significativamente maior em relação aos animais expostos ao gato de brinquedo (Figura 9 - fator exposição: $F_{(1,32)} = 105,56$; $p < 0,05$; fator droga: $F_{(1,32)} = 5,240$; $p < 0,05$; droga X exposição: $F_{(1,32)} = 4,445$; $p < 0,05$) .

A administração prévia de AP-7 intra-SCPdl, foi capaz de atenuar as respostas comportamentais observadas após a exposição ao predador. Os animais que receberam AP-7 tiveram aumento na distância percorrida e no tempo de permanência no compartimento próximo ao gato, em relação ao grupo salina/gato (Figura 8; $p < 0,05$ Duncan). Além disso, esses animais tiveram um tempo de imobilidade menor quando comparados aos animais que receberam salina e foram expostos ao gato (Figura 9; $p < 0,05$ Duncan).

Considerando-se os dados imunoistoquímicos, a exposição ao gato não alterou o número de células IR-NOS nas estruturas analisadas. Considerando-se o número de células IR-Fos, a exposição ao gato promoveu aumento significativo em relação aos animais naive no lado ipsi (Figura 10 A - $F_{(4,38)} = 5,0619$; $p < 0,05$) e contralateral da SCPdl (Figura 10 B - $F_{(4,38)} = 2,5661$; $p < 0,05$), no PMd (Figura 11 - $F_{(4,17)} = 5,34$; $p < 0,05$) e na porção parvocelular (Figura 12 A - $F_{(4,34)} = 2,38$; $p < 0,1$; Duncan, $p < 0,05$) e magnocelular do PVN (Figura 12 B - $F_{(4,34)} = 1,9931$; $p < 0,1$; Duncan, $p < 0,05$). Os animais expostos ao gato apresentaram aumento das células IR-Fos na

AmMe, porém esse aumento não foi estatisticamente significativo (Tabela 1). Não houve diferenças significativas nas três regiões quantificadas do CPF (Tabela 1).

Na porcentagem de células duplamente marcadas, houve aumento estatisticamente significativo apenas na SCPdl (Figura 11 A - ipsilateral $F_{(4,38)}=2,3361$; $p<0,1$ Duncan, $p<0,05$; B - contralateral $F_{(4,38)}=2,3035$; $p<0,1$; Duncan, $p<0,05$). Houve um aumento na porcentagem de células duplamente marcadas nas duas regiões do PVN (Figura 12).

Não foi possível quantificar de maneira confiável o número de células IR-NOS na AmMe, pois a densidade de fibras nesta estrutura é alta, dificultando a visualização das células. Dessa forma, quantificamos apenas o número das células duplamente marcadas na AmMe (Tabela 1), porém este efeito não foi estatisticamente significativo em relação aos outros grupos.

O tratamento com AP-7 atenuou significativamente a ativação de IR-Fos no lado ipsilateral da SCPdl (Figura 10 A- Duncan, $p<0,05$). Na porção contralateral da SCPdl (Figura 10B), no PVNp e PVNm (Figura 12- A e B), os animais do grupo AP-7/gato tiveram redução (não significativa em relação aos animais expostos ao gato) das células IR-Fos, mas este grupo também não diferiu dos animais naive e expostos ao gato de brinquedo. O AP-7 diminuiu significativamente a porcentagem de células duplamente marcadas após a exposição ao predador no lado ipsilateral (Figura 10 A- Duncan $p<0,05$). Já no lado contralateral da SCPdl (Figura 9B), PVNp e PVNm (Figura 12- A e B) houve uma redução que não foi estatisticamente significativa, mas os animais que receberam AP-7 não diferiram dos animais controles.

Com relação ao PMd, o tratamento com AP-7 intra-SCPdl promoveu um aumento significativo em relação aos animais do grupo salina/gato das células IR-Fos (Figura 11 -Duncan, $p<0,05$) e na porcentagem das células duplamente marcadas (Figura 10 $F_{(4,17)}=4,0975$; $p<0,05$).

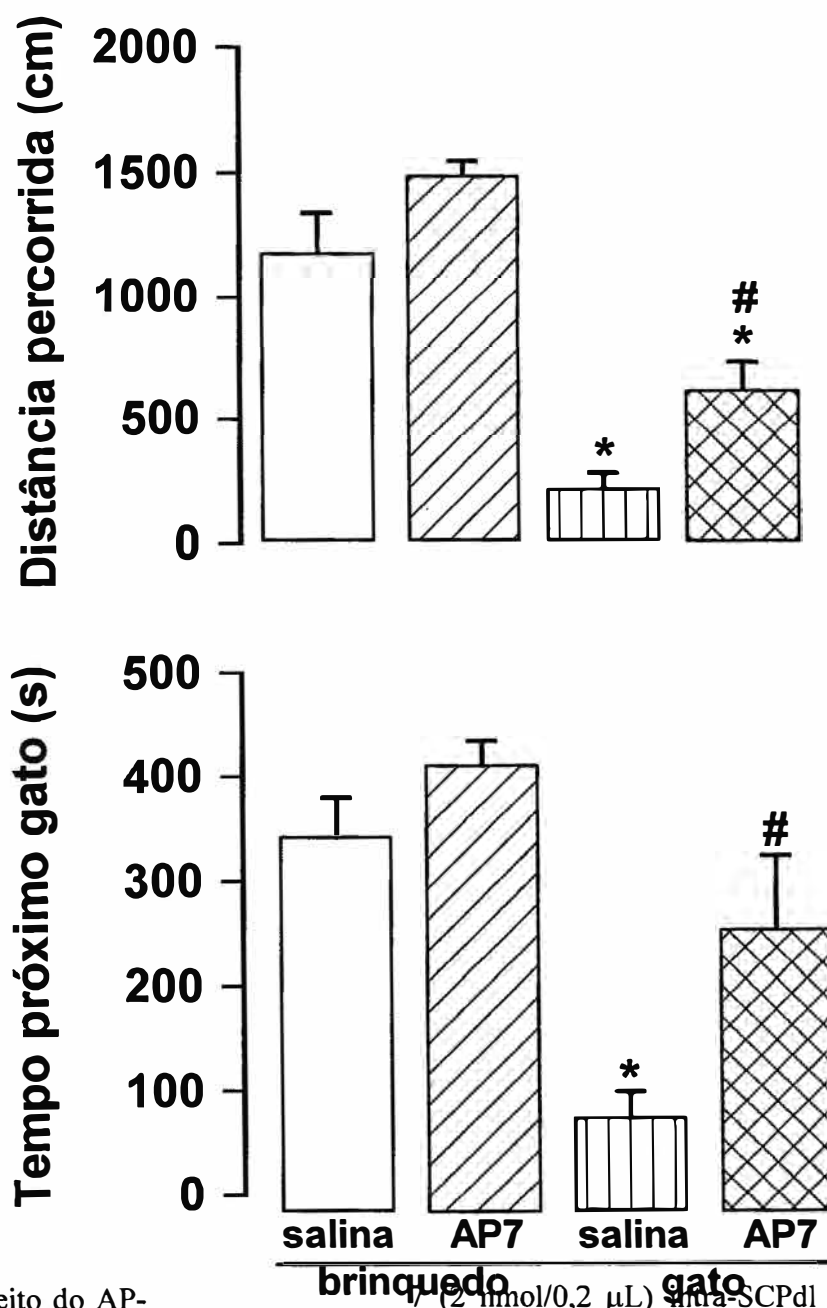


Figura 8: Efeito do AP-7 (2 mmol/0,2 μ L) intra-SCPdl sobre a distância percorrida (cm) e o tempo de permanência (s) no compartimento próximo ao gato por ratos (n=9-10) expostos ao brinquedo ou ao gato. Os valores representam a média \pm E.P.M. * p<0,05 em relação ao grupo salina brinquedo e # p<0,05 em relação ao grupo salina gato (ANOVA de duas vias seguida de Duncan).

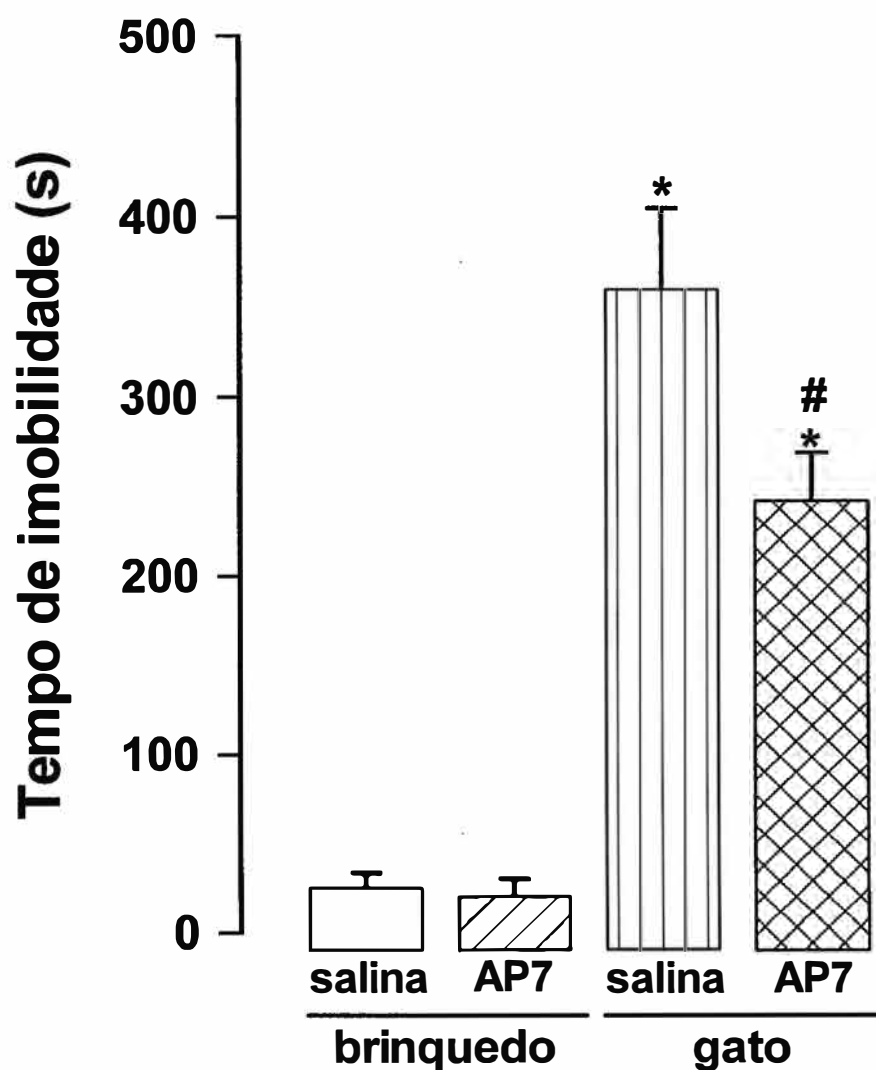


Figura 9: Efeito do AP-7 (2 nmol/0,2 μ L) intra-SCPdl sobre o tempo de imobilidade (s) de ratos (n=9-10) expostos ao brinquedo ou ao gato. Os valores representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina brinquedo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina gato (ANOVA de duas vias seguida de Duncan).

SCPdl

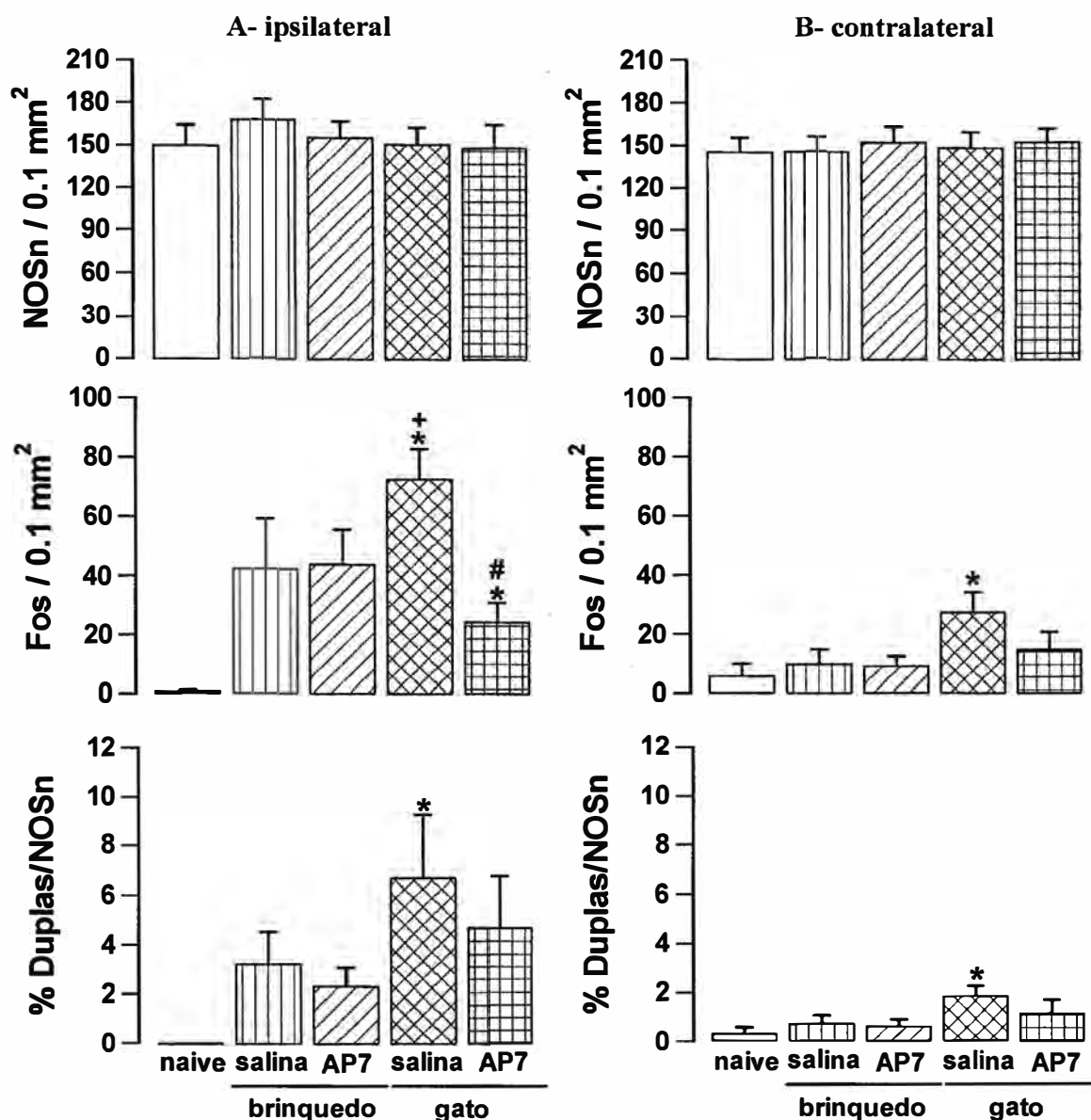


Figura 10 :Efeito do AP-7 (2 nmol/0,2 μ L) em ratos expostos ao brinquedo ou ao gato sobre o número de células NOSn positivas, c-Fos positivas e duplamente marcadas na porção ipsilateral (painel A) e contralateral (painel B) da SCPdl. Os animais naive não foram manipulados e nem expostos à caixa. Os resultados foram representados como a média \pm E.P.M. do número de células positivas e como a percentagem de células duplamente marcadas em relação às células NOSn positivas de 8-9 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao naive; + $p < 0,05$ comparado ao salina/brinquedo; # $p < 0,05$ comparado ao salina/gato (ANOVA seguida de Duncan).

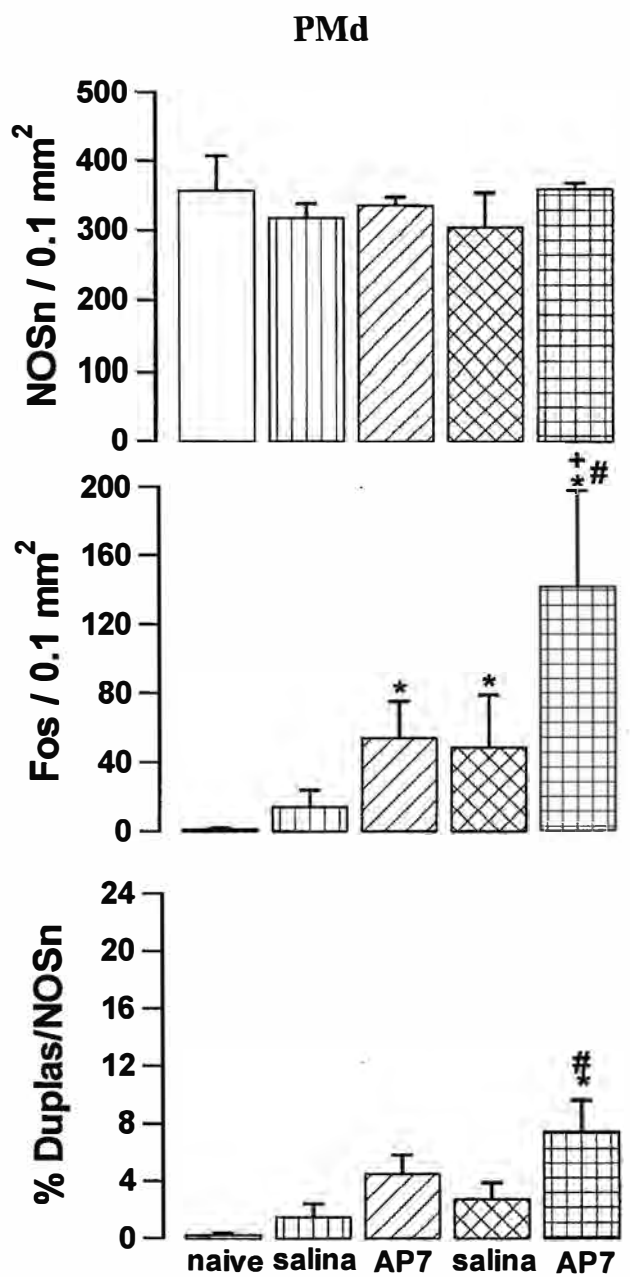


Figura 11: Efeito do AP7 (2 μL) intra-SCPdl em ratos expostos ao brinquedo ou ao gato sobre o número de células NOSn positivas, c-Fos positivas e na percentagem de células duplamente marcadas do PMd. Os resultados foram representados como a média \pm E.P.M. do número de células positivas e como a percentagem de células duplamente marcadas em relação às células NOSn positivas de 4-5 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao naive; + $p < 0,05$ comparado ao salina/brinquedo; # $p < 0,05$ comparado ao salina/gato (ANOVA seguida de Duncan).

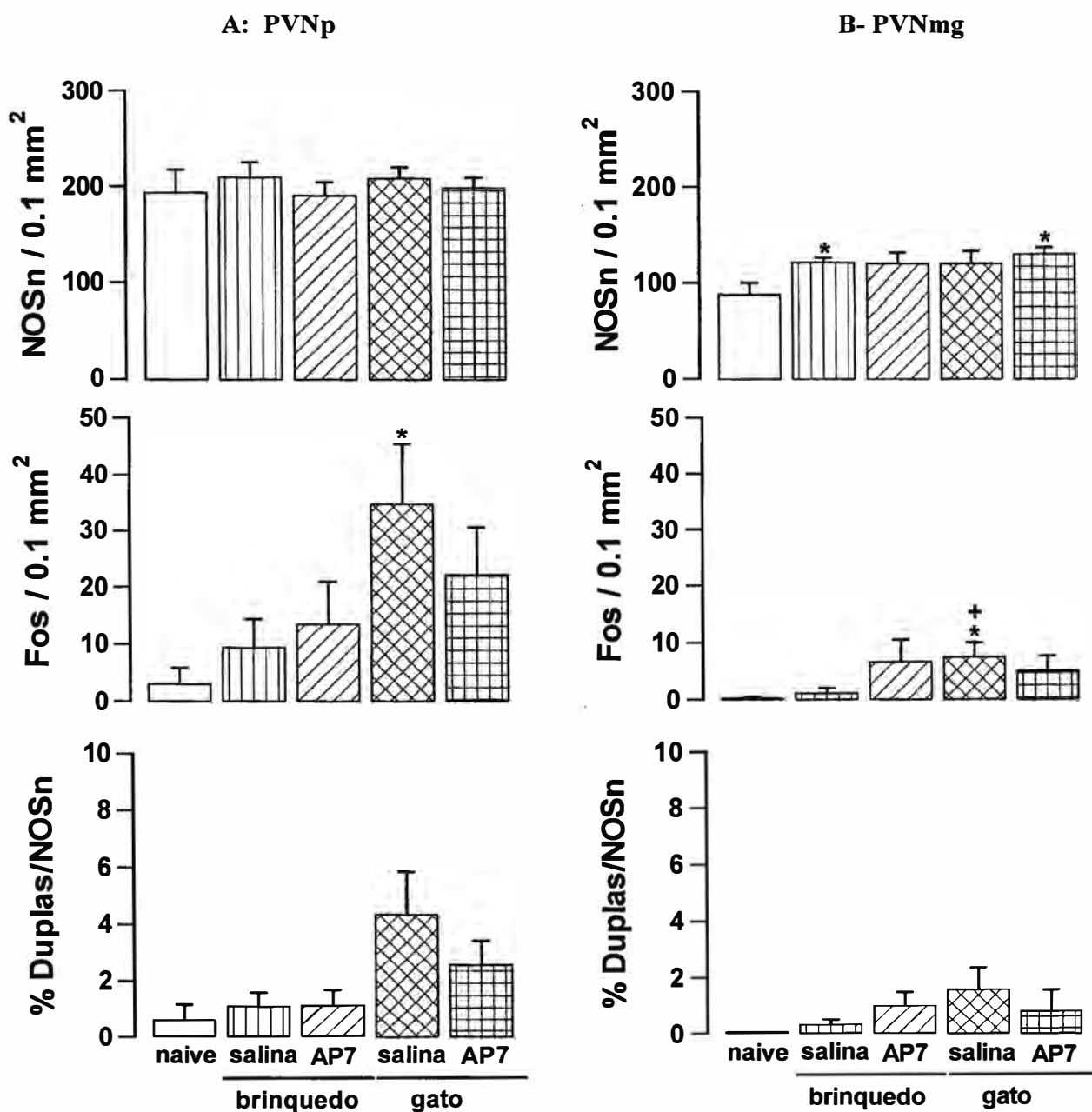


Figura 12: Efeito do AP-7 (2 nmol/0,2 μ L) intra-SCPdl em ratos expostos ao brinquedo ou ao gato sobre o número de células NOSn positivas, c-Fos positivas e na percentagem de células duplamente marcadas do PVNp (painel A) e PVNmg (painel B). Os resultados foram representados como a média \pm E.P.M. do número de células positivas e como a percentagem de células duplamente marcadas em relação às células NOSn positivas de 5-9 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao naive; + $p < 0,05$ comparado ao salina/brinquedo; (ANOVA seguida de Duncan).

Tabela 1: Número de células c-Fos positivas, NOSn positivas, porcentagem e número de células duplamente marcadas nas porções Cg1, IL e PrL do CPF e na AmMe de ratos que receberam tratamento de AP-7 intra-SCPdl e foram expostos ao gato de brinquedo ou ao gato.

