

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
LABORATÓRIO DE NEUROANATOMIA E NEUROPSICOBIOLOGIA

ESTUDO NEUROANATÔMICO E PSICOFARMACOLÓGICO DO DUPLO ELO
GABAÉRGICO ESTRIADO-NIGRO-TECTAL, DE CONEXÕES
INTRAMESENCEFÁLICAS E DA INFLUÊNCIA DESSAS VIAS SOBRE O
COMPORTAMENTO DE DEFESA ELICIADO POR ESTIMULAÇÃO DO
COLÍCULO INFERIOR

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do título de Mestre em Biologia
Celular e Molecular

Lissandra Castellan Baldan

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Ribeirão Preto/SP
FAPESP

**“Prestem atenção não apenas ao aperfeiçoamento do conhecimento,
mas também ao das qualidades do coração, para que, no final de seus
estudos, vocês sejam não só pessoas instruídas, mas também bondosas
e cheias de compaixão”.**

Tenzin Gyatso, o XIV Dalai Lama

DEDICATÓRIA:

Ao meu querido amigo Carlos Garcia

A meu amor Paulo Felin

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que em Sua infinita bondade e misericórdia me concedeu a graça e a oportunidade da vida, cujo sentido para mim, hoje, não é outro senão o de trabalhar para a evolução de todos os seres.

Agradeço a Humanidade, meu único veículo de evolução, assim como a todos os meus antepassados, pois graças a eles estou presente na atual época. Tudo neste mundo está inexoravelmente ligado por meio da interdependência, assim como os fios de lã que tecem o agasalho e se sustentam mutuamente. E, sendo assim, jamais haveria logrado êxito em meu trabalho, não fosse a cooperação, em primeiro lugar, da minha família,- mãe, pai e irmãos-, por toda a compreensão e apoio que me foi dado. Sou, também, muito grata a todos que colaboraram comigo, direta ou indiretamente: meu orientador e amigo, professor e mestre, Norberto Coimbra e meus colegas do laboratório. Aos amigos, professores e técnicos do departamento, meu muito obrigado. Sou grata, ainda, pelo incentivo da FAPESP, instituição que financiou e possibilitou a realização deste projeto.

Agradeço, também, aos trabalhadores que fabricaram os materiais e equipamentos que utilizei em minhas experiências, aos homens que produziram as matérias-primas que resultaram nesses equipamentos, àqueles cuja função foi disponibilizar e tornar acessíveis todos esses insumos e, mais do que tudo, aos animais sacrificados para que o homem pudesse ter suavizado suas dores e amenizado seu sofrimento.

Ofereço este trabalho para a evolução da Humanidade e a realização de uma sociedade que seja una e não mais voltada para a realização de desejos individuais. Minha esperança é que o mundo caminhe para um estágio onde as leis naturais sejam respeitadas e o ser humano cultive sua sabedoria interna.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO -----	03
1- Considerações gerais sobre a elaboração do medo -----	04
2- Mesencéfalo -----	13
3- O colículo inferior, o neurotransmissor GABA e de sua relação com o comportamento defensivo -----	15
4- Substância negra -----	23
4.1- Conexões aferentes -----	25
4.2- Conexões eferentes: projeções dopaminérgicas -----	26
4.3- Conexões eferentes: projeções não-dopaminérgicas-----	28
5- Núcleos basais -----	29
6- Objetivo geral-----	32
6.1- Objetivos específicos-----	33
7- Materiais e métodos-----	34
7.1- Animais-----	35
7.2- Traçamento das projeções nigro-tectais-----	35
7.3- Procedimentos cirúrgicos para os estudos psicofarmacológicos-----	37
7.4- Drogas-----	38
7.5- Microinjeção intramesencefálica de drogas-----	39
7.6- Medidas das reações aversivas-----	39
7.7- Procedimento para realização de lesões eletrolíticas-----	40
7.8- Histologia para a determinação dos sítios de microinjeção de drogas---	41
7.9- Análise estatística -----	42
8- Resultados-----	43

9- Discussão-----	66
10- Conclusões-----	79
11- Resumo-----	82
12- <i>Abstract</i> -----	85
13- Referências bibliográficas-----	88
14- Anexo I: Tabelas-----	118
15- Anexo II: Trabalho publicado-----	125

INTRODUÇÃO

1- CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ELABORAÇÃO DO MEDO

O comportamento defensivo tem sido descrito em decorrência de microinjeções de agentes antagonistas de receptores GABA-A ou de inibidores da enzima ácido glutâmico-descarboxilase em sítios mesencefálicos, cuja estimulação induz reações de fuga (BRANDÃO *et al.*, 1982, 1986, 1988). Vigorosas reações defensivas também podem ser evocadas por administrações de aminoácidos excitatórios ou drogas opiáceas no colículo inferior (CARDOSO *et al.*, 1992; 1994; BRANDÃO *et al.*, 2001). Partindo desse pressuposto, o estudo de vias GABAérgicas e de projeções peptidérgicas opióides deve ser incluído na busca do substrato neural do medo, do pânico e da ansiedade, ressaltando-se mecanismos neuroquímicos que integram as reações de defesa desencadeadas por estímulos ambientais inatos ou aprendidos que sinalizem perigo: ambientes desconhecidos, a silhueta de predadores, expressões emocionais que indiquem raiva e ameaça de ataque, odor ou ruídos de um predador, vocalizações ameaçadoras de animais de uma mesma espécie na ocorrência de conflitos sociais ou qualquer outro fator que tenha adquirido significado de advertência por precederem consistentemente a ocorrência de estímulos nocivos ou dolorosos.

Um estímulo inato ou aprendido que sinalize perigo e dano corporal iminente ativa circuitos neurais encefálicos responsáveis pela gênese e elaboração de estados aversivos (ADAMS, 1979; PANKSEPP, 1990; FANSELOW, 1991), que são interpretados em nossa espécie como estado motivacional do medo. Comportamentos defensivos podem então se expressar sob a forma de inibição comportamental e vigilância (GRAY, 1982; COIMBRA & BRANDÃO, 1993), imobilidade defensiva ou congelamento (FANSELOW, 1980; COIMBRA *et al.*, 1989; ZHANG *et al.*, 1990), fuga (PANKSEPP, 1990; COIMBRA & BRANDÃO, 1993), ou por imobilidade tônica

(MENESCAL-DE-OLIVEIRA & HOFFMANN, 1993), e por um conjunto de posturas ameaçadoras e vocalização seguidas por ataque (na impossibilidade de fuga), a que se denomina defesa afetiva (HESS & BRUGER, 1943). Posturas apaziguadoras de submissão são freqüentemente apresentadas no sentido de evitar um posterior comportamento ofensivo de um oponente dominante (ADAMS, 1979; MICZEK, 1984). A expressão do comportamento de defesa acompanha-se de acentuadas alterações neurovegetativas e endócrinas, largamente estudadas (MANCIA & ZANCHETTI, 1981; HILTON, 1982; LEÃO-BORGES *et al.*, 1988).

Em uma tentativa de investigar o substrato neural responsável pela elaboração do comportamento defensivo, assim como determinar os neurotransmissores envolvidos nas conexões entre estruturas encefálicas, cuja estimulação eliciaria reações de ira ou de medo, extensas investigações têm sido feitas com a utilização de neurotraçadores, de técnicas imunoistoquímicas, psicofarmacológicas e até mesmo utilização de clássicos métodos de estudo em neurofisiologia (STEINBUSH, 1981; FUCHS & SIEGEL, 1984; FUCHS *et al.*, 1985; BRANDÃO *et al.*, 1991, 1993; CARRIVE, 1993; COIMBRA & BRANDÃO, 1993; BRANDÃO *et al.*, 2001; EICHENBERGER e col., 2002). Somente para citar alguns achados, verificou-se a existência de fibras ascendentes, via hipotálamo anterior, para o complexo amigdalóide e núcleo do leito da estria terminal, assim como de fibras descendentes, através do hipotálamo medial, para o complexo mediano parafascicular do tálamo e substância cinzenta periaquedutal (FUCHS & SIEGEL, 1984; FUCHS *et al.*, 1985). Acrescente-se que o hipotálamo encontra-se diretamente envolvido nos mecanismos neurais que controlam as funções hipofisárias, comandando, dessa forma, as alterações endócrinas que acompanham o comportamento emocional (NAUTA, 1958; MARTIN, 1998; KUPFERMAN, 1991; LEDOUX, 1991).

Ao serem estudadas as áreas encefálicas que traçam a suposta trajetória do medo, descobriu-se uma vasta gama de interconexões entre elas, como a conhecida ligação funcional e neuroanatômica entre a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), hipotálamo medial, amígdala e área septal (BEN-ARI, 1981; SIEGEL & POTT, 1988; GRAEFF, 1990), o que permite situá-la no cerne do sistema encefálico aversivo, que coordenaria a geração e elaboração do medo (GRAEFF, 1981), ao lado de outras estruturas, como as camadas profundas do colículo superior (COIMBRA & BRANDÃO, 1993) e núcleo central do colículo inferior (BRANDÃO *et al.*, 1988, 1993; CARDOSO *et al.*, 1994). Efetivamente, danos realizados na SCPd prejudicam a defesa afetiva induzida por estímulos ambientais ou pela estimulação elétrica do hipotálamo dorso-medial e amígdala; muito embora a destruição dessas últimas estruturas não seja suficiente para afetar a reação de defesa evocada na SCPd (FERNANDEZ de MOLINA & HUNSPERGER, 1959). A fuga e outros comportamentos defensivos, como as reações de esquiva, são reduzidas por lesões na amígdala e SCPd (HORVATH, 1963; PELLEGRINO, 1968; BLANCHARD & BLANCHARD, 1972; BLANCHARD *et al.*, 1979; ISAACSON, 1982). As lesões no núcleo central da amígdala amenizam as respostas aversivas evocadas por estimulação elétrica do núcleo central do colículo inferior (MAISONNETTE *et al.*, 1996) e tem sido sugerido que o processamento emocional depende da informação aferente vinda do corpo geniculado medial para amígdala (IWATA *et al.*, 1987). Animais lesados na SCPd, caracteristicamente, além de exibirem poucas reações de medo, também não fugiam de estímulos dolorosos (MELZACK *et al.*, 1982) e, na presença de ruídos (LYON, 1964), mostraram resposta reduzida de fuga e esquiva ao choque nas patas (HALPERN, 1968).

Estudos usando imunorreatividade à proteína c-Fos corroboraram os estudos neurofisiológicos mostrando evidências que sugerem que a amígdala, o hipotálamo medial, a substância cinzenta periaquedutal dorsal, as camadas profundas do colículo superior e o colículo inferior constituem parte do sistema encefálico aversivo, pois essas áreas foram marcadas após a estimulação tanto elétrica quanto química da substância cinzenta periaquedutal dorsal ou seguida a exposição dos animais a estímulos ambientais aversivos e a predadores (SILVEIRA, SANDNER & GRAEFF, 1993).

A estimulação elétrica ou a microinjeção de antagonistas de receptores GABA-A no colículo inferior eliciam um conjunto de respostas comportamentais caracterizado por corridas, saltos e rotações, a que se denomina comportamento explosivo de fuga. A imobilidade que antecede essas reações motoras e que se faz acompanhar de algumas alterações autonômicas denominamos de congelamento. O colículo inferior tem sido recentemente considerado como parte integrante do sistema encefálico aversivo, constituído, pelo que foi exposto acima, por estruturas como a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), o colículo superior *stratum griseum profundum*, o hipotálamo dorso-medial e o complexo amigdalóide (BRANDÃO *et al.*, 1988; 1993).

Há evidências de que a substância negra, parte reticulada (SNpr), envia projeções GABAérgicas ao colículo superior e à SCPd (ANDERSON & YOSHIDA, 1977; VINCENT *et al.*, 1978; DI CHIARA *et al.*, 1979; COIMBRA *et al.*, 1989; COIMBRA *et al.*, 1998 a; EICHENBERGER *et al.*, 2002). A remoção das vias nigro-tectais, seja por meio de lesões eletrolíticas ou neuroquímicas, facilita as reações aversivas eliciadas pela estimulação do mesencéfalo dorsal, em seus substratos neurais mais craniais (BRANDÃO e SCHIMITT, 1987; COIMBRA *et al.*, 1989; COIMBRA e BRANDÃO, 1993; COIMBRA *et al.*, 1998 a). Assim também, lesões unilaterais da

substância negra, uma estrutura rica em neurônios GABAérgicos, podem alterar morfológicamente os substratos neurais responsáveis pela integração e elaboração de estímulos sensorio-motores envolvidos no controle e na expressão de crises convulsivas audiogênicas (GARCIA-CAIRASCO & TRIVIÑO-SANTOS, 1989; GARCIA-CAIRASCO & SABBATINI, 1991; DORETTO & GARCIA-CAIRASCO, 1995).

Dentre as estruturas auditivas do tronco encefálico, o colículo inferior tem se mostrado como um ponto chave necessário para a iniciação de crises audiogênicas (GARCIA-CAIRASCO, 2002). As lesões bilaterais do colículo inferior bloquearam completamente a expressão de crises audiogênicas em ratos (GARCIA-CAIRASCO & SABBATINI, 1991). Os achados sobre crise audiogênica mostraram que os bloqueadores GABAérgicos aumentam, enquanto os agonistas GABA-A atenuam o potencial evocado auditivo no colículo inferior (BAGRI *et al.*, 1989). Estudos mostraram a ocorrência de corridas selvagens associadas com atividade convulsiva seguida à estimulação elétrica ou que se manifesta após a microinjeção de bicuculina no colículo inferior, sendo que tais efeitos comportamentais têm também sido correlatados com a diminuição da transmissão GABAérgica nessa região (FRYE *et al.*, 1983; BREESE *et al.*, 1984). As respostas de fuga (COIMBRA *et al.*, 1996; EICHENBERGER *et al.*, 2002) são muito similares às respostas comportamentais que, algumas vezes, antecedem as crises convulsivas audiogênicas. Logo, é sugerido (GARCIA-CAIRASCO, 2002) que as crises audiogênicas e os padrões encontrados nas respostas de fuga evocadas por manipulações do colículo inferior, formam substratos neurais que se sobrepõem (TOMAZ *et al.*, 1992).

Estudos vários evidenciaram também a implicação de mecanismos GABAérgicos e opióides no controle dos substratos neurais que comandam o

comportamento defensivo no sistema encefálico aversivo (GRAEFF, 1990; CARDOSO *et al.*, 1992; COIMBRA *et al.*, 1992; COIMBRA & BRANDÃO, 1993, 1997). Os achados encontrados têm sugerido que mecanismos opióides podem estar envolvidos no controle de reações defensivas, uma vez que a administração de antagonistas opióides aumentaram os limiares aversivos eliciados por estimulação elétrica de algumas estruturas do mesencéfalo dorsal, como a substância cinzenta periaquedutal dorsal e o colículo superior (COIMBRA *et al.*, 1996). Achados recentes sugerem, ainda que os substratos neurais que controlam o comportamento defensivo no colículo inferior estão sob o controle inibitório opióide (CARDOSO *et al.*, 1992; BRANDÃO *et al.*, 1993, 1994; COIMBRA *et al.*, 2000).

Recentes estudos têm mostrado evidências de que muitas substâncias fluorescentes possuem a propriedade de serem transportadas retrogradamente, através dos axônios, até atingirem os corpos celulares, os quais são marcados por cores diversas, pela excitação por comprimentos de onda da ordem de 360 a 590 nm (CESARO *et al.*, 1979; CATSMAN-BERREVOETS *et al.*, 1979; KUYPERS *et al.*, 1980). Neurotraçadores anterógrados (REDGRAVE *et al.*, 1992) e bidirecionais (EICHENBERGER *et al.*, 2002) têm sido largamente utilizados para a determinação de conexões neurais.

Projeções nigro-tectais têm sido consistentemente demonstradas na literatura, descrevendo-se, principalmente, aferências às camadas profundas (COIMBRA *et al.*, 1998 a; EICHENBERGER *et al.*, 2002) intermediárias e superficiais do colículo superior (REDGRAVE *et al.*, 1992), provenientes da substância negra, parte reticulada (SNpr), e ao núcleo pericentral do colículo inferior (OLAZÁBAL & MOORE, 1989), provenientes da substância negra, parte lateral (SNpl).

O presente trabalho é uma continuação do estudo realizado por Coimbra e Brandão em 1993. Nesse trabalho, os pesquisadores realizaram estimulações elétricas e químicas, estas com bloqueador de receptor GABA-A (bicuculina), em estruturas conhecidas por gerarem e organizarem o comportamento defensivo no teto mesencefálico como a substância cinzenta periaquedutal dorsal e camadas profundas do colículo superior. Um dos objetivos desse estudo foi saber se as fibras GABAérgicas estriado-nigro-coliculares exerciam algum controle sobre o comportamento aversivo elaborado em estruturas do mesencéfalo dorsal. Para investigar essa questão foram estudadas os efeitos de lesões neuroquímicas da substância negra, parte reticulada ou da parte compacta, e de microinjeções de muscimol ou bicuculina nessa mesma estrutura, sobre os limiares aversivos obtidos por estimulação elétrica ou química do teto mesencefálico. Foram registrados os limiares de viglância, congelamento e fuga antes e depois da lesão ou da microinjeção de drogas na substância negra. Os resultados obtidos mostraram uma significativa diminuição nos limiares de alerta, congelamento e fuga após a lesão neuroquímica da substância negra, parte reticulada, comprovando assim o aumento da sensibilidade do teto mesencefálico à estimulação elétrica após a lesão de neurônios GABAérgicos de projeção nigro-tectal. Já a lesão da substância negra, parte compacta não modificou quaisquer dos limiares aversivos estudados. A lesão da SNpr também induziu um significativo aumento da atividade locomotora, número de saltos e rotações após a microinjeção de bicuculina no teto mesencefálico, ao contrário, das lesões da SNpc não afetou quaisquer respostas aversivas evocadas por estimulação elétrica ou química do teto mesencefálico, e se apresentam como um controle adicional do efeito pró-aversivo das lesões neurotóxicas da SNpr. Manipulações farmacológicas dessa estrutura com microinjeções de agonistas e antagonistas GABAérgicos

simularam, farmacologicamente, um aumento ou uma diminuição de atividade na via estriado-nigral, o que interfere de maneira decisiva na atividade modulatória da via nigro-colicular, corroborando os dados anteriores e apontando o duplo elo GABAérgico estriado-nigro-colicular, de projeção cranial como um relevante circuito de controle das respostas defensivas elaboradas no colículo superior e na substância cinzenta periaquedutal.

O aumento do comportamento de rotação após a lesão da SNpr já tinha sido sugerido por outros estudos (IMPERATO *et al.*, 1981; COIMBRA *et al.*, 1989) como sendo resultado da diminuição na transmissão GABAérgica através da via nigro-colicular. Logo, o aumento da manifestação do comportamento de fuga após a lesão da SNpr pode ter sido devido à remoção do controle inibitório exercido pelas fibras GABAérgicas no substrato neural do comportamento defensivo induzido por estimulação do mesencéfalo dorsal.

No presente estudo pretendemos ampliar esses achados pesquisando parte do duplo elo GABAérgico estriado-nigro-tectal com relação a uma outra estrutura que também está envolvida com a geração e elaboração do comportamento defensivo no teto mesencefálico (BRANDÃO *et al.*, 1988, 1993; CARDOSO e col., 1992; BRANDÃO *et al.*, 1999): o colículo inferior, destacando-se a conformação citoarquitetônica da SN e com quais sítios coliculares seus diferentes neurônios se conectam. Assim, procuramos realizar, em princípio, uma abordagem puramente neuroanatômica das projeções nigro-tectais, utilizando-se traçadores retrógrado e anterógrado, microinjetados no teto mesencefálico ou na substância negra, parte reticulada, respectivamente. Em seguida, foi investigada a neuroanatomia funcional das projeções eferentes que partem da substância negra, parte reticulada, e se destinam ao substrato neural do medo, localizado

no colículo inferior, estudando o efeito de lesões eletrolíticas e neuroquímicas da SNpr sobre os limiares de congelamento e fuga, eliciados por estimulação elétrica do núcleo central do colículo inferior. Também pretendemos estudar as conexões intramesencefálicas caudais que conectam o núcleo central do colículo inferior com os substratos periaquedutais responsáveis por organizarem padrões não somente explosivos do comportamento que segue as sensações de medo, como a fuga, mas também padrões mais passivos, como o congelamento, todos gerados e organizados nas colunas dorsais e ventrais da substância cinzenta periaquedutal, que se apresenta como via de saída das respostas defensivas organizadas no teto mesencefálico.

2- MESENCÉFALO

O mesencéfalo é o componente mais cranial do tronco encefálico e está localizado entre a ponte e o diencéfalo. O aqueduto de Sylvius atravessa o mesencéfalo longitudinalmente. O aqueduto é um estreito canal que une o III ao IV ventrículo e é circundado pela substância cinzenta periaquedutal. O teto do mesencéfalo está situado dorsalmente ao aqueduto; ventralmente estão localizados os dois pedúnculos cerebrais, os quais se dividem em uma parte dorsal, predominantemente celular, o tegmento, e outra ventral, formada por fibras longitudinais, a base do pedúnculo cerebral. O tegmento é separado da base por uma lâmina de substância cinzenta pigmentada, chamada substância negra, formada por neurônios que contêm melanina e outros neurotransmissores (FALLON & LOUGHLIN, 1985).

Os corpos quadrigêmeos são formados por quatro estruturas arredondadas, que se apresentam na forma de pequenas colinas, dispostas aos pares, os colículos superiores e inferiores, separados pelo sulco cruciata. Os colículos superiores são maiores e mais escuros que os inferiores e estão relacionados com os órgãos da visão. O braço quadrigeminal superior se estende lateralmente e conecta cada colículo superior com um corpo geniculado lateral, situado no metatálamo. Os colículos inferiores são mais salientes que os colículos superiores, possuem uma massa de substância cinzenta denominada núcleo do colículo inferior (MACHADO, 2000) e estão envolvidos com o sistema auditivo (MARTIN, 1998). O braço quadrigeminal inferior une lateralmente cada colículo inferior a um corpo geniculado medial (CHUSID, 1970).

As fibras do pedúnculo cerebelar superior envolvem o núcleo rubro, massa de substância cinzenta grande e oblonga, situada no tegmento do mesencéfalo bilateralmente, dorsal e ventralmente posicionada em relação à substância negra.

O teto do mesencéfalo é um centro nervoso muito importante, relacionado com a integração de funções sensoriais e motoras em vertebrados (Di SCALA *et al.*, 1984; BLOMQUIST *et al.*, 1990). Entretanto, durante a evolução, o córtex cerebral passou a desempenhar parte de suas funções, mudando consideravelmente sua importância nos mamíferos. Os colículos superiores são formados por uma série de camadas superpostas, alternadamente constituídas por substâncias branca e cinzenta, sendo que a camada mais profunda se confunde com a substância cinzenta central (MARTIN, 1998; MACHADO, 2000). O colículo inferior pode ser dividido em três componentes: o núcleo central, o núcleo externo e o núcleo pericentral, também chamado de córtex dorsal (MEININGER & BAUDRIMONT, 1977; MARTIN, 1998). O núcleo central recebe a maioria das aferências ascendentes ao mesencéfalo, por onde trafegam impulsos auditivos (ADAMS, 1979). Essas informações ascendem pelo lemnisco lateral, e ganham o corpo geniculado medial, através do braço do colículo inferior. Algumas fibras dessa via cruzam de um colículo para o outro, formando a comissura do colículo inferior.

3- O COLÍCULO INFERIOR, O NEUROTRANSMISSOR GABA E DE SUA RELAÇÃO COM O COMPORTAMENTO DEFENSIVO

Os sons são conduzidos pelo pavilhão auditivo à membrana timpânica e desta à orelha média e interna, que possui um mecanismo transdutor: a cóclea, local onde estão situados os receptores auditivos. A sensibilidade das células sensoriais dos receptores auditivos diferem ao longo da cóclea, caracterizando assim a organização tonotópica da membrana auditiva. As células sensoriais são inervadas por neurônios bipolares sensitivos situados no gânglio espiral, o qual se localiza no modíolo da cóclea. Os axônios desses neurônios se projetam aos núcleos cocleares ipsilaterais, localizados no bulbo. As projeções bilaterais vindas dos núcleos cocleares são enviadas ao complexo olivar superior, situado na ponte, e, deste ao núcleo central do colículo inferior no teto mesencefálico, através de uma via ascendente chamada de lemnisco lateral (MARTIN, 1998; PURVES *et al.*, 2001). A projeção auditiva ascendente destina-se do núcleo central do colículo inferior ao núcleo do corpo geniculado medial, situado no metatálamo (KUDO & NIIMI, 1980), e em seguida se projeta ao córtex auditivo primário, localizado no giro temporal transversal de Heschl (MARTIN, 1998; PURVES *et al.*, 2001), figura 1.

As vias auditivas possuem muitos locais onde as informações auditivas cruzam a linha média através de decussações e comissuras. Assim, as vias auditivas ascendentes em cada lado do tronco cerebral levam informações de ambos os ouvidos. Diante do exposto acima, as lesões unilaterais do tronco cerebral não causam surdez no ouvido do mesmo lado, mas podem produzir prejuízos na percepção auditiva, tais como a localização imprecisa de sons e tinidos. Já uma lesão no núcleo coclear pode produzir

surdez no ouvido ipsilateral, pois esse núcleo recebe uma projeção unicamente do ouvido ipsilateral (MARTIN, 1998).

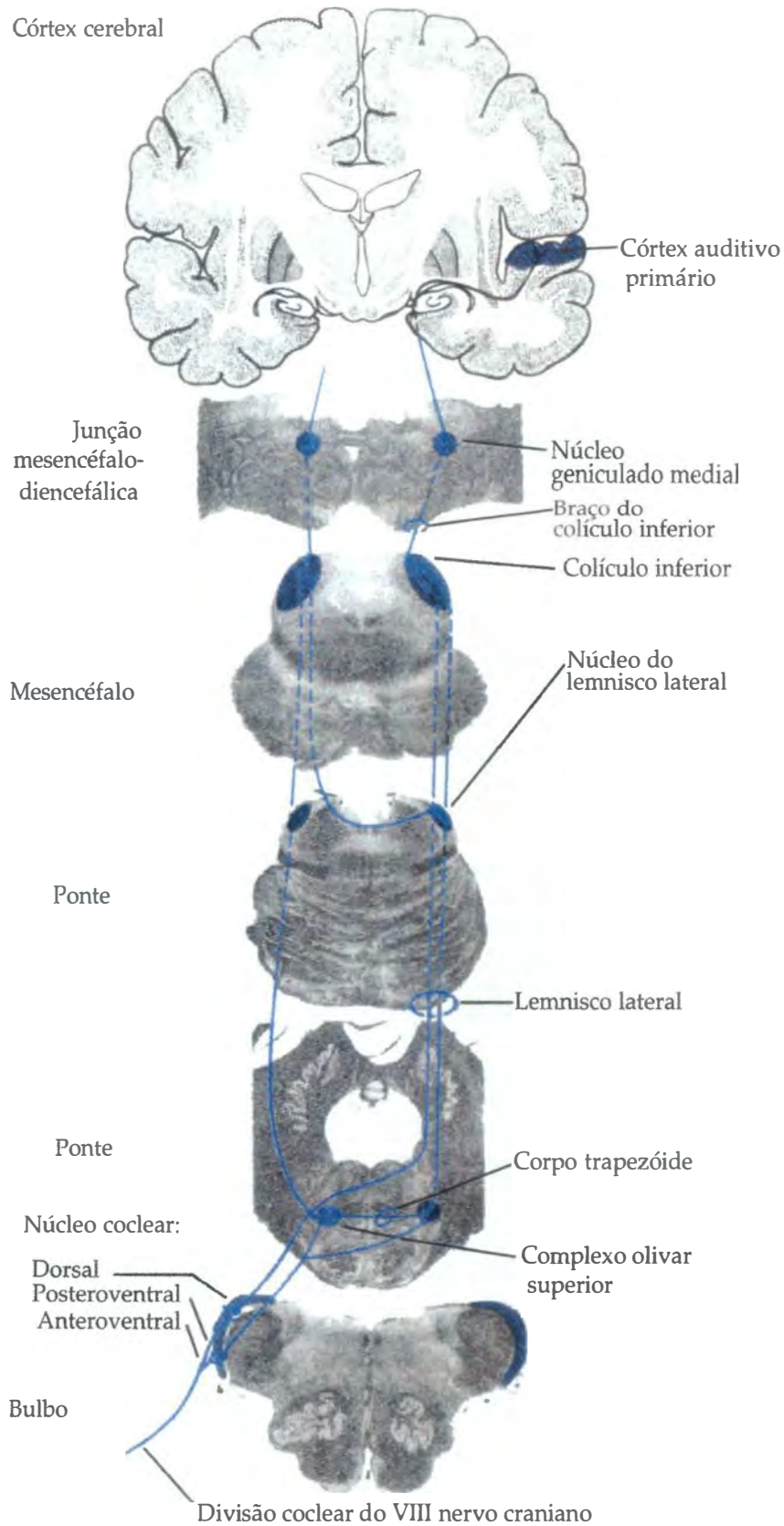


Figura 1- Organização geral do sistema auditivo mostrada em cortes realizados em diferentes níveis do tronco cerebral, de cortes coronais do diencefalo e dos hemisférios cerebrais. Martin, 1998.

O colículo inferior é uma estrutura crítica para o processamento da informação auditiva no tronco encefálico (KUWADA *et al.*, 1997). Ele consiste basicamente de uma massa central de células circundadas por um córtex. A massa central possui uma estrutura laminada e recebe a maioria das aferências auditivas ascendentes ipsilateral e contralateral vindas da ponte e do bulbo, e origina uma via auditiva “lemniscal” ascendente que vai ao núcleo do corpo geniculado medial, situado no metatálamo, o qual envia projeções axônicas para o córtex auditivo primário. Essa via possui uma organização tonotópica precisa, visto que os neurônios do núcleo central possuem sensibilidade máxima às frequências de tons similares. Já o núcleo externo e o córtex dorsal originam vias “extralemniscais”, nas quais a tonotopia é menos precisa (FAYE-LUND & OSEN, 1985; MARTIN, 1998).

O núcleo central recebe informações de três fontes: de vias que se originam do núcleo olivar superior ipsi e contralateral; de vias do núcleo do lemnisco lateral ipsi e contralateral e de vias dos núcleos cocleares dorsal e póstero-ventral contralaterais. Tais núcleos estão relacionados com o processamento dos sons para a percepção auditiva e reflexos de ajuste, como as respostas comportamentais eliciadas após um susto de origem acústica (MARTIN, 1998). A oliva superior contribui para a organização sináptica do núcleo central do colículo inferior (OLIVER *et al.*, 1995). As vias auditivas ascendentes, que divergem do núcleo coclear em múltiplos tratos ascendentes, convergem para o núcleo central do colículo inferior, onde realizam sinapses (ZHANG *et al.*, 1998). O colículo inferior tem um papel na orientação da cabeça e do corpo na direção do estímulo auditivo.

O colículo inferior possui dois componentes que o conectam com as estruturas vizinhas: o braço do colículo inferior, que se estende ao corpo geniculado medial, e o

lemnisco lateral que conecta o colículo inferior com outros núcleos da via auditiva (MEININGER *et al.*, 1986).

Estudos realizados em ratos e gatos mostraram projeções vindas do núcleo do corpo geniculado medial, situado no tálamo, e se estendendo para a amígdala (LEDOUX *et al.*, 1990 a). O colículo inferior envia aferências auditivas a essas áreas talâmicas e a via para a amígdala tem sido implicada na resposta emocional condicionada à estímulos auditivos (LEDOUX *et al.*, 1990 b).

Há muitos estudos que apontam o GABA como o maior neurotransmissor inibitório do colículo inferior (GOLDSMITH *et al.*, 1995; MILBRANDT *et al.*, 1996) e a função normalmente desempenhada pelo GABA nessa estrutura é importante para a codificação de estímulos acústicos (Li *et al.*, 1999) e para a habilidade de localizar a fonte do som (PARK *et al.*, 1993). Esse neurotransmissor, não obstante, está envolvido com 30 a 50% de todos os neurônios do sistema nervoso central (GUIDOTTI *et al.*, 1983). As mudanças na neurotransmissão do GABA no colículo inferior podem resultar em efeitos significativos na audição de animais mais velhos. Os receptores GABA-A podem passar por modificações modulatórias com o processo de envelhecimento. Tais mudanças foram observadas como um aumento da função do receptor em ratos mais velhos (MILBRANDT *et al.*, 1996).

No colículo inferior, o GABA é liberado de maneira cálcio-dependente (SHNEIDERMAN *et al.*, 1993). Esse neurotransmissor é sintetizado a partir do glutamato, em uma reação catalisada pela enzima ácido glutâmico-descarboxilase. Esse processo ocorre não apenas no colículo, mas em todo o sistema nervoso onde o GABA é sintetizado.

As ações inibitórias mediadas pelo GABA são realizadas através de dois principais subtipos de receptores, conhecidos como GABA-A e GABA-B (BOWERY *et al.*, 1980). Esta classificação define o receptor GABA-A por ser sensível ao antagonismo realizado pela bicuculina (antagonista GABAérgico) e não afetado pelo baclofen (agonista GABAérgico tipo B). Já os receptores GABA-B não são afetados pelo antagonismo da bicuculina e são ativados pelo baclofen (HILL & BOWERY, 1981). É importante citar que o agonista GABAérgico tipo A é o muscimol. Recentemente foi identificado nos neurônios da retina de vertebrados, receptores GABA que não são afetados pela bicuculina e nem pelo baclofen e são chamados de GABA-C (JOHNSTON 1996; BORMANN, 2000).

O receptor GABA-A é um receptor ionotrópico que controla um canal de cloro. Hoje se sabe que os receptores-canais ativados pelo GABA-A são formados a partir de uma proteína transmembrana constituída por cinco subunidades protéicas (duas α 1, duas β 2 e uma γ 2) que contêm um poro central, o qual atravessa a membrana celular e é permeável a íons cloro e a outros ânions. Ao fixar o neurotransmissor, o receptor ionotrópico sofre uma alteração de sua conformação, resultando no aumento da permeabilidade do poro central aos íons cloro, provocando, assim, a hiperpolarização da célula neuronal, já que permite a entrada de mais íons cloro, negativamente carregados, na célula. Esse processo produz um efeito inibitório geral na atividade do neurônio (NUTT & MALIZIA, 2001).

O receptor GABA-B é metabotrópico, ativando uma cascata de segundo mensageiro que ativa um canal de potássio. Esse receptor é uma macromolécula distinta do canal-iônico, sobre o qual atua. Neste caso, o neurotransmissor atua indiretamente sobre o canal. Assim, o receptor ativa uma proteína fixadora-GTP (proteína G), a qual

ativa uma cascata de segundos mensageiros que modulam a atividade do canal-iônico (JOHNSTON, 1996).

Os circuitos neurais do colículo inferior estão envolvidos com as vias de entrada, auditiva, e com a geração e elaboração do comportamento defensivo em resposta a um estímulo ameaçador (BRANDÃO *et al.*, 1994; BRANDÃO *et al.*, 1999; COIMBRA *et al.*, 2000). Alguns estudos mostraram que a microinjeção de agonistas GABAérgicos no colículo inferior reduziram as respostas aversivas eliciadas por estimulação elétrica dessa estrutura (MELO *et al.*, 1997; PANDOSSIO *et al.*, 1999). A microinjeção de antagonistas de receptores GABAérgicos nessa estrutura mimetizou os efeitos da estimulação elétrica, apontando assim para uma modulação inibitória tônica, GABAérgica, dessa região mesencefálica (BRANDÃO *et al.*, 1982; BRANDÃO *et al.*, 1988). Assim também, estudos fisiológicos indicaram que o GABA aplicado a neurônios do colículo inferior exerce um efeito inibitório (FAINGOLD *et al.*, 1983).

