

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA/NEUROCIÊNCIAS

*Ophidiarium* LNN-FMRP-USP/INeC

**Efeitos da dopamina intranasal  
nas respostas defensivas de ratos em modelos comportamentais de pânico: participação  
dos receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub>**

REBECA MACHADO DE FIGUEIREDO

RIBEIRÃO PRETO/SP

2021

REBECA MACHADO DE FIGUEIREDO

**Efeitos da dopamina intranasal  
nas respostas defensivas de ratos em modelos comportamentais de pânico: participação  
dos receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub>**

**Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da  
Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da  
USP (BDTD)**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo (FMRP-USP), como parte das exigências  
para obtenção do título de Doutora em – Medicina, Área:  
Neurologia/Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Co-orientadora: D<sup>ra</sup>. Milene Cristina de Carvalho

Ribeirão Preto - SP

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação  
Serviço de Biblioteca e Documentação  
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

F74p Figueiredo, RM

Efeitos da dopamina intranasal nas respostas defensivas de ratos em modelos comportamentais de pânico: participação dos receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub>

—Neurologia—(Neurociência) — Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP): Ribeirão Preto, 2021.77f.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Coimbra

Co-orientadora: D<sup>ra</sup>. Milene Carvalho

1. Dopamina Intranasal. 2. Substância cinzenta periaquedutal. 3. Modelos de ataques de pânico. I. Título.

Tese (Doutorado em Medicina). Área de Pós-graduação em Neurologia/Neurociências, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Nome: FIGUEIREDO, Rebeca Machado

Título: Efeitos da dopamina intranasal nas respostas defensivas de ratos em modelos comportamentais de pânico: participação dos receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub>

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Medicina Área: Neurologia/Neurociências.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

### *OS QUE LUTAM*

*Há aqueles que lutam um dia e, por isso, são bons;  
Há aqueles que lutam muitos dias e, por isso, são muito bons;  
Há aqueles que lutam anos e são melhores ainda;  
Porém, há aqueles que lutam toda a vida; esses são os imprescindíveis.*

*Bertolt Brecht*

Aos meus amados pais, Ana e Luiz, por me darem o dom da vida, por serem meus primeiros mestres que sempre acreditaram em mim.

Aos meus amados irmãos, Gabriel e Lucas, meus exemplos e meus heróis, companheiros e cúmplices.

Aos meus inspiradores avós, Gabriel (*in memoriam*) e Rita, Jorge (*in memoriam*) e Netinha, por me ensinarem que tudo na vida precisa de uma pitada de fé, música e arte.

À minha querida tia-madrinha Cristina, por ser meu maior exemplo acadêmico.

À minha mentora, Prof.<sup>a</sup> D<sup>ra</sup>. Graziela Ferreira, por me apresentar a fantástica área das neurociências.

A vocês que são imprescindíveis na minha vida e formação, dedico esta tese.

## AGRADECIMENTOS

“São tempos difíceis para os sonhadores”, mas quando você tem as pessoas certas ao seu lado a dificuldade se torna apenas um detalhe. O meu processo de doutoramento foi repleto de desafios, transformações. Durante quatro anos, quanta coisa mudou! Quantas escolhas foram feitas, alegrias foram vividas, lágrimas foram derramadas, risadas e sorrisos distribuídos, e o melhor disso tudo foi que eu sabia que não estava sozinha nessa caminhada e nada mais justo do que deixar registrado nessa tese meus agradecimentos a algumas pessoas que contribuíram para que esse meu sonho difícil se tornasse realidade.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra, por ter aceito me orientar e por tudo que me ensina diariamente, pela compreensão em todos os momentos, principalmente nesse período de conclusão, onde não deixou de modo algum eu desistir.

Agradeço a minha Co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Milene Cristina de Carvalho, por toda ajuda durante a minha trajetória pela pós-graduação, e por me acompanhar de perto em todas as etapas dessa pesquisa, por me ensinar o tanto que uma amizade pode amadurecer ao decorrer do tempo.

Ao técnico do laboratório, Daoud H. Elias-Filho, por toda a assistência nesse meu período como aluna do laboratório.

Aos meus companheiros de laboratórios por todas as conversas, cafés e companhia, convivência que, com certeza deu significado a essa minha caminhada.

A minha amiga do laboratório para a vida, Yara Paiva; somos tão diferentes, mas isso não foi nenhum empecilho para que nossa amizade crescesse e se fortalecesse. Obrigada, minha amiga, por todo companheirismo e paciência comigo.

A minha amiga da pós-graduação para a vida, Renata Ferreira Sggobi, pela parceria de seis anos. Obrigada por sempre estar por perto quando precisei, pela ajuda nos experimentos, por todos os ensinamentos da vida.

Ao meu amigo da óptica para a vida, Guilherme Bazaglia, por todo companheirismo e todas as palavras de incentivo.

Ao Programa de Pós-graduação em Neurologia, pela oportunidade dada a mim para de ser aluna de um curso de excelência.

À CAPES, pelo financiamento da minha bolsa de pesquisa durante esses quatro anos; esse apoio foi essencial para cursar esse doutorado.

A minha amiga Helen Tormina, a prova de que coisas boas também podem acontecer em momentos desafiadores; conhecê-la foi um presente durante o período de pandemia.

Ao Expresso Riso, em especial a Pérsio, Daniel, Fabrício e Thais, minha outra família de Ribeirão Preto, que me apresentaram a melhor parte de mim (D<sup>ra</sup>. Neura) e assim me ensinaram como viver a vida com mais gratidão e leveza.

À escola Projeto *Broadway* e aos seus professores, em especial, Nana Póvoas, Debs Bérghamo, Rico Buhner, Ju Caillot, Kaio Bergamin, Clotilde Saporito, Marguerita Dissá, Rosane Jorge, por terem me mostrado a artista que existe nessa cientista e terem despertado a vontade de reunir as minhas duas maiores paixões: Neurociência e a Arte.

A todos meus amigos que, nesse final de processo, quando estava prestes a desistir, não mediram esforços para me convencer de concluir esse ciclo: Juliana Caillot, Kaio Bergamin, Graziela Ferreira, Renata Ferreira, Franciely Paliarin, Priscila Medeiros, Helen Tormina, Bruna Bortoletto, Felipe Furlanetto, Marila Reato, Ana Carolina Fernandes e Isabela Lellis.

Um agradecimento especial ao meu pai, por me ajudar na formatação e conclusão desse trabalho, e para minha mãe que, mesmo de longe, acompanhou-me cada segundo vivido na minha trajetória.

Obrigada a todas as pessoas que, mesmo que indiretamente, contribuíram durante toda minha caminhada nessa vida acadêmica. Eu sou quem sou hoje, porque conheci todos vocês!

*“Climb these hills  
I'm reaching for the heights  
And chasing all the lights that shine  
And when they let you down  
You'll get up off the ground  
'Cause morning rolls around  
And it's another day of sun”*

*Benji Pasek and Justin Paul*

## RESUMO

Figueiredo, Rebeca Machado. Efeitos da dopamina intranasal nas respostas defensivas de ratos em modelos comportamentais de pânico: participação dos receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub>. 2021. Tese (Doutorado em Medicina). Área de Pós-graduação em Neurologia/Neurociências, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

O indivíduo que sofre de ansiedade patológica desenvolve uma expectativa de perigo ou ameaça futura a sua sobrevivência que geralmente o torna vulnerável à ocorrência de ataques ou transtorno do pânico. Estudos pré-clínicos e clínicos mostram a ativação de circuitos de medo nessa doença psiquiátrica, sendo a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) o substrato neural que mais se destaca. Por estar localizada no mesencéfalo, a SCPd modula a saída de informações geradas por estruturas que compõem o sistema encefálico de defesa. Sua estimulação elétrica produz respostas defensivas que são sugeridas assemelharem-se a ataques de pânico. Um dos neurotransmissores que parece controlar essas respostas é a dopamina (DA) via receptores do tipo D1 e D2. Esse neurotransmissor parece exercer um papel dual na mediação das respostas de medo, visto que na via mesocorticolímbica, originada da área tegmental ventral do mesencéfalo, parecem facilitar o medo aprendido, enquanto em estruturas mesencefálicas dorsais, como a SCPd, parecem inibir as reações inatas de medo. Entretanto, desconhece-se a origem dessa última via dopaminérgica. Este trabalho buscou compreender o papel da DA nas respostas defensivas em modelos comportamentais de pânico, permitindo o conhecimento da mediação dopaminérgica em estruturas mesencefálicas, como a SCPd. Os experimentos conduzidos basearam-se na estimulação elétrica da SCPd, e na aplicação de dopamina por vias central e intranasal (IN), no teste do labirinto em T elevado, no de campo aberto e modelo de confronto entre presa e predador. A DA-IN, na dose de 2 mg/kg, aumenta o limiar de fuga dos animais submetidos à estimulação elétrica da SCPd e o pré- tratamento com Sulpirida reverteu o efeito da DA-IN no limiar de fuga de ratos submetidos à estimulação elétrica da SCPd, sugerindo uma mediação desse efeito por receptores do tipo D2.

**Palavras-chave:** Comportamento de defesa; Modelos de ataques de pânico; Sistema dopaminérgico; Receptor dopaminérgico do tipo D2.

## **ABSTRACT**

Figueiredo, Rebeca Machado. *Effects of intranasal dopamine on the defensive responses of rats in panic behavioral models: participation of dopaminergic receptors type D<sub>2</sub>*. 2021. Thesis (Doctorate in Medicine). Neurology / Neuroscience Post-Graduate Area, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo.

*The individual who suffers from pathological anxiety developing an expectation of danger or future threat to his/her priority which generally makes him/her vulnerable to the occurrence of panic disorder. Pre-clinical and clinical studies have demonstrated the activation of fear circuits in this psychiatric disease, with the dorsal periaqueductal grey matter (dPAG) being the most prominent neural substrate. Because it is located in the midbrain, the dPAG modules outputs information generated by structures that comprises the encephalic defense system. Its electrical stimulation produces defensive responses that are suggested to resemble panic attacks. One of the neurotransmitters that seems to control these responses is dopamine (DA) via D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> type receptors. This neurotransmitter seems to play a dual role in mediating fear responses, since when acting on in the mesocorticolimbic pathway originating from the ventral tegmental area of the midbrain, the learned fear seems to be facilitated, while acting on dorsal mesencephalic structures, such as the dPAG, seems to inhibit fear-related responses. However, the origin of this former dopaminergic pathway is unknown. This work aimed to understand the role of DA in defensive responses displayed by rats in behavioural models of panic, clarifying the dopaminergic mediation in mesencephalic structures, such as dPAG. The experiments performed were electrical stimulation of the dPAG, and application of dopamine by central and intranasal (IN) routes, the elevated T maze test, the open field test and the confrontation between prey (rats) and predators (venomous snakes). DA-IN, in a dose of 2 mg / kg, increases the escape threshold of animals submitted to the electrical stimulation of SCPd, and the pretreatment of Sulpiride reversed the effect of DA-IN on escape threshold of rats stimulated in SCPd, suggesting a mediation of this effect by dopaminergic type D<sub>2</sub> receptors.*

**Key-words:** *Defensive behaviour; Experimental models of panic attack; Dopaminergic system; Dopaminergic receptors type D<sub>2</sub>*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Visão esquemática de um quimitrodo.....	26
Figura 2 – Representação esquemática da linha experimental do experimento número 1 .....	29
Figura 3 – Representação esquemática da linha experimental do experimento número 2 .....	30
Figura 4 – Representação esquemática da linha experimental do experimento número 3 .....	31
Figura 5 – Visão esquemática do teste de labirinto em T elevado .....	32
Figura 6 – Representação esquemática da linha experimental do experimento número 4.....	34
Figura 7 – Visão esquemática do modelo de campo aberto utilizado no experimento. ....	35
Figura 8 – Representação esquemática da linha experimental do experimento número 5 .....	36
Figura 9 - Alguns comportamentos apresentados pelos ratos em confronto com serpente.....	38
Figura 10 - Alguns comportamentos apresentados pelos ratos em confronto com serpente urutu-cruzeiro .....	38
Figura 11 - Representação esquemática da linha experimental do experimento número 6 .....	39
Figura 12 -Locais para implantação do eletrodo nas colunas dorsais de substância cinzenta periaquedutal (dPAG).....	41
Figura 13 - Ausência de efeito do tratamento com dopamina no comportamento de defesa elicitado por estimulação .....	42
Figura 14 - Efeito do tratamento intranasal com dopamina no comportamento de defesa elicitado por estimulação .....	43
Figura 15 - Efeito do tratamento intranasal com dopamina ou sulpirida + dopamina no comportamento de defesa .....	45
Figura 16 - Ausência de efeito do tratamento intranasal com dopamina (2 mg/kg) no comportamento de defesa .....	46
Figura 17 - Ausência de efeito do tratamento intranasal com dopamina (2 mg/kg) no comportamento de ratos.....	47
Figura 18 - Ausência de efeito do tratamento intranasal com dopamina (2 mg/kg) no comportamento de ratos.....	49
Figura 20 - Ausência de efeito do tratamento intranasal com dopamina (2 mg/kg) no comportamento de ratos.....	50

## LISTA DE SIGLAS

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>ATV</b>	Área Tegmental Ventral
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética e Uso de Animais
<b>CPE</b>	“Congelamento” pós-estimulação
<b>D1 a D5</b>	Receptores Dopaminérgicos
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DA IN</b>	Dopamina Intranasal
<b>EE</b>	Estimulação Elétrica
<b>EPM</b>	Erro Padrão da Média
<b>FMRP-USP</b>	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
<b>Gi</b>	Proteína G heterotrimérica do tipo inibitória
<b>Gs</b>	Proteína G heterotrimérica do tipo S
<b>LTE</b>	Labirinto em T Elevado
<b>PBS</b>	Salina Tamponada
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>SCP</b>	Substância Cinzenta Periaquedutal
<b>SCPd</b>	Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal
<b>SCPv</b>	Substância Cinzenta Periaquedutal Ventral
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 EXPRESSÃO DAS EMOÇÕES .....	14
1.3 ANSIEDADE E MEDO .....	15
1.4 TRANSTORNO DO PÂNICO.....	16
1.5 MODELOS ANIMAIS .....	17
1.6 BASES NEURAIS DO COMPORTAMENTO DE DEFESA.....	18
1.7 SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL.....	19
1.8 DOPAMINA.....	21
1.9 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO.....	23
1.10 HIPÓTESE .....	24
1.11 OBJETIVO GERAL.....	24
1.12 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
1.13 ESTRUTURA DO TRABALHO .....	24
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1 COMITÊ DE ÉTICA.....	25
2.2 ANIMAIS .....	25
2.3 CIRURGIA.....	26
2.4 DROGAS.....	27
2.5 APLICAÇÃO DA IN .....	27
2.6 MODELOS COMPORTAMENTAIS.....	27
2.6.1 Estimulação Elétrica do <i>Tectum</i> .....	27
2.6.2 Labirinto em T elevado.....	32
2.6.3 Modelo de Campo Aberto .....	35
2.6.4 Modelo de Confronto Presa <i>versus</i> Predador .....	36
2.7 HISTOLOGIA .....	39
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
3. RESULTADOS .....	41
3.1 EXPERIMENTO NÚMERO 1.....	42
3.2 EXPERIMENTO NÚMERO 2.....	43
3.3 EXPERIMENTO NÚMERO 3.....	44
3.4 EXPERIMENTO NÚMERO 4.....	45
3.5 EXPERIMENTO NÚMERO 5.....	46
3.6 EXPERIMENTO NÚMERO 6.....	47
4 DISCUSSÃO .....	51
5 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS .....	57
APÊNDICE .....	67

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 EXPRESSÕES DAS EMOÇÕES

As emoções são o elemento fundamental para a vida dos seres humanos. Elas moldam as situações do cotidiano e são indispensáveis para a sobrevivência das espécies (LEDOUX, 1991, 2000; ADOLPHS, 2010; SPUNT; ADOLPHS, 2019). Este tema desperta uma incansável curiosidade de pesquisadores que desejam compreender quais são suas bases neurais e fisiológicas.

Refletindo sob um panorama histórico, este interesse surgiu no ano de 1872, quando Charles Darwin publicou o livro “A expressão das emoções nos homens e animais” (LEDOUX, 1998; BRANDÃO, 2019).

Nessa obra, Darwin pontuou três principais princípios das expressões das emoções:

a) Princípio da utilidade dos hábitos, onde comportamentos característicos refletem a maneira que os animais expressam suas emoções perante os pares. Um exemplo deste comportamento pode ser visto no ser humano, quando enrijecemos os dentes numa situação de extrema raiva, ou em um cachorro, o qual mostra suas presas antes de um ataque, ou, ainda, quando se abaixa os olhos numa situação de submissão.

b) Princípio da antítese, onde emoções opostas são manifestadas por posturas opostas. Por exemplo, numa situação de orgulho, a pessoa estufa seu tórax ou, envergonhada, comprime-o, esperando passar despercebida.

c) Princípio da ação direta do sistema nervoso central, que afirma que ajustes fisiológicos estão envolvidos em determinados estados emocionais que preparam os organismos para reagir em situações adversas. Por exemplo, em uma situação de perigo, o corpo libera adrenalina para prepará-lo para a situação de luta ou fuga.

Portanto, o ser humano e os animais, em geral, apresentam comportamentos típicos face à percepção momentânea do ambiente no qual estão inseridos. Essa percepção provocará respostas instintivas num amplo espectro de alternativas (FEITOSA; DARWIN, 1999; BRANDÃO, 2019)

Quando o estímulo aversivo é potencial ou distante, provoca as seguintes respostas defensivas:

a) Avaliação de risco, que consiste em um comportamento defensivo que ocorre na presença de um perigo em potencial. Esta resposta induz um estado de alerta no animal e

permite a realização de uma varredura do ambiente à procura de sinais ameaçadores (SHUHAMA et al., 2007).

b) Imobilidade defensiva ou “Congelamento” (*freezing*), que corresponde à paralisação quase que absoluta de movimentos perceptíveis, exceto pelos movimentos respiratórios. Essa resposta é emitida como uma estratégia defensiva quando o estímulo ameaçador é real, mas ainda se encontra distante do animal (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989b; SHUHAMA et al., 2007).

Quando o estímulo ameaçador é de uma intensidade maior e está próximo, as respostas defensivas são as seguintes:

a) Fuga, que se traduz na resposta emitida quando a ameaça está muito próxima e existe a possibilidade de escape, pois o ambiente proporciona rotas de fuga, tais como lugares seguros, como, por exemplo, uma toca, locais elevados ou, no caso de animais aquáticos, a água de rios, lagos e mar (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989a; SHUHAMA et al., 2007).

b) Ameaça defensiva / Luta, quando o perigo está bem próximo e rotas de fuga não são disponíveis. O ser ameaçado adota, neste caso, uma postura de defesa, emitindo vocalizações, adotando uma postura mais altaneira e olhar mais ameaçador, sinalizando para o oponente a possibilidade de um contra-ataque (BLANCHARD et al., 1989; SHUHAMA et al., 2007)

c) Imobilidade tônica, que consiste em uma reação de defesa extrema, caracterizada por imobilidade rígida e perscrutação discreta do ambiente que cerca a presa; comportamento que se expressa quando o animal já está sob as garras do predador, sendo também considerado como pseudo-morte (VIEIRA-RASTELI et al., 2018)

### 1.3 ANSIEDADE E MEDO

A maneira como as respostas se manifestam foi herdada através da evolução das espécies e traz *insights* fundamentais para a compreensão das emoções nos seres humanos (LEDOUX, 1991, 1998; FEITOSA; DARWIN, 1999; BRANDÃO, 2019).

A ansiedade e medo, por exemplo, são emoções convergentes que, decorrentes de uma ameaça, eminente ou não, levam os indivíduos a apresentarem respostas comportamentais e fisiológicas esperadas, a fim de evitarem ou mesmo fugirem da situação, garantindo a autoproteção e, instintivamente, assegurando o perpetuar da espécie (LEDOUX, 1998).

No entanto, mesmo com essas emoções fazendo parte do repertório de sobrevivência dos indivíduos, a problemática aparece quando estas manifestações são excessivas, trazendo

como conseqüências o que se conhece como transtornos psiquiátricos (LEDOUX, 1991, 2000).

Dados do *website* “*Our world in Data*” relatam que a prevalência dos transtornos de ansiedade em todo o mundo varia de 2,5 a 7% por país. Em um panorama global, cerca de 284 milhões de pessoas experimentaram um transtorno de ansiedade em 2017; dessa forma, tornando-se o transtorno de saúde mental de maior prevalência. O indivíduo que sofre com essa patologia desenvolve uma expectativa de perigo ou ameaça futura à sua sobrevivência (LENT, 2002) que geralmente o torna vulnerável à ocorrência de ataques ou transtornos do pânico (REISS; BOOTZIN, 1985; REISS, 1991; MCNALLY, 2002).

#### 1.4 TRANSTORNO DO PÂNICO

O transtorno do pânico é caracterizado por ataques de medo intenso inesperados e repetidos, com pico de duração de cerca de dez minutos e com vários sintomas associados, tais como, taquicardia, *angina pectoris*, suor, tremores, tontura, desmaios, dispneia e sensação de morte iminente (BIGHELLI et al., 2018).

Estudos para medir a prevalência desse transtorno na população mundial sugerem que 1,7% a 4,7% dos adultos e adolescentes são acometidos por esse transtorno mental (POLITIS et al., 2020). Algumas intervenções farmacológicas, principalmente utilizando benzodiazepínicos e inibidores de captação de serotonina cronicamente administrados, com o propósito de tratar os ataques de pânico, e abordagens psicológicas, com o intuito de tratar a ansiedade antecipatória, têm sido utilizadas como tratamento (FURUKAWA et al., 2007; BIGHELLI et al., 2018).

Entretanto, para que se tenha intervenção farmacológica efetiva, faz-se necessário conhecer como o substrato e circuitaria neurais atuam durante a manifestação dessas emoções (LEDOUX, 1998; BRANDÃO, 2019). Modelos experimentais de ataques de pânico utilizando confrontos entre serpentes e animais de laboratório vêm permitindo estabelecer algumas das bases neurobiológicas de comportamentos que se assemelham àqueles apresentados por pacientes durante ataques de pânico (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018a), assim como têm sido concebidos para desvendar as vias neurais e os neuromoduladores que controlam a expressão de tais reações comportamentais (ALMADA et al., 2021).

## 1.5 MODELOS ANIMAIS

Efetivamente, modelos animais de doenças mentais (COIMBRA, NORBERTO CYSNE et al., 2017; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018a; MENDES-GOMES et al., 2020) são algumas ferramentas neuropsicobiológicas utilizadas em laboratórios de pesquisas em neurociências para que se possa ter uma compreensão mais detalhada dos diferentes aspectos da neurobiologia das doenças mentais, que embasa a etologia e sintomatologia das diferentes psicopatologias (TREIT et al., 2010).

Porém, para que um modelo animal seja adotado adequadamente e produza resultados comparáveis àqueles comportamentos patológicos apresentados por seres humanos, é necessária uma análise criteriosa, constituída por três aspectos de validação: Validade de face, Validade de constructo e Validade preditiva. Ou seja, o modelo animal precisa englobar aspectos teóricos e sintomatológicos da doença que simula, aspectos etológicos correlatos e, por fim, precisa ser sensível a tratamentos farmacológicos utilizados para o tratamento de uma determinada doença (PALANZA, 2001; CHADMAN et al., 2009). Um exemplo disso foi o trabalho publicado por Paschoalin-Maurin e colaboradores (2018), que validaram o modelo de ataques de pânico baseado no paradigma de confronto entre presa e serpentes. Nesse estudo, Mesocricetus auratus foram pré-tratados com drogas ansiolíticas e panicolíticas clássicas, tais como o alprazolam e a paroxetina, e foram confrontados com serpentes corais peçonhentas da espécie Micrurus frontalis (*Reptilia; Elapidae*). A presença da serpente causou uma clara ativação comportamental, caracterizada como alerta defensivo, imobilidade defensiva, aproximação cautelosa, e fuga, tendo havido, ainda, um aumento da expressão da proteína Fos em estruturas-chave do sistema límbico ou a ele funcionalmente relacionadas, tais como o complexo amigdalóide, o hipotálamo e a substância cinzenta periaquedutal. O pré-tratamento dos roedores com as drogas de ação panicolítica atenuou não somente as respostas de defesa apresentadas pelos animais de laboratório na presença da serpente coral verdadeira, como também diminuiu significativamente a ativação das estruturas do sistema límbico recrutadas para a organização das reações defensivas que têm sido relacionadas à ansiedade antecipatória, e ao pânico.

Existe uma variedade de tipos de modelos animais que medem diferentes padrões de resposta comportamentais. Estas respostas podem envolver paradigmas de medo condicionado, quando o objetivo é estudar principalmente aspectos da aprendizagem, ou paradigmas de medo incondicionado, os quais tentam mimetizar situações em que o animal experimental apresente respostas comportamentais de defesa na presença ou ameaça de estímulos naturalmente aversivos para ele (LISTER, 1990; CAMPOS et al., 2013).