	CPF Cg1			CPF IL			CPF PrL			AmMe		
	FOS	NOSn	%duplas	FOS	NOS	%duplas	FOS	NOS	%duplas	FOS	NOS	duplas
naive	0,16 ± 0,11	4,42±1,06	0	1,24 ± 0,84 (6)	5,50±1,17 (6)	0 (6)	0,16 ±0,16 (6)	4,42±1,06 (6)	0	1,56 ± 0,76	n.q	4,12±3,13
sal./brinq.	7,56± 6,15	13,65±6,88	0	2,65 ± 1,70	8,08 ±2,70	0	10,54 ± 6,65	13,65 ± 6,88	0	7,95 ±3,77	n.q	4,48± 2,06
AP-7/brinq.	10,54 ± 6,64	16,62±3,06	0	9,18±4,68	13,65±6,88	0	1,23 ± 0,32	16,62±3,06*	0	11,44±5,79	n.q	4,16± 2,11
sal/gato	1,23± 0,31	10,35±2,53	0	1,23±0,71	7,11±1,82	0	6,95±6,39	10,35±2,53	0	46,50±28,22	n.q.	10,56± 7,2
AP-7/gato	6,95±6,38	10,24±3,02	0	3,88±3,05	6,05±1,70	0	0,16±0,12	10,24±3,02	0	19,88±15,72	n.q	3,15± 1,98

Os resultados foram representados como a média ± E.P.M. do número de células positivas, da porcentagem de células duplamente marcadas em relação às células NOSn positivas e no número de células duplamente marcadas de 5-6 animais/grupo. * p<0,05 comparado ao naive (ANOVA seguida de Duncan). n.q. = não quantificado

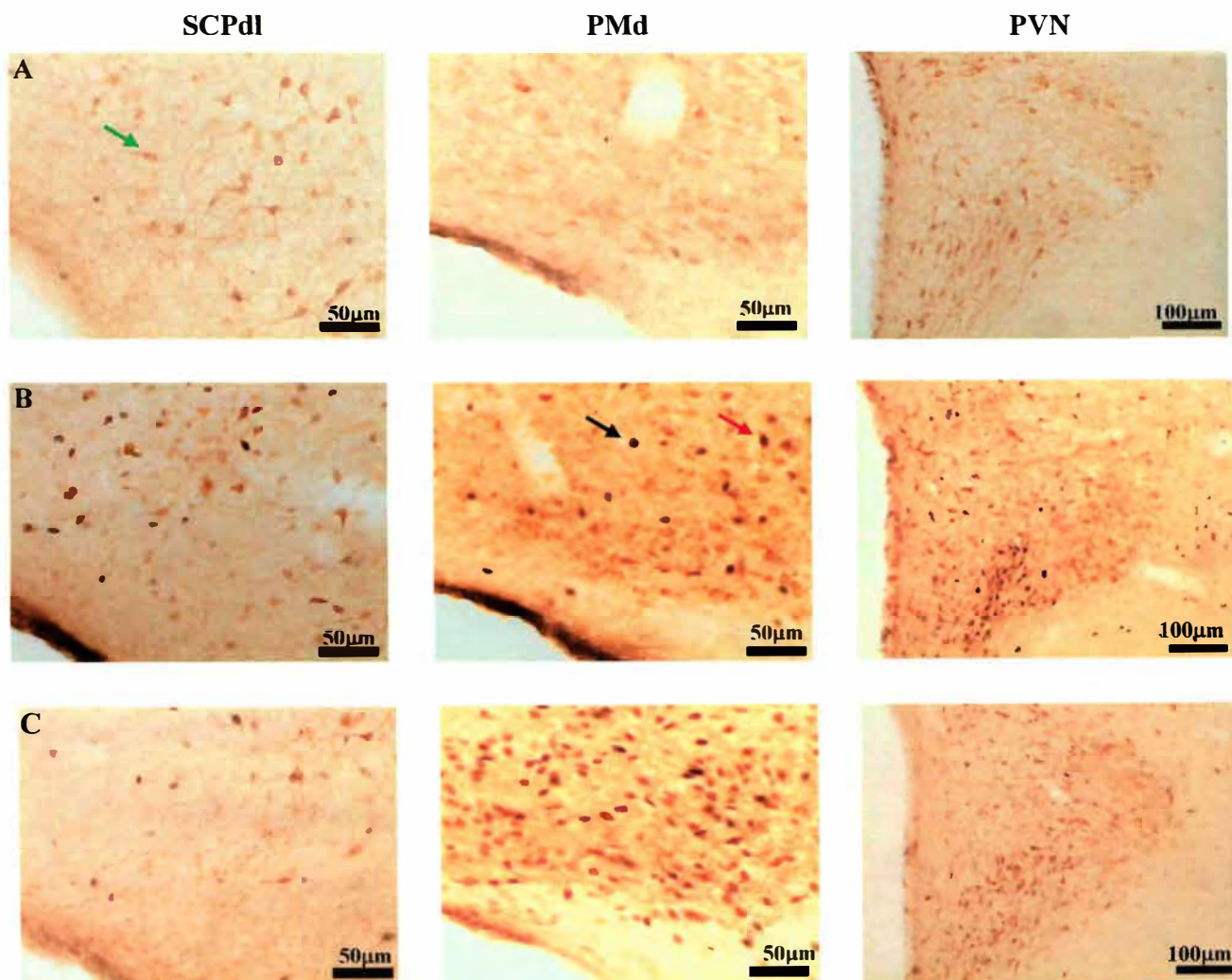


Figura 13: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da SCPdl, PMd e PVN de um rato naive (A), de um exposto ao gato que recebeu salina intra-SCPdl (B) e de um exposto a gato que recebeu AP-7 intra-SCPdl (C), processadas para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e da enzima NOSn. A seta verde indica uma célula positiva para NOSn, a seta preta indica uma célula positiva para Fos e a seta vermelha indica uma célula duplamente marcada para Fos e NOSn.

Experimento 3: Efeito do tratamento de NP intra-SCPdl sobre a dupla marcação Fos+NOSn em diferentes regiões encefálicas de ratos expostos a um gato

A exposição ao gato promoveu reações defensivas caracterizadas por redução significativa no tempo de permanência (fator exposição: $F_{(1,16)}= 15,81$; $p<0,05$; fator droga: $F_{(1,16)}= 0,76$; $p=0,39$; droga X exposição: $F_{(1,16)}= 0,59$; $p=0,453$) e na distância percorrida (fator exposição: $F_{(1,16)}= 19,14$; $p<0,05$; fator droga: $F_{(1,16)}= 4,45$; $p<0,05$; droga X exposição: $F_{(1,16)}= 3,27$; $p<0,1$) pelos animais no compartimento próximo ao gato em relação aos animais expostos ao gato de brinquedo (Figura 14). Esses animais apresentaram imobilidade significativamente maior em relação aos animais expostos ao gato de brinquedo (Figura 15; $H_3= 16,451$; Kruskal-Wallis $p<0,05$).

Nestes experimentos, o tratamento com o NP reverteu parcialmente o efeito da exposição ao gato, pois esses animais percorreram uma distância maior no compartimento próximo ao gato (não significativa em relação aos animais expostos ao gato) e ainda permaneceram durante um tempo significativamente menor no compartimento próximo ao gato em relação ao grupo salina/brinquedo (Figura 14). Considerando o tempo de imobilidade, o tratamento com o NP reverteu os efeitos da exposição ao predador. (Figura 15- $p<0,05$; Mann-Whitney U).

Com relação aos dados imunoistoquímicos, como já observado no experimento 2, a exposição ao gato não promoveu alterações no número de células IR-NOS nas estruturas analisadas. Houve aumento significativo em relação ao grupo naive nas células IR-FOS em ambos os lados da SCPdl (Figura 16; A- ipsilateral $F_{(4,20)}=7,1212$; $p<0,05$; B- contralateral $F_{(4,20)}= 3,74$; $p<0,05$), PMd (Figura 17 $F_{(4,11)}=4,58$; $p<0,05$) e PVNmg (Figura 17 B $F_{(4,20)}=3,91$; $p<0,05$). Houve aumento das células IR-Fos no PVNp (Figura 18 A) e na AmMe (Tabela 2), porém esse aumento não foi estatisticamente significativo. Não houve alterações no número de células IR-Fos nas três regiões quantificadas do CPF (Tabela 2).

Houve aumento significativo das células duplamente marcadas no lado contra - lateral da SCPdl (Figura 16 B; $F_{(4,20)} = 4,4725$; $p < 0,05$) e no PMd (Figura 17 $F_{(4,11)} = 6,2981$; $p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos na porcentagem de células duplamente marcadas nas outras estruturas analisadas.

O NP foi capaz de atenuar no lado ipsilateral da injeção, o número de células IR-FOS, mas este efeito não foi estatisticamente diferente dos animais expostos ao gato (estes animais também não diferiram do grupo salina/brinquedo; Figura 16 A). Houve redução estatisticamente significativa em relação aos animais salina/gato na porcentagem de células duplas no lado contralateral da injeção da SCPdl (Figura 16 B, Duncan $p < 0,05$). Como observado no experimento 2, houve um aumento nas células IR-Fos no PMd dos animais que receberam NP e foram expostos ao gato, mas neste experimento este grupo não diferiu do grupo salina/gato (Figura 17). Não houve alterações após o tratamento com o NP nas outras estruturas quantificadas.

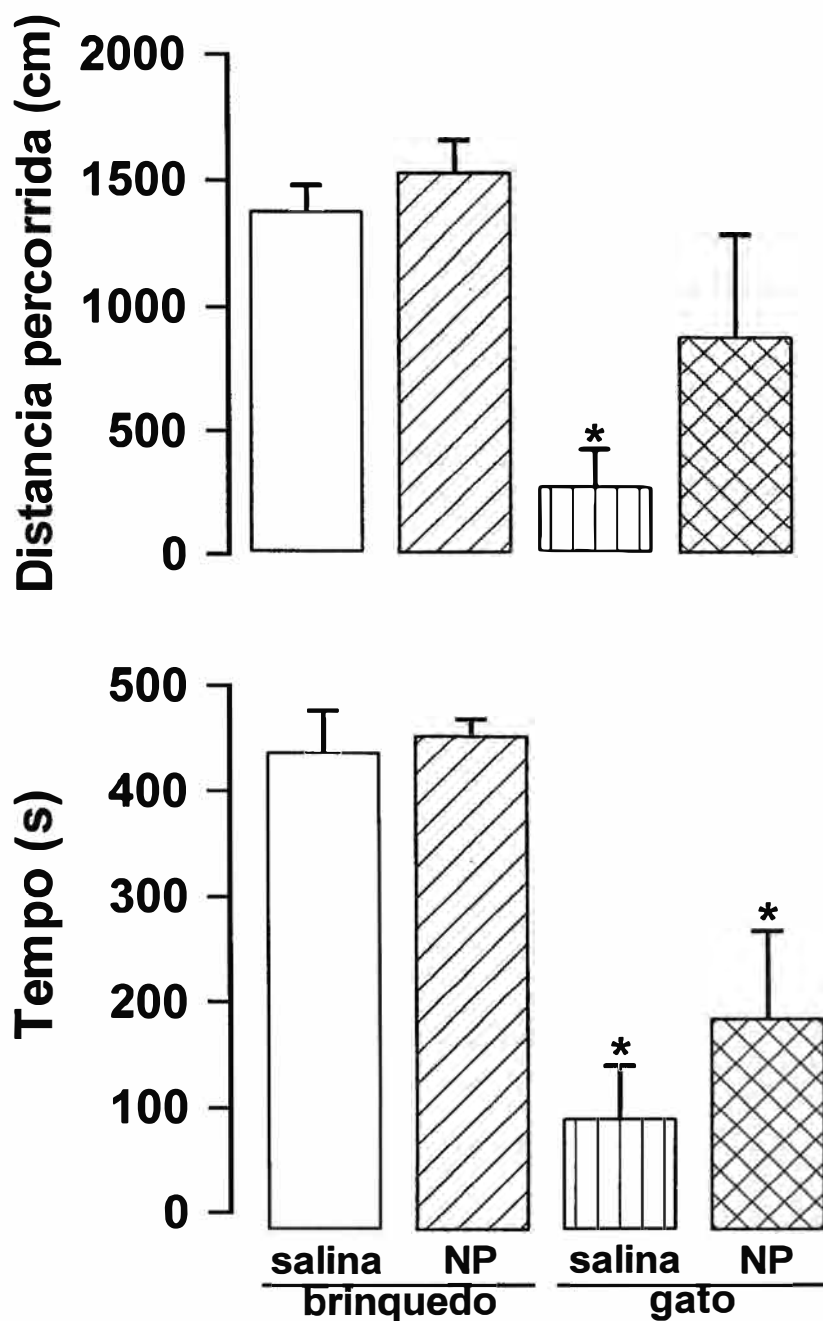


Figura 14: Efeito do NP (100 nmol/0,2 μ L) intra-SCPdl sobre a distância percorrida (cm) e o tempo de permanência (s) no compartimento próximo ao gato por ratos ($n=4-6$) expostos ao brinquedo ou ao gato. Os valores representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina brinquedo (ANOVA de duas vias seguida de Duncan).

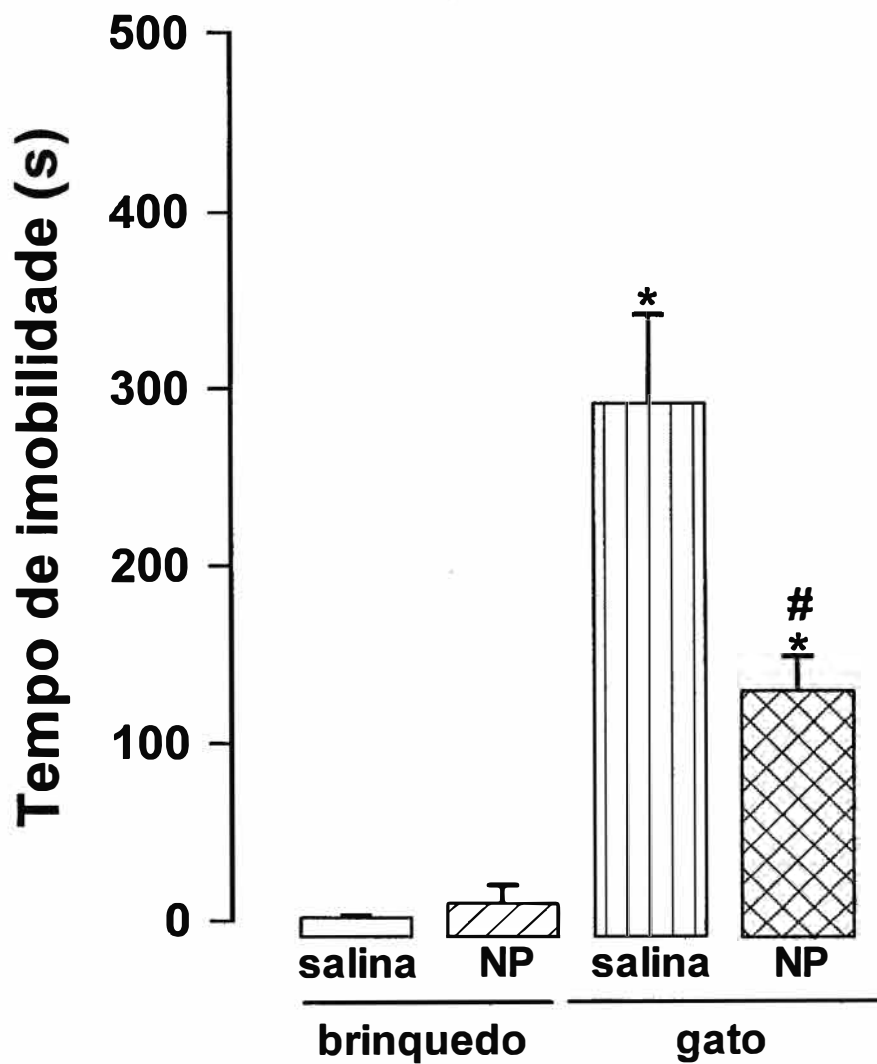


Figura 15: Efeito do NP (100 nmol/0,2 µL) intra-SCPdl sobre o tempo de imobilidade (s) de ratos (n=4-6) expostos ao brinquedo ou ao gato. Os valores representam a média ± E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina brinquedo, # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina gato (Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney U).

SCPdl

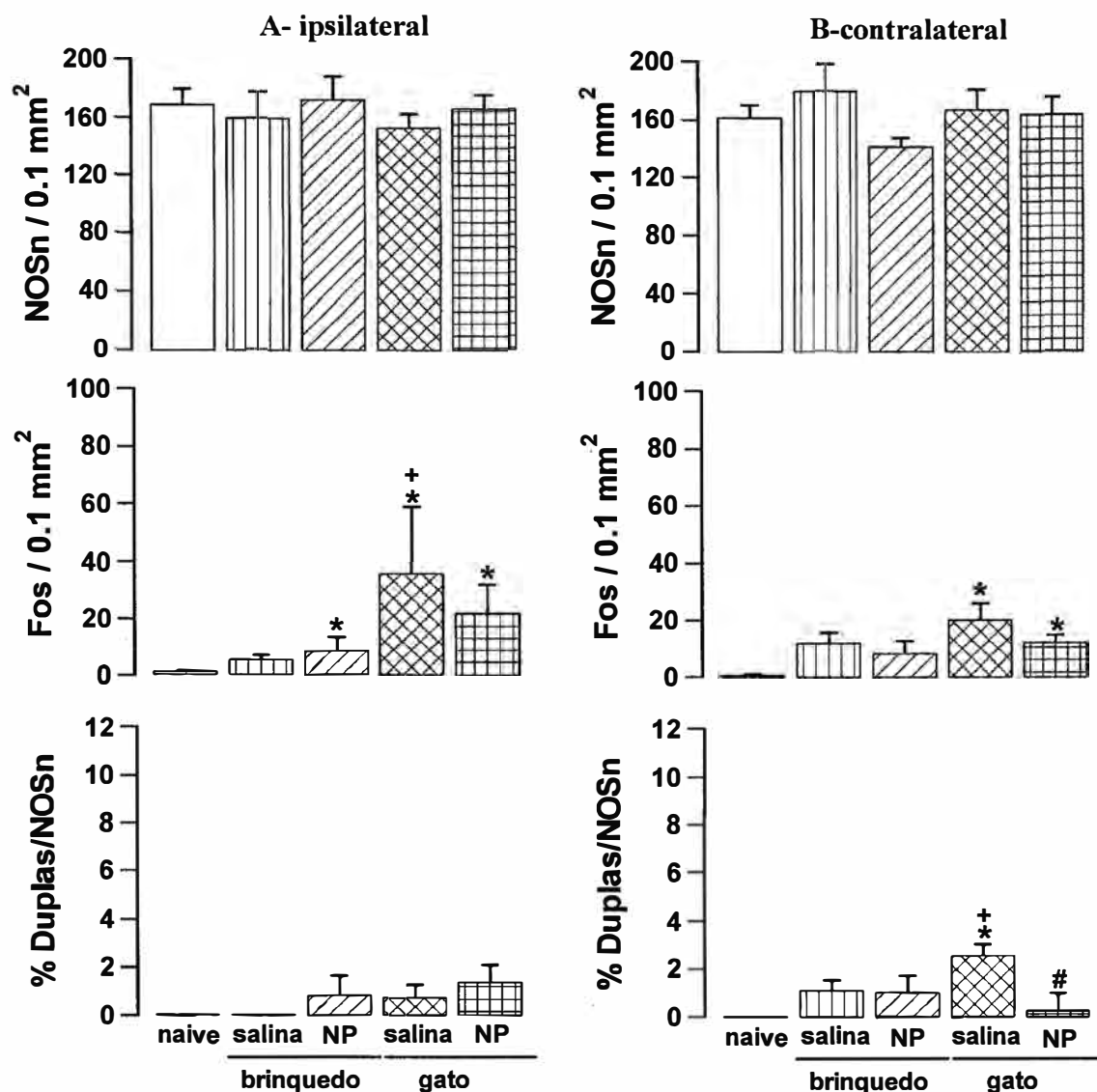


Figura 16: Efeito do NP (100 nmol/0,2 µL) intra-SCPdl em ratos expostos ao brinquedo ou ao gato sobre o número de células NOSn positivas, c-Fos positivas e duplamente marcadas na porção ipsi – lateral (painel A) e contra - lateral (painel B) da SCPdl. Os animais naive não foram manipulados e nem expostos à caixa. Os resultados foram representados como a média ± E.P.M. do número de células positivas e como a percentagem de células duplamente marcadas em relação às células NOSn positivas de 4-6 animais/grupo. * p<0,05 comparado ao naive; + p<0,05 comparado ao salina/brinquedo; # p<0,05 comparado ao salina/gato (ANOVA de uma via seguida de Duncan).

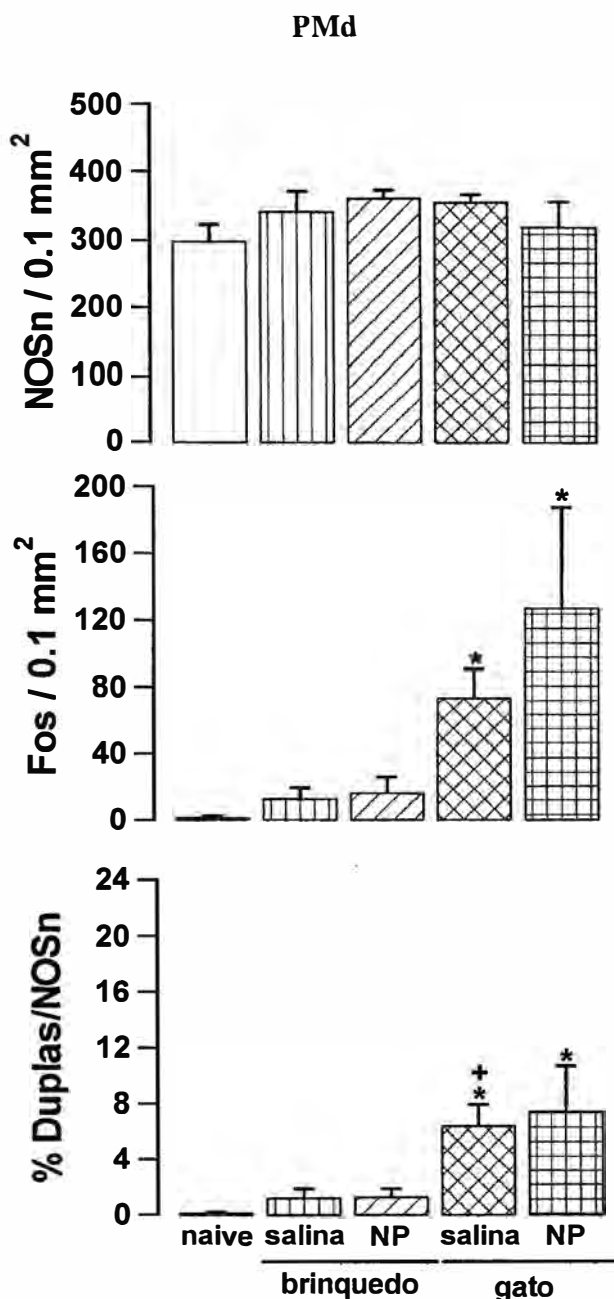


Figura 17: Efeito do NP (100 nmol/0,2 μ L) intra-SCPdl em ratos expostos ao brinquedo ou ao gato sobre o número de células NOSn positivas, c-Fos positivas e na percentagem de células duplamente marcadas do PMd. Os resultados foram representados como a média \pm E.P.M. do número de células positivas e como a percentagem de células duplamente marcadas em relação às células NOSn positivas de 3-4 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao naive; + $p < 0,05$ comparado ao salina/brinquedo (ANOVA seguida de Duncan).

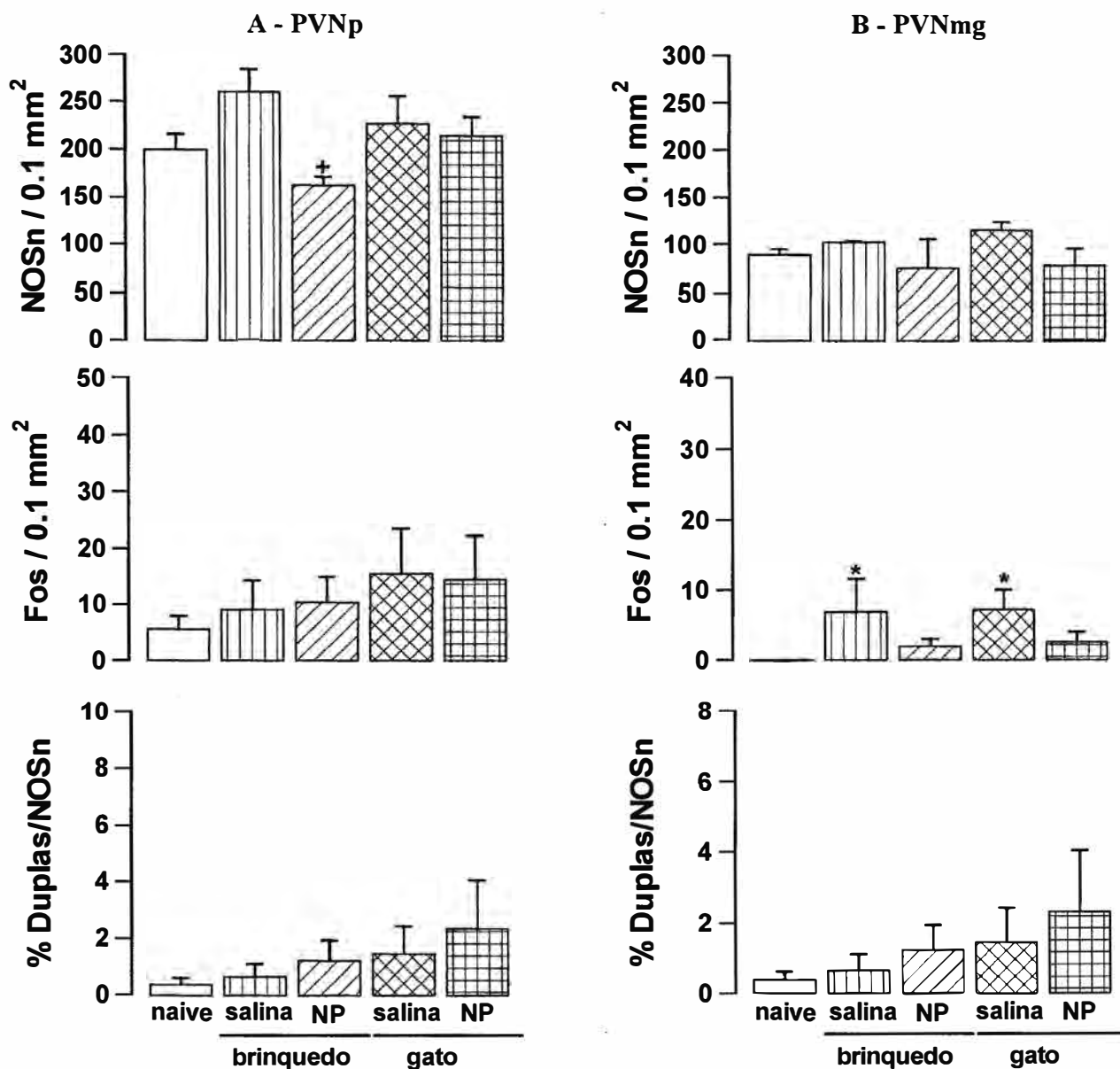


Figura 18: Efeito do NP (100 nmol/0,2 µL) intra-SCPdl em ratos expostos ao brinquedo ou ao gato sobre o número de células NOSn positivas, c-Fos positivas e na percentagem de células duplamente marcadas do PVNp (painel A) e PVNmg (painel B). Os resultados foram representados como a média ± E.P.M. do número de células positivas e como a percentagem de células duplamente marcadas em relação às células NOSn positivas de 4-6 animais/grupo. * p<0,05 comparado ao naive; + p<0,05 comparado ao salina/brinquedo; (ANOVA seguida de Duncan).