Alguns investigadores descobriram que o colículo inferior também se projeta para áreas corticais, principalmente aquelas situadas no lobo temporal (COOPER *et al.*, 1976; MEININGER *et al.*, 1986). Outras projeções vindas do núcleo central do colículo inferior passam pelo corpo geniculado medial, depois vão para à amígdala, tálamo dorsomedial, terminando no córtex pré-frontal (FUSTER, 1989; BRODAL, 1992). Dessa forma, o colículo inferior é importante para a informação auditiva, sendo que perturbações nessa área podem alterar a transmissão da informação para os centros corticais. Estudos recentes mostram que ratos podem aprender a evitar a estimulação elétrica no núcleo central do colículo inferior, sugerindo que essa estimulação possui um caráter aversivo (TRONCOSO *et al.*, 1998).

As respostas comportamentais, sensoriais e autonômicas produzidas pela estimulação elétrica do núcleo central do colículo inferior são muito similares às reações de defesa observadas em situações ameaçadoras. Tais reações de defesa são integradas com a participação de estruturas corticais situadas no córtex pré-frontal. Em harmonia com essa afirmação, pesquisadores notaram um aumento dos níveis de dopamina no córtex pré-frontal, após a estimulação elétrica do núcleo central do colículo inferior (CUADRA *et al.*, 2000). Estudos anatômicos têm mostrado que o córtex pré-frontal faz conexões com áreas auditivas, localizadas no córtex temporal (FUSTER, 1989).

O colículo inferior, juntamente com outras estruturas como o complexo olivar superior e o núcleo coclear, possibilitam ao animal a habilidade de caracterizar a localização do som (MASTERTON, 1992; MARTIN, 1998; PURVES *et al.*, 2001). Para o animal, seja ele presa ou predador, essa habilidade de reconhecer rapidamente sua posição com relação ao local de onde se origina o som é de fundamental importância para sua sobrevivência e para a de sua prole.

4- SUBSTÂNCIA NEGRA

A substância negra é a maior estrutura nuclear do mesencéfalo (MARTIN, 1998) e é classificada morfológicamente em três subdivisões: a parte compacta (SNpc), a parte reticulada (SNpr) e a parte lateral (SNpl). Há neurônios pequenos na substância negra, cujo diâmetro varia de 10 µm a 45 µm, sendo que morfológicamente essas células se apresentam sob forma poligonal, fusiformes, triangulares, esféricas e semelhantes a elementos neurogliais (DANNER & PFISTER, 1982).

A SNpc de roedores pode ser subdividida em uma parte rostral e outra, caudal, as quais apresentam diferentes características celulares. Na porção rostral, os neurônios consistem nos maiores e mais pigmentados da substância negra; caudalmente, as células são menores e mais pálidas (FALLON & LOUGHLI 1985).

A SNpr está localizada adjacente à base do pedúnculo e contém GABA (MARTIN, 1998). Alguns trabalhos na literatura mostraram que áreas específicas do caudado-*putamen* se projetam topograficamente à SNpr (SZABO, 1967; STAINES, 1980; BOLAM *et al.*, 1981; PARENT, 1990), figura 2 B.

No rato, gato, macaco e no homem, a SNpl está localizada dorso-lateralmente à SNpr, e lateralmente à SNpc (HUBER *et al.*, 1943). No rato e no macaco, a SNpl possui menor extensão rostro-caudal e se inicia caudalmente às demais subdivisões da substância negra. Muitos de seus neurônios contêm dopamina ou colecistocinina, alguns dos quais se dirigem para dentro da região do núcleo peripeduncular (FALLON *et al.*, 1983).

A área tegmental ventral (ATV), localizada dorsomedialmente à substância negra contém neurônios dopaminérgicos e se projeta para o estriado (MARTIN, 1998; PURVES *et al.*, 2001).

A SNpc dá origem ao sistema dopaminérgico nigro-estriatal (FAULL & MEHLER, 1978; BECKSTEAD *et al.*, 1979; SWANSON, 1982; MARTIN, 1998) e a degeneração desse sistema é a maior causa das síndromes parkinsonianas. Por sua vez, a SNpr, junto com o globo pálido, constitui a principal fonte de saída dos núcleos basais. As duas principais projeções eferentes da SNpr se dirigem ao núcleo ventro-medial do tálamo (FAULL & MEHLER, 1978; GROFOVÁ *et al.*, 1982) e ao colículo superior (RINVIK *et al.*, 1976; FAULL & MEHLER, 1978; MAY & HALL, 1986; WILLIAMS & FAULL, 1988; HARTING *et al.*, 1988; EICHENBERGER *et al.*, 2002), figura 2 B. Os neurotransmissores potencialmente envolvidos são a dopamina e o GABA.

Outras projeções provenientes de neurônios da substância negra, parte reticulada, destinam-se à formação reticular mesencefálica caudal e mais especificamente ao núcleo pedúnculo-pontino (BECKSTEAD, 1982; JACKSON & CROSSMAN, 1983; DENIAU & CHEVALIER, 1992).

4.1- Conexões Aferentes

A aferência que se destina à substância negra é a projeção estriado-nigral (JOHNSON & CLEMENTI, 1959; FISHER *et al.*, 1986; BOLAM & SMITH, 1990) que provém de neurônios GABAérgicos localizados no caudado-*putamen* (GROFOVA, 1975; RIBAK *et al.*, 1980), figura 2 B. A SNpr contém a mais alta concentração de GABA do encéfalo. É importante mencionar que o GABA, na SNpr, é encontrado não só em terminações axônicas, mas também no interior de corpos celulares (RIBAK *et al.*, 1980).

Uma segunda conexão aferente à substância negra é a via pálido-nigral (GERFEN *et al.*, 1982; SMITH & BOLAM, 1989); projeções que se destinam à região dorsal da SNpr e SNpc (RIBAK *et al.*, 1976; GERFEN *et al.*, 1982). O GABA parece ser o neurotransmissor envolvido também nessa via (RIBAK *et al.*, 1976, 1980).

Outra importante aferência à substância negra consiste na via subtálamo-nigral (GERFEN *et al.*, 1982), cujo destino é a SNpr. Ao lado desta, há também a via córtico-nigral, que se origina no córtex motor e área 32, de Brodmann, e se destina à SNpr (GERFEN *et al.*, 1982), assim como a conexão tecto-nigral, recentemente descrita na literatura (EICHENBERGER *et al.*, 2002), que pode vir a modular as projeções GABAérgicas nigro-tectais.

4.2- Conexões Eferentes

Projeções Dopaminérgicas

A via funcionalmente mais relevante compreende as projeções ascendentes mesotelencefálicas (LINDIVALL & BJÖRKLUND, 1978), compostas pelas vias nigro-estriatal, mesocortical e mesolímbica.

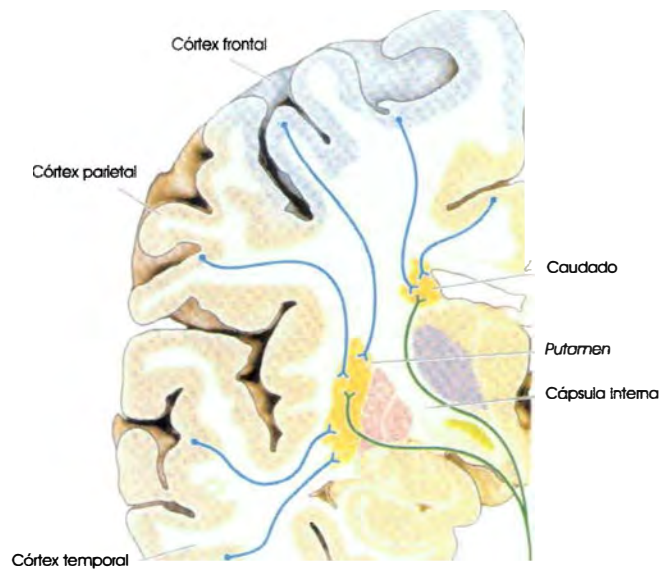
A via nigro-estriatal se origina de neurônios dopaminérgicos (e não-dopaminérgicos) localizados na SNpc, na SNpl e na SNpr (FALLON & MOORE, 1978), figura 2 A. Algumas das projeções meso-estriatais, especialmente aquelas que se originam medialmente na SNpc, também se projetam para outras áreas do prosencéfalo, tais como o complexo amigdalóide, septo cerebral, tubérculo olfatório e neocórtex (FALLON & LOUGHLIN, 1982).

A via mesolímbica tem o rigem na área tegmental ventral (ATV) e em áreas adjacentes, especialmente a região dorsal da SNpc, além da SNpl. As principais eferências se dirigem ao complexo amigdalóide (núcleos central, baso-lateral e intercalado). Rostralmente, projetam-se ao *nucleus accumbens* (FALLON & MOORE, 1978; SWANSON, 1982).

As projeções dopaminérgicas mesocorticais se originam de células dispersas na área tegmental ventral (ATV), região medial da SNpc e inervam o córtex pré-frontal, o giro do cíngulo e áreas suparrinal e entorrinal (FALLON & MOORE, 1978; SWANSON, 1982).

Descreve-se também uma via dopaminérgica descendente, que tem origem na substância negra e que se destina ao núcleo mediano da rafe e *locus coeruleus* (SWANSON, 1982).

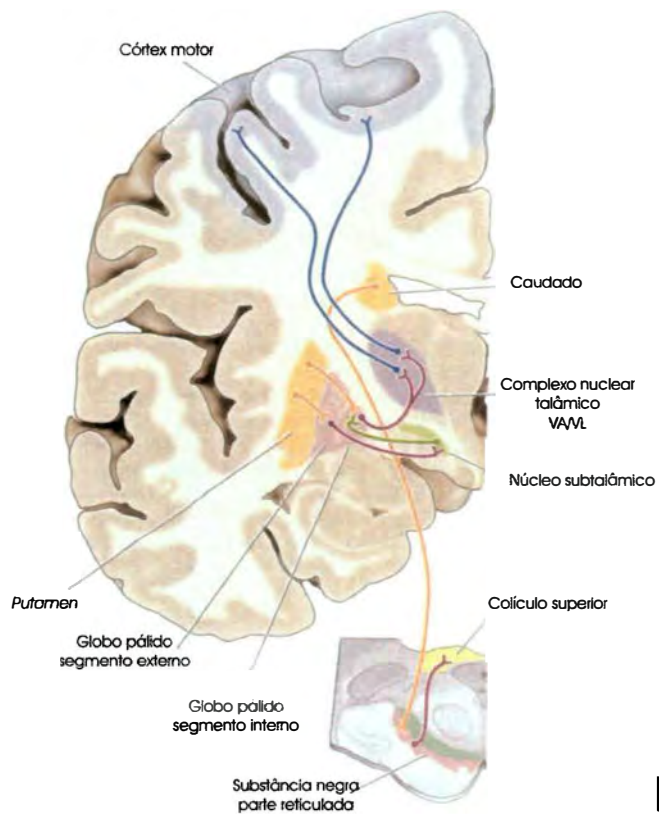
Figura 2 - A) Organização anatômica das aferências aos núcleos basais, mostrando as projeções vindas do córtex cerebral e da substância negra, parte compacta para o estriado (caudado-*putamen*). B) Organização anatômica, apontando os núcleos basais (segmentos interno e externo do globo pálido, caudado-*putamen*), a substância negra, parte reticulada, o colículo superior, os núcleos subtalâmicos, o tálamo e o córtex cerebral. Destaque para a via **estriado-nigro-tectal**. Purves e col., 2001.



Mesencéfalo

Substância negra
parte compacta

A



B

4.3- Conexões Eferentes

Projeções Não-Dopaminérgicas

A mais expressiva eferência não-dopaminérgica da substância negra se origina na SNpr e se destina ao tálamo, colículo superior (figura 3 B), formação reticular mesencefálica e substância cinzenta periaquedutal dorsal (RIOCH, 1929; FAULL & MEHLER, 1978; BENTIVOGLIO *et al.*, 1979; GERFEN *et al.*, 1982; APPELL & BEHAN, 1990; DENIAU & CHEVALIER, 1992; REDGRAVE *et al.*, 1992; EICHENBERGER *et al.*, 2002). O neurotransmissor usado por essa via parece consistir no GABA (KILPATRICK *et al.*, 1980; COIMBRA & BRANDÃO, 1993).

A via nigro-tectal se origina de neurônios localizados na região ventro-medial (rostralmente) e ventro-lateral (caudalmente) da SNpr (FAULL & MEHLER, 1978; KILPATRICK *et al.*, 1982), e seus axônios se projetam para as camadas profundas do colículo superior de ambos os lados do mesencéfalo (GERFEN *et al.*, 1982; EICHENBERGER *et al.*, 2002). Os axônios que compõem a via nigro-tectal são finos e desmielinizados, formando sinapses nos estratos intermediários (FAULL & MEHLER, 1978; REDGRAVE *et al.*, 1992) e profundo (EICHENBERGER *et al.*, 2002) do colículo superior. Essas projeções ainda se estendem à substância cinzenta periaquedutal dorsal (GROFOVÁ *et al.*, 1978; EICHENBERGER *et al.*, 2002) e parecem usar o GABA, como neurotransmissor inibitório (COIMBRA & BRANDÃO, 1993; EICHENBERGER *et al.*, 2002). Há também indícios de projeções não-dopaminérgicas que se originam na SNpl e destinam-se ao núcleo pericentral do colículo inferior, além dos aspectos dorsais da porção caudal da substância cinzenta periaquedutal (YUKIHIKO *et al.*, 1991).

5- NÚCLEOS BASAIS

Os núcleos da base são constituídos pelo núcleo caudado, *putamen* e globo pálido. O núcleo caudado e o *putamen* compõem o estriado (*striatum*), também chamado neo-estriado, e o *putamen* e o globo pálido formam o núcleo lenticular. As estruturas funcionalmente relacionadas são o núcleo subtalâmico (Corpo de Luys), alguns núcleos talâmicos (complexo ventral anterior e ventral lateral) e a substância negra. O globo pálido e a substância negra, parte reticulada, são as principais fontes de saída do complexo dos núcleos basais (PURVES *et al.*, 2001).

A maioria das conexões aferentes para os núcleos da base terminam no neo-estriado, o qual recebe entradas de duas fontes importantes: o córtex cerebral (figura 3 A) e os núcleos intralaminares talâmicos. Cada área do córtex se projeta para um núcleo distinto do neo-estriado e cada um desses núcleos possuem uma função comportamental definida. Assim, o *putamen* está relacionado primariamente ao controle motor, o caudado ao controle dos movimentos oculares e com determinadas funções cognitivas. O estriado ventral está envolvido com as outras áreas corticais que modulam os efeitos da emoção sobre o comportamento (KANDELL *et al.*, 1995).

A projeção estriado-nigral (figura 3 B) recebe fibras provenientes de áreas do corpo estriado para um mesmo local da substância negra (LOOPUIJT & VAN DER KOOY, 1985). Os neurônios estriatais, em sua maioria, que se projetam à substância negra são não-colinérgicos e constituem cerca de 96% da população neuronal do corpo estriado (HENDERSON, 1981), e a circuitaria interna estriado-palidal e neo-estriatal parece usar o GABA como neurotransmissor (RIBAK *et al.*, 1979).

Os canais de saída dos núcleos basais partem, em linhas gerais, do segmento interno do globo pálido, da substância negra, parte reticulada, e dos núcleos

subtalâmicos. Cada uma dessas projeções se dirige em parte ao córtex, por meio do tálamo, e parcialmente ao mesencéfalo, também estendendo-se a neurônios bulbares e motores espinhais. O *striatum* parece ser dividido em uma região límbica ventro-medial aferente e uma região não-límbica dorso-lateral, que recebe as principais projeções motoras córtico-estriatais (NAUTA & DOMESICK, 1984).

Os neurônios de tamanho médio do caudado e do *putamen* enviam projeções GABAérgicas inibitórias à divisão interna do globo pálido e à substância negra, parte reticulada. Os neurônios eferentes do globo pálido interno e da substância negra, parte reticulada, alcançam a via que faz a ligação dos núcleos basais com os neurônios motores corticais, localizados no córtex cerebral e no tronco encefálico. A via para o córtex motor alcança primeiro o segmento interno do globo pálido, depois as projeções inibitórias chegam aos núcleos ventral anterior e ventral lateral do complexo talâmico, sendo enviadas diretamente, através dos núcleos talâmicos, para as áreas motoras do córtex, excitando-as. Já os axônios da substância negra, parte reticulada, fazem sinapses com os neurônios motores corticais do colículo superior (figura 3 B) que comanda os movimentos dos olhos (PURVES *et al.*, 2001) e também às camadas do colículo superior, que elaboram parte das reações de defesa, como o *stratum griseum profundum* (EICHENBERGER *et al.*, 2002). Outras saídas dos núcleos da base se dirigem para os córtices pré-motor e pré-frontal, por via talâmica (KANDELL *et al.*, 1995).

Um possível papel dos núcleos da base no controle motor pode estar no processamento da informação, necessário para o planejamento e a iniciação de movimentos auto-iniciados, bem como podem relacionar-se com a organização dos ajustes posturais associados ao movimento (KANDELL *et al.*, 1995).

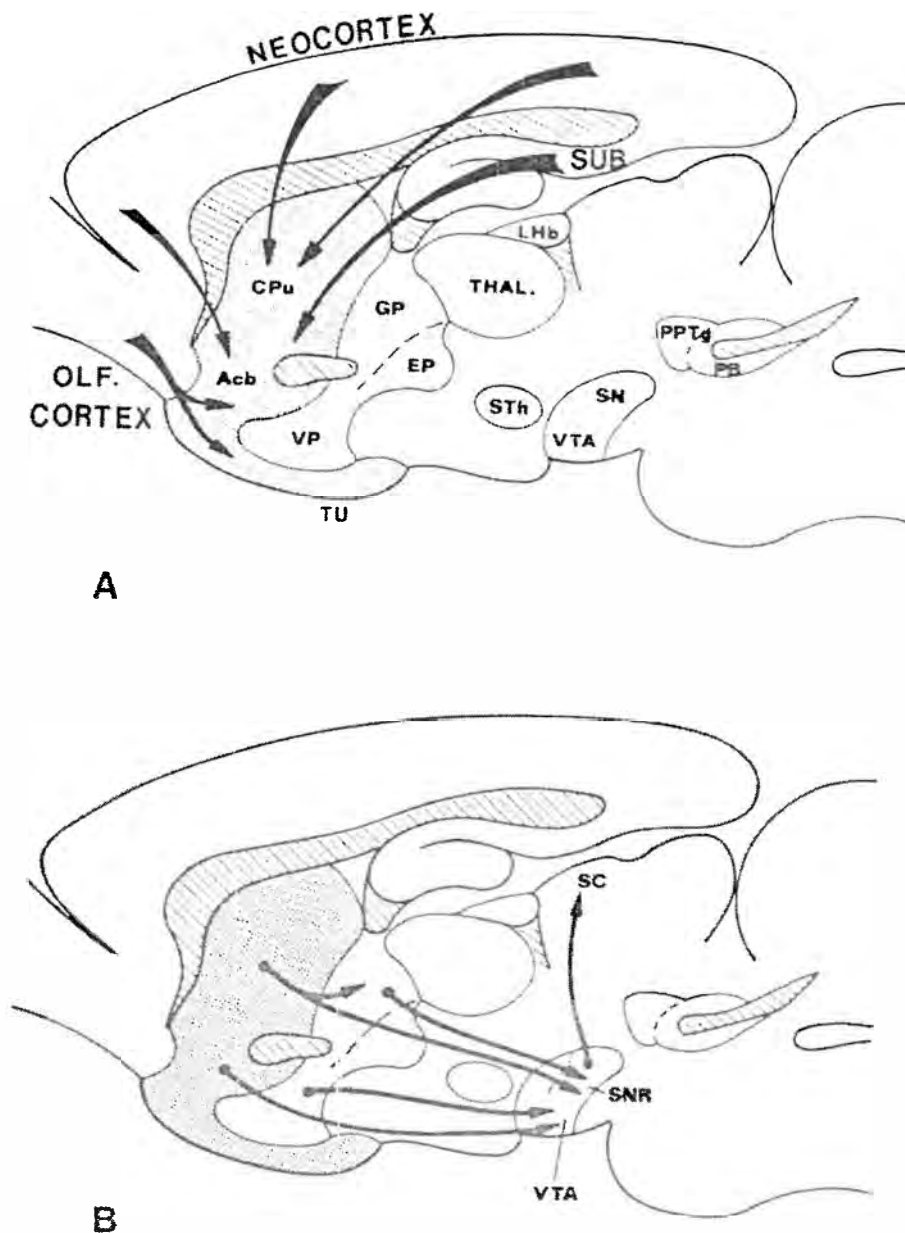


Figura 3 – A) As projeções córtico-estriatais. ACb, núcleo accumbens; Cpu, caudado-*putamen*; EP, núcleo endopeduncular; GP, globo pálido; LHb, núcleo habenular lateral; PB, núcleo parabraquial; PPTg, núcleo subtalâmico; Tu, tubérculo olfatório; VP, pálido ventral; VTA, área tegmental ventral.

B) Projeções estriado-nigrais e o “sistema de saída” da parte reticulada da substância negra (SNpr). CS, colículo superior; VTA, área tegmental ventral. Paxinos, G. (1985).

6- OBJETIVO GERAL

Estudar a participação de estruturas mesencefálicas como o colículo inferior (estratos aversivos), e a substância negra (parte reticulada), na geração, elaboração e modulação do comportamento aversivo que tem sido associado ao medo.

6.1- Objetivos Específicos

Estudar anatomicamente, com traçador fluorescente, de captação e transporte retrógrado (fast blue), e anterógrado (biodextran), não-fluorescente, parte do duplo elo inibitório, GABAérgico, estriado-nigro-tectal.

Estudar os efeitos da diminuição da atividade da via nigro-colicular sobre as respostas aversivas eliciadas por estimulação elétrica do colículo inferior.

Investigar, morfológicamente, as conexões intramesencefálicas caudais, conectando o núcleo central do colículo inferior (NCCI) com os substratos periaquedutais que organizam e elaboram a imobilidade defensiva e o comportamento de fuga.

Investigar o efeito da estimulação química do colículo inferior (com o bloqueio de receptores GABA-A no NCCI) sobre as respostas comportamentais de fuga, caracterizadas por cruzamentos, saltos, levantamentos e rotações.

7- MATERIAL E MÉTODOS

7.1- Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando 250-300g, vindos do biotério do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Esses animais foram mantidos em gaiolas individuais, com livre acesso à comida e água durante todo o experimento. Os experimentos foram realizados seguindo as recomendações gerais da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), as quais são baseadas no Manual de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América.

7.2- Traçamento das projeções nigro-tectais

Em animais previamente submetidos a uma cirurgia estereotáxica para a implantação de uma cânula-guia no colículo inferior, segundo as seguintes coordenadas: AP=8,8 mm; L=1,6 mm e DV=4,5 mm, foi microinjetado 0,5 µl de uma solução de “fast blue” a 1% no núcleo central do colículo inferior. O traçador foi diluído em uma solução salina a 0,9 %. Depois de passados oito dias, os animais foram sacrificados com emanações de éter etílico, perfundidos com tampão fosfato em solução salina (0,1M, pH=7,3), e paraformaldeído a 4 %, por via intracardiaca. Em seguida, seus encéfalos foram removidos e mantidos na solução fixadora por 4 horas. Foram, então, mantidos em solução salina, tamponada, com sacarose a 10 % e a 20 %, por 12 horas em cada solução. Os encéfalos foram, por fim, congelados a -80° C, em isopentana resfriada em gelo seco, e levados a um criostato, onde secções de 20 µm foram obtidas. Estas, montadas entre lâmina e lamínula, com óleo mineral, foram analisadas em um

microscópio de fluorescência (Axiophot; Zeiss) equipado com filtros de excitação Bp 360 nm ou 450-546 nm, espelho dicrótico FT 580 nm ou 510 nm e filtro de barragem LP 590 nm ou 520 nm.

Para confirmar esse estudo neuroanatômico, um outro grupo de animais recebeu microinjeções de um neurotraçador anterógrado, a amina dextran biotinizada (biodextran; Molecular Probes), na parte reticulada da substância negra. Para isso, foram preparadas micropipetas com ponta de diâmetro entre 40 e 50 μm , preenchidas com biodextran a 10 %, dissolvida em tampão fosfato a 0,1M, em pH 7,3. O neurotraçador foi depositado no tecido neural por iontoforese (ponta do eletrodo positiva, corrente contínua, com pulsos de 5 μA , com 7 s de duração e 7 s de intervalo, cobrindo um período de 15 min, seguindo-se 10 min de repouso). Completado o período de microinjeção, a calvária foi recoberta com acrílico autopolimerizável para proteger a trepanação de impurezas. Passados três dias de pós-operatório, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico e perfundidos por via intracardíaca com salina tamponada, seguida de paraformaldeído a 4 %, em tampão fosfato, 0,1M, pH 7,3. Em seguida, os encéfalos foram removidos, processados para a obtenção de cortes congelados, como descrito acima, e secções de 60 μm foram obtidas no criostato (Mícrom) e depositadas em placas de acrílico, confeccionadas para a técnica de “free floating”. Antes do processamento histoquímico da marcação com biodextran, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por pré-incubação em soluções alcoólicas de concentração variada (50 %, 70 %, 50 %) por 15, 20 e 15 min, respectivamente (Metz *et al.*, 1989). A marcação por biodextran foi visualizada usando-se o método da avidina-biotina (ABC standart Elite kit; Vector Laboratories) com reação 3-3 diaminobenzidina (DAB; Sigma) peroxidase intensificada com níquel. As

secções foram lavadas em tampão fosfato, pH 7,3, montadas entre lâminas e lamínulas, e coradas com hematoxilina-eosina.

O biodextran foi também microinjetado iontoforéticamente em um outro grupo de animais, no núcleo central do colículo inferior, com o intuito de investigar as conexões intramesencefálicas situadas nos estratos neurais dorsal e caudalmente localizados, responsáveis pela elaboração do comportamento de defesa.

7.3- Procedimentos cirúrgicos para os estudos psicofarmacológicos

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (45mg/kg, i. p.) e fixados no aparelho estereotáxico (David Kopf, USA). A barra dos incisivos superiores foi posicionada a 3,3 mm abaixo da linha interaural, de forma que o crânio ficou na posição horizontal entre bregma e lambda. Um quimitrodo, feito de uma cânula-guia de aço inoxidável (0,6 mm, de diâmetro externo e 0,4 mm de diâmetro interno) conectado a um eletrodo encefálico foi implantado no mesencéfalo, apontado para o núcleo central do colículo inferior. O eletrodo foi feito de um fio de aço inoxidável, 160 µm de diâmetro, isolado em toda sua extensão, exceto na seção transversa da ponta, ultrapassando a cânula em 1 mm. O quimitrodo foi introduzido verticalmente, usando-se as seguintes coordenadas, tomando-se o lambda como ponto de referência para cada plano: ântero-posterior = 0,9 mm; médio-lateral = 1,5 mm; e dorso-ventral = 4,5 mm. Uma cânula-guia também foi implantada na substância negra, parte reticulada. Tomando-se o bregma como referência, a cânula foi implantada de acordo com as seguintes coordenadas: ântero-posterior = -5,8 mm; médio-lateral = 1,6 mm; dorso-ventral = 7,5 mm. O quimitrodo e a cânula foram fixados no crânio através de uma

resina acrílica e três parafusos de aço inoxidável. No final da cirurgia, cada cânula-guia foi selada temporariamente com um fio de aço inoxidável para proteção contra possíveis entupimentos.

Em animais acordados, previamente submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação de um quimitrodo no núcleo central do colículo inferior, como descrito acima, foram microinjetados 0,2 µl de salina (NaCl a 0,9 %) ou 40 ηg / 0,2 µl de metiliodeto de bicuculina, e o comportamento resultante do bloqueio de receptores GABA-A no teto mesencefálico, e que também seguiu-se à administração central do veículo da solução que continha o antagonista farmacológico, foi avaliado durante 20 min. Passadas duas horas após as microinjeções, os animais, que haviam já retornado a suas respectivas gaiolas, foram sacrificados com emanações de éter etílico e perfundidos por via intracardíaca com salina tamponada, seguida de paraformaldeído a 4 %, em tampão fosfato, 0,1M, pH 7,3. Em seguida o encéfalo foi removido, e imerso no fixador por 4h, a 4°C.

7.4- Drogas

Foram usados o metiliodeto de bicuculina (40 ηg / 0,2 µl), o “fast blue” a 1 % (Sigma), o biodextran a 10 % (molecular Probes), reagentes ABC (Vector Laboratories), DAB (Sigma), dissolvidos em solução tamponada (PBS, 0,1M, pH 7,3), e o ácido ibotênico (1 µg, Sigma) dissolvido em solução de cloreto de sódio a 0,9%.

7.5- Microinjeção intramesencefálica de drogas

As drogas e seu respectivo veículo (salina a 0,9%) foram administrados no tegmento mesencefálico por meio de uma seringa Hamilton (modelo 701 – EUA), de 10 μ l, conectada a uma agulha dental (Mizzy – EUA), de 0,3 mm de diâmetro externo, através de um tubo de polietileno PE-50. A extremidade da agulha alcançava o tecido encefálico 1 mm abaixo do limite inferior da cânula-guia.

Para se obter uma redução na atividade inibitória das vias nigro-coliculares, foram realizadas microinjeções unilaterais de ácido ibotênico, por meio de uma cânula-guia independente do quimitrodo e inserida na intimidade da substância negra, parte reticulada. A neurotoxina (1 μ g; 0,5 μ l) foi infundida, durante 60 s, 1 mm abaixo da cânula-guia, em ratos anestesiados com pentobarbital sódico.

7.6- Medidas das reações aversivas

Uma semana após a cirurgia, os animais foram colocados em uma arena circular (60cm de diâmetro e 50cm de altura, com o assoalho dividido em 12 seções), com o compartimento experimental iluminado com uma lâmpada fluorescente de 40 Watts. O mesencéfalo foi estimulado eletricamente através de um estimulador de corrente senoidal (Marseillan, Brasil). A estimulação da corrente foi monitorizada por um osciloscópio (Minipa, Brasil). A estimulação encefálica (60 Hz, 15 s) foi feita a intervalos de 1 min. com aumento de corrente a passos de 5 μ A (pico a pico), até serem atingidos os limiares aversivos.

O limiar de congelamento foi operacionalmente definido pela intensidade mínima de corrente que, aplicada por duas vezes consecutivas, induzisse um conjunto de sinais caracterizados por arqueamento do dorso, exoftalmia, defecação, micção e retração das orelhas; o limiar de fuga, pela menor intensidade de corrente elétrica que, aplicada ao colículo inferior, induzia, em duas ocasiões seguidas, respostas de galope (corridas bruscas no interior da arena) ou o aparecimento de saltos. A determinação desses limiares era feita rotineiramente antes de qualquer teste experimental.

Para os experimentos psicofarmacológicos, 40 η g de metiliodeto de bicuculina ou seu veículo (solução salina a 0,9 %; 0,2 μ l) foram microinjetados no núcleo central do colículo inferior, e o comportamento dos animais (cruzamentos, saltos, rotações e levantamentos) foi cuidadosamente registrado no teste do campo aberto (arena), de 1-1 min., durante 20 min. Considerou-se um cruzamento, quando o roedor colocava as quatro patas em um dos compartimentos da arena; um levantamento, quando o animal erguia-se sobre as patas posteriores; um salto, quando o roedor arrojava-se, erguendo as quatro patas do assoalho da arena; e uma rotação, quando o animal realizava giros fechados, de 360°.

7.7- Procedimento para a realização de lesões eletrolíticas da substância negra

As lesões eletrolíticas da substância negra, parte reticulada foram produzidas em animais previamente anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg), através da passagem de uma corrente elétrica de 2 mA, durante 15 s, por um eletrodo monopolar, confeccionado a partir de um fio de aço inoxidável de 300 μ m de diâmetro, e isolado em toda a sua extensão, excetuando-se a extremidade. Esse eletrodo era direcionado à

substância negra, parte reticulada através de uma cânula-guia implantada cronicamente no tecido nervoso, ultrapassando-a em 1 mm. Um outro pólo era acoplado ao pavilhão auditivo do animal, cuja condutibilidade era favorecida pela presença de um chumaço de algodão embebido em solução salina a 0,9 %.

7.8- Histologia para a determinação dos sítios de microinjeção de drogas

Após a finalização dos experimentos, os animais eram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (45 mg/kg) até atingir uma depressão respiratória letal, seguida de uma incisão no tórax, com exposição do mediastino. O próximo passo era clampar a aorta descendente torácica, libertando o coração do envoltório pericárdico, para o puncionamento do ventrículo esquerdo, por meio de um equipo sanguíneo conectado a uma seringa de 60 ml, e era feita uma incisão no átrio direito, quando então os encéfalos eram perfundidos com solução salina a 0,9 %, seguida por solução de paraformaldeído a 4 %. Em seguida, os encéfalos eram removidos, seccionados em cortes coronais, para separação do tecido mesencefálico do restante do tecido nervoso. O bloco assim obtido era levado ao criostato, onde secções seriadas de 20 μ m eram realizadas e adequadamente montadas em lâminas gelatinizadas; posteriormente desidratadas, diafanizadas e coradas com azul de metileno. Em seguida, foram analisadas ao microscópio de luz, e os sítios de microinjeção de drogas foram assim assinalados em diagramas do atlas de Paxinos e Watson (1997).

7.9- Análise estatística

Os dados com distribuição contínua (limiares aversivos) foram analisados usando-se o teste T de Student para amostras pareadas. Os dados de análise quantitativa do comportamento de fuga (cruzamentos, saltos, rotações e levantamentos), por não terem uma distribuição normal, foram analisados através do teste de Wilcoxon.

8- RESULTADOS

Todos os animais estudados e incluídos no presente trabalho apresentaram comportamento de fuga, expresso por corridas, saltos, eliciados de maneira explosiva e não direcionados, após a estimulação elétrica do núcleo central do colículo inferior. Apenas animais que apresentaram limiar de fuga abaixo de 200 μ A foram considerados.

A microinjeção do traçador fluorescente de captação e transporte retrógrado (*fast blue* a 1 %) no núcleo central do colículo inferior (fig. 1) mostrou evidências neuroanatômicas da presença de neurônios fortemente marcados na substância negra, parte reticulada (fig. 2). Essas células neuronais projetam-se ipsi (fig. 3 A e B) e contralateralmente (fig. 4 A e B) para os substratos neurais que elaboram o medo no núcleo central do colículo inferior. Um diagrama da localização dos neurônios de projeção nigro-tectal é mostrado na figura 5.

As microinjeções iontoforéticas do traçador anterógrado, a amina dextran biotinizada, na substância negra, parte reticulada (fig. 6), permitiu a identificação de neurônios que se projetam ipsi (fig. 7 A) e contralateralmente (fig. 7 B) para o núcleo central do colículo inferior. Fibras neurais varicosas e não-varicosas, ao lado de uma ampla rede sináptica são visualizadas na substância negra, parte reticulada (fig. 7 C). Terminações sinápticas foram observadas no núcleo central do colículo inferior (fig. 8), assim como foram identificadas profusas conexões sinápticas varicosas e fibras positivas para biodextran no núcleo central do colículo inferior (fig. 9), após a microinjeção do biodextran na SNpr.