Na realidade, é por meio deste segundo paradigma, que se busca compreender as bases neurais e neuroquímicas de sinais e sintomas que os pacientes apresentam na síndrome do pânico, assim como as respostas do comportamento defensivo de ataques de pânico. No que se refere ao medo incondicionado e condicionado, por serem estes baseados em uma emoção amplamente estudada, já se tem um entendimento mais aprofundado das bases neurais envolvidas nas expressões das respostas comportamentais relacionadas ao medo (LEDOUX, 1998).

#### 1.6 BASES NEURAIAS DO COMPORTAMENTO DE DEFESA

O complexo amigdalóide, por exemplo, é uma das principais estruturas envolvidas na circuitaria do medo. Composto por três núcleos (basolateral, central e medial), essa estrutura límbica tem a função de avaliar o nível da ameaça dos estímulos sensoriais e, frente a uma ameaça potencial, dispara sinais neurais para outras estruturas límbicas com a finalidade de desencadear reações emocionais defensivas (LENT, 2002; GROSS; CANTERAS, 2012; CANTERAS; GRAEFF, 2014; BRANDÃO, 2019).

O hipotálamo também faz parte das bases neurais das reações de medo, pois, além de controlar a homeostase corporal, possui componentes de respostas motoras, autonômicas e endócrinas que embasam a geração e a elaboração das respostas emocionais (LENT, 2002; CANTERAS; GRAEFF, 2014; BRANDÃO, 2019). Recentemente, nossa equipe mostrou o envolvimento do hipotálamo anterior (FALCONI-SOBRINHO; COIMBRA, 2018; ANJOS-GARCIA, DOS; COIMBRA, 2019; FALCONI-SOBRINHO et al., 2021), do hipotálamo medial (BIAGIONI et al., 2016b; ANJOS-GARCIA, DOS et al., 2017; FALCONI-SOBRINHO; COIMBRA, 2018; dos ANJOS-GARCIA; COIMBRA, 2019; URIBE-MARIÑO et al., 2019; KHAN et al., 2020) e do hipotálamo posterior (BIAGIONI et al., 2016a; FALCONI-SOBRINHO; ANJOS-GARCIA; OLIVEIRA, DE; et al., 2017) na organização de respostas de defesa similares a ataques de pânico.

Posteriormente, a circuitaria que será ativada irá depender da natureza e das características do estímulo aversivo. Estímulos condicionados e que estão distantes do animal, ativam um circuito neural constituído, principalmente, pelo núcleo mediano da rafe, pelo septo, pelo hipocampo e pela substância cinzenta periaquedutal (SCP) ventral, enquanto estímulos intensos e próximos geram respostas incondicionadas de defesa, conhecidas por ataques de pânico em seres humanos, e têm sua mediação por estruturas do tronco encefálico, como, por exemplo, a SCP dorsal (CANTERAS; GRAEFF, 2014).

As estruturas dos circuitos neurais do medo são organizadas de forma hierárquica no encéfalo e quanto mais caudal a estrutura no encéfalo for, mais primitiva e comum serão as respostas defensivas, como no caso das respostas de pânico. E quanto mais cortical for a estrutura, maior será a subjetividade e o refinamento da resposta comportamental, como a ansiedade, seguida por reações autonômicas simpáticas, como taquicardia, aumento da pressão arterial, entre outras (BRANDÃO, 2019). Por exemplo, nossa equipe demonstrou que a estimulação química, com NMDA, de núcleos do hipotálamo medial elicia um comportamento de fuga orientada para a toca e saltos verticais (ULLAH et al., 2015). Não obstante, uma estimulação com doses mais altas de aminoácidos excitatórios do hipotálamo medial elicia respostas de fuga não-orientadas e mais explosivas, correlacionadas a um aumento da expressão da proteína Fos na substância cinzenta periaquedutal (ULLAH et al., 2015, 2017a). Ao serem bloqueadas conexões sinápticas na SCPdl, as reações panicogênicas eliciadas pela estimulação da divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial de ratos são interrompidas (ULLAH et al., 2017a). Dessa forma, os autores sugerem que o comportamento de fuga orientado para abrigos é organizado pelo hipotálamo, ao passo que reações de fuga explosivas/não orientadas são organizadas por neurônios da SCP.

A resposta de ansiedade possui função adaptativa e motivacional, preparando o indivíduo para ter um desempenho satisfatório em uma determinada tarefa (BRANDÃO, 2019). Porém, quando a tensão e as respostas fisiológicas estão presentes de maneira frequente e generalizada para diferentes estímulos, a ansiedade se torna patológica. No que se refere a respostas similares àquelas do tipo ansiedade e pânico, apresentadas por animais em alguns modelos animais de laboratório, podemos considerá-las parte do repertório do comportamento de defesa, por exemplo apresentado por roedores na presença de serpentes (GUIMARÃES-COSTA et al., 2007; LOBÃO-SOARES et al., 2008; COIMBRA, NORBERTO C. et al., 2017b), ao passo que em modelos de disfunção crônica da atividade GABAérgica (SHEKHAR, 1994; SHEKHAR et al., 1996) ou em modelos de hipóxia (SPIACCI et al., 2015, 2018) se assemelham mais propriamente a reações patológicas de ansiedade patológica e síndrome do pânico.

## 1.7 SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL

Um substrato neural que se destaca nos estudos do funcionamento dessas circuitarias é, inquestionavelmente, a SCP (NASHOLD et al., 1969; GERMAN et al., 2000; BRANDÃO et al., 2005).

O termo SCP designa a região do mesencéfalo que circunda o aqueduto cerebral, a qual é, inclusive, conservada entre muitas espécies de vertebrados (peixes ósseos e cartilagosos, anfíbios, répteis, aves e mamíferos) (KINGSBURY et al., 2011; STEPHENSON-JONES et al., 2011). Sua posição anatômica, entre o rombencéfalo e o diencéfalo, proporciona-lhe uma localização privilegiada, participando de vários sistemas sensoriais ascendentes e de trajetos sensoriais descendentes. Esta condição sugere que a SCP está interligada a um grande número de redes neurais que coordenam estratégias distintas para enfrentar diferentes tipos de ameaças que culminem em estímulos estressores e dolorosos (BEITZ, 1985). A SCP está, inclusive, inserida no sistema endógeno de modulação da dor (COIMBRA et al., 2006), um sistema neural descendente recrutado em situações de perigo iminente de morte (COIMBRA et al., 2017a).

A SCP recebe aferências de estruturas-chave do sistema límbico, como, por exemplo, o hipotálamo medial (ULLAH et al., 2017b), envia sinalização para diferentes áreas motoras, sensoriais, autonômicas e límbicas (BANDLER et al., 1991), inclusive interconecta-se reciprocamente com o próprio hipotálamo (FALCONI-SOBRINHO; ANJOS-GARCIA; ELIAS-FILHO; et al., 2017; FALCONI-SOBRINHO et al., 2021).

Ao longo dos anos, alguns estudos comportamentais têm mostrado que a SCP é uma estrutura crítica na seleção, organização e no comando das reações defensivas comportamentais e neurovegetativas (BEHBEHANI, 1995; BRANDÃO et al., 1999; COIMBRA et al., 2006; BIAGIONI et al., 2012; ULLAH et al., 2017b).

A SCP, na sua porção dorsal, tem um papel na mediação da saída de informações geradas por estruturas que compõem o sistema encefálico de defesa e parece ser essencial para a execução dos comportamentos defensivos (CANTERAS et al., 1997; RISOLD; SWANSON, 1997; GRAEFF; GUIMARÃES, 2012). Sua estimulação química ou elétrica produz respostas comportamentais de “congelamento” e fuga, acompanhadas por alterações cardiovasculares e neurovegetativas similares àquelas observadas em situações aversivas proximais, como o confronto com predadores (OLDS; OLDS, 1962; BRANDÃO et al., 1999; GRAEFF, 2004; ALMADA; COIMBRA, 2015).

Um período de imobilidade denominada “congelamento” pós-estimulação (CPE) é observado quando a estimulação elétrica é finalizada e se refere a um processo de transferência de informações para estruturas prosencefálicas, o que permite ao animal avaliar as consequências da situação aversiva (VIANNA et al., 2001; BRANDÃO et al., 2008; CARVALHO et al., 2018). Tais evidências experimentais sugerem que essas respostas defensivas observadas em ratos se assemelham à imobilidade comumente vista em ataques de

pânico observados em seres humanos (NASHOLD et al., 1969; GRAEFF, 2002, 2004; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018b).

O controle neuroquímico de reações defensivas é realizado por diversos neurotransmissores (ZANGROSSI; GRAEFF, 2014; COIMBRA, NORBERTO CYSNE et al., 2017; CARVALHO et al., 2018). Estudos a respeito dos transtornos de ansiedade geralmente enfatizam a ação de monoaminas e indoloaminas na circuitaria encefálica (BRANDÃO; COIMBRA, 2018).

## 1.8 DOPAMINA

Um neurotransmissor que vem ganhado destaque nos estudos da circuitaria dos comportamentos defensivos é a dopamina (DA) (BRANDÃO et al., 2015b; BRANDÃO; COIMBRA, 2018), tendo em mente que seus receptores se encontram amplamente distribuídos em substratos neurais envolvidos no circuito da recompensa e defesa (núcleo *accumbens* e complexo amigdalóide).

Uma característica dos receptores de DA é que são acoplados à proteína G, envolvida no processo molecular com a função de fazer a transdução de sinais, com finalidade de ativar eventos intracelulares por estímulos externos (MOURA; VIDAL, 2011). Nas famílias e subfamílias dos receptores DA, encontram-se dois tipos principais de proteína G, denominadas Gs e Gi, ambas atuando mediando o processo enzimático da adenilato-ciclase (MISSALE et al., 1998; AYANO, 2016; GUREVICH et al., 2016).

Os receptores dopaminérgicos do tipo D1 (receptores D1, mas também D5) ativam a proteína Gs, que irá ativar a enzima adenilato-ciclase, produzindo uma ação estimulatória e, conseqüentemente, o aumento da resposta celular. No caso dos receptores de DA do tipo D2 (receptores D2, mas também D3 e D4), estes ativam a proteína Gi, que é inibitória; logo, inibem a atividade da enzima adenilato-ciclase, culminando na diminuição da resposta celular (MISSALE et al., 1998; MOURA; VIDAL, 2011; BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011).

Para investigar qual é o envolvimento de cada tipo de receptor dopaminérgico na expressão das respostas de medo, alguns estudos utilizam drogas antagonistas que irão dificultar a ação dos agonistas em seus respectivos receptores (SOUZA CAETANO, DE et al., 2013). No receptor D1, atuam o agonista SKF38393 e o antagonista SCH23390, já quanto aos receptores do tipo D2, o quinpirol é um tipo de agonista e a sulpirida atua como antagonista. Evidências na literatura sugerem que o quinpirol pode atuar nos receptores pré-sinápticos D2 localizados na área tegmental ventral (ATV), diminuindo os níveis de dopamina nos campos terminais da via mesolímbica; já a sulpirida parece atuar nos receptores

dopaminérgicos pós-sinápticos (OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA, DE et al., 2011; SOUZA CAETANO, DE et al., 2013).

Algumas estruturas ricas em receptores dopaminérgicos são o *nucleus accumbens* (CASTRELLON et al., 2019), o giro do cíngulo (LIU et al., 2020), o complexo amigdalóide (LA MORA, DE et al., 2016), estruturas do teto mesencefálico (MUTHURAJU et al., 2016), entre outras. Esses receptores respondem à DA proveniente da ATV (BOROWSKI; KOKKINIDIS, 1996; PEZZE; FELDON, 2004) e têm um papel importante na modulação de respostas de defesa (BRANDÃO; COIMBRA, 2018). De fato, os receptores dopaminérgicos do tipo D2 podem ter um papel importante na modulação do medo e da ansiedade, assim como da antinocicepção (TOBALDINI et al., 2018) induzida pelo medo, um fenômeno comumente observado após estimulações elétricas e químicas de estruturas do *tectum* (COIMBRA et al., 1992, 2006). Algo importante de se ressaltar é que a participação dos neurotransmissores no medo e na ansiedade irá depender na natureza da informação do estímulo aversivo.

Quanto à dopamina, observa-se que menção à sua participação no processamento de medo eliciado por estímulos aversivos condicionados é também encontrada na literatura (SALINAS-HERNÁNDEZ et al., 2018; TANG et al., 2020). Evidências mostram que o antagonismo de receptor D2 nos modelos comportamentais de paradigmas de medo condicionado prejudica o fenômeno de condicionamento, mostrando a importância desse neurotransmissor para as expressões das respostas de medo (OLIVEIRA, DE et al., 2006, 2009, 2011; SOUZA CAETANO, DE et al., 2013; BRANDÃO et al., 2015a).

Logo, a via mesocorticolímbica, originada na ATV, parece facilitar o medo condicionado. Quanto à participação da dopamina nas respostas de medo incondicionado, esta não foi ainda muito bem estabelecida, mas existe uma hipótese que a ativação de receptores dopaminérgicos em áreas mesencefálica, como a SCPd, inibe as reações inatas de medo; porém, a origem dessa via não é muito conhecida. Brandão et al. (2015) propõem um possível papel dual da dopamina, a qual, em estruturas mais corticais, acabaria por facilitar o medo elaborado nas estruturas mesencefálicas, como a SCPd, e parece inibir as reações inatas de medo.

Ao se tratar do papel da DA na SCP, propriamente dito, muito se sabe sobre o envolvimento desse neurotransmissor em sua porção ventral (SCPv). Por exemplo, a injeção de agonista do receptor dopaminérgico apomorfina na SCPv demonstrou causar efeitos antinociceptivos (SCHOO et al., 2018), uma ativação de neurônios positivos para tirosina hidroxilase na SCPv, uma ação antinociceptiva supraespinhal, e os neurônios dopaminérgicos

na SCPv tiveram algum envolvimento com a elaboração da antinocicepção opioide, via DA *downstream* e liberação de glutamato (LI et al., 2016).

Por outro lado, pouco se sabe sobre a participação da SCPd em termos de possível mediação dopaminérgica nas reações de defesa, muito embora conexões entre a área dopaminérgica da zona incerta e a SCP já tenham sido recentemente demonstradas e discutidas em termos de controle do comportamento de defesa (BRANDÃO; COIMBRA, 2019).

### 1.9 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS

A administração farmacológica de drogas de ação central é uma ferramenta imprescindível no estudo da compreensão das estruturas e circuitos encefálicos das respostas neurofisiológicas e comportamentais. Pode ser realizada por diferentes vias de administração, como, por exemplo, intraperitoneal (URIBE-MARIÑO et al., 2012; TWARDOWSCHY et al., 2013), intramencefálica (de OLIVEIRA et al., 2014a; KHAN et al., 2020), intranasal (TROSSBACH et al., 2014; de SOUZA SILVA et al., 2016; TALBOT et al., 2017; de CARVALHO et al., 2019), entre outras.

A via intranasal, especificamente, tem seu interesse ampliado entre pesquisadores a partir dos anos 1980. Esta via tem se mostrado eficaz não somente por não ser invasiva, mas também pelo fato de que a droga, ao ser administrada, tem sua atuação direta no sistema nervoso central (SNC) (LOCHHEAD; THORNE, 2012).

Portanto, enquanto a DA não atravessa a barreira hematoencefálica, sua administração intranasal (DA-IN) atinge o SNC diretamente pela via oferecida pela mucosa nasal, ricamente vascularizada e contendo neurônios da via olfatória, atingindo, em seguida, o cérebro, fornecendo um meio alternativo de ativar os receptores dopaminérgicos encefálicos (TAYEBATI et al., 2013; GIOIA, DI et al., 2015; SOUZA SILVA, DE et al., 2016).

Foi demonstrado que a DA-IN em ratos se liga aos transportadores estriatais DA2 (SOUZA SILVA, DE et al., 2016), permitindo um aumento da DA extracelular no neostriado dorsal e ventral (SOUZA SILVA, M. A. DE et al., 2008), o que pode culminar em efeitos antidepressivos (BUDDENBERG et al., 2008) e de promoção da memória (RUOCCO et al., 2014; TROSSBACH et al., 2014; WANG et al., 2017).

### 1.10 HIPÓTESE

Considerando o exposto, a hipótese do presente trabalho é de que (a) a ativação de estruturas mesencefálicas dorsais, como a SCPd, causará respostas de medo inato, assim como muito possivelmente ocorrerá em animais de laboratório submetidos ao teste do labirinto em T- elevado e ao modelo de confronto entre presas e serpentes; (b) a administração de dopamina por via intranasal atenuará, por meio do recrutamento de receptores dopaminérgicos do tipo D2, as respostas comportamentais defensivas eliciadas pela estimulação elétrica do teto mesencefálico, pela exposição dos roedores ao teste do labirinto em T elevado e aquelas apresentadas por animais de laboratório confrontados com serpentes.

### 1.11 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é investigar o papel da DA e de seus receptores do tipo D2 nas respostas defensivas em modelos comportamentais de pânico, com o intuito de compreender como se dá essa mediação dopaminérgica do comportamento de defesa em estruturas mesencefálicas, tais como a SCPd.

### 1.12 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar os efeitos da DA-IN em modelos comportamentais de pânico, como o da estimulação elétrica da SCPd, o do Labirinto em T elevado (LTE) e o modelo de confronto presa *versus* predador (teste da arena poligonal para serpentes);
- b) Investigar se os efeitos da DA-IN nos modelos comportamentais de pânico dão-se via receptores D2;
- c) Averiguar se a DA-IN afeta o comportamento locomotor dos ratos no modelo de campo aberto, assim como as reações de ansiedade comumente apresentada por roedores expostos a esse modelo experimental;

### 1.13 ESTRUTURA DO TRABALHO

A partir desta introdução, onde são apresentados os alguns aspectos da expressão da ansiedade e do medo em seres humanos, estabelecendo ligações com o comportamento defensivo dos animais de laboratório, e destacando os objetivos geral e específicos, o capítulo dois descreve o material e métodos utilizados nos experimentos e os modelos comportamentais relativos aos estímulos aos quais foram submetidos os animais de

laboratório no presente trabalho, destacando em cada modelo, a natureza do estímulo provocado, os equipamentos utilizados, o procedimento experimental e as linhas de experimento. Os experimentos conduzidos foram: (a) estimulação elétrica da SCPd, após o pré-tratamento dos animais com aplicação de dopamina central e intranasal, (b) o teste de labirinto em T elevado, (c) o teste de campo aberto e (d) o modelo de confronto entre presa e predador na arena poligonal enriquecida para serpentes (teste da arena poligonal para serpentes). O capítulo três apresenta os resultados de cada experimento, destacando, em gráficos, os valores em delta dos limiares obtidos nos comportamentos de defesa nos experimentos de números 1 a 3, os valores em delta tempo de esquiva e fuga relativos ao experimento número 4, o número de cruzamentos e tempo de permanência no experimento do campo aberto e os gráficos, mostrando o comportamento dos ratos ameaçados por serpentes. O capítulo quatro discute os principais resultados alcançados.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 COMITÊ DE ÉTICA**

Todos os experimentos receberam aprovação formal (processo 134/2018) da Comissão de Ética de uso de animais em pesquisas (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e foram realizados em conformidade com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – Ministério da Ciência e Tecnologia. Além disso, o número de animais usado foi o mínimo necessário para assegurar a confiabilidade estatísticas dos dados, e com todos os esforços para minimizar o sofrimento dos animais.

### **2.2 ANIMAIS**

Foram utilizados ratos Wistar *Hannover*, machos (N =187), pensando entre 250 e 300 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – *Campus* de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em grupos de quatro em caixas de polipropileno (45 x 35 x 15 cm) no biotério setorial do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, com temperatura controlada ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ), com água e ração à vontade, em um ciclo claro/escuro de doze horas, com as luzes acesas às 07:00 h da manhã.

Como predadores, foram utilizadas serpentes peçonhentas urutu-cruzeiro (*Bothrops alternatus*, *Reptilia*, *Viperidae*) (N = 6) fornecidas pelo *Ophidiarium* LNN-FMRP-USP/INeC,

registrado no IBAMA e na Secretaria de Meio ambiente do Estado de São Paulo (Projeto MEDUSA processo 1/35/1998 / 000846-1), como citado em Almada et al. (2021).

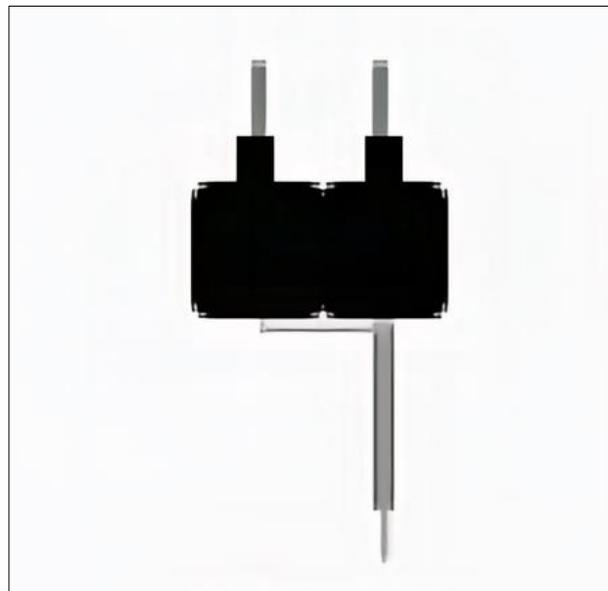
### 2.3 CIRURGIA

Os animais foram anestesiados com Cetamina/Xilasina (100/4,5 mg/kg; União Química Farmacêutica Nacional, Brasil; Laboratório Caller, Espanha, respectivamente) e fixados a um aparelho estereotáxico (*Insight Equipamentos*, Brasil), sendo a barra do incisivo fixada a 3,3 mm abaixo da linha interaural (CARVALHO et al., 2015; de CARVALHO et al., 2019).

Considerando a linha interaural como referência, um quimitrodo (cânula-guia acoplada a um eletrodo de estimulação elétrica) foi direcionado à SCPd com ângulo de 22°, segundo as seguintes coordenadas: AP = 0 mm, ML = 1,9 mm e DV = - 5,4 mm (PAXINOS; WATSON, 2007).

Os quimitrodos foram formados por um fio de aço inoxidável (50 µm de diâmetro) isolado por PFA (A-M Systems, WA, EUA), exceto pela sua extremidade em contato com o tecido neural (SAITO, 2016).

Figura 1 - Visão esquemática de um quimitrodo



Em todos os grupos, um quimitrodo foi fixado no crânio com resina acrílica e dois parafusos de aço inoxidável. No final da cirurgia, os ratos receberam injeções intramusculares de penicilina G benzatina (Pentabiótico, 600.000 UI, 0,2 ml; Fort Dodge) e subcutâneas de

um droga analgésica e anti-inflamatória não esteroide (Banamine, 2,5 mg/kg; Schering-Plough, Cotia, Brasil).

Cada cânula-guia foi selada com um fio de aço inoxidável para protegê-la de obstrução. Os ratos foram, então, devolvidos ao biotério e deixados em recuperação por cinco dias.

## 2.4 DROGAS

Nos experimentos foram utilizadas as seguintes drogas:

— Sulpirida (40 mg/kg, i.p. antagonista D2; *Sigma, St. Louis, USA*) dissolvida em Tween 80 a 2%); (de OLIVEIRA et al., 2006).

— Dopamina (1 mg/kg, 2 mg/kg por via intranasal, e 40nmol/0,2µl por intratectal; *DA hydrochloride - Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany*) para aplicação intranasal a DA (1, e 2 mg/kg) foi solubilizada em um gel feito de óleo de castor (*M&P Pharma, Emmetten, Switzerland*) (Talbet et al., 2017). Para a aplicação central, a DA foi solubilizada em PBS a 0,1 M.

O preparo das drogas foi realizado minutos antes do início dos procedimentos experimentais. Além disto, a salina + Tween 80 e o óleo de castor foram utilizados como veículos em grupos controles.

## 2.5 APLICAÇÃO DA DOPAMINA INTRANASAL (DA-IN)

Para aplicação da DA IN foi utilizada uma micropipeta com ponteiros apropriadas para administrar soluções viscosas (Microman, Gilson, Villiers le Bel, France e CP10 Tips, Gilson, Villiers le Bel, France).

A administração da droga foi realizada em animais acordados e envoltos em flanela. A DA ou o veículo foram administrados em um volume de 5 µl em cada narina (TROSSBACH et al., 2014). Cada rato recebeu tratamento com DA-IN ou veículo apenas uma vez.

## 2.6 MODELOS COMPORTAMENTAIS

### 2.6.1 Estimulação Elétrica do *Tectum*

#### 2.6.1.1 Equipamento

Para a estimulação elétrica na SCPd, foi utilizado um aparato experimental, que consiste em uma caixa (25 × 20 × 20 cm) com paredes e assoalho feitos de *Plexiglas* e um estimulador de onda senoidal (Del Vecchio, Brasil) acoplado a um osciloscópio para medida da

corrente em ampere (*Philips, USA*). A sala foi iluminada com uma lâmpada fluorescente de 40 W.

#### 2.6.1.2 Procedimento Experimental

Cinco dias após a cirurgia, os animais foram colocados no aparato experimental por dez minutos para aclimatação.

A estimulação elétrica da SCPd foi realizada em intervalos aleatórios de 30 a 120 segundos, sendo a intensidade de corrente elétrica elevadas de 5 em 5  $\mu\text{A}$  para determinação dos limiares de respostas de congelamento e de fuga.