Tabela 2: Número de células c-Fos positivas, NOSn positivas e porcentagem de células duplamente marcadas nas porções Cg1, IL, PrL do CPF e na AmMe de ratos que receberam tratamento de NP intra-SCPdI e foram expostos ao gato de brinquedo ou ao gato.

	CPF Cg1			CPF IL			CPF PrL			AmMe		
	FOS	NOSn	%duplas	FOS	NOS	%duplas	FOS	NOS	%duplas	FOS	NOS	duplas
Naive	4,07 ± 2,86	8,67±1,56	0,5±0,5	4,65 ± 3,43	7,63±1,8	1,05±1,1	5,56 ±5,54	7,83±3,3	0,32±0,32	5,84 ± 4,88	n.q	1,29± 1,1
sal./brinq.	9,13± 3,13	14,47±3,96	1,69±1,0	5,49 ± 3,10	10,6±3,6	2,46±2,5	6,39 ± 2,55	12,3±3,4	0	2,27 ±2,27	n.q	0,65± 0,65
NP/brinq	2,34 ±1,91	8,08±0,97	0,	4,10±0,54	9,38±2,24	1,15±1,2	6,47 ±4,94	15,5±4,7	0,83±0,83	0,43±0,43	n.q	0
sal/gato	11,72± 4,06	16,00±5,24	0,81±0,8	2,34±1,94	5,90 ±1,7	0	5,01±2,86	7,03 ±1,9	2,40±1,6	22,06±17,76	n.q.	3,6± 2,26
NP/gato	3,24±1,54	8,57±1,25	0	0,65±3,43	5,12±1,1	0	0,70±0,46	5,55±1,1	0	12,71±9,46	n.q	4,11± 2,61

Os resultados foram representados como a média ± E.P.M. do número de células positivas, da porcentagem de células duplamente marcadas em relação às células NOSn positivas e no número de células duplamente marcadas de 5-6 animais/grupo. * p<0,05 comparado ao naive (ANOVA seguida de Duncan). n.q. = não quantificado

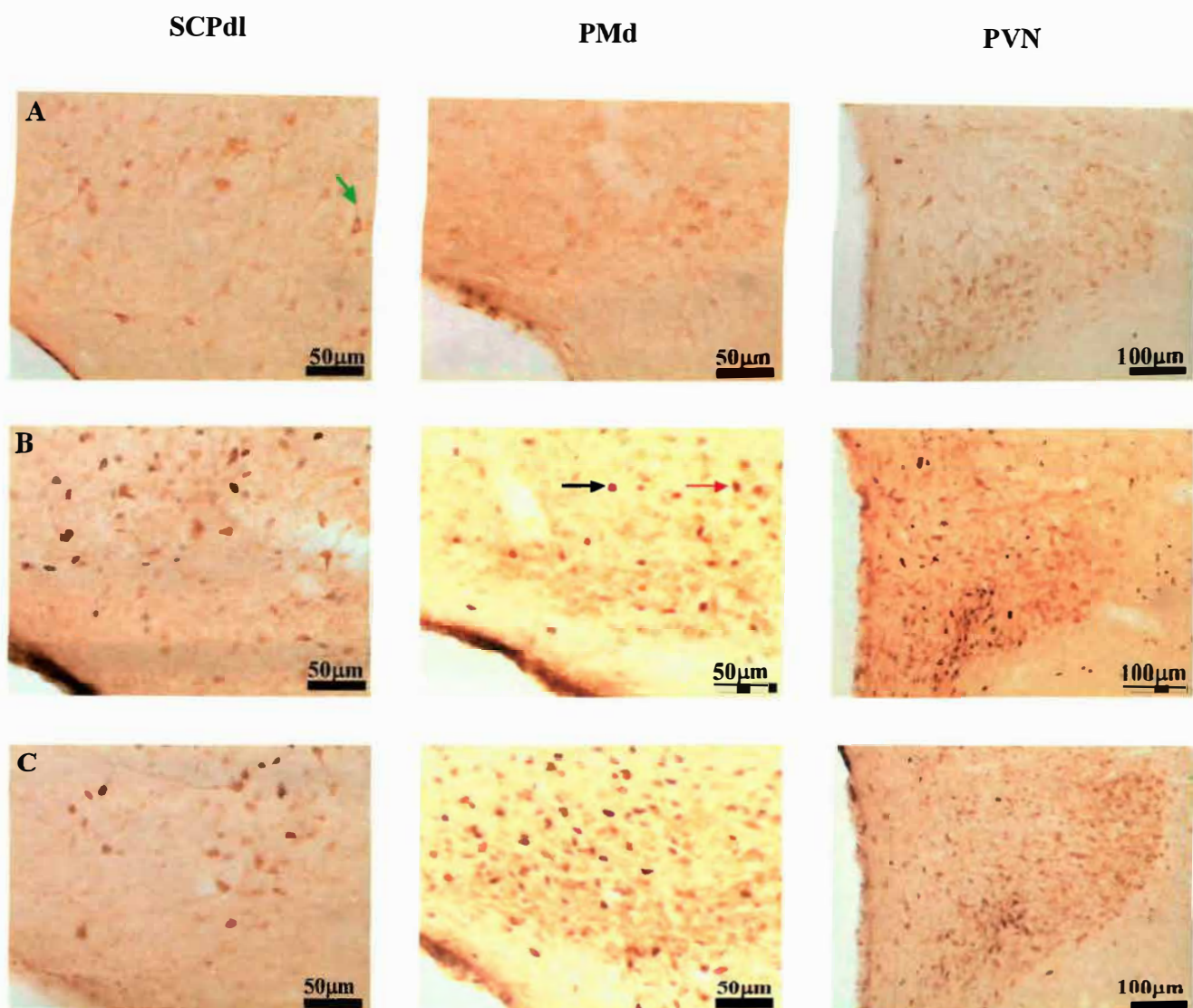


Figura 19: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da SCPdl, PMd e PVN de um rato naive (A), de um exposto ao gato que recebeu salina intra-SCPdl (B) e de um exposto a gato que recebeu NP intra-SCPdl (C), processadas para imunistoquímica para a detecção da proteína Fos e da enzima NOSn. A seta verde indica uma célula positiva para NOSn, a seta preta indica uma célula positiva para Fos e a seta vermelha indica uma célula duplamente marcada para Fos e NOSn.

Experimento 4: Efeito do tratamento com AP-7 ou N-propyl-L-arginina intra-PMd em ratos expostos a um gato.

Experimento 4 A:

A exposição ao gato induziu nesses animais reações defensivas semelhantes às observadas nos experimentos anteriores. Os animais operados no PMd e que foram expostos ao gato percorreram uma distância significativamente menor no compartimento próximo ao gato (Fator exposição: $F_{(1,18)} = 60,75$; $p < 0,05$; fator droga: $F_{(1,18)} = 7,90$; $p = 0,05$; droga X exposição: $F_{(1,18)} = 5,97$; $p < 0,05$), como também, permaneceram um tempo significativamente menor neste compartimento (Fator exposição: $F_{(1,18)} = 97,12$; $p < 0,05$; fator droga: $F_{(1,18)} = 6,97$; $p < 0,05$; droga X exposição: $F_{(1,18)} = 7,26$; $p < 0,05$; Figura 20). Os animais expostos ao predador natural apresentaram imobilidade estatisticamente significativa em relação aos animais controles (Fator exposição: $F_{(1,18)} = 91,81$; $p < 0,05$; fator droga: $F_{(1,18)} = 33,35$; $p < 0,05$; droga X exposição: $F_{(1,18)} = 31,97$; $p < 0,05$; Figura 21).

O tratamento com AP-7 nesta estrutura também foi capaz de atenuar significativamente em relação aos animais salina/gato (Figura 20; Duncan $p < 0,05$). Além disso, esses animais também tiveram redução significativa no tempo de imobilidade (Figura 21; Duncan $p < 0,05$).

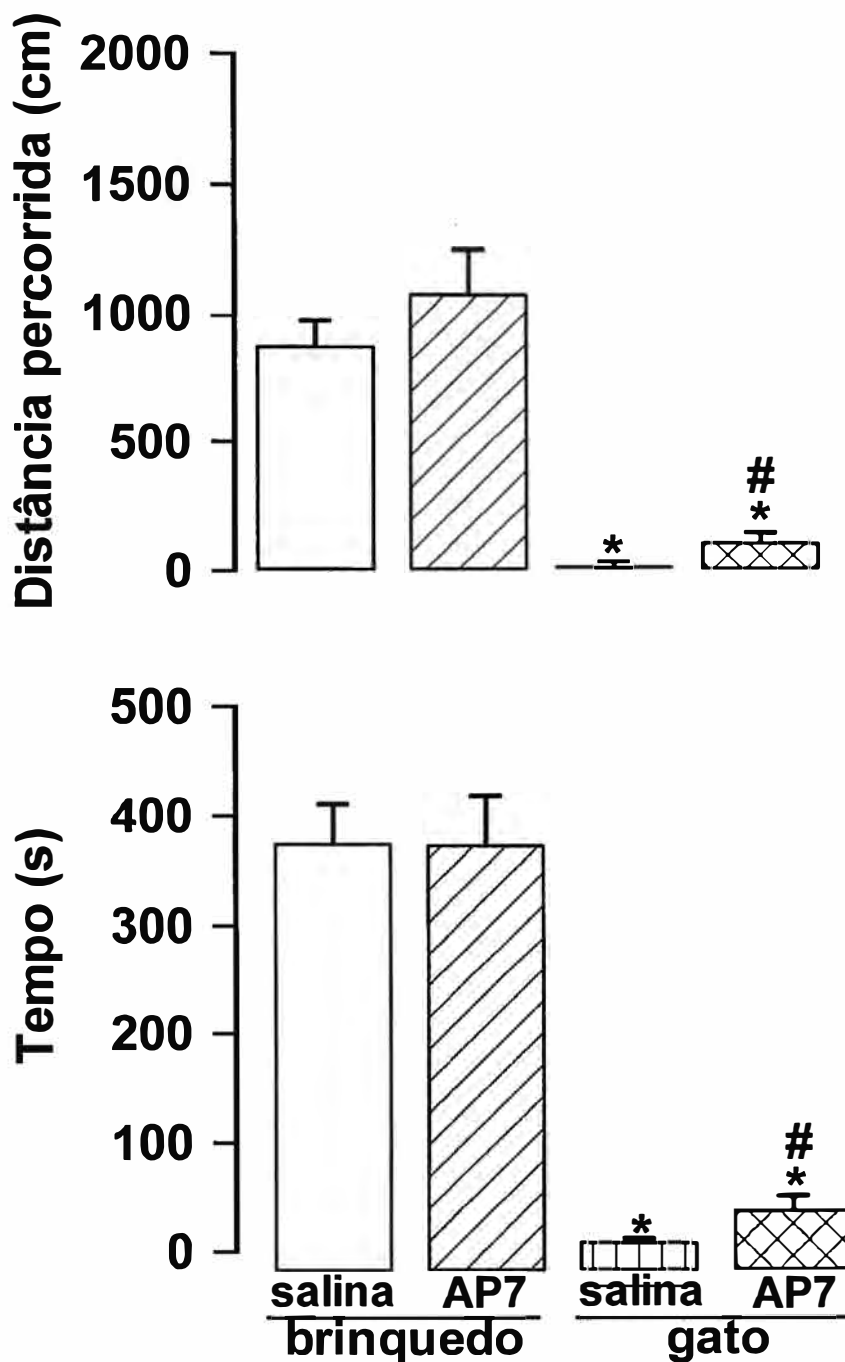


Figura 20: Efeito do AP-7 (2 nmol/0,2 μ L) intra-PMd sobre a distância percorrida (cm) e o tempo de permanência (s) no compartimento próximo ao gato por ratos (n=5-6) expostos ao brinquedo ou ao gato. Os valores representam a média \pm E.P.M. * p<0,05 em relação ao grupo salina brinquedo, # p<0,05 comparado ao salina/gato (ANOVA de duas via seguida de Duncan).

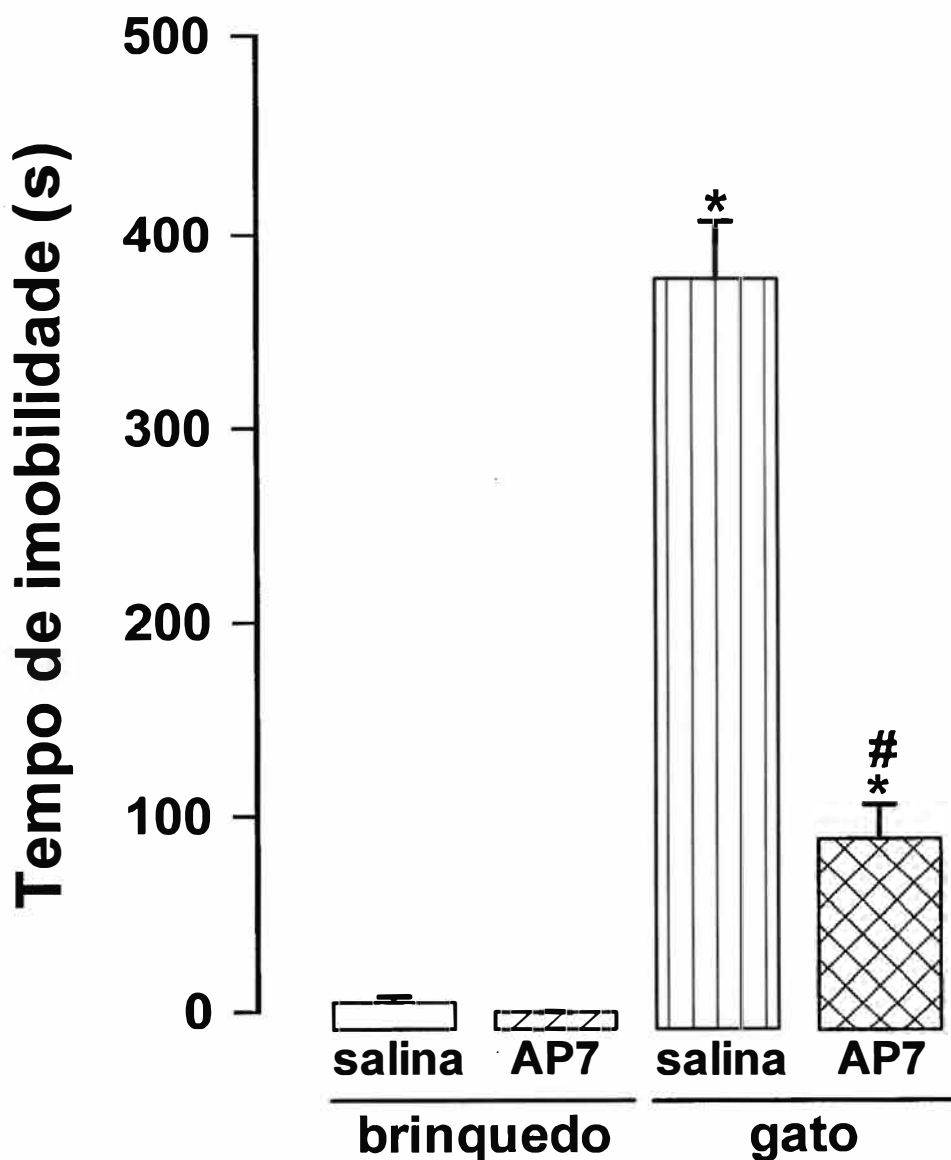


Figura 21: Efeito do AP-7 (2 nmol/0,2 μ L) intra-PMd sobre o tempo de imobilidade (s) de ratos (n=5-6) expostos ao brinquedo ou ao gato. Os valores representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina brinquedo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina gato (ANOVA de duas via seguida de Duncan).

Experimento 4 B

Como observado nos experimentos anteriores houve uma redução significativa dos animais que foram expostos ao gato distância ($H_3 = 14,99$; $p < 0,05$ Kruskal-Wallis; seguido de Mann-Whitney U) no compartimento próximo ao gato, como também, permaneceram um tempo significativamente menor neste compartimento ($H_3 = 13,09$; $p < 0,05$ Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney U Figura 22). Os animais expostos ao predador natural apresentaram imobilidade estatisticamente significativa em relação aos animais controles ($H_3 = 14,95$; $p < 0,05$ Kruskal-Wallis; seguido de Mann-Whitney U; Figura 23).

O tratamento com NP reverteu parcialmente as respostas defensivas observadas pela exposição ao predador. Os animais NP/gato tenderam a percorrer uma distância maior no compartimento próximo ao gato ($p < 0,1$ em relação ao grupo salina/brinq), porém da mesma forma que os animais do grupo salina/gato permaneceram um tempo menor neste compartimento. Com relação ao tempo de imobilidade, esses animais tiveram uma redução estatisticamente significativa no tempo que ficaram imóveis durante a exposição ao predador ($p < 0,05$ em relação ao grupo salina/gato; Mann-Whitney U).

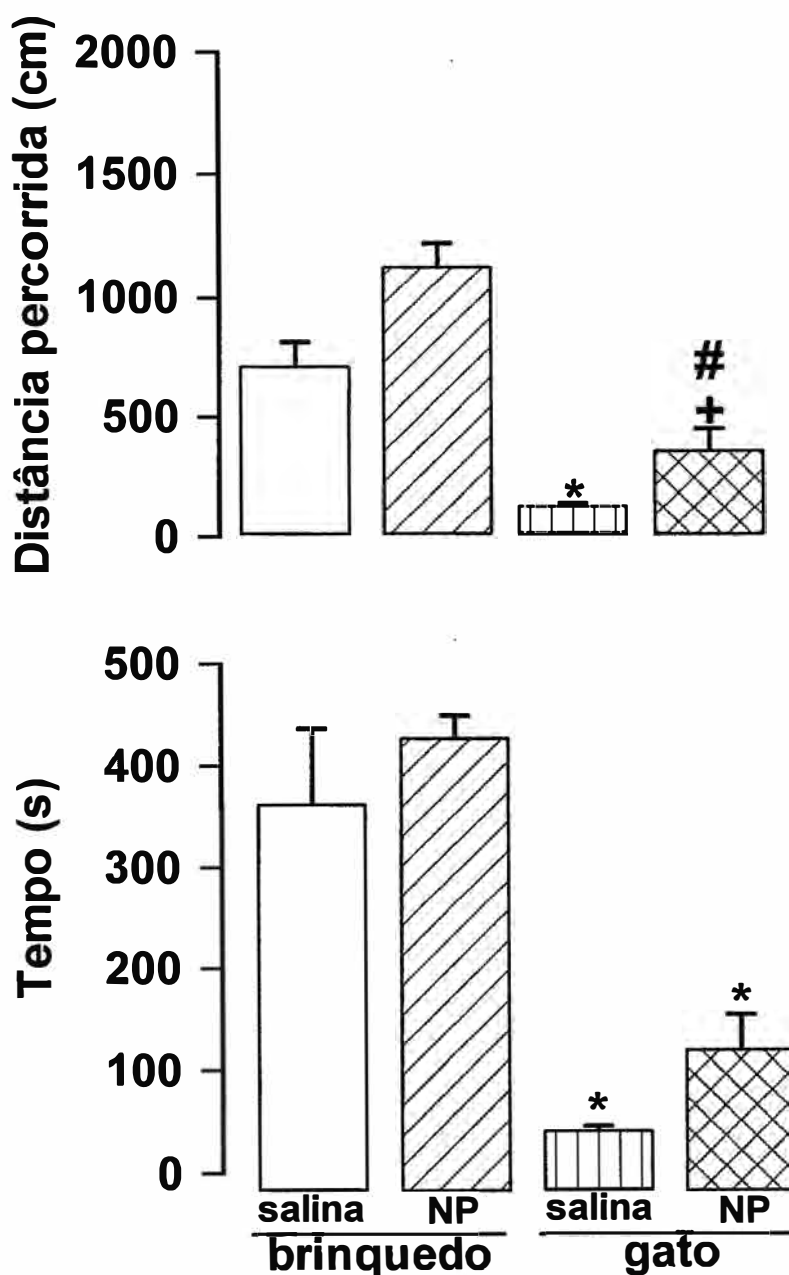


Figura 22: Efeito do NP (100 nmol/0,2 μ L) intra-PMd sobre a distância percorrida (cm) e o tempo de permanência (s) no compartimento próximo ao gato por ratos ($n=4-7$) expostos ao brinquedo ou ao gato. Os valores representam a média \pm E.P.M. * $p<0,05$ em relação ao grupo salina/brinquedo, # $p<0,1$ em relação ao grupo salina/gato; + $p<0,1$ em relação ao grupo salina/brinquedo (Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney U).

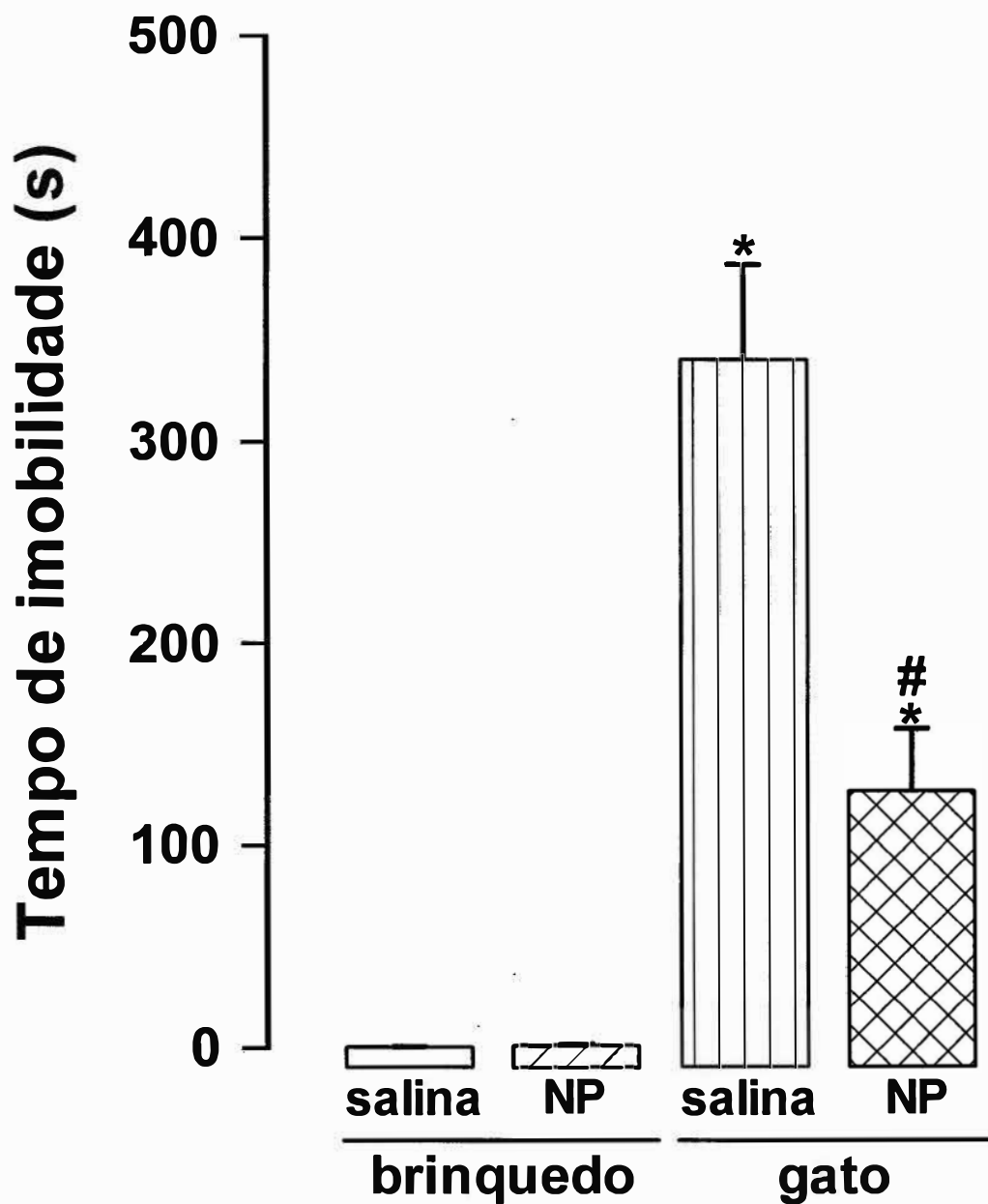


Figura 23: Efeito do NP (100 nmol/0,2 μ L) intra-PMd sobre tempo de imobilidade (s) de ratos (n=4-7) expostos ao brinquedo ou ao gato. Os valores representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina brinquedo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina gato (Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney U).