As lesões eletrolíticas unilaterais da SNpr (fig. 11 A e B), ipsilaterais aos sítios de estimulação elétrica situados no núcleo central do colículo inferior (fig. 10 A) induziram uma diminuição significativa nos limiares de congelamento ($T= 3,53$; $p<0,01$, quando comparados com o controle, segundo o teste *t* de Student) e fuga ($T= 5,10$;

$p < 0,01$, quando comparados com o controle, segundo o teste t de Student) (fig. 12). Esses dados foram corroborados por microinjeções unilaterais de ácido ibotênico na substância negra, parte reticulada (fig 13), que também induziram uma diminuição significativa nos limiares de congelamento ($T = 2,66$; $p < 0,001$, quando comparados com o controle, segundo o teste t de Student) (fig.15) e nos limiares de fuga ($T = 2,80$; $p < 0,001$, quando comparado com o controle, segundo o teste t de Student) (fig.15).

As lesões neuroquímicas unilaterais da substância negra, parte reticulada, ipsilaterais aos sítios de estimulação elétrica, onde se localizam os neurônios que processam e elaboram o medo no núcleo central do colículo inferior produziram edema, gliose reacional e degeneração de neurônios (fig. 14 A), enquanto que as fibras de passagem foram preservadas (fig. 14 B).

O bloqueio de receptores GABA-A no substrato neural responsável pela organização do comportamento de defesa no núcleo central do colículo inferior (fig. 10 B), induziu congelamento, seguido por uma clara ativação comportamental (comportamento explosivo de fuga), caracterizada por corridas, saltos e rotações defensivas, por tempo que variou de 15 a 20 min. de duração (fig. 16 e 17).

Microinjeções de biodextran no núcleo central do colículo inferior mostraram neurônios se projetando profusamente para as colunas dorso-mediais e, principalmente laterais da substância cinzenta periaquedutal, nível caudal (fig. 18 e 19). Essa conexão colículo-periaquedutal se apresentou constituída por fibras varicosas grossas e finas e por fibras não-varicosas grossas e finas (fig. 19 e 20).

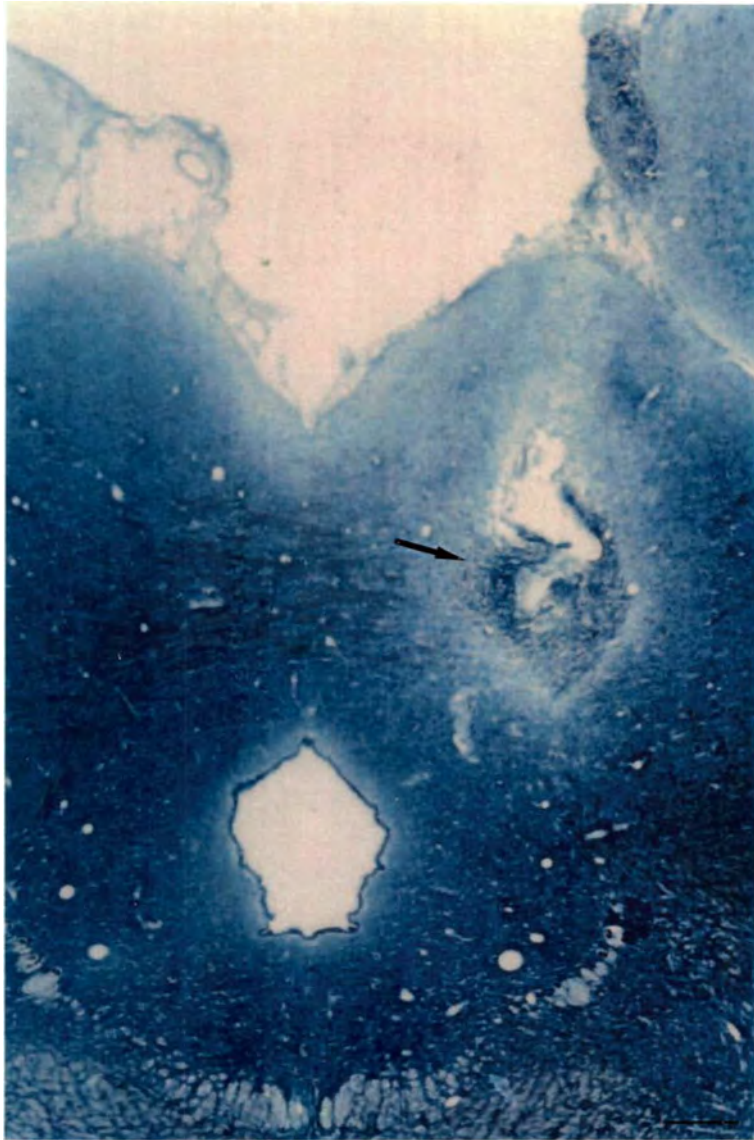


Figura 1- Fotomicrografia de um corte coronal do mesencéfalo dorsal de rato Wistar, mostrando (seta) o sítio de microinjeção de neurotraçador “fast blue” a 1% no núcleo central do colículo inferior.
Barra: 360 μ m. Coloração: azul de metileno.

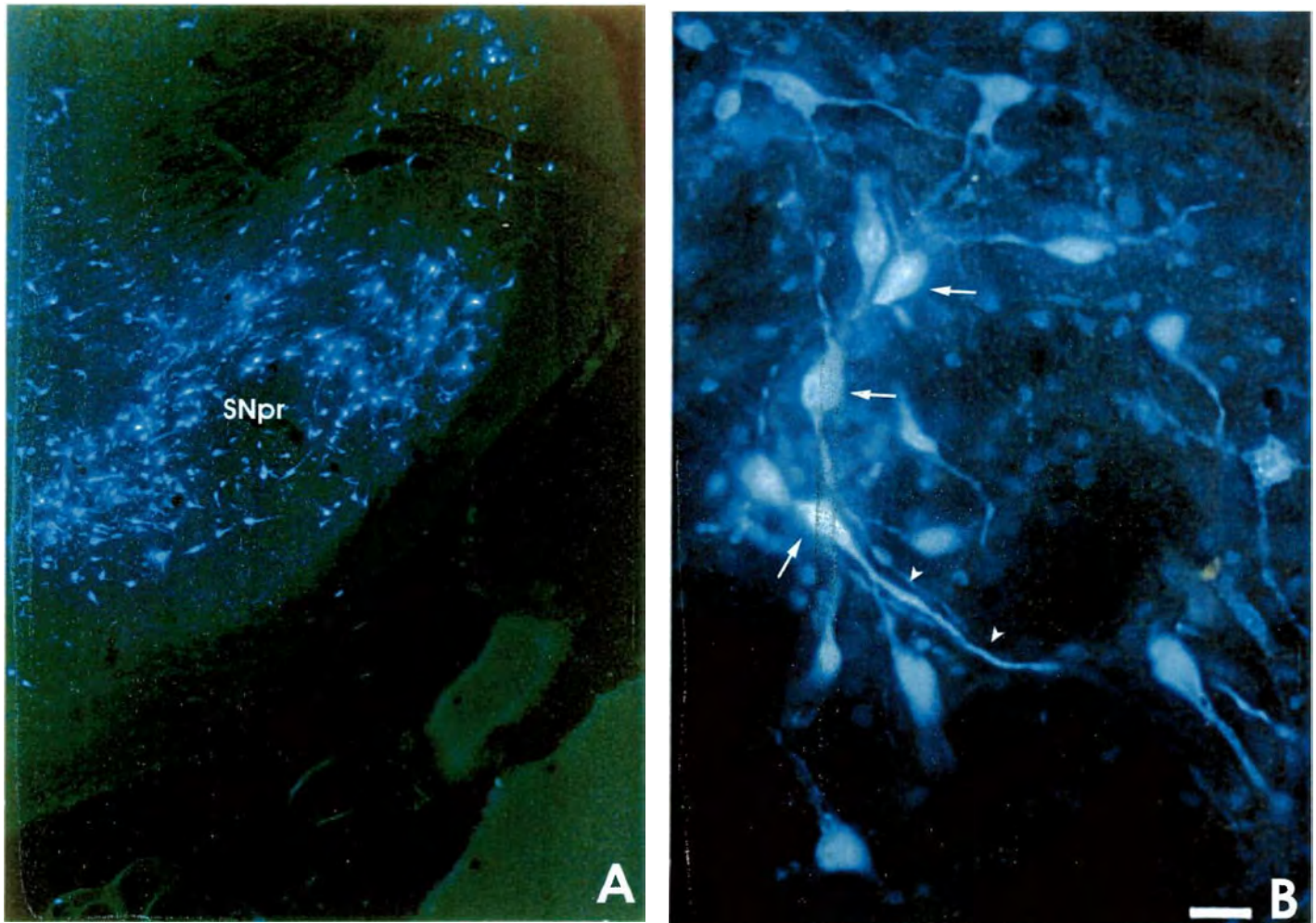


Figura 2- Fotomicrografias de cortes transversais do mesencéfalo de rato Wistar, passando pela substância negra, parte reticulada (SNpr). Notar a presença de neurônios (setas), e seus prolongamentos (pontas de setas) marcados com traçador “fast blue” localizados na substância negra, parte reticulada (ampliados em B).
Barra: 198,61 μm em A e 22,52 μm em B. Microscopia de fluorescência.

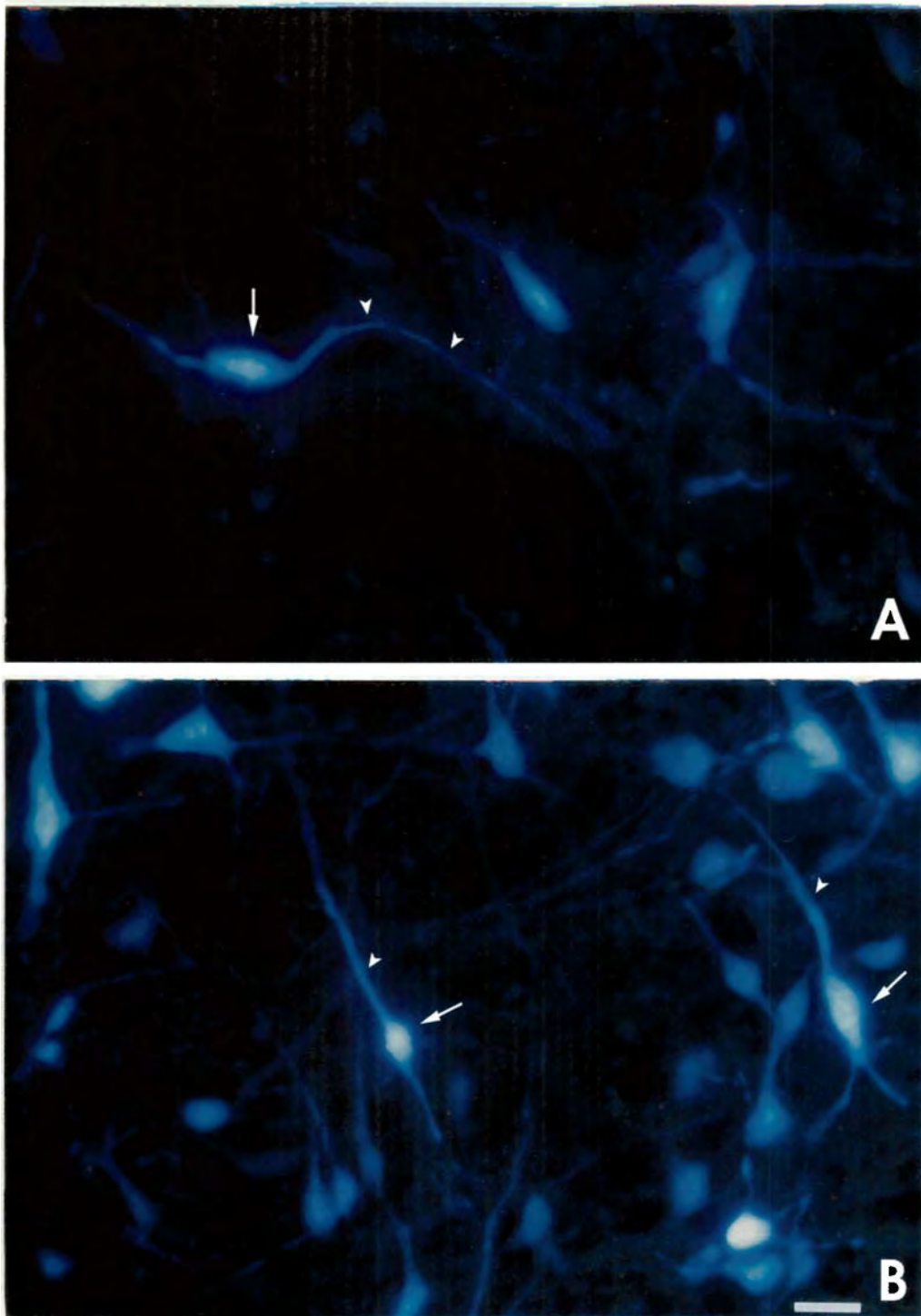


Figura 3- Fotomicrografias de cortes coronais do tegmento do mesencéfalo, passando pela substância negra, parte reticulada, mostrando (setas) corpos celulares e seus prolongamentos (pontas de setas) de neurônios que se projetam ipsilateralmente para os substratos que elaboram o medo no colículo inferior. Barra: 24,83 μm em A e B. Microscopia de fluorescência.

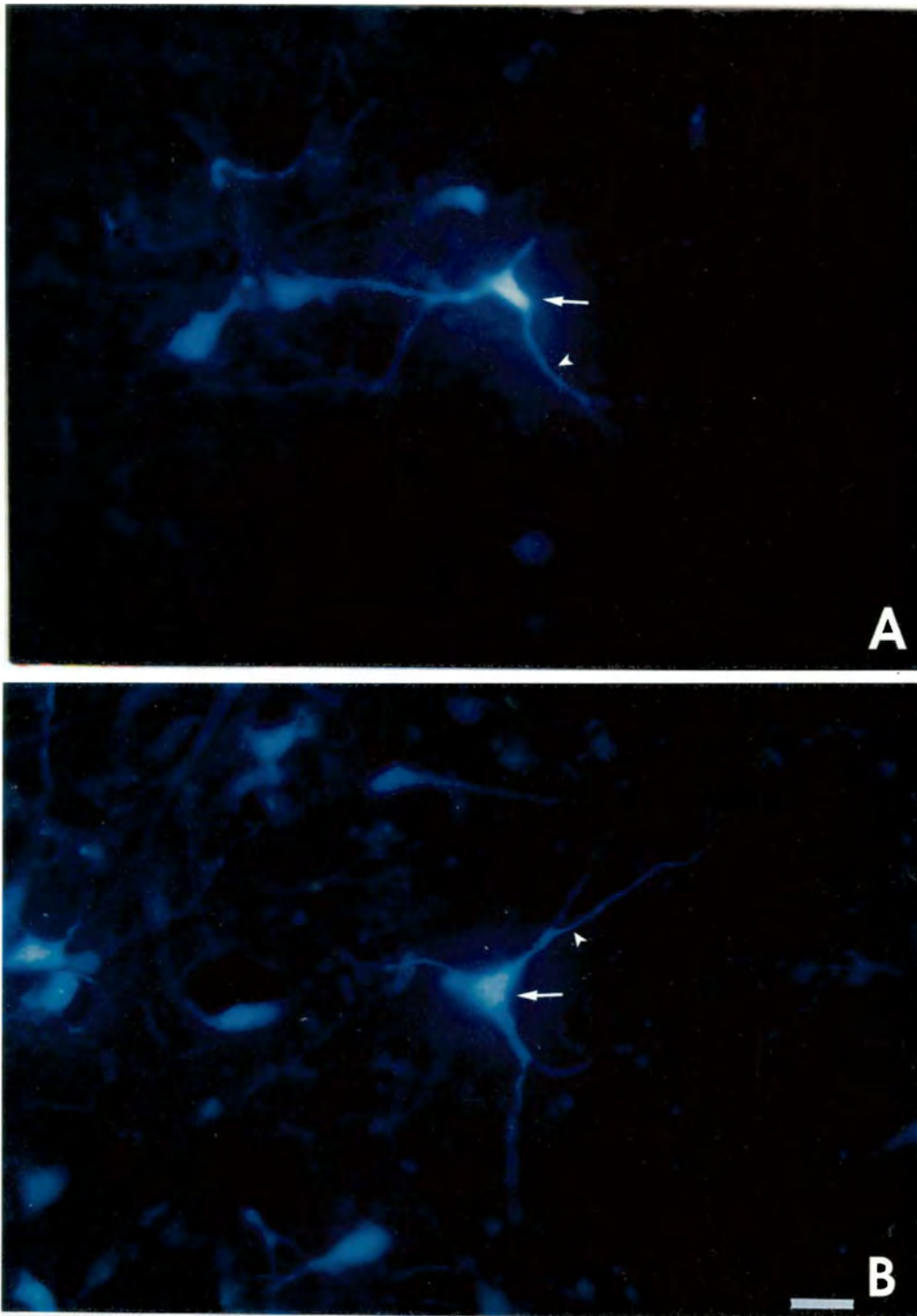


Figura 4- Fotomicrografias de cortes coronais do tegmento do mesencéfalo, passando pela substância negra, parte reticulada, mostrando corpos celulares (setas) e prolongamentos (pontas de setas) de neurônios que se projetam contralateralmente para os substratos neurais do colículo inferior que elaboram o medo. Barra: 24,83 μ m em A e B. Microscopia de fluorescência.

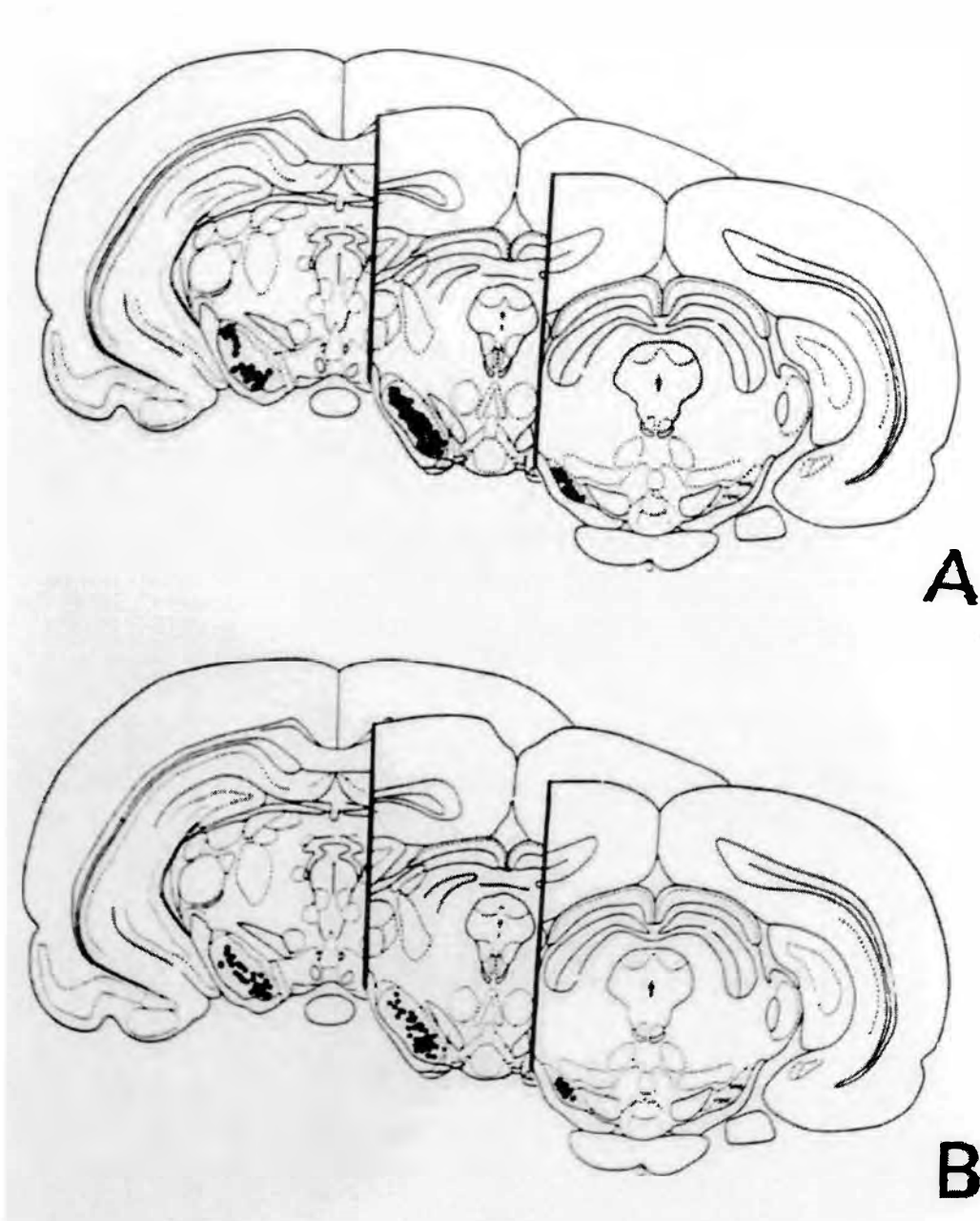


Figura 5- Diagrama mostrando os sítios neuronais (círculos negros) que se projetam da substância negra, parte reticulada, ipsi em A e contralateralmente em B ao núcleo central do colículo inferior, tendo sido utilizado, como referência, prancha, do atlas de Paxinos e Watson (1997).

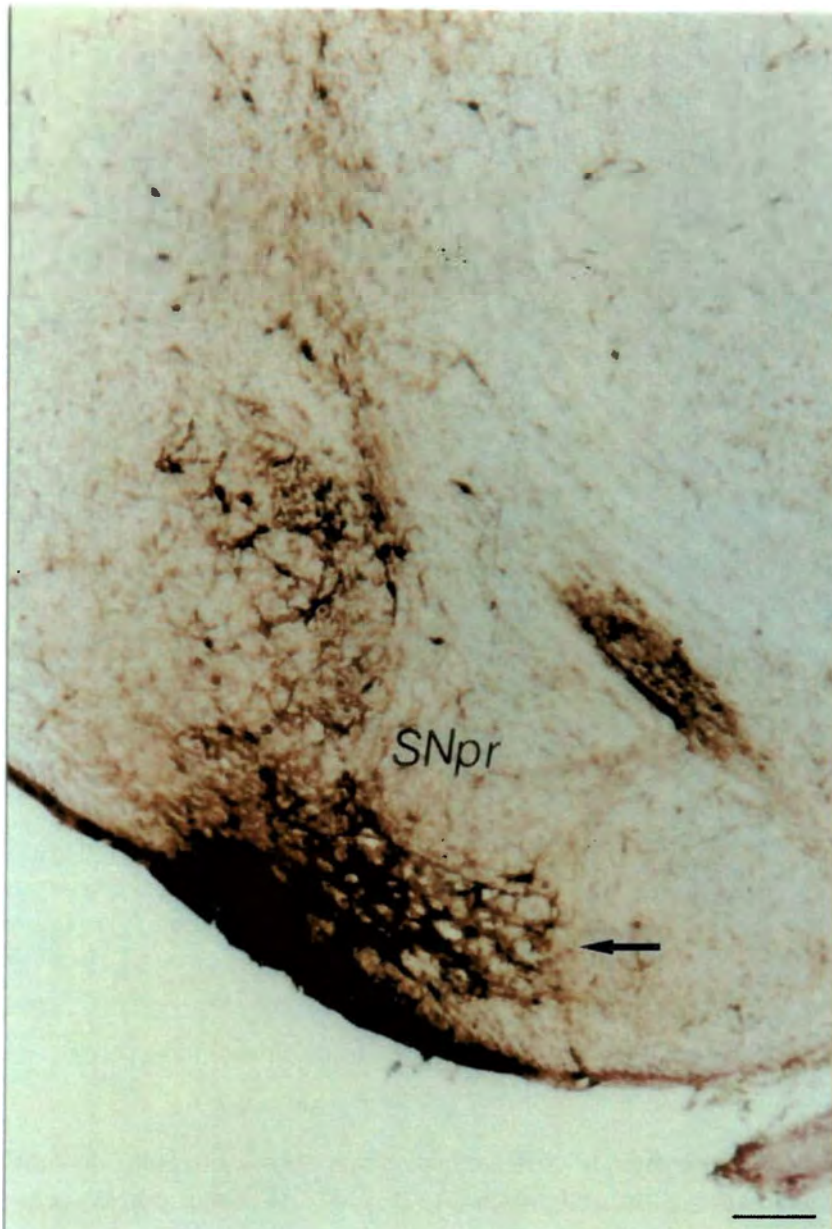
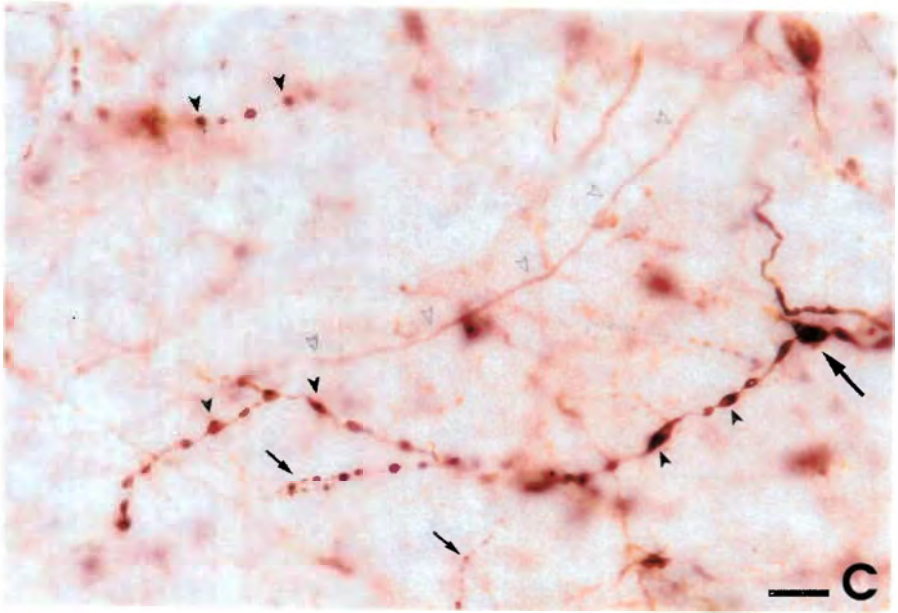
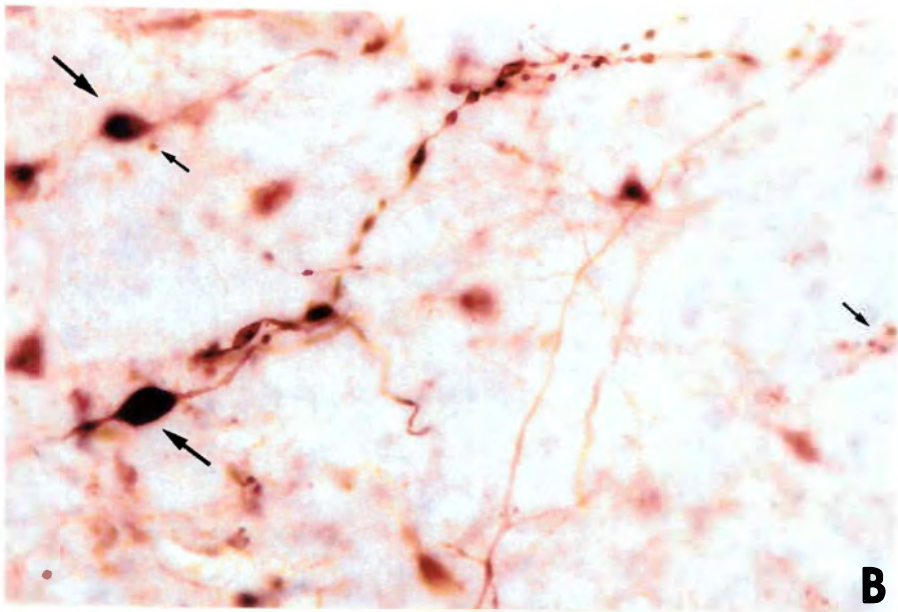
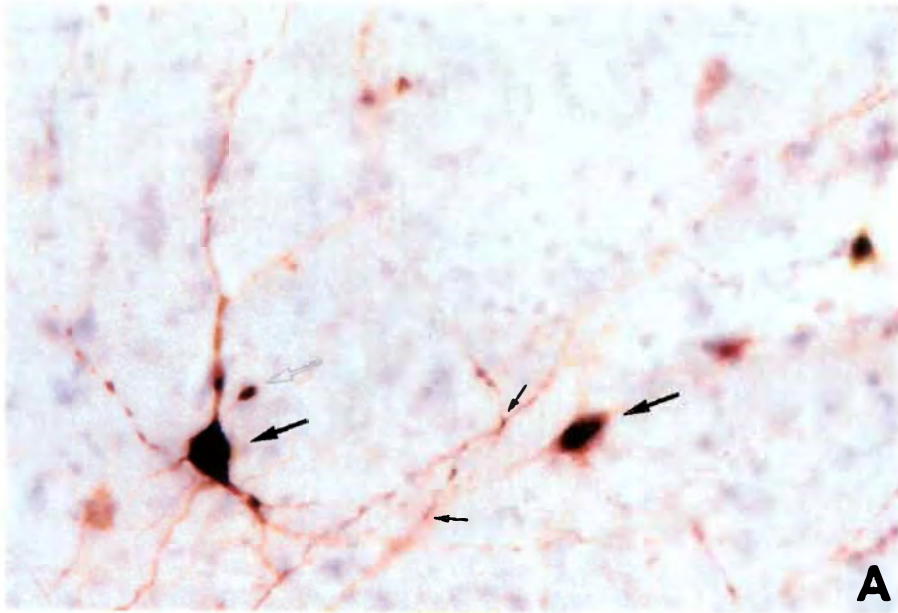


Figura 6- Fotomicrografia de corte transversal do mesencéfalo de rato Wistar, passando pela substância negra, parte reticulada, mostrando (seta) o sítio de microinjeções iontoforéticas de biodextran. Barra: 380 μm . Coloração: hematoxilina / eosina.

Figura 7- Fotomicrografias de cortes transversais do mesencéfalo de rato Wistar, passando pela substância negra, parte reticulada (A - C). A - B: Notar corpos celulares de neurônios (setas) situados na substância negra, parte reticulada (SNpr), os quais se projetam ipsilateralmente (A) e contralateralmente (B) para o substrato neural que elabora o medo no núcleo central do colículo inferior. Um interneurônio (seta aberta) pode ser visualizado promovendo contato sináptico axo-somático com neurônio de projeção nigro-colicular. Algumas conexões sinápticas varicosas (setas menores) apresentam-se profusamente distribuídas pela substância negra, parte reticulada (vide detalhes em C). C: Malha conectiva presente na substância negra, parte reticulada, onde se vêem fibras neurais varicosas (pontas de setas cheias) e não-varicosas (pontas de setas abertas) em ampla rede sináptica (setas menores). Barra: 23,98 μm em A; 23,98 μm em B e 23,98 μm em C. Coloração: hematoxilina / eosina.



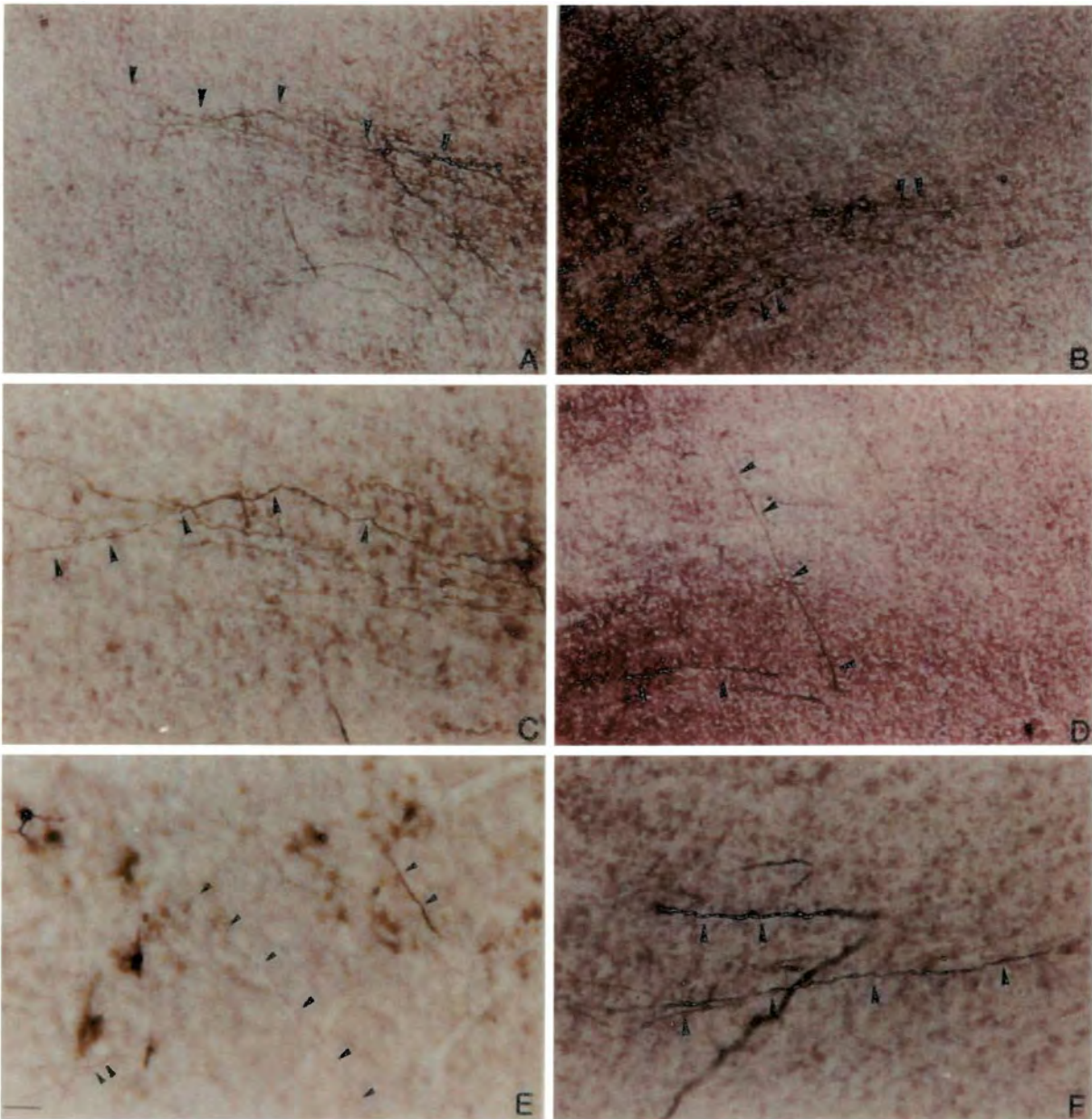
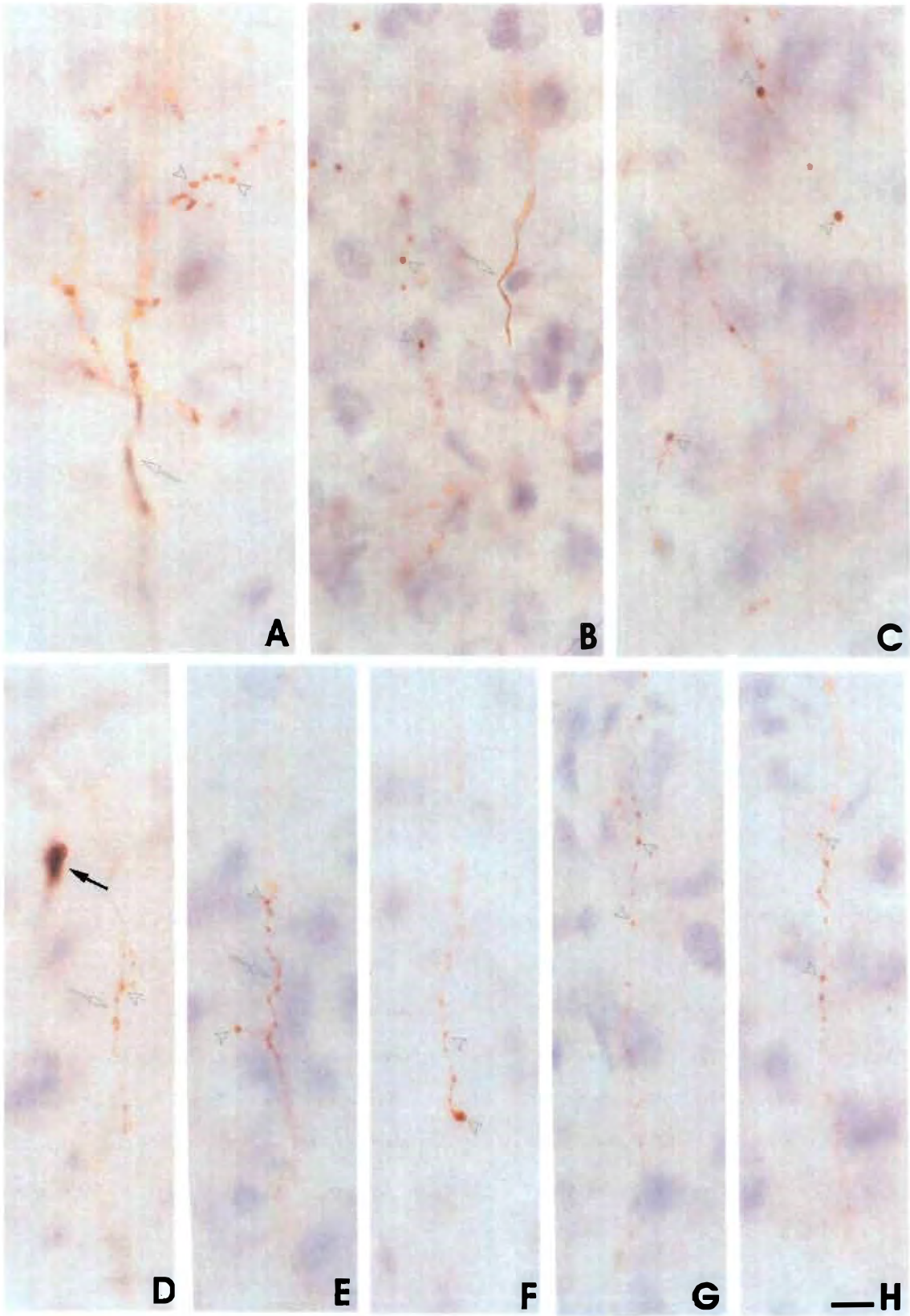


Figura 8- Fotomicrografias de cortes coronais do mesencéfalo de rato Wistar, na região do núcleo central do colículo inferior. As setas apontam para terminações nervosas positivas para biodextran. Barra: 192 μ m em A, B e D; 96 μ m em C, E e F. Coloração: hematoxilina / eosina.