O limiar de “congelamento” foi definido como a menor intensidade que produziu a ausência de movimento por 6 segundos, exceto os movimentos relacionados à respiração, seguindo-se alterações neurovegetativas, tais como piloereção, exoftalmia, defecação e micção. A intensidade da corrente que produziu corrida e/ou salto foi considerada o limiar de fuga. Animais com limiar de fuga  $> 120 \mu\text{A}$  (pico a pico) foram removidos do experimento.

Para investigar o comportamento que persistiu após a fuga, os animais permaneceram na caixa experimental por mais oito minutos, sem estimulação, durante os quais a duração do “congelamento” pós-estimulação foi registrada.

Após o registro dos valores basais, os animais receberam os tratamentos correspondentes ao seu respectivo grupo experimental. Após o período de tempo necessário para cada tratamento, os limiares de “congelamento” e de fuga, assim como o tempo gasto no congelamento pós-estimulação elétrica foram novamente registrados. Esse procedimento foi baseado em estudos prévios de nosso laboratório (CARVALHO et al., 2015, 2018)

#### 2.6.1.3 Linhas experimentais:

Foram realizados os seguintes experimentos:

##### **a) Experimento número 1 – Estimulação elétrica de SCPd após a aplicação da dopamina central**

Os animais passaram pela cirurgia esterotáxica e, cinco dias depois, foram submetidos ao modelo de estimulação elétrica da SCPd.

Uma primeira medida dos limiares de “congelamento”, de fuga e de “congelamento” pós-estimulação foi realizada, e os animais foram tratados com de DA central ou veículo. Cinco minutos depois, tiveram seus limiares medidos novamente.

Ao final do experimento, foi realizada uma perfusão intracardíaca para a remoção do encéfalo para conferir se o quimitrodo estava no lugar certo.

Figura 2 — Representação esquemática da linha experimental do experimento número 1



**b) Experimento número 2 – Estimulação elétrica da MCPd após aplicação de dopamina intranasal**

Os animais passaram pela cirurgia esterotáxica e, cinco dias depois, foram submetidos ao modelo de estimulação elétrica da SCPd.

Uma primeira medida dos limiares de “congelamento”, de fuga e de “congelamento” pós-estimulação foi realizada, e os animais foram tratados com 1 ou 2 mg/kg de DA intranasal ou veículo e, cinco minutos depois, tiveram seus limiares de defesa medidos novamente.

Ao final do experimento, foi realizada a uma perfusão intracardíaca para a remoção do encéfalo para conferir se o quimirodo estava no lugar certo.

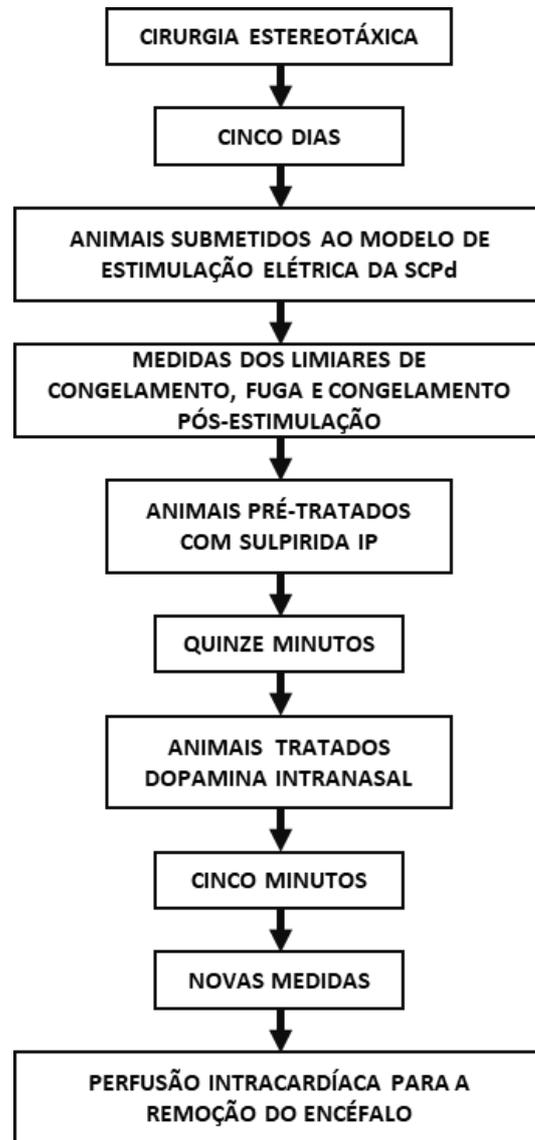
Figura 3 — Representação esquemática da linha experimental do experimento número 2



**c) Experimento número 3 – Estimulação elétrica da SCPd após aplicação de dopamina intranasal em animais pré-tratados com sulpirida por via i.p.**

Os animais passaram pela cirurgia esterotáxica e, cinco dias depois, foram submetidos ao modelo de estimulação elétrica da SCPd.

Figura 4 — Representação esquemática da linha experimental do experimento número 3



Uma primeira medida dos limiares de “congelamento”, de fuga e de “congelamento” pós-estimulação foi realizada e os animais foram primeiramente pré-tratados com 40mg/kg sulpirida por via i.p. ou veículo e, após 15 minutos, foram tratados com 2 mg/kg de DA por via intranasal ou veículo e, 5 minutos depois, tiveram seus limiares de defesa medidos novamente.

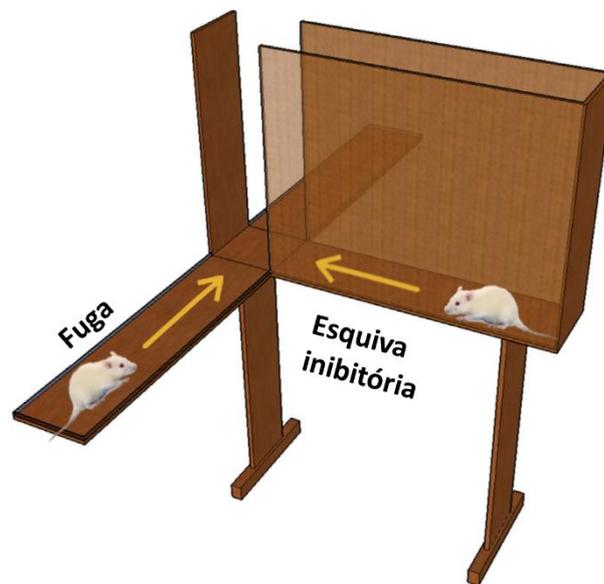
Ao final do experimento, foi realizada uma perfusão encefálica por via intracardíaca, seguida pela fixação e remoção do encéfalo para conferir se o eletrodo estava no lugar certo.

## 2.6.2 Labirinto em T elevado

### 2.6.2.1 Equipamento

O aparato experimental consistiu em um labirinto em cruz elevado a 50 cm do solo, que teve o acesso, de um dos seus braços fechados, bloqueados para ser utilizado como labirinto em T elevado.

Figura 5 — Visão esquemática do teste de labirinto em T elevado



Fonte: Zangrossi Jr. e Graeff (Adaptado).

O labirinto em cruz elevado é feito de madeira é constituído por dois braços abertos opostos a outros dois braços fechados do mesmo tamanho (50 x 10 cm). Um dos braços fechados foi bloqueado com uma lâmina de madeira e transformado em um labirinto com três braços (dois braços abertos e um fechado), caracterizando o modelo de labirinto em T elevado (LTE).

Esses três braços se encontravam em uma área central (10 x 10 cm). Bordas de acrílico transparente (0,5 cm de altura) permeavam os braços abertos a fim de evitar quedas dos animais.

O labirinto encontrava-se em uma sala com isolamento acústico iluminada com uma lâmpada de 40 W.

### 2.6.2.2 Procedimento Experimental

Um dia antes do teste, os animais passaram por uma habituação de 20 minutos no braço aberto do aparato. Este procedimento minimiza a interferência do comportamento exploratório.

O experimento consiste em três exposições seguidas, a partir do braço fechado para as medidas de latência de esquiva e três exposições seguidas, a partir dos braços abertos para registro da latência de fuga.

Para cada tentativa, foram adotados intervalos de 30 segundos entre cada exposição e tolerância máxima de 5 minutos para a ocorrência do comportamento (RONCON et al., 2015).

O comportamento de esquiva foi padronizado a partir da latência da primeira saída do animal do braço fechado em direção ao braço aberto. Isso significa que, assim que o animal era colocado no final do braço fechado, contabilizava-se o tempo até a primeira saída do animal (com as quatro patas) desse braço para um dos braços abertos.

O comportamento de fuga, no entanto, foi registrado como a saída do braço aberto rumo aos braços fechados do teste de LTE. Foi registrada latência de entrada no braço fechado, a partir do início do experimento, quando o animal é posto no final do braço aberto.

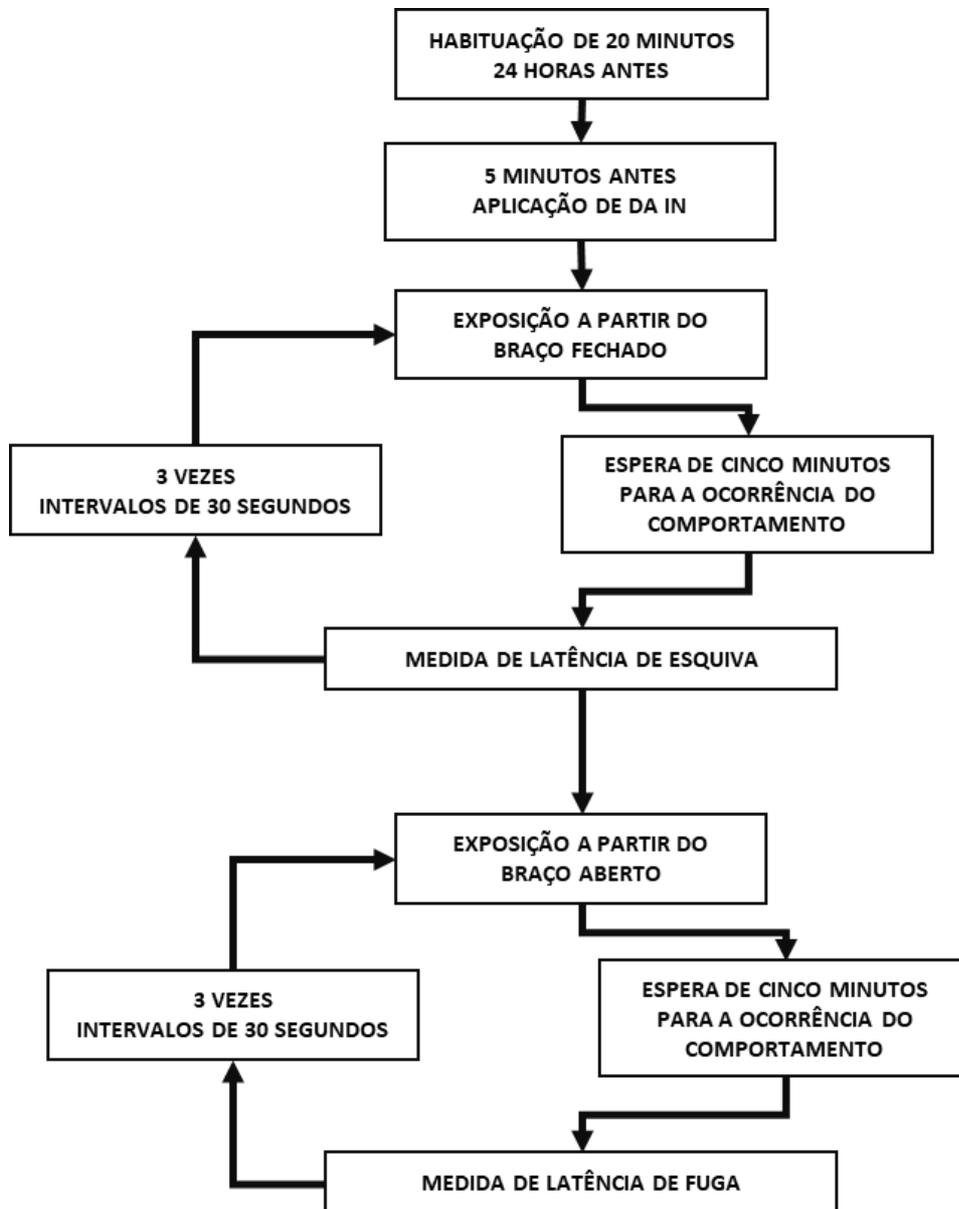
Vale ressaltar que, no momento da aferição da latência da fuga, o animal era colocado no braço aberto em que foi habituado no dia anterior (RONCON et al., 2015).

### 2.6.2.3 Linha experimental.

Vinte e quatro horas após o procedimento de habituação ao braço aberto, os animais receberam DA-IN ou seu veículo e foram submetidos ao LTE.

Foram medidas as latências de ida do braço fechado para o braço aberto (3 vezes), bem como a latência de idas do braço aberto para o fechado (3 vezes) com intervalo de 30 segundos entre cada medida.

Figura 6 – Representação esquemática da linha experimental do experimento número 4



## 2.6.3 Modelo do Campo Aberto

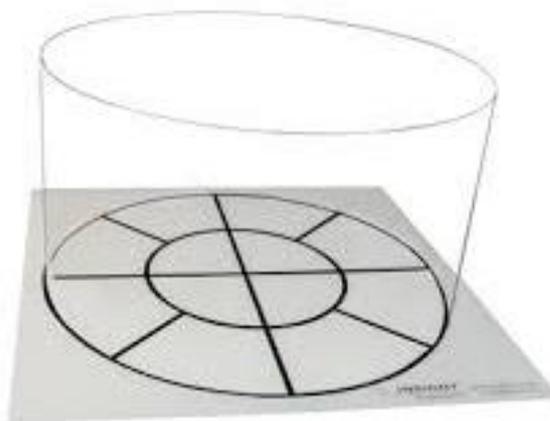
### 2.6.3.1 Equipamento

O aparato experimental consistiu em uma arena circular, construída com acrílico cristal (60 cm de diâmetro x 50 cm de altura), e composta por uma base tracejada que delimita o centro e as bordas. A arena circular era localizada em uma sala com isolamento acústico, e iluminada com uma lâmpada 40 W.

### 2.6.3.2 Procedimento Experimental

O animal foi colocado no centro da arena e foi permitido que este explorasse livremente o ambiente por um período de cinco minutos.

Figura 7 — Visão esquemática do modelo de campo aberto utilizado no experimento.



Fonte: Insight Equipamentos Ltda.

Após esse período, o animal foi retirado da arena e colocado de volta em sua caixa. Foram registrados a frequência de cruzamentos da borda e do centro, assim como o tempo que o animal permaneceu em cada região da arena. As sessões foram gravadas e analisadas posteriormente.

### 2.6.3.3 Linha experimental

Os animais receberam DA-IN ou seu veículo e foram submetidos ao modelo de campo aberto.

Foram medidos o número de cruzamento no centro e na borda do assoalho da arena e o tempo de permanência em cada região.

Figura 8 — Representação esquemática da linha experimental do experimento número 5



#### 2.6.4 Modelo da Arena Poligonal para Serpentes (com Confronto entre Presa *versus* Predador)

##### 2.6.4.1 Equipamento

O aparato experimental consistiu em uma arena poligonal enriquecida (154 x 72 x 64 cm, feita com acrílico cristal, revestido de *insulfim*), disposta sobre uma superfície de granito (170 x 85 x 02 cm), para minimizar vibrações, e munida com uma toca artificial (36 x 26 x 12,5 cm, com duas saídas diametralmente opostas), e com duas plataformas de escape com acesso feito por meio de escadas de acrílico transparente (7 x 4 x 10,5 cm).

Para o registro dos comportamentos, foi utilizada uma câmera filmadora Sony (*Handcam HDRCX350*, Tóquio, Japão).

##### 2.6.4.2 Procedimento Experimental

Durante dois dias, antes do confronto, os animais foram acondicionados em uma arena poligonal enriquecida para habituação sob ciclo claro/escuro de 12/12h e com temperatura entre 22-25°C, com livre acesso à comida e água, exceto no dia do experimento.

No dia do experimento, os animais foram removidos da arena poligonal e após a limpeza da arena com solução alcoólica a 20 %, uma serpente foi colocada no lado oposto ao da toca. Posteriormente, cada animal foi colocado na arena poligonal no lado oposto ao da toca, e no canto oposto àquele em se encontrava a serpente, com o auxílio de uma rede.

Depois de um confronto de 5 minutos, os animais foram removidos da arena poligonal, com o auxílio de uma rede. A cada grupo de 5 animais, a serpente foi substituída por outra. Nenhum animal foi utilizado em mais de um confronto.

Foi analisada a frequência dos seguintes comportamentos antipredatórios exibidos pelos ratos, segundo COIMBRA et al. (2017a):

(I) atenção defensiva (interrupção do comportamento em curso e perscrutação do ambiente, com farejo do ar e atenção voltada para o predador, e imobilidade menor que 5 segundos);

(II) imobilidade defensiva (arqueamento do dorso, interrupção do comportamento em curso ou imobilidade com pelo menos 6 segundos de duração, em geral seguida de alterações neurovegetativas visíveis, tais como piloereção, exoftalmia, micção e defecação);

(III) avaliação de risco (movimentos de estiramento do corpo, com o ventre colado ao assoalho da arena);

(IV) fuga não orientada (corridas não orientadas para os locais de abrigo);

(V) fuga orientada (corridas orientadas para a toca ou para as plataformas elevadas de escape);

(VI) interações com o predador (contato próximo entre presa e predador, com farejo e eventuais mordidas exploratórias);

(VII) levantamento (elevação vertical do corpo, com apoio das patas anteriores nas laterais da arena, ou elevação destas sem apoio);

(VIII) esquiva inibitória, tempo que os animais permaneciam na toca após uma fuga direcionada para a toca, evitando retornar ao ambiente ocupado pela serpente, em geral com a cabeça exposta em uma das entradas da toca, e com visão direta do predador.

Figura 9 - Alguns comportamentos apresentados pelos ratos em confronto com serpente

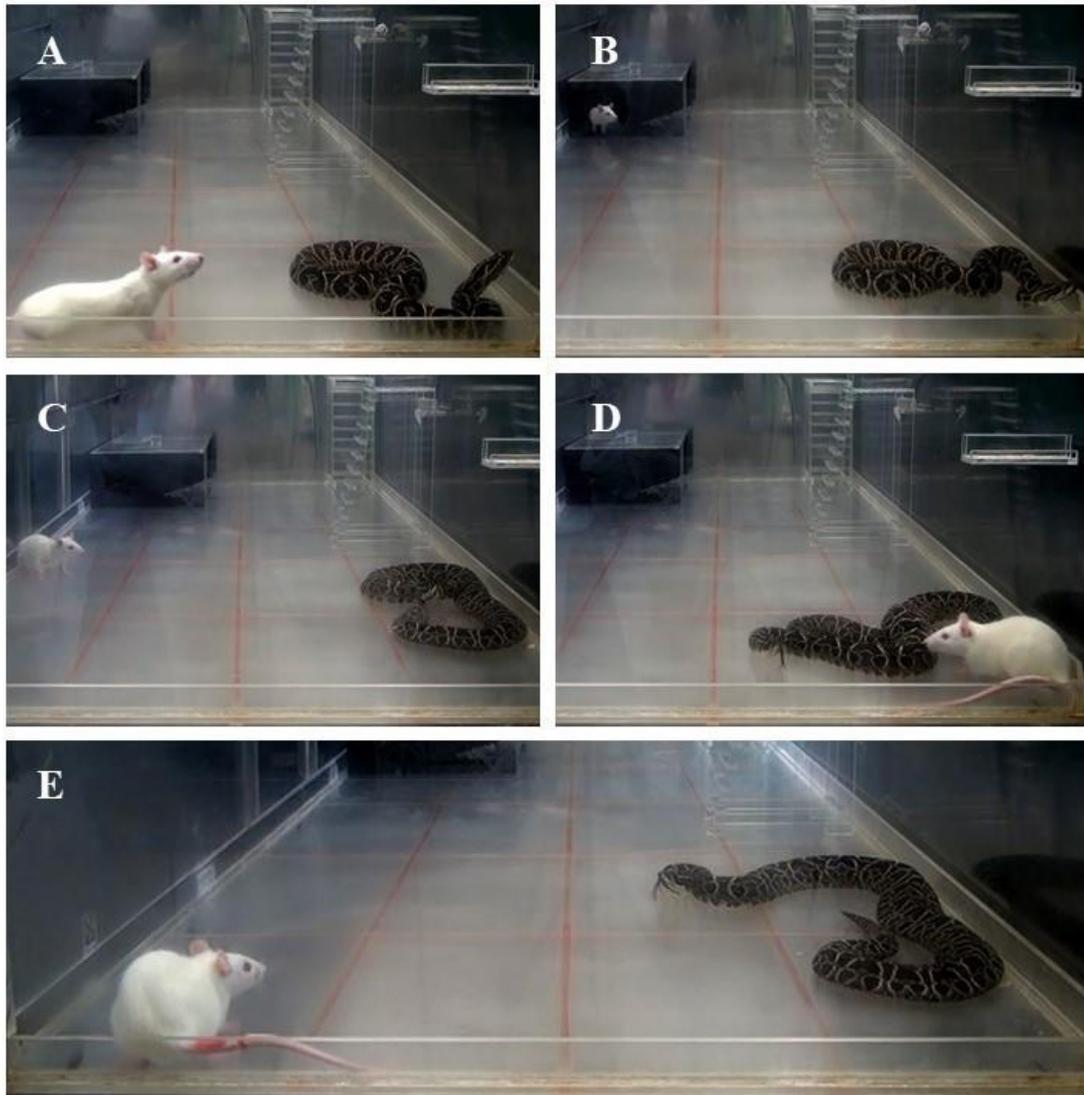


Figura 10 - Alguns comportamentos apresentados pelos ratos em confronto com serpente urutu-cruzeiro (*Bothrops alternatus*). A; aproximação cautelosa. B: esquivia inibitória. C; alerta defensivo. D: Interação entre presa e predador. E: Imobilidade defensiva (freezing). Fonte: Sgobbi, RF et al, 2020 (dados não publicados).

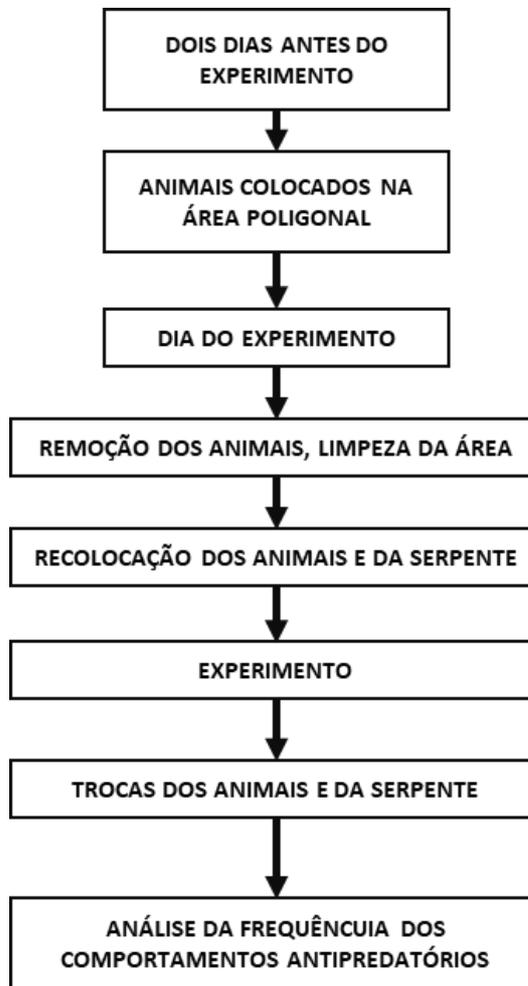
Na figura 9, observam-se os comportamentos defensivos evocados por *Rattus norvegicus* confrontados com a serpente peçonhenta urutu-cruzeiro sul-americana (*Bothrops alternatus*) por cinco minutos, no teste da arena poligonal enriquecida para serpentes, onde a arena era munida com toca artificial e duas pequenas plataformas elevadas para fuga, acessadas por meio de escadas de acrílico.

#### 2.6.4.3 Linha Experimental

Os animais receberam DA-IN ou seu veículo e foram submetidos ao teste da arena poligonal para serpentes (com confronto entre presa e urutu-cruzeiro). Foram medidos os comportamentos de defesa acima descritos, como também o tempo de permanência no local

seguro, ora na toca, ora na escada, como especificado alhures (COIMBRA, et al., 2017a; ALMADA et al., 2021)

Figura 11 - Representação esquemática da linha experimental do experimento número 6



## 2.7 HISTOLOGIA

Os animais que passaram pelo procedimento de cirurgia esterotáxica foram encaminhados à perfusão encefálica. Para isso, foram anestesiados com uma solução na proporção de 0,1 ml de cetamina (*Ketamina*, frasco de 10 ml) para 0,2 ml de xilasina (Dopaser, frasco de 10 ml) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com solução de NaCl a 0.9%, em volume suficiente para retirar todo o sangue do animal, seguida por solução tamponada de paraformaldeído a 4%, em volume suficiente para fixar os tecidos.

