

## Plano de Atividades Bolsista PD (Temático 11/00041-3)

### Mediação por mecanismos dopaminérgicos da imobilidade defensiva induzida por estimulação do colículo inferior

#### **Resumo**

A estimulação elétrica ou quimicamente de diversas áreas do chamado sistema encefálico aversivo (SEA) provoca uma série de reações comportamentais e fisiológicas de natureza defensiva, como alerta, congelamento e respostas de fuga associadas a comportamentos de avaliação de risco, e alterações hormonais e autonômicas. Uma resposta que vem sendo bastante investigada nesse contexto é o chamado congelamento pós-estimulação de estruturas do teto mesencefálico, como a substância periaquedutal dorsal (SCPd) e os aspectos ventrais do núcleo central do colículo inferior (CIC). Esta resposta corresponde ao período que se segue a um perigo imediato intenso ou um ataque de pânico. Como sabemos que estímulos neutros associados à estimulação da SCPd ou do CIC adquirem propriedades aversivas é possível que esta resposta seja indicativa de medo condicionado contextual associado ao estado aversivo gerado pela estimulação do teto mesencefálico de forma que tem sido considerado como um modelo de distúrbio de pânico. O substrato neural do congelamento pós-estimulação do colículo inferior pode estar subjacente ao estado aversivo gerado ainda no nível do processamento da informação aversiva. Neste projeto vamos investigar uma provável mediação dopaminérgica dessa resposta defensiva. Três evidências obtidas nesse laboratório recentemente justificam essa abordagem: i) a catalepsia que se obtém por bloqueio de receptores dopaminérgicos (DA) no estriado dorsal se assemelha bastante à imobilidade pós-estimulação elétrica ou química (com injeções locais de NMDA) do CIC (Cardoso et al. 1994), ii) o CIC contém concentrações apreciáveis de DA de forma que este neurotransmissor pode mediar certas respostas defensivas nesta estrutura mesencefálica, como a esquiva ativa (Troncoso et al. 2003), iii) a injeção sistêmica de haloperidol inibe a imobilidade pós-estimulação química com NMDA do CIC.

Neste projeto vamos estudar os mecanismos subjacentes à imobilidade pós-estimulação do CIC na perspectiva de entender o filtro sensorimotor para as informações aversivas que ascendem neste nível mesencefálico para estruturas superiores. Isto será feito através da análise dos efeitos de manipulações do sistema DA no CIC sobre as respostas defensivas induzidas por sua estimulação elétrica ou química com NMDA, os seus correlatos eletrofisiológicos (potenciais evocados auditivos), neuroquímicos associados no estriado dorsal (microdiálise) e o recrutamento de estruturas envolvidas com o filtro sensorial (“sensorimotor gating”) das respostas defensivas (marcação Fos). Será feita uma análise comparativa entre os resultados obtidos com as abordagens comportamentais, farmacológica, eletrofisiológica e neuroquímica também aplicadas à catalepsia tradicionalmente obtida com injeções sistêmicas de haloperidol.

## **Fundamentação**

A estimulação elétrica da substância cinzenta periaqueductal (SCPd) e das porções ventrais do núcleo central do colículo inferior (CIC) de roedores com intensidades crescentes de corrente causa alerta, congelamento e fuga (Brandão et al., 1988, 1993, 1999, 2001, 2005). Após o término da estimulação elétrica dessas estruturas o animal entra em um estado de imobilidade intensa (Vianna et al., 2001). Acredita-se que as reações defensivas associadas à estimulação dessas estruturas possam ser representativas nos animais dos ataques de pânico em humanos enquanto que a imobilidade pós-estimulação elétrica de estruturas do teto mesencefálico esteja associada aos distúrbios do pânico (Brandão et al. 2008). Estas predições resultam do fato de que os ataques de pânico são incontrolados e sem regulação de mecanismos inibitórios supratentais enquanto que o distúrbio do pânico cursa com contextualização do meio, processamento cognitivo e, em razão disso, conta com a desregulação de mecanismos supratentais de controle (Vianna et al. 2001, Brandão et al. 2008). De fato, as reações defensivas associadas à estimulação da SCPd não estão sob controle de estruturas prosencefálicas como a amígdala uma vez que a lesão eletrolítica ou inativação dessa estrutura com injeções locais de muscimol não alteram os substratos neurais responsáveis pela