Figura 9- Fotomicrografias de cortes transversais do mesencéfalo de ratos Wistar, passando pelo núcleo central do colículo inferior (NCCI), sede de redes neurais responsáveis pela elaboração do comportamento defensivo. É possível visualizar as fibras positivas para biodextran (setas abertas), provenientes da substância negra, parte reticulada (SNpr); um neurônio de provável conexão colículo-nigral é mostrado em D (seta fechada). Profusas conexões sinápticas varicosas (pontas de setas abertas) mostram evidências da projeção nigro-colicular atingindo seu alvo no mesencéfalo dorsal, nível caudal. Barra: 9,60 μm em A; 9,60 μm em B; 9,60 μm em C; 9,60 μm em D; 9,60 μm em E; 9,60 μm em F; 9,60 μm em G e 9,60 μm em H. Coloração: hematoxilina / eosina.



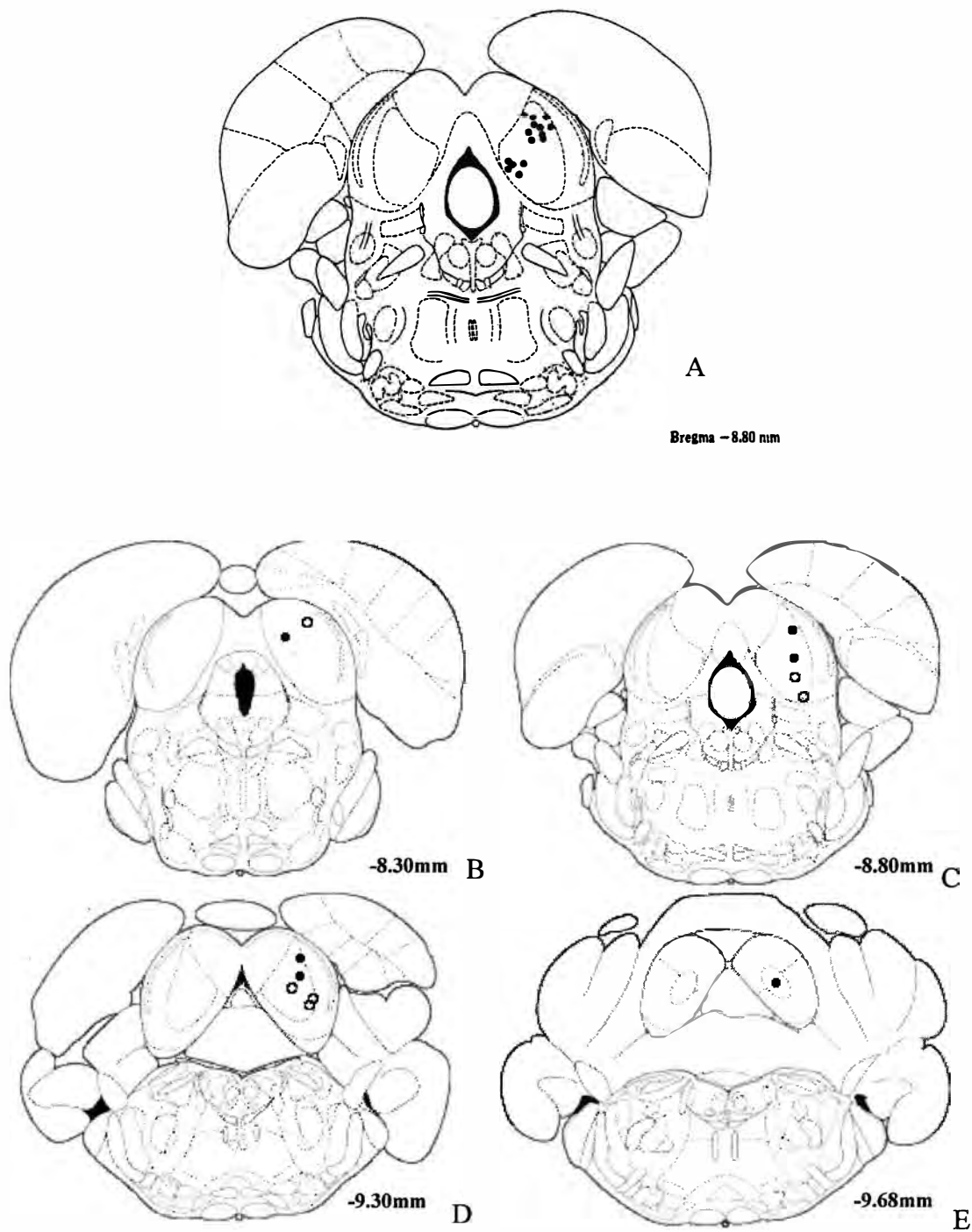


Figura 10- Localização dos sítios de estimulação elétrica (A) e de microinjeções (B, C, D e E) de salina (pontos abertos), N=6 e de bicuculina (pontos cheios), N=6 em cortes coronais do teto mesencefálico, apresentadas em anagrama, do atlas de Paxinos e Watson (1997).



Figura 11- Fotomicrografias de cortes transversais do mesencéfalo de rato Wistar, mostrando (setas) a localização de duas lesões eletrolíticas (A e B) na substância negra, parte reticulada (SNpr), situadas ipsilateralmente aos sítios de estimulação elétrica realizada no colículo inferior. Os cortes coronais foram realizados em dois planos, situados mais caudal (A) e mais cranial (B), tendo-se como referência o eixo mediano. Barra: 98 μ m em A e 173,91 μ m em B. Coloração: hematoxilina / eosina.

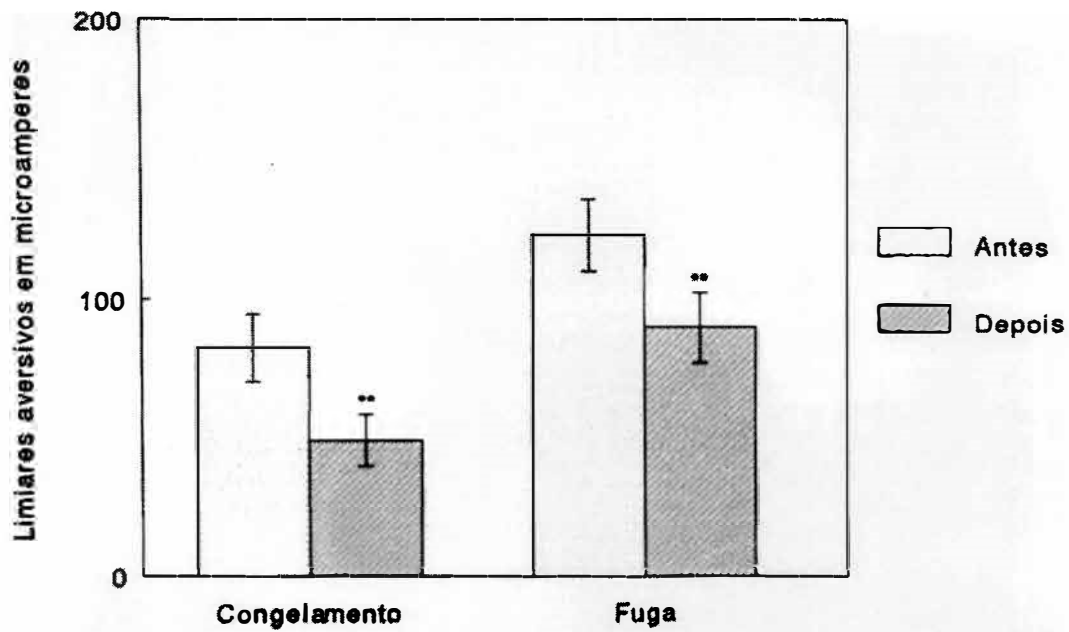
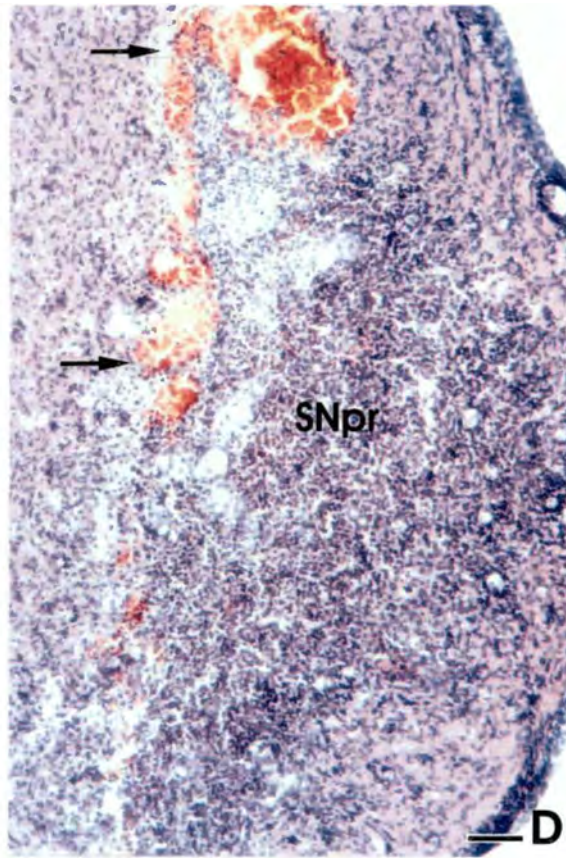
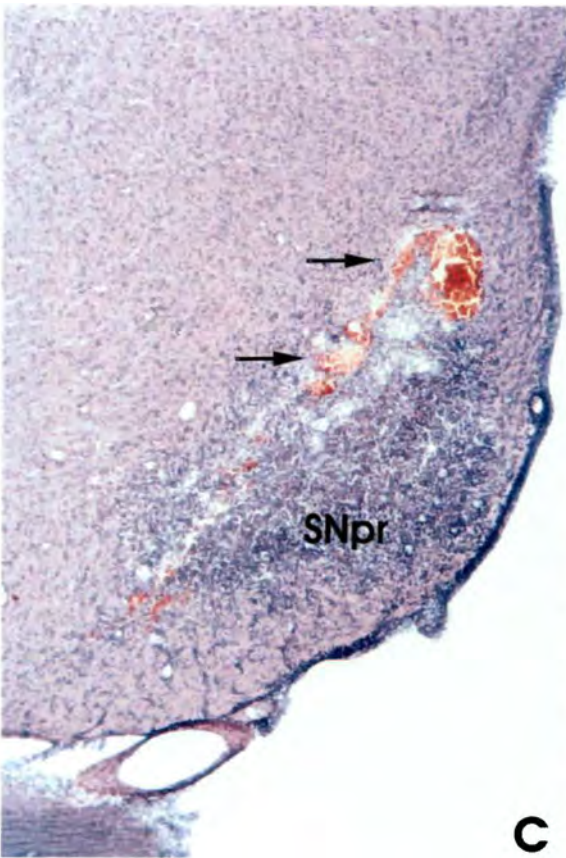
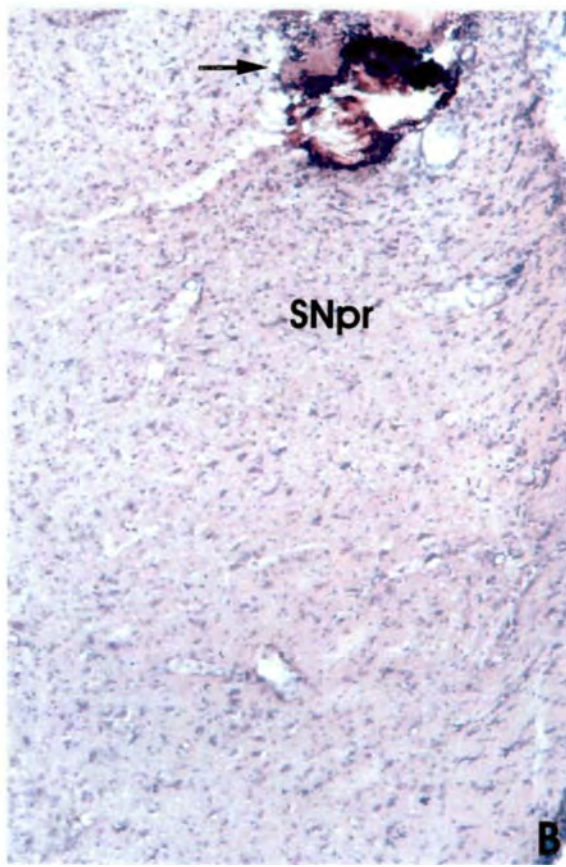


Figura 12- Efeito da lesão eletrolítica da substância negra, parte reticulada, sobre os limiares de congelamento e fuga eliciados por estimulação elétrica do núcleo central do colículo inferior. As colunas representam as médias, e as barras, o EPM, dos comportamentos de congelamento e de fuga, registrados antes (colunas pontilhadas) e depois (colunas pretas) da lesão eletrolítica da substância negra, parte reticulada. N=7; **p<0,01, quando comparado com o controle, segundo o teste de t de Student.

Figura 13- Fotomicrografias de cortes transversais do mesencéfalo de rato Wistar, mostrando (setas) a localização das lesões neuroquímicas unilaterais da substância negra, parte reticulada (SNpr), situadas ipsilateralmente aos sítios de estimulação elétrica do colículo inferior. Em A e B são mostradas as lesões de menor tamanho, sendo B uma ampliação de A. C e D mostram as lesões de maior tamanho, sendo D uma ampliação de C. Barra: 192,01 μm em A, 96,15 μm em B, 192,01 μm em C e 96,15 μm em D. Coloração: hematoxilina / eosina.



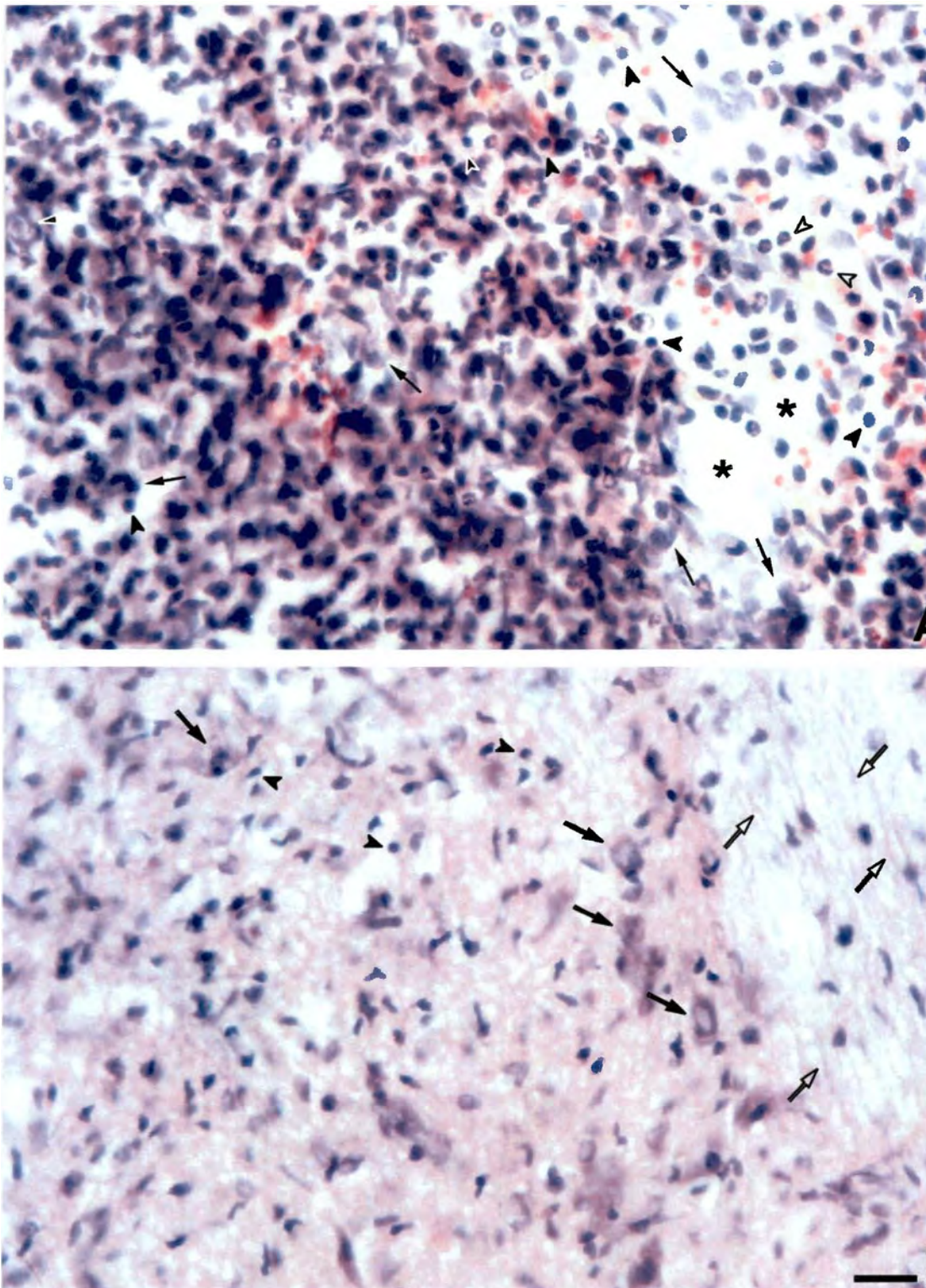


Figura 14- Fotomicrografias de cortes transversais do mesencéfalo de rato Wistar, na região das lesões neuroquímicas unilaterais da substância negra, parte reticulada (SNpr), mostrando em A, uma área mais central da lesão (asterisco) a presença de edema, gliose reacional (ponta de seta fechada), polimorfonucleares (ponta de seta aberta) e neurônios em degeneração (setas fechadas). Em B podemos observar uma área imediatamente vizinha ao núcleo da microinjeção da neurotoxina. Notar a presença de gliose reacional (ponta de seta fechada), fibras de passagem preservadas (setas abertas) e neurônios em degeneração (setas fechadas). Barra: 23,98 μm em A e 23,98 μm em B. Coloração: hematoxilina / eosina.

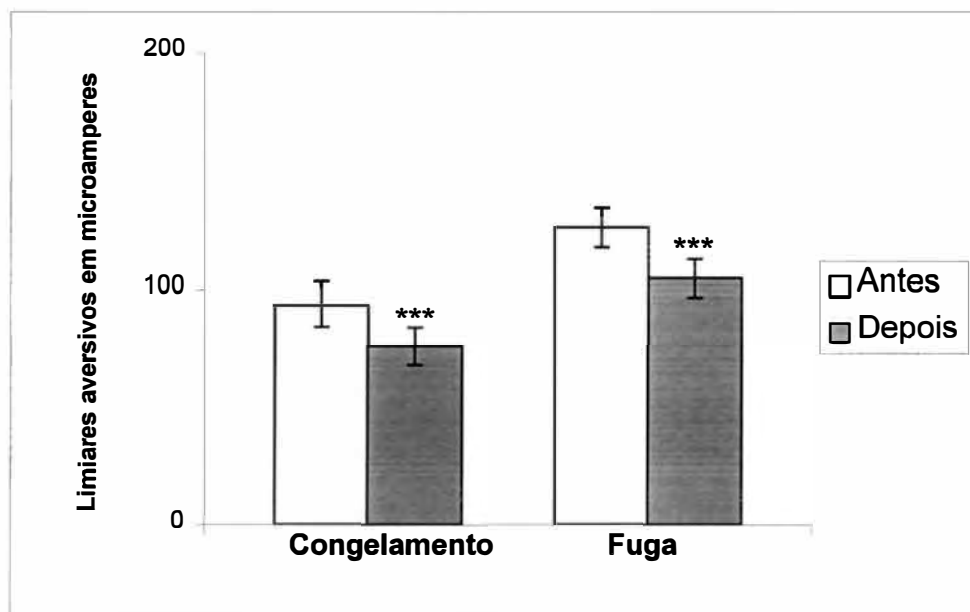


Figura 15- Efeito da lesão neuroquímica da substância negra, parte reticulada, sobre os limiares de congelamento e fuga eliciados por estimulação elétrica do núcleo central do colículo inferior. As colunas representam as médias, e as barras, o EPM, dos comportamentos de congelamento e de fuga, registrados antes (colunas pontilhadas) e depois (colunas pretas) da lesão neuroquímica da substância negra, parte reticulada. N=10; ***p<0,001, quando comparado com o controle, segundo o teste de t de Student.

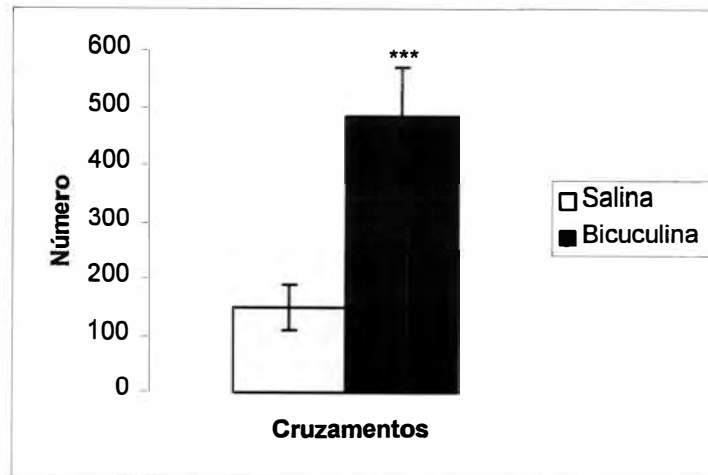


Figura 16- Efeito das microinjeções de salina (0,2 μ l) ou de bicuculina (40 η g/0,2 μ l) no núcleo central do colículo inferior de ratos Wistar, sobre a incidência média do número de cruzamentos. As colunas representam as médias, e as barras, o EPM, do comportamento locomotor (cruzamentos), registrados após as microinjeções de salina (coluna pontilhada) e após as microinjeções de bicuculina (coluna preta). N=6; ***p<0,001, quando comparado com o controle, segundo o teste de Wilcoxon.

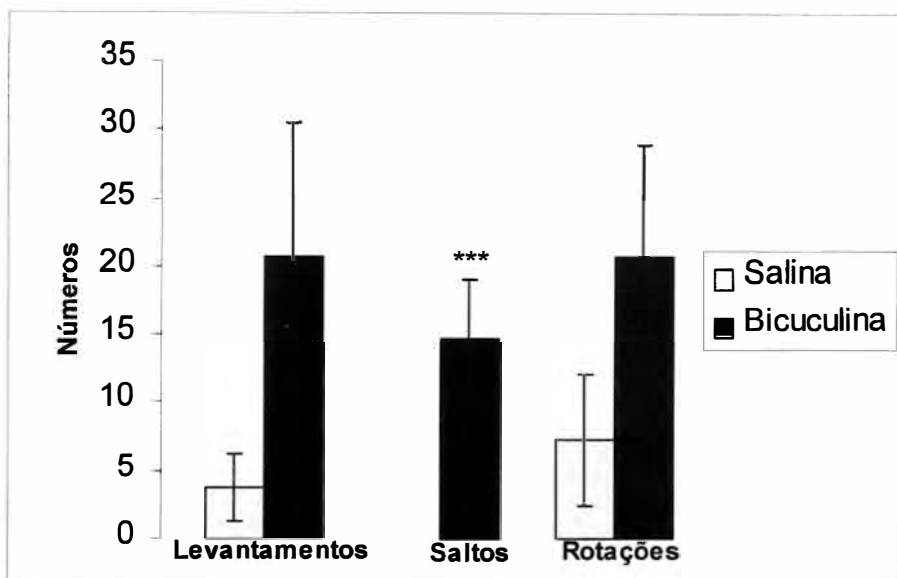


Figura 17- Efeito das microinjeções de salina (0,2 μ l) ou de bicuculina (40 η g/0,2 μ l) no núcleo central do colículo inferior de ratos Wistar, sobre a incidência média do número de levantamentos, saltos e rotações. As colunas representam as médias, e as barras, o EPM, dos comportamentos, registrados após as microinjeções de salina (coluna pontilhada) e após as microinjeções de bicuculina (coluna preta). N=6; ***p<0,001, quando comparado com o controle, segundo o teste de Wilcoxon.

Figura 18- Fotomicrografias de cortes coronais do mesencéfalo dorsal, nível caudal, de *Rattus norvegicus*. Microinjeções de biodextran foram realizadas no núcleo central do colículo inferior. A: Fotomicrografia representativa do sítio de microinjeção (seta). B: Notar neurônios (setas) localizados no núcleo central do colículo inferior NCCI, enviando projeções neurais (pontas de setas) para as colunas dorso-medial e lateral, nível caudal, da substância periaquedutal (SCP), ipsilateralmente. C: Corte transversal da coluna dorso-medial da SCP, mostrando a chegada da conexão NCCI-SCP, com sinapses (setas abertas) na arborização dendrítica de corpos neuroniais (seta cheia) ali localizados. D: Neurônios (setas cheias) localizados na coluna dorso-medial (topo) e lateral (parte inferior da figura) da SCP, recebendo contatos sinápticos (seta aberta) provenientes da via NCCI-SCP. Barra: 198,42 µm em A; 12,54 µm em B; 24,83 µm em C e D.

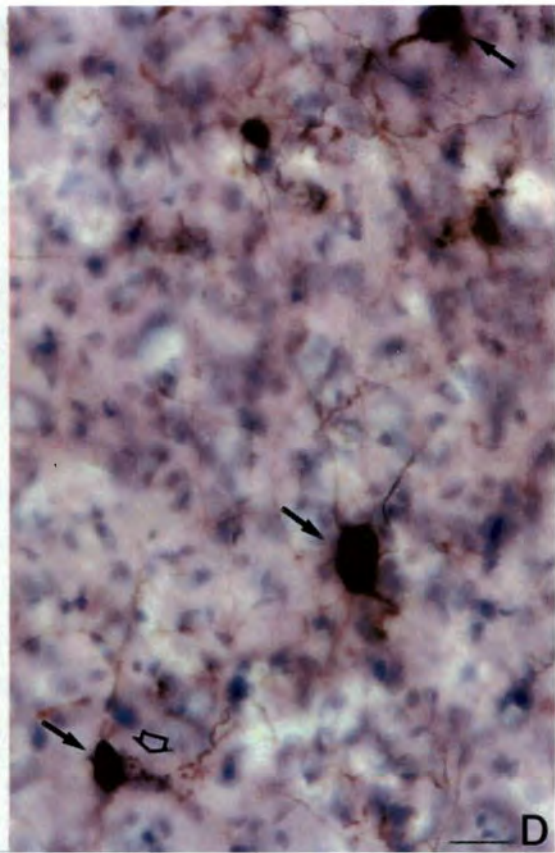
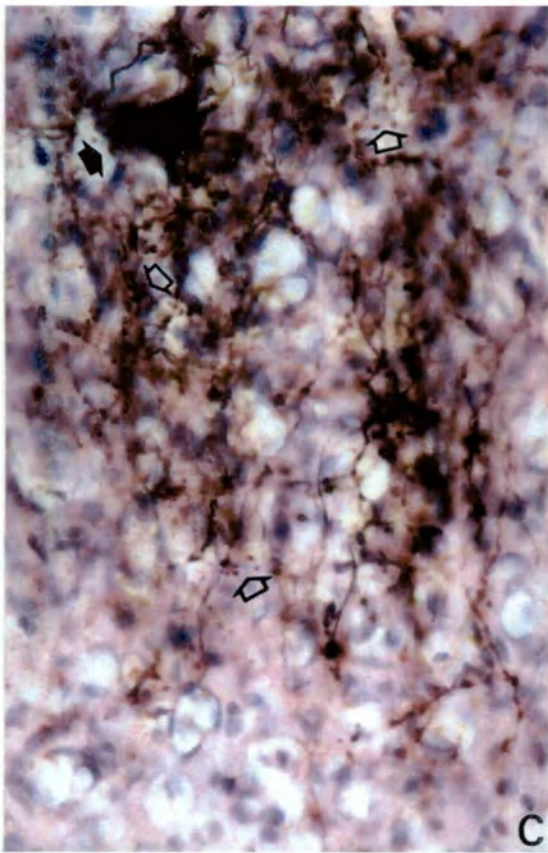
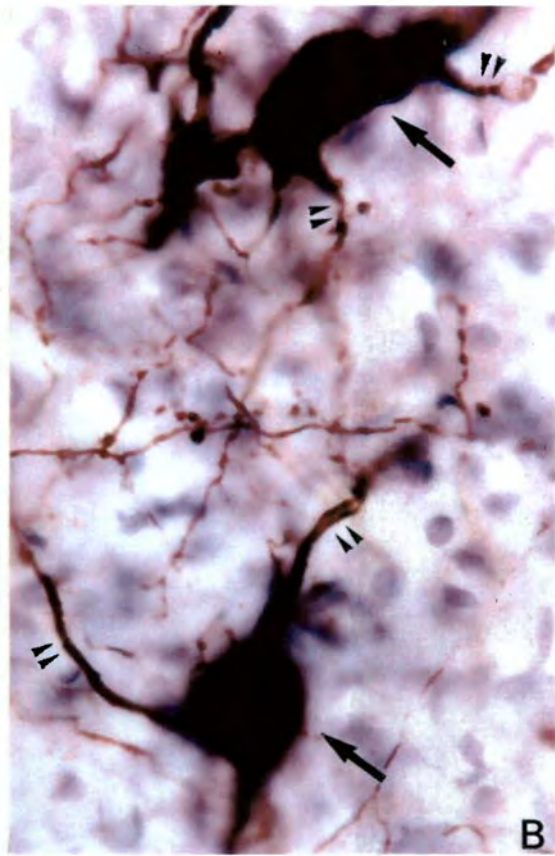
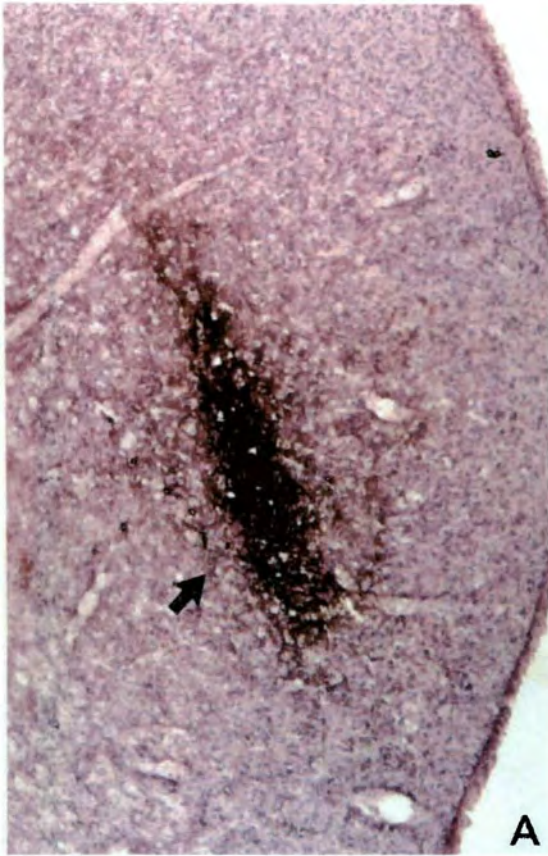


Figura 19- Fotomicrografias de cortes transversais da substância cinzenta periaquedutal (SCP), porção mais posterior, para onde destina-se a via colículo-periaquedutal. A: Fibras (setas) com varicosidades (setas abertas) são identificadas profusamente na coluna dorso-medial da SCP, após a microinjeção de biodextran no núcleo central do colículo inferior. B: Fibras (setas cheias) com ramificações finas, varicosas (pontas das setas) espraiam-se na coluna lateral da SCP. C: Corte transversal da coluna lateral da SCP, nível caudal, mostrando um neurônio (seta cheia) recebendo contatos sinápticos (seta aberta) provenientes de neurônios localizados no núcleo central do colículo inferior ipsilateral. Barra: 9,93 μm em A e C; 12,54 μm em B.