Os encéfalos foram retirados e mantidos no fixador até serem seccionados no criostato (Leica CM 1950) em secções histológicas de 20  $\mu\text{m}$  de espessura. As secções histológicas foram dispostas em lâminas de vidro, gelatinizadas, secas ao ar e coradas com hematoxilina e eosina em um sistema robotizado de histologia (Leica Autostainer XL, modelo CV5030).

Posteriormente, os cortes foram analisados com o auxílio de microscopia de luz (AxioImager Z1, Zeiss) e a posição das pontas das agulhas de microinjeção do neuroeixo foram assinaladas em anagramas do atlas de Paxinos e Watson (2007).

Somente animais com sinais de presença da extremidade final da agulha injetora dentro das estruturas estudadas foram incluídos na análise estatística.

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados com média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e foram analisados pelo *software GraphPadPrism 8.0* (GraphPad Software, Inc., USA).

Para a análise dos dados do Experimento número 1, foi realizado um teste *t* não-pareado, tendo em vista a presença de apenas dois grupos experimentais independentes. Nos experimentos 2, 3 e 5, uma ANOVA de uma via foi aplicada, tendo como fator condição o tratamento recebido pelo animal. Quando o resultado do teste foi significativo, o teste *post hoc* de Tukey foi realizado ( $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo)

Os dados do Experimento número 4 foram submetidos à ANOVA de duas vias com medidas repetidas, onde os fatores foram o tratamento e a tentativa (fator de repetição). Nesse caso, um teste *post hoc* de Tukey também foi aplicado caso a significância dos fatores tenha sido apontada ( $p < 0,05$  considerado estatisticamente significativo).

Para o Experimento número 6, os dados foram submetidos a uma ANOVA de duas vias, sendo os fatores o Tratamento e a Exposição (serpente de brinquedo ou serpente real). Diferenças significativas entre médias entre os grupos foram determinadas através do teste post-hoc de Tukey ( $p < 0,05$  considerado estatisticamente significativo).

### 3. RESULTADOS

Representação ilustrativa dos locais de implantação do quimitrodo na SCPd

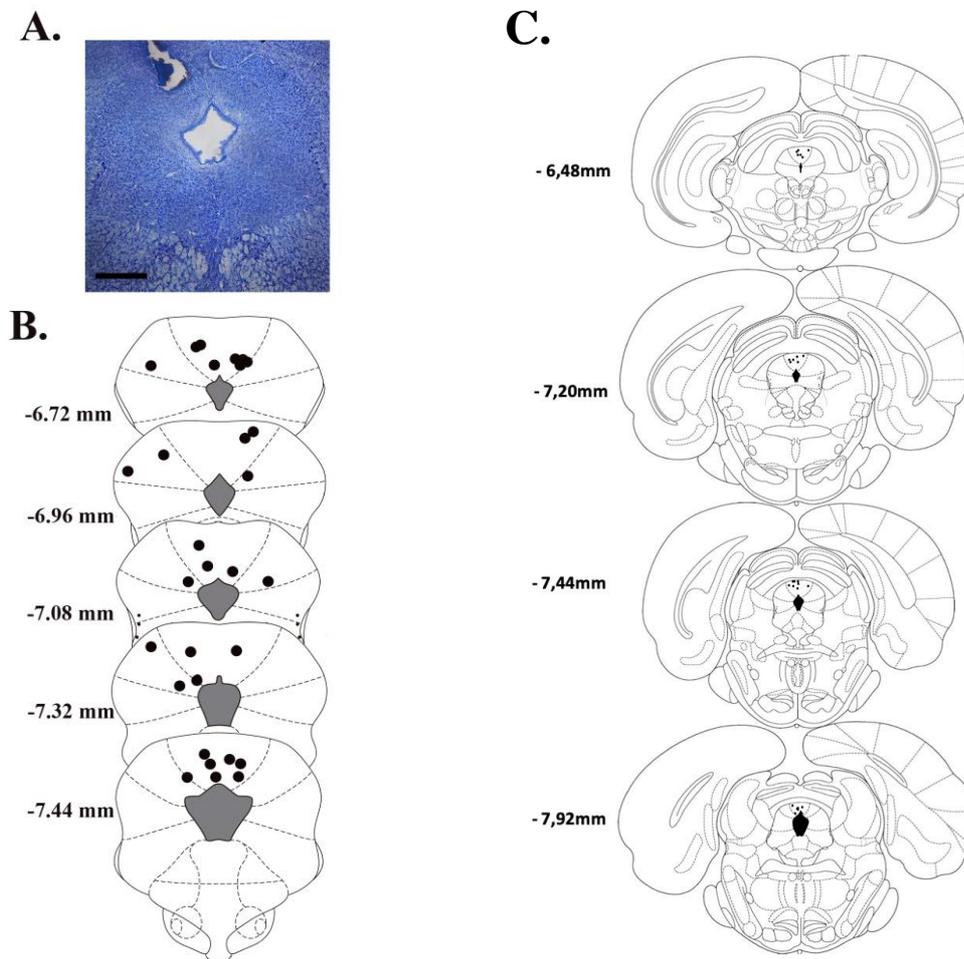


Figura 12 -Locais para implantação do eletrodo nas colunas dorsais de substância cinzenta periaquedutal (dPAG) (A) Fotomicrografia de uma seção transversal do mesencéfalo murino, mostrando um local representativo de um eletrodo implantado na SCPd. (B) e (C) Representação de locais confirmados histologicamente (círculos hachurados em preto) de estimulação elétrica dPAG representada em diagramas modificados do atlas de Paxinos e Watson (2007), referentes nos experimentos 2 e 3 respectivamente. Barra de calibração = 200  $\mu$ m.

### 3.1 EXPERIMENTO NÚMERO 1

Os dados, representado na forma de delta (limiar da segunda medida – limiar da primeira medida) dos limiares de “congelamento” e de fuga, assim como do tempo de “congelamento” pós-estimulação da SCPd (CPE) de animais controles (tratados com PBS a 0,1 M) e tratados intra-SCPd com DA (40 nmol/ 0,2  $\mu$ l) foram submetidos a um teste *t* não-pareado.

Para os deltas do “congelamento” e de fuga, o teste mostrou ausência de efeitos significativos entre os tratamentos ( $t_{12}= 1,00, p > 0,05$ ) (Figura 12A) e ( $t_{12}= 0,34; p > 0,05$ ) (Figura 12B), respectivamente, assim como para os deltas do CPE-SCPd ( $t_{12}= 0,5; p > 0,05$ ) (Figura 12C).

Valores em delta dos limiares defensivos obtidos no experimento número 1

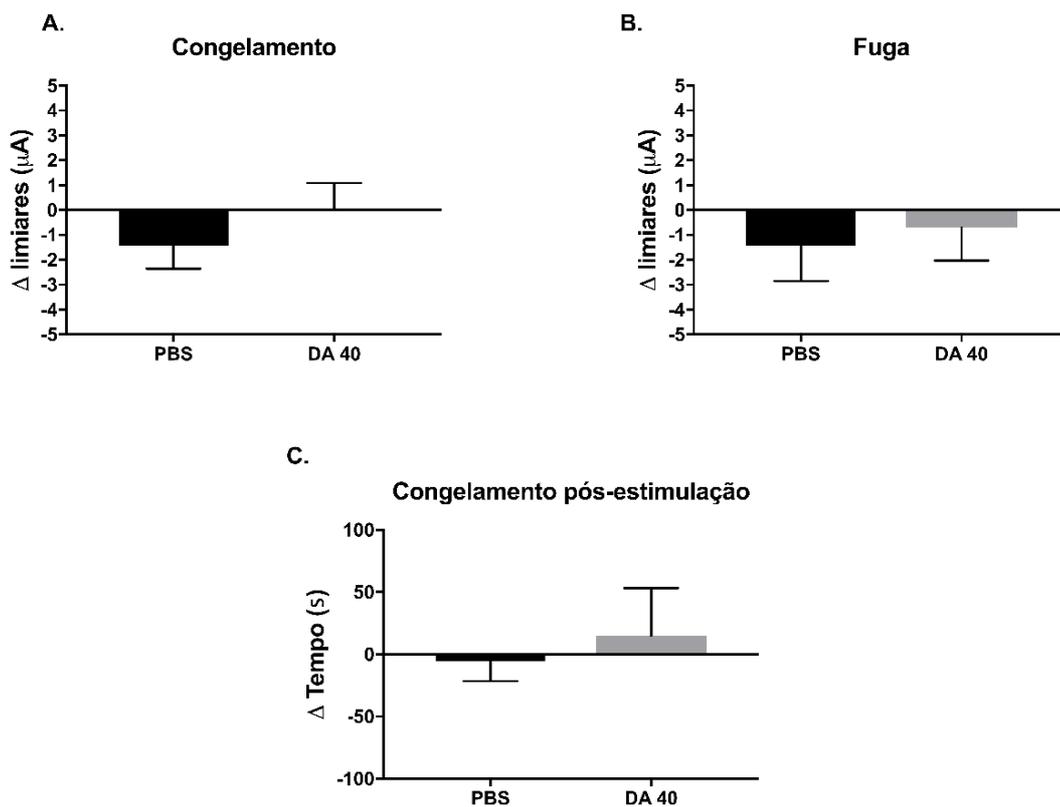


Figura 13 - Ausência de efeito do tratamento com dopamina no comportamento de defesa elicitado por estimulação

elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd). Os dados foram apresentados como delta dos limiares de “congelamento” (A), de fuga (B) e do tempo de “congelamento” pós-estimulação da SCPd (C) de ratos tratados com PBS 0,1 M (grupo controle) e dopamina (40 nmol/ 0,2  $\mu$ l; DA) intra-SCPd. Os dados são

expressos em média + erro padrão da média (n=7 em cada grupo).  $P > 0,05$ , em todos os casos, segundo o teste *t* de Student não-pareado

### 3.2 EXPERIMENTO NÚMERO 2

Os dados, apresentados na forma de delta (limiar da segunda medida - limiar da primeira medida) dos limiares de “congelamento” e de fuga, assim como do tempo de “congelamento” pós-estimulação da SCPd de animais tratados com GEL (veículo, VEI) e dopamina intranasal (1 e 2 mg/kg, DA-IN), foram submetidos a uma ANOVA de uma via.

Considerando os deltas do “congelamento” e CPE-SCPd, segundo a ANOVA de uma via houve ausência de efeitos significativos entre os tratamentos ( $F_{2,27} = 2,65$ ;  $p > 0,05$ ) e ( $F_{2,27} = 4,58$ ;  $p > 0,05$ ), respectivamente (Figuras 13A e 13C). Para os deltas de fuga, no entanto, segundo a ANOVA de uma via, houve diferença significativa entre os tratamentos ( $F_{2,27} = 3,61$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 13B). Ratos tratados com DA-IN na dose de 2 mg/kg apresentaram aumento dos limiares de fuga em relação aos animais tratados com GEL (teste *post-hoc* de Tukey;  $p < 0,05$ ), como mostrado na figura 13B.

Valores em delta dos limiares do comportamento de defesa relacionados ao experimento 2

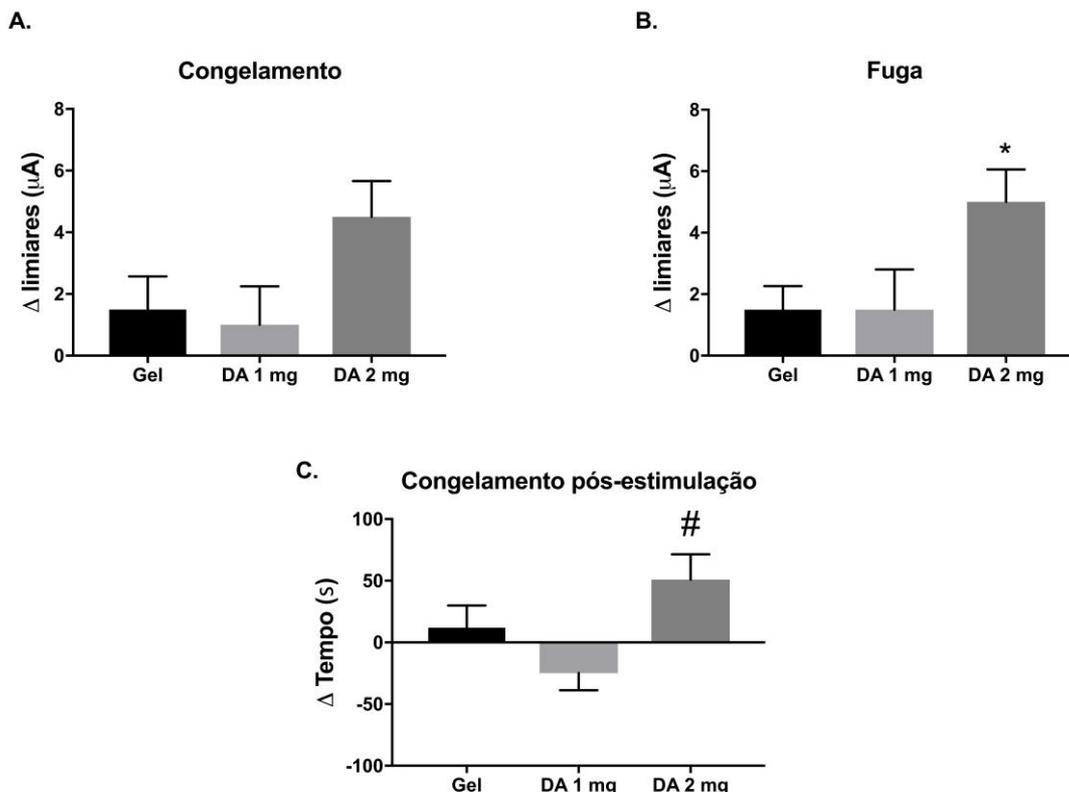


Figura 14 - Efeito do tratamento intranasal com dopamina no comportamento de defesa elicitado por estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd). Os dados foram apresentados como delta dos limiares de “congelamento” (A), de fuga (B) e do tempo de “congelamento” pós-estimulação da SCPd (C) de

ratos tratados com GEL (veículo, VEI) e dopamina intranasal (1 e 2 mg/ kg; DA-IN). Os dados são expressos em média + erro padrão da média (n=7 em cada grupo). \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo tratado com GEL; #  $p < 0,05$  comparado a DA na menor dose (1 mg/ kg), de acordo com a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

### 3.3 EXPERIMENTO NÚMERO 3

Os dados, apresentados na forma de delta (limiar da segunda medida - limiar da primeira medida) dos limiares de congelamento e de fuga, assim como do tempo de “congelamento” pós-estimulação da SCPd de animais tratados com GEL (veículo, VEI) e dopamina intranasal (2 mg/ kg, DA-IN) e pré-tratados com sulpirida ou seu respectivo veículo, foram submetidos a uma ANOVA de uma via.

Considerando os deltas do “congelamento” e CPE-SCPd, segundo a análise de variância de uma via, houve ausência de efeitos significativos do tratamento ( $F_{3, 24} = 1.700$ ;  $p > 0,05$ ) e ( $F_{3, 24} = 0.7706$ ;  $p > 0,05$ ), respectivamente (Figuras 14A e 14C). Considerando os deltas dos limiares de fuga, no entanto, segundo a ANOVA de uma via, houve efeito significativo do tratamento ( $F_{3, 24} = 6.293$ ;  $p < 0,05$ ). A administração de DA por via IN na dose de 2 mg/kg causou uma elevação significativa do limiar de fuga, em relação ao controle, como mostrado na Figura 14B (teste *post-hoc* de Tukey;  $p < 0,05$ ). Ratos tratados com DA IN na dose de 2 mg/ kg apresentaram aumento dos limiares de fuga em relação aos animais tratados com GEL/Veículo e DA-IN/ Sulpirida.

Valores em delta dos limiares do comportamento de defesa relativos ao experimento 3

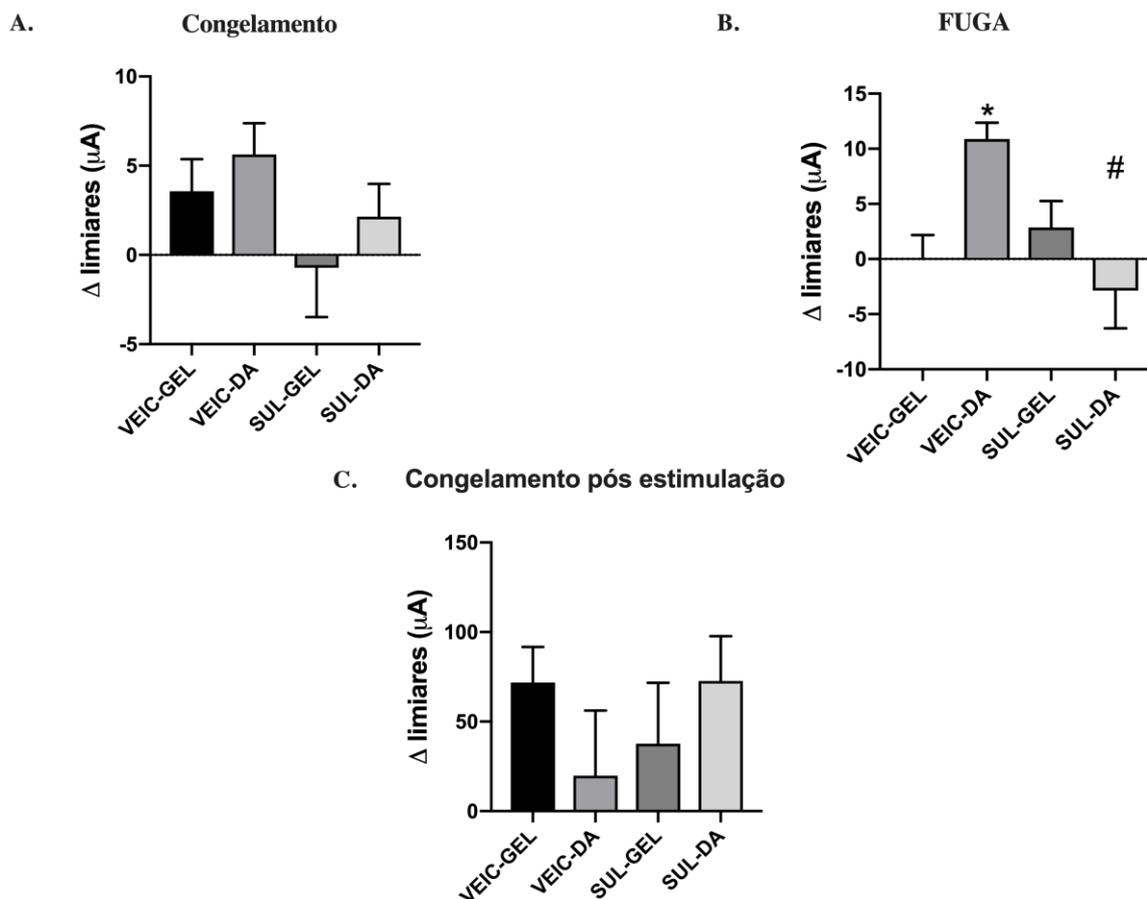


Figura 15 - Efeito do tratamento intranasal com dopamina ou sulpirida + dopamina no comportamento de defesa eliciado por estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd). Os dados foram apresentados como as diferenças nos limiares de “congelamento” (A), de fuga (B) e do tempo de “congelamento” pós-estimulação (C) registrados antes e após o tratamento intraperitoneal combinado de sulpirida (SUL; antagonista D2, 40 mg/kg) ou solução *Tween 80* a 2% (veículo) e de tratamento intranasal (5 μL em cada narina) com GEL (veículo) ou com dopamina (DA; 2 mg/kg) em ratos submetidos à estimulação elétrica da SCPd. Os dados são expressos como a média ± EPM (n = 8 por grupo). \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo gel-veículo; #  $p < 0,05$  em comparação ao grupo VEI-DA, de acordo com a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

### 3.4 EXPERIMENTO NÚMERO 4

Os dados relacionados ao tempo de esquia e fuga apresentados por ratos submetidos ao teste de LTE por animais controles (sem tratamento) e tratados com GEL (veículo) e DA IN foram submetidos à ANOVA de duas vias com medidas repetidas.

Considerando a latência do comportamento de esquiva, segundo a *two-way ANOVA* de medidas repetidas, houve efeito significativo do fator tentativa ( $F_{2,80} = 17,80$ ,  $p < 0,05$ ), mas não do fator tratamento ( $F_{2,40} = 2,12$ ;  $p > 0,05$ ), nem referente à interação entre tratamento *vs* tentativa ( $F_{4,80} = 1,32$ ;  $p > 0,05$ ) (Figura 15A). No que se refere ao tempo da fuga, segundo a *two-way ANOVA* de medidas repetidas, houve efeito significativo da tentativa ( $F_{2,80} = 11,20$ ,  $p < 0,05$ ), mas não do tratamento ( $F_{2,40} = 1,22$ ;  $p > 0,05$ ), nem da interação tratamentos *vs* tentativa ( $F_{4,80} = 1,17$ ;  $p > 0,05$ ) (Figura 15B).

Valores em delta tempo de esquiva e fuga relativos ao experimento número 4

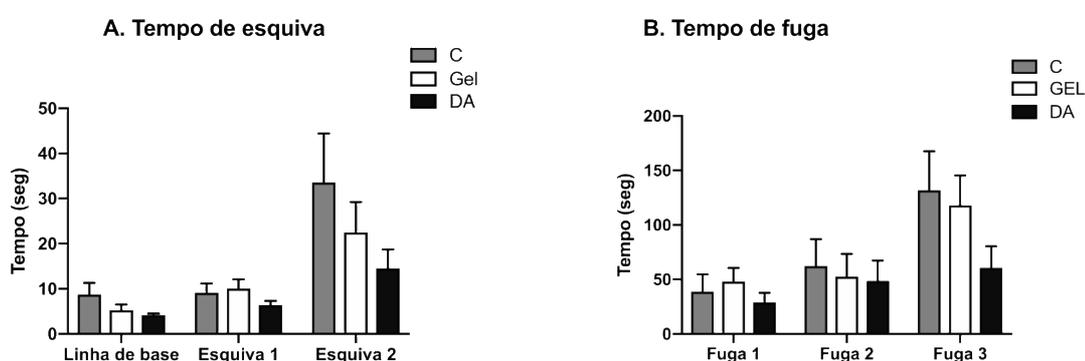


Figura 16 - Ausência de efeito do tratamento intranasal com dopamina (2 mg/kg) no comportamento de defesa eliciado dos ratos expostos ao teste do labirinto em T elevado. Os dados são expressos em média + erro padrão da média ( $n=11$  para o grupo C;  $n=16$  para os grupos DA IN e GEL) do tempo de esquiva (A) e de fuga (B) de ratos tratados com dopamina intranasal (DA-IN) e GEL (veículo) e não tratados (controles, C).  $P > 0,05$  em todos os casos, segundo a ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

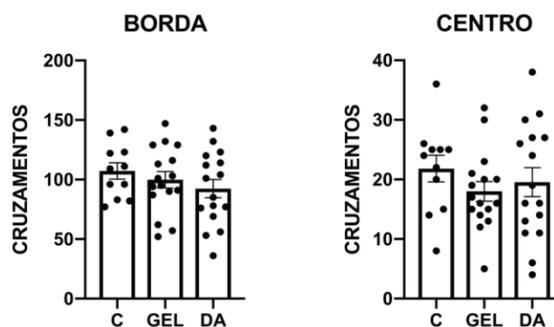
### 3.5 EXPERIMENTO NÚMERO 5

O número de cruzamentos e o tempo de permanência na borda e no centro da arena por animais controles (sem tratamento) e tratados com GEL (veículo) e DA-IN foram submetidos à ANOVA de uma via.

No que se refere ao número de cruzamentos na borda e no centro da arena circular, segundo ANOVA de uma via, não houve efeito significativo do tratamento ( $F_{2,40} = 0,95$ ,  $p > 0,05$ ) e ( $F_{2,40} = 0,72$ ;  $p > 0,05$ ), respectivamente (Figura 17A). Segundo a *one-way ANOVA*, houve ausência de efeito significativo do tratamento no que se refere ao tempo de permanência na borda e no centro da arena circular ( $F_{2,40} = 0,02$ ;  $p > 0,05$ ) e ( $F_{2,40} = 0,03$ ;  $p > 0,05$ ), respectivamente (Figura 17B).

Números de cruzamentos e tempo de permanência no experimento 5

### A. Número de cruzamentos



### B. Tempo de permanência

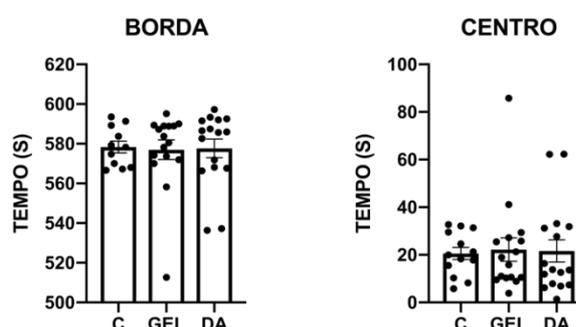


Figura 17 - Ausência de efeito do tratamento intranasal com dopamina (2 mg/kg) no comportamento de ratos expostos ao teste de campo aberto. Os dados são expressos em média + erro padrão da média (n=11 para o grupo C; n=16 para os grupos DA IN e GEL) do número de cruzamentos (A) e tempo de permanência (B) na borda e no centro da arena circular dos ratos submetidos à arena circular. DA-IN: tratamento com dopamina intranasal; GEL; tratamento com veículo; C: Grupo controle, não tratado.  $P > 0,05$  em todos os casos, segundo a ANOVA de uma, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

## 3.6 EXPERIMENTO NÚMERO 6

No que se refere à frequência dos comportamentos defensivos dos grupos de animais tratados com GEL ou DA IN nas condições serpente de brinquedo ou serpente real os dados foram submetidos a uma ANOVA de duas vias, seguida, quando apropriado, pelo teste *post hoc* de Tukey. Os roedores, quando confrontados com as serpentes no teste da arena poligonal para serpentes, eliciaram um claro comportamento de defesa induzido pelo medo inato, expresso por esquiva inibitória (Figura 18 C), fuga orientada para locais seguros (Figura 19 A), e consequente aumento do tempo de permanência na toca (Figura 19, B).