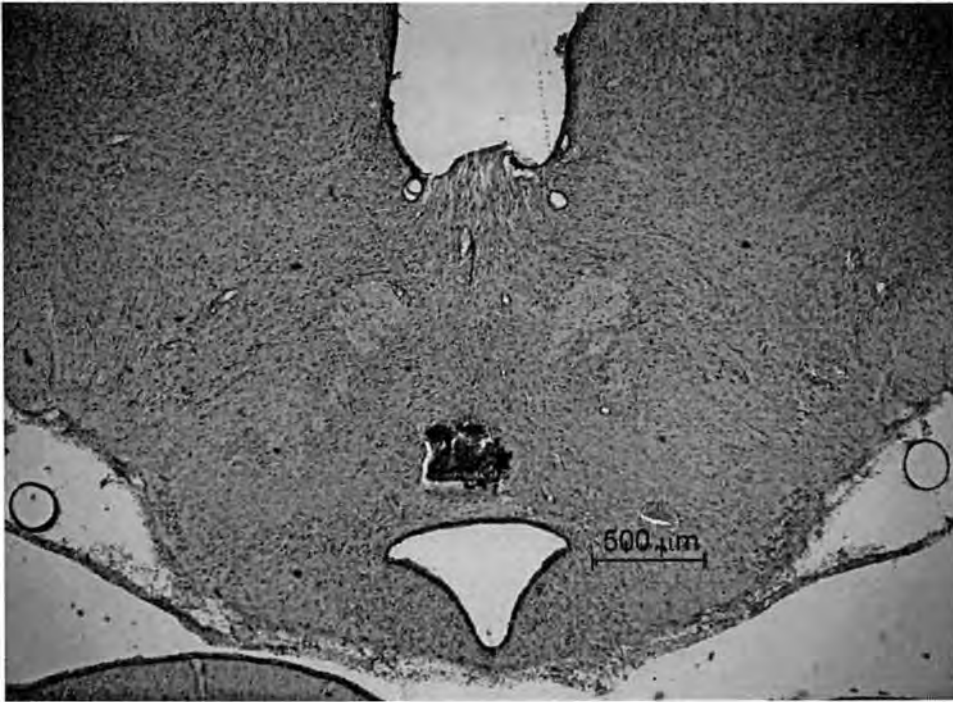


Figura 24: Fotomicrografia representativa do sítio de injeção do PMd.

Os comportamentos defensivos caracterizam-se pelas respostas desencadeadas em situações ameaçadoras, as quais são adaptativas ao estímulo de perigo e às situações comuns ao longo da história evolutiva das espécies que os exibem (BLANCHARD; BLANCHARD, 2008). Por conseqüência, a presença de perigos iminentes promove nos animais reações comportamentais distintas, sendo que, em ratos, dependendo da distância do perigo, observam-se desde comportamentos de avaliação de risco e esquiva, até fuga e ataques defensivos (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; MAREN, 2007; MCGREGOR et al., 2004; MCNAUGHTON; CORR, 2004).

Nos experimentos comportamentais realizados neste trabalho, observou-se que a exposição ao predador induziu congelamento e redução da atividade locomotora, conforme deduzido pelo aumento no tempo que os animais permaneceram imóveis, como também, pela redução no tempo de permanência e na distância percorrida pelos animais no compartimento próximo ao gato. Esses comportamentos são semelhantes aos observados por outros trabalhos descritos na literatura, os quais demonstraram, além desses efeitos, a redução de comportamentos não defensivos, como por exemplo, auto-limpeza (BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006; BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; CANTERAS et al., 1997; MOREIRA; GUIMARAES, 2008). Embora a exposição ao gato seja um estímulo aversivo mais intenso, reações defensivas semelhantes também são observadas após indícios da presença do gato, como por exemplo, seu odor (BLANCHARD et al., 2005; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2004).

Corroborando nossa hipótese inicial, tanto a inibição glutamatérgica, quanto a nitrérgica na SCPdl foram capazes de atenuar as respostas defensivas promovidas pela exposição ao predador, sugerindo um efeito antiaversivo.

Há relatos na literatura de que a administração sistêmica de antagonistas de rNMDA atenuou as respostas defensivas observadas após a exposição ao odor do predador, como também bloqueou as alterações desencadeadas pelo estresse de exposição ao predador no modelo do LCE (ADAMEC et al., 1999; BLANCHARD et al., 1992; BLUNDELL; ADAMEC; BURTON, 2005). Adicionalmente, Beijamini e Guimarães (2006) observaram que a administração de AP-7, por via i.c.v., reduziu as respostas comportamentais promovidas pela exposição ao gato. Efeitos do tipo ansiolítico também foram descritos em diferentes modelos de ansiedade após a administração de AP-7 em diversas estruturas do SNC relacionadas com o comportamento defensivo, como por exemplo, na SCPdl (GUIMARAES et al., 1991; JARDIM et al., 2005; JARDIM; GUIMARAES, 2004; MOLCHANOV; GUIMARAES, 2002). Em conjunto, esses dados sustentam a hipótese do envolvimento dos rNMDA na elaboração das respostas defensivas, possivelmente facilitando-as.

Nesse sentido, a administração de glutamato ou de agonistas dos rNMDA em regiões relacionadas com comportamento defensivo, como a SCPdl, induz respostas de fuga, seguidas de congelamento (AGUIAR; MOREIRA; GUIMARAES, 2006; BITTENCOURT et al., 2004; CARRIVE, 1993; KRIEGER; GRAEFF, 1985). Essas respostas foram acompanhadas por uma intensa ativação da proteína Fos em estruturas como o dmHVM, PMd, AHN, colículo inferior, núcleo dorsal da rafe e SCPdl (FERREIRA-NETTO; BORELLI; BRANDAO, 2005), as quais também são ativadas em resposta a outros estímulos aversivos e estão implicadas em diferentes componentes das reações de medo e ansiedade (DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001; SILVEIRA; SANDNER; GRAEFF, 1993; SINGEWALD; SALCHNER; SHARP, 2003). Recentemente, verificou-se que os rNMDA da SCPd também estão envolvidos no comportamento defensivo de imobilidade tônica em cobaias, uma vez que a administração de um agonista glutamatérgico intra-SCPd reduziu esse comportamento e teve seu efeito bloqueado pelo

pré-tratamento com um antagonista de rNMDA, o MK-801 (RAMOS COUTINHO; DA SILVA; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008).

Devido à estreita relação existente entre o glutamato e o NO nos diferentes processos fisiológicos do SNC, diversas evidências sugerem que o NO, assim como o glutamato, também possa ser um importante fator que contribui para regulação da excitabilidade neuronal da SCPdl (LOVICK, 2000) e, conseqüentemente, na modulação de respostas relacionadas com o comportamento defensivo (CHIAVEGATTO; SCAVONE; CANTERAS, 1998; GUIMARAES et al., 2005; VOLKE et al., 1997).

A administração sistêmica de 7-NI induziu efeitos do tipo ansiolítico em ratos em modelos de ansiedade distintos (VOLKE et al., 1997). Além disso, a administração intra-SCPd de inibidores da NOS ou de drogas que interferem com a neurotransmissão nitrérgica produz efeitos ansiolíticos no LCE (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARAES, 2001; GUIMARAES et al., 2005; GUIMARAES et al., 1994). Por outro lado, de maneira semelhante aos agonistas glutamatérgicos, a injeção nesta mesma região de doadores de NO induzem reações de fuga acompanhadas de intensa ativação neuronal (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARAES, 2001; DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARAES, 2000).

Recentemente, Wultsch et al. (2007) demonstraram que animais *knockout* para a isoforma neuronal da NOS (nNOS) apresentaram redução nos níveis de ansiedade (WULTSCH et al., 2007). Além disso, tanto a inibição farmacológica, quanto gênica da nNOS foram capazes de promover efeitos do tipo ansiolítico em camundongos, além de reduzir a concentração do hormônio liberador de corticotrofinas (CRH) induzido pelo estresse neste modelo (WORKMAN et al., 2007). Adicionalmente, a administração de inibidores da nNOS intra-AmMe produziu efeitos ansiolíticos em dois modelos de ansiedade, o LCE e a caixa de claro-escuro. (FORESTIERO et al., 2006).

Nossos resultados, em conjunto com dados citados anteriormente, sustentam a hipótese de que a inibição do NO promove efeitos antiaversivos nas estruturas relacionadas com o comportamento defensivo, pois a administração de dois inibidores seletivos da nNOS intra-SCPdl, o 7-NI e o NP, atenuou as respostas defensivas promovidas pela exposição ao predador.

Aparentemente, o NP é um composto mais seletivo para a isoforma neuronal da NOS do que o 7-NI (ZHANG et al., 1997), porém em nossos experimentos, ambos compostos exerceram efeitos antiaversivos nas mesmas doses. Não optamos pela utilização do 7-NI nos experimentos subsequentes, pois os animais controles que foram expostos ao gato não tiveram reduções significativas na distância percorrida pelos animais no compartimento próximo ao gato, sugerindo que o veículo do 7NI (DMSO 100%) estaria promovendo uma alteração da atividade exploratória desses animais. De fato, dados obtidos por Matheus et al. (1997) mostraram que, dependendo da concentração, a administração de veículos como o DMSO ou Tween-80 alterou significativamente a atividade exploratória de ratos expostos ao LCE (MATHEUS; DELACERDA; GUIMARAES, 1997). Embora a dose de 1nmol/0.2μL de NP tenha reduzido significativamente o tempo de imobilidade dos animais expostos ao gato, nos outros parâmetros analisados no presente trabalho, essa dose não foi tão eficaz quanto à maior dose (100 nmol). Assim, decidimos utilizar o NP na maior dose nos experimentos subsequentes.

Considerando-se os dados imunoistoquímicos, observamos que a exposição ao gato induziu aumento de IR-Fos nos lados ipsi e contralateral da SCPdl, no PMd, nas porções magnocelular e parvocelular do PVN e na AmMe. Porém, nessa última estrutura este efeito não foi estatisticamente significativo.

Esses dados corroboram resultados prévios da literatura, que mostram que a exposição a perigos iminentes, como a exposição ao gato ou a exposição de ratos a estímulos ameaçadores,

como o odor, induzem um aumento expressivo da proteína Fos em áreas relacionadas com o comportamento defensivo como regiões da SCP, em núcleos hipotalâmicos (Hipotálamo lateral, PMd e PVN) e porção posteroventral da AmMe (BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006; BLANCHARD et al., 2005; CANTERAS et al., 1997; CANTERAS; GOTO, 1999; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001). Foi também observado, após a exposição ao gato, o aumento da expressão do RNAm para *c-fos* no BNST, PMd, dmHVM, CPFM e AmMe (FIGUEIREDO et al., 2003).

Nossos resultados também mostraram que, embora não tenha sido observada diferenças no número absoluto das células IR-NOS, a exposição ao gato promoveu aumento significativo das células nitrérgicas ativadas após exposição ao predador em ambos os lados da SCPdl, sugerindo que o NO possa modular as respostas de medo inato mediadas por esta região.

A porção dorsal da SCP foi ativada após exposição ao gato em um modelo distinto ao empregado neste trabalho, sendo que essa ativação foi acompanhada por um aumento nos níveis de citrulina (medida indireta da formação de NO) e acúmulo do segundo mensageiro GMPc (CHIAVEGATTO; SCAVONE; CANTERAS, 1998). A ativação de neurônios nitrérgicos da SCPdl também foi observada em um estudo prévio realizado em nosso laboratório (BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006).

Ainda, considerando o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica na elaboração das respostas defensivas, nossos resultados mostraram que tanto o AP-7, quanto o NP intra-SCPdl foram capazes de atenuar a ativação celular dessa região, como também reduzir a porcentagem de células nitrérgicas ativadas após a exposição ao predador. Esses dados corroboram dados prévios obtidos por nosso laboratório, que mostraram que a inibição da neurotransmissão glutamatérgica, por via i.c.v., também foi capaz de reduzir a ativação neuronal induzida após a exposição ao gato na SCPdl (BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006). Em conjunto,

esses dados reforçam a hipótese de que a via rNMDA/NO também module as respostas promovidas por eventos aversivos.

A exposição ao gato induziu ativação celular na AmMe, porém este efeito não foi significativo quando comparado com outros grupos, possivelmente devido à grande variabilidade dos animais. Como essa região possui um grande número de fibras de neurônios nitrérgicos, como já previamente descrito por Beijamini e Guimarães (2006b), não foi possível realizar a quantificação de maneira confiável das células IR-NOS. Por este motivo, nós representamos os dados da dupla-marcação dessa estrutura em valores absolutos, e diferentemente do observado previamente por Beijamini e Guimarães (2006b), em nosso trabalho a exposição ao predador não alterou o padrão de ativação de neurônios NOS positivos nesta região. No entanto, o envolvimento dessa estrutura, em situações ameaçadoras não pode ser descartado, pois a AmMe parece ocupar uma função central na integração das informações sensoriais relacionadas ao predador (CANTERAS; BLANCHARD, 2008).

O odor do predador é processado no bulbo olfatório acessório (BOA) e não no bulbo olfatório principal, o que sugere que, no rato, o odor do predador seria mais um ferormônio do que um odor convencional (MCGREGOR et al., 2004). O BOA possui projeções principalmente para a amígdala medial, a qual é fortemente ativada após a exposição ao predador e especialmente após a exposição ao odor, o que sugere que esta região amidaliana está envolvida no processamento de pistas ferormonais da presença do predador (BLANCHARD et al., 2005; CANTERAS; BLANCHARD, 2008; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2004; MULLER; FENDT, 2006; UWANO et al., 1995). Lesões excitotóxicas na AmMe, mas não no núcleo central da amígdala, promoveram reduções significativas das respostas defensivas observadas com o odor do predador (LI; MAGLINAO; TAKAHASHI, 2004). Adicionalmente, este núcleo amidalóide, da mesma forma que o núcleo

central, possui importantes eferências para o hipotálamo e SCP (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; SAH et al., 2003), funcionando como uma conexão entre as áreas cerebrais neurovegetativas e as áreas corticais (SAH et al., 2003). Resultados obtidos por Herdade et al. (2006) mostraram que o bloqueio reversível dessa região aumentou o limiar elétrico necessário para desencadear respostas de fuga pela SCPd e inibiu o comportamento de fuga no modelo do labirinto em T elevado, sugerindo um efeito antiaversivo e reforçando a importância da AmMe na regulação das respostas defensivas (HERDADE et al., 2006). Além disso, essa região amidaliana parece ser essencial para ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal após eventos estressores (DAYAS; BULLER; DAY, 1999).

O hipotálamo é uma região responsável pela integração de várias respostas autonômicas e comportamentais relacionadas com o comportamento defensivo (CANTERAS, 2002). Dentre os núcleos hipotalâmicos envolvidos na elaboração das respostas relacionadas ao estresse, o PVN é uma estrutura complexa e necessária para desencadear respostas autonômicas e endócrinas para manutenção da homeostase e adaptação ao estresse por regular a secreção de vários hormônios (BENARROCH, 2005; HARBUZ; LIGHTMAN, 1992; SAWCHENKO; SWANSON, 1983).

Tanto a exposição ao gato (BLANCHARD et al., 1998; FIGUEIREDO et al., 2003), quanto ao odor de gato, aumentam os níveis plasmáticos de corticosterona e a expressão de RNAm para CRH no PVN de roedores (MORROW et al., 2000; PERROT-SINAL; OSSENKOPP; KAVALIERS, 1999). Esse efeito também pôde ser observado no PVN e na amídala de ovelhas após a exposição a um predador natural, o cão (COOK, 2004).

Nossos dados estão de acordo com a idéia do envolvimento do PVN em respostas relacionadas ao estresse, pois a exposição ao gato promoveu aumento das células IR-FOS principalmente no PVNp. Foi observado também que houve um aumento não significativo na porcentagem das células duplamente marcadas nessa região. Esses dados diferem de dados

anteriores obtidos em nosso laboratório, os quais mostraram a ativação dos neurônios nitrérgicos do PVNp após a exposição ao predador (BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006). Apesar das diferenças encontradas, pode-se sugerir que o NO nesta estrutura module os sistemas neuroendócrinos durante as respostas aversivas. Neste sentido, observou-se que a utilização de outros estressores como, por exemplo, o estresse de imobilização promoveu o aumento da expressão da NOS no PVN (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARAES, 2001) e ativação de neurônios nitrérgicos nessa região (AMIR; RACKOVER; FUNK, 1997). Além disso, essa ativação foi bloqueada pelo tratamento sistêmico com o 7-NI (AMIR; RACKOVER; FUNK, 1997). Em nossos experimentos, apenas o tratamento com AP-7 atenuou a ativação celular induzida pela exposição ao predador.

Além do PVN, os núcleos hipotalâmicos que constituem o circuito hipotalâmico de defesa (CHMD) também possuem uma importante função na iniciação de comportamentos motivados específicos (CANTERAS, 2002). A estimulação elétrica de estruturas que compõem o CHMD promove um padrão de respostas somatomotoras e autonômicas que se assemelham com as respostas comportamentais que os animais apresentam em situações ameaçadoras (BRANDAO et al., 1986; DI SCALA; SCHMITT; KARLI, 1984; SILVEIRA; GRAEFF, 1992). Lesões químicas nas regiões caudais do CHMD prejudicaram significativamente a expressão das respostas comportamentais defensivas desencadeadas pela presença de um predador. Esse prejuízo era mais evidente quando as lesões atingem especificamente o PMd (CANTERAS et al., 1997). Adicionalmente, a estimulação elétrica (YARDLEY; HILTON, 1986) ou microinjeções de antagonistas GABAérgicos na região do PMd (DI SCALA; SCHMITT; KARLI, 1984), promoveram respostas somatomotoras e autonômicas semelhantes às observadas quando os animais estão frente a situações de perigo. Dessa forma, é sugerido que o PMd também possua uma importante função na elaboração das respostas incondicionadas.

Considerando essas evidências, Blanchard et al. (2003) mostraram que lesões eletrolíticas nesse núcleo promoveram uma redução dramática na imobilidade, no comportamento de esquiva e nos comportamentos relacionados com avaliação de risco após a exposição ao estímulo (odor ou gato) (BLANCHARD et al., 2003).

Além das respostas comportamentais, observa-se que após a exposição a estímulos ameaçadores o PMd juntamente com a SCPdl apresenta intensa ativação neuronal (BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006; BLANCHARD et al., 2005; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2004; MCGREGOR et al., 2002). Nossos resultados corroboram os dados da literatura, além de mostrarem que a exposição ao gato promoveu ativação de neurônios nitrérgicos nesta estrutura. Curiosamente, o tratamento com o AP-7 e com o NP intra-SCPdl aumentou significativamente o padrão de ativação celular do PMd. Esses dados diferem do observado anteriormente por Beijamini e Guimarães em que a administração de AP-7 foi capaz de atenuar o padrão de ativação celular dessa região e em outras estruturas do sistema defensivo. No entanto, neste trabalho a droga foi administrada por via i.c.v, podendo atuar, portanto, nas várias estruturas do sistema de defesa, incluindo o próprio PMd (BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006).

Como já dito anteriormente, a exposição ao gato mobiliza o CHMD, principalmente o PMd (CANTERAS, 2003, 2002). Este núcleo recebe densas projeções dos outros componentes deste sistema e ocupa uma posição estratégica para acionar a SCP (CANTERAS et al., 1997; CANTERAS; RIBEIRO-BARBOSA; COMOLI, 2001). A SCPdl, por outro lado, recebe uma densa projeção do PMd (CANTERAS; SWANSON, 1992), o qual parece ser um amplificador do processamento neural no CHMD, desempenhando uma importante função na iniciação do comportamento defensivo durante expressão de respostas inatas (BLANCHARD et al., 2003; COMOLI; RIBEIRO-BARBOSA; CANTERAS, 2000).

A porção dorsal do CPFm (pré-limbico dorsal e cingulado anterior) parece estar associada com comportamentos motores, enquanto que a porção ventral do córtex pré-frontal (vCPFm, PrL ventral e IL) estaria envolvida na coordenação de respostas comportamentais relacionadas com o medo e ansiedade (BISHOP, 2007; VERTES, 2006). Nesse sentido, observa-se que as áreas do vCPFm projetam-se principalmente para regiões subcorticais como, por exemplo, complexo amigdaloide, áreas hipotalâmicas e SCP (FLOYD et al., 2000; GABBOTT et al., 2005; PRICE, 2007). Adicionalmente, vários estudos têm descrito aumento na expressão da proteína Fos no CPFm ventral durante a exposição à vários estressores, tais como, exposição ao LCE, ao predador (ou ao odor), a um ambiente novo ou estresse de imobilização (CANTERAS et al., 1997; CULLINAN et al., 1995; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001; DUNCAN; KNAPP; BREESE, 1996). Já a lesão dessa região produz resultados que variam entre aumento das respostas de medo, diminuição ou até nenhum efeito (BURNS et al., 1996; HEIDBREDER; GROENEWEGEN, 2003; JINKS; MCGREGOR, 1997; LACROIX et al., 1998; SAH et al., 2003; WALL et al., 2004).

Nossos resultados mostram que a exposição ao gato não promoveu diferenças no padrão de ativação celular no Cg, PrL e IL. Esses dados diferem de resultados prévios da literatura que observaram que a exposição ao predador, ou ao seu odor, promoveu aumento da proteína Fos principalmente nas regiões PL e IL do CPFm de ratos (CANTERAS et al., 1997; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001).

Uma possível interpretação para tais resultados seria a de que além das diferenças experimentais empregadas, em situações intensas de perigo onde a fuga não é possível, ocorreria uma mudança do processamento neuronal de estruturas corticais para estruturas sub-corticais, críticas para as respostas de perigo, como por exemplo, a SCPdl. Essa interpretação corrobora estudos que mostram que estruturas corticais não são necessárias para responder apropriadamente

ao perigo (CORCORAN; QUIRK, 2007) e que as respostas de luta ou fuga são mediadas predominantemente por estruturas sub-corticais evolucionariamente preservadas, como a SCPd (BUTLER et al., 2007). Recentemente Mobbs et al. (2007) observaram em humanos a existência de uma configuração dinâmica nas estruturas que estão relacionadas com o perigo, incluindo a SCP. Esses autores observaram que circuitos neurais distintos estão envolvidos em situações de perigo distal e proximal e a ativação dessas estruturas cerebrais correlaciona-se com a experiência subjetiva do medo eliciado pelo perigo. Além disso, houve uma similaridade entre as regiões ativadas após a exposição a um predador virtual, com o padrão de ativação celular observado em modelos animais de esquiva defensiva e medo (MOBBS et al., 2007).

Nesse sentido, a SCP é proposta como sendo a via final comum do sistema defensivo, mediando reações de luta ou fuga frente a situações de perigo iminente ou dor (BLANCHARD et al., 2005). Segundo Mcnaughton e Corr (2004), essa região é o componente mais caudal (subcortical) do sistema que controla a aproximação defensiva. Considerando essa possibilidade, os resultados de Mobbs et al. (2007) em humanos, mostraram uma estreita ligação entre o prosencéfalo e mesencéfalo, onde regiões mais corticais (como o vmPFC) controlam o comportamento quando o grau de perigo é pequeno, e nos níveis extremos de perigo, a SCP pode alterar e inibir os processos de controles mais complexos quando uma resposta mais rápida e obrigatória é requerida (MOBBS et al., 2007).

Nossos dados são compatíveis com tais propostas, uma vez que a administração intra-SCPdl de AP-7 ou NP foi capaz de abolir as respostas defensivas induzidas pela exposição ao predador sem reduzir significativamente o padrão de ativação celular em estruturas mais rostrais envolvidas na elaboração do comportamento de defesa, como o PMd. Ao contrário, esta última apresenta um padrão de ativação celular ainda maior nos animais que receberam o tratamento com essas drogas do que nos animais que receberam salina e foram expostos ao gato. Em

conjunto, estes resultados sugerem que, ao bloquearmos a aferência excitatória à SCP, prejudicamos a resposta defensiva (congelamento, esquiva) ao predador, fazendo com que o animal permaneça mais tempo próximo do mesmo. Esta proximidade com o predador, no entanto, poderia estar levando a uma maior ativação de áreas rostrais à SCP, como o PMd.

Apesar das diversas evidências sugerindo a participação do PMd na modulação de medo inato, pouco foi estudado sobre os sistemas de neurotransmissores envolvidos nas respostas moduladas por este núcleo. Como esta região possui receptores ionotrópicos de glutamato (EYIGOR; CENTERS; JENNES, 2001) e células nitrérgicas (VINCENT; KIMURA, 1992) e parte dessas células nitrérgicas são ativadas durante a exposição ao gato (BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006), nós hipotetizamos que, semelhantemente à SCPdl, a inibição da neurotransmissão glutamatérgica ou nitrérgica nessa região também atenuaria as respostas comportamentais induzidas pela exposição ao predador.

De fato, nós observamos que o tratamento intra-PMd com AP-7 ou NP atenuou as respostas comportamentais observadas durante a presença do gato de maneira semelhante ao observado com a SCPdl, sugerindo que também nessa região o glutamato e o NO possam ser uns dos neurotransmissores envolvidos nas respostas promovidas por esta estrutura. Esses resultados, corroboram dados obtidos recentemente por Canteras et al. (2008), que observaram que a administração bilateral de um antagonista de rNMDA intra-PMd bloqueou significativamente as respostas defensivas observadas durante a exposição ao predador (CANTERAS et al., 2008).