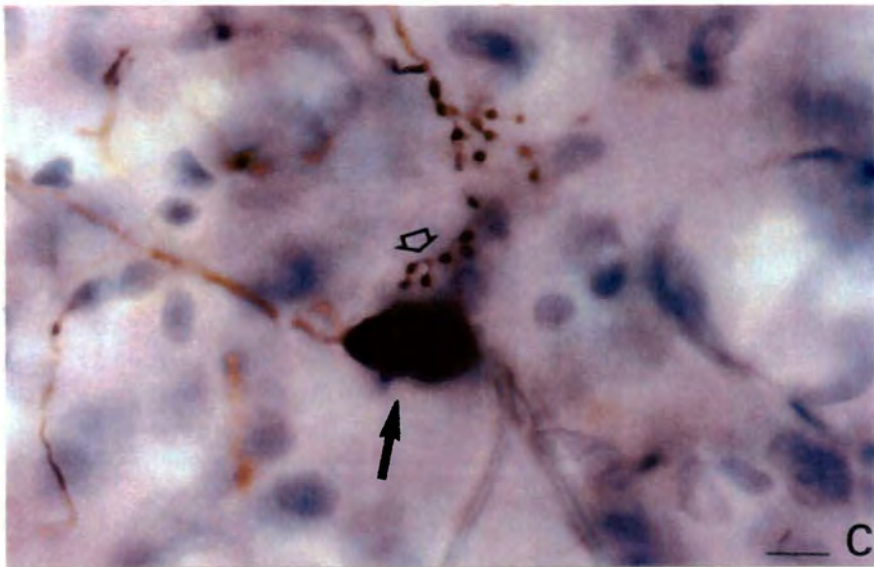
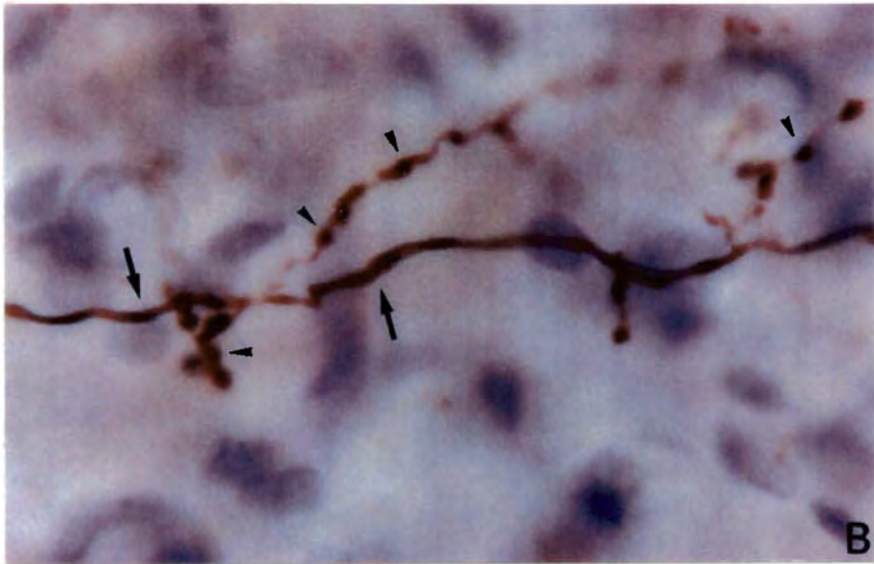
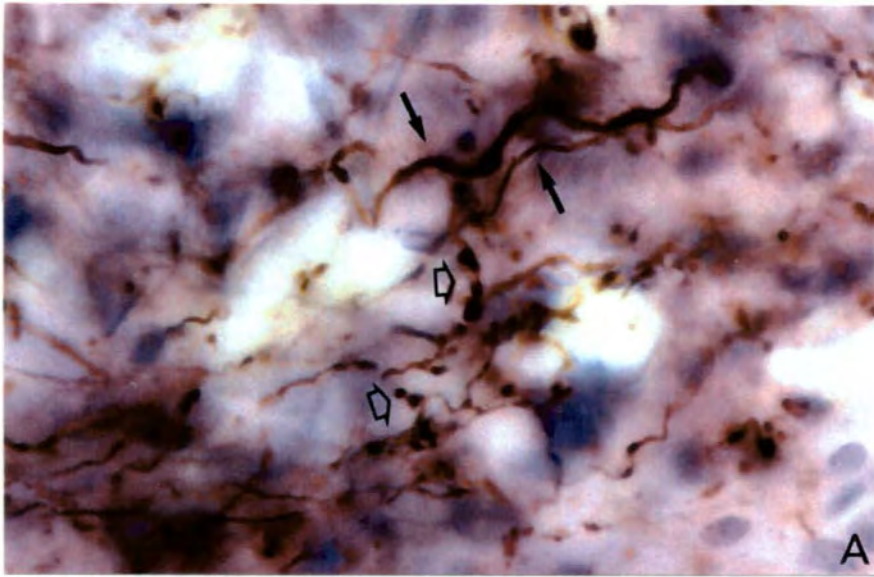
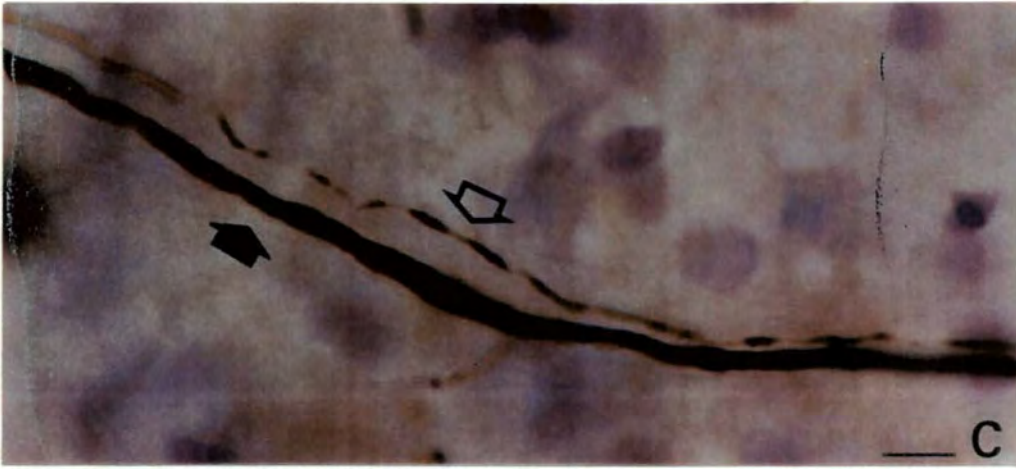
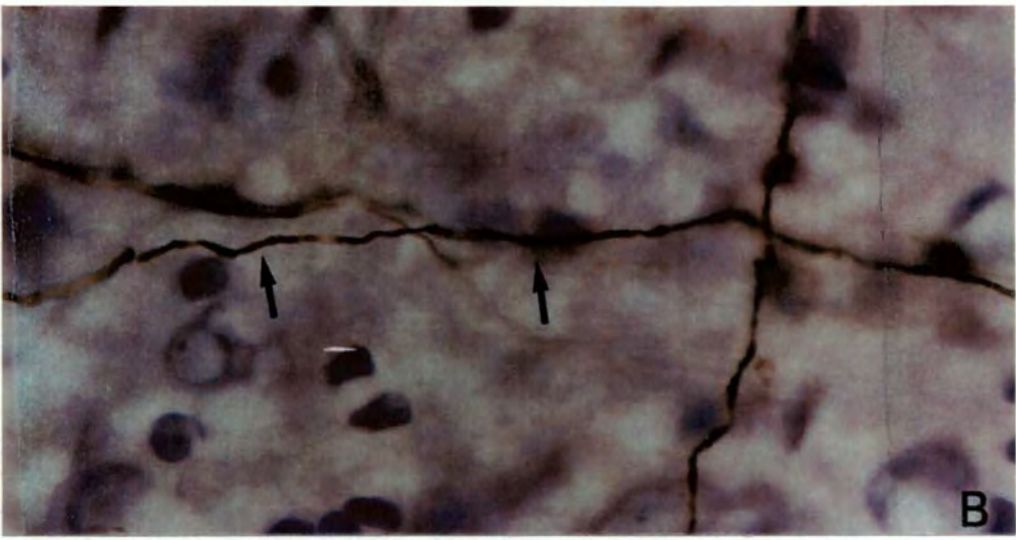
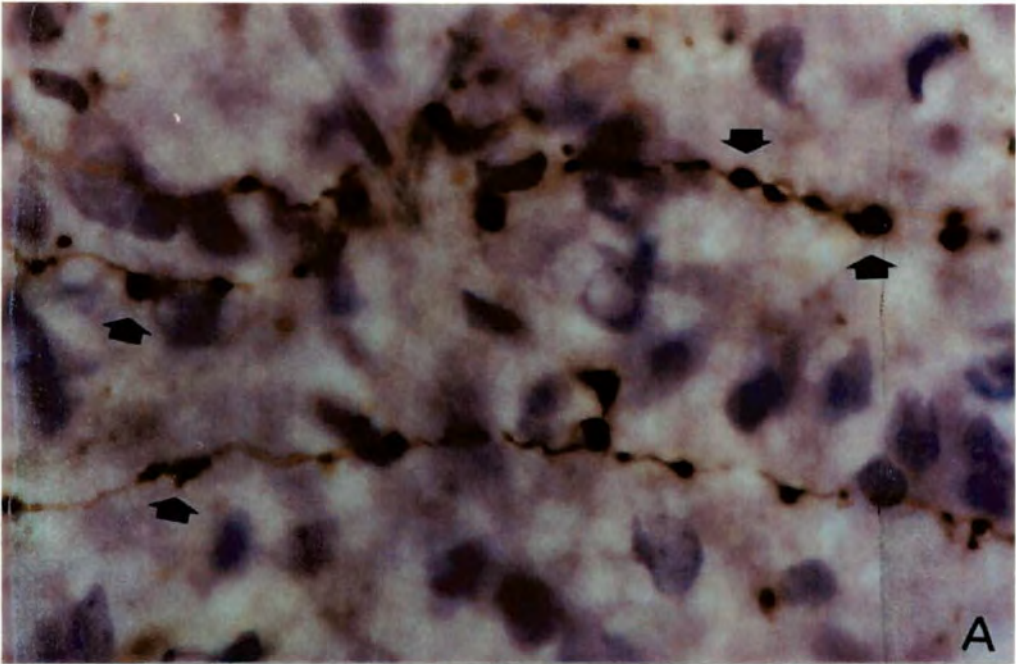


Figura 20- Fotomicrografias de cortes transversais do colículo inferior de *Rattus norvegicus*, mostrando as características morfológicas da via intratectal. A: Fibras varicosas grossas (setas) provenientes do núcleo central do colículo inferior (NCCI), projetando-se para as colunas caudais da substância periaquedutal (SCP). B: As setas apontam fibras não-varicosas finas do NCCI dirigindo-se para a SCP. C: Fibras não-varicosas grossas (seta cheia) e fibras finas, com varicosidades (seta aberta) provenientes de neurônios do NCCI, cruzando o núcleo pericentral do colículo inferior, e dirigindo-se às colunas caudais da SCP. Barra: 9,93 μm .



9- DISCUSSÃO

O presente trabalho oferece evidências neuroanatômicas e neurofisiológicas de conexões nigro-tectais e teto-tectais responsáveis pelo controle de respostas comportamentais induzidas pelo medo gerado no mesencéfalo dorsal, em estruturas mais caudais. Há evidências de que o receptor GABA esteja envolvido no processo de inibição de respostas defensivas evocadas por estimulação do teto mesencefálico (COIMBRA & BRANDÃO, 1993).

Com efeito, o bloqueio de receptores GABA-A, seja com bicuculina ou com picrotoxina, no colículo inferior de ratos, resulta em comportamento de fuga, seguido de mudanças neurovegetativas, tais como o aumento da pressão arterial média e da frequência cardíaca; respostas similares àquelas induzidas por estimulação elétrica e química da substância cinzenta periaquedutal dorsal (BRANDÃO *et al.*, 1982; BRANDÃO *et al.*, 1986; SCHIMITT *et al.*, 1986; BRANDÃO *et al.*, 1988). Os componentes autonômicos da reação de defesa obtida no colículo inferior de ratos são qualitativamente similares às respostas conseguidas no hipotálamo (GRAEFF, 1981), muito embora as respostas de fuga evocadas por estimulação do colículo inferior sejam explosivas e não direcionadas, em comparação com o comportamento de defesa afetiva evocado por estimulação do hipotálamo, que são orientadas e precedidas por exuberante comportamento exploratório (BRANDÃO *et al.*, 1994). Essas descobertas corroboram a hipótese de que o tronco encefálico é um centro de integração de circuitos neurais responsáveis por mudanças autonômicas e somáticas da reação defensiva (TOMAZ *et al.*, 1988), enquanto a amígdala parece fornecer um controle mais refinado da intensidade e do momento da manifestação comportamental, enquanto o hipotálamo elabora comportamentos defensivos mais bem orientados.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a lesão eletrolítica unilateral da substância negra, parte reticulada (SNpr), ipsilateral aos substratos neurais que organizam o comportamento defensivo, era seguida de um aumento da sensibilidade do teto mesencefálico à estimulação elétrica, expresso por uma significativa redução dos limiares aversivos de congelamento e fuga, evocados por estimulação do núcleo central do colículo inferior. Esses resultados psicofisiológicos sugerem que a SNpr envia projeções provavelmente inibitórias para o substrato neural que organiza o comportamento defensivo no teto mesencefálico, situado caudalmente, na região do colículo inferior, podendo ser, tais conexões neurais, importantes para o controle das respostas aversivas na região do núcleo central dessa estrutura.

O estudo neuroanatômico comprovou essa projeção nigro-tectal, pois foi demonstrado que a microinjeção unilateral de um neurotraçador retrógrado *fast blue* no NCCI permitia a identificação de células fortemente positivas, com características muito sugestivas de neurônios, na substância negra, parte reticulada, localizados tanto ipsi quanto contralateralmente, considerando os substratos neurais situados no núcleo central do colículo inferior. A organização topográfica, na substância negra, dos neurônios que originam essas projeções coincide com a localização de neurônios que se projetam a sítios do mesencéfalo dorsal, mais cranialmente situados, especificamente considerando não somente as camadas intermediárias do colículo superior, como descrito na literatura (FALLON & LOUGHLIN, 1985; REDGRAVE *et al.*, 1992), mas também as camadas profundas do colículo superior e aspectos dorsolaterais da substância cinzenta periaquedutal (EICHENBERGER *et al.*, 2002), muito embora as células neuronais estudadas no presente trabalho apresentem-se em distribuição mais ampla, situadas na parte reticulada da substância negra.

Há relatos na literatura que apontam para o aumento do comportamento rotatório resultante das lesões da SNpr como sendo um resultado da diminuição na transmissão GABAérgica na via nigro-colicular (FAULL & MEHLER, 1978; IMPERATO & DICHIARA, 1981; KILPATRICK *et al.*, 1982; COIMBRA *et al.*, 1989). O aumento das manifestações das reações de fuga observado no presente estudo pode ter ocorrido como consequência da remoção do controle inibitório exercido pelas fibras GABAérgicas sobre o substrato neural mesencefálico que organiza o comportamento defensivo, questão essa já sugerida em publicações anteriores, no que se refere às camadas profundas do colículo superior e substância cinzenta periaquedutal dorsal (COIMBRA *et al.*, 1989; COIMBRA & BRANDÃO, 1993). Outros estudos eletrofisiológicos e farmacológicos demonstraram a existência da projeção nigral GABAérgica originada em corpos celulares localizados na parte reticulada da substância negra e com terminais nervosos finalizando primariamente dentro das camadas intermediárias e profundas do colículo superior (BENTIVOGLIO *et al.*, 1979; CHEVALIER *et al.*, 1981; WILLIAMS & FAULL, 1988; HARTING *et al.*, 1988; APPELL & BEHAN, 1990; DENIAU & CHEVALIER, 1992; COIMBRA *et al.*, 1998 a; EICHENBERGER *et al.*, 2002). Com o atual trabalho, sugerimos que esse controle GABAérgico pode envolver sítios localizados também no núcleo central do colículo inferior.

Os resultados descritos não excluem a participação de outras influências GABAérgicas, como aquelas oriundas do núcleo pedúnculo-pontino (CHILDS & GALE, 1984), sobre as reações aversivas induzidas por estimulação do teto mesencefálico. Por certo, a SNpr não é a única estrutura a enviar projeções GABAérgicas para sítios mesencefálicos, fato esse demonstrado quando da redução do

GABA colicular, após lesão da SN, que consiste em aproximadamente 25% (KILPATRICK *et al.*, 1982). Contudo, os presentes resultados evidenciam que a redução de aferências GABAérgicas ao teto mesencefálico causa uma significativa alteração no controle das respostas aversivas na região colicular. Além disso, foi demonstrado que os neurônios da parte reticulada da substância negra são vinte vezes mais sensíveis ao GABA, quando comparados aos neurônios da parte compacta dessa estrutura (GRACE & BUNNEY, 1979), e o GABA parece exercer um efeito inibitório tônico sobre os neurônios do colículo inferior, os quais elaboram o medo e o pânico (BRANDÃO *et al.*, 1988).

As descobertas acima discutidas permitem sugerir uma função da substância negra na regulação e controle de algumas respostas emocionais (DICHIARA *et al.*, 1979; CHEVALIER *et al.*, 1981), como as sensações subjetivas de medo (COIMBRA *et al.*, 1989). Sabe-se que a estimulação elétrica do teto mesencefálico humano evoca sensações de medo e desejo de fuga (NASHOLD *et al.*, 1969). As reações comportamentais apresentadas por animais estimulados no mesencéfalo dorsal são bastante características, seguidas de alterações autonômicas que são evocadas durante as sensações subjetivas de medo (BRANDÃO *et al.*, 1990; COIMBRA *et al.*, 1993). Em detrimento disso, e considerando que os neurônios do teto mesencefálico mostram-se sensíveis à ação de drogas antipânico, as quais atenuam as respostas comportamentais evocadas pelo medo elaborado no mesencéfalo dorsal (SCHENBERG *et al.*, 2001), essa área tem se apresentado como provável sítio indicado como base neural da síndrome do pânico. Possivelmente, as projeções GABAérgicas nigro-tectais consistem em uma via inibitória que pode, seja agindo em sítios mais craniais do mesencéfalo (COIMBRA *et al.*, 1993), seja mais caudalmente, como consiste nossa proposição, modular a

elaboração das sensações de medo e comportamento de defesa no tronco encefálico. Conseqüentemente, as projeções estriado-nigro-tectais podem vir a exercer uma função no controle das reações de pânico no sistema nervoso central.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem uma atividade modulatória da via nigro-tectal, provavelmente exercida por neurônios GABAérgicos inibitórios, sobre os substratos neurais responsáveis pelo processamento de estados aversivos no núcleo central do colículo inferior. Após a lesão dos neurônios situados na substância negra, parte reticulada, os limiares aversivos de congelamento e fuga diminuíram significativamente, sendo acompanhados por respostas comportamentais que lembram estados de ansiedade, medo e pânico, como respostas autonômicas de defecação, micção e exoftalmia, bem como corridas ao redor da arena.

O estudo neuroanatômico corroborou os achados funcionais encontrados até o momento, ao identificar neurônios na substância negra, parte reticulada, após a microinjeção do traçador retrógrado “fast blue” no núcleo central do colículo inferior. O uso de um traçador predominantemente anterógrado, como o biodextran, confirmou a projeção nigro-tectal, ao permitir a identificação de fibras neurais no núcleo central do colículo inferior, quando de sua microinjeção na substância negra, parte reticulada. É possível que esse circuito venha a ser crucial para o controle das reações de defesa em momentos de risco iminente de vida, e possa vir a englobar o GABA como neurotransmissor, não afastando, contudo, a possibilidade desse sistema também vir a ser modulado por projeções opióides (COIMBRA *et al.*, 2000; EICHENBERGER *et al.*, 2002).

Evidências recentes, obtidas em investigação anterior, mostraram que estruturas que integram o sistema encefálico aversivo, tais como a substância cinzenta

periaquedutal e o colículo superior enviam projeções axonais para o colículo inferior (COIMBRA *et al.*, 1998 b), o que poderia influenciar a atividade de células neurônicas ali situadas.

O presente trabalho apresentou evidências morfológicas da conexão entre estruturas situadas mais caudalmente no mesencéfalo, como o colículo inferior e sítios responsáveis pela elaboração do comportamento defensivo mais explosivo, expresso por fuga e saltos, assim como respostas comportamentais mais passivas tais como a imobilidade defensiva (CARRIVE, 1993) e a imobilidade tônica (MENESCAL-DE-OLIVEIRA *et al.*, 1993). Com efeito, a microinjeção de um neurotraçador predominantemente anterógrado, a amina dextram biotinizada, no núcleo central do colículo inferior, mostrou fibras varicosas e não varicosas grossas e finas se projetando às colunas dorso-mediais e laterais da substância cinzenta periaquedutal, nível caudal. Essa conexão está em harmonia com os dados recentes na literatura, que apresentam evidências de projeções intratectais varicosas, ricas em β -endorfina, que exercem um efeito inibitório pré-sináptico em terminais GABAérgicos nigro-tectais (EICHENBERGER *et al.*, 2002).

Nesse mesmo trabalho, estudos neuromorfológicos mostraram, ainda, neurônios localizados em estruturas mais craniais do mesencéfalo dorsal (colículo superior e substância cinzenta periaquedutal dorsal) com varicosidades, as quais também enviavam projeções de volta à substância negra, parte reticulada. Muito embora evidências imunistoquímicas de opióides endógenos (β -endorfina) nas fibras nervosas com varicosidades, situadas nas colunas dorso-medial, dorso-lateral, ventral e ventro-lateral da substância cinzenta periaquedutal, nível caudal, tenham sido claramente identificadas, sua origem não foi precisada. É possível que pelo menos parte dessas vias

opióides possa originar-se de neurônios localizados no núcleo central do colículo inferior, que se avizinha dos sítios periaquedutais mais posteriores, onde aquelas foram identificadas mais profusamente. A presença de uma via modulatória opióide conectando o núcleo central do colículo inferior a aspectos caudais da substância cinzenta periaquedutal dorso-medial e da substância cinzenta periaquedutal dorso-lateral poderia permitir um controle fino e rápido das projeções nigro-tectais GABAérgicas, ora facilitando, ora dificultando a explosão de atividade dos substratos neurais que elaboram o medo nos aspectos mais caudais do mesencéfalo dorsal. Fibras varicosas também foram encontradas nas camadas profundas do colículo superior, outra estrutura envolvida na elaboração do comportamento defensivo (EICHENBERGER *et al.*, 2002). Corroborando essa hipótese, outros estudos também mostraram tratos contendo β -endorfina que se projetam para a substância cinzenta periaquedutal dorsal (IBATA *et al.*, 1985; SIM & JOSEPH, 1991). No que se refere à substância cinzenta periaquedutal, em seus aspectos ventrolaterais, precisamente, foram já consideradas relações inibitórias recíprocas entre GABA e encefalinas (WILLIAMS *et al.*, 1995).

A conexão colículo-periaquedutal apresentada no presente trabalho complementou os dados obtidos por Eichenberger em 2002, os quais se apresentam como evidências psicofarmacológicas e imunoistoquímicas da interação entre os sistemas opióides e GABAérgicos na modulação de estados aversivos no mesencéfalo mais cranial, pois o bloqueio de receptores opióides no teto mesencefálico causou um aumento dos limiares de congelamento e fuga, eliciados por estimulação elétrica do mesencéfalo dorsal, ao lado da diminuição das diversas respostas comportamentais que seguem o bloqueio GABAérgico nas camadas profundas do colículo superior e nos aspectos dorsais da substância cinzenta periaquedutal. Essas evidências

psicofarmacológicas e neuroanatômicas da inibição pré-sináptica opióide exercida sobre terminais GABAérgicos localizados no mesencéfalo dorsal necessitavam de uma complementação morfológica, pois não explicavam os efeitos antiaversivos da microinjeção de antagonistas opióides inespecíficos e específicos sobre receptores μ_1 , realizados no núcleo central do colículo inferior (COIMBRA *et al.*, 2000).

O presente trabalho acrescentou evidências neuromorfológicas de novas conexões intramesencefálicas, demonstrando fibras varicosas e não varicosas vindas do núcleo central do colículo inferior e se projetando não somente para aspectos dorso-mediais e laterais da substância cinzenta periaquedutal, mas também atingindo o núcleo pericentral do colículo inferior. É possível que tais fibras varicosas sejam as mesmas que foram encontradas marcadas com anticorpos dirigidos contra opióides endógenos no trabalho de Eichenberger (2002), as quais atingiam sítios localizados no mesencéfalo mais cranial, precisamente entre as camadas profundas do colículo superior e a substância cinzenta periaquedutal. Contudo, não podemos afastar a possibilidade de haver outros circuitos provenientes tanto dos aspectos mais craniais como caudais do mesencéfalo dorsal, que modulam as respostas defensivas ali elaboradas. O novo circuito revelado pelos presentes achados permite-nos acrescentar que tais conexões possam se estender a regiões mais caudais do mesencéfalo, sendo oriundos de sítios localizados no núcleo central do colículo inferior. Conexões que podem se apresentar como um possível elo de ligação entre os neurônios que compõem o substrato neural que organiza o medo e o comportamento defensivo do colículo inferior (CARDOSO *et al.*, 1994; CASTILHO *et al.*, 1999; PANDÓSSIO & BRANDÃO, 1999; BRANDÃO *et al.*, 2001) com sítios da substância cinzenta periaquedutal dorsal que organizam o

comportamento defensivo (COIMBRA *et al.*, 1992; COIMBRA & BRANDÃO, 1997) e possivelmente respostas de pânico (SCHENBERG, 2001; 2002).

Essa hipótese poderia explicar mais claramente a influência de opióides endógenos, tais como as encefalinas e as endorfinas, na atividade do substrato neural que elabora o medo nesta região mesencefálica (COIMBRA *et al.*, 2000). Nossos estudos são ainda corroborados por evidências diretas que sugerem um efeito inibitório induzido por opióides endógenos na liberação do GABA na substância cinzenta periaquedutal (STILLER *et al.*, 1996). Efetivamente, para ser explicada a influência antiaversiva dos bloqueadores opióides no teto mesencefálico, nível caudal, seria preciso o envolvimento de um segundo mecanismo neural nessa circuitaria, tendo sido proposto, em trabalhos anteriores, que opióides endógenos exerceriam uma inibição pré-sináptica tônica nos terminais GABAérgicos do mesencéfalo dorsal (COIMBRA *et al.*, 1996; COIMBRA *et al.*, 2000). Nossos achados, além de apresentarem-se como evidência estrutural da conexão neuroanatômica ligando a substância negra, parte reticulada, rica em neurônios GABAérgicos, ao colículo inferior, avança no sentido de permitir a identificação de neurônios varicosos, possivelmente opióides, conectando os subnúcleos do colículo inferior entre si, e estes a substrato neural de colunas mais caudais da substância cinzenta periaquedutal.

A aversão no teto mesencefálico é modulada, segundo vários estudos não somente por mecanismos opióides (COIMBRA *et al.*, 1996; COIMBRA *et al.*, 2000), GABAérgicos (COIMBRA *et al.*, 1989; COIMBRA & BRANDÃO, 1993), mas também por aminoácidos excitatórios (CARDOSO *et al.*, 1994; BRANDÃO *et al.*, 2001). Em harmonia com esses resultados, o presente trabalho mostrou, ainda, evidências de que o bloqueio de receptores GABAérgicos, com a microinjeção de

bicuculina no núcleo central do colículo inferior, induziu uma vigorosa resposta defensiva, caracterizada por congelamento, seguido por corridas, saltos e rotações amplas. Contudo, ao lado dessas manifestações comportamentais, que sugerem o bloqueio GABAérgico tônico sobre neurônios situados no colículo inferior, outras evidências apontaram para a modulação opióide no sistema encefálico aversivo (BRANDÃO *et al.*, 1990, 1993, 1994), onde se destaca o colículo inferior como possível sede para esses microcircuitos neurais (CARDOSO *et al.*, 1992; COIMBRA *et al.*, 2000).

Estudos conflitantes mostraram que as microinjeções de baixas doses de morfina no teto mesencefálico atenuaram de maneira dose-dependente as conseqüências aversivas de sua estimulação elétrica (JENCK, SCHMITT & KARLI, 1986; BRANDÃO *et al.*, 1990; CARDOSO *et al.*, 1992). No entanto, altas doses de morfina, quando localmente injetadas nessa região, causam uma ativação comportamental com saltos, mostrando, dessa maneira, uma grande similaridade com a reação observada após a estimulação elétrica ou após a microinjeção de bloqueadores de receptores GABAérgicos no teto mesencefálico (MOTTA & BRANDÃO, 1993). Este efeito excitatório, produzido pela morfina, não foi revertido pelo naloxone (JACQUET *et al.*, 1987). Como a bicuculina mimetiza, e o GABA, por si só, bloqueia esta ação da morfina não reversível por naloxone, Jacquet e Squires (1988) sugerem que essa excitação da morfina é em parte devida ao bloqueio de receptor GABA-A.

A atenuação de conseqüências aversivas da estimulação elétrica do colículo inferior, mediada pela morfina, pode ser parcialmente de natureza opióide, pois foi antagonizada por administrações prévias de naloxone no colículo inferior (CARDOSO *et al.*, 1992). Microinjeções de altas doses de morfina, contudo, mimetizam os efeitos da

estimulação elétrica do colículo inferior, e esse efeito pró-aversivo não foi bloqueado pela injeção prévia de naloxone, o que sugere o envolvimento de outros mediadores no controle de respostas de defesa elaboradas no colículo inferior (CARDOSO *et al.*, 1992). Dessa maneira, a interação entre mecanismos GABAérgicos e opióides descrita entre as camadas profundas do colículo superior e a substância cinzenta periaquedutal podem também vir a ocorrer no colículo inferior, pois a bicuculina microinjetada nessa estrutura produz ativação comportamental com saltos, com características similares àquelas induzidas por microinjeções de morfina ou estimulação elétrica dessa estrutura (BRANDÃO *et al.*, 1988; CARDOSO *et al.*, 1992). É possível que a ampla rede neural identificada no colículo inferior possa incluir conexões também ricas em peptídeos opióides, promovendo inibição pré-sináptica em conexões GABAérgicas provenientes da SNpr e que se destinam ao substrato neural da SCP, responsáveis pela geração e elaboração do medo e de respostas de pânico. Como os sítios que organizam o comportamento aversivo no colículo inferior também encontram-se sob controle inibitório de conexões GABAérgicas nigro-tectais, esse elo GABAérgico nigro-colicular mais caudal, modulado por interneurônios peptidérgicos opióides, ou mesmo a ação direta de interneurônios opióides sobre o substrato neural que elabora o medo no colículo inferior, podem vir a promover finas regulações da circuitaria colicular e periaquedutal durante a elaboração de respostas defensivas.

Assim, é possível que a ativação concatenada de redes neurais estriatais e mesencefálicas, possam prover projeções que, ativando ou inibindo microcircuitos intramesencefálicos, mediados pelo GABA e por peptídeos opióides, resultem na exacerbação ou bloqueio de enérgicas respostas de defesa que permitam que o animal elabore o comportamento mais adequado para o contexto experimental em que se

insere, ou para melhor adptar-se ou reagir ao tipo de conflito com o qual ele está sendo confrontado, durante os embates intra e interespecíficos que permeiam sua capacidade de sobrevivência e perpetuação da espécie.

10- CONCLUSÕES

- A estimulação elétrica do núcleo central do colículo inferior evoca uma clara ativação comportamental explosiva de fuga.
- O bloqueio de receptores GABA-A no núcleo central do colículo inferior também é seguido de respostas defensivas, geradas provavelmente pelo medo, o que sugere que o substrato neural do colículo inferior encontra-se sob bloqueio GABAérgico tônico.
- Técnicas neuroanatômicas clássicas de neurotraçamento de vias, utilizando substâncias de captação e transporte retrógrado e anterógrado apresentam evidências de uma nova via nigro-colicular, que conecta a parte reticulada da substância negra, rica em GABA, ao núcleo central do colículo inferior.
- A diminuição de atividade na via nigro-colicular, seja por lesões eletrolíticas ou neuroquímicas na intimidade da substância negra, parte reticulada, sensibiliza o teto mesencefálico à estimulação elétrica, despertando respostas defensivas mais vigorosas, em detrimento da ativação do substrato neural do colículo inferior que organiza o medo e o comportamento de fuga.
- Neurônios conectando o núcleo central do colículo inferior às colunas dorso-mediais e laterais da substância cinzenta periaquedutal apresentam fibras varicosas e não-varicosas grossas e finas e podem apresentar-se

como um importante aporte neural que venha modular respostas comportamentais elaboradas na substância cinzenta periaquedutal, nível caudal.

- Circuitos intramesencefálicos e nigro-coliculares apresentam-se como o mais novo substrato neural descoberto que exerce um potencial efeito modulatório sobre as respostas de medo e pânico organizadas no colículo inferior.

11- RESUMO

A estimulação elétrica e química de algumas estruturas mesencefálicas, tais como a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), as camadas profundas do colículo superior (CPCS) e o núcleo central do colículo inferior (NCCI) eliciam respostas defensivas, associadas ao medo, que muito se assemelham àquelas que caracterizam a síndrome do pânico em humanos. A substância negra, rica em neurônios GABAérgicos, recebe aferências também GABAérgicas provenientes do corpo estriado e se projeta para o mesencéfalo dorsal, mais cranialmente, modulando o substrato neural do medo no colículo superior e SCPd.

O objetivo deste trabalho foi investigar se essas conexões GABAérgicas nigro-tectais também se estendem ao substrato aversivo do colículo inferior de ratos, determinando sua influência sobre a modulação de respostas aversivas eliciadas por estimulação elétrica do teto mesencefálico dorsal, situado caudalmente. Também foi estudada a neuroanatomia de conexões entre o núcleo central do colículo inferior e as colunas dorsais e ventrais posteriores da substância cinzenta periaquedutal. A via foi traçada com o neurotraçador fluorescente “fast blue”, de captação e transporte retrógrado, microinjetado no núcleo central do colículo inferior (NCCI) e com o biodextran, um neurotraçador, anterógrado, microinjetado na substância negra, parte reticulada (SNpr) ou no NCCI. Os efeitos da diminuição de atividade dessa via foram estudados, através de lesões eletrolíticas e neuroquímicas (com ácido ibotênico) da substância negra, parte reticulada.

O neurotraçamento retrógrado mostrou células neuroniais localizadas na substância negra, parte reticulada que se projetam ipsi e contralateralmente ao

núcleo central do colículo inferior. Essa conexão nigro-tectal foi confirmada pelo neurotraçamento anterógrado, que mostrou fibras axônicas no núcleo central do colículo inferior, após a microinjeção de biodextran na substância negra, parte reticulada. Tanto a lesão eletrolítica como a lesão neuroquímica da substância negra, parte reticulada, sensibilizaram o teto mesencefálico à estimulação aversiva. O estudo das conexões intramesencefálicas, estudadas através da microinjeção iontoforética de biodextran no núcleo central do colículo inferior, permitiu a identificação de uma via rica em fibras varicosas conectando o NCCI, às colunas dorsomediais e laterais mais posteriores da substância cinzenta periaquedutal (SCP).

O bloqueio de receptores GABA-A no núcleo central do colículo inferior induziu vigorosas respostas defensivas, caracterizadas por congelamento, seguido de corridas, saltos e rotações, sugerindo o bloqueio GABAérgico tônico sobre neurônios localizados no substrato neural responsável pela elaboração do comportamento defensivo no núcleo central do colículo inferior.

12- ABSTRACT

The electrical and chemical stimulation of some midbrain structures, such as the dorsal periaqueductal gray matter (DPAG), deep layers of the superior colliculus and central and pericentral nucleus of the inferior colliculus, elicit defensive behavior, similar to these fear-like reactions described in panic disorder. The substantia nigra, a midbrain structure rich in GABAergic neurons, also receives GABAergic inputs from the striatum and sends inputs to the dorsal mesencephalon, more rostrally, modulating the neural substrate of fear in the superior colliculus and DPAG.