Considerando-se os comportamentos similares à ansiedade, no que se refere aos comportamentos de avaliação de risco e de atenção defensiva, segundo a *two-way ANOVA*, não houve efeito significativo do tratamento ( $F_{1,30} = 0,409$ ;  $p > 0,05$ ) e ( $F_{1,30} = 0,0018$ ;  $p >$

0,05), nem da exposição ( $F_{1,30} = 0,246; p > 0,05$ ) e ( $F_{1,30} = 4,83; p > 0,05$ ), tampouco efeito significativo da interação entre os dois fatores ( $F_{1,30} = 1,97; p > 0,05$ ) e ( $F_{1,30} = 0,537; p > 0,05$ ). Considerando a resposta de esquiva inibitória, segundo a *two-way ANOVA*, houve efeito significativo na exposição ( $F_{1,30} = 14,6; p < 0,05$ ), porém não houve efeito significativo do tratamento ( $F_{1,30} = 0,146; p > 0,05$ ), e nem da interação entre tratamento versus exposição ( $F_{1,30} = 0,146; p > 0,05$ ). Esses dados são mostrados na figura 18.

Considerando as respostas comumente relacionadas a ataques de pânico ou medo intenso, no que se refere aos comportamentos de fuga orientada, segundo a *two-way ANOVA*, houve efeito significativo do fator exposição ( $F_{1,30} = 9,85; p < 0,05$ ), porém não houve efeito significativo no tratamento ( $F_{1,30} = 2,14; p > 0,05$ ), nem da interação entre exposição e tratamento ( $F_{1,30} = 0,355; p > 0,05$ ) (dados mostrados na figura 19a). Não obstante, no que se refere ao tempo de permanência na toca, após a evocação do comportamento de fuga orientada para locais seguros, segundo a *two-way ANOVA*, houve efeito significativo da exposição ( $F_{1,30} = 52,4; p < 0,05$ ), do tratamento ( $F_{1,30} = 12,6; p < 0,05$ ) e da interação entre esses dois fatores ( $F_{1,30} = 4,1; p < 0,05$ ). Os animais tratados com DA IN ficaram menos tempo no lugar seguro quando confrontados com a serpente real do que os animais tratados com GEL e submetidos à presença da serpente, como mostrado (teste *post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ ), o que sugere destemor, como mostrado na Figura 19B.

No que se refere aos comportamentos exploratórios de levantamento, segundo a *two-way ANOVA*, houve efeito significativo do fator exposição ( $F_{1,30} = 14,4; p < 0,05$ ), mas não houve efeito estatisticamente significativo nem do fator tratamento ( $F_{1,30} = 0,287; p > 0,05$ ), nem tampouco da interação entre esses fatores ( $F_{1,30} = 0,287; p > 0,05$ ) (Figura 20A). Assim também, no que se refere ao comportamento de interação entre presa e predador, houve efeito significativo no fator exposição ( $F_{1,30} = 11,1; p < 0,05$ ), porém não foi encontrado resultado significativo no fator tratamento ( $F_{1,30} = 2,63; p > 0,05$ ) e nem na interação entre os dois fatores ( $F_{1,30} = 0,695; p > 0,05$ ) (Figura 20B).

## Comportamento de ratos ameaçados por serpentes (experimento número 6)

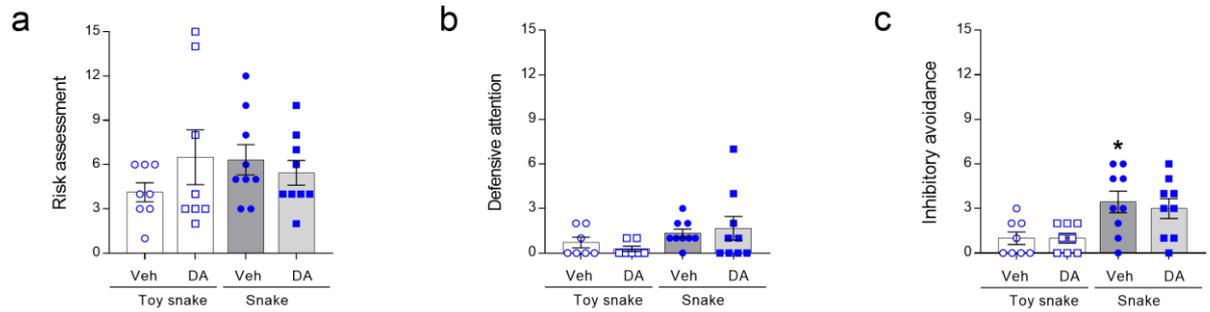


Figura 18 – Ausência de efeito do tratamento intranasal com dopamina (2 mg/kg) no comportamento de ratos Expostos ao teste da arena poligonal para serpentes, com confronto com urutu-cruzeiro. Os dados são expressos em média + erro padrão da média (n=8 para o grupo gel – serpente de brinquedo; n=8 para o grupo DA-IN + serpente de brinquedo; n= 9 para o grupo gel+ serpente; n= 9 para o grupo DA-IN + serpente) do número de avaliação de risco (A), atenção defensiva (B), e de esquiva inibitória (C). DA: tratamento com dopamina (por via intranasal; GEL: tratamento com veículo. \*  $P < 0,05$  em relação ao grupo tratado com veículo + serpente de brinquedo, segundo a ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

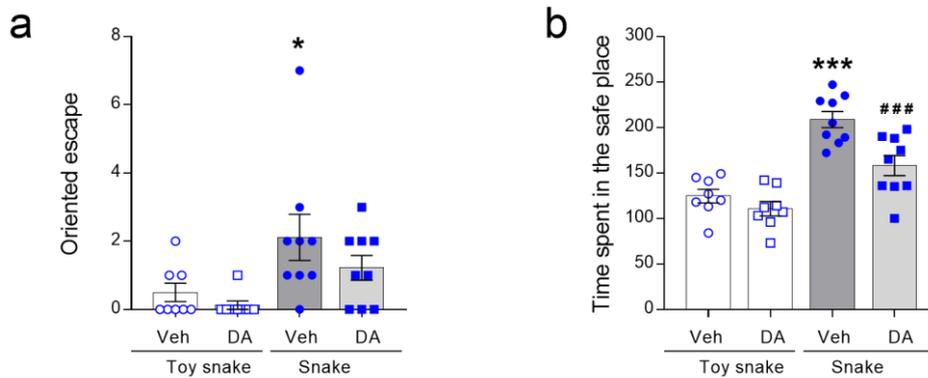


Figura 19 - Efeito do tratamento intranasal com dopamina (2 mg/kg) na frequência de fuga orientada e no tempo despendido em locais seguros (toca e plataformas de escape) de ratos expostos ao teste da arena poligonal para serpentes, com confronto com urutu-cruzeiro. Os dados são expressos em média + erro padrão da média (n=8 para o grupo gel + serpente de brinquedo; n=8 para o grupo DA + serpente de brinquedo; n= 9 par ao grupo gel + serpente; n= 9 para o grupo DA-IN + serpente) do número de fuga orientada (A) e tempo de permanência no local seguro (B). DA: tratamento com dopamina (por via intranasal); GEL: tratamento com veículo. \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo tratado com veículo (gel) e exposto à serpente de brinquedo; ###  $p < 0,001$ , quando comparado ao grupo tratado com veículo e exposto à serpente, segundo a ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

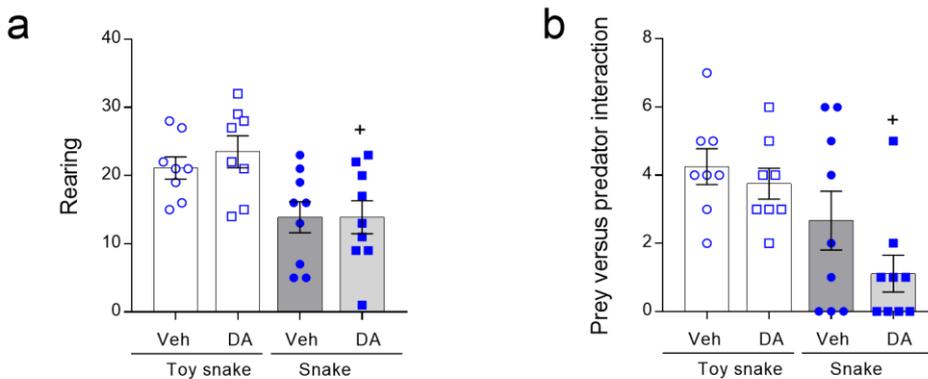


Figura 19 - Ausência de efeito do tratamento intranasal com dopamina (2 mg/kg) no comportamento de ratos expostos ao teste da arena poligonal para serpentes, com confronto com urutu-cruzeiro. Os dados são expressos em média + erro padrão da média (n=8 para o grupo gel - brinquedo; n=8 para o grupo DA brinquedo n= 9 gel serpente n= 9 DA serpente) do número de cruzamentos (A) frequência de levantamento (B) frequência interação com a presa; tratamento DA com dopamina intranasal; GEL; tratamento com veículo. +  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com DA-IN e confrontado com a serpente de brinquedo, segundo a ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

## 4 DISCUSSÃO

Essa tese teve como o seu objetivo geral compreender como a DA-IN mediava as respostas de pânico em quatro diferentes modelos comportamentais, trazendo contribuições sobre o papel da DA nessas respostas comportamentais de pânico, bem como testar a eficácia da utilização da via intranasal para aplicação de DA em modelos de pânico.

Este trabalho foi dividido em dois blocos de experimentos, os que envolvem o modelo de estimulação elétrica, que ocorreu em três etapas, e o bloco de experimentos correspondentes à exposição dos animais de laboratório aos modelos do campo aberto, do LTE e ao teste da arena poligonal para serpentes, confronto com um potencial predador. Utilizando esses modelos comportamentais, buscou-se investigar um possível papel da dopamina na expressão das respostas de pânico.

No experimento 1, a dopamina foi administrada diretamente na SCPd, a fim de compreender se o próprio neurotransmissor poderia influenciar nos limiares do comportamento de defesa inato. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos. No entanto, essa ausência de efeito significativo da injeção direta da dopamina em uma estrutura do teto mesencefálico, instigou-nos a pensar em outras formas de administrar a dopamina para que ela viesse ter algum possível efeito antiaversivo.

A administração de medicamentos pelas vias nasais é uma alternativa de medicação em animais de laboratório e pacientes (LOCHHEAD; THORNE, 2012; CHAPMAN et al., 2013; CARVALHO, DE et al., 2019). Os neurotransmissores e fármacos, quando aplicados através dessa via, podem entrar diretamente no cérebro contornando os obstáculos das barreiras hematoencefálica e *liquor*-encefálica, encontrando, assim uma rota direta para as estruturas encefálicas a partir do epitélio nasal, provavelmente através das vias extracelulares ao longo dos nervos olfatório e trigêmeo (DHURIA et al., 2010).

A DA não cruza a barreira hematoencefálica, mas pode, no entanto, atingir estruturas encefálicas por meio dessa via de administração de drogas, como já foi demonstrado anteriormente que a [<sup>3</sup>H] dopamina administrada pelas narinas de camundongos e ratos entra no cérebro sem alteração metabólica (DAHLIN et al., 2000, 2001).

A DA-IN também mostrou aumentar a DA extracelular no estriado dorsal e ventral (SOUZA SILVA, M. A. DE et al., 2008) ao se ligar ao transportador DA2 no *neostriatum* do rato (DE SOUZA SILVA et al., 2016).

Considerando o que já se sabe sobre o efeito da DA no comportamento relacionado ao pânico, onde vários estudos indicaram os efeitos antiaversivos da DA no *tectum*, com ênfase

na SCPd, nas camadas profundas do colículo superior e no colículo inferior (MUTHURAJU et al., 2014; de OLIVEIRA et al., 2014b; BRANDÃO et al., 2015b; BRANDÃO; COIMBRA, 2019), no presente trabalho, a dose 2 mg/kg de DA-IN aumentou o limiar de fuga, eliciado pela estimulação elétrica da SCPd (CARVALHO, et al., 2019), ou seja a DA-IN promoveu um efeito panicolítico no modelo de estimulação elétrica da SCPd. Esse resultado corrobora a ideia proposta por Brandão, em 2018, de que a DA liberada nas estruturas mesencefálicas durante a presença de um estímulo aversivo incondicionado, promoveria este efeito panicolítico (BRANDÃO et al., 2015b; BRANDÃO; COIMBRA, 2019)

Ainda no experimento 2, com relação ao “congelamento” após estimulação elétrica da SCPd, estudos na literatura já afirmam que essa resposta comportamental é resultado da ativação da projeção ascendente da SCPd (CARVALHO et al., 2015, 2018,2019), envolvendo em sua organização estruturas como o complexo amigdalóide e o hipocampo (FANSELOW, 1994; CARVALHO et al., 2013, 2015, 2018)

Acredita-se que, quando os neurônios da SCPd são ativados por estímulos aversivos, a informação percorre dois caminhos: o primeiro, percorrendo vias que conectam a SCPd a estruturas límbicas, as quais irão promover a reação de defesa (respostas de “congelamento” e de fuga), e o segundo em direção a circuitos neurais ascendentes (“congelamento” pós-estimulação).

O resultado encontrado, referente à atenuação do “congelamento” pós-estimulação causado por 1 mg/kg de DA administrada por via intranasal, destaca a evidência de que o tronco encefálico afeta o processamento de informações aversivas em áreas rostrais do neuroeixo (CARVALHO et al., 2015, 2018,2018).

No entanto, a provável ampla distribuição de DA, devido à via de administração, não limitaria sua ação aos receptores dopaminérgicos na SCPd. A DA também poderia atuar nos autoreceptores da ATV e, conseqüentemente, reduzir a atividade da via mesolímbica. Este fato talvez possa explicar o porquê de apenas a baixa dose de DA afetou o “congelamento” pós-estimulação (CARVALHO, 2019).

Retomando a questão de quais receptores estariam envolvidos na modulação das respostas comportamentais, no experimento 3, os animais foram submetidos a um pré-tratamento com injeção i.p. de sulpirida. A DA-IN aumentou o limiar de fuga (um efeito antiaversivo) e a sulpirida bloqueou esse efeito. Isso sugere que os efeitos da DA deram-se via receptores D2. Não se pode afirmar, contudo, se esses receptores são os que estão localizados na SCPd, devido à administração da sulpirida por via intraperitoneal, e um próximo passo

pertinente seria realizar um novo estudo, injetando o antagonista sulpirida diretamente na SCPd.

Quanto a isso, sabe-se que a SCPd possui receptores do tipo D2, pois a injeção de sulpirida, esse antagonista do receptor D2, na SCPd, causou alterações das respostas defensivas nos modelos comportamentais de respostas de fuga a um estímulo luminoso (medo condicionado), e reduziu o número de entradas e o tempo despendido nos braços abertos do teste do labirinto em cruz elevado (MUTHURAJU et al., 2016). Logo, estes dados sugerem que a ação DA poderia ser mediada por receptores do tipo D2 da SCPd, uma evidência que abre caminhos para as futuras investigações.

Na presente investigação, um resultado similar foi obtido no experimento 2, em que a DA-IN na dose de 2mg/kg aumentou o limiar de fuga dos animais submetidos à estimulação elétrica da SCPd, o que foi também observado no experimento 3, corroborando os dados anteriores, que sugerem um efeito antiaversivo da dopamina.

Investigações futuras precisam também ser planejadas para investigar uma possível participação dos receptores D1 na ação antiaversiva da dopamina, pois há evidências na literatura que sugerem uma possível participação na mediação deste receptor nas respostas defensivas (BURKEY et al., 1999; de OLIVEIRA et al., 2006; de SOUZA CAETANO et al., 2013).

Vale ressaltar que, no experimento 3, resultado similar àquele obtido no estudo anterior, a respeito do efeito no “congelamento” pós-estimulação, não foi replicado, pois a dose de 1 mg/kg de DA não foi utilizada.

Como o foco deste estudo foi compreender o efeito da DA-IN na resposta de pânico, expressa diretamente por estimulação da SCPd, utilizou-se antes da aplicação intranasal de DA o pré-tratamento dos animais com sulpirida na dose que teve efeito nesse comportamento.

Não se sabe exatamente quais áreas do cérebro foram ativadas pela DA-IN em sua ação sobre essas respostas de medo. Entretanto, pode-se inferir que o mecanismo de ação da DA aplicada por via IN pode ser semelhante ao que foi proposto no corpo estriado (de SOUZA SILVA et al., 2016).

Estudos adicionais são necessários, entretanto, usando agonistas e antagonistas dos receptores D1 e D2 para identificar como a DA atua especificamente para produzir os efeitos panicolíticos aqui observados.

Buscou-se, também, neste trabalho, investigar se a DA-IN teria o seu efeito em outros modelos de pânico como é o caso do LTE e modelo de confronto entre presa e predador.

No experimento 4, utilizou-se o modelo clássico de LTE que busca segmentar as respostas de ansiedade e pânico no mesmo modelo, através da medida dos limiares de esquiva inibitória (ansiedade) e de fuga (pânico). Não obstante, a dopamina utilizada na dose preconizada no presente estudo não alterou nem a latência de esquiva, nem a latência de fuga. Drogas com efeito panicolítico, por exemplo no modelo de estimulação elétrica intra-tectal (Coimbra et al., 1996) ou o teste da arena poligonal para serpentes com exposição a cascáveis (Calvo et al., 2019), tais como o naloxone, já se mostraram surpreendentemente ineficazes no modelo de LTE (Coimbra et al., 2017a). O mesmo fenômeno pode ter ocorrido com a dopamina, muito embora novos estudos necessitem ser elaborados para esclarecer essa questão.

Outro fator pertinente, principalmente depois de se perceber uma tendência não significativa de a DA diminuir o comportamento de fuga na terceira tentativa (terceira exposição ao teste do LTE), consiste em uma possível influência intrínseca do tratamento no comportamento motor do animal.

De fato, durante a realização dos experimentos, houve a preocupação de que a DA-IN poderia influenciar o comportamento motor do animal, haja vista a dose de 3 mg/kg ter mostrado efeitos na locomoção em trabalhos prévios (de SOUZA SILVA et al., 2008), ao passo que na dose de 1 mg/kg não houve aumento de cruzamentos na caixa de condicionamento (Carvalho et al., 2019). A fim de confirmar se a dose de 2mg/kg teria alguma influência no comportamento locomotor, no experimento 5, foi utilizado o modelo do campo aberto, o que não apresentou efeito significativo nem no número de cruzamentos, nem no tempo de permanência, seja no centro, seja na periferia da arena circular, o que permite deduzir que, provavelmente, a DA intranasal, na dose aplicada no presente teste, não implicaria em prejuízos ao comportamento motor de animal. Não obstante, curiosamente, mesmo na dose de 2mg/kg, a DA-IN também não foi capaz de causar efeitos significantes no tempo de permanência do animal no centro da arena, local mais aversivo, o que não demonstrou seu potencial efeito ansiolítico no teste do campo aberto.

O experimento 6, os roedores foram submetidos ao teste da arena poligonal para serpentes com confronto entre presa *versus* predador, um modelo de ataques de pânico que simula uma situação ameaçadora típica na natureza, mas no ambiente de laboratório, confrontando um roedor com uma serpente selvagem. Este modelo tem mostrado propício a detectar efeitos panicolíticos de drogas antagonistas de captação de serotonina (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018), antagonistas de receptores opioides (COIMBRA et

al., 2017a; CALVO et al., 2019), e canabinoides (Uribe-Marino et al., 2012; Twadowschy et al., 2013).

Um estudo investigando o papel da DA nas respostas comportamentais mais etológicas não tinha sido realizado até então. Assim, para a realização desse experimento foi necessária a inclusão de grupos expostos à serpente de brinquedo em comparação à serpente viva, a fim de confirmar a existência da aversão do animal ao predador. Os roedores, quando confrontados com urutu-cruzeiro no teste da arena poligonal para serpentes, eliciaram um claro comportamento de defesa induzido pelo medo inato, expresso por esquiva inibitória, fuga orientada para locais seguros, e consequente aumento do tempo de permanência na toca.

Os animais tratados com DA-IN e expostos à serpente peçonhenta passaram menos tempo no local seguro, durante o confronto com o predador, o que sugere um efeito claramente panicolítico.

Estes experimentos evidenciaram que a utilização da via intranasal para a aplicação de fármacos pode ser uma relevante alternativa em futuros experimentos pré-clínicos para compreensão das vias neurais do comportamento defensivo. Como objeto de estudos futuros, sugerem-se novos experimentos para ampliar a compreensão do efeito da DA no comportamento defensivo e determinar os receptores especificamente recrutados para embasar seu efeito panicolítico, bem como realizar estudos morfológicos para determinar como a via dopaminérgica atua na mediação dos comportamentos defensivos.

## 5 CONCLUSÃO

A DA IN, na dose de 2 mg/kg, aumenta o limiar de fuga dos animais submetidos à estimulação elétrica da SCPd.

O pré-tratamento de sulpirida reverteu o efeito da DA-IN no limiar de fuga de ratos submetidos à estimulação elétrica da SCPd, sugerindo uma mediação desse efeito panicolítico da dopamina por receptores do tipo D2.

DA-IN, no modelo LTE, não mostrou alteração na latência das tentativas de esquiva inibitória e de fuga, o que sugere que este modelo por não ser sensível ao efeito antiaversivo da dopamina.

A aplicação de DA-IN em animais submetidos ao modelo do campo aberto não afetou o comportamento motor, o que sugere que a ação da DA observada em experimentos de estimulação do teto mesencefálico seja de fato antiaversiva.

Os animais que receberam DA-IN e foram confrontados com o predador permaneceram menos tempo em local seguro, sugerindo um efeito panicolítico causado pelo tratamento com dopamina por via intranasal.

## REFERÊNCIAS

- ADOLPHS, R. Emotion. **Current Biology**, 13. Jul. 2010. Cell Press.
- ALMADA, R. C.; ANJOS-GARCIA, T. DOS; SILVA, J. A. DA; et al. The modulation of striatonigral and nigrotectal pathways by CB1 signalling in the substantia nigra pars reticulata regulates panic elicited in mice by urutu-cruzeiro lancehead pit vipers. **Behavioural Brain Research**, v. 401, 2021. Elsevier B.V.
- ALMADA, R. C.; COIMBRA, N. C. Recruitment of striatonigral disinhibitory and nigrotectal inhibitory GABAergic pathways during the organization of defensive behavior by mice in a dangerous environment with the venomous snake *B othrops alternatus* (Reptilia , Viperidae). **Synapse**, v. 69, n. 6, p. 299–313, 2015.
- ANJOS-GARCIA, T. DOS; COIMBRA, N. C. Opposing roles of dorsomedial hypothalamic CB1 and TRPV1 receptors in anandamide signaling during the panic-like response elicited in mice by Brazilian rainbow Boidae snakes. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 6, p. 1863–1874, 2019. Springer Verlag.
- ANJOS-GARCIA, T. DOS; ULLAH, F.; FALCONI-SOBRINHO, L. L.; COIMBRA, N. C. CB1 cannabinoid receptor-mediated anandamide signalling reduces the defensive behaviour evoked through GABAA receptor blockade in the dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus. **Neuropharmacology**, v. 113, n. Pt A, p. 156–166, 2017. Elsevier Ltd.
- AYANO, G. Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. **Journal of Mental Disorders and Treatment**, 2016.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P.; ZHANG, S. P. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: Viscerotopic, somatotopic and functional organization. **Progress in Brain Research**, v. 87, n. C, p. 269–305, 1991. Prog Brain Res.
- BEAULIEU, J.-M.; GAINETDINOV, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. (D. R. Sibley, Ed.) **Pharmacological reviews**, v. 63, n. 1, p. 182–217, 2011.
- BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Progress in Neurobiology**, 1995.
- BEITZ, A. J. The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. **Journal of Comparative Neurology**, v. 237, n. 4, p. 445–459, 1985.
- BIAGIONI, A. F.; OLIVEIRA, R. C. DE; OLIVEIRA, R. DE; et al. 5-Hydroxytryptamine 1A receptors in the dorsomedial hypothalamus connected to dorsal raphe nucleus inputs modulate defensive behaviours and mediate innate fear-induced antinociception. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 3, p. 532–545, 2016a.
- BIAGIONI, A. F.; OLIVEIRA, R. C. DE; OLIVEIRA, R. DE; et al. 5-Hydroxytryptamine 1A receptors in the dorsomedial hypothalamus connected to dorsal raphe nucleus inputs modulate defensive behaviours and mediate innate fear-induced antinociception. **European**

**Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 3, p. 532–545, 2016b. Elsevier B.V.

BIAGIONI, A. F.; SILVA, J. A.; COIMBRA, N. C. Panic-like defensive behavior but not fear-induced antinociception is differently organized by dorsomedial and posterior hypothalamic nuclei of *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 328–336, 2012.