Os resultados do presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

- O bloqueio da neurotransmissão glutamatérgica ou nitrérgica intra-SCPdl promoveu efeitos anti-aversivos no modelo de exposição ao gato;
- Esses efeitos foram acompanhados de redução na expressão da proteína Fos e nos neurônios nitrérgicos ativados nessa região, sem alterar ou até mesmo aumentar, o padrão de ativação celular observado em outras estruturas envolvidas com o comportamento de defesa, como o PMd. Assim, podemos sugerir que embora o bloqueio de aferências excitatórias à SCP atenua as respostas comportamentais desencadeadas pela presença do predador, a presença do estímulo aversivo ainda é detectada por estruturas mais rostrais importantes na elaboração desses comportamentos;
- De maneira semelhante ao observado com a SCPdl, o bloqueio da neurotransmissão glutamatérgica ou nitrérgica do PMd promoveu efeitos anti-aversivos, sugerindo que esses neurotransmissores também são importantes na modulação das respostas defensivas promovidas por esta estrutura.

ADAMEC, R. E.; BURTON, P.; SHALLOW, T.; BUDGELL, J. NMDA receptors mediate lasting increases in anxiety-like behavior produced by the stress of predator exposure--implications for anxiety associated with posttraumatic stress disorder. *Physiol Behav*, v.65, n.4-5, p.723-37, 1999.

ADAMEC, R. E.; SHALLOW, T. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiol Behav*, v.54, n.1, p.101-9, 1993.

AGUIAR, D. C.; MOREIRA, F. A.; GUIMARAES, F. S. Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-d-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. *Pharmacol Biochem Behav*, v.83, n.2, p.296-301, 2006.

ALBIN, R. L.; MAKOWIEC, R. L.; HOLLINGSWORTH, Z.; DURE IV, L. S.; PENNEY, J. B.; YOUNG, A. B. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience Letters*, v.118, p.112-115, 1990.

ALDERTON, W.; COOPER, C.; KNOWLES, R. Nitric oxide synthases: structures, functions and inhibition. *Biochemical Journal*, n.357, p.593-615, 2001.

AMARA, S. G.; FONTANA, A. C. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int*, v.41, n.5, p.313-8, 2002.

AMIR, S.; RACKOVER, M.; FUNK, D. Blockers of nitric oxide synthase inhibit stress activation of c-fos expression in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Neuroscience*, v.77, n.3, p.623-7, 1997.

APFELBACH, R.; BLANCHARD, C. D.; BLANCHARD, R. J.; HAYES, R. A.; MCGREGOR, I. S. The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. *Neurosci Biobehav Rev*, v.29, n.8, p.1123-44, 2005.

BANDLER, R. Induction of 'rage' following microinjections of glutamate into midbrain but not hypothalamus of cats. *Neurosci Lett*, v.30, n.2, p.183-8, 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 Res*, v.439, n.1-2, p.95-106, 1988.

BANDLER, R.; KEAY, K. A.; FLOYD, N.; PRICE, J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Res Bull*, v.53, n.1, p.95-104, 2000.

BARBARESI, P. Glutamate transporter EAAC1 in the cat periaqueductal gray matter. *Neuroscience Letters*, v.314, p.9-12, 2001.

BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev*, v.75, n.4, p.725-48, 1995.

- BECKETT, S.; MARSDEN, C. A. Computer analysis and quantification of periaqueductal grey-induced defence behaviour. *J Neurosci Methods*, v.58, n.1-2, p.157-61, 1995.
- BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol*, v.46, n.6, p.575-605, 1995.
- BEIJAMINI, V.; GUIMARAES, F. S. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. *Behav Brain Res*, v.170, n.1, p.52-61, 2006.
- BENARROCH, E. E. Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease. *Clin Auton Res*, v.15, n.4, p.254-63, 2005.
- BERGINK, V.; VAN MEGEN, H. J.; WESTENBERG, H. G. Glutamate and anxiety. *Eur Neuropsychopharmacol*, v.14, n.3, p.175-83, 2004.
- BISHOP, S. J. Neurocognitive mechanisms of anxiety: an integrative account. *Trends Cogn Sci*, v.11, n.7, p.307-16, 2007.
- BITTENCOURT, A. S.; CAROBREZ, A. P.; ZAMPROGNO, L. P.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L. C. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience*, v.125, n.1, p.71-89, 2004.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Defensive behaviors, fear and anxiety. In: R. J. Blanchard, D. C. Blanchard, *et al* (Ed.). Handbook of Anxiety and Fear. Amsterdam: Elsevier, v.17, 2008, p.63-99. (Handbook of Behavioral Neuroscience)
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol*, v.39, p.43-68, 1988.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J.; CAROBREZ ADE, P.; VENIEGAS, R.; RODGERS, R. J.; SHEPHERD, J. K. MK-801 produces a reduction in anxiety-related antipredator defensiveness in male and female rats and a gender-dependent increase in locomotor behavior. *Psychopharmacology (Berl)*, v.108, n.3, p.352-62, 1992.
- BLANCHARD, D. C.; CANTERAS, N. S.; MARKHAM, C. M.; PENTKOWSKI, N. S.; BLANCHARD, R. J. Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. *Neurosci Biobehav Rev*, v.29, n.8, p.1243-53, 2005.
- BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v.27, n.8, p.1177-85, 2003.
- BLANCHARD, D. C.; LI, C. I.; HUBBARD, D.; MARKHAM, C. M.; YANG, M.; TAKAHASHI, L. K.; BLANCHARD, R. J. Dorsal premammillary nucleus differentially

- modulates defensive behaviors induced by different threat stimuli in rats. *Neurosci Lett*, v.345, n.3, p.145-8, 2003.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol*, v.103, n.1, p.70-82, 1989.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; RODGERS, J.; WEISS, S. M. The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, v.14, n.4, p.463-72, 1990.
- BLANCHARD, R. J.; GRIEBEL, G.; HENRIE, J. A.; BLANCHARD, D. C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neurosci Biobehav Rev*, v.21, n.6, p.783-9, 1997.
- BLANCHARD, R. J.; NIKULINA, J. N.; SAKAI, R. R.; MCKITTRICK, C.; MCEWEN, B.; BLANCHARD, D. C. Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress. *Physiol Behav*, v.63, n.4, p.561-9, 1998.
- BLANCHARD, R. J.; YANG, M.; LI, C. I.; GERVACIO, A.; BLANCHARD, D. C. Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. *Neurosci Biobehav Rev*, v.25, n.7-8, p.587-95, 2001.
- BLEAKMAN, D.; LODGE, D. Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, v.37, n.10-11, p.1187-204, 1998.
- BLUNDELL, J.; ADAMEC, R.; BURTON, P. Role of NMDA receptors in the syndrome of behavioral changes produced by predator stress. *Physiol Behav*, v.86, n.1-2, p.233-43, 2005.
- BORGES, K.; DINGLEDINE, R. AMPA receptors: molecular and functional diversity. *Prog Brain Res*, v.116, p.153-70, 1998.
- BRANDAO, M. L.; DI SCALA, G.; BOUCHET, M. J.; SCHMITT, P. Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. *Pharmacol Biochem Behav*, v.24, n.3, p.497-501, 1986.
- BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, v.347, n.6295, p.768-70, 1990.
- BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.86, n.22, p.9030-3, 1989.
- BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*, v.63, p.175-95, 1994.
- BRENMAN, J. E.; CHRISTOPHERSON, K. S.; CRAVEN, S. E.; MCGEE, A. W.; BREDT, D. S. Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J Neurosci*, v.16, n.23, p.7407-15, 1996.

BRUTUS, M.; SHAIKH, M. B.; SIEGEL, A. Differential control of hypothalamically elicited flight behavior by the midbrain periaqueductal gray in the cat. *Behav Brain Res*, v.17, n.3, p.235-44, 1985.

BURNS, L. H.; ANNETT, L.; KELLEY, A. E.; EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Effects of lesions to amygdala, ventral subiculum, medial prefrontal cortex, and nucleus accumbens on the reaction to novelty: implication for limbic-striatal interactions. *Behav Neurosci*, v.110, n.1, p.60-73, 1996.

BUTLER, T.; PAN, H.; TUESCHER, O.; ENGELIEN, A.; GOLDSTEIN, M.; EPSTEIN, J.; WEISHOLTZ, D.; ROOT, J. C.; PROTOPODESCU, X.; CUNNINGHAM-BUSSEL, A. C.; CHANG, L.; XIE, X. H.; CHEN, Q.; PHELPS, E. A.; LEDOUX, J. E.; STERN, E.; SILBERSWEIG, D. A. Human fear-related motor neurocircuitry. *Neuroscience*, v.150, n.1, p.1-7, 2007.

CANTERAS, N. S. [Critical analysis of the neural systems organizing innate fear responses]. *Rev Bras Psiquiatr*, v.25 Suppl 2, p.21-4, 2003.

CANTERAS, N. S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol Biochem Behav*, v.71, n.3, p.481-91, 2002.

CANTERAS, N. S.; BLANCHARD, D. C. A behavioral and neural systems comparison of unconditioned and conditioned defensive behavior. In: R. J. Blanchard, D. C. Blanchard, *et al* (Ed.). Handbook of Anxiety and Fear. Amsterdam: Elsevier, v.17, 2008, p.141-154

CANTERAS, N. S.; CHIAVEGATTO, S.; VALLE, L. E.; SWANSON, L. W. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res Bull*, v.44, n.3, p.297-305, 1997.

CANTERAS, N. S.; GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport*, v.10, n.2, p.413-8, 1999.

CANTERAS, N. S.; KROON, J. A.; DO-MONTE, F. H.; PAVESI, E.; CAROBREZ, A. P. Sensing danger through the olfactory system: The role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. *Neurosci Biobehav Rev*, 2008.

CANTERAS, N. S.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; COMOLI, E. Tracing from the dorsal premammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses. *Neurosci Biobehav Rev*, v.25, n.7-8, p.661-8, 2001.

CANTERAS, N. S.; SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol*, v.360, n.2, p.213-45, 1995.

CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.89, n.21, p.10089-93, 1992.

- CAROBREZ, A. P. [Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety]. *Rev Bras Psiquiatr*, v.25 Suppl 2, p.52-8, 2003.
- CAROBREZ, A. P.; TEIXEIRA, K. V.; GRAEFF, F. G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neurosci Biobehav Rev*, v.25, n.7-8, p.697-709, 2001.
- CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res*, v.58, n.1-2, p.27-47, 1993.
- CHAUDHURI, A. Neural activity mapping with inducible transcription factors. *Neuroreport*, v.8, n.16, p.v-ix, 1997.
- 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.571-6, 1998.
- CLEMENTS, J. R.; MADL, J. E.; JOHSON, R. L.; LARSON, A. A.; BEITZ, A. J. Localization of glutamate, glutaminase, aspartate and aspartate aminotransferase in the rat midbrain periaqueductal gray. *Experimental Brain Research*, v.67, p.594-602, 1987.
- COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, N. S. Afferent connections of the dorsal premammillary nucleus. *J Comp Neurol*, v.423, n.1, p.83-98, 2000.
- COOK, C. J. Stress induces CRF release in the paraventricular nucleus, and both CRF and GABA release in the amygdala. *Physiol Behav*, v.82, n.4, p.751-62, 2004.
- CORCORAN, K. A.; QUIRK, G. J. Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *J Neurosci*, v.27, n.4, p.840-4, 2007.
- CULLINAN, W. E.; HERMAN, J. P.; BATTAGLIA, D. F.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*, v.64, n.2, p.477-505, 1995.
- DARWIN, C. The expression of emotion in man and animals. New York: Philosophical Library; 1985. 1872
- DAYAS, C. V.; BULLER, K. M.; DAY, T. A. Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. *Eur J Neurosci*, v.11, n.7, p.2312-22, 1999.
- DE OLIVEIRA, C. L.; DEL BEL, E. A.; GUIMARAES, F. S. Effects of L-NOARG on plus-maze performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, v.56, n.1, p.55-9, 1997.

- DE OLIVEIRA, R. M.; DEL BEL, E. A.; GUIMARAES, F. S. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. *Neurosci Biobehav Rev*, v.25, n.7-8, p.679-85, 2001.
- DE OLIVEIRA, R. W.; DEL BEL, E. A.; GUIMARAES, F. S. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Brain Res Bull*, v.51, n.6, p.457-64, 2000.
- DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. *Journal Psychopharmacology*, v.5, p.305-315, 1991.
- DEPAULIS, A.; BANDLER, R.; VERGNES, M. Characterization of pretentorial periaqueductal gray matter neurons mediating intraspecific defensive behaviors in the rat by microinjections of kainic acid. *Brain Res*, v.486, n.1, p.121-32, 1989.
- DI SCALA, G.; SCHMITT, P.; KARLI, P. Flight induced by infusion of bicuculline methiodide into periventricular structures. *Brain Res*, v.309, n.2, p.199-208, 1984.
- DIELENBERG, R. A.; HUNT, G. E.; MCGREGOR, I. S. "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience*, v.104, n.4, p.1085-97, 2001.
- DIELENBERG, R. A.; LEMAN, S.; CARRIVE, P. Effect of dorsal periaqueductal gray lesions on cardiovascular and behavioral responses to cat odor exposure in rats. *Behav Brain Res*, v.153, n.2, p.487-96, 2004.
- DUNCAN, G. E.; KNAPP, D. J.; BREESE, G. R. Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Res*, v.713, n.1-2, p.79-91, 1996.
- DUNN, R. W.; REED, T. A.; COPELAND, P. D.; FRYE, C. A. The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats following subchronic administration. *Neuropharmacology*, v.37, n.7, p.899-904, 1998.
- EROGLU, L.; CAGLAYAN, B. Anxiolytic and antidepressant properties of methylene blue in animal models. *Pharmacol Res*, v.36, n.5, p.381-5, 1997.
- EYIGOR, O.; CENTERS, A.; JENNES, L. Distribution of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the rat hypothalamus. *J Comp Neurol*, v.434, n.1, p.101-24, 2001.
- FARIA, M. S.; MUSCARA, M. N.; MORENO JUNIOR, H.; TEIXEIRA, S. A.; DIAS, H. B.; DE OLIVEIRA, B.; GRAEFF, F. G.; DE NUCCI, G. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. *Eur J Pharmacol*, v.323, n.1, p.37-43, 1997.
- FERNANDEZ DE MOLINA, A.; HUNSPERGER, R. W. Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis, and adjacent structures. *J Physiol*, v.145, n.2, p.251-65, 1959.

- FERREIRA-NETTO, C.; BORELLI, K. G.; BRANDAO, 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 Res*, v.1031, n.2, p.151-63, 2005.
- FIGUEIREDO, H. F.; BODIE, B. L.; TAUCHI, M.; DOLGAS, C. M.; HERMAN, J. P. Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology*, v.144, n.12, p.5249-58, 2003.
- FLOYD, N. S.; PRICE, J. L.; FERRY, A. T.; KEAY, K. A.; BANDLER, R. Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *J Comp Neurol*, v.422, n.4, p.556-78, 2000.
- FORESTIERO, D.; MANFRIM, C. M.; GUIMARAES, F. S.; DE OLIVEIRA, R. M. Anxiolytic-like effects induced by nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the medial amygdala of rats. *Psychopharmacology (Berl)*, v.184, n.2, p.166-72, 2006.
- FRIEBE, A.; KOESLING, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res*, v.93, n.2, p.96-105, 2003.
- FUCHS, S. A.; EDINGER, H. M.; SIEGEL, A. The organization of the hypothalamic pathways mediating affective defense behavior in the cat. *Brain Res*, v.330, n.1, p.77-92, 1985.
- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v.288, n.5789, p.373-6, 1980.
- GABBOTT, P. L.; WARNER, T. A.; JAYS, P. R.; SALWAY, P.; BUSBY, S. J. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol*, v.492, n.2, p.145-77, 2005.
- GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci*, v.14, n.2, p.60-7, 1991.
- GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res*, v.27, n.4, p.811-29, 1994.
- GRAY, J. Précis of The Neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septohipocampal system. *Behavioural and Brain Sciences*, v.5, p.469-534, 1982.
- GRAY, J.; MCNAUGHTON, N., Eds. The neuropsychology of anxiety. Oxford: Oxford Medical Publications, 2 ed. 2000.
- GRIEBEL, G.; BLANCHARD, D. C.; JUNG, A.; LEE, J. C.; MASUDA, C. K.; BLANCHARD, R. J. Further evidence that the mouse defense test battery is useful for screening anxiolytic and panicolytic drugs: effects of acute and chronic treatment with alprazolam. *Neuropharmacology*, v.34, n.12, p.1625-33, 1995.

GRIFFITH, O. W.; STUEHR, D. J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*, v.57, p.707-36, 1995.

GUIMARAES, F. S.; BEIJAMINI, V.; MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C.; DE LUCCA, A. C. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosci Biobehav Rev*, v.29, n.8, p.1313-22, 2005.

GUIMARAES, F. S.; CAROBREZ, A. P.; DE AGUIAR, J. C.; GRAEFF, F. G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology (Berl)*, v.103, n.1, p.91-4, 1991.

GUIMARAES, F. S.; DE AGUIAR, J. C.; DEL BEL, E. A.; BALLEJO, G. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *Neuroreport*, v.5, n.15, p.1929-32, 1994.

HARBUZ, M. S.; LIGHTMAN, S. L. Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. *J Endocrinol*, v.134, n.3, p.327-39, 1992.

HARRO, J. CCK and NPY as anti-anxiety treatment targets: promises, pitfalls, and strategies. *Amino Acids*, v.31, n.3, p.215-30, 2006.

HEIDBREDE, C. A.; GROENEWEGEN, H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev*, v.27, n.6, p.555-79, 2003.

HENDRIE, C. A.; WEISS, S. M.; EILAM, D. Exploration and predation models of anxiety: evidence from laboratory and wild species. *Pharmacol Biochem Behav*, v.54, n.1, p.13-20, 1996.

HERDADE, K. C.; STRAUSS, C. V.; ZANGROSSI JUNIOR, H.; VIANA, M. B. Effects of medial amygdala inactivation on a panic-related behavior. *Behav Brain Res*, v.172, n.2, p.316-23, 2006.

HESS, W. R.; BRUGGER, M. Das subkortikale Zentrum der affektiven Abwehrreaktion. *Helv Physiol Pharmacol Acta*, n.1, p.33-52, 1943.

HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, v.17, p.31-108, 1994.

HOLLMANN, M.; O'SHEA-GREENFIELD, A.; ROGERS, S. W.; HEINEMANN, S. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature*, v.342, n.6250, p.643-8, 1989.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.84, n.24, p.9265-9, 1987.

JARDIM, M. C.; AGUIAR, D. C.; MOREIRA, F. A.; GUIMARAES, F. S. Role of glutamate ionotropic and benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus on anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, v.82, n.1, p.182-9, 2005.

JARDIM, M. C.; GUIMARAES, F. S. Role of glutamate ionotropic receptors in the dorsomedial hypothalamic nucleus on anxiety and locomotor behavior. *Pharmacol Biochem Behav*, v.79, n.3, p.541-6, 2004.

JAVITT, D. C. Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*, v.9, n.11, p.984-97, 979, 2004.

JINKS, A. L.; MCGREGOR, I. S. Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Res*, v.772, n.1-2, p.181-90, 1997.

KALUEFF, A. V.; NUTT, D. J. Role of GABA in anxiety and depression. *Depress Anxiety*, v.24, n.7, p.495-517, 2007.

KAVALIERS, M.; CHOLERIS, E. Antipredator responses and defensive behavior: ecological and ethological approaches for the neurosciences. *Neurosci Biobehav Rev*, v.25, n.7-8, p.577-86, 2001.

KRIEGER, J. E.; GRAEFF, F. G. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. *Braz J Med Biol Res*, v.18, n.1, p.61-7, 1985.

KURT, M.; BILGE, S. S.; AKSOZ, E.; KUKULA, O.; CELIK, S.; KESIM, Y. Effect of sildenafil on anxiety in the plus-maze test in mice. *Pol J Pharmacol*, v.56, n.3, p.353-7, 2004.

LACROIX, L.; BROERSEN, L. M.; WEINER, I.; FELDON, J. The effects of excitotoxic lesion of the medial prefrontal cortex on latent inhibition, prepulse inhibition, food hoarding, elevated plus maze, active avoidance and locomotor activity in the rat. *Neuroscience*, v.84, n.2, p.431-42, 1998.

LI, C. I.; MAGLINAO, T. L.; TAKAHASHI, L. K. Medial amygdala modulation of predator odor-induced unconditioned fear in the rat. *Behav Neurosci*, v.118, n.2, p.324-32, 2004.

LOVICK, T. A. Panic disorder – A malfunction of multiple transmitter control systems within the midbrain periaqueductal gray matter? *Neuroscientist*, v.6, p.48-59, 2000.

MAREN, S. Neuroscience. The threatened brain. *Science*, v.317, n.5841, p.1043-4, 2007.

MATHEUS, M. G.; DE-LACERDA, J. C.; GUIMARAES, F. S. Behavioral effects of "vehicle" microinjected into the dorsal periaqueductal grey of rats tested in the elevated plus maze. *Braz J Med Biol Res*, v.30, n.1, p.61-4, 1997.

MCGREGOR, I. S.; HARGREAVES, G. A.; APFELBACH, R.; HUNT, G. E. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. *J Neurosci*, v.24, n.17, p.4134-44, 2004.

- MCGREGOR, I. S.; SCHRAMA, L.; AMBERMOON, P.; DIELENBERG, R. A. Not all 'predator odours' are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats. *Behav Brain Res*, v.129, n.1-2, p.1-16, 2002.
- MCLENNAN, H.; HUFFMAN, R. D.; MARSHALL, K. C. Patterns of excitation of thalamic neurones by amino-acids and by acetylcholine. *Nature*, v.219, n.5152, p.387-8, 1968.
- MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev*, v.28, n.3, p.285-305, 2004.
- MOBBS, D.; PETROVIC, P.; MARCHANT, J. L.; HASSABIS, D.; WEISKOPF, N.; SEYMOUR, B.; DOLAN, R. J.; FRITH, C. D. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science*, v.317, n.5841, p.1079-83, 2007.
- MOLCHANOV, M. L. Receptores metabotrópicos de glutamato na substância cinzenta periaqueductal dorsolateral: papel nas reações comportamentais de defesa. Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, Ribeirão Preto, 2003.
- 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 (Berl)*, v.160, n.1, p.30-8, 2002.
- MOLCHANOV, M. L.; GUIMARAES, F. S. Defense reaction induced by a metabotropic glutamate receptor agonist microinjected into the dorsal periaqueductal gray of rats. *Braz J Med Biol Res*, v.32, n.12, p.1533-7, 1999.
- MOREIRA, F. A.; GUIMARAES, F. G. Lack of effects of clomipramine on Fos and NADPH-diaphorase double-staining in the periaqueductal gray after exposure to an innate fear stimulus. *Physiol Behav*, 2008.
- MOREIRA, F. A.; MOLCHANOV, M. L.; GUIMARAES, F. S. Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)*, v.171, n.2, p.199-203, 2004.
- MORGAN, J. I.; CURRAN, T. Stimulus transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neuroscience*, v.12, p.459-462, 1989.
- MORROW, B. A.; REDMOND, A. J.; ROTH, R. H.; ELSWORTH, J. D. The predator odor, TMT, displays a unique, stress-like pattern of dopaminergic and endocrinological activation in the rat. *Brain Res*, v.864, n.1, p.146-51, 2000.
- MULLER, M.; FENDT, M. Temporary inactivation of the medial and basolateral amygdala differentially affects TMT-induced fear behavior in rats. *Behav Brain Res*, v.167, n.1, p.57-62, 2006.

- NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, v.258, n.5082, p.597-603, 1992.
- NASHOLD, B. S.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *Journal Neurosurgery*, v.30, p.14-24, 1969.
- NISHI, M.; HINDS, H.; LU, H. P.; KAWATA, M.; HAYASHI, Y. Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci*, v.21, n.23, p.RC185, 2001.
- NOWAK, L.; BREGESTOVSKI, P.; ASCHER, P.; HERBET, A.; PROCHIANTZ, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, v.307, n.5950, p.462-5, 1984.
- ONSTOTT, D.; MAYER, B.; BEITZ, A. J. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy. *Brain Res*, v.610, n.2, p.317-24, 1993.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*, v.54, n.5, p.581-618, 1998.
- PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v.327, n.6122, p.524-6, 1987.
- PALMER, R. M.; REES, D. D.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*, v.153, n.3, p.1251-6, 1988.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press. 1997
- PERROT-SINAL, T. S.; OSSENKOPP, K. P.; KAVALIERS, M. Brief predator odour exposure activates the HPA axis independent of locomotor changes. *Neuroreport*, v.10, n.4, p.775-80, 1999.
- PRICE, J. L. Definition of the orbital cortex in relation to specific connections with limbic and visceral structures and other cortical regions. *Ann N Y Acad Sci*, v.1121, p.54-71, 2007.
- QUOCK, R. M.; NGUYEN, E. Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice. *Life Sci*, v.51, n.25, p.PL255-60, 1992.
- RAMOS COUTINHO, M.; DA SILVA, L. F.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Modulation of tonic immobility in guinea pig PAG by homocysteic acid, a glutamate agonist. *Physiol Behav*, v.94, n.3, p.468-73, 2008.

RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. Medial prefrontal cortex NMDA receptors and nitric oxide modulate the parasympathetic component of the baroreflex. *Eur J Neurosci*, v.23, n.2, p.481-8, 2006.

RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M.; GUIMARAES, F. S. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, v.18, n.9, p.2027-35, 2008.

RODGERS, R. J. Animal models of 'anxiety': where next? *Behav Pharmacol*, v.8, n.6-7, p.477-96; discussion 497-504, 1997.

SAH, P.; FABER, E. S.; LOPEZ DE ARMENTIA, M.; POWER, J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev*, v.83, n.3, p.803-34, 2003.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol*, v.218, n.2, p.121-44, 1983.

SCHENBERG, L. C.; BITTENCOURT, A. S.; SUDRE, E. C.; VARGAS, L. C. Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev*, v.25, n.7-8, p.647-59, 2001.

SCHENBERG, L. C.; GRAEFF, F. G. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*, v.9, n.3, p.287-95, 1978.

SCHMITT, M. L.; COELHO, W.; LOPES-DE-SOUZA, A. S.; GUIMARAES, F. S.; CAROBREZ, A. P. Anxiogenic-like effect of glycine and D-serine microinjected into dorsal periaqueductal gray matter of rats. *Neurosci Lett*, v.189, n.2, p.93-6, 1995.

SCHMITT, P.; DI SCALA, G.; BRANDAO, M. L.; KARLI, P. Behavioral effects of microinjections of SR 95103, a new GABA-A antagonist, into the medial hypothalamus or the mesencephalic central gray. *Eur J Pharmacol*, v.117, n.2, p.149-58, 1985.

SEWARDS, T. V.; SEWARDS, M. A. Fear and power-dominance drive motivation: neural representations and pathways mediating sensory and mnemonic inputs, and outputs to premotor structures. *Neurosci Biobehav Rev*, v.26, n.5, p.553-79, 2002.

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. *Behav Neural Biol*, v.57, n.3, p.226-32, 1992.

SILVEIRA, M. C.; SANDNER, G.; GRAEFF, F. G. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behav Brain Res*, v.56, n.1, p.115-8, 1993.

SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Projections of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol*, v.270, n.2, p.209-42, 1988.

- SINGEWALD, N.; SALCHNER, P.; SHARP, T. Induction of c-Fos expression in specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs. *Biol Psychiatry*, v.53, n.4, p.275-83, 2003.
- SINGEWALD, N.; SHARP, T. Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry. *Neuroscience*, v.98, n.4, p.759-70, 2000.
- SNYDER, S. H.; FERRIS, C. D. Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance. *Am J Psychiatry*, v.157, n.11, p.1738-51, 2000.
- SPIACCI, A., JR.; KANAMARU, F.; GUIMARAES, F. S.; OLIVEIRA, R. M. Nitric oxide-mediated anxiolytic-like and antidepressant-like effects in animal models of anxiety and depression. *Pharmacol Biochem Behav*, v.88, n.3, p.247-55, 2008.
- SPOLIDORIO, P. C.; ECHEVERRY, M. B.; IYOMASA, M.; GUIMARAES, F. S.; DEL BEL, E. A. Anxiolytic effects induced by inhibition of the nitric oxide-cGMP pathway in the rat dorsal hippocampus. *Psychopharmacology (Berl)*, v.195, n.2, p.183-92, 2007.
- SPOOREN, W.; BALLARD, T.; GASPARINI, F.; AMALRIC, M.; MUTEL, V.; SCHREIBER, R. Insight into the function of Group I and Group II metabotropic glutamate (mGlu) receptors: behavioural characterization and implications for the treatment of CNS disorders. *Behav Pharmacol*, v.14, n.4, p.257-77, 2003.
- TOMITA, S.; NICOLL, R. A.; BREDET, D. S. PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity. *J Cell Biol*, v.153, n.5, p.F19-24, 2001.
- UWANO, T.; NISHIJO, H.; ONO, T.; TAMURA, R. Neuronal responsiveness to various sensory stimuli, and associative learning in the rat amygdala. *Neuroscience*, v.68, n.2, p.339-61, 1995.
- VERTES, R. P. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience*, v.142, n.1, p.1-20, 2006.
- VINCENT, S. R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, v.46, n.4, p.755-84, 1992.
- VOLKE, V.; KOKS, S.; VASAR, E.; BOURIN, M.; BRADWEJN, J.; MANNISTO, P. T. Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behaviour in an elevated plus-maze. *Neuroreport*, v.6, n.10, p.1413-6, 1995.
- VOLKE, V.; SOOSAAR, A.; KOKS, S.; BOURIN, M.; MANNISTO, P. T.; VASAR, E. 7-Nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, v.131, n.4, p.399-405, 1997.
- VOLKE, V.; WEGENER, G.; VASAR, E. Augmentation of the NO-cGMP cascade induces anxiogenic-like effect in mice. *J Physiol Pharmacol*, v.54, n.4, p.653-60, 2003.

WALL, P. M.; BLANCHARD, R. J.; YANG, M.; BLANCHARD, D. C. Differential effects of infralimbic vs. ventromedial orbital PFC lidocaine infusions in CD-1 mice on defensive responding in the mouse defense test battery and rat exposure test. *Brain Res*, v.1020, n.1-2, p.73-85, 2004.

WATKINS, J. C. l-glutamate as a central neurotransmitter: looking back. *Biochem Soc Trans*, v.28, n.4, p.297-309, 2000.

WILEY, J. L.; CRISTELLO, A. F.; BALSTER, R. L. Effects of site-selective NMDA receptor antagonists in an elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Eur J Pharmacol*, v.294, n.1, p.101-7, 1995.

WORKMAN, J. L.; TRAINOR, B. C.; FINY, M. S.; NELSON, R. J. Inhibition of neuronal nitric oxide reduces anxiety-like responses to pair housing. *Behav Brain Res*, 2007.

WULTSCH, T.; CHOURBAJI, S.; FRITZEN, S.; KITTELT, S.; GRUNBLATT, E.; GERLACH, M.; GUTKNECHT, L.; CHIZAT, F.; GOLFIER, G.; SCHMITT, A.; GASS, P.; LESCH, K. P.; REIF, A. Behavioural and expressional phenotyping of nitric oxide synthase-I knockdown animals. *J Neural Transm Suppl*, n.72, p.69-85, 2007.

YAMAKURA, T.; SHIMOJI, K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol*, v.59, n.3, p.279-98, 1999.

YARDLEY, C. P.; HILTON, S. M. The hypothalamic and brainstem areas from which the cardiovascular and behavioural components of the defence reaction are elicited in the rat. *J Auton Nerv Syst*, v.15, n.3, p.227-44, 1986.

ZANGROSSI, H., JR.; FILE, S. E. Chlordiazepoxide reduces the generalised anxiety, but not the direct responses, of rats exposed to cat odor. *Pharmacol Biochem Behav*, v.43, n.4, p.1195-200, 1992.

ZHANG, H. Q.; FAST, W.; MARLETTA, M. A.; MARTASEK, P.; SILVERMAN, R. B. Potent and selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by N omega-propyl-L-arginine. *J Med Chem*, v.40, n.24, p.3869-70, 1997.

ZHANG, J.; SNYDER, S. H. Nitric oxide in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v.35, p.213-33, 1995.

ZHANG, S. P.; BANDLER, R.; CARRIVE, P. Flight and immobility evoked by excitatory amino acid microinjection within distinct parts of the subtentorial midbrain periaqueductal gray of the cat. *Brain Res*, v.520, n.1-2, p.73-82, 1990.

0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
0

Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal grey attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator.

Daniele Cristina Aguiar, Francisco Silveira Guimarães*

Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto
Campus USP, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

*Corresponding author: Dr. F.S. Guimarães, Phone: +55-1636023209, Fax: 16-36332301,
Email: fsguimar@fmrp.usp.br

Running Title: Antipredator effect of midbrain NMDA/NO inhibition

Grant Information: D.C. Aguiar has a FAPESP PhD fellowship (04/09648-4). This research was supported by grants from CAPES, CNPq and FAPESP

Introduction

Rats exposed to a predator exhibit unconditioned behaviors characterized by alertness, freezing, fight/flight reactions, analgesia and autonomic changes (Blanchard and Blanchard 2008; Blanchard et al. 1990). Since these behaviors are innate and easily evoked in the laboratory, they have been extensively used to investigate the neural substrate mediating emotional responses to threatening stimuli (Blanchard et al. 2003a; Hendrie et al. 1996; Rodgers 1997). In this way, experiments employing Fos protein as a marker of neural activation has unveiled a network of interconnected brain regions comprising that the medial amygdala (MeA), various medial hypothalamic structures and the periaqueductal gray (PAG) (Bejamini and Guimaraes 2006b; Canteras et al. 1997; Canteras and Goto 1999) that is activated by predator exposure (Bejamini and Guimaraes 2006b; Canteras and Goto 1999; Dielenberg et al. 2001; Dielenberg et al. 2004). This neural system may constitute the neural basis of psychiatric disorders such as anxiety, panic and post-traumatic stress (McNaughton and Corr 2004; Swards and Swards 2002). Several studies have also suggested that these defensive responses are mediated or modulated by neurotransmitters such as glutamate, serotonin, GABA and neuropeptides (Adamec et al. 1999; Blanchard et al. 1992; McGregor et al. 2004; Moreira and Guimaraes 2008). More recently, nitric oxide (NO) has also been proposed to modulate these behaviors. In the central nervous system (CNS) NO is synthesized by the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) enzyme (Bredt and Snyder 1994). This enzyme is activated by calcium influx through glutamate N-methyl-D-aspartate receptors (nNMDA), indicating a close relationship between NO and glutamate-mediated neurotransmission (Bredt and Snyder 1994).

nNOS neurons are located in several regions related to defensive behaviors, including the dorsolateral columns of PAG (dlPAG) (Onstott et al. 1993; Vincent and Kimura 1992). Intra-dlPAG injection of NO donors and glutamate agonists induces flight reactions similar to

unconditioned fear responses to proximal danger (Aguiar et al. 2006; Bittencourt et al. 2004; Krieger and Graeff 1985). Moreover, predator exposure increases NO production (Chiavegatto et al. 1998) and induces Fos expression in NADPH-d positive neurons (a marker of NOS presence) in this region, an effect prevented by i.c.v. injection of a glutamate NMDAR antagonist (Beijamini and Guimaraes 2006b). These results suggest that NO and glutamate play an important role in aversive behaviors that involve the dlPAG. Corroborating this proposal, local injection of NOS inhibitor and glutamate antagonists induces anxiolytic effects in animal models of anxiety such as the elevated plus-maze (EPM) (Guimaraes et al. 1991; Guimaraes et al. 1994). However, the effects of local dlPAG blockade of NMDA- or NO-mediated neurotransmission on the behavior responses and cellular activation induced by predator exposure has not yet been tested. The aim of the present study, therefore, was to test the hypothesis that the injection of N-propyl-L-arginine (NP), a selective nNOS inhibitor, or AP7, a glutamate NMDAR antagonist, into this region would attenuate defensive responses induced by exposure to a live cat and modify c-Fos expression and activation of nNOS containing neurons in regions related to defensive behavior.

2. Methods

2.1. Subjects

Subjects were adult male Wistar rats (220–240 g) obtained from the colony of pathogen-free rats maintained by the Pharmacy School of Ribeirão Preto, University of Sao Paulo. The animals were housed in groups of four with free access to food and water in a temperature-controlled room (24 °C) with a 12 h light/dark cycle. An adult male cat (3 kg), kept at the animal farm of our University Campus with free access to food and water, was used throughout the study. A white dummy cat, of approximately the same size of the live cat, was used as control. The experiments were carried out according to the Brazilian Society of

Neuroscience and Behavior guidelines for care and use of Laboratory animals and all efforts were made to minimize animal suffering. The experiment protocol was approved by the local Ethical Committee (062-2004).

2.2. Drugs

2-Amino-7-phosphonoheptanoic acid (AP7; 2 nmol/0.2 μ L TOCRIS - Ellisville, Missouri; USA), a glutamate NMDA-receptor antagonist and N-propyl-L-arginine (NP; 1, 10 and 100 nmol/0.2 μ L; TOCRIS - Ellisville, Missouri; USA), a selective nNOS inhibitor, were used. The drugs were dissolved in sterile isotonic saline. The dose of AP7 was chosen based on a previous studies showing anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze and Vogel tests (Molchanov and Guimaraes 2002; Resstel et al. 2008). Although several reports have investigated the effects of NOS inhibitors in the dIPAG (Calixto et al. 2008; Guimaraes et al. 1994; Wang et al. 2001), neither of them employed a selective nNOS inhibitor such as NP. To find the best dose of NP to be used in the subsequent experiment, we initially tested several doses. These doses were based on previous results obtained after intra-medial prefrontal cortex administration (Resstel et al. 2008).

2.3. Apparatus

The observation box consisted of a rectangular arena (80cm x 22cm x 50cm) with Plexiglas walls and a metal grid floor. It was divided into two compartments by a metal grid wall.

During the experimental session the rat was placed in the compartment opposite to the live or dummy cat. The rat compartment was divided into two equal parts (close and distant to the cat compartment) by an imaginary line.

2.4. Surgery and intra-dlPAG injection

The rats were anaesthetized with 2.5% 2,2,2-tribromoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA, 10 ml/kg, IP), placed in a stereotaxic frame (David Kopf, USA) and unilaterally implanted with a stainless steel guide cannula (11 mm, length) aimed at the dlPAG (coordinates: coordinates: AP=0 from lambda, L=1.9 mm, D=4.0 mm below the surface of the skull) (Paxinos and Watson 1997). The cannula was attached to the bones with stainless steel screws and acrylic cement. An obturator inside the guide cannula prevented obstruction. Seven days after surgery, intra-dlPAG injections were performed with a thin dental needle (0.3 mm, o.d.) introduced through the guide cannula until its tip was 1mm below the cannula end. A volume of 0.2 μ L was injected during 30 s using an infusion pump (KdScientific). The movement of an air bubble inside the PE 10 polyethylene tubing connecting the pump to the dental needle confirmed drug flow. The drugs were injected ten minutes before the exposure to the observation box.

2.5. Behavioral procedure

2.5.1. Experiment 1

The animals were divided into two experimental groups: exposed to the dummy or to the live cat. During 3 days the animals were daily handled by the experimenter for 5 min and habituated to the observation box for 10 min. In the fourth day, ten minutes after intra-dlPAG injections of the vehicle or NP (1, 10 or 100 nmol/0.2 μ L), the animals were placed into the observation box and exposed to the dummy or to the live cat for 10 min. After each trial the observation box was carefully cleaned with an alcohol solution. To prevent eventual cat smell interference, exposure to the live cat always followed that of the dummy cat.

2.5.2 Experiment 2

The experimental sessions took place seven days after surgery. The animals were divided into five experimental groups: (I) naïve (II) saline + exposure to the dummy cat, (III) NP +

exposure to the dummy cat, (IV) saline + exposure to the live cat and (V) NP + exposure to the live cat. During three days all the animals but those from the naïve group were daily handled by the experimenter for five minutes and habituated to the observation box for ten minutes. In the fourth day, the animals received the intra-dlPAG injections and ten minutes later were exposed to the dummy cat or to the live cat for ten minutes. After each trial the observation box was carefully cleaned with an alcohol solution. The naïve group remained undisturbed in the home cages until the perfusion.

2.5.3 Experiment 3

The procedure was similar to experiment 2 except that the experimental groups were: (I) naïve (II) saline + exposure the dummy cat (III) AP7+ exposure the dummy cat (IV) saline + exposure the cat (V) AP7 + exposure the live cat.

All sessions were videotaped and later analyzed with the help of the Ethovision (Version 1.9, Noldus, The Netherlands) software. The program detected the animal position in the observation box and calculated the time spent and the distance moved in the area near to the cat compartment. The immobility time (freezing) was considered as the cessation of the movements except those associated with breathing and was analyzed manually by an observer that was blind to the animal's treatment.

2.7 Histology

After the behavioral tests rats from experiment 1 were sacrificed under deep urethane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA, 5 ml/kg, IP) anesthesia and perfused through the left ventricle of the heart with isotonic saline followed by 10% formalin solution. After that, a dental needle was inserted through the guide cannula and 0.2 μ L of fast-green was injected. The brains were removed and after a minimum period of 3 days immersed in a 10% formalin solution, 50 μ m sections were obtained in a Cryostat (Cryocut 1800). The injection sites were identified in

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

diagrams from the Paxinos and Watson's atlas (Paxinos and Watson 1997). The injection sites can be seen in Figure 1. Rats that received injections outside the aimed area were excluded from analysis.

2.8. *c-Fos* and *nNOS* double- immunohistochemistry

Two hours after exposure to the observation box the animals from experiments 2 and 3 were anaesthetized with an overdose of urethane and perfused transcardially with saline followed by 4% paraformaldehyde in 0.05M Tris phosphate buffer (TBS, pH 7.4). Brains were removed and post fixed over 2 h in paraformaldehyde and stored for at least 30h in 30% sucrose for cryoprotection. Coronal sections (40 μ m) were obtained in duplicate in a cryostat. The sections were first processed for c-Fos immunohistochemistry as previously described (Beijamini and Guimaraes 2006a; Beijamini and Guimaraes 2006b; de Oliveira et al. 2000). Briefly, tissue sections were washed and incubated overnight at room temperature with rabbit IgG (1/1000 into TBS, sc 52, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), which was raised against an amino-acid sequence of the N-terminal region of the peptide and specifically recognizes c-Fos. After incubation in the primary antiserum, the tissue sections were washed in TBS and sequentially incubated with a biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:1000 into TBS). Sections were then processed by the avidin-biotin immunoperoxidase method (Vectastain ABC kit, Vector Lab, Burlingame, CA, USA). c-Fos immunoreactivity (FLI) was revealed by the addition of the chromogen diaminobenzidin (Sigma -Aldrich, St. Louis, MO USA, into TBS, H₂O₂ 0.02% and nickel ammonium sulfate 1%) and visualized as a black reaction product inside the neuronal nuclei. After the c-Fos immunohistochemistry assay the same tissue sections were processed for nNOS immunohistochemistry. The sections were incubated as mentioned before, except that the primary antiserum was rabbit IgG (1/1000 into TBS, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) which was raised against C-

terminus of nNOS. nNOS immunoreactivity (nNOSIR) was revealed by the addition of the chromogen diaminobenzidin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA; into TBS, H₂O₂ 0.02%) and visualized as a brown reaction product inside the neuronal cytoplasm.

2.9 Analysis

Since the variances between groups were not homogenous the behavioral data were analyzed by the non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney *U* test. The significance level was set at $p < 0.05$. Only animals with cannula located inside the dlPAG were considered in the analysis.

The identification method of double-stained cells was similar to that described in previous works (Beijamini and Guimaraes 2006a; De Oliveira et al. 2001). The number of FLI, nNOSIR and doubled-stained cells were manually counted with the help of a computerized image analysis system (Image Pro-Plus 4.0, Media Cybernetics) to capture the images. An observer blind to group assignment performed the analysis. For each group one section from each animal was evaluated. All stained cells in the whole area of each brain region of interested were recorded. The areas of the analyzed regions were calculated and the results expressed as the number of positive cells/0.1mm². Double-stained cells were represented as percentage of nNOSIR cells. Neuroanatomical sites were identified with the help of the Paxinos and Watson's atlas (Paxinos and Watson 1997). The anterior–posterior (AP) localization from bregma of the analyzed regions were as follows: cingulated cortex 1 (Cg 1, AP: 2.7 mm), infralimbic cortex (IL, AP: 2.7 mm), prelimbic cortex (PrL, AP: 2.7 mm), medial amygdaloid nucleus (MeA, AP: -2.80 mm), lateral magnocellular part (PVNm, AP: -1.80 mm) and ventral part (PVNp, AP: -1.80 mm) of periventricular hypothalamic nucleus, dorsal preammillary nucleus of hypothalamus (PMd, AP: -4.16 mm), dorsolateral periaqueductal gray (dlPAG, AP: -7.04 mm). The immunohistochemistry data were analyzed

by the non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney U test. The significance level was set at $p < 0.05$.

In addition, in order to investigate if cat closeness was associated with neural activation in the PMd, a Pearson's analysis was performed with the rats exposed to the cat correlating the density of FLI cells and double-stained cells with the time spent near the cat.

3 Results

3.1 Experiment 1

Exposure to a live cat for 10 minutes induced a significant fear reaction reflected by a reduction in the distance moved in the compartment near the cat ($H_4 = 11.11$, Kruskal-Wallis $p = 0.0253$; Figure 2) and by increased freezing behavior ($H_4 = 13.03$, Kruskal-Wallis $p = 0.011$; Figure 2). The highest dose of NP (100 nmol) increased the distance moved in this compartment (Mann-Whitney; $p < 0.05$, Figure 2) and it also reduced freezing behavior (Mann-Whitney, $p < 0.05$; Figure C). The smallest dose of NP (1 nmol) also significantly reduced freezing behavior (Mann-Whitney, $p < 0.05$; Figure 2) but the other parameters analyzed were not different from the live cat group. For this reason, we choose the dose of 100 nmol to use in the subsequent experiment.

3.2 Experiment 2

As in the previous experiment, rats exposed to a live cat exhibited a significant fear reaction, reflected by a reduction in the distance moved in the compartment near the cat ($H_3 = 12.33$, Kruskal-Wallis $p = 0.006$; Figure 3) and in the time spent in this compartment ($H_3 = 10.32$, Kruskal-Wallis $p = 0.016$; Figure 3). These animals also displayed increased freezing behavior when compared to those exposed to the dummy cat ($H_3 = 16.451$, Kruskal-Wallis $p = 0.0009$; Figure 3). NP pre-treatment in the dIPAG significantly increased the distance moved by the

1
2
3 animals in the compartment near the cat and reduced freezing behavior induced by predator
4 exposure as compared to saline/cat group (Mann-Whitney, $p < 0.05$).
5
6

7
8 The immunohistochemistry results can be seen in Table 1. Exposure to the live cat induced a
9 significant increase in FLI cells compared to naïve group in the ipsi ($H_4 = 15.43$, Kruskal-
10 Wallis $p = 0.0039$) and in the contralateral ($H_4 = 10.32$, Kruskal-Wallis $p = 0.0354$) sides of the
11 dlPAG, in the PMd ($H_4 = 9.60$, Kruskal-Wallis $p = 0.048$) and in the PVNm ($H_4 = 12.20$,
12 Kruskal-Wallis $p = 0.016$). There were no differences for FLI cells in PVNp, MeA, PrL, IL
13 and Cg1. Additionally there was no difference among groups in the number of nNOS positive
14 cells in any of the analyzed structures.
15
16

17
18 Predator exposure also induced a significant increase in the percentage of double-stained cells
19 compared to naïve in the contralateral side of the dlPAG ($H_4 = 12.43$, $p = 0.0145$) and in the
20 PMd ($H_4 = 9.60$, $p = 0.048$). There were no differences between groups for double-stained cells
21 in the PrL, IL, Cg1, PVNp and PVNm and in the ipsilateral dlPAG.
22
23

24
25 Due to the intense packing of nNOS cells and fibers processes in the MeA quantification of
26 these positive cells was not possible. As a consequence, the number of double-stained cells in
27 this area was represented as an absolute number. No difference was found among groups.
28
29

30
31 NP treatment in the dlPAG attenuated the increase in FLI induced by predator exposure in
32 both sides of the dlPAG and in the PVNm. The drug also induced a significant decrease in the
33 percentage of double-stained cells compared to the saline cat/group in the contralateral dlPAG
34 (Mann-Whitney, $p < 0.05$). On the other hand, in the PMd intra-dlPAG NP administration
35 induced a significant increase in FLI (Mann-Whitney, $p < 0.05$) and in double-stained cells
36 (Mann-Whitney, $p < 0.05$) compared to saline/dummy exposed rats. There were no significant
37 effects in the other structures quantified.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Experiment 3

As previously observed, rats exposed to a live cat exhibited a significant fear reaction reflected by a reduction in time spent ($H_3 = 17.64$, Kruskal-Wallis $p = 0.0005$; Figure 4) and in distance moved in the compartment near the cat ($H_3 = 27.31$, Kruskal-Wallis $p = 0.0001$; Figure 4). As in the previous experiments, these animals also displayed increased freezing behavior when compared to the dummy cat ($H_3 = 27.37$, Kruskal-Wallis $p = 0.0001$; Figure 4). AP7 pre-treatment in the dlPAG reduced the behavioral consequences of predator exposure in all parameters quantified (Figure 4).

The immunohistochemistry results can be seen in Table 2. Similar to the results of Experiment 2, exposure to the live cat induced a significant increase in FLI cells compared to naïve group in the ipsi ($H_4 = 21.46$, Kruskal-Wallis $p = 0.0003$) and in the contralateral ($H_4 = 9.53$, Kruskal-Wallis $p = 0.049$) side of the dlPAG, in the PMd ($H_4 = 11.87$, $p = 0.018$) and in the PVNp ($H_4 = 9.19$, Kruskal-Wallis $p = 0.056$). There were no differences for FLI cells in MeA, PVNm, PrL, IL and Cg1. Additionally, there was no difference among groups in the number of nNOS positive cells in any of the analyzed structures.

Predator exposure also induced a significant increase in the percentage of double-stained cells compared to naïve in the ipsi ($H_4 = 17.1391$, Kruskal-Wallis $p = 0.0018$). There were no differences between groups for double-stained cells in the PrL, IL, Cg1, PVNp, PVNm and in the contra-lateral side of the dlPAG.