expressão (output) dessas respostas no teto mesencefálico (Maisonnette et al. 1996, Ruiz-Martinez et al. 2006). Por outro lado, essas manipulações da amígdala reduzem significativamente a imobilidade pós-estimulação da SCPd (Ruiz-Martinez et al. 2005, 2006). Portanto, há dois conjuntos de respostas com significados biológicos distintos neste contexto: 1) alerta, congelamento e fuga associado com ataques de pânico sem regulação pela amígdala e 2) imobilidade pós-estimulação associada com distúrbios de pânico e sob controle da amígdala. Enquanto que, de maneira geral, possamos nos referir a essas respostas como sendo geradas e elaboradas no teto mesencefálico há uma clara prevalência da SCPd sobre o CIC nos estudos publicados sobre este tópico na literatura. Sem dúvida, enquanto que o nosso conhecimento sobre a mediação química da reação de defesa organizada na SCPd já esteja bem avançada com a identificação de mecanismos mediados por aminoácidos excitatórios, gabaérgicos, serotoninérgicos, opióides e neurocininérgicos muito pouco se sabe sobre os mecanismos neuroquímicos subjacentes à reação de defesa integrada no CIC (Cardoso et al., 1994, Brandão et al., 1999, 2005, Moreira et al., 2003). De especial importância para esse tema sabe-se que é a porção ventral do CI que possui os chamados substratos neurais do medo que por sua vez está anatomo-funcionalmente associada à porção ventral da SCP (Maisonnette et al., 1996). A porção dorsal do CIC não faz parte do sistema encefálico de aversão e está anatomo-funcionalmente conectado a estruturas que subservem as chamadas crises audiogênicas (Ferreira-Netto et al., 2006).

A mediação dopaminérgica constitui-se uma das diferenças mais marcantes entre a mediação química da reação de defesa na SCPd e no CIC. De fato, a estimulação elétrica do CIC no limiar de fuga – mas não da SCPd – promovia uma significativa liberação de dopamina no córtex pré-frontal (Cuadra et al. 2001). A amígdala basolateral intermedeia esse efeito na medida que sua inativação com injeções locais de muscimol nessa estrutura reduz consistentemente essa liberação. Estas conexões funcionais entre o cortex pré-frontal, amígdala, núcleos da base e áreas mesencefálicas encontram sustentação em evidências que mostram que estes circuitos neurais podem ser recrutados durante estados emocionais (Macedo et al., 2006). Neste contexto, é sabido que eventos

sensoriais e comportamento motor interagem fortemente em situações com conotação afetiva aversiva em pacientes parkinsonianos (Matsui et al. 2006, Baker et al. 2007, Willems et al. 2007, Arias e Cudeiro 2008). O fato de o CI possuir concentrações apreciáveis de dopamina (Troncoso et al., 2003) e manter importantes conexões com a substância negra pars reticulata (Olazabal e Moore, 1989, Yasui et al., 1991, Nobre et al., 2004) traz uma conotação adicional para investigação do papel dessas estruturas no funcionamento do “sensorimotor gating”. Como estas conexões nigrocoliculares são GABAérgicas faz sentido que elas sejam regulatórias da atividade colicular que processa as informações aversivas que ascendem para o tálamo (Coimbra e Brandão, 1993). Enquanto que a participação do colículo superior no controle da postura e do movimento esteja bem estabelecida (vias teto-espinhais) embora existam várias evidências da participação do CIC nos chamados circuitos neurais que organizam a resposta de sobressalto (Koch 1999, Reimer et al., 2008) as evidências de um papel do CI no controle motor ainda são esparsas (Casaday e Covey 1996).

Se admitirmos que o CI além de ser uma estação importante de informações auditivas normais também possui a função de integrar a informação sensorial de natureza aversiva com a resposta motora então poderíamos considerar hipoteticamente que o CIC poderia servir como um filtro sensoriomotor mesencefálico (“mesencephalic sensorimotor gating