BIGHELLI, I.; CASTELLAZZI, M.; CIPRIANI, A.; et al. Antidepressants versus placebo for panic disorder in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 4, p. CD010676, 2018.

BLANCHARD, D. C.; HORI, K.; RODGERS, R. J.; HENDRIE, C. A.; BLANCHARD, R. J. Attenuation of defensive threat and attack in wild rats (*Rattus rattus*) by benzodiazepines. **Psychopharmacology**, v. 97, n. 3, p. 392–401, 1989.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 13 Suppl, p. S3-14, 1989a.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **Journal of comparative psychology (Washington, D.C. : 1983)**, v. 103, n. 1, p. 70–82, 1989b.

BOROWSKI, T. B.; KOKKINIDIS, L. Contribution of ventral tegmental area dopamine neurons to expression of conditional fear: effects of electrical stimulation, excitotoxin lesions, and quinpirole infusion on potentiated startle in rats. **Behavioral neuroscience**, v. 110, n. 6, p. 1349–64, 1996.

BRANDÃO, M. L.; ANSELONI, V. Z.; PANDÓSSIO, J. E.; ARAÚJO, J. E. DE; CASTILHO, V. M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 23, n. 6, p. 863–75, 1999.

BRANDÃO, M. L. B. **Psicofisiologia**. fourth ed. Ribeirão Preto: Atheneu, 2019.

BRANDÃO, M. L.; BORELLI, K. G.; NOBRE, M. J.; et al. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. **Anais...** v. 29, p.1299–1311, 2005.

BRANDÃO, M. L.; COIMBRA, N. C. Understanding the role of dopamine in conditioned and unconditioned fear. **Reviews in the Neurosciences**, v. 0, n. 0, 2018.

BRANDÃO, M. L.; COIMBRA, N. C. Understanding the role of dopamine in conditioned and unconditioned fear. **Reviews in the Neurosciences**, v. 30, n. 3, p. 325–337, 2019. De Gruyter.

BRANDÃO, M. L.; OLIVEIRA, A. R. DE; MUTHURAJU, S.; et al. Dual role of dopamine D2-like receptors in the mediation of conditioned and unconditioned fear. **FEBS Letters**, v. 589, n. 22, p. 3433–3437, 2015a.

BRANDÃO, M. L.; OLIVEIRA, A. R. DE; MUTHURAJU, S.; et al. Dual role of dopamine D(2)-like receptors in the mediation of conditioned and unconditioned fear. **FEBS letters**, v. 589, n. 22, p. 3433–7, 2015b.

BRANDÃO, M. L.; ZANOVELI, J. M.; RUIZ-MARTINEZ, R. C.; OLIVEIRA, L. C.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. **Behavioural brain research**, v. 188, n. 1, p. 1–13, 2008.

BUDDENBERG, T. E.; TOPIC, B.; MAHLBERG, E. D.; et al. Behavioral actions of intranasal application of dopamine: effects on forced swimming, elevated plus-maze and open field parameters. **Neuropsychobiology**, v. 57, n. 1–2, p. 70–9, 2008.

BURKEY, A. R.; CARSTENS, E.; JASMIN, L. Dopamine reuptake inhibition in the rostral agranular insular cortex produces antinociception. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 10, p. 4169–79, 1999.

CAMPOS, A. C.; FOGAÇA, M. V.; AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)**, v. 35 Suppl 2, p. S101-11, 2013.

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

CANTERAS, N. S.; GRAEFF, F. G. Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: implications for panic disorder. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 46 Pt 3, p. 352–64, 2014.

CARVALHO, M. C. C.; SANTOS, J. M. M.; BRANDÃO, M. L. L. Dorsal periaqueductal gray post-stimulation freezing is counteracted by neurokinin-1 receptor antagonism in the central nucleus of the amygdala in rats. , v. 121, 2015.

CARVALHO, M. C. DE; FIGUEIREDO, R. M. DE; COIMBRA, N. C.; et al. Intranasal dopamine attenuates fear responses induced by electric shock to the foot and by electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray matter. **Journal of Psychopharmacology**, 2019.

CARVALHO, M. C.; SANTOS, J. M.; BASSI, G. S.; BRANDÃO, M. L. Participation of NK1 receptors of the amygdala on the processing of different types of fear. **Neurobiology of learning and memory**, v. 102, p. 20–7, 2013.

CARVALHO, M. C.; VELONI, A. C.; GENARO, K.; BRANDÃO, M. L. Behavioral sensitization induced by dorsal periaqueductal gray electrical stimulation is counteracted by NK1 receptor antagonism in the ventral hippocampus and central nucleus of the amygdala. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 148, p. 60–68, 2018.

CASTRELLON, J. J.; YOUNG, J. S.; DANG, L. C.; et al. Mesolimbic dopamine D2 receptors and neural representations of subjective value. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019. Nature Research.

CHADMAN, K. K.; YANG, M.; CRAWLEY, J. N. Criteria for validating mouse models of psychiatric diseases. **American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics**, v. 150B, n. 1, p. 1–11, 2009.

CHAPMAN, C. D.; FREY, W. H.; CRAFT, S.; et al. Intranasal Treatment of Central Nervous

System Dysfunction in Humans. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 10, p. 2475–2484, 2013.

COIMBRA, NORBERTO CYSNE; CALVO, F.; ALMADA, R. C.; et al. Opioid neurotransmission modulates defensive behavior and fear-induced antinociception in dangerous environments. **Neuroscience**, v. 354, p. 178–195, 2017. Elsevier Ltd.

COIMBRA, N. C.; OLIVEIRA, R. DE; FREITAS, R. L.; et al. Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive beh. **Experimental Neurology**, v. 197, n. 1, p. 93–112, 2006.

COIMBRA, NORBERTO C.; PASCHOALIN-MAURIN, T.; BASSI, G. S.; et al. Critical neuropsychobiological analysis of panic attack- and anticipatory anxiety-like behaviors in rodents confronted with snakes in polygonal arenas and complex labyrinths: A comparison to the elevated plus- and T-maze behavioral tests. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 1. Jan. 2017a. Associacao Brasileira de Psiquiatria.

COIMBRA, NORBERTO C.; PASCHOALIN-MAURIN, T.; BASSI, G. S.; et al. No Title. , v. 39, n. 1, p. 72–83, 2017b.

COIMBRA, N. C.; TOMAZ, C.; BRANDAO, M. L. Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum. **Behavioural Brain Research**, v. 50, p. 77–83, 1992.

DAHLIN, M.; BERGMAN, U.; JANSSON, B.; BJÖRK, E.; BRITTEBO, E. Transfer of dopamine in the olfactory pathway following nasal administration in mice. **Pharmaceutical research**, v. 17, n. 6, p. 737–42, 2000.

DAHLIN, M.; JANSSON, B.; BJÖRK, E. Levels of dopamine in blood and brain following nasal administration to rats. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 1, p. 75–80, 2001.

DHURIA, S. V.; HANSON, L. R.; FREY, W. H. Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, p. 1654–1673, 2010.

FALCONI-SOBRINHO, L. L.; ANJOS-GARCIA, T. DOS; COIMBRA, N. C. Nitric oxide-mediated defensive and antinociceptive responses organised at the anterior hypothalamus of mice are modulated by glutamatergic inputs from area 24b of the cingulate cortex. **Journal of Psychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 78–90, 2021. SAGE Publications Ltd.

FALCONI-SOBRINHO, L. L.; ANJOS-GARCIA, T. DOS; ELIAS-FILHO, D. H.; COIMBRA, N. C. Unravelling cortico-hypothalamic pathways regulating unconditioned fear-induced antinociception and defensive behaviours. **Neuropharmacology**, v. 113, n. Pt A, p. 367–385, 2017. Elsevier Ltd.

FALCONI-SOBRINHO, L. L.; ANJOS-GARCIA, T. DOS; OLIVEIRA, R. DE; COIMBRA, N. C. Decrease in NMDA receptor-signalling activity in the anterior cingulate cortex diminishes defensive behaviour and unconditioned fear-induced antinociception elicited by GABAergic tonic inhibition impairment in the posterior hypothalamus. **European**

**Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 11, p. 1120–1131, 2017. Elsevier B.V.

FALCONI-SOBRINHO, L. L.; COIMBRA, N. C. The Nitric Oxide Donor SIN-1-Produced Panic-Like Behaviour And Fear-Induced Antinociception Are Modulated By NMDA Receptors In The Anterior Hypothalamus. **Journal of Psychopharmacology**, v. 32, n. 6, p. 711–722, 2018. SAGE Publications Ltd.

FANSELOW, M. S. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. **Psychonomic bulletin & review**, v. 1, n. 4, p. 429–38, 1994.

FEITOSA, M.; DARWIN, C. **Resenha: Darwin, o Comportamento Humano e as Emoções Book Review: Darwin, Human Behavior and Emotions**. 1999.

FURUKAWA, T. A.; WATANABE, N.; CHURCHILL, R. Combined psychotherapy plus antidepressants for panic disorder with or without agoraphobia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, , n. 1, p. CD004364, 2007.

GERMAN, D. C.; LIANG, C. L.; MANAYE, K. F.; LANE, K.; SONSALLA, P. K. Pharmacological inactivation of the vesicular monoamine transporter can enhance 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration of midbrain dopaminergic neurons, but not locus coeruleus noradrenergic neurons. **Neuroscience**, v. 101, n. 4, p. 1063–9, 2000.

GIOIA, S. DI; TRAPANI, A.; MANDRACCHIA, D.; et al. Intranasal delivery of dopamine to the striatum using glycol chitosan/sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin based nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 94, p. 180–193, 2015.

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

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

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. **Fundamentos de Psicofarmacologia - 2a. Edição**. Atheneu ed. Ribeirão Preto, 2012.

GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 651–8, 2012.

GUIMARÃES-COSTA, R.; GUIMARÃES-COSTA, M. B.; PIPPA-GADIOLI, L.; et al. Innate defensive behaviour and panic-like reactions evoked by rodents during aggressive encounters with Brazilian constrictor snakes in a complex labyrinth: Behavioural validation of a new model to study affective and agonistic reactions in a prey versus predator paradigm. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 165, n. 1, p. 25–37, 2007. J Neurosci Methods.

GUREVICH, E. V.; GAINETDINOV, R. R.; GUREVICH, V. V. G protein-coupled receptor kinases as regulators of dopamine receptor functions. **Pharmacological Research**, 1. Sep. 2016. Academic Press.

KHAN, A. U.; FALCONI-SOBRINHO, L. L.; ANJOS-GARCIA, T. DOS; et al. Cannabidiol-induced panicolytic-like effects and fear-induced antinociception impairment: the role of the CB1 receptor in the ventromedial hypothalamus. **Psychopharmacology**, v. 237, n. 4, p.

1063–1079, 2020. Springer.

KINGSBURY, M. A.; KELLY, A. M.; SCHROCK, S. E.; GOODSON, J. L. Mammal-like organization of the avian midbrain central gray and a reappraisal of the intercollicular nucleus. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011. PLoS One.

LA MORA, M. P. DE; PÉREZ-CARRERA, D.; CRESPO-RAMÍREZ, M.; et al. Signaling in dopamine D2 receptor-oxytocin receptor heterocomplexes and its relevance for the anxiolytic effects of dopamine and oxytocin interactions in the amygdala of the rat. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1862, n. 11, p. 2075–2085, 2016. Elsevier B.V.

LEDOUX, J. Emotion and the limbic system concept. **Concepts in Neuroscience**, v. 2, p. 169–199, 1991.

LEDOUX, J. Fear and the brain: where have we been, and where are we going? **Biological psychiatry**, v. 44, n. 12, p. 1229–38, 1998.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual review of neuroscience**, v. 23, p. 155–84, 2000.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios**. First ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002.

LI, C.; SUGAM, J. A.; LOWERY-GIONTA, E. G.; et al. Mu Opioid Receptor Modulation of Dopamine Neurons in the Periaqueductal Gray/Dorsal Raphe: A Role in Regulation of Pain. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 8, p. 2122–32, 2016.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology & therapeutics**, v. 46, n. 3, p. 321–40, 1990.

LIU, S.; SHU, H.; CRAWFORD, J.; et al. Optogenetic Activation of Dopamine Receptor D1 and D2 Neurons in Anterior Cingulate Cortex Differentially Modulates Trigeminal Neuropathic Pain. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 10, p. 4060–4068, 2020. Springer.

LOBÃO-SOARES, B.; WALZ, R.; PREDIGER, R. D. S.; et al. Cellular prion protein modulates defensive attention and innate fear-induced behaviour evoked in transgenic mice submitted to an agonistic encounter with the tropical coral snake *Oxyrhopus guibei*. **Behavioural brain research**, v. 194, n. 2, p. 129–37, 2008.

LOCHHEAD, J. J.; THORNE, R. G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 7, p. 614–628, 2012.

MCNALLY, R. J. Anxiety sensitivity and panic disorder. **Biological psychiatry**, v. 52, n. 10, p. 938–46, 2002.

MENDES-GOMES, J.; MOTTA, S. C.; PASSONI BINDI, R.; et al. Defensive behaviors and brain regional activation changes in rats confronting a snake. **Behavioural Brain Research**, v. 381, 2020. Elsevier B.V.

MISSALE, C.; RUSSEL NASH, S.; ROBINSON, S. W.; JABER, M.; CARON, M. G. Dopamine receptors: From structure to function. **Physiological Reviews**, 1998. American

Physiological Society.

MOURA, P. R. DE; VIDAL, F. A. P. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. **Sci. med**, 2011.

MUTHURAJU, S.; NOBRE, M. J.; SAITO, V. M. N.; BRANDAO, M. L. Distinct effects of haloperidol in the mediation of conditioned fear in the mesolimbic system and processing of unconditioned aversive information in the inferior colliculus. **Neuroscience**, v. 261, p. 195–206, 2014. Elsevier Ltd.

MUTHURAJU, S.; TALBOT, T.; BRANDÃO, M. L. Dopamine D2 receptors regulate unconditioned fear in deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. **Behavioural Brain Research**, v. 297, p. 116–123, 2016. Elsevier.

NASHOLD, B. S.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. Sensations Evoked by Stimulation in the Midbrain of Man. **Journal of Neurosurgery**, v. 30, n. 1, p. 14–24, 1969.

OLDS, M. E.; OLDS, J. Approach-escape interactions in rat brain. **The American journal of physiology**, v. 203, n. 5, p. 803–10, 1962.

OLIVEIRA, A. R. DE; COLOMBO, A. C.; MUTHURAJU, S.; ALMADA, R. C.; BRANDÃO, M. L. Dopamine D2-like receptors modulate unconditioned fear: Role of the inferior colliculus. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014a. Public Library of Science.

OLIVEIRA, A. R. DE; COLOMBO, A. C.; MUTHURAJU, S.; ALMADA, R. C.; BRANDÃO, M. L. Dopamine D2-like receptors modulate unconditioned fear: role of the inferior colliculus. (T. Jhou, Ed.) **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104228, 2014b.

OLIVEIRA, A. R. DE; REIMER, A. E.; BRANDÃO, M. L. Dopamine D2 receptor mechanisms in the expression of conditioned fear. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 84, n. 1, p. 102–11, 2006.

OLIVEIRA, A. R. DE; REIMER, A. E.; BRANDÃO, M. L. Role of dopamine receptors in the ventral tegmental area in conditioned fear. **Behavioural Brain Research**, v. 199, n. 2, p. 271–277, 2009.

OLIVEIRA, A. R. DE; REIMER, A. E.; BRANDÃO, M. L. Role of dopamine receptors in the ventral tegmental area in conditioned fear. **Behavioural brain research**, v. 199, n. 2, p. 271–7, 2009.

OLIVEIRA, A. R. DE; REIMER, A. E.; MACEDO, C. E. A. DE; et al. Conditioned fear is modulated by D2 receptor pathway connecting the ventral tegmental area and basolateral amygdala. **Neurobiology of learning and memory**, v. 95, n. 1, p. 37–45, 2011.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 25, n. 3, p. 219–33, 2001.

PASCHOALIN-MAURIN, T.; ANJOS-GARCIA, T. DOS; FALCONI-SOBRINHO, L. L.; et al. The Rodent-versus-wild Snake Paradigm as a Model for Studying Anxiety- and Panic-like Behaviors: Face, Construct and Predictive Validities. **Neuroscience**, v. 369, p. 336–349, 2018a.

PASCHOALIN-MAURIN, T.; ANJOS-GARCIA, T. DOS; FALCONI-SOBRINHO, L. L.; et al. The Rodent-versus-wild Snake Paradigm as a Model for Studying Anxiety- and Panic-like Behaviors: Face, Construct and Predictive Validities. **Neuroscience**, v. 369, p. 336–349, 2018b. Elsevier Ltd.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 2007.

PEZZE, M. A.; FELDON, J. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. **Progress in neurobiology**, v. 74, n. 5, p. 301–20, 2004.

POLITIS, S.; BELLOS, S.; HADJULIS, M.; et al. Epidemiology of panic disorder and subthreshold panic symptoms in the Greek general population. **Psychiatrike = Psychiatriki**, v. 31, n. 3, p. 201–215, 2020. NLM (Medline).

REISS, S. Expectancy model of fear, anxiety, and panic. **Clinical Psychology Review**, v. 11, n. 2, p. 141–153, 1991. Pergamon.

REISS, S.; BOOTZIN, R. R. **Theoretical issues in behavior therapy**. Academic Press, 1985.

RISOLD, P. Y.; SWANSON, L. W. Connections of the rat lateral septal complex. **Brain research. Brain research reviews**, v. 24, n. 2–3, p. 115–95, 1997.

RONCON, C. M.; ALMADA, R. C.; MARASCHIN, J. C.; et al. Pharmacological evidence for the mediation of the panicolytic effect of fluoxetine by dorsal periaqueductal gray matter  $\mu$ -opioid receptors. **Neuropharmacology**, v. 99, p. 620–626, 2015. Elsevier Ltd.

RUOCCO, L. A.; TRENO, C.; GIRONI CARNEVALE, U. A.; et al. Prepuberal intranasal dopamine treatment in an animal model of ADHD ameliorates deficient spatial attention, working memory, amino acid transmitters and synaptic markers in prefrontal cortex, ventral and dorsal striatum. **Amino acids**, v. 46, n. 9, p. 2105–22, 2014.

SAITO, V. M. N. **Papel dos mecanismos GABAérgicos do colículo inferior e da substância cinzenta periaquedutal na interface sensoriomotora do medo e ansiedade**, 10. Oct. 2016. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo.

SALINAS-HERNÁNDEZ, X. I.; VOGEL, P.; BETZ, S.; et al. Dopamine neurons drive fear extinction learning by signaling the omission of expected aversive outcomes. **eLife**, v. 7, 2018. eLife Sciences Publications Ltd.

SCHOO, S. M.; BOBECK, E. N.; MORGAN, M. M. Enhanced antinociception with repeated microinjections of apomorphine into the periaqueductal gray of male and female rats. **Behavioural pharmacology**, v. 29, n. 2 and 3-Special Issue, p. 234–240, 2018.

SHEKHAR, A. Effects of treatment with imipramine and clonazepam on an animal model of panic disorder. **Biological Psychiatry**, v. 36, n. 11, p. 745–758, 1994.

SHEKHAR, A.; KEIM, S. R.; SIMON, J. R.; MCBRIDE, W. J.; MCBRIDE, W. J. Dorsomedial Hypothalamic GABA Dysfunction Produces Physiological Arousal Following Sodium Lactate Infusions Panic disorder Anxiety Dorsomedial hypothalamus Abet pumps Social interaction elevated plus-maze Lactate infusion. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 55, n. 2, p. 249–256, 1996.

SHUHAMA, R.; DEL-BEN, C. M.; LOUREIRO, S. R.; GRAEFF, F. G. Animal defense strategies and anxiety disorders. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 1, p. 97–109, 2007.

SOUZA CAETANO, K. A. DE; OLIVEIRA, A. R. DE; BRANDÃO, M. L. Dopamine D2 receptors modulate the expression of contextual conditioned fear: role of the ventral tegmental area and the basolateral amygdala. **Behavioural pharmacology**, v. 24, n. 4, p. 264–74, 2013.

SOUZA SILVA, M. A. DE; MATTERN, C.; DECHEVA, C.; et al. Intranasal Dopamine Reduces In Vivo [(123)I]FP-CIT Binding to Striatal Dopamine Transporter: Correlation with Behavioral Changes and Evidence for Pavlovian Conditioned Dopamine Response. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 10, p. 80, 2016.

SOUZA SILVA, M A DE; TOPIC, B.; HUSTON, J. P.; MATTERN, C. Intranasal dopamine application increases dopaminergic activity in the neostriatum and nucleus accumbens and enhances motor activity in the open field. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 62, n. 3, p. 176–84, 2008.

SOUZA SILVA, M. A. DE; TOPIC, B.; HUSTON, J. P.; MATTERN, C. Intranasal administration of progesterone increases dopaminergic activity in amygdala and neostriatum of male rats. **Neuroscience**, v. 157, n. 1, p. 196–203, 2008. Neuroscience.

SPIACCI, A.; OLIVEIRA SERGIO, J. T. DE; F DA SILVA, G. S.; et al. SEROTONIN IN THE DORSAL PERIAQUEDUCTAL GRAY INHIBITS PANIC-LIKE DEFENSIVE BEHAVIORS IN RATS EXPOSED TO ACUTE HYPOXIA. **NEUROSCIENCE**, v. 307, p. 191–198, 2015.

SPIACCI, A.; VILELA-COSTA, H. H.; SANT'ANA, A. B.; et al. Panic-like escape response elicited in mice by exposure to CO<sub>2</sub>, but not hypoxia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, p. 178–186, 2018. Elsevier Inc.

SPUNT, R. P.; ADOLPHS, R. The neuroscience of understanding the emotions of others. **Neuroscience Letters**, 6. Feb. 2019. Elsevier Ireland Ltd.

STEPHENSON-JONES, M.; SAMUELSSON, E.; ERICSSON, J.; ROBERTSON, B.; GRILLNER, S. Evolutionary conservation of the basal ganglia as a common vertebrate mechanism for action selection. **Current Biology**, v. 21, n. 13, p. 1081–1091, 2011.

TALBOT, T.; MATTERN, C.; SOUZA SILVA, M. A. DE; BRANDÃO, M. L. Intranasal administration of dopamine attenuates unconditioned fear in that it reduces restraint-induced ultrasound vocalizations and escape from bright light. **Journal of Psychopharmacology**, v. 31, n. 6, p. 682–690, 2017.

TANG, W.; KOCHUBEY, O.; KINTSCHER, M.; SCHNEGGENBURGER, R. A VTA to basal amygdala dopamine projection contributes to signal salient somatosensory events during fear learning. **Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 20, 2020. Society for Neuroscience.

TAYEBATI, S. K.; NWANKWO, I. E.; AMENTA, F. Intranasal drug delivery to the central nervous system: present status and future outlook. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 3, p. 510–26, 2013.

TOBALDINI, G.; REIS, R. A.; SARDI, N. F.; et al. Dopaminergic mechanisms in

periaqueductal gray-mediated antinociception. **Behavioural Pharmacology**, v. 29, p. 225–233, 2018.

TREIT, D.; ENGIN, E.; MCEOWN, K. Animal models of anxiety and anxiolytic drug action. **Current topics in behavioral neurosciences**, v. 2, p. 121–60, 2010.

TROSSBACH, S. V.; SOUZA SILVA, M. A. DE; HUSTON, J. P.; KORTH, C.; MATTERN, C. Intranasal dopamine treatment reinstates object-place memory in aged rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 114, p. 231–235, 2014.

ULLAH, F.; ANJOS-GARCIA, T. DOS; MENDES-GOMES, J.; et al. Connexions between the dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal grey matter are critical in the elaboration of hypothalamically mediated panic-like behaviour. **Behavioural Brain Research**, v. 319, p. 135–147, 2017a.

ULLAH, F.; ANJOS-GARCIA, T. DOS; MENDES-GOMES, J.; et al. Connexions between the dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal grey matter are critical in the elaboration of hypothalamically mediated panic-like behaviour. **Behavioural Brain Research**, v. 319, p. 135–147, 2017b. Elsevier B.V.

ULLAH, F.; ANJOS-GARCIA, T. DOS; SANTOS, I. R. DOS; BIAGIONI, A. F.; COIMBRA, N. C. Relevance of dorsomedial hypothalamus, dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal gray matter in the organization of freezing or oriented and non-oriented escape emotional behaviors. **Behavioural Brain Research**, v. 293, p. 143–152, 2015.

URIBE-MARIÑO, A.; CASTIBLANCO-URBINA, M. A.; FALCONI-SOBRINHO, L. L.; et al. The alpha- and beta-noradrenergic receptors blockade in the dorsal raphe nucleus impairs the panic-like response elaborated by medial hypothalamus neurons. **Brain Research**, v. 1725, 2019. Elsevier B.V.