AP7 treatment significantly attenuated the increase in FLI (Mann-Whitney, $p < 0.05$) and double-stained cells induced by predator exposure in the ipsilateral dlPAG. Although there was a trend for a reduction in the contralateral dlPAG, PVNp and PVNm, the AP7/cat group was not different from the control groups.

1
2
3 Similar to the results obtained with NP, in the PMd AP7 induced a significant increase in FLI
4 (Mann-Whitney, $p < 0.05$) and in the percentage of double-stained cells (Mann-Whitney,
5
6
7
8
9
10 $p < 0.05$) compared to saline/cat group.

11 A Pearson's correlation analysis with all the 15 animals with sessions containing the PMd that
12 were exposed to the cat showed that the time spent near the cat correlated with both the
13 density of FLI cells ($r = 0.7597$, $p = 0.001$; Figure 5) and the percentage of double-stained cells
14 ($r = 0.6057$, $p = 0.017$; Figure 5, lower panel), meaning that the near the predator the higher the
15 neural activation of the PMd.
16
17
18
19
20
21
22
23

24 Discussion

25
26
27 Cat exposure produced a robust fear reaction, characterized by freezing behavior and
28 avoidance of the area near the predator compartment. These results are in agreement with
29 previous data reporting reduction in overall locomotor activity after live cat exposure
30 (Beijamini and Guimaraes 2006b; Blanchard and Blanchard 1989; Canteras et al. 1997;
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

These data indicate that the blockade of nitrenergic or glutamatergic neurotransmission in the dIPAG is able to attenuate the effects of predator exposure. These results corroborate a previous work from our group showing that *i.c.v.* microinjection of AP7 attenuated the behavioral consequences of live cat exposure (Beijamini and Guimaraes 2006b). Similar results were obtained after systemic administration of the non-competitive NMDA receptor antagonist MK801, which produced a reduction in defensiveness behavior of rats exposed to a cat (Blanchard et al. 1992). Moreover, systemic administration of AP7 blocked the long-lasting increase in anxiety-like behavior produced by predator exposure (Adamec et al. 1999). Additionally, it was also observed the involvement of

1
2
3 NMDA receptors in the defensive behavior modulated by the dorsal PAG in guinea pig
4
5 (Ramos Coutinho et al. 2008). Although there were no reports showing the effects of NOS
6
7 inhibitors in this model, several studies have detected anxiolytic-like effects of these drugs
8
9 after systemic or intra-PAG administration [for review, see (Guimaraes et al. 2005)].
10
11

12 Furthermore, exposure to a predator activates neurons containing NOS in brain areas related
13
14 to defensive reactions, including the dlPAG (Beijamini and Guimaraes 2006b; Moreira and
15
16 Guimaraes 2008).
17
18

19
20 In the present study, cat exposure induced an increase in c-Fos expression in the dlPAG, PMd
21
22 and PVN. These effects are in agreement with other studies showing that threatening stimuli
23
24 such as live predator or its odor result in an increase in the number of c-Fos positive cells in
25
26 the PAG and hypothalamic nuclei (Beijamini and Guimaraes 2006b; Blanchard et al. 2005;
27
28 Canteras et al. 1997; Canteras and Goto 1999; Dielenberg et al. 2001). These structures,
29
30 together with the medial amygdala, comprise the circuitry responsible for integrating innate
31
32 fear responses. In line with this view, the dlPAG is activated by different stressful stimuli,
33
34 including immobilization (Cullinan et al. 1995), exposure to a novel open field (Nagahara and
35
36 Handa 1997), foot shocks (Campeau et al. 1997b) and audiogenic stress (Campeau et al.
37
38 1997a). Although no significant differences in the number of nNOS positive cells were found,
39
40 cat exposure significantly increased the percentage of double-stained cells in the dlPAG.
41
42
43
44

45
46 These results agree with previous reports from our group (Beijamini and Guimaraes 2006b;
47
48 Moreira and Guimaraes 2008) and suggest that innate fear reactions involve activation of NO
49
50 producing neurons in this region. Corroborating this proposal, increased levels of citrulline
51
52 (an indirect measure of the formation of NO) and cGMP in the dorsal periaqueductal gray
53
54 have been reported after predator exposure (Chiavegatto et al. 1998).
55
56

57
58 Microinjections of AP7 or NP into the dlPAG reduced local cellular activation induced by cat
59
60 exposure. These effects were also accompanied by a reduction in the percentage of double-

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

stained cells. These data are in agreement with our previous work showing reduction of neuronal activation after blockade of glutamate NMDA receptors by *i.c.v.* administration of AP7.

Live cat exposure also induces a significant increase in c-Fos immunoreactivity and in the percentage of double-stained cells in the PMd. This structure is a component of the medial hypothalamic defense zone proposed to be essential for responses to a predatory threat (Canteras 2003; Canteras and Blanchard 2008; Canteras et al. 2008; Canteras et al. 2001). In line with this view, this hypothalamic site is strongly activated after predator cues (Beijamini and Guimaraes 2006b; Canteras et al. 2001; Dielenberg et al. 2001). Moreover, electrolytic or excitotoxic lesions of the PMd in rats severely reduced defensives response to a live cat and its odor (Blanchard et al. 2003a; Blanchard et al. 2003b; Canteras et al. 1997). Interestingly, in the present study animals that received AP7 or NP into the dlPAG and were exposed to live cat showed a greater c-Fos expression and increased number of activated nitrergic neurons in the PMd. These results are different from those previously obtained by our group, which showed that *i.c.v.* administration of AP7 attenuated the cellular consequences of predator exposure in the PMd and in other structures related with defensive behavior (Beijamini and Guimaraes 2006b). One possibility for this discrepancy is that in the first study the drug was administrated *i.c.v.*, probably reaching the PMd and diverse other structures related to defensive system. In the present experiment the local blocked of NMDA- or nitric oxide-mediated neurotransmission in the dlPAG, by attenuating the predator-induced defensive responses, increased the time the animal remained near the cat. Since the PMd has been proposed as an amplifier of defensive responses to predators (Canteras and Blanchard 2008; Canteras et al. 2008), this latter effect could help to explain the apparent paradox of a higher activation of a brain structure closely related to defensive responses in animals displaying reduced fear signals. This possibility is reinforced by the significant positive correlation

1
2
3
4 between proximity to the cat and neural activation of the PMd. The significant correlation
5
6 between the number of double-labeled cells and time near the cat also suggests that NO-
7
8 mediated neurotransmission could modulate defensive responses to a predator in this nucleus.
9
10 Cat exposure also induced activation of the PVN, a complex structure responsible for
11
12 maintenance of individual homeostasis and integrates behavioral, autonomic and endocrine
13
14 responses to stress, modulating the release of corticotrophin releasing hormone (CRH),
15
16 oxytocin and vasopressin (Benarroch 2005; Harbuz and Lightman 1992; Sawchenko and
17
18 Swanson 1983). Rodents exposed to a live cat or to its odor displayed increases in plasmatic
19
20 levels of corticosterone and increases CRH mRNA in the PVN (Morrow et al. 2000; Perrot-
21
22 Sinal et al. 1999). Despite contradictory results, most studies support the hypothesis that NO
23
24 modulates the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by stressors. Moreover,
25
26 restraint stress induces an increase in NOS expression (De Oliveira et al. 2001) and activates
27
28 NOS neurons in the PVN (Amir et al. 1997). This activation was blocked by pre-treatment
29
30 with a NOS inhibitor, 7NI (Amir et al. 1997). Probably reflecting a decreased stress response,
31
32 in our work the cellular activation induced by the live cat in the PVN was attenuated by intra-
33
34 dIPAG administration of AP7.
35
36
37
38
39
40

41 Several studies have suggested that the MeA is involved in innate fear responses during
42
43 encounters with a predator (Blanchard et al. 2005; Canteras and Blanchard 2008; Dielenberg
44
45 et al. 2001; McGregor et al. 2004; Muller and Fendt 2006). The posteroventral part of the
46
47 MeA, which is a component of the vomeronasal pathway, seems to be particularly related to
48
49 the processing pheromone-like of predator odor (Canteras and Blanchard 2008; McGregor et
50
51 al. 2004). Moreover, excitotoxic lesions in the MeA induced a significant reduction in
52
53 unconditioned fear related to predator odor (Li et al. 2004). In the present study, however, we
54
55 failed to replicate the increase in MeA activation after predator exposure. Although we have
56
57 no explanation for this lack of activation, there was a clear trend in this direction, suggesting
58
59
60

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

that the higher data variability observed in cat-exposed animals compared to controls could have prevented the differences to become significant.

Among other structures related to defensive reactions the medial prefrontal cortex (mPFC) has been implicated in fear and anxiety-related processes (Resstel et al. 2006b; Vertes 2006). The ventral regions of the mPFC (PL/IL) have been functionally linked to subcortical structures related to defensive behavior such as the amygdala, hippocampus, hypothalamus and PAG (Floyd et al. 2000; Gabbott et al. 2005; Price 2007). In addition, exposure to different stressful stimuli such as EPM, novel-environment, immobilization and predator exposure increases Fos expression in the PL (Canteras et al. 1997; Cullinan et al. 1995; Dielenberg et al. 2001; Duncan et al. 1996).

In the present study no cellular effects were detected in the mPFC. Although several pieces of evidence indicate the involvement of this region in the modulation of defensive responses, its precise role is still controversial. For example, studies employing lesions of the mPFC have showed increase, decrease or no change in anxiety-like responses (Burns et al. 1996; Heidbreder and Groenewegen 2003; Jinks and McGregor 1997; Lacroix et al. 1998; Sah et al. 2003; Shah and Treit 2003; Wall et al. 2004). The mPFC seems to be also important for the expression of contextual fear (Corcoran and Quirk 2007; Resstel et al. 2008; Resstel et al. 2006a) but not for the expression of innate fear (Corcoran and Quirk 2007). One possibility to explain these findings is that under high-threat situations, where avoidance is impossible, a shift from cortical to subcortical processing during danger occurs. In support to this possibility, several studies have shown that fight or flight behaviors are essentially mediated by phylogenetically older sub-cortical structures such as the dorsal periaqueductal gray (Mobbs et al. 2007; Sewards and Sewards 2002). This structure has been assigned in the lowest level of control of the defensive system, coordinating defensive behaviors to proximal threatening stimuli (Blanchard et al. 2005; McNaughton and Corr 2004). Corroborating this

possibility Mobbs et al (2007), using a virtual predator model in volunteers, showed that brain activation shifts from the ventromedial prefrontal cortex to the central amygdala and periaqueductal gray as the predator gets closer to the subject (Mobbs et al. 2007). These results reinforce the proposal that cortical structures such as the mPFC organize defensive behaviors when the threat is remote. Proximity to the threat, on the other hand, would engage the dorsal PAG and inhibit cortical structures (Mobbs et al. 2007). Our results, by showing that injection of a glutamate antagonist or a NOS inhibitor into the dlPAG attenuated the defensive behaviors induced by predator exposure, are in agreement with this hypothesis. In conclusion, our results suggest that glutamate- and NO-mediated neurotransmission in the dlPAG play an essential role in responses elicited by predator exposure. Blocking these neurotransmitter systems in this brain area impairs defensive responses. The greater time spent near the predator that follows this effect could be responsible for an increased cellular activation of the PMd, a more rostral brain area that is also closely related to these defensive responses.

Acknowledgments

We thank J.C. de Aguiar and E.T. Gomes for the excellent technical support and to Dr. L. Resstel for help in the figures edition.

Abbreviations

AP7, 2-Amino-7-phosphonoheptanoic acid; CNS, central nervous system; Cg 1, cingulate cortex; cGMP, cyclic guanosine 3':5'-monophosphate; CRH, corticotrophin releasing hormone; dlPAG, dorsolateral periaqueductal grey; EPM, elevated plus-maze; FLI, c-Fos immunoreactivity; IL, infralimbic cortex; MeA, medial amygdaloid nucleus; mPFC, medial prefrontal cortex; NMDAR, N-methyl-D-aspartate receptors, nNOS, neuronal nitric oxide synthase; nNOSIR, nNOS immunoreactivity; NO, nitric oxide; NP, N-propyl-L-arginine; %

1
2
3 DS, percentage of double stained cells; PAG, periaqueductal gray; PMd, dorsal
4 preammillary nucleus; PrL, prelimbic cortex; PVN (m or p), periventricular nucleus of
5
6
7 hypothalamus (lateral magnocellular part and ventral part); TBS, Tris phosphate buffer
8
9
10
11
12
13
14
15

16 References

- 17
18
19
20
21 Adamec RE, Burton P, Shallow T, Budgell J. 1999. NMDA receptors mediate lasting
22 increases in anxiety-like behavior produced by the stress of predator exposure--
23 implications for anxiety associated with posttraumatic stress disorder. *Physiol Behav*
24 65(4-5):723-737.
25
26 Aguiar DC, Moreira FA, Guimaraes FS. 2006. Flight reactions induced by injection of
27 glutamate N-methyl-d-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral
28 periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. *Pharmacol*
29 *Biochem Behav* 83(2):296-301.
30
31 Amir S, Rackover M, Funk D. 1997. Blockers of nitric oxide synthase inhibit stress activation
32 of c-fos expression in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat.
33 *Neuroscience* 77(3):623-627.
34
35 Beijamini V, Guimaraes FS. 2006a. Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide
36 synthase following exposure to an elevated plus maze. *Brain Res Bull* 69(4):347-355.
37
38 Beijamini V, Guimaraes FS. 2006b. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive
39 neurons after exposure to a live cat. *Behav Brain Res* 170(1):52-61.
40
41 Benarroch EE. 2005. Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease.
42 *Clin Auton Res* 15(4):254-263.
43
44 Bittencourt AS, Carobrez AP, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC. 2004. Organization of
45 single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal
46 gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors.
47 *Neuroscience* 125(1):71-89.
48
49 Blanchard DC, Blanchard RJ. 2008. Defensive behaviors, fear and anxiety. In: Blanchard RJ,
50 Blanchard DC, Griebel G, Nutt D, editors. *Handbook of Anxiety and Fear*. 1 ed.
51 Amsterdam: Elsevier. p 63-99.
52
53 Blanchard DC, Blanchard RJ, Carobrez Ade P, Veniegas R, Rodgers RJ, Shepherd JK. 1992.
54 MK-801 produces a reduction in anxiety-related antipredator defensiveness in male
55 and female rats and a gender-dependent increase in locomotor behavior.
56 *Psychopharmacology (Berl)* 108(3):352-362.
57
58 Blanchard DC, Canteras NS, Markham CM, Pentkowski NS, Blanchard RJ. 2005. Lesions of
59 structures showing FOS expression to cat presentation: effects on responsivity to a
60 Cat, Cat odor, and nonpredator threat. *Neurosci Biobehav Rev* 29(8):1243-1253.
61
62 Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. 2003a. Conditioning and residual emotionality
63 effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. *Prog*
64 *Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(8):1177-1185.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- Blanchard DC, Li CI, Hubbard D, Markham CM, Yang M, Takahashi LK, Blanchard RJ. 2003b. Dorsal premammillary nucleus differentially modulates defensive behaviors induced by different threat stimuli in rats. *Neurosci Lett* 345(3):145-148.
- Blanchard RJ, Blanchard DC. 1989. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol* 103(1):70-82.
- Blanchard RJ, Blanchard DC, Rodgers J, Weiss SM. 1990. The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 14(4):463-472.
- Bredt DS, Snyder SH. 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 63:175-195.
- Burns LH, Annett L, Kelley AE, Everitt BJ, Robbins TW. 1996. Effects of lesions to amygdala, ventral subiculum, medial prefrontal cortex, and nucleus accumbens on the reaction to novelty: implication for limbic-striatal interactions. *Behav Neurosci* 110(1):60-73.
- Calixto AV, Duarte FS, Moraes CK, Faria MS, De Lima TC. 2008. Nitric oxide involvement and neural substrates of the conditioned and innate fear as evaluated in the T-maze test in rats. *Behav Brain Res* 189(2):341-349.
- Campeau S, Akil H, Watson SJ. 1997a. Lesions of the medial geniculate nuclei specifically block corticosterone release and induction of c-fos mRNA in the forebrain associated with audiogenic stress in rats. *J Neurosci* 17(15):5979-5992.
- Campeau S, Falls WA, Cullinan WE, Helmreich DL, Davis M, Watson SJ. 1997b. Elicitation and reduction of fear: behavioural and neuroendocrine indices and brain induction of the immediate-early gene c-fos. *Neuroscience* 78(4):1087-1104.
- Canteras NS. 2003. [Critical analysis of the neural systems organizing innate fear responses]. *Rev Bras Psiquiatr* 25 Suppl 2:21-24.
- Canteras NS, Blanchard DC. 2008. A behavioral and neural systems comparison of unconditioned and conditioned defensive behavior. In: Blanchard RJ, Blanchard DC, Griebel G, Nutt D, editors. *Handbook of Anxiety and Fear*. Amsterdam: Elsevier. p 141-154.
- Canteras NS, Chiavegatto S, Valle LE, Swanson LW. 1997. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res Bull* 44(3):297-305.
- Canteras NS, Goto M. 1999. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport* 10(2):413-418.
- Canteras NS, Kroon JA, Do-Monte FH, Pavesi E, Carobrez AP. 2008. Sensing danger through the olfactory system: The role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. *Neurosci Biobehav Rev*.
- Canteras NS, Ribeiro-Barbosa ER, Comoli E. 2001. Tracing from the dorsal premammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses. *Neurosci Biobehav Rev* 25(7-8):661-668.
- Chiavegatto S, Scavone C, Canteras NS. 1998. Nitric oxide synthase activity in the dorsal periaqueductal gray of rats expressing innate fear responses. *Neuroreport* 9(4):571-576.
- Corcoran KA, Quirk GJ. 2007. Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *J Neurosci* 27(4):840-844.
- Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ. 1995. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64(2):477-505.
- De Oliveira RM, Del Bel EA, Guimaraes FS. 2001. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. *Neurosci Biobehav Rev* 25(7-8):679-685.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- de Oliveira RW, Del Bel EA, Guimaraes FS. 2000. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Brain Res Bull* 51(6):457-464.
- 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(4):1085-1097.
- Dielenberg RA, Leman S, Carrive P. 2004. Effect of dorsal periaqueductal gray lesions on cardiovascular and behavioral responses to cat odor exposure in rats. *Behav Brain Res* 153(2):487-496.
- Duncan GE, Knapp DJ, Breese GR. 1996. Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Res* 713(1-2):79-91.
- Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R. 2000. Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *J Comp Neurol* 422(4):556-578.
- Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ. 2005. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 492(2):145-177.
- Guimaraes FS, Bejamini V, Moreira FA, Aguiar DC, de Lucca AC. 2005. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosci Biobehav Rev* 29(8):1313-1322.
- Guimaraes FS, Carobrez AP, De Aguiar JC, Graeff FG. 1991. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology (Berl)* 103(1):91-94.
- Guimaraes FS, de Aguiar JC, Del Bel EA, Ballejo G. 1994. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *Neuroreport* 5(15):1929-1932.
- Harbuz MS, Lightman SL. 1992. Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. *J Endocrinol* 134(3):327-339.
- Heidbreder CA, Groenewegen HJ. 2003. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev* 27(6):555-579.
- Hendrie CA, Weiss SM, Eilam D. 1996. Exploration and predation models of anxiety: evidence from laboratory and wild species. *Pharmacol Biochem Behav* 54(1):13-20.
- Jinks AL, McGregor IS. 1997. Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Res* 772(1-2):181-190.
- Krieger JE, Graeff FG. 1985. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. *Braz J Med Biol Res* 18(1):61-67.
- Lacroix L, Broersen LM, Weiner I, Feldon J. 1998. The effects of excitotoxic lesion of the medial prefrontal cortex on latent inhibition, prepulse inhibition, food hoarding, elevated plus maze, active avoidance and locomotor activity in the rat. *Neuroscience* 84(2):431-442.
- Li CI, Maglinao TL, Takahashi LK. 2004. Medial amygdala modulation of predator odor-induced unconditioned fear in the rat. *Behav Neurosci* 118(2):324-332.
- McGregor IS, Hargreaves GA, Apfelbach R, Hunt GE. 2004. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. *J Neurosci* 24(17):4134-4144.
- McNaughton N, Corr PJ. 2004. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev* 28(3):285-305.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ, Frith CD. 2007. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science* 317(5841):1079-1083.
- Molchanov ML, Guimaraes FS. 2002. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 160(1):30-38.
- Moreira FA, Guimaraes FG. 2008. Lack of effects of clomipramine on Fos and NADPH-diaphorase double-staining in the periaqueductal gray after exposure to an innate fear stimulus. *Physiol Behav.*
- Morrow BA, Redmond AJ, Roth RH, Elsworth JD. 2000. The predator odor, TMT, displays a unique, stress-like pattern of dopaminergic and endocrinological activation in the rat. *Brain Res* 864(1):146-151.
- Muller M, Fendt M. 2006. Temporary inactivation of the medial and basolateral amygdala differentially affects TMT-induced fear behavior in rats. *Behav Brain Res* 167(1):57-62.
- Nagahara AH, Handa RJ. 1997. Age-related changes in c-fos mRNA induction after open-field exposure in the rat brain. *Neurobiol Aging* 18(1):45-55.
- Onstott D, Mayer B, Beitz AJ. 1993. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy. *Brain Res* 610(2):317-324.
- Paxinos G, Watson C. 1997. *The rat brain in stereotaxic coordinates*: New York, Academic Press.
- Perrot-Sinal TS, Ossenkopp KP, Kavaliers M. 1999. Brief predator odour exposure activates the HPA axis independent of locomotor changes. *Neuroreport* 10(4):775-780.
- Price JL. 2007. Definition of the orbital cortex in relation to specific connections with limbic and visceral structures and other cortical regions. *Ann N Y Acad Sci* 1121:54-71.
- Ramos Coutinho M, da Silva LF, Menescal-de-Oliveira L. 2008. Modulation of tonic immobility in guinea pig PAG by homocysteic acid, a glutamate agonist. *Physiol Behav* 94(3):468-473.
- Resstel LB, Correa FM, Guimaraes FS. 2008. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 18(9):2027-2035.
- Resstel LB, Joca SR, Guimaraes FG, Correa FM. 2006a. Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience* 143(2):377-385.
- Resstel LB, Joca SR, Moreira FA, Correa FM, Guimaraes FS. 2006b. Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res* 172(2):294-298.
- Rodgers RJ. 1997. Animal models of 'anxiety': where next? *Behav Pharmacol* 8(6-7):477-496; discussion 497-504.
- Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J. 2003. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83(3):803-834.
- Sawchenko PE, Swanson LW. 1983. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 218(2):121-144.
- Sewards TV, Sewards MA. 2002. Fear and power-dominance drive motivation: neural representations and pathways mediating sensory and mnemonic inputs, and outputs to premotor structures. *Neurosci Biobehav Rev* 26(5):553-579.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- Shah AA, Treit D. 2003. Excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex attenuate fear responses in the elevated-plus maze, social interaction and shock probe burying tests. *Brain Res* 969(1-2):183-194.
- Vertes RP. 2006. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142(1):1-20.
- Vincent SR, Kimura H. 1992. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46(4):755-784.
- Wall PM, Blanchard RJ, Yang M, Blanchard DC. 2004. Differential effects of infralimbic vs. ventromedial orbital PFC lidocaine infusions in CD-1 mice on defensive responding in the mouse defense test battery and rat exposure test. *Brain Res* 1020(1-2):73-85.
- Wang MR, Kuo JS, Chai CY. 2001. Nitric oxide produces different actions in different areas of the periaqueductal grey in cats. *Neurosci Lett* 309(1):57-61.

Figure Legends

Figure 1: Histological localization of injection sites from experiment 1 in diagrams based on the atlas of Paxinos & Watson, 1997. Closed and open circles represent the injection sites inside and outside the dlPAG, respectively.

Figure 2: Effects of NP (1, 10 or 100 nmol/0.2 μ L) injected into the dlPAG in the distance moved (cm) and time spent (s) in the compartment near the cat and in immobility time (s) after exposure to a live cat for 10 min. Data represented the means \pm S.E.M. of 3-5 animals per group (* $p < 0.05$ compared to toy cat and # $p < 0.05$ compared to live cat, Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney test).

Figure 3: NP (100 nmol/0.2 μ L) injected into the dlPAG increased the distance moved (cm), time spent (s) in the compartment near the cat and immobility time (s) after exposure to a live cat. Data represented the means \pm S.E.M of 4-6 animals per group (* $p < 0.05$ compared to dummy cat and # $p < 0.05$ compared to live cat, Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney test).

Figure 4: AP7 (2 nmol/0.2 μ L) injected into the dlPAG increased the distance moved (cm) and time spent (s) in the compartment near the cat and immobility time (s) after exposure to a live cat. Data are represented by mean \pm S.E.M of 9-10 animals per group (* $p < 0.05$ compared to dummy cat and # $p < 0.05$ compared to live cat, Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney test).

Figure 5: Correlations between time spent near the live cat and the densities of FLI (upper panel) and percentage of double-stained cells (lower panel) in the PMd of rats (n=15) exposed

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

to the cat. The data were analyzed by Pearson's correlation ($r=0.7597$ and $p=0.001$ for the FLI cells; $r=0.6057$ and $p=0.017$ for the percentage of double-stained cells).