The aim of this work consists in studying if these GABAergic connections reach also modulatory targets in the aversive substrate of the inferior colliculus, effecting aversive responses elicited by electrical stimulation of the caudal midbrain tectum. The neuroanatomy of the connections between the central nucleus of the inferior colliculus and the dorsal columns of the periaqueductal gray matter was also investigated. The nigrotectal pathway was labeled with retrograde fluorescent neurotracer fast blue, microinjected in the central nucleus of the inferior colliculus and with the non-fluorescent neurotracer biotin dextran, iontophoretically microinjected in the substantia nigra, pars reticulata (SNpr). The effects of the decrease of the activity of this pathway were studied, through electrolytic and neurochemical lesions (with ibotenic acid) of the substantia nigra, pars reticulata.

The retrograde neurotracer showed neuronal cells located in the substantia nigra, pars reticulata, both ipsi- and contralaterally. This nigro-tectal pathway was corroborated by the anterograde neurotracer (BDA), that showed axonal fibers in the central nucleus of the inferior colliculus. Both the electrolytic and the neurochemical lesions of the SNpr decreased the aversive thresholds elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus. Intramesencephalic connections were studied by means of

iontophoretical microinjections of biotin in the central nucleus of the inferior colliculus, allowing the identification of pathway with axons rich in varicosities connecting the central nucleus of the inferior colliculus to caudal dorsomedial and lateral columns of the periaqueductal gray matter, where fear-induced behavior may be organized.

The GABA-A receptors blockade in the central nucleus of the inferior colliculus was followed by vigorous defensive responses, characterized by freezing, followed by running, jumping and rotations, suggesting a tonic inhibitory role of GABAergic pathways on the neural substrate responsible by elaboration of fear-like responses in the inferior colliculus, central nucleus.

13- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, D. B. – Brain mechanisms for offense and submission. *Behavioural Brain Sciences*, (1979) 2: 201-241.

Anderson, M & Yoshida, M. – Electrophysiological evidence for branching nigral projections to the thalamus and the superior colliculus. *Brain res.*, (1977) 137: 361-364.

Appel, P.P. & Behan, M. – Sources of subcortical GABAergic projections to the superior colliculus in the cat. *J. Comp. Neurol.*, (1990) 302: 143-158.

Bagri, A.; Sandner, G.; DiScala, G. – Effects of unilateral microinjections of GABAergic drugs into the inferior colliculus on auditory evoked potentials and on audiogenic seizure susceptibility. *Exp. Neurol.*, (1989) 104: 82-87.

Beckstead, R. M. – Convergent prefrontal and nigral projections to the striatum of the rat. *Neuroscience Letters*, (1979) 12: 59-64.

Beckstead, R. M. – Long collateral branches of substantia nigra pars reticulada axons to the thalamus, superior colliculus and reticular formation in monkey and cat. Multiple retrograde neuronal labelling with fluorescent dyes. *Neuroscience*, (1982) 10: 767-779.

Ben-Ari, Y. - The amygdaloid complex. Y. Ben-Ari (ed), Elsevier, Amsterdam, 1981.

Bentivoglio, M.; Van der Koov, D & Kuypers, H. G. J. M. – The organization of the efferent projections of the substantia nigra in the rat. A retrograde fluorescent double labeling study. *Brain Res.*, (1979) 174: 1-17.

Blanchard, D. C.; & Blanchard, R. J. - Innate and conditioned reactions to threat in rat with amygdaloid lesions. *J. Comp. Physiol., Psychol.*, (1972) 81: 281-293.

Blanchard, D. C.; & Blanchard, R. J.; Lee, E. M. C. & Nakamura, S. Defense behaviours in rats following septal amygdala lesions. *J. Comp. Physiol., Psychol.*, (1979) 93: 378-390.

Blomqvist, A; Danielson, I. & Norrsell, U. – The somatosensory intercollicular nucleus of the cat's mesencephalon. *Journal of Physiology*, (1990) 429: 149-191.

Bolam, J. P.; Somogyi, P.; Totterdell, S. & Smith, A. D. – A second type of striatonigral neuron: a comparison between retrogradely labelled and Golgi-stained neurons at the light and electron microscopic levels. *Neurosci.*, (1981) 6: 2141-2157.

Bolam, J. P. & Smith, Y. – The GABA and substance P input to dopaminergic neurons in the substantia nigra of the rat. *Brain Res.*, (1990) 529: 57-78.

Bormann, J. – The “ABC” of GABA receptors. *TIPS*, (2000) 21: 16-19.

Bowery, N.G.; Hill, D. R., Hudson, A. L.; Doble, A.; Middlemiss, D. N.; Shaw, J. & Turnbull, M. J. – (-) Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature*, (1980) 283: 92-94.

Brandão, M. L.; Aguiar, J. C. & Graeff, F. G. – GABA mediation of the antiaversive action of the minor tranquilizers. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, (1982) 16: 397-402.

Brandão, M. L.; DiScala, G.; Bouchet, M. J. & Schmitt, P. - Escape behavior induced by blockade of glutamic acid decarboxilase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, (1986) 24: 497-501.

Brandão, M. L.; Coimbra, N. C.; Leão-Borges, P. C. – Effects of morphine and midazolam on reactivity to peripheral noxious and central aversive stimuli. *Neurosci. Biobehav Rev.*, (1990) 14: 495-499.

Brandão, M. L.; Lopez-Garcia, J. A.; Graeff, F.G. & Roberts, M.H.T. Electrophysiological evidence for excitatory 5-HT₂ and depressant 5-HT_{1A} receptors on neurons of the rat midbrain tectum. *Brain Res.*, (1991) 556: 259-266.

Brandão, M. L.; Melo, L. L. & Cardoso, S. H. – Mechanisms of defense in the inferior colliculus. *Behavioural Brain Res.*, (1993) 58: 49-55.

Brandão, M. L. & Tomaz, C.; Leão-Borges, P. C.; Coimbra, N. C. & Bagri, A. – Defense reaction induced by microinjections of bicuculine into inferior colliculus. *Physiol. Behav.*, (1988) 44: 361-365.

Brandão, M. L.; Cardoso, S. H.; Melo, L. L.; Motta, V. & Coimbra, N. C. – The neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, (1994) 18: 339-346.

Brandão, M. L.; Anseloni, V. Z.; Pandóssio, J. E.; De Araújo, J. E. & Castilho, V. M. – Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, (1999) 23: 863-875.

Brandão, M. L.; Coimbra, N. C. & Osaki, M. Y. – Changes in the auditory-evoked potentials induced by fear-evoking stimulations. *Physiology and Behavior*, (2001) 72: 365-372.

Brandão, M. L. & Schmitt, P. – Role of nigrocollicular GABAergic fibers in the genesis of aversive behaviour. In M. L. Brandão (Ed.), *Neurosciences and Behaviour*, Vitória, Gráfica da UFES, 1987, pp. 31-44.

Breese, G. R.; Frye, G. D.; McCown, T. J.; Mueller, R. A. – Comparison of the CNS effects induced by TRH and bicuculline after microinjection into medial septum, substantia nigra and inferior colliculus: Absence of support for a GABA antagonist action for TRH. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, (1984) 21: 145-149.

Brodal, P. – The central nervous system: Structure and function. New York: Oxford University Press; 1992.

Cardoso, S. H.; Coimbra, N. C. & Brandão, M. L. - Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. *Behav. Brain Res.*, (1994) 63: 17-24.

Cardoso, S. H.; Melo, L. L.; Coimbra, N. C. & Brandão, M. L. – Opposite effects of low and high doses of morphine on neuronal substrates of aversion in the inferior colliculus. *Behav. Pharmacology*, (1992) 3: 489-495.

Carrive, P. – The pariaqueductal gray and defensive behaviour: functional representation and neuronal organization. *Behav. Brain Res.*, (1993) 58: 27-47.

Castilho, V. M.; Avanzi, V. & Brandão, M.L. – Antinociception elicited by aversive stimulation of the inferior colliculus. *Pharmacol. Biochem. BE*, (1999) 62: (3) 425-431.

Catsman-Berrevoets, C. E.; Kuypers, H. G. J. M. – Differences in distribution of corticospinal axon collaterals to thalamus and retrograde fluorescent labeling of cortical neurons. *Neurosci. Lett.* [suppl.], (1979) 3: 133.

Cesaro, P.; Nguyen-Legros, J.; Berger, B.; Alvarez, C. & Alve-Fessard, D. – Double labeling of branched neurons in the central nervous system of the rat by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase and iron dextran complex. *Neurosci. Lett.*, (1979) 15: 1-8.

Chevalier, G.; Thierry, A. M.; Shibasaki, T. & Feger, J. – Evidence for a GABAergic inhibitory nigro-collicular pathway in the rat. *Neurosci. Lett.*, (1981) 21: 67-70.

Childs, J. A. & Gale, K. – Circling behaviour elicited from the pedunculopontine nucleus: evidence for the involvement of midbrain GABAergic projections. *Brain Res.*, (1984) 304: 387-391.

Chusid, J. G. – Sistema Nervoso Central. Em: *Neuroanatomia Correlativa & Neurologia Funcional*, Joseph G. Chusid (ed.) Guanabara Koogan, (14 ed.), Rio de Janeiro, p. 23, 1970.

Coimbra N. C. & Brandão, M. L. – Effects of 5 HT₂ receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of

the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. *Behav. Brain Res.*, (1997) 87: 97-103.

Coimbra, N. C.; & Brandão, M. L. – GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behavior elicited by midbrain tectum stimulation. *Behav. Brain Res.*, (1993) 59: 131-139.

Coimbra, N. C.; Kawasaki, M. C.; Ciscato, Jr., J. G.; Cardoso, S. H. & Corrêa S. A. L. – Nigro-tectal pathway: neuroanatomy and role on defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. *Soc. Neurosci. Abstr.*, (1998 a) 24: 1930.

Coimbra, N. C.; Castro-Souza, C.; Garcia-Cairasco, N. – Neuroanatomical and neurophysiological study of post-ictal antinociceptive process in experimental models of epilepsy (abstract). *Arq. Neuropsiquiatr.* (Suppl. 1) (1998 b) 56: 267.

Coimbra, N. C.; Eichenberger, G. C. D.; Gorchinski, R. T. & Maisonnette, S. S. – Effects of the blockade of opioid receptor of defensive reactions elicited by electrical stimulation within the deep layers of the superior colliculus and DPAG. *Brain Res.*, (1996) 736: 348-352.

Coimbra, N. C.; Leão-Borges, P. C.; & Brandão, M. L. – GABAergic fibers from substantia nigra, pars reticulata, modulate escape behaviour induced by midbrain central gray stimulation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, (1989) 22: 111-114.

Coimbra, N. C.; Osaki, M. Y.; Eichenberger, G. C. D.; Ciscato, J. G. Jr.; Jucá, C. E. B.; Biojone, C. R. – Effects of opioid receptor blockade on defensive behavior elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior colliculus in *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). *Psychopharmacology*, (2000) 152: 422-430.

Coimbra, N. C.; Tomaz, C. & Brandão, M. L. – Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum. *Behav. Brain*, (1992) 50: 77-83.

Cooper, M. H. & Young, P. A. – Cortical projections to the inferior colliculus of the cat. *Exp. Neurol.* (1976) 51: 488-502.

Cuadra, G.; Zurita, A.; Macedo, C. E.; Molina, V. A. & Brandão, M. L. – Electrical stimulation of the midbrain tectum enhances dopamine release in the frontal cortex. *Brain Res. Bulletin*, (2000) 52: 413-418.

Danner, H & Pfister, C. – Sieben neurontypen in der substantia nigra der ratte. Eine Golgi-rapid impragnationsstudie. *J. für Hirnforsch*, (1982) 23: 553-566.

Deniau, J. M. & Chevalier, G. – The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: distribution of projection neurons. *Neuroscience*, (1992) 46: 361-377.

Di Chiara, G.; Porceddu, M. L.; Moreli, M.; Mulas, M. L. & Gessa, G. L. – Evidence for a GABAergic projection from the substantia nigra to the ventro-medial thalamus and to the superior colliculus of the rat. *Brain Res.*, (1979) 176: 273-284.

Di Scala, G.; Schmitt, P & Karli, P – Flight induced by infusion of bicuculine methiodide into periventricular structures. *Brain Res.*, (1984) 309: 199.

Doretto, M. C & Garcia-Cairasco, N – Differential audiogenic seizure sensitization by selective unilateral substantia nigra lesions in resistant Wistar rats. *Physiol. Behav.*, (1995) 58: 273-282.

Eichenberger, G. C. D.; Ribeiro, S. J.; Osaki, M. Y.; Maruoka, R. Y.; Resende, G. C. C.; Castellan-Baldan, L.; Corrêa, S. A L.; Da Silva, L. A & Coimbra, N. C. - Neuroanatomical and psychopharmacological evidences for interactions between opioid and GABAergic neural pathways in the modulation

of the defensive behavior elicited by electrical and chemical stimulation of the dorsal mesencephalon. *Neuropharmacology*, (2002) 42: 48-59.

Faingold, C. L.; Gehlbach, C.; Caspary, D. M. – Effects of GABA on inferior colliculus neuronal responses to acoustic stimuli. *Soc. Neurosci. Abstr.*, (1983) 11: 247.

Fallon, J. H. & Loughlin, S. E. – Monoamine innervation of the forebrain: Forebrain collateralization. *Brain Res. Bulletin* (1982) 9: 295-307.

Fallon, J. H.; Hicks, R. & Loughlin, S. E. – The origin of CCK terminals in the basal forebrain of the rat: evidence from immunofluorescence and retrograde tracing. *Neurosci. Lett.*, (1983) 37: 29-35.

Fallon, J. H. & Loughlin, S. E. – Substantia nigra. Em: *The rat nervous system*. (1985) pp. 353-374.

Fallon, J. H. & Moore, R. Y. – Catecholamine innervation of basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection of the basal forebrain and neostriatum. *Journal of Comp. Neurology*, (1978) 180: 545-580.

Fanselow, M. S. – Conditional and unconditional components of post-shock freezing. *J. Biol. Sci.*, (1980) 15: 177-182.

Fanselow, M. S. – The midbrain pariaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: *The Midbrain Pariaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Immunohistochemical Organization*, A Depaulis and R. Blander (eds.), Plenum Publishing Corporation, New York (1991), pp. 151-173.

Faull, R. L. M. & Mehler, W. R. – The cells of origin of nigrotectal, nigrothalamic and nigrostriatal projections in the rat. *Neuroscience*, (1978) 3: 989-1002.

Faye-Lund, H. & Osen, K. K. – Anatomy of the inferior colliculus in rat. *Anat. Embriol. Berlin*, (1985) 171 (1): 1-20.

Fernandez de Molina, A & Hunsperger, R. W. – Central representation of affective reaction in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis and adjacent structures. *J. Physiol.*, (1959) 145: 251-265.

Fisher, R. S.; Buchwald, N. A.; Hull, C. D. & Levine, M. S. – The GABAergic striatonigral neurons of the cat: demonstration by double peroxidase labeling. *Brain Res.*, (1986) 398: 148-156.

Frye, G. D.; MacCown, T. J.; Breese, G. R. – Characterization of susceptibility to audiogenic seizures in ethanol-dependent rats after

microinjections of γ -aminobutyric acid (GABA) agonists into the inferior colliculus, substantia nigra or medial septum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1983) 227: 663-670.

Fuchs, S. A G.; & Siegel, A – Neural pathways mediating hypothalamically elicited flight behaviour in the cat. *Brain Res.*, (1984) 306: 263-281.

Fuchs, S. A G.; Edinger, H. M. & Siegel, A – The role of the anterior hypothalamus in affective defense behaviour elicited from the ventromedial hypothalamus of the cat. *Brain Res.*, (1985) 330: 93-107.

Fuster, J. M. – The prefrontal cortex: Anatomy, physiology and neurophysiology of the frontal lobe. New York: Raven Press; 1989.

Garcia-Cairasco, N. & Sabbatini, R. M. E. – Possible interaction between the inferior colliculus and the substantia nigra in audiogenic seizures in wistar rats. *Physiol. Behav.*, (1991) 50: 421-427.

Garcia-Cairasco, N & Triviño-Santos, H. F. – Effects of both 6-hydroxydopamine-induced and electrolytic lesion of the substantia nigra on the rotational behavior and audiogenic seizures in the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, (1989) 22: 617-629.

Garcia-Cairasco, N – A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hear. Res.*, (2002) 168: 208-222.

Gerfen, C. R.; Staines, W. A.; Arbuthnott, G. W. & Fibiger, H. C. – Crossed connections of the substantia nigra in the rat. *Journal of Comp. Neurology*, (1982) 207: 283-303.

Goldsmith, J. D.; Kujawa, S. G.; McLaren, J. D.; Bledsoe, S. C., Jr. – In vivo release of neuroactive amino acids from the inferior colliculus of the guinea pig using brain microdialysis. *Hear. Res.*, (1995) 83: 80-88.

Grace, A A & Bunney, B. S. – Paradoxical GABA excitation of nigral dopaminergic cells: indirect mediation through reticulata inhibitory neurons. *Eur. J. Pharmac.*, (1979) 59: 211-218.

Graeff, F. G. – Minor tranquilizers and brain defense system. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, (1981) 14: 239-265.

Graeff, F. G. – Brain defense systems and anxiety. Em: *Handbook of Anxiety*, M. Roth; G. D. Burrows e R. Noyes (eds.), vol. 3, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1990) pp. 307-354.

Gray, J. A – Neuropharmacology of Anxiety, Oxford University Press, New York, 1982.

Grofová, I. – The identification of striatal and pallidal neurons projecting to substantia nigra. An experimental study by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.*, (1975) 91: 286-291.

Grofová, I.; Ottersen, O. P. & Rinvik, E. – Mesencephalic and diencephalic afferents to the superior colliculus and periaqueductal gray substance demonstrated by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in the cat. *Brain Res.*, (1978) 146: 205-220.

Grofová, I., Deniau, J. M., Kitai, S. T. & Donoghue, J. P. – Neuronal interactions in the substantia nigra pars reticulata through axon collaterals of the projection neurons. *Exp. Brain Res.*, (1982) 47: 105.

Guidotti, A.; Corda, M. G.; Wise, B. C. – GABAergic synapses. *Neuropharmacology*, (1983) 22: 1471-1479.

Halpern, M. – Effects of midbrain central gray matter lesions on escape avoidance behaviour in rats. *Physiol. Behav.*, (1968) 3: 171-180.

Harting, J. K.; Huerta, M. F.; Hashikawa, R.; Weber, J. T. & Van Lieshout, D. P. – Neuroanatomical studies of the nigro-tectal projection in the cat. *J. Comp. Neurol.*, (1988) 278: 615-631.

Henderson, Z. – Ultrastructure and acetylcholinesterase content of neurons forming connections between the striatum and substantia nigra of rat. *J. of Comp. Neurol.*, (1981) 197: 185-196.

Hess, W & Brugger, M. – Das subkortikale zentrum der affektiven abwereaktion. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta.*, (1943) 1: 33-52.

Hill, D. R. & Bowery, N. G. – H³ Baclofen and H³ GABA bind to bicuculine-insensitive GABA-B sites in rat brain. *Nature*, (1981) 290: 149-152.

Hilton, S. M. – The defense –arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. *J. Exp. Biol.*, (1982) 100: 159-174.

Horvath, F. E. – Effects of basolateral amygdaletomy on three types of avoidance behaviour in cats. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, (1963) 56: 530. *Apud* Panksepp, J. The psychoneurology of fear: evolutionary perspectives and the role of animals models in undestarding human anxiety. Em: *The Neurobiology of Anxiety*, G. D. Burrows; M. Roth e R. Noyes (eds.), Elsevier Science Publishers, vol. 3, (1990) pp.3-58.

Huber, G.; Crosby, E.; Woodburne, R.; Gillian, L.; Brown, J & Tamthai, B. – The mammalian midbrain and isthmus regions. *Journal of Comp. Neurology*, (1943) 78: 129-536.

Ibata, Y.; Kawakami, F.; Okamura, H.; Obata-Tsuto, H. L.; Morimoto, n. & Zimmerman, E. A. – Light and electron microscopic immunocytochemistry of β -LPH-like immunoreactive neurons in the arcuate nucleus and surrounding areas of the rat hypothalamus. *Brain Res.*, (1985) 341: 233-242.

Imperato, A. & Di Chiara, G. – Behavioural effects of GABA agonists infused in the mesencephalic reticular formation-deep layers of superior colliculus. *Brain Res.*, (1981) 224: 184-194.

Isaacson, R. L. – The Limbic System, R L. Isaacson (ed.), 2ed., Plenum Press, New York, 1982.

Iwata, J., Chida, K. & LeDoux J. E. – Cardiovascular responses elicited by stimulation of neurons in the central amygdaloid nucleus in awake but not anaesthetized rats resemble conditioned emotional responses. *Brain Res.*, (1987) 418: 183-188.

Jackson, A. & Crossman, A. R. – Nucleus tegmenti pedunculopontinos: efferent connections with special reference to the basal ganglia, studied in the

rat by anterograde and retrograde transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience*, (1983) 10: 725-765.

Jacquet, Y. F.; Saedrup, E.; Squires, R. F. – Non-stereospecific excitatory actions of morphine may be due to GABA-A receptor blockade. *Eur. J Pharmacol.*, (1987) 138: 285-288.

Jacquet, Y. F.; Squires, R. F. – Excitatory amino acids: role in morphine excitation in rat periaqueductal gray. *Behav. Brain Res.*, (1988) 31: 85-88.

Jenck, F.; Schmitt, P & Karli, P. – Morphine injected into the periaqueductal gray attenuates brain stimulation-induced effects: an intensity discrimination study. *Brain Res.*, (1986) 378: 274-284.

Jonhson, T. N. & Clementi, C. D. – An experimental study of the fiber connections between the putamen, globus pallidus, ventral thalamus, and midbrain tegmentum in cat. *Journal of Comp. Neurology*, (1959) 113: 83-97.

Johnston, G. A. R. – GABA-A receptor pharmacology. *Pharmacol. Ther.*, (1996) 69: 173-198.

Johnston, G. A. R. – GABA-C receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trens Pharmacol. Sci.*, (1996) 17: 319-323.

Kandel, E.R.; Schwartz, J. H.; Jessel, T. M. – Fundamentos da Neurociência e do Comportamento, cap. XXIX, Editora Prentice-Hall do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 1995.

Kilpatrick, I. C.; Collingridge, G & Starr, M. – Evidence for the participation of nigrotectal gamma-aminobutyrate containing neurons in striatal and nigral-derived circling in the rat. *Neuroscience*, (1982) 7: 207-222.

Kilpatrick, I. C.; Starr, M.; Fletcher, A.; James, T. & MacLeod, N. – Evidences for a GABAergic nigrothalamic pathway in the rat. *Experimental Brain Res.*, (1980) 40: 45-54.

Kuwada, S.; Batra, R.; Yin, T. C.; Oliver, D. L.; Haberly, L.B.; Stanford, T.R. – Intracellular recordings in response to monoaural and binaural stimulation of the neurons in the inferior colliculus of the cat. *J. Neurosci.*, (1997) 17: 7565-7581.

Kudo, M; Niimi, K. – Ascending projections of the inferior colliculus in the cat: an autoradiographic study. *The Journal of Comp. Neurol.*, (1980) 191: 545-556.

Kupferman, I. – Hypothalamus and limbic system: Motivation. In Kandel, E. R., Schwartz, J.H. & Jessell, T. M. (eds.), *Principles of Neural Science*, 3rd ed. New York: Elsevier, (1991) 751-760.

Kuypers, H. G. J. M.; Bentivoglio, M.; Catsman-Berrevoets, C. E. & Bharos, A. T. – Double retrograde neuronal labeling through divergent axon collaterals, using two fluorescent tracers with the same excitation wave length which label different features of the cell. *Exp. Brain Res.*, (1980) 40: 383-392.

Leão-Borges, P. C.; Coimbra, N. C. & Brandão, M. L. – Independence of aversive and pain mechanisms in the dorsal periaqueductal gray matter of the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, (1988) 21: 1027.

LeDoux, J. E.; Farb, C. & Ruggiero, D. A. – Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *J. Neurosci.*, (1990 a) 10: 1043-1054.

LeDoux, J. E.; Cicchetti, P.; Xagoraris, A & Romanski, L. M. – The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J. Neurosci.*, (1990 b) 10: 1062-1069.

LeDoux, J. E. – Emotion and the limbic system concept. *Concepts in Neuroscience*, (1991) 2: 169-199.

Li, Y; Evans, M.S. & Faingold, C. L. – Synaptic response patterns of neurons in the cortex of the rat inferior colliculus. *Hear. Res.*, (1999) 137: 15-28.

Lindvall, O & Björklund, A. – Organization of catecholamine neurons in the rat central nervous system. In: Iverson, L.L.; Iversen S.D. and Snyder, S.H. (eds.), *Handbook of Psychopharmacology*, [9 vol.], Plenum, New York, 139-231, 1978.

Loopuijt, L. D. & Van Der Kooy, D. – Organization of the striatum collateralization of its efferent axons. *Brain Res.*, (1985) 348: 86-99.

Lyon, M. – The role of central midbrain structures in conditioned responding to aversive noise in the rat. *J. Comp. Neurol.*, (1964) 122: 407-429.

Machado, A. B. M., - Neuroanatomia Funcional, cap. XVIII, (2 ed.) Editora Atheneu, Rio de Janeiro, 2000.

Maisonnette, S. S.; Kawasaki, M. C.; Coimbra, N. C. & Brandão, M. L. – Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Res. Bulletin*, (1996) 40: 93-98.

Mancia, G. & Zanchetti, A – Hypothalamic control of autonomic functions. Em: *Handbook of Hypothalamus*, P. J. Morgani e J. Panksepp (eds.), Marcel Dekker, New York (1981) pp. 147-201.

Martin, John H. – Neuroanatomia, cap. VII (2 ed.) Editora Artes Médicas, Porto Alegre, 1998.

Masterton, R. B. – Role of the central auditory system in hearing: the new direction. *TINS*, (1992) 15, 280-285.

May, P. J. & Hall, W. C. – The sources of the nigrotectal pathway. *Neuroscience*, (1986) 19: 159.

Meininger, V.; Pol, D. & Derer, P – The inferior colliculus of the mouse. A nissl and golgi study. *Neuroscience*, (1986) 17 (4):1159-1179.

Meininger, V & Baudrimont, M – The cytoarchitecture of the inferior colliculus in the cat. A stereological approach. *Journal of Neurological Sciences* (1977) 34: 25-36.

Melo, L. L.; Brandão, M. L.; Graeff, F. G. & Sandner, G. – Bilateral ablation of the auditory cortex in the rats alters conditioned emotional suppression to a sound as appraised through a latent inhibition study. *Behav. Brain Res.*, (1997) 88: 59-65.

Melzack, R. & Wall, P. D.; TY, T. C. – Acute pain in an emergency clinic: latency of onset and descriptor patterns related to different injuries. *Pain*, (1982) 14: 33-43.

Menescal-de-Oliveira, L. & Hoffmann, A. – The parabrachial region as a possible region modulating simultaneously pain and tonic immobility. *Behav. Brain Res.*, (1993) 56: 127-132.

Metz, C. B.; Scheneider, S. P. & Fyffe, E. W. – Selective suppression of endogenous peroxidase activity: application for enhancing appearance of HRP-labeled neurons in vitro. *J. Neurosci. Method*, (1989) 26: 181-189.

Miczek, K. A & Thompson, M. L. – Analgesia resulting from defeat in a social confrontation: the role of endogenous opioids in brain. Em: *Modulation of Sensorimotor Activity During Alteration in Behavioral States*, R. Bandler (ed.), Liss, New York (1984) pp. 431-456.

Milbrandt, J. C.; Albin, R. L.; Turgeon, S. M.; Caspary, D. M. – GABA-A receptor binding in the aging rat inferior colliculus. *Neuroscience*, (1996) 73: 449-458.

Motta V. & Brandão, M. L. – Aversive and antiaversive effects of morphine in the periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. *Pharmacol. Biochem. and Behav.*, (1993) 44: 119-125.

Nashold, B. S.; Wilson, W. P. & Slaughter, D. G. – Sensations evoked by stimulation in the midbrain of the man. *Journal of neurosurgery*, (1969) 30: 14.

Nauta, W. J. H. – Hypocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat. *Brain Res.*, (1958) 81: 319-340.

Nauta, W. J. H. & Domesick, V. B. – Afferent and efferent relationship of the basal ganglia. *Ciba Found Symposium*, (1984) 107: 3-29.

Nutt, D. J. & Malizia, A L. – New insights into the role of the GABA-A – benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *British Journal of Psychiat.*, (2001) 179: 390-396.

Olazábal, U. E. & Moore, J.K. – Nigrotectal projection to the inferior colliculus: horseradish peroxidase transport and tyrosine hydroxylase immunohistochemical studies in rats, cats and bats. *J. Comp. Neurol.*, (1989) 282: 98-118.

Oliver, D. L.; Beckius, G. E.; & Shneiderman, A. – Axonal projections from the lateral and medial superior olive to the inferior colliculus of the cat: a study using electron microscopic autoradiography. *The Journal of Comp. Neurol.*, (1995) 360: 17-32.

Paksepp, J. – The psychoneurology of fear: evolutionary perspectives and the role of animal models in understanding human anxiety. Em: *Handbook of Anxiety*, G. D. Burrows; M. Roth e R. Noyers, Jr. (eds.), vol. 3, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1990) pp. 3-58.

Pandossio, J. E. & Brandão, M. L. – Defensive reactions are counteracted by midazolam and muscimol and elicited by activation of glutamate receptors in the inferior colliculus of rats. *Psychopharmacology*, (1999) 142: 360-368.

Paxinos, G. & Watson, C. – The rat brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press, Sydney, 1997.

Paxinos, G. – The rat nervous system, vol. 1, Academic Press, Australia, (1985), pp: 37-86.

Parent, A. – Extrinsic connections of the basal ganglia. *TINS*, (1990) 13: (7) 254-259.

Park, T. J. & Pollak, G. D. – GABA shapes sensitivity to interaural intensity disparities in the mustache bat's inferior colliculus: implications for encoding sound location. *J. Neurosci.*, (1993) 13: 2050-2067.

Pellegrino, L. – Amygdaloid lesions and behavioral inhibition in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, (1968) 56: 483-491.

Purves, D.; Augustine, G. J.; Fitzpatrick, D.; Katz, L. C.; LaMantia, A. S.; McNamara, J. O.; Williams, S. M. – Neuroscience, chapters. XIII, XVII, XVIII (2 ed.) Sinauer, Sunderland, MA U.S.A., 2001.

Redgrave, P.; Marrow, L. & Dean, P. – Topographical organization of the nigrotectal projection in rat: evidence for segregated channels. *Neurosci.*, (1992) 50: 571-595.

Ribak, C. E.; Vaughn, J. E. & Roberts, E. – The GABA neurons and their axons terminals in rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunocytochemistry. *J. of Comp. Neurol.*, (1979) 187: 261.

Ribak, C. E.; Vaughn, J. E. & Roberts, E. – GABAergic nerve terminals decrease in the substantia nigra following hemitranssections of the striatonigral and palidonigral pathways. *Brain Res.*, (1980) 192: 413-420.

Ribak, C. E.; Vaughn, J. E.; Sato, K; Barber, G & Roberts, E. – Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat substantia nigra. *Brain Res.*, (1976) 116: 287-298.

Rinvik, E.; Grofová, I. & Ottersen, O. P. – Demonstration of nigrotectal and nigroreticular projections in the cat by axonal transport of proteins. *Brain Res.*, (1976) 112: 388-394.

Rioch, D. M. – Studies on the diencephalon of carnaria. II. Certain nuclear configurations and fiber connections of the subthalamus and midbrain of the dog and cat. *Journal of Comp. Neurology*, (1929) 49: 121-153.

Schenberg, L. C.; Bittencourt, A. S.; Sudre, E. C. M. – Modeling panic attacks. *Neurosci. Biobehav. R.* (2001) 25:(7-8) 647-659.

Schenberg, L. C.; Capucho, L. B.; Vatanabe, R. O. – Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey – evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology*, (2002) 159: (2) 138-144.

Schmitt, P; Carrive, P; DiScala, G; Jenck, F.; Brandão, M. L.; Bagri, A; Moreau, J. L. & Sandner, G. – A neuropharmacological study of the periventricular neural substrate involved in flight. *Behav. Brain Res.*, (1986) 22: 181-190.

Shneiderman, A.; Chase M. B.; Rockwood, J. M.; Benson, C. G. & Potashner, S. J. – Evidence for a GABAergic projection from the dorsal nucleus of the lateral lemniscus to the inferior colliculus. *J. Neurochem.*, (1993) 60: 72-82.

Siegel, A & Pott, C. B. – Neural substrates of aggression and flight in the cat. *Prog. Neurobiol.*, (1988) 31: 261-283.

Silveira, M. C. L., Sandner, G. & Graeff, F. G. – Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.*, (1993) 56: 115-118.

Sim, L. J. & Joseph, S. A. – Arcuate nucleus projections to brainstem regions which modulate nociception. *J. of Chemical Neuroanatomy.*, (1991) 4: 97-109.

Smith, Y. & Bolam, J. P. – Neurons of the substantia nigra reticulata receive a dense GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *Brain Res.*, (1989) 493: 160-167.

Staines, W. A.; Nagy, J. I.; Vincent, S. R. & Fibiger, H. C. – Neurotransmitters contained in the efferents of the striatum. *Brain Res.*, (1980) 194: 391-402.

Steinbusch, H. W. M. – Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat cell bodies and terminals. *Neurosci.*, (1981) 6: 557-618.

Stiller, C. O.; Bergquist, J.; Beck, O.; Ekman, R.; Brodin, E. – Local administration of morphine decreases the extracellular level of GABA in the periaqueductal gray matter of freely moving rats. *Neuroscience Letters*, (1996) 209: 165-168.

Swanson, L. W. – The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescent study in the rat. *Brain Res. Bulletin*, (1982) 9: 321-353.

Szabo, J. – The efferent projections of *putamen* in the monkey. *Experimental Neurology*, (1967) 19: 463-476.

Tomaz, C.; Brandão, M. L.; Bagri, A; Carrive, P.; Schmitt, P. – Flight behavior induced by microinjections of GABA antagonists into periventricular structures in detelencephalated rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, (1988) 30 (2): 337-342.

Tomaz, C.; Brandão, M. L.; Garcia-Cairasco, N. – Overlapping neural substrates underlying defense reactions, aversive memory and convulsive behavior, In: Butcher, L. L., Lewin, E. (Eds.), *Neurotransmitter Interactions and Cognitive Function*. (1992) Cambridge, MA, Birkhauser, Boston MA, pp. 240-256.

Troncoso, A. C.; Cirilo-Júnior, G.; Sandner, G.; Brandão, M. L. – Signaled two-way avoidance learning using electrical stimulation of the inferior colliculus as negative reinforcement: effects of visual and auditory cues as warning stimuli. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, (1998) 31: 391-398.

Vincent, S. R.; Hattori, T & McGeer, E. G. – The nigrotectal projection: a biochemical and ultrastructural characterization. *Brain Res.*, (1978) 151: 159-164.

Williams, F. G.; Mullet, M. A.; Beitz, A. J. – Basal release of metenkefalin and neurotensin in the ventrolateral periaqueductal gray matter of the rat: a microdialysis study of antinociceptive circuits. *Brain Res.*, (1995) 690: 207-216.

Williams, M. N. & Faull, R. L. M. – The nigrotectal projection and tectospinal neurons in the rat. A light and electron microscopic study demonstrating a monosynaptic nigral input to identified tectospinal neurons. *Neuroscience*, (1988) 25: 533-562.