URIBE-MARIÑO, A.; FRANCISCO, A.; CASTIBLANCO-URBINA, M. A.; et al. Anti-aversive effects of cannabidiol on innate fear-induced behaviors evoked by an ethological model of panic attacks based on a prey vs the wild snake epicrates cenchria crassus confrontation paradigm. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 2, p. 412–421, 2012. *Neuropsychopharmacology*.

VIANNA, D. M.; GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Defensive freezing evoked by electrical stimulation of the periaqueductal gray: comparison between dorsolateral and ventrolateral regions. **Neuroreport**, v. 12, n. 18, p. 4109–12, 2001.

VIEIRA-RASTELI, E. B.; PAULA, B. B. DE; PAIVA, Y. B. DE; COIMBRA, N. C.; LEITE-PANISSI, C. R. A. Restricted lesions of the ventrolateral or dorsal columns of the periaqueductal gray promotes distinct effects on tonic immobility and defensive analgesia in guinea pigs. **Physiology and Behavior**, v. 194, p. 538–544, 2018. Elsevier Inc.

WANG, A.-L.; FAZARI, B.; CHAO, O. Y.; et al. Intra-nasal dopamine alleviates cognitive deficits in tgDISC1 rats which overexpress the human DISC1 gene. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 146, p. 12–20, 2017.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 46, p. 397–406, 2014.

## APÊNDICE

Original Paper

# Intranasal dopamine attenuates fear responses induced by electric shock to the foot and by electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray matter



*Journal of Psychopharmacology*  
2019, Vol. 33(12) 1524–1532  
© The Author(s) 2019  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/0269881119862527  
journals.sagepub.com/home/jop



Milene Cristina de Carvalho<sup>1,2,3</sup> , Rebeca Machado de Figueiredo<sup>1,2</sup> ,  
Norberto Cysne Coimbra<sup>1,2,3</sup> , Christie Ramos Andrade Leite-Panissi<sup>1,3,4</sup> ,  
Maria Angélica de Souza Silva<sup>5</sup>, Joseph P Huston<sup>5</sup>, Claudia Mattern<sup>6,7</sup>  
and Marcus Lira Brandão<sup>1,3</sup>

## Abstract

**Purpose:** Intranasally applied dopamine (IN-DA), which likely reaches the brain via nasal–brain pathways and bypasses the blood–brain barrier, has been found to increase extracellular DA and bind to the DA2 transporter in the striatum. Recent studies suggest that DA plays a significant role in the processing of signaled and unconditioned aversive stimulation, including evidence that may attenuate responses to painful input. The purpose of this study was to examine the effects of IN-DA on fear-related behaviors induced by electric shock to the foot or by electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray matter (dPAG).

**Methods:** DA hydrochloride suspended in a viscous castor oil gel (1 or 2 mg/kg) was applied (IN-DA) in a volume of 5  $\mu$ L into the nostrils of adult Wistar male rats in order to evaluate its effects on (a) freezing induced by electric shock to the foot and (b) thresholds of freezing and escape and duration of post-stimulation freezing induced by electrical stimulation of the dPAG.

**Results:** IN-DA attenuated freezing induced by electric shock to the foot in the three test trials, indicating that it reduced long-term fear responses. IN-DA also increased the threshold of dPAG stimulation-induced escape responses and reduced post-stimulation freezing.

**Conclusions:** IN-DA, which has previously been shown to facilitate learning and to have antidepressive-like effects, attenuated unconditioned fear responses elicited by peripheral and intramesencephalic (dPAG) stimulation and reduced long-term conditioned fear responses.

## Keywords

Unconditioned fear, conditioned fear, fear extinction, dopamine, dPAG, nasal drug application

## Introduction

Dopaminergic neurotransmission has been implicated in the processing of conditioned and unconditioned aversive stimulation. For instance, a cue for fear decreased dopamine (DA) transmission in the nucleus accumbens (NAc) core, but increased it in the NAc shell (Badrinarayan et al., 2012). Similarly, extracellular DA was decreased in the NAc core but not shell by the withholding of anticipated reward (Biesdorf et al., 2015). Changes in NAc DA release occurred upon presentation of predictors of aversion (Wenzel et al., 2015), and predicted the extent of avoidance behavior (Pultorak et al., 2018). Pharmacological studies have also implicated DA in the various fear/anxiety-related behaviors, including conditioned and unconditioned fear-related responses (Brandão et al., 2015; Brandão and Coimbra, 2019; Garcia et al., 2005; Reis et al., 2004).

DA has also been demonstrated to attenuate responses to aversive stimulation. Recently, we found in rats that intranasally applied DA (IN-DA) attenuated unconditioned fear responses, considering that it reduced escape behavior from bright light and ultrasound vocalizations in response to aversive restraint (Talbot et al., 2017). The present study follows up on this finding by examining the effects of acute IN-DA on (a) freezing induced by

electric shock to the foot (as a measure of conditioned fear) one, two, and eight days after the conditioning session, and (b) freezing, escape, and post-stimulation freezing (unconditioned

<sup>1</sup>Instituto de Neurociências e Comportamento (INeC), Ribeirão Preto, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Neuroanatomy and Neuropsychobiology, Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>3</sup>NAP-USP-Neurobiology of Emotions Research Centre (NuPNE), Ribeirão Preto School of Medicine of the University of São Paulo (FMRP-USP), Ribeirão Preto, Brazil

<sup>4</sup>Department of Psychology, Ribeirão Preto School of Philosophy, Science and Literature of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>5</sup>Center for Behavioral Neuroscience, Institute of Experimental Psychology, University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

<sup>6</sup>M et P Pharma AG, Emmetten, Switzerland

<sup>7</sup>Oceanographic Center, Nova Southeastern University, Fort Lauderdale, FL, USA

## Corresponding author:

Milene Cristina de Carvalho, Instituto de Neurociências e Comportamento-INeC, Av. do Café, Ribeirão Preto, 2450, Brazil.  
Email: mccarva@usp.br

fear-related behavioral responses) elicited by electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray matter (dPAG).

The dPAG is the main structure of the encephalic aversion system, a neural network underlying the expression of unconditioned fear-related behaviors (Brandão et al., 1999, 2005; Coimbra et al., 2006; Graeff, 2004). Chemical and electrical stimulation of the dPAG evokes unconditioned defensive behaviors mediated by serotonin, neurokinins, and excitatory amino acids (Brandão et al., 1999, 2005; Eichenberger et al., 2002; Ullah et al., 2015, 2017) and modulated by endogenous opioid peptides (Eichenberger et al., 2002; Ribeiro et al., 2005). The role of DA in the ventral PAG (vPAG) has been well documented under nociceptive conditions. Injection into the vPAG of the DA receptor agonist apomorphine was found to have antinociceptive effects (Schoo et al., 2018). The activation of tyrosine hydroxylase-positive neurons in the vPAG had supraspinal antinociceptive action, and DA neurons in the vPAG interacted with endogenous opioid peptide-related antinociception (Li et al., 2016). On the other hand, little is known about the dPAG in terms of possible DAergic mediation of defense reactions.

Whereas DA does not cross the blood–brain barrier, IN-DA enters the brain directly via the nose–brain pathways in rodents, providing an alternative means of targeting DA receptors (De Souza Silva et al., 2008; Di Gioia et al., 2015; Tayebati et al., 2013). IN-DA in rats has been demonstrated to bind to striatal DA2 transporters (De Souza Silva et al., 2016), to increase extracellular DA in the dorsal and ventral striatum (De Souza Silva et al., 2008), and to have antidepressant-like (Buddenberg et al., 2008) and memory-promoting effects (Ruocco et al., 2014; Trossbach et al., 2014; Wang et al., 2017).

Here, we investigate the effect of IN-DA (1 and 2 mg/kg) application on both unconditioned and conditioned fear-related behavior either resulting from electric shocks to the foot (Furini et al., 2017; Myskiw et al., 2014) or elicited by dPAG electrical stimulation (Carvalho et al., 2018). Based on our previous finding that IN-DA attenuated escape behavior from bright light and ultrasound vocalizations in response to restraint, we hypothesized that IN-DA would also reduce fear-related responses to shocks to the foot and to dPAG stimulation.

## Material and methods

### Animals

A total of 63 male Wistar rats, weighing 250–300 g, from the animal facility of the University of São Paulo (USP) at Ribeirão Preto were used. The laboratory rodents were housed in groups of four in plastic boxes (40 cm×33 cm×26 cm) and maintained under a 12-hour/12-hour light/dark cycle (lights on at 7:00am) at 23±1°C. The rats were allowed free access to food and water throughout the experiment. The experiments were carried out during the light phase of the cycle.

### Ethical statement

All of the experiments received formal approval (process 10.1.595.53.7 and 12.1.909.53.3) from the Committee on Animal Research and Ethics (CEUA) of the University of São Paulo at Ribeirão Preto and were performed in compliance with the recommendations of the Brazilian Society for Neuroscience and

Behavior, which are in accordance with the United States National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The number of animals used was the minimum required to ensure the reliability of the results, and every effort was made to minimize animal suffering.

### Surgery

The rats were intraperitoneally anesthetized with ketamine/xylazine (100/7.5 mg/kg; Agener União, Embu-Guaçu, São Paulo, Brazil) and fixed in a stereotaxic frame (David Kopf, Tujunga, CA). The upper incisor bar was set 3.3 mm below the interaural line, such that the skull was horizontal between the bregma and lambda. After scalp anesthesia with 2% lidocaine (S.S. White Artigos Dentários, São Paulo, Brazil), the calvaria was surgically exposed, and one bipolar brain electrode was implanted over the left side of the dPAG according to Paxinos and Watson (2007). The electrodes consisted of two twisted stainless-steel wires (50 µm diameter each) that were insulated except at the cross-section of the tip. The electrode was introduced at a 22° angle inclined medially, with the lambda serving as the reference for each plane (anterior/posterior (AP) 0.1 mm; medial/lateral (ML) 1.9 mm; dorsal/ventral (DV) 5.3 mm). For all groups, the electrode was fixed to the skull with acrylic resin and two stainless-steel anchor screws. Each one was sealed with a stainless-steel wire to prevent obstruction. At the end of surgery, the rats received an intramuscular injection of penicillin G benzathine (Pentabiotic, 600,000 IU, 0.2 mL; Fort Dodge, Campinas, Brazil) and subcutaneous injection of the anti-inflammatory and analgesic flunixin meglumine (Banamine, 2.5 mg/kg; Schering-Plough, Cotia, Brazil). The rats were then returned to their home cages and allowed to recover for five days.

### Drugs

DA hydrochloride (Sigma–Aldrich, St Louis, MO) was suspended in a gel composed of viscous castor oil mixture (M&P Pharma, Emmetten, Switzerland) immediately before administration. The rats received IN-DA (1 mg/kg and 2 mg/kg) five minutes before the behavioral tests. To minimize the animals' suffering in the shock freezing experiment, we decided to test only one dose (1 mg/kg) against the control based on the fact that this dose was the most effective dose in a previous study from this lab (Talbot et al., 2017), in which IN-DA (0.03 mg/kg or 0.3 mg/kg) did not have significant effects in three other anxiety/fear tests used in this lab (isolation, elevated plus maze and escape from bright light). The 2 mg/kg of IN-DA was tested in the dPAG stimulation procedure as the natural option after noticing a trend toward significance of the 1 mg/kg IN-DA in this test.

### IN-DA application

During the procedure, each rat remained free in a polypropylene box (28 cm×17 cm×13 cm). DA in gel was kept on ice throughout the experiment and protected from light. Two minutes before application, the suspension was removed from the ice to fill an applicator pipette for viscous liquids (Microman; Gilson, Villiers le Bel, France). Either 5 µL DA or gel (control) was applied per nostril with this applicator and corresponding tips (CP10 Tips;

Gilson). Drug administration was performed in awake animals over eight seconds per nostril with an application depth of 2 mm (see De Souza Silva et al. (2016) for more details). Each rat received treatment with IN-DA or its vehicle only once. There is no report in the literature about interference of the gel with olfaction.

### *Conditioned fear-related responses elicited by electric shock to the foot*

The foot-shock chamber (48 cm×26 cm×25 cm) had side and back walls made of black acrylic, and the ceiling and front door were made of transparent Plexiglas. In the middle of the frontal wall was a thin marking on the acrylic with the purpose of dividing the box into two imperceptible halves to the rat. The grid floor consisted of 36 stainless-steel rods spaced 1.5 cm apart through which electrical shocks to the foot could be delivered. The chamber also enclosed a wooden sound-attenuating box with a loudspeaker and a sound generator to deliver a 1 kHz tone (72 dB; Insight Equipment, Ribeirão Preto, Brazil) and was illuminated by a 15 W red lamp. On day 1 (fear conditioning session), animals were placed into the conditioning chamber for three minutes. Then, three electrical shocks (0.6 mA, 1 second) were delivered to the foot with a 30-second interval between them. The shocks were delivered through the training cage floor by a constant current generator delivering scrambled stimulation (Albarsch Instruments, Porto Alegre, Brazil). Stimulus presentation was controlled by a microprocessor and an input/output board (Insight Equipment). Animals were removed from the conditioning chamber 30 seconds after the last shock to the foot and returned to their home cages. On day 2, five minutes after IN-DA or gel treatment, the rats were placed in the same chamber for 12 minutes without any shocks to the foot. On days 3 and 9, rats were again placed in the same apparatus for another three minutes without receiving any shocks to the foot. Freezing is defined as the arrest of movement for at least six seconds, whereas crossing is defined as units of trespassing movements for a divisor line drawn in the middle of the experimental box. Thus, IN-DA could make the rat move and reduce the time of freezing in one compartment without changing the number of crossings in this particular experimental set-up. The chamber was cleaned with 20% ethanol between animals.

### *Thresholding for dPAG stimulation-induced freezing and escape responses*

Five days after surgery, the animals were placed in a square Plexiglas box (25 cm×20 cm×20 cm) in an illuminated room with a 40 W fluorescent lamp (80 lx at the level of the box floor). The rats were allowed a 10-minute period of acclimation in the enclosure. The dPAG was then electrically stimulated by means of a sine-wave stimulator (Del Vecchio, Ribeirão Preto, Brazil). The stimulation current was monitored by measuring the voltage drop across a 1 k $\Omega$  resistor with an oscilloscope (Minipa, Houston, TX). Brain stimulation (60 Hz sine wave for 10 seconds) was given at pseudorandom intervals (30–120 seconds), with the current intensity increasing in 5  $\mu$ A steps to determine the thresholds for freezing and escape responses. The freezing threshold was defined as the lowest intensity that produced the

absence of movement, except movements related to respiration. The intensity of current that produced running and/or jumping was considered the escape threshold. Animals with an escape threshold >120  $\mu$ A (peak-to-peak) were removed from the experiment. To investigate behavior that persisted after escape, the rats remained in the experimental box for another eight minutes, without any stimulation, during which the duration of post-stimulation freezing was recorded (Carvalho et al., 2015). After the measurement of these baseline values, rats received IN-DA or gel. Five minutes after the applications, the defensive behavior was again evaluated through measurement of aversive threshold and time spent in freezing after the end of the dPAG stimulation.

### *Histology*

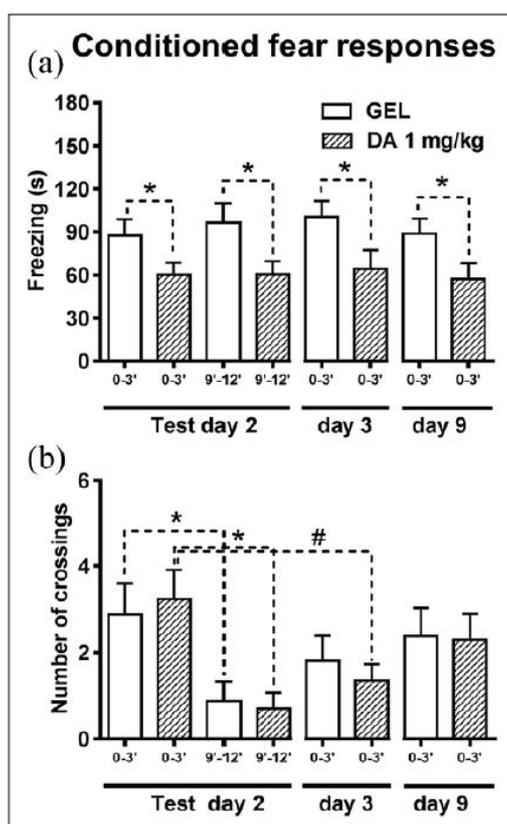
Upon conclusion of the experiments, to confirm the placements of the electrode sites, each animal was anesthetized with ketamine at 92 mg/kg (Ketamina<sup>®</sup>) and xylazine at 9.2 mg/kg (Dopaser<sup>®</sup>), and the brains were then removed from the skulls, maintained in 4% formalin for one week, and then cryoprotected in 30% sucrose. Coronal slices 60  $\mu$ m thick were cut (CM 1950; Leica, Mannheim, Germany), mounted on gelatin-coated slides, and Nissl staining was used to localize the sites of stimulation according to Paxinos and Watson's (2007) atlas. Three rats were excluded from the analysis because of inappropriate electrode placement.

### *Statistical analysis*

In the shock-induced fear experiment, the duration of the conditioned freezing and number of crossings were subjected to repeated-measures two-way analysis of variance (ANOVA). Treatments and time (0–3 minutes and 9–12 minutes) were considered as factors for the analysis on test day 2. Treatments and three-minute sessions (test days 2, 3, and 9) were the factors for the evaluation of the effects of treatment over trials. Considering the dPAG electrical stimulation experiments, one-way ANOVA was used to assess the effects of IN-DA infusions on defensive behaviors induced by dPAG stimulation. The difference ( $\Delta$ ) of freezing and escape thresholds and post-stimulation freezing responses measured before and after the IN-DA was the dependent variable, and treatment (gel or DA at 1 and 2 mg/kg) was the independent variable. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). ANOVAs were followed by Bonferroni's multiple comparisons post hoc test. *p*-Values of <0.05 were considered statistically significant.

## **Results**

For the study of fear induced by shocks to the foot, repeated-measures two-way ANOVAs were used to assess the effects of the IN-DA on duration of freezing (Figure 1(a)) and number of crossings (Figure 1(b)) on test days 2 (12 minutes), 3 (three minutes), and 9 (three minutes). The analysis was split into two approaches: (a) treatment (DA 1 mg/kg and gel) and time (0–3 minutes and 9–12 minutes) were used as factors for the test day 2 session, and (b) treatment (DA 1 mg/kg and gel) was one factor and the three-minute time of test days 2, 3, and 9 was the repeated measure.



**Figure 1.** Effect of intranasally administered dopamine (IN-DA) before the test for conditioned fear responses. Animals were subjected to a contextual fear-conditioning task (three minutes of habituation followed by three electric shocks to the foot of 0.6 mA with 30 seconds between trials). After 24 hours, they received an intranasal infusion of gel (vehicle) or IN-DA (1 mg/kg; 5  $\mu$ L per side) five minutes before the first test for conditioned fear. This session lasted 12 minutes, and the results are depicted for the first three minutes and final three minutes. These same rats were subjected to three-minute extinction tests 24 hours and seven days later. (a) Animals that received IN-DA exhibited less freezing behavior compared to the vehicle group in each of the three sessions. (b) Animals that received either IN-DA or vehicle emitted fewer crossings in the box in the last three minutes compared to the first three minutes of the first test session. They also made fewer crossings during test day 3 compared to the initial three minutes of test day 2. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM;  $n=16-17$ /group). \* $p<0.05$  last three minutes compared to first three minutes of first test session; # $p<0.05$  compared to IN-DA group of test day 2, according to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test.

Considering the duration of freezing during the test performed on day 2, according to the repeated-measures two-way ANOVA, there was significant effect of treatment ( $F(1, 31)=6.09$ ;  $p<0.05$ ) but not of time ( $F(1, 31)=0.33$ ;  $p>0.05$ ) or of treatment by time interaction ( $F(1, 31)=0.30$ ;  $p>0.05$ ). Rats that received IN-DA before the test on day 2 expressed less freezing behavior compared with the gel-treated group ( $p<0.05$ ). Similarly, considering the duration of

freezing behavior recorded during test days 2, 3, and 9, there was a significant effect of treatment ( $F(1, 31)=5.88$ ;  $p<0.05$ ) but not session ( $F(2, 62)=1.05$ ;  $p>0.05$ ) and no treatment-session interaction ( $F(2, 62)=0.20$ ;  $p>0.05$ ). Decreased freezing responses were maintained for 24 hours and over the seven-day testing period, indicating that rats that received IN-DA expressed less freezing than the gel-treated rats throughout these sessions (Figure 1(a)).

Considering the number of crossings displayed during test day 2, according to the repeated-measures two-way ANOVA, there was a significant effect of time ( $F(1, 31)=16.66$ ;  $p<0.05$ ) but not treatment ( $F(1, 31)=0.03$ ;  $p>0.05$ ) or treatment by time interaction ( $F(1, 31)=0.23$ ;  $p>0.05$ ). However, there was a significant effect of session ( $F(2, 62)=4.42$ ;  $p<0.05$ ) on the number of crossings during test days 2, 3, and 9, despite no significant effect of treatment ( $F(1, 31)=0.01$ ;  $p>0.05$ ) and no treatment-session interaction ( $F(2, 62)=0.20$ ;  $p>0.05$ ) were found. The rats exhibited less locomotor activity over time, regardless of the treatment (Figure 1(b)).

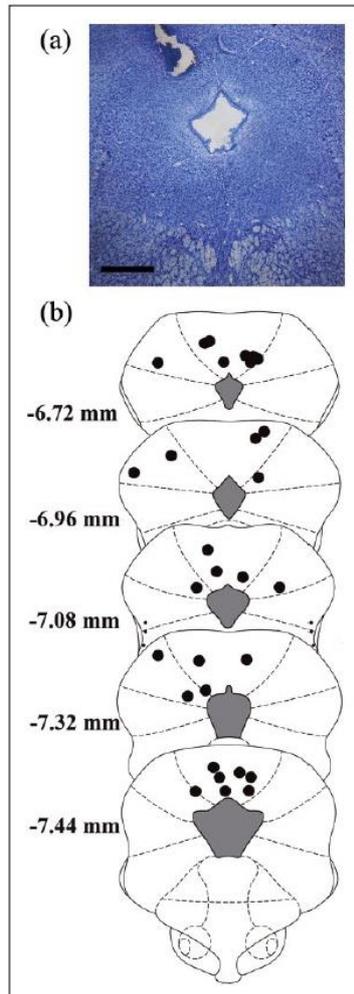
With regard to dPAG electrical stimulation-related experiments, only those rats in which the tips of the electrodes were located within the dorsomedial and dorsolateral columns of the periaqueductal gray matter were used in this study (Figure 2). According to the one-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test, there was a trend toward a significant effect of the treatment with IN-DA at the highest dose (2mg/kg) on freezing responses in comparison to the control group ( $F(2, 27)=2.65$ ;  $p=0.08$ ), as shown in Figure 3(a). Considering the escape behavior, according to the one-way ANOVA, there were significant effects of treatments on escape behavior threshold ( $F(2, 27)=3.61$ ;  $p<0.05$ ; Figure 3(b)). Concerning post-stimulation freezing behavior, according to the one-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test, there was a significant effect of treatments ( $F(2, 27)=4.58$ ;  $p<0.05$ ). Animals treated with IN-DA at the lowest dose displayed decreased post-stimulation freezing behavior elicited after dPAG neural activation in comparison to the highest dose (2 mg/kg), as shown in Figure 3(c).

## Discussion

The main findings of the present study are: (a) after foot-shock conditioning, IN-DA applied five minutes prior to the behavioral test attenuated the conditioned freezing behavior 24 hours, two days, and eight days after conditioning; (b) IN-DA given five minutes before the dPAG electrical stimulation increased the amount of current required to elicit escape behavior; and (c) there was reduced post-dPAG stimulation freezing.