Figure 6: Photomicrographs showing c-Fos immunohistochemistry (arrowhead), nNOS immunohistochemistry (black arrow) and double-stained neurons (white arrow) in the paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN), PMd and dlPAG of naïve (A), rats exposed to a dummy cat (B), rats exposed to a live cat (C), rats treated with intra-dlPAG AP7 exposed to a live cat (D) and rats treated with intra-dlPAG NP exposed to a live cat (E). Scale bar: 150 μm .

Table 1: Effects of intra-dIPAG injection of NP (100 nmol/0.2 μ L) in the number of c-FOS positive cells, nNOS positive cells and percentage of double-stained cells in brain regions of rats exposed to a toy or a live cat.

		Naive	saline/dummy	NP/dummy	Saline/Cat	NP/Cat
Cg1	FOS	4.07 \pm 2.86	9.13 \pm 3.13	2.34 \pm 1.91	11.72 \pm 4.06	3.24 \pm 1.54
	nNOS	8.67 \pm 1.56	14.47 \pm 3.96	8.08 \pm 0.97	16.00 \pm 5.24	8.57 \pm 1.25
	% double stained	0.5 \pm 0.5	1.69 \pm 1.0	0	0.81 \pm 0.8	0
IL	FOS	4.65 \pm 3.43	5.49 \pm 3.10	4.10 \pm 0.54	2.34 \pm 1.94	0.65 \pm 3.43
	nNOS	7.63 \pm 1.8	10.6 \pm 3.6	9.38 \pm 2.24	5.90 \pm 1.7	5.12 \pm 1.1
	% double stained	1.05 \pm 1.1	2.46 \pm 2.5	1.15 \pm 1.2	0	0
PrL	FOS	5.56 \pm 5.54	6.39 \pm 2.55	6.47 \pm 4.94	5.01 \pm 2.86	0.70 \pm 0.46
	nNOS	7.83 \pm 3.3	12.3 \pm 3.4	15.5 \pm 4.7	7.03 \pm 1.9	5.55 \pm 1.1
	% double stained	0.32 \pm 0.32	0	0.83 \pm 0.83	2.40 \pm 1.6	0
PVNm	FOS	0	6.81 \pm 4.78 *	1.95 \pm 1.12 *	7.14 \pm 2.82 *	2.59 \pm 1.42 *
	nNOS	89.33 \pm 5.57	102.52 \pm 1.18	75.92 \pm 29.83	115.07 \pm 9.13	78.95 \pm 16.78
	% double stained	0.37 \pm 0.24	0.64 \pm 0.44	1.19 \pm 0.73	1.44 \pm 0.98	2.32 \pm 1.70
PVNP	FOS	5.62 \pm 2.31	9.08 \pm 5.21	10.38 \pm 4.56	15.57 \pm 7.99	14.53 \pm 7.72
	nNOS	199.86 \pm 15.74	260.2 \pm 23.83	162.21 \pm 8.85	227.1 \pm 29.03	214.65 \pm 20.09
	% double stained	0.37 \pm 0.24	0.64 \pm 0.44	1.19 \pm 0.73	1.44 \pm 0.98	2.32 \pm 1.70

MeA	FOS	5.84 ± 4.88	2.27 ± 2.27	0.43 ± 0.43	22.06 ± 17.76	12.71 ± 9.46
	Double stained ^a	1.29 ± 1.1	0.65 ± 0.65	0	3.6 ± 2.26	4.11 ± 2.61
PMd	FOS	1.29 ± 1.29	12.95 ± 6.52	16.44 ± 9.75	73.54 ± 17.32 ^{*,+}	126.74 ± 60.52 [*]
	nNOS	297.83 ± 25.71	341.74 ± 29.30	360.78 ± 12.52	354.73 ± 12.41	319.23 ± 36.56
	%double stained	0.1 ± 0.1	1.18 ± 0.64	1.23 ± 0.62	6.35 ± 1.54 ^{*,+}	7.38 ± 3.26 [*]
dIPAG contralateral	FOS	0.78 ± 0.52	12.03 ± 3.73 [*]	8.13 ± 4.7	20.03 ± 5.77 ^{*,+}	12.14 ± 2.99 [*]
	nNOS	161.04 ± 9.11	179.46 ± 18.73	140.45 ± 6.65	166.98 ± 13.94	164.07 ± 12.05
	%double stained	0	1.07 ± 0.44 [*]	0.99 ± 0.69	2.54 ± 0.48 [*]	0.24 ± 0.74 [#]
dIPAG ipsilateral	FOS	1.08 ± 0.39	5.2 ± 1.68 [*]	8.45 ± 5.11 [*]	35.89 ± 22.96 ^{*,+}	21.89 ± 10.04 [*]
	nNOS	168.63 ± 10.8	159.31 ± 18.06	172.31 ± 15.9	152.67 ± 10.03	166.02 ± 9.82
	%double stained	0	0	0.81 ± 0.81	0.72 ± 0.53	1.36 ± 0.74

Data are represented as means ± S.E.M from 4-6 animals/group. Animals were killed 2 h after exposure to a toy or live cat. Naive animals remained undisturbed in their home-cages. Gg₁, cingulate cortex 1; IL, infralimbic cortex; PrL, prelimbic cortex; PVNm, lateral magnocellular part of paraventricular hypothalamic nucleus; PVNv, ventral part of paraventricular hypothalamic nucleus; MeA, medial amygdala; PMd, dorsal premmammillary nucleus of hypothalamus. dIPAG, dorsolateral periaqueductal grey. Double-stained cells are expressed as percentage of nNOS positive cells except in the MeA (a), where the results show the absolute number of double-stained cells.

* $p < 0.05$ vs. naive.

+ $p < 0.05$ vs. sal/dummy cat.

$p < 0.05$ vs. sal/cat (Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney test).

Table 2: Effects of intra-dIPAG injection of AP7 (2 nmol/0.2 μ L) in the number of c-Fos positive cells, nNOS positive cells and percentage of double-stained cells in brain regions of rats exposed to a toy or a live cat.

		<u>Naive</u>	<u>saline/dummy</u>	<u>AP7/dummy</u>	<u>Saline/Cat</u>	<u>AP7/Cat</u>
Cg1	FOS	0.16 \pm 0.11	7.56 \pm 6.15	10.54 \pm 6.64	1.23 \pm 0.31	6.95 \pm 6.38
	nNOS	4.42 \pm 1.06	13.65 \pm 6.88	16.62 \pm 3.06	10.35 \pm 2.53	10.24 \pm 3.02
	%double stained	0	0	0	0	0
IL	FOS	1.24 \pm 0.84	2.65 \pm 1.70	9.18 \pm 4.68	1.23 \pm 0.71	3.88 \pm 3.05
	nNOS	5.50 \pm 1.17	8.08 \pm 2.70	13.65 \pm 6.88	7.11 \pm 1.82	6.05 \pm 1.70
	%double stained	0	0	0	0	0
PrL	FOS	0.16 \pm 0.16	10.54 \pm 6.65	1.23 \pm 0.32	6.95 \pm 6.39	0.16 \pm 0.12
	nNOS	4.42 \pm 1.06	13.65 \pm 6.88	16.62 \pm 3.06	10.35 \pm 2.53	10.24 \pm 3.02
	%double stained	0	0	0	0	0
PVNm	FOS	0.26 \pm 0.26	1.14 \pm 0.97	6.65 \pm 3.73	7.5 \pm 2.48	5.07 \pm 2.62
	nNOS	87.91 \pm 11.78	120.03 \pm 4.88	118.62 \pm 12.11	118.52 \pm 14.19	129.3 \pm 6.74
	%double stained	0	0.29 \pm 0.19	0.98 \pm 0.51	1.58 \pm 0.77	0.8 \pm 0.8
PVNp	FOS	3.14 \pm 2.82	9.44 \pm 2.82	13.58 \pm 7.30	34.68 \pm 10.62 ^{*,+}	22.04 \pm 8.48 [*]
	nNOS	193.09 \pm 24.31	209.17 \pm 16.08	193.08 \pm 10.56	207.71 \pm 12.17	198.31 \pm 10.56
	%double stained	0.58 \pm 0.58	1.09 \pm 0.49	1.11 \pm 0.55	4.32 \pm 1.5	2.54 \pm 0.87

MeA	FOS	1.56 ± 0.76	7.95 ± 3.77	11.44 ± 5.79	46.50 ± 28.22	19.88 ± 15.72
	Double stained ^a	4.12 ± 3.13	4.48 ± 2.06	4.16 ± 2.11	10.56 ± 7.2	3.15 ± 1.98
PMd	FOS	1.3 ± 0.92	14.31 ± 9.7	53.65 ± 21.09*	48.4 ± 29.28*	141.92 ± 55.71* ⁺
	nNOS	355 ± 52.34	317 ± 19.99	335.37 ± 11.25	304.47 ± 48.75	358.33 ± 9.08
	%double stained	0.22 ± 0.13	1.51 ± 0.91	4.5 ± 1.36	2.69 ± 1.16	7.41 ± 2.19* ⁺
dIPAG contralateral	FOS	5.69 ± 4.43	9.83 ± 4.91	9.1 ± 3.37	27.23 ± 7.03* ⁺	14.7 ± 5.99
	nNOS	144.83 ± 10.36	145.43 ± 10.37	152.01 ± 11.07	148.21 ± 11.32	152.43 ± 9.61
	%double stained	0.28 ± 0.28	0.7 ± 0.33	0.59 ± 0.3	1.81 ± 0.41	1.13 ± 0.58
dIPAG ipsilateral	FOS	3.58 ± 1.85	42.25 ± 16.97*	43.90 ± 35.30*	72.41 ± 10.53* ⁺	24.34 ± 6.81* [#]
	nNOS	149.55 ± 14.80	167.66 ± 14.66	155.03 ± 11.70	150.39 ± 11.79	147.55 ± 14.80
	%double stained	0	3.23 ± 1.28*	2.30 ± 0.76*	6.7 ± 2.53*	4.6 ± 2.11*

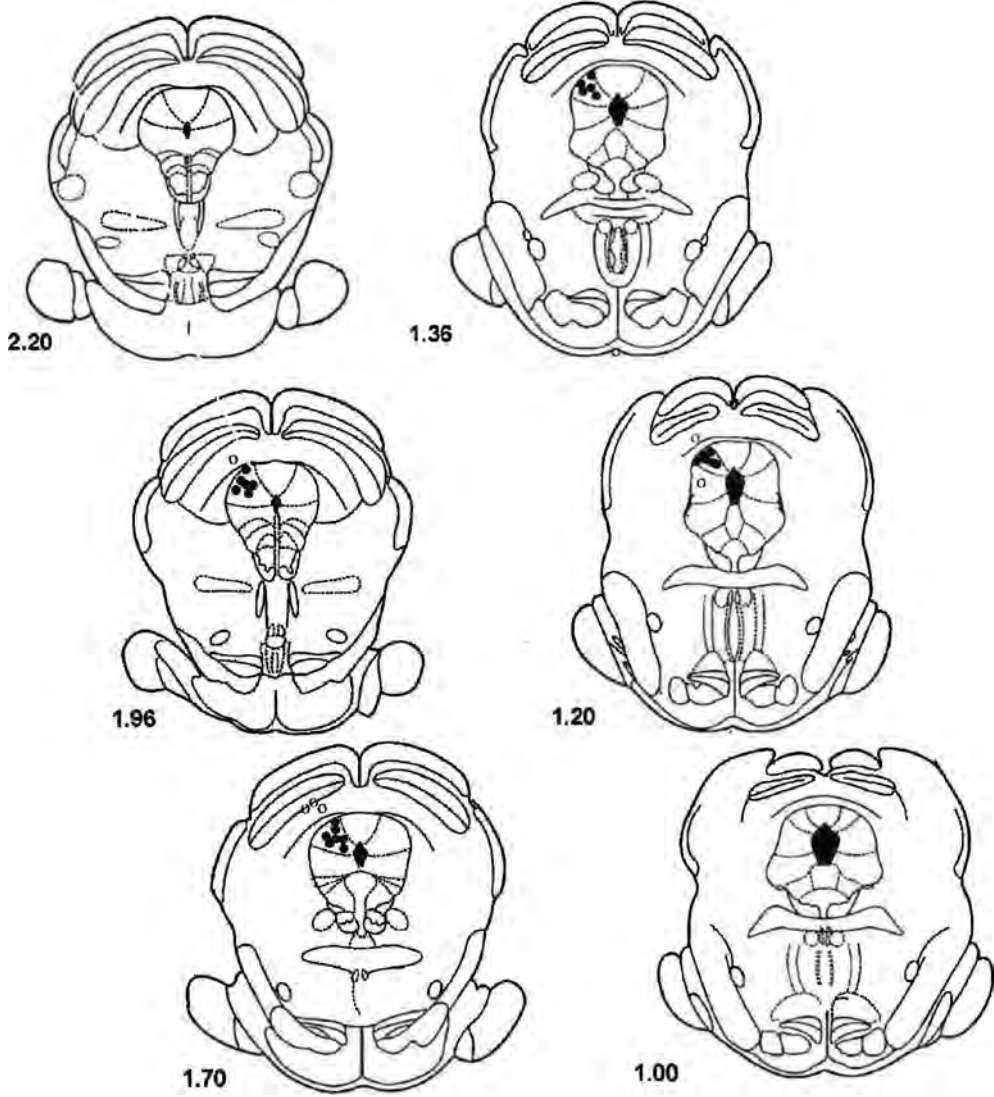
Data are represented as means ± S.E.M. from 8-9 animals/per group. Animals were killed 2 h after exposition to a toy or a live cat. Naive animals remained undisturbed in their home-cages. Gg₁, cingulated cortex 1; IL infralimbic cortex; PrL prelimbic cortex; PVNm lateral magnocellular part of paraventricular hypothalamic nucleus; PVNv ventral part of paraventricular hypothalamic nucleus; MeA medial amygdala; PMd, dorsal preammillary nucleus of hypothalamus, dIPAG, dorsolateral periaqueductal grey. Double-stained cells are expressed as percentage of nNOS positive cells.

a Absolute number of double-stained cells.

* $p < 0.05$ vs. naive.

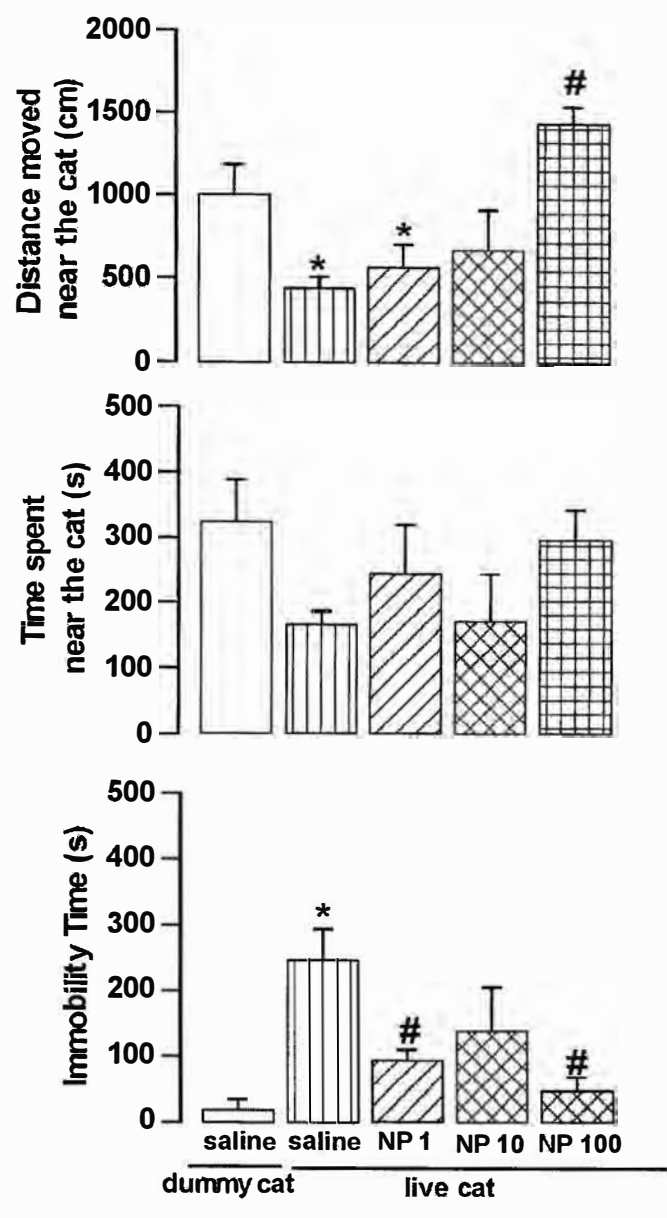
+ $p < 0.05$ vs. saline/dummy cat.

$p < 0.05$ vs. saline/cat (Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney test)

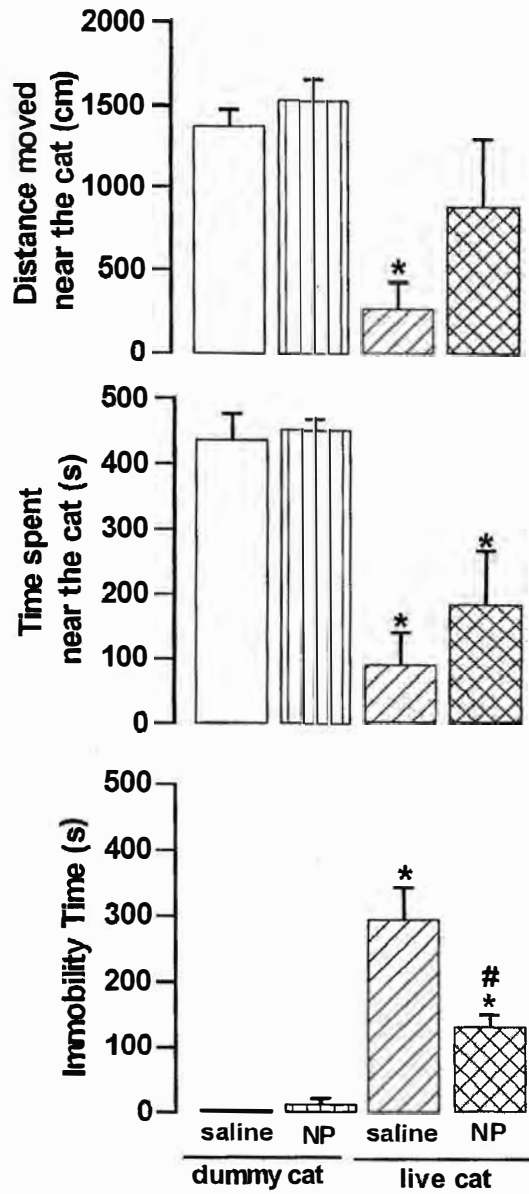


155x174mm (300 x 300 DPI)

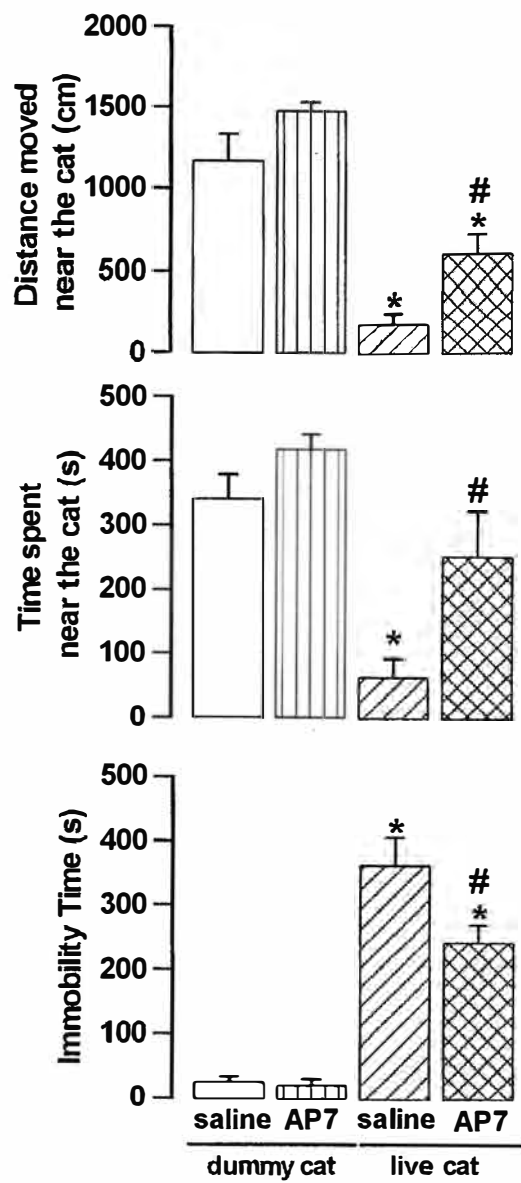
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30



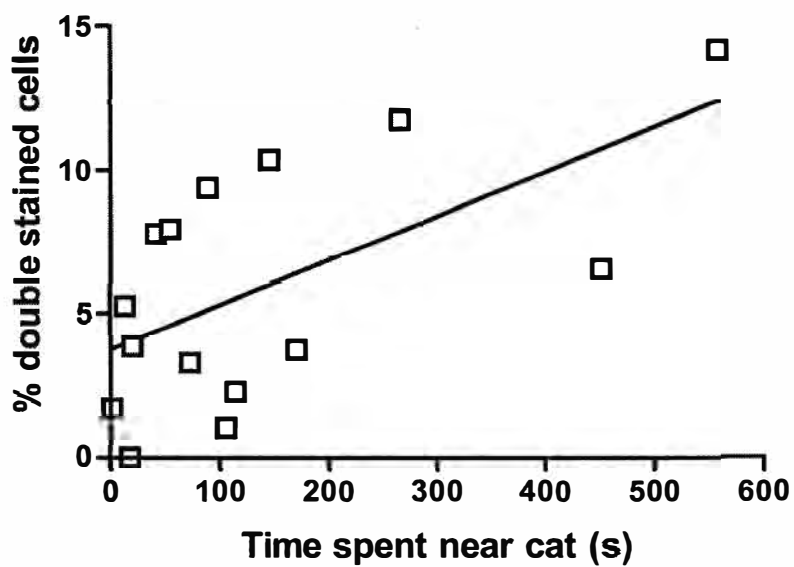
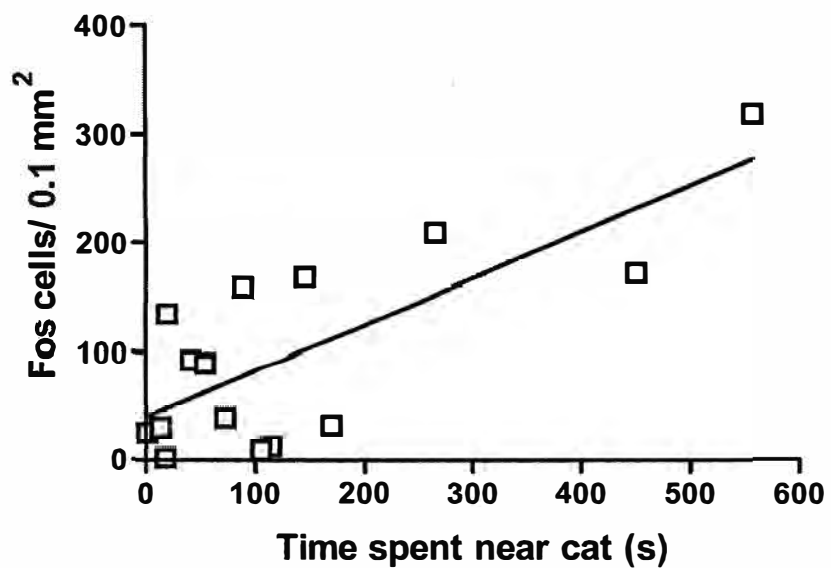
94x165mm (300 x 300 DPI)



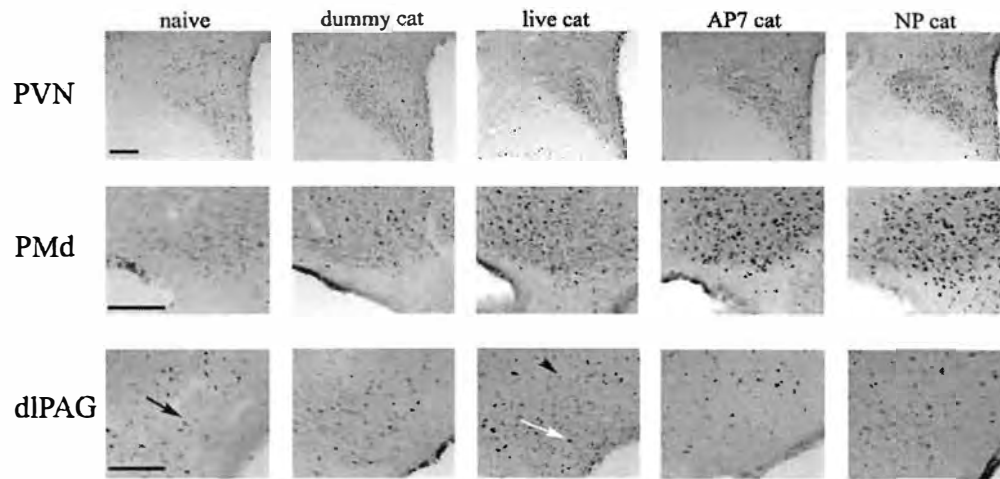
87x183mm (300 x 300 DPI)



80x172mm (300 x 300 DPI)



121x178mm (600 x 600 DPI)



89x43mm (600 x 600 DPI)