Yukihiko, Y; Nakano, K; Kayahara, T & Mizuno, N. – Non-dopaminergic projections from the substantia nigra, *pars lateralis*, to the inferior colliculus in the rat. *Brain Res.*, (1991) 559: 139-144.

Zhang, De Xing; Li, L. Kelly, J. B. & Wu, S. H. – GABAergic projections from the lateral lemniscus to the inferior colliculus of the rat. *Hear. Res.*, (1998) 117: 1-12.

Zhang, S. P.; Bandler, R. & Carrive, P. – Flight and immobility evoked by excitatory amino acid microinjection within distinct parts of the subtentorial midbrain pariaqueductal gray of the cat. *Brain Res.*, (1990) 520: 73-82.

14- ANEX● I

Efeito da Lesão Eletrolítica da SNpr sobre os Limiares Aversivos Eliciados por Estimulação Elétrica do Colículo Inferior

	CONGELAMENTO		FUGA	
	<i>Antes</i>	<i>Depois</i>	<i>Antes</i>	<i>Depois</i>
K3	60	50	70	60
K4	110	60	130	70
K5	100	20	110	80
K6	90	90	180	110
K14	90	30	120	50
K12	100	80	170	140
K13	120	60	140	100

Média	95,71	55,71	131,43	87,14
EPM	7,19	9,48	14,05	11,89

T= 3,53
p= 0,01

T= 5,10
p= 0,002

Efeito da Lesão Neuroquímica da SNpr sobre os Limiares Aversivos Elicidos por Estimulação Elétrica do Colículo Inferior

	CONGELAMENTO		FUGA	
	<i>Antes</i>	<i>Depois</i>	<i>Antes</i>	<i>Depois</i>
GA RIII	150	130	170	150
GB RI	130	100	150	130
GB RIII	100	80	140	130
GC RI	100	80	130	100
GC RII	100	80	130	100
GD RIII	80	50	130	100
GH RIX	50	50	100	80
GF RI	60	50	80	70
GF RIII	100	80	130	100
GF RVI	70	60	100	90

Média	94	76	126	105
EPM	9,68	8,05	8,33	7,78

T= -2,66
p= 0,0077

T= -2,80
p= 0,0051

Efeito das Microinjeções de Salina e de Bicuculina no NCCI sobre a Incidência Média do Número de Cruzamentos

	SALINA
RI	224
RXII	0
RXIII	144
RV	280
RII	120
RXX	136

Média	150,66
EPM	39,16

	BICUCULINA
RIIX	456
RIV	448
RX	264
RIII	544
RVII	336
RIX	864

Média	485,33
EPM	85,71

U= 1,0
p= 0,0065

Efeito das Microinjeções de Salina e de Bicuculina no NCCI sobre a Incidência Média do Número de Levantamentos

	SALINA
RI	14
RXII	0
RXIII	9
RV	0
RII	0
RXX	0
Média	3,83
EPM	2,51

	BICUCULINA
RIIX	0
RIV	63
RX	33
RIII	0
RVII	18
RIX	10
Média	20,66
EPM	9,86

U= 9,0
p= 0,1240

Efeito das Microinjeções de Salina e de Bicuculina no NCCI sobre a Incidência Média do Número de Saltos

SALINA		BICUCULINA	
RI	0	RIIX	22
RXII	0	RIV	16
RXIII	0	RX	6
RV	0	RIII	32
RII	0	RVII	4
RXX	0	RIX	8
Média	0	Média	14,66
EPM	0	EPM	4,43

U= 0,00
p= 0,0021

Efeito das Microinjeções de Salina e de Bicuculina no NCCI sobre a Incidência Média do Número de Rotações

SALINA		BICUCULINA	
RI	0	RIIX	26
RXII	0	RIV	10
RXIII	0	RX	4
RV	29	RIII	57
RII	2	RVII	23
RXX	13	RIX	4
Média	7,33	Média	20,66
EPM	4,8	EPM	8,21

U= 8,0
p= 0,1062

15- ANEXO II



Pergamon

Neuropharmacology 42 (2002) 48–59

NEURO
PHARMACOLOGY

www.elsevier.com/locate/neuropharm

Neuroanatomical and psychopharmacological evidence for interaction between opioid and GABAergic neural pathways in the modulation of fear and defense elicited by electrical and chemical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray matter

G.C.D. Eichenberger, S.J. Ribeiro, M.Y. Osaki, R.Y. Maruoka, G.C.C. Resende, L. Castellan-Baldan, S.A.L. Corrêa, L.A. Da Silva, N.C. Coimbra *

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo, Lab. de Neuroanatomia e Neuropsicobiologia, Avenida dos Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, 14049-900, Brazil

Received 15 January 2001; received in revised form 27 July 2001; accepted 20 September 2001

Abstract

The effects of central administration of opioid antagonists on the aversive responses elicited by electrical (at the freezing and escape thresholds) or chemical stimulation (crossings, rearings, turnings and jumps, induced by microinjections of bicuculline) of the midbrain tectum were determined. Central microinjections of naloxone and naltrexone in the mesencephalic tectum caused a significant increase in the freezing and escape thresholds elicited by electrical midbrain tectum stimulation. Furthermore, both opioid antagonists caused a significant decrease in the mean incidence of aversive behavioral responses induced by microinjections of bicuculline in the deep layers of the superior colliculus (DLSC) and in dorsal aspects of the periaqueductal gray matter (DPAG), as compared with controls. These findings suggest an opioid modulation of the GABAergic inhibitory inputs controlling the aversive behavior elicited by midbrain tectum stimulation. In fact, immunohistochemical evidence suggests that the dorsal mesencephalon is rich in β -endorphin-containing neurons and fibers with varicosities. Iontophoretical microinjections of the neurotracer biodeextran in the substantia nigra, pars reticulata (SNpr), show nigro-tectal pathways connecting SNpr with the same neural substrate of the DPAG rich in neuronal cells immunoreactive for opioid peptides. Labeled neurons of the DLSC and periaqueductal gray matter send inputs with varicosities to ipsi- and contralateral DPAG and ipsilateral SNpr. These findings, in addition to the psychopharmacological evidence for the interaction between opioid and GABAergic mechanisms, offer a neuroanatomical basis of a possible presynaptic opioid inhibition of GABAergic nigro-tectal neurons modulating the fear in aversive structures of the cranial mesencephalon, in a short link, and maybe through a major neural circuit, also in GABA-containing perikarya of nigro-tectal neurons. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Superior colliculus; Periaqueductal gray matter; Fear; Defensive reactions; Nigro-tectal pathways; GABA; β -endorphin; GABA_A receptor

1. Introduction

Gradual increase in the intensity of electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray matter (DPAG), deep layers of the superior colliculus (DLSC), and inferior colliculus elicits, in a progressive manner,

defensive behavior characterized by autonomic reactions, alertness, freezing and escape (Brandão et al. 1988, 1990; Coimbra et al. 1989, 2000; Cardoso et al. 1992, 1994; Coimbra and Brandão 1993, 1997; Melo and Brandão, 1995). It has been established that the brain aversive system (Graeff, 1990), comprising the medial hypothalamus, amygdala, and mesencephalic structures, such as DPAG, DLSC and inferior colliculus, constitutes the main neural substrates for the integration of aversive states in the central nervous system (Olds and Olds, 1963; Adams, 1979). Several lines of evidence clearly

* Corresponding author. Tel.: +55-16-633-3035; fax: +55-16-633-1786.

E-mail address: nccoimbr@fmrp.usp.br (N.C. Coimbra).

implicate GABAergic, serotonergic and opioid-mediated mechanisms in the control of the neural substrates commanding defensive behavior in this aversive system (Brandão et al., 1982; Bandler et al., 1985; Schmitt et al., 1986; Graeff, 1990; Cardoso et al., 1992; Coimbra et al., 1992; Coimbra and Brandão 1993, 1997). Opioid-mediated mechanisms have been a focus of attention in the search for the neural basis of aversion in the midbrain tectum. The effects of opioid agonists depend on the type of receptors with which they interact. It has been shown that μ -agonists function as positive reinforcers and κ -agonists cause aversive states (Mucha and Herz, 1985; Bechara and Vanderkooy, 1987; Bals-Kubik et al., 1989). Morphine has more affinity for μ - than for κ -receptors (Martin, 1983). The DPAG has significant levels of both μ - and κ -receptors (Mansour et al., 1988), and it has been reported that microinjections of low doses of morphine into the dorsal aspects of the periaqueductal gray matter (PAG) of rats attenuate in a dose dependent manner the aversive consequences of this electric stimulation (Jenck et al. 1983, 1986; Brandão et al. 1985, 1990). High doses of morphine, however, when locally injected into this structure cause a behavioral activation together with jumps which shows a great similarity to the reaction observed following electrical stimulation of midbrain tectum or after microinjections of GABA blockers into DPAG (Motta and Brandão, 1993). Opioid mechanisms may be involved in the control of these defensive reactions since morphine microinjections into DPAG produce either antiaversive (10 nmol) or aversive effects (30 nmol), which, respectively, reduced and increased entry and time spent in the open arms and other behaviors associated with risk assessment (Anseloni et al., 1999). Interestingly, microinjections of opioid antagonists, such as naloxone, in ventral aspects of the PAG attenuate the fear elicited by peripheral noxious stimuli (Fanselow and Bolles, 1979a,b) and it has been suggested that opioid mechanisms may be involved in the control of the defensive reactions since peripheral administrations of opioid antagonists cause an increase of aversive thresholds elicited by electrical stimulation of the DPAG and DLSC (Coimbra et al., 1996).

Although midbrain tectum structures, such as DPAG, DLSC and inferior colliculus are involved with fear-related behavioral patterns, it is not clear if these neural substrates responsible for motivational aspects of the fear in the brainstem are also implicated in the defensive patterns that follow painful sensations. The involvement of endogenous opioids in aversive reactions induced by stimulation of the midbrain tectum is also unclear. The present work examines the effects of central administration of naloxone or naltrexone on aversive responses elicited by electrical and chemical stimulation (with central microinjections of GABA_A blocker bicuculline) of dorsal sites of the PAG and DLSC. The neural pathways

and neurons of the midbrain rich in GABA and endogenous opioids were also studied in the present work.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats weighing 250–300 g from the animal facility of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo were used. These animals were housed in individual plexiglass cages and given free access to food and water throughout the experiment. They were kept in the experimental room for 48 h prior to the experiment on a 12 h light/12 h dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) at 23–25°C. All the experiments were performed in accordance with the recommendation of SBNeC (Brazilian Society for Neuroscience and Behavior), which is based on the US National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

2.2. Neuroanatomical procedures

2.2.1. Neurotracing of nigro-tectal pathways and of intrinsic circuitry of the mesencephalic tectum

In twelve animals, previously anesthetized with sodium pentobarbital (45 mg/kg, IP), biotinylated dextran amine (BDA: molecular weight, 3000; Molecular Probes) (Veenman et al., 1992) was microinjected into the tectum or into the tegmentum of the mesencephalon, through a micropipette implanted in the midbrain, aimed at the DLSC or substantia nigra, pars reticulata (SNpr). The upper incisor bar was set at 3.3 mm below the interaural line such that the skull was horizontal between bregma and lambda. The micropipette was introduced vertically using the following coordinates with the bregma serving as the reference for each plane: antero-posterior, –5.8 mm; mediolateral, 0.7 and 2.0 mm; dorsoventral, 4.6 and 8.0 mm, respectively, for DLSC and SNpr. Micropipettes were made with a tip diameter of 40–50 μ m filled with 10% BDA dissolved in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4. BDA was deposited by iontophoresis: electrode tip positive, DC current pulses 5 μ A, 7 s on, 7 s off, over a period of 15 min. After the injection was completed, a protective layer of sterile gelatine foam was laid in the bone cavity above the mesencephalon and the bone was closed with cyanoacrylate glue thickened with dental cement powder. Three to four days after surgery the animal was deeply anesthetized with sodium pentobarbital (45 mg/kg, IP) and perfused transcardially at a rate of 3.5 ml/min with a 20 ml saline followed by 100–200 ml of 2% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. After fixation, the brains were sectioned and the mesencephalon was disconnected from the diencephalon and pons. The midbrains were rinsed in 10 and 20% sucrose

dissolved in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, at 4°C for at least 12 h, in each solution. Tissue fragments were immersed in 2-methylbutane (Sigma), frozen on dry ice (30 s), embedded in Tissue Tek O.C.T. and cut with a cryostat (HM 505 E, Microm). Endogenous peroxidase activity was blocked by preincubation in 50, 70 and 50% ethanol solutions for 15, 20 and 15 min, respectively (Metz et al., 1989). BDA labeling was visualized using the avidin-biotin method (ABC standard Elite kit; Vector Laboratories) with a nickel-enhanced DAB reactions. All steps of the development process have been described by Veenman et al. (1992). The sections were then washed thoroughly with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, mounted on glass slides, counterstained with hematoxylin-eosin and coverslipped with Canada balsam.

2.3. Immunohistochemical procedures

2.3.1. Tissue preparation

The animals were anesthetized with sodium pentobarbital (45 mg/kg, IP) and perfused through the left ventricle. The blood was washed out with cold, oxygen enriched, Ca²⁺-free Tyrods's buffer (40 ml at 4°C) followed by 200 ml ice-cold 4% (w/v) paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.3, for 15 min at a pressure of 50 mmHg. The midbrains were quickly removed and immersed for 4 h in fresh fixative at 4°C. After fixation, the brains were sectioned, disconnecting the mesencephalon from the diencephalon and pons. The midbrains were rinsed in 10 and 20% sucrose dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4), at 4°C for at least 12 h, in each solution. Tissue pieces were immersed in 2-methylbutane (Sigma), frozen on dry ice, embedded in Tissue Tek O.C.T. and cut with a cryostat, at -25°C.

Subsequently the sections were mounted on glass slides coated with chrome alum gelatin to prevent detachment of the sections during the incubation procedure. The sections were immediately processed for immunohistochemistry.

2.3.2. Immunohistochemical staining

The mesencephalic sections were removed from the cryostat and maintained at room temperature for 2 h, and then rinsed in phosphate buffer (0.1 M; pH 7.3) for an additional 30 min. The antiserum was developed in rabbit using β -endorphin bound to keyhole limpet hemocyanin (KLH) with carbodiimide as immunogen. The morphological aspects taken into consideration in order to describe and characterize the perikarya of the opioid neurons were the size and shape of the perikarya, the characteristics of their processes, the topographical distribution patterns of cells and the accuracy of the immunohistochemical staining. The following schedule summarizes the immunohistochemical procedure: (1) preincubate with normal goat serum, diluted 1:50 for 2 h;

(2) rinse with PBS containing 0.3% triton X-100 for 30 min; (3) incubation with β -endorphin (BioGenex, ready to use) antibody (step omitted in control situations); (4) rinse with buffered 0.05% saline, for 30 min; (5) incubation with goat antirabbit IgG (ready-to-use link), biotinylated, for 3 h, in humid chamber; (6) rinse as in the fourth step; (7) incubation with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (ready-to-use HRP label), for 2 h, at 4°C, in humid chamber; (8) rinse as in fourth step; (9) apply 3,3'-diaminobenzidine (DAB); (10) counterstaining with alcoholic Harris' hematoxylin (10%); (11) rinse with distilled water for 30 min; (12) dehydrate with alcohol, cleared with xylene and mount the sections with synthetic Canada balsam.

2.4. Psychopharmacological procedures

2.4.1. Surgery

The animals were anesthetized with sodium pentobarbital (45 mg/kg, IP) and fixed in a stereotaxic frame (David Kopf, USA). A chemitrode made of a stainless steel guide-cannula (o.d. 0.6 mm, i.d. 0.4 mm) glued to a brain electrode was implanted in the midbrain, aimed at the DPAG or the DLSC. The electrode was made of stainless steel wire, insulated except at the cross-section of the tip reaching 1 mm below the lower end of the cannula. The upper incisor bar was set at 3.3 mm below the interaural line such that the skull was horizontal between bregma and lambda. The chemitrode was introduced vertically using the following coordinates with the bregma serving as the reference for each plane: antero-posterior, -5.8 mm; mediolateral, 0.4 mm to DPAG, and 1.2 mm to DLSC; and dorsoventral, 5.0 mm to DPAG and 4.6 mm to DLSC. The chemitrode was fixed to the skull by means of acrylic resin and two stainless steel screws. The electrode wire was connected to a male pin, parallel to the outer end of the cannula. Together, they could be plugged into an amphenol socket at the end of a flexible electrical cable and used for brain stimulation. At the end of the surgery each guide-cannula was sealed with a stainless steel wire to protect it from obstruction.

2.5. Procedure

One week after surgery, the animals were placed in an arena (circular enclosure, 60 cm in diameter and 50 cm high) with the floor divided into 12 sections. This arena was situated in an experimental compartment illuminated with a 40 W fluorescent lamp (350 lx at the arena floor level). The rats were allowed a 10 min period of habituation in the enclosure at the beginning of each session. Afterwards, the brain was electrically stimulated by means of a sine wave stimulator. The stimulation current was monitored by measuring the voltage drop across a 1 K resistor with an oscilloscope (Minipa, MO-1250S).

Brain stimuli (60 Hz) were presented at 1 min intervals with the current intensity increasing by steps of 1.4 μ A (rms) for measurements of the aversive thresholds. Freezing threshold was operationally defined as the lowest intensity producing immobility in two consecutive ascending series of electrical stimulation accompanied by at least two of the following autonomic reactions: urination, defecation, piloerection or exophthalmus. The current intensity producing running (gallop) or jumping in two successive trials was considered to be the escape threshold. Animals with an escape threshold above 200 μ A (rms) were discarded from the experiment.

Immediately after the recording of baseline values the animals were gently wrapped in a cloth, hand-held and received 5 μ g/0.2 μ l of naloxone, naltrexone or saline (NaCl, 0.9%; 0.2 μ l), microinjected into DLSC or in the DPAG. As the cross-section of the tip of the needle reaches 1 mm below the lower end of the guide-cannula, the central administration of drugs was made in the same site in which electrical stimuli were applied. The effects of drug administrations were then evaluated on the aversive thresholds induced by electrical stimulation of the mesencephalic tectum. The effects of these opioid antagonists on the mean incidence of aversive behavioral responses induced by microinjections of bicuculline in the midbrain tectum were also investigated in independent groups of animals. For this, the GABA-A receptor blocker was administered 10 min after microinjection of the opioid antagonists, in the DLSC or in the DPAG. Both microinjections of saline or opioid and GABAergic antagonists were made in the same site of the midbrain tectum. The behavioral aversive responses (crossings, rearings, turnings and jumps) were recorded for 30 min. Each animal received a maximum of two treatments (an opioid antagonist or its vehicle plus bicuculline, or only bicuculline dissolved in saline).

2.6. Histology

Upon completion of the experiments, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital (thiopental, 45 mg/kg bodyweight, IP) and perfused through the left ventricle. The blood was washed out with Tyrod's buffer (40 ml at 4°C) followed by 200 ml ice-cold 4% (w/v) paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.3, for 15 min at a pressure of 50 mmHg. The brains were quickly removed and soaked for 4 h in fresh fixative at 4°C. After fixation, the brains were sectioned, disconnecting the mesencephalon from the diencephalon and pons. The midbrains were rinsed in 10 and 20% sucrose dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.3) at 4°C for at least 12 h, in each solution. Tissue pieces were immersed in 2-methylbutane (Sigma), frozen on dry ice (30 min), embedded in Tissue Tek and cut on a cryostat (HM 505 E, Microm, Zeiss). Subsequently the slices were mounted on glass slides coated

with chrome alum gelatine to prevent detachment and stained with methylene blue in order to localize the positions of the electrode tips according to the Paxinos and Watson atlas (Paxinos and Watson, 1997). Data from rats with electrode tips located outside the DLSC and DPAG were not included in the statistical analysis.

2.7. Statistical analysis

Determinations of statistical significances were made using a non-parametric test (Mann–Whitney *U*-test) as the data were not normally distributed.

2.8. Drugs

In the psychopharmacological study, naloxone (Sigma), naltrexone (Sigma) and bicuculline methiodide (Sigma) were each dissolved in physiological saline (0.9%) shortly before use. Physiological saline also served as vehicle control. The doses used were: 5.0 μ g of naloxone and naltrexone; 40 ng of bicuculline. In the neuroanatomical and immunohistochemical procedures BDA (Molecular Probes), β -endorphin antibody (BioGenex), streptavidin BioGenex kit and 3,3'-diaminobenzidine (Sigma) were used.

3. Results

Eighty four sites in the brainstem were studied in this work. The electrode tips were situated mostly in the DLSC and dorsal periaqueductal gray as illustrated in Fig. 1. The present results show that gradual increases in the intensity of electrical stimulation of the dorsal aspects of the PAG and DLSC of rats induce, in a progressive manner, characteristic aversive responses such as alertness, freezing and escape. Initially, in successive ascendant series of electrical stimulation, the animals interrupt their ongoing behavior, manifesting arousal. Next, the rodents present immobility accompanied by neurovegetative reactions. Thereafter, they engage in vigorous escape attempts or jump attacks. Microinjections of the GABA-A receptor blocker bicuculline into the midbrain tectum elicited freezing followed by an explosive reaction of escape, with rapid running, jumps and turns, which lasted approximately 20 min.

Central microinjections of the opioid antagonists caused a significant increase in the aversive thresholds. Naloxone caused an increase of the freezing (Mann–Whitney *U*-test: $U=0.0$, $p<0.0001$) and escape (Mann–Whitney *U*-test: $U=0.0$, $p<0.0001$) thresholds (Fig. 2(A)). Similar findings were observed following the microinjections of naltrexone. This agent caused a significant increase in the freezing (Mann–Whitney *U*-test: $U=5.5$, $p<0.01$) and escape (Mann–Whitney *U*-test: $U=5.0$, $p<0.01$) thresholds (data illustrated in Fig. 2(B)).

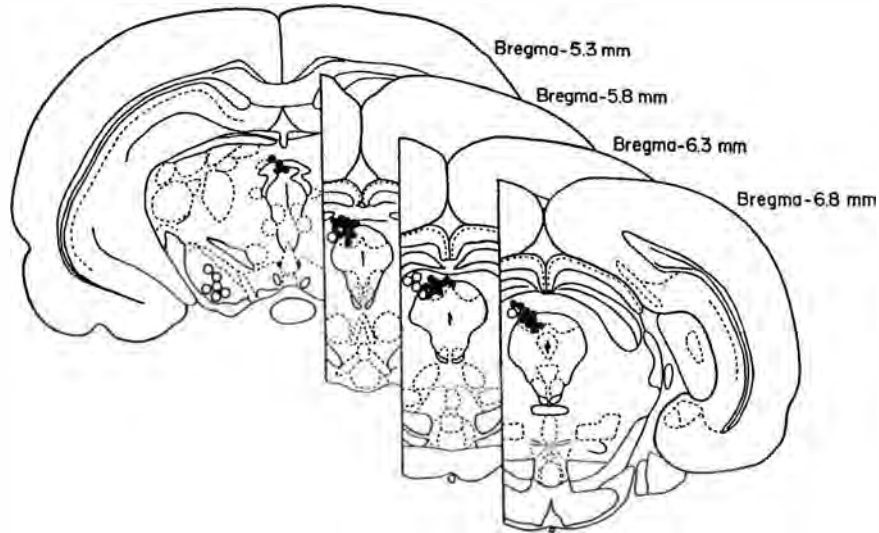


Fig. 1. Location of sites of electrical stimulation of the midbrain tectum (closed circles) and sites (open circles) in which iontophoretic microinjections of biotinylated dextran amine were made, depicted in diagrams from the Paxinos and Watson atlas. In the mesencephalic tectum, the number of points is apparently less than the total number of rats used (84) because several points coincide.

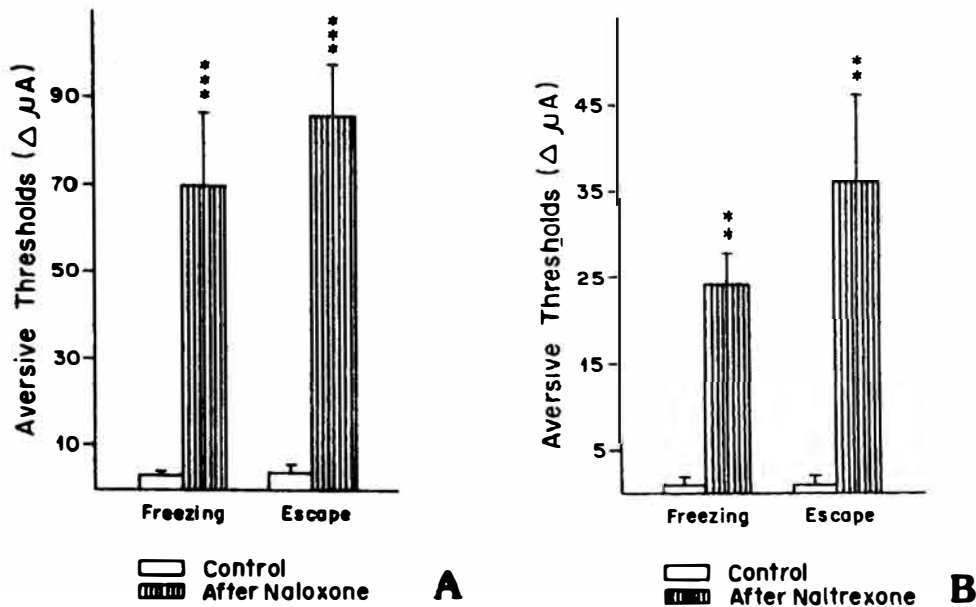


Fig. 2. Effect of central administration of saline (NaCl; 0.9%), naloxone (A) or naltrexone (B), at a dose of 5 µg/0.2 µl, on aversive thresholds elicited by electrical midbrain tectum stimulation. Increases in mean freezing and escape thresholds are reported as individual differences (Δ) between the values measured just before and 10 min after drug administration. Columns represent the means and bars the SEM. $N=16$, for saline and naloxone and $N=8$, for naltrexone; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ as compared to the control, Mann–Whitney U -test.

Pretreatment with central microinjections of naloxone or naltrexone, 10 min before chemical stimulation of the midbrain tectum with bicuculline, caused a significant decrease in the fear-related responses elicited by this GABA antagonist. Naloxone reduced the number of crossings (Mann–Whitney: $U=7.5$; $p=0.01$), jumps (Mann–Whitney: $U=4$, $p=0.001$), turns (Mann–Whitney: $U=8.5$; $p=0.01$) and rearings (Mann–Whitney: $U=10$; $p<0.05$). Similar results were obtained with naltrexone. Pretreatment with naltrexone of the DPAG and DLSC

also induced a decrease in the number of crossings (Mann–Whitney: $U=1$; $p=0.001$), jumps (Mann–Whitney: $U=4$; $p=0.001$) and turns (Mann–Whitney: $U=8$; $p=0.01$). Pretreatment with local microinjections of saline before GABA-A blockade in the dorsal mesencephalon with bicuculline did not cause significant differences when compared to controls ($p>0.05$ in all cases). These data are illustrated in Fig. 3.

The iontophoretic microinjections of BDA in the SNpr, showed positive axons in the DLSC/DPAG, sug-

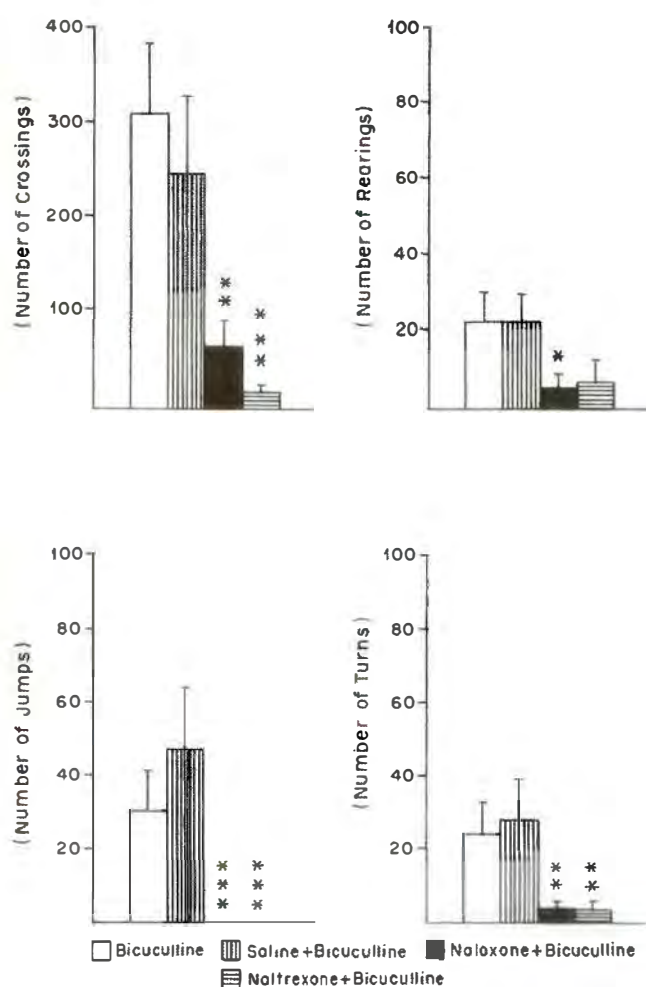


Fig. 3. Mean incidence of aversive behavioral responses induced by microinjections of bicuculline in the midbrain tectum (MT) before and after the unilateral infusion of saline (NaCl: 0.9%), naloxone (5 μ g/0.2 μ l) or naltrexone (5 μ g/0.2 μ l) and bicuculline (40 ng/0.2 μ l) in the mesencephalic tectum. The columns represent the means and the bars the SEM. The open columns represent the behavior recorded after the local (MT) injections of bicuculline (40 ng/0.2 μ l) dissolved in saline. The hatched columns indicate the behavioral responses after local microinjections of the saline (0.2 μ l), naloxone or naltrexone plus bicuculline. $N=8$, * $p<0.05$; ** $p\leq 0.01$, *** $p\leq 0.001$, as compared with the control, Mann–Whitney U -test.

gesting a connective pathway between SNpr and neurons of the dorsal mesencephalon involved with the generation and elaboration of fear and defensive behavior (Fig. 4(A)). In addition, the neurotracing showed positive neurons in DLSC and DPAG with varicosities that send inputs back to the SNpr (Figs. 4 and 5). Microinjections of this anterograde and retrograde neurotracer in the DLSC showed neurons, axonal connections with varicosities and synapses with neuronal cells located in dorsal midbrain tectum both ipsi- and contralaterally to the sites in which biodeextran was microinjected (Fig. 6). Cells with similar characteristics were found in the SNpr (data not shown).

The immunohistochemical staining of the aversive

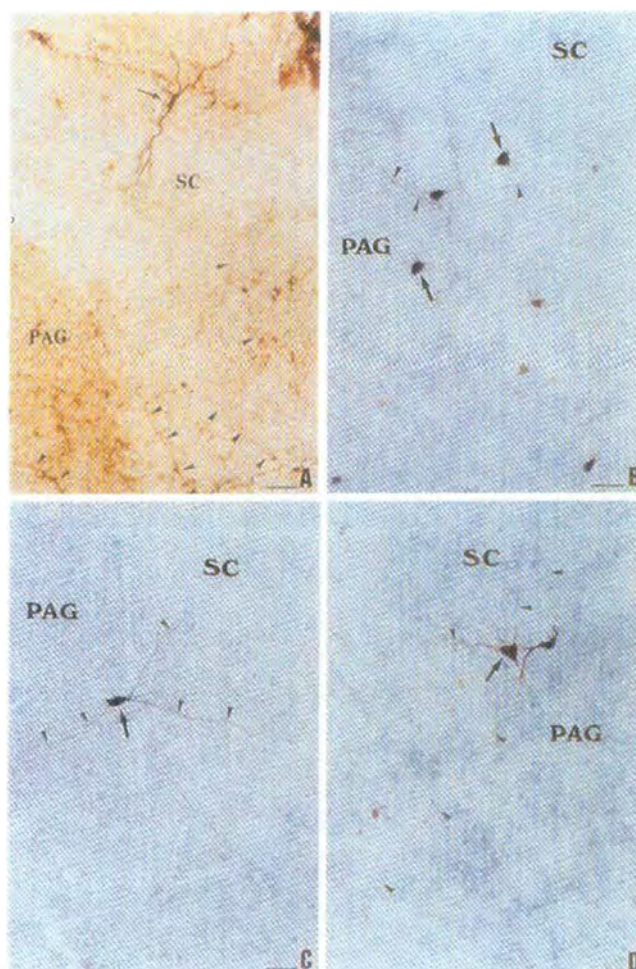


Fig. 4. Photomicrographs of transversal sections of the dorsal mesencephalon of the *R. norvegicus* at the level of the superior colliculus (SC), showing reciprocal neural pathways connecting substantia nigra, pars reticulata (SNpr) and the aversive neural substrate of the dorsal mesencephalon, in cranial aspects. These pathways were traced with the anterograde–retrograde neurotracer biotinylated dextran amine (10%) iontophoretically microinjected into SNpr. Arrows point out neurons located in the intermediated (A) and deep layers (B) and (D) of the superior colliculus (DLSC) and in the dorsolateral column (C) of the periaqueductal gray matter (DPAG). Arrowheads point to the nigro-tectal pathway (A) and axons rich in varicosities of neurons situated in DPAG and DLSC ((B)–(D)). Note that some of these neurons send inputs to dorsal aspects of the PAG and DLSC ((B) and (C)) and send projections back to the SNpr (D). Bars=188.2 μ m in (A); 47.1 μ m in (B), (C) and (D). PAG-Periaqueductal gray matter; SC-Superior colliculus.

structures of the dorsal mesencephalon showed β -endorphin-containing neurons located in the DLSC and DPAG. The axons of these neurons are rich in varicosities and there are more similar projections labeled in caudal PAG than in the DLSC (Figs. 7 and 8).

4. Discussion

The electrical stimulation of the mesencephalic tectum has been described as aversive in animals (Dean et al.,

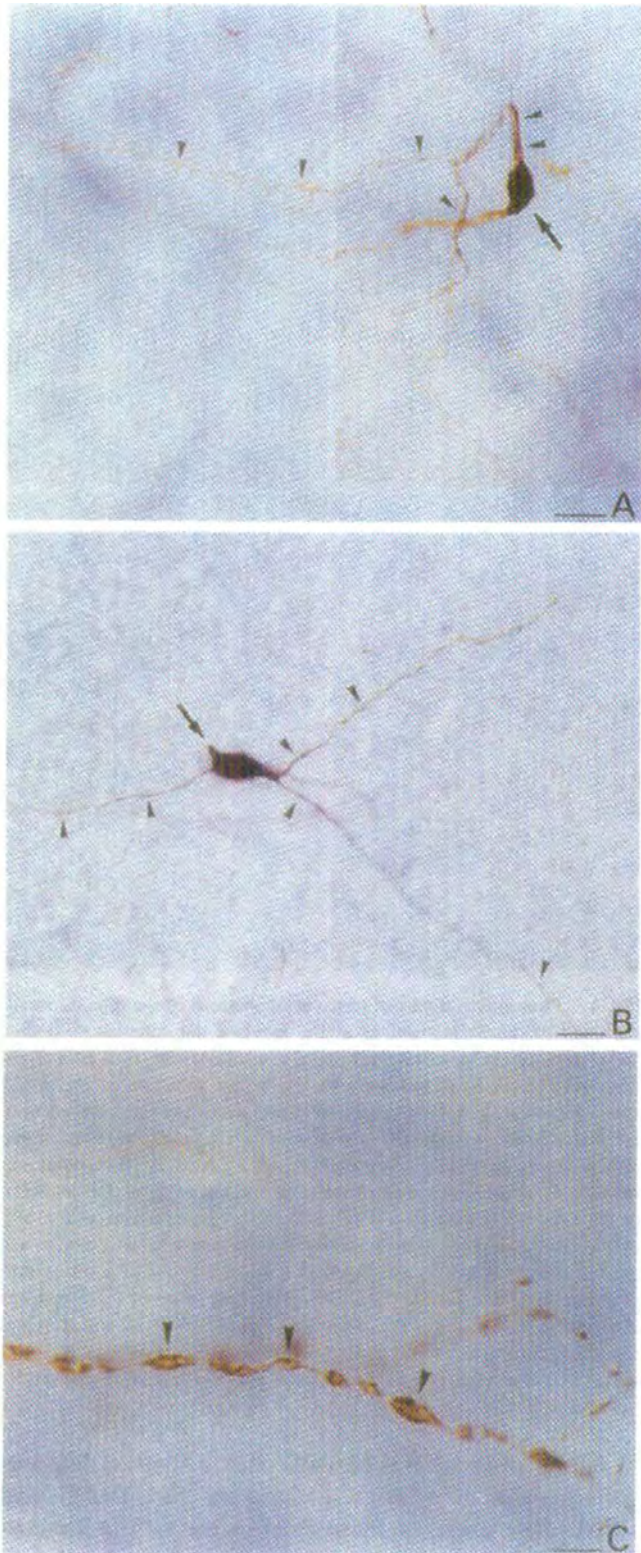


Fig. 5. Photomicrographs of cross-sections of the midbrain tectum of *R. Norvegicus*. Arrows point to neurons with varicosities located in the deep layers of the superior colliculus (A) and in the dorsolateral column of the periaqueductal gray matter (B). Arrowheads point to neuronal connections with varicosities (magnified in (C)). Bars=24 μm in (A) and (B); 9.6 μm in (C).