### IN-DA application

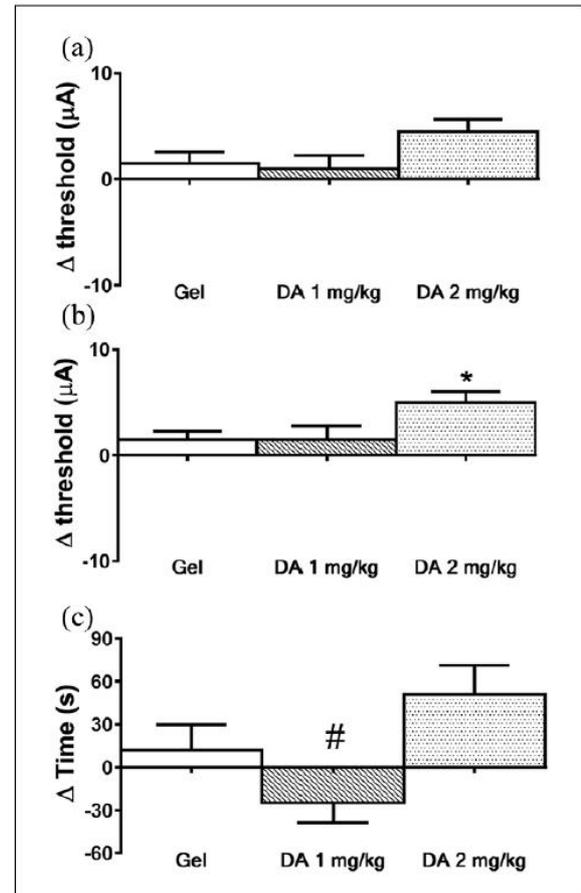
The administration of drugs through upper nasal passages has become an important alternative route of medication in laboratory animals and human patients (Chapman et al., 2013; Lochhead and Thorne, 2012). Some pharmacological agents when intranasally applied can enter the brain by bypassing the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers, thus finding a direct route to the encephalic structures from the nasal epithelium, likely via the extracellular pathways along the olfactory and trigeminal nerves (Crowe et al., 2018; Dhuria et al., 2010). For example, DA cannot cross the blood-brain barrier. Yet, [ $^3$ H]dopamine administered via the nostrils of mice and rats has been shown to enter the brain



**Figure 2.** Target sites for electrode implantation into the dorsal columns of periaqueductal gray matter (dPAG). (a) Photomicrograph of midbrain transverse sections showing a histological confirmed representative site of an electrode implanted into the dPAG. (b) Representation of histologically confirmed sites (black hatched circles) of dPAG electrical stimulation depicted on modified diagrams from Paxinos and Watson's (2007) atlas. Bar=200  $\mu$ m.

unchanged (Dahlin et al., 2000, 2001). IN-DA was also shown to increase the extracellular DA in the dorsal and ventral striatum (De Souza Silva et al., 2008) and to bind to the DA<sub>2</sub> transporter in the neostriatum of the rat (De Souza Silva et al., 2016). Behaviorally in rodents, IN-DA has caused antidepressive-like effects (Buddenberg et al., 2008), attenuated behavioral asymmetries incurred by unilateral DA lesion of the nigrostriatal pathway (Pum et al., 2009), countered attention/working memory-related deficits in a rat model of attention-deficit/hyperactivity disorder (Ruocco et al., 2014), and attenuated memory deficits in novel-object preference tasks (Trossbach et al., 2014; Wang et al., 2017).

Of relevance to the present study is the finding that IN-DA in rats reduced escape behavior from a noxious bright light, and



**Figure 3.** Differences ( $\Delta$ ) in freezing, escape thresholds, and time of post-stimulation freezing recorded before and after intranasal infusions of gel (vehicle) and 1 and 2 mg/kg DA, given (5  $\mu$ L per side) in rats submitted to electrical stimulation of dPAG. Thresholds for freezing (a) and escape (b) and duration of post-stimulation freezing (c) were recorded by dPAG electrical stimulation. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n=10$ /group). \* $p<0.05$  compared to gel control; # $p<0.05$  compared to 2 mg/kg dose of DA, according to repeated measure two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

decreased ultrasonic vocalizations induced by physical restraint (Talbot et al., 2017). The present results, showing that IN-DA treatment attenuated conditioned fear-related responses induced by electric shocks to the foot over trials and time, and decreased the unconditioned freezing induced by stimulating the dPAG, support and extend these findings. These results are relevant with respect to the evidence that DA may play a role in the mechanisms that underlie the perception of the behavioral reaction to aversive or threatening stimulation. The increased DA availability after its administration could account for its anti-aversive action and supports findings related to increased response to painful stimulation due to low DA transmission (Martikainen et al., 2018). Dietary DA depletion in humans also increased rating of pain (Thiemann et al., 2014). However, it should be noted that enhanced DA has also been reported to increase pain (Treister

et al., 2013) and to enhance response to aversive stimulation (for a review, see Taylor et al. (2016)). DA release in the NAc was found to respond to punishing events or signals of aversive stimulation (Badrinarayan et al., 2012; Biesdorf et al., 2015) and to correlate with the magnitude of the avoidance response (Pultorak et al., 2018). In addition, the firing of most dopaminergic neurons is suppressed by aversive stimulation or by aversive stimulus-related cues (Ungless et al., 2004). It may be of relevance here that the IN-DA procedure was also shown to increase DA release in the NAc and dorsal striatum (De Souza Silva et al., 2008) and to bind to the DA<sub>2</sub> transporter in the striatum (De Souza Silva et al., 2016). This concordance suggests that the striatum may be a focus of action of the effect of IN-DA in attenuating behavioral response to aversive stimulation.

The attenuation of conditioned fear (freezing) response over the three test trials was the result of IN-DA treatment five minutes prior to the first test of the conditioned response (CR). Thus, the attenuated freezing could be interpreted as a reduction in the expression of the conditioned fear during the first trial (i.e. an attenuated fear response), which continued to be reduced in the further two (extinction) trials. Such an interpretation suggests that conditioned fear could be attenuated by the administration of DA agonists prior to exposure to the conditioned stimulus (CS). On the other hand, administering a drug concomitant with testing for conditioning modifies the biological state of the animal from the one prevailing during conditioning to the one active during testing, resulting in the possibility of a state-dependent decrement in recall or expression of the CR. However, the attenuated freezing persisted over two further trials in the absence of DA treatment, weakening the argument of state dependency. It is also unlikely that IN-DA treatment increased the motor activity (Schindler and Carmona, 2002), resulting in less freezing during the first test, since this treatment did not change the number of crossings.

On the other hand, the attenuated fear response over the three testing trials might suggest that the IN-DA treatment hastened the rate of extinction of the conditioned fear. Such an interpretation was espoused in several studies that have used similar paradigms as those used in the current work, namely to administer a drug prior to the first test for conditioning (which was considered to be a trial to condition 'extinction memory' to the environmental CS; Furini et al., 2017; Myskiw et al., 2014). In a fear-conditioning paradigm similar to that used in the present work, Furini et al. (2017) injected methylphenidate (which increases extracellular levels of dopamine by blocking its reuptake) into the CA1 region of the hippocampus 20 minutes before the first conditioning test trial (which they called an 'extinction training' trial). They found less freezing behavior during both the 'training' trial and the subsequent extinction-retention test trials. These findings bolster the present data and suggest that enhanced hippocampal DA is involved in the diminished freezing response presently demonstrated.

Previous studies on the involvement of DA in anxiety have reported either anxiolytic- or anxiogenic-like effects and a lack of effect of DA agonists and antagonists in animal models of anxiety (Garcia et al., 2005; Rodgers et al., 1994). Part of that conflict may come from the psychobiological characteristics, whether unconditioned or conditioned, of the aversive stimulus used in these studies. Increased DA activity in the mesolimbic system is correlated with conditioned fear, and reduction of the DA activity in this

system leads to a reduced expression of conditioned fear (De Oliveira et al., 2011, 2009; De Souza Caetano et al., 2013; Martinez et al., 2008; Zweifel et al., 2011). Intraperitoneal injections of low doses of the D<sub>2</sub> receptor agonist quinpirole, acting on autoreceptors at the ventral tegmental area (VTA) neurons and decreasing DA release at dopaminergic projection axonal terminals, were found to attenuate conditioned fear (De Oliveira et al., 2009, 2011). Fear response to a conditioned stimulus appears to depend on the activation of VTA-mesocorticolimbic dopaminergic connections. Thus, our findings suggest that IN-DA may also be acting on presynaptic D<sub>2</sub> receptors in the brain stem, thereby reducing neuronal firing of dopaminergic efferent pathways. However, it cannot be ignored that DA acting on the D1/D5 receptor modulates both acquisition and consolidation of context-dependent extinction (André and Manahan-Vaughan, 2016).

Unconditioned fear-related studies have aimed to investigate the role of the dPAG in fear-related behavior (Brandão et al., 1999, 2005; Castilho and Brandão, 2001; Roncon et al., 2015; Twardowsky and Coimbra, 2015). Several studies have indicated anti-aversive effects of DA in the midbrain tectum, with emphasis on the dPAG, deep layers of the superior colliculus (dLSC), and inferior colliculus (Brandão et al., 2015; Brandão and Coimbra, 2019; De Oliveira et al., 2014; Muthuraju et al., 2014)). In the present study, 2 mg/kg IN-DA increased the escape threshold elicited by electrical stimulation of the dPAG. Injection of sulpiride, a D<sub>2</sub> receptor antagonist, into the dPAG and the dLSC increased the number of escape responses to a light stimulus (an index of innate fear reactions to illuminated areas) and reduced the number of entries into and time spent on the open arms in the elevated plus maze test (Muthuraju et al., 2016). These findings suggest that DA, through D<sub>2</sub> receptors in the dLSC and dPAG, is involved in defense reactions organized in the midbrain tectum.

The post-stimulation freezing following electrical stimulation of the dPAG has been considered the result of activation of ascending projection from the dPAG (Carvalho et al., 2015, 2018) and is considered an experimental model of panic attacks, with forebrain structures such as the amygdala and hippocampus playing a critical role in its organization (Carvalho et al., 2013, 2015, 2018; Fanselow, 1994). It has been proposed that different mechanisms are activated when aversive stimuli activate dPAG neurons; there is a concomitant activation of the dPAG toward the outcome defense reaction (freezing and escape responses), as well as the limbic processing of the signal through ascending neural circuits (post-stimulation freezing). The attenuation of the post-stimulation freezing by 1 mg/kg IN-DA highlight the evidence that the brain stem affects the processing of aversive information in rostral areas of the neuroaxis (Carvalho et al., 2015, 2018) and that DA can influence fear-related behavior processing through neuromodulation of ventral midbrain structures already demonstrated to exert control on dorsal midbrain neural activity (Almada and Coimbra, 2015; Almada et al., 2015, 2018). However, the likely broad distribution of the DA due to route of administration would not limit its action to dopaminergic receptors in the dPAG. The DA could also act on the autoreceptors in the VTA and therefore reduce activity of the mesolimbic pathway. It also could explain why only the low dose of DA affected the post-stimulation freezing. Although D<sub>2</sub> receptors are found both pre- and postsynaptically, it has been reported that the presynaptic sites are between 6 and 10 times more sensitive to apomorphine than the postsynaptic sites (Skirboll et al., 1979). Thus, it can be inferred that a high dose of DA could

affect postsynaptic receptors without affecting locomotor behavior. The administration of D2 agonist (Quimpirole) into the VTA as well as D2 antagonist (Sulpiride) into the dPAG concomitant to IN-DA could confirm this hypothesis.

The present findings show that IN-DA reduced conditioned and unconditioned fear responses without influencing exploratory behavior. Unfortunately, we do not know exactly which areas of the brain were activated by IN-DA in its action on these fear responses. However, it can be inferred that the mechanism of IN-DA could be similar to what has been proposed in the striatum where it acts on the DA transporter, promoting enhanced DA availability (De Souza Silva et al., 2016). Additional studies are required using specific D1 and D2 receptor agonists and antagonists in order to identify how DA acts to produce the effects observed here. Psychostimulants tend to have rewarding influences on behavior, and basal nuclei DA reflects expectation of reward (prediction errors; Kalisch et al., 2019; Schultz, 2010; Sutton and Barto, 1981). Possible rewarding effects of IN-DA could account for it reducing responses to unconditioned and conditioned fear. However, IN-DA has not yet been tested for reinforcing properties. In general, establishing the mechanisms by which DA participates in the organization of fear-related behavior can impact our understanding of anxiety, stress, pain, fear, and panic states, and the beneficial effects of IN-DA may be therapeutically relevant for these disorders.

#### Authors' Note

Claudia Mattern is an employee of M et P Pharma AG.

#### Acknowledgements

We acknowledge support by a Heisenberg Fellowship and Grant from the DFG (SO 1032/5-2 and SO 1032/2-5) to MADSS, and DFG (HU 306/27-3) to JPH. NCC was granted a research fellowship (level 1A) from CNPq (Grants 301905/2010-0 and 301341/2015-0). CRAL-P was granted a research fellowship from CNPq (Grant 304215/2016-3).

#### Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

#### Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Grants 2016/02640-1 and 2017/ 11855-8), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) (Grant 427397/2018-9), and a Pro-Rector of the University of São Paulo (USP) Research Grant (NAP-USP-NuPNE; Grant IaPq2012-156-USP-12.1.25440.01.6). None of these organizations had a role in the study design; the collection, analysis, and interpretation of the data; the writing of the report; or the decision to submit the paper for publication. RFM holds a doctoral scholarship from CAPES (Grant CAPES/PROEX-33002029012P3). MCC holds a postdoctoral fellowship from CNPq (Grant 113624/2018-2).

#### ORCID iDs

Milene Cristina de Carvalho  <https://orcid.org/0000-0002-5760-2999>  
 Rebeca Machado de Figueiredo  <https://orcid.org/0000-0002-3883-7338>  
 Norberto Cysne Coimbra  <https://orcid.org/0000-0002-4676-2620>  
 Christie Ramos Andrade Leite-Panissi  <https://orcid.org/0000-0003-1762-2730>

#### References

- Almada RC and Coimbra NC (2015) Recruitment of striatonigral disinhibitory and nigroreticular inhibitory GABAergic pathways during the organization of defensive behavior by mice in a dangerous environment with the venomous snake *Bothrops alternatus* (Reptilia, Viperidae). *Synapse* 69: 299–313.
- Almada RC, Genewsky AJ, Heinz DE, et al. (2018) Stimulation of the nigroreticular pathway at the level of the superior colliculus reduces threat recognition and causes a shift from avoidance to approach behavior. *Front Neural Circuits* 12: 36.
- Almada RC, Roncon CM, Elias-Filho DH, et al. (2015) Endocannabinoid signaling mechanisms in the substantia nigra pars reticulata modulate GABAergic nigroreticular pathways in mice threatened by *uru-tucruzeiro* venomous pit viper. *Neuroscience* 303: 503–514.
- André MA and Manahan-Vaughan D (2016) Involvement of dopamine D1/D5 and D2 receptors in context-dependent extinction learning and memory reinstatement. *Front Behav Neurosci* 9: 372.
- Badrinarayan A, Wescott SA, Vander Weele CM, et al. (2012) Aversive stimuli differentially modulate real-time dopamine transmission dynamics within the nucleus accumbens core and shell. *J Neurosci* 32: 15779–15790.
- Biesdorf C, Wang A-L, Topic B, et al. (2015) Dopamine in the nucleus accumbens core, but not shell, increases during signaled food reward and decreases during delayed extinction. *Neurobiol Learn Mem* 123: 125–139.
- Brandão ML and Coimbra NC (2019) Understanding the role of dopamine in conditioned and unconditioned fear. *Rev Neurosci* 30: 325–337.
- Brandão ML, Anseloni VZ, Pandóssio JE, et al. (1999) Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 863–875.
- Brandão ML, Borelli KG, Nobre MJ, et al. (2005) Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1299–1311.
- Brandão ML, De Oliveira AR, Muthuraju S, et al. (2015) Dual role of dopamine D2-like receptors in the mediation of conditioned and unconditioned fear. *FEBS Lett* 589: 3433–3437.
- Buddenberg TE, Topic B, Mahlberg ED, et al. (2008) Behavioral actions of intranasal application of dopamine: effects on forced swimming, elevated plus-maze and open field parameters. *Neuropsychobiology* 57: 70–79.
- Carvalho MC, Santos JM, Bassi GS, et al. (2013) Participation of NK1 receptors of the amygdala on the processing of different types of fear. *Neurobiol Learn Mem* 102: 20–27.
- Carvalho MC, Santos JM and Brandão ML (2015) Dorsal periaqueductal gray post-stimulation freezing is counteracted by neurokinin-1 receptor antagonism in the central nucleus of the amygdala in rats. *Neurobiol Learn Mem* 121: 52–58.
- Carvalho MC, Veloni AC, Genaro K, et al. (2018) Behavioral sensitization induced by dorsal periaqueductal gray electrical stimulation is counteracted by NK1 receptor antagonism in the ventral hippocampus and central nucleus of the amygdala. *Neurobiol Learn Mem* 148: 60–68.
- Castilho VM and Brandão ML (2001) Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT2A receptors in rats. *Psychopharmacology* 155: 154–162.
- Chapman CD, Frey WH, Craft S, et al. (2013) Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharm Res* 30: 2475–2484.
- Coimbra NC, De Oliveira R, Freitas RL, et al. (2006) Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. *Exp Neurol* 197: 93–112.

- Crowe TP, Greenlee MHW, Kanthasamy AG, et al. (2018) Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sciences* 195: 44–52.
- Dahlin M, Bergman U, Jansson B, et al. (2000) Transfer of dopamine in the olfactory pathway following nasal administration in mice. *Pharm Res* 17: 737–742.
- Dahlin M, Jansson B and Björk E (2001) Levels of dopamine in blood and brain following nasal administration to rats. *Eur J Pharm Sci* 14: 75–80.
- De Oliveira AR, Colombo AC, Muthuraju S, et al. (2014) Dopamine D2-like receptors modulate unconditioned fear: role of the inferior colliculus. *PLoS One* 9: e104228.
- De Oliveira AR, Reimer AE and Brandão ML (2009) Role of dopamine receptors in the ventral tegmental area in conditioned fear. *Behav Brain Res* 199: 271–277.
- De Oliveira AR, Reimer AE, De Macedo CEA, et al. (2011) Conditioned fear is modulated by D2 receptor pathway connecting the ventral tegmental area and basolateral amygdala. *Neurobiol Learn Mem* 95: 37–45.
- De Souza Caetano KA, De Oliveira AR and Brandão ML (2013) Dopamine D2 receptors modulate the expression of contextual conditioned fear: role of the ventral tegmental area and the basolateral amygdala. *Behav Pharmacol* 24: 264–274.
- De Souza Silva MA, Mattern C, Decheva C, et al. (2016) Intranasal dopamine reduces in vivo [(123)I]FP-CIT binding to striatal dopamine transporter: correlation with behavioral changes and evidence for Pavlovian conditioned dopamine response. *Front Behav Neurosci* 10: 80.
- De Souza Silva MA, Topic B, Huston JP, et al. (2008) Intranasal dopamine application increases dopaminergic activity in the neostriatum and nucleus accumbens and enhances motor activity in the open field. *Synapse* 62: 176–184.
- Dhuria SV, Hanson LR and Frey WH (2010) Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci* 99: 1654–1673.
- Di Gioia S, Trapani A, Mandracchia D, et al. (2015) Intranasal delivery of dopamine to the striatum using glycol chitosan/sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin based nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 94: 180–193.
- Eichenberger GCD, Ribeiro SJ, Osaki MY, et al. (2002) 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. *Neuropharmacology* 42: 48–59.
- Fanselow MS (1994) Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychon Bull Rev* 1: 429–438.
- Furini CRG, Behling JAK, Zinn CG, et al. (2017) Extinction memory is facilitated by methylphenidate and regulated by dopamine and noradrenaline receptors. *Behav Brain Res* 326: 303–306.
- Garcia A, Martinez R, Brandão M, et al. (2005) Effects of apomorphine on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiol Behav* 85: 440–447.
- Graeff FG (2004) Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 239–259.
- Kalisch R, Gerlicher AMV, Duvarci S (2019) A dopaminergic basis for fear extinction. *Trends Cogn Sci* 23: 274–277.
- Li C, Sugam JA, Lowery-Gionta EG, et al. (2016) Mu opioid receptor modulation of dopamine neurons in the periaqueductal gray/dorsal raphe: a role in regulation of pain. *Neuropsychopharmacology* 41: 2122–2132.
- Lochhead JJ and Thorne RG (2012) Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev* 64: 614–628.
- Martikainen IK, Hagelberg N, Jääskeläinen SK, et al. (2018) Dopaminergic and serotonergic mechanisms in the modulation of pain: in vivo studies in human brain. *Eur J Pharmacol* 834: 337–345.
- Martinez RCR, Oliveira AR, Macedo CE, et al. (2008) Involvement of dopaminergic mechanisms in the nucleus accumbens core and shell subregions in the expression of fear conditioning. *Neurosci Lett* 446: 112–116.
- Muthuraju S, Nobre MJ, Saito VMN, et al. (2014) Distinct effects of haloperidol in the mediation of conditioned fear in the mesolimbic system and processing of unconditioned aversive information in the inferior colliculus. *Neuroscience* 261: 195–206.
- Muthuraju S, Talbot T and Brandão ML (2016) Dopamine D2 receptors regulate unconditioned fear in deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. *Behav Brain Res* 297: 116–123.
- Myskiw JC, Izquierdo I and Furini CRG (2014) Modulation of the extinction of fear learning. *Brain Res Bull* 105: 61–69.
- Paxinos G and Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, CA: Academic Press.
- Pultorak KJ, Schelp SA, Isaacs DP, et al. (2018) A transient dopamine signal represents avoidance value and causally influences the demand to avoid. *eNeuro* 5.
- Pum ME, Schäble S, Harooni HE, et al. (2009) Effects of intranasally applied dopamine on behavioral asymmetries in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the nigro-striatal tract. *Neuroscience* 162: 174–183.
- Reis FL V, Masson S, De Oliveira AR, et al. (2004) Dopaminergic mechanisms in the conditioned and unconditioned fear as assessed by the two-way avoidance and light switch-off tests. *Pharmacol Biochem Behav* 79: 359–365.
- Ribeiro SJ, Ciscato JG, Jr, De Oliveira R, et al. (2005) Functional and ultrastructural neuroanatomy of interactive intratectal/tectonigral mesencephalic opioid inhibitory links and nigroretectal GABAergic pathways: involvement of GABA<sub>A</sub> and  $\mu_1$ -opioid receptors in the modulation of panic-like reactions elicited by electrical stimulation of the dorsal midbrain. *J Chem Neuroanat* 30: 184–200.
- Rodgers RJ, Nikulina EM and Cole JC (1994) Dopamine D1 and D2 receptor ligands modulate the behaviour of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 49: 985–995.
- Roncon CM, Almada RC, Maraschin JC, et al. (2015) Pharmacological evidence for the mediation of the panicolytic effect of fluoxetine by dorsal periaqueductal gray matter  $\mu$ -opioid receptors. *Neuropharmacology* 99: 620–626.
- Ruocco LA, Treno C, Gironi Carnevale UA, et al. (2014) Prepubertal intranasal dopamine treatment in an animal model of ADHD ameliorates deficient spatial attention, working memory, amino acid transmitters and synaptic markers in prefrontal cortex, ventral and dorsal striatum. *Amino Acids* 46: 2105–2122.
- Schindler CW and Carmona GN (2002) Effects of dopamine agonists and antagonists on locomotor activity in male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 857–863.
- Schoo SM, Bobeck EN and Morgan MM (2018) Enhanced antinociception with repeated microinjections of apomorphine into the periaqueductal gray of male and female rats. *Behav Pharmacol* 29: 234–240.
- Schultz W (2010) Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behav Brain Funct* 6: 24.
- Skirboll LR, Grace AA and Bunney BS (1979) Dopamine auto and post-synaptic receptors: electrophysiological evidence for differential sensitivity to dopamine agonists. *Science* 206: 80–82.
- Sutton RS and Barto AG (1981) Toward a modern theory of adaptive networks: expectation and prediction. *Psychol Rev* 88: 135–170.
- Talbot T, Mattern C, De Souza Silva MA, et al. (2017) Intranasal administration of dopamine attenuates unconditioned fear in that it reduces restraint-induced ultrasound vocalizations and escape from bright light. *J Psychopharmacol* 31: 682–690.
- Tayebati SK, Nwankwo IE and Amenta F (2013) Intranasal drug delivery to the central nervous system: present status and future outlook. *Curr Pharm Des* 19: 510–526.

- Taylor AMW, Becker S, Schweinhardt P, et al. (2016) Mesolimbic dopamine signaling in acute and chronic pain: implications for motivation, analgesia, and addiction. *Pain* 157: 1194–1198.
- Tiemann L, Heitmann H, Schulz E, et al. (2014) Dopamine precursor depletion influences pain affect rather than pain sensation. *PLoS One* 9: e96167.
- Treister R, Pud D and Eisenberg E (2013) The dopamine agonist apomorphine enhances conditioned pain modulation in healthy humans. *Neurosci Lett* 548: 115–119.
- Trossbach SV, De Souza Silva MA, Huston JP, et al. (2014) Intranasal dopamine treatment reinstates object-place memory in aged rats. *Neurobiol Learn Mem* 114: 231–235.
- Twardowsky A and Coimbra NC (2015)  $\mu$ - and  $\kappa$ -Opioid receptor activation in the dorsal periaqueductal grey matter differentially modulates panic-like behaviours induced by electrical and chemical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Res* 1597: 168–179.
- Ullah F, dos Anjos-Garcia T, dos Santos IR, et al. (2015) Relevance of dorsomedial hypothalamus, dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal gray matter in the organization of freezing or oriented and non-oriented escape emotional behaviors. *Behav Brain Res* 293: 143–152.
- Ullah F, dos Anjos-Garcia T, Mendes-Gomes J, et al. (2017) Connexions between the dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal grey matter are critical in the elaboration of hypothalamically mediated panic-like behaviour. *Behav Brain Res* 319: 135–147.
- Ungless MA, Magill PJ and Bolam JP (2004) Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli. *Science* 303: 2040–2042.
- Wang A-L, Fazari B, Chao OY, et al. (2017) Intra-nasal dopamine alleviates cognitive deficits in tgDISC1 rats which overexpress the human DISC1 gene. *Neurobiol Learn Mem* 146: 12–20.
- Wenzel JM, Rauscher NA, Cheer JF, et al. (2015) A role for phasic dopamine release within the nucleus accumbens in encoding aversion: a review of the neurochemical literature. *ACS Chem Neurosci* 6: 16–26.
- Zweifel LS, Fadok JP, Argilli E, et al. (2011) Activation of dopamine neurons is critical for aversive conditioning and prevention of generalized anxiety. *Nat Neurosci* 14: 620–626.