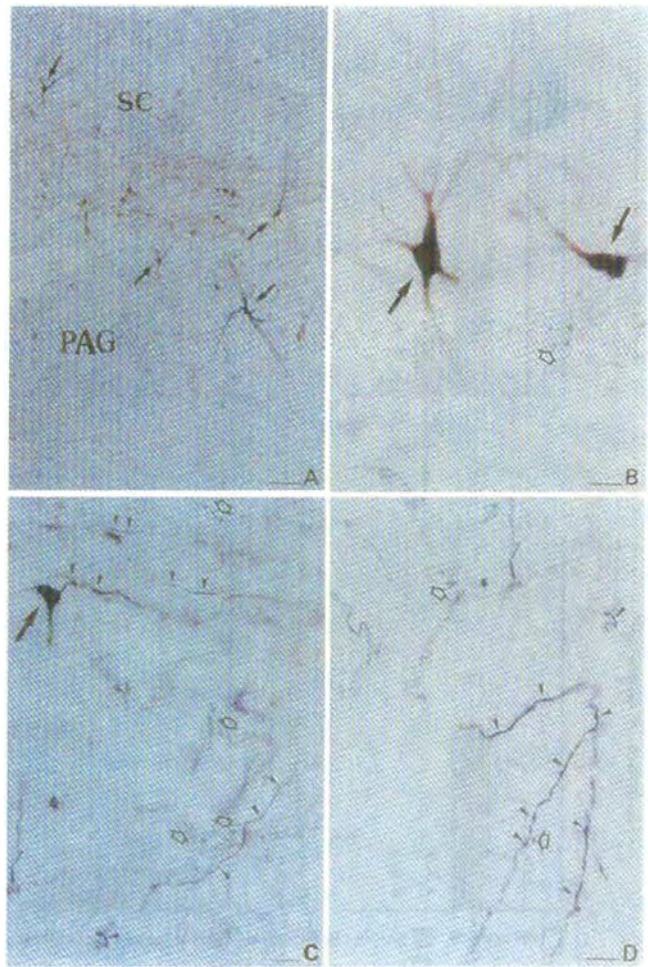


Fig. 6. Photomicrographs of cross-sections of the midbrain tectum of *R. norvegicus*. Closed arrows point to neurons with varicosities located in the deep layers of the superior colliculus (SC) and in the dorsal columns of the periaqueductal gray matter (PAG), identified after microinjections of biotinylated biodextran in the midbrain tectum. Neurons magnified in (B) send axons to the same and opposite side of the midbrain tectum in which microinjections of the neurotracer were made. Arrowheads point to neuronal connections with varicosities to the dorsomedial (A) and dorsolateral (B) PAG on the opposite side of the microinjections of the biodextran. Open arrows point to thin axons and terminal buttons located in the deep layers of the superior colliculus (B) and in dorsal columns of the PAG ((C) and (D)). Bars=95.92 μm in (A); 24 μm in (B), (C) and (D).

1988; Leão-Borges et al., 1988; Coimbra 1991, 1995; Cardoso et al. 1992, 1994; Brandão et al., 1994; Melo and Brandão, 1995) and in man (Nashold et al., 1969). Freezing and flight behavior are widely described in the literature as fear-related responses (Coimbra et al. 1989, 1992; Coimbra and Brandão 1993, 1997). The present results show that electrical and chemical stimulation of the midbrain tectum induced alertness, freezing and vigorous escape behavior. Similar aversive responses, along with autonomic reactions resembling a defense behavior, have also been observed following blockade of GABA-A receptors in the aversive structures of the mesen-

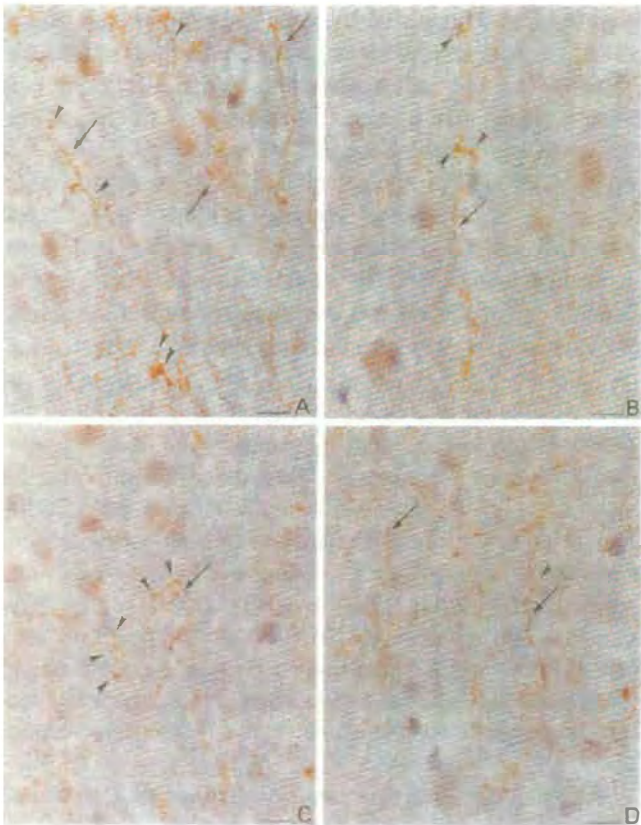


Fig. 7. Photomicrographs of cross-sections of the midbrain tectum of *R. norvegicus*. Arrows point to immunolabeled neuronal fibers positive to β -endorphin, situated in dorsomedial (A), dorsolateral (B), ventral (C) and ventrolateral (D) columns of the periaqueductal gray matter. Arrowheads point to immunolabeled fibers, rich in varicosities, of β -endorphin containing neurons. Bars=24 μ m.

cephalic tectum (Coimbra et al. 1989, 1992; Coimbra 1991, 1995; Coimbra and Brandão, 1993).

In the present study we examined the role played by opioid mechanisms in the neural substrates mediating aversive states in the dorsal mesencephalon. The results obtained clearly show that narcotic antagonists attenuate the behavioral responses elicited by electrical stimulation of aversive sites located in the dorsal PAG and DLSC. The significant increase of the freezing and escape thresholds that follow midbrain tectum stimulation suggests that endogenous opioids such as enkephalins and endorphins can exert a modulatory effect on neural substrates of fear at the mesencephalic level.

Other studies reported recently demonstrated that similar results can be obtained with peripheral administration of opioid antagonists on aversive thresholds elicited by stimulation of the dorsal mesencephalon, in cranial aspects (DPAG and DLSC) (Coimbra et al., 1996), and in more caudal level (inferior colliculus), in which local microinjections of opioid antagonists also caused antiaversive effects (Coimbra et al., 2000). In addition, in the dorsal midbrain, microinjections of naltrexone in the central nucleus of the inferior colliculus caused a

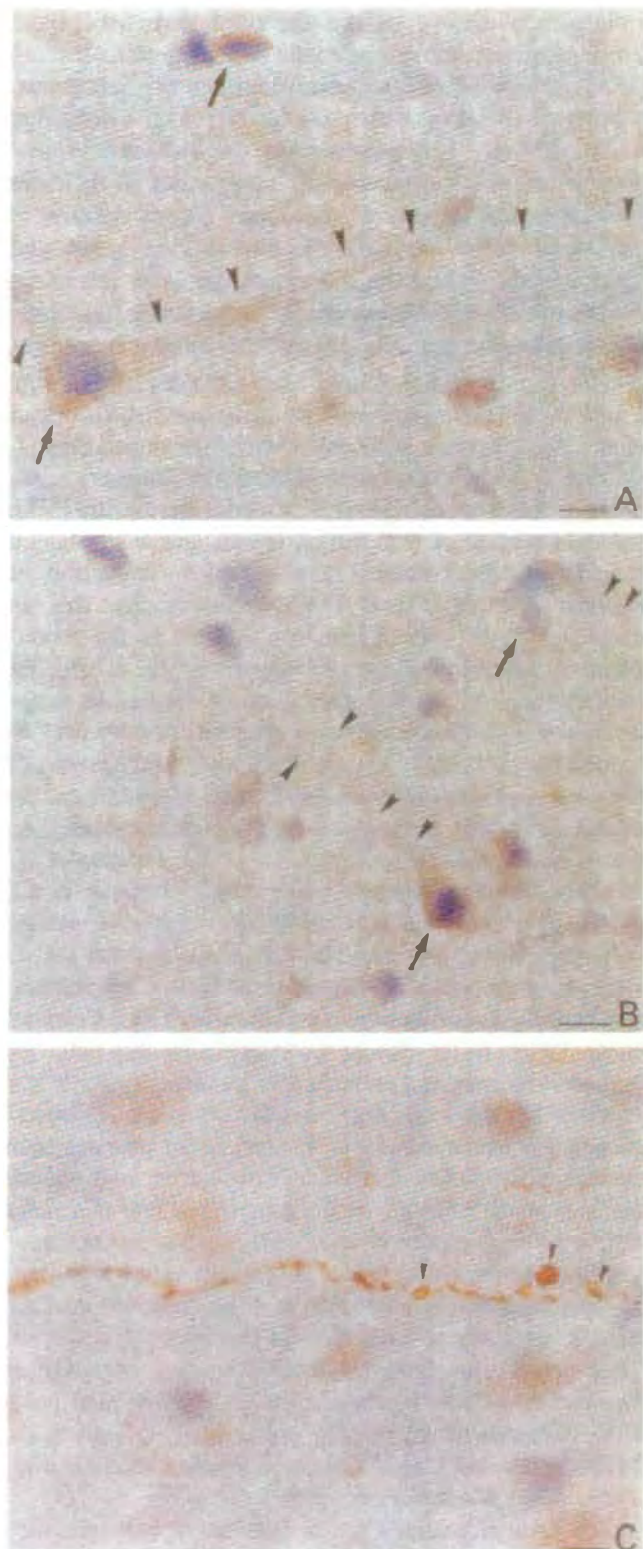


Fig. 8. Photomicrographs of cross-sections of the midbrain tectum of *R. norvegicus*. Arrows point to immunolabeled neurons positive to β -endorphin, situated in the deep layers of the superior colliculus (A) and in the dorsal columns of the periaqueductal gray matter (B). Arrowheads point to immunolabeled fibers to β -endorphin. Axon with varicosities in ventral periaqueductal gray matter, of β -endorphin containing neurons was magnified in (C). Bars=9.6 μ m.

greater antiaversive effect as compared with local administration of naloxone in the superior colliculus and DPAG as compared to central effect of naltrexone, although naltrexone had a greater effect on bicuculline microinjections. It is possible that the local microinjections of these pharmacological antagonists in different sites of cranial aspects of the dorsal mesencephalon in the continuum DLSC/DPAG controlling fear and defense may explain the differences between the intensity of the effect of these drugs. In fact, the functional neuroanatomy and the target of neurotransmitters involved in the elaboration of fear in the dorsal midbrain and adjacent nuclei are not precisely uniform (Cardoso et al., 1992; Motta and Brandão, 1993; Terra and Garcia-Cairasco, 1994; Maissonette et al., 1996; Coimbra et al., 2000; Brandão et al., 2001). Even considering the PAG, for example, there was in its dorsal and ventrolateral aspects the involvement of a complex interaction of cholinergic, opioid and GABAergic mechanisms in descending pain modulation, as well as in the modulation of tonic immobility, an inborn defensive behavior characterized by a temporary state of reversible motor inhibition as a last resource of defense used by prey to reduce the probability of continued attack on the part of the predator (Monassi et al. 1997, 1999). In addition, the neural circuit of the corpora quadrigemina controlling fear is not similar (Kilpatrick et al., 1982; DiScala et al., 1983a,b; Coimbra and Brandão, 1993; Brandão et al., 2001). We observed that while the explosive escape behavior elicited by electrical stimulation of the DLSC stops as soon as the mesencephalic tectum stimulation was switched off (Coimbra and Brandão, 1993; Coimbra et al., 1996), in the caudal mesencephalon this behavior is more vigorous and enhanced in its intensity for a few seconds during and immediately after the electrical stimulation of the inferior colliculus, a structure in which endogenous opioids, GABA and excitatory amino acids are also involved in the modulation of the fear (Coimbra et al., 2000; Brandão et al., 2001). These findings suggest the presence of a neural link in the inferior colliculus in which action potentials may reverberate, increasing the intensity and duration of the aversive response. This circuit may facilitate the elaboration not only of fear but also of audiogenic seizures, epilepsy and postictal analgesia in the inferior colliculus (Cardoso et al., 1994; Terra and Garcia-Cairasco, 1994; Coimbra et al., 2000, 2001; Moraes et al., 2000).

The present findings are in agreement with previous reports that demonstrated opioid involvement in the freezing threshold elicited by peripheral nociceptive stimulation. The freezing behavior that follows painful electric shock was found to increase when the animal was pretreated with the opiate antagonist naloxone (Fanselow and Bolles, 1979a,b). In addition, the freezing behavior that occurs following footshock was found to increase in rats in which naloxone was injected into the

ventrolateral regions of the PAG (Hammer and Kapp, 1986). In the present work, both central administration of naloxone and naltrexone increased the freezing and escape thresholds induced by central midbrain stimulation, at the level of the DPAG and DLSC. This fact suggests an opioid control of fear in the mesencephalic tectum. A recent report showed evidence that central microinjections of morphine in the inferior colliculus, caused opposite effect on neural substrates of aversion, depending on the dose. Low doses of morphine which activate μ -receptors produce antiaversive effects, and pro-aversive effects result from the activation of κ -receptors by higher doses of morphine (Cardoso et al., 1992). On the other hand, microinjections of naloxonazine, a μ_1 -opioid antagonist, into the inferior colliculus also cause antiaversive effect (Coimbra et al., 2000). However, as the present results were obtained with non-specific pharmacological antagonists (naloxone and naltrexone) microinjected in more cranial aversive substrates of the dorsal midbrain, other opioid receptors may be involved in the modulation of fear through opioid antagonism on neurons of the cranial mesencephalic tectum responsible for the elaboration of defensive behavior.

While those previous studies examined the opioid effect on aversive reactions elicited at the level of inferior colliculus, the present results show the effect of the blockade of opioid receptor on aversive reactions elicited by electrical stimulation of the DLSC and dorso-lateral PAG. The defensive behavior recorded at two different intensities (at freezing and escape threshold) and obtained after fear elicitation by electrical stimulation of the DPAG and of the DLSC can be under endogenous opioid control. To explain the antiaversive effect of the opioid blockade in the mesencephalic tectum seen in the present results and in other findings reported previously (Coimbra et al. 1996, 2000), we might consider a possible interaction between opioid and GABAergic mechanisms in the dorsal mesencephalon. Psychopharmacological evidence of opioid inhibitory inputs on GABAergic neurotransmission in the mesencephalic tectum was presently demonstrated and corroborated by the finding of opioid-positive neurons in the same substrates in which GABAergic neurons of the substantia nigra send inhibitory connections. In support of this hypothesis, electrical stimulation of the PAG of the midbrain increased the immunoreactivity to β -endorphin and met-enkephalin in the ventriculo-cisternal perfusate (Bach and Yaksh, 1995). In the present work we found not only β -endorphin positive neurons in the aversive structures of the dorsal mesencephalon, in its cranial aspects, but also β -endorphin-containing fibers spreading widely in the DLSC and mainly in DPAG. In fact, there is evidence that, in the brain, many β -endorphin-containing tracts project to the DPAG (Finley et al., 1981; Ibata et al., 1985; Sim and Joseph, 1991). These neurotransmit-

ters may exert an inhibitory action on GABAergic inputs to the mesencephalic tectum, modulating the defensive behavior elicited from midbrain structures whose stimulation causes aversive responses. Psychopharmacological and neurophysiological evidences of GABAergic inhibitory pathways in these mesencephalic structures were recently reported in the literature (Coimbra et al. 1989, 1998; Coimbra and Brandão, 1993; Maissonnette et al., 1996), and corroborate the neuroanatomical findings of this pathway in the present study. However, the present results do not exclude the participation of other GABAergic influences, e.g. from pedunculopontine nucleus (Childs and Gale, 1984) and from substantia nigra, but mainly connected to the intermediated layers of the superior colliculus (Gerfen et al., 1982), since it has been demonstrated that the reduction of collicular GABA by substantia nigra lesions is about 25% (Kilpatrick et al., 1982). As a matter of fact, the opiate blockade on inhibitory GABAergic inputs may justify the antiaversive effect of opioid antagonists on behavioral responses elicited from midbrain tectum stimulation. However, evidence indicates that opioid antagonists may also have effects on gamma-aminobutyric acid (Sawynok et al., 1979; Moroni et al., 1982) and a recent finding indicates that the effects of naltrexone may be at least partially mediated by an action at the GABA-linked chloride channel, rather than directly at the GABA receptor (Gewiss et al., 1994).

Our present results point to an antiaversive action of opioid antagonists naloxone and naltrexone on the aversive consequences of the electrical and chemical stimulation of the dorsal mesencephalon. Considering the hypothesis in which endogenous opioid inputs cause inhibitory effects in their synaptic terminals, the effects observed in this work may be due to a presynaptic inhibition of β -endorphin-immunoreactive neurons on GABAergic terminals at mesencephalic level. However, we might also consider the possibility that opioid input may act on the cell bodies of GABAergic neurons. The similarity between the morphology of the β -endorphin-containing fibers of the dorsal mesencephalon and the processes of the mesencephalic neurons connected with the substantia nigra suggests that β -endorphin-containing neurons may exert their influence on DPAG/DLSC neurons, in a short link, and, maybe through a major circuit, also in GABA-containing perikarya of nigro-tectal neurons, causing the antiaversive action of opioid receptor antagonists. In fact, considering the bi-directional transport of biodextran, neurons with varicosities of the dorsolateral columns of the PAG may send inputs toward ventral aspects of this structure and DLSC, and very similar neuronal cells of the DLSC located close to dorsolateral PAG may send axons with varicosities to the dorsolateral column of PAG and effectively to SNpr. These particular findings were corroborated by microinjections of biodextran in the mesencephalic tectum

showing neural connections between neurons of the DLSC and DPAG and neurons located in DLSC and dorsomedial and dorsolateral columns of the PAG situated ipsi- and contralaterally to the sites of microinjections of the neurotracer. However, other opioid interneurons may be involved in this circuitry. In fact, at least in the ventrolateral PAG, reciprocal inhibitory relationship between GABA and enkephalins has been considered (Williams et al., 1995), and a recent report provided direct experimental evidence for an opioid-induced inhibition of tonic GABA release in the PAG, in more ventral aspects (Stiller et al., 1996). It is possible that similar neural circuitry may be involved in the dorsal aspects of the PAG and in the DLSC, controlling the defensive behavior. Corroborating this hypothesis the interaction between opioid pathways and GABAergic mechanisms in the mesencephalon controlling pain that follows aversive behavior was already described in the literature, and μ -opioid receptor may be involved in this neural network, since microinjections of naltrexone and cys^2 , tyr^3 , orn^5 , pen^7 -amide (a selective μ -opioid receptor antagonist) reversed the antinociception produced by GABA antagonism in the midbrain PAG (Roychowdhury and Fields, 1996). In addition, recent reports discussed evidences that point to a multi-component modulation of aversion in the midbrain tectum, in which the authors considered an association of GABA, opioid and excitatory amino acid mechanisms in the control of defensive behavior organized in the dorsal midbrain (Brandão et al. 1994, 1999). Electrical stimulation of the dorsal midbrain may partially activate these circuits and this neural circuitry working at different steps of the aversion may elaborate the defensive behavior. Some of these circuits may overlap, and the interactions between opioid peptides and GABA, as discussed in the present work, or between opioid and glutamate or serotonin and GABA or excitatory aminoacids, as suggested in previous reports (Urca et al., 1980; Tao and Auerbach, 2000), are interesting evidences for the presence of integrative circuits in the elaboration of fear and fear-induced analgesia in the brain.

Acknowledgements

This work was sponsored by FAPESP (proc. 95/3604-4, 95/6199-3, 96/8574-9, 98/11187-2 to N.C. Coimbra; 95/8418-4 to N.C. Coimbra and L.A. da Silva; 96/0548-9 to S.A.L. Correa) and FAEP (proc. 71/94, 537/95, 278/96 and 355/2000 to N.C. Coimbra). G.C.D. Eichenberger and R.Y. Maruoka were recipients of scholarship from FAPESP (proc. 95/5085-4) and PIBIC-CNPq (proc. 97.1.487.17.0), respectively; L.A. da Silva was the recipient of a fellowship (JP-3) from FAPESP (proc. 96/06946-6). S.J. Ribeiro and L. Castellan-Baldan are recipients of Master fellowship from CAPES (proc.

DS103/00-4) and FAPESP (proc. 00/08953-7), respectively. M.Y. Osaki is the recipient of Master fellowship from FAPESP (01/03683-2). N.C. Coimbra is the recipient of a research fellowship from CNPq (proc. 300772/97-1). The authors are grateful to V. Mazzucato Jr., I.R. Violante, J.A. Malafatti and J.R. Espreafico. J.R. Espreafico was the recipient of a scholarship (TT-2) from FAPESP (97/10440-4). The authors also thank Dr Constance Oliver for reviewing the manuscript.

References

- Adams, D.B., 1979. Brain mechanisms for offense, defense and submission. *Behavioral Brain Sciences* 2, 201–241.
- Anseloni, V.C., Coimbra, N.C., Morato, S., Brandão, M.L., 1999. A comparative study of the effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray and nucleus accumbens of rats submitted to the elevated plus-maze test. *Experimental Brain Research* 129, 260–268.
- Bach, F.W., Yaksh, T.L., 1995. Release into ventriculo-cisternal perfusate of β -endorphin and met-enkephalin-immunoreactivity: effects of electrical stimulation in the Arcuate nucleus and periaqueductal gray of the rat. *Brain Research* 690, 167–176.
- Bals-Kubik, R., Herz, A., Shippenberg, T.S., 1989. Evidence that the aversive effects of opioid antagonists and κ -agonists are centrally mediated. *Psychopharmacology* 98, 203–206.
- Bandler, R., DePaulis, A., Vernes, M., 1985. Identification of midbrain neurons mediating defensive behaviour in the rat by microinjections of excitatory amino acids. *Behavioural Brain Research* 15, 107–119.
- Bechara, A., Vanderkooy, D., 1987. Opposite motivational effects of endogenous opioids in brain and periphery. *Nature* 314, 533–534.
- Brandão, M.L., Aguiar, J.C., Graeff, F.G., 1982. GABA mediation of the antiaversive action of the minor tranquilizers. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 16, 397–402.
- Brandão, M.L., Cabral, A.M., Vasquez, E.C., Schmitt, P., 1985. Chloridiazepoxide and morphine reduce pressor response to brain stimulation in awake rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 23, 1069–1071.
- Brandão, M.L., Cardoso, S.H., Melo, L.L., Motta, V., Coimbra, N.C., 1994. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 18, 339–346.
- Brandão, M.L., Coimbra, N.C., Leão-Borges, P.C., 1990. Effects of morphine and midazolam on reactivity to peripheral noxious and central aversive stimuli. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 14, 495–499.
- Brandão, M.L., Coimbra, N.C., Osaki, M.Y., 2001. Changes in the auditory-evoked potentials induced by fear-evoking stimulations. *Physiology and Behavior* 72, 365–372.
- Brandão, M.L., Anseloni, V.Z., Pandossio, J.E., de Araújo, J.E., Castilho, V.M., 1999. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23, 863–875.
- Brandão, M.L., Tomaz, C., Leão-Borges, P.C., Coimbra, N.C., Bagri, A., 1988. Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. *Physiology and Behavior* 44, 361–365.
- Cardoso, S.H., Coimbra, N.C., Brandão, M.L., 1994. Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. *Behavioural Brain Research* 63, 17–24.
- Cardoso, S.H., Melo, L.L., Coimbra, N.C., Brandão, M.L., 1992. Opposite effects of low and high doses of morphine on neuronal substrates of aversion in the inferior colliculus. *Behavioural Pharmacology* 3, 489–495.
- Childs, J.A., Gale, K., 1984. Circling behavior elicited from the pedunculo-pontine nucleus — Evidence for the involvement of hindbrain GABAergic projections. *Brain Research* 304, 387–391.
- Coimbra, N.C., 1991. Influence of GABAergic nigrocollicular pathways on aversive behaviour induced by electrical and chemical stimulation of the mesencephalic tectum of *Rattus norvegicus* (*Rodentia, Muridae*). MS thesis (in Portuguese), Faculty of Philosophy, Sciences and Literature of Ribeirão Preto of the University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brasil, pp. 1–160.
- Coimbra, N.C., 1995. Identification of opioid and serotonergic neurons of the mesencephalic tectum and their role on antinociception induced by aversive stimulation of the midbrain, Thesis (in Portuguese), Faculty of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brasil, pp. 1–119.
- Coimbra, N.C., Brandão, M.L., 1993. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. *Behavioural Brain Research* 59, 131–139.
- Coimbra, N.C., Brandão, M.L., 1997. Effects of 5-HT₂ receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray matter. *Behavioural Brain Research* 87, 97–103.
- Coimbra, N.C., Eichenberger, G.C.D., Gorchinski, R.T., Maisonnette, S.S., 1996. Effects of the blockade of opioid receptor on defensive reactions elicited by electrical stimulation within the deep layers of the superior colliculus and DPAG. *Brain Research* 736, 348–352.
- Coimbra, N.C., Freitas, R.L., Savoldi, M., Castro-Souza, C., Segato, E.N., Kishi, R., Weltson, A., Resende, G.C.C., 2001. Opioid neurotransmission in the post-ictal analgesia: Involvement of U1-opioid receptor. *Brain Research* 903, 216–221.
- Coimbra, N.C., Kawasaki, M.C., Ciscato Jr, J.G., Cardoso, S.H., Corrêa, S.A.L., 1998. Nigro-tectal pathway: neuroanatomy and role on defensive behavior elicited by midbrain tectum stimulation. *Society for Neuroscience Abstracts* 24, 1930–1930.
- Coimbra, N.C., Osaki, M.Y., Eichenberger, G.C.D., Ciscato, J.G. Jr., Jucá, C.E.B., Biojone, C.R., 2000. Effects of opioid receptor blockade on defensive behavior elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior colliculus in *Rattus norvegicus* (*Rodentia, Muridae*). *Psychopharmacology* 152, 422–430.
- Coimbra, N.C., Leão-Borges, P.C., Brandão, M.L., 1989. GABAergic fibers from substantia nigra, pars reticulata modulate escape behavior induced by midbrain central gray stimulation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 22, 111–114.
- Coimbra, N.C., Tomaz, C., Brandão, M.L., 1992. Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum. *Behavioural Brain Research* 50, 77–83.
- Dean, P., Mitchell, I.J., Redgrave, P., 1988. Responses resembling defensive behavior produced by microinjections of glutamate into superior colliculus of rats. *Neuroscience* 24, 501–510.
- DiScala, G., Jenck, F., Sandner, G., Schmitt, P., 1983a. Involvement of GABA at the levels of mesencephalic central gray and medial hypothalamus in the elicitation of escape. *Behavioral Brain Research* 8, 239–239.
- DiScala, G., Schmitt, P., Karli, P., 1983b. Unilateral injection of GABA agonists in the superior colliculus: asymmetry to tactile stimulation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 19, 281–285.
- Fanselow, M.S., Bolles, R.C., 1979a. Triggering of the endorphin analgesia reaction by a cue previously associated with shock. Reversal by naloxone. *Bulletin of the Psychonomic Society* 14, 88–90.
- Fanselow, M.S., Bolles, R.C., 1979b. Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 93, 736–744.
- Finley, J.C.W., Lindstrom, P., Petrusz, P., 1981. Immunocytochemical localization of β -endorphin-containing neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology* 33, 28–42.
- Gerfen, C.R., Staines, W.A., Arbuthnott, G.W., Fibiger, H.C., 1982.

- Crossed connections of the substantia nigra in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 207, 283–303.
- Gewiss, M.V., Marley, R.J., Thordike, E.B., Goldberg, S.R., Schindler, C.W.M., 1994. GABA receptor-linked chloride channels and the behavioral effects of naltrexone in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 49, 589–597.
- Gräff, F.G., 1990. Brain defense systems and anxiety. In: Roth, M., Burrow, G.D., Noyes, R. (Eds.), *Handbook of Anxiety*, vol. 3. Elsevier, New York, pp. 307–354.
- Hammer, G.D., Kapp, B.S., 1986. The effects of naloxone administered into the periaqueductal gray on shock-elicited freezing behavior in the rat. *Behavioral Neural Biology* 46, 189–195.
- Ibata, Y., Kawakami, F., Okamura, H., Obata-Tsuto, H.L., Morimoto, N., Zimmerman, E.A., 1985. Light and electron microscopic immunocytochemistry of β -LPH-like immunoreactive neurons in the arcuate nucleus and surrounding areas of the rat hypothalamus. *Brain Research* 341, 233–242.
- Jenck, F., Schmitt, P., Karli, P., 1983. Morphine applied to the mesencephalic central gray suppresses brain stimulation escape. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 19, 301–308.
- Jenck, F., Schmitt, P., Karli, P., 1986. Morphine injected into the periaqueductal gray attenuates brain stimulation-induced effects: an intensity discrimination study. *Brain Research* 378, 274–284.
- Kilpatrick, I.C., Collingridge, G.L., Starr, M.S., 1982. Evidence for the participation of nigrotectal γ -aminobutyrate-containing neurones in striatal and nigral-derived circling in the rat. *Neuroscience* 7, 207–222.
- Leão-Borges, P.C., Coimbra, N.C., Brandão, M.L., 1988. Independence of aversive and pain mechanisms in the dorsal periaqueductal gray matter of the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 21, 1027–1031.
- Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, M.E., Akil, H., Watson, S.J., 1988. Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends in Neuroscience* 11, 308–314.
- Martin, W.R., 1983. Pharmacology of opioids. *Pharmacological Reviews* 35, 283–323.
- Maisonnette, S.S., Kawasaki, M.C., Coimbra, N.C., Brandão, M.L., 1996. Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Research Bulletin* 40, 93–98.
- Melo, L. L., Brandão, M.L., 1995. Role of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in the aversion induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 51, 317–321.
- Metz, C.B., Schneider, S.P., Fyffe, E.W., 1989. Selective suppression of endogenous peroxidase activity: application for enhancing appearance of HRP-labeled neurons in vitro. *Journal of Neuroscience Methods* 26, 181–188.
- Monassi, C.L., Leite-Panissi, C.R.A., Menescal-de-Oliveira, L., 1999. Ventrolateral periaqueductal gray matter and the control of tonic immobility. *Brain Research Bulletin* 50, 201–208.
- Monassi, C.L., Hoffmann, A., Menescal-de-Oliveira, L., 1997. Involvement of the cholinergic system and periaqueductal gray matter in the modulation of tonic immobility in the guinea pig. *Physiology and Behavior* 62, 53–59.
- Moraes, M.F.D., Del Vecchio, F., Terra, V.C., Garcia-Cairasco, N., 2000. Time evolution of acoustic ‘information’ processing in the mesencephalon of Wistar rats. *Neuroscience Letters* 284, 13–16.
- Moroni, F., Forchetti, M.C., Krogs Gaard-Larsen, P., Guidotti, A., 1982. Relative disposition of the GABA agonists THIP and muscimol in the brain of the rat. *Journal of Pharmacology* 34, 67–678.
- Motta, V.E., Brandão, M.L., 1993. Aversive and antiaversive effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 44, 119–125.
- Mucha, R.F., Herz, A., 1985. Motivational properties of kappa and mu opioid receptor agonists studied with place and taste preference conditioning. *Psychopharmacology* 86, 274–280.
- Nashold, B.S., Wilson, W.P., Slaughter, D.G., 1969. Sensation evoked by stimulation in the midbrain of man. *Journal of Neurosurgery* 30, 14–24.
- Olds, M.E., Olds, J., 1963. Approach avoidance analysis of rat diencephalon. *Journal of Comparative Neurology* 120, 259–295.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Sydney (pp. 113).
- Roychowdhury, S.M., Fields, H.L., 1996. Endogenous opioids acting at a medullary μ -opioid receptor contribute to the behavioral antinociception produced by GABA antagonism in the midbrain periaqueductal gray. *Neuroscience* 74, 863–872.
- Sawynok, J., Pinsky, C., Labella, F.S., 1979. On the specificity of naloxone as an opiate antagonist. *Life Sciences* 25, 1621–1632.
- Schmitt, P., Carrive, P., DiScala, G., Jenck, F., Brandão, M.L., Bagri, A., Moreau, J.L., Sandner, G., 1986. A neuropharmacological study of the periventricular neural substrate involved in flight. *Behavioural Brain Research* 22, 181–190.
- Sim, L.J., Joseph, S.A., 1991. Arcuate nucleus projections to brainstem regions which modulate nociception. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 4, 97–109.
- Stiller, C.O., Bergquist, J., Beck, O., Ekman, R., Brodin, E., 1996. Local administration of morphine decreases the extracellular level of GABA in the periaqueductal gray matter of freely moving rats. *Neuroscience Letters* 209, 165–168.
- Tao, R., Auerbach, S.B., 2000. Regulation of serotonin release by GABA and excitatory amino acids. *Journal of Psychopharmacology* 14, 100–113.
- Terra, V.C., Garcia-Cairasco, N., 1994. NMDA-dependent audiogenic seizures are differentially regulated by inferior colliculus subnuclei. *Behavioural Brain Research* 62, 29–39.
- Urca, G., Nahin, R.L., Liebeskind, J.C., 1980. Glutamate-induced analgesia — blockade and potentiation by naloxone. *Brain Research* 192, 523–530.
- Veenman, C.L., Reiner, A., Honig, M.G., 1992. Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single-labeling and double-labeling studies. *Journal of Neuroscience Methods* 41, 239–254.
- Williams, F.G., Mullet, M.A., Beitz, A.J., 1995. Basal release of met-enkephalin and neurotensin in the ventrolateral periaqueductal gray matter of the rat: a microdialysis study of antinociceptive circuits. *Brain Research* 690, 207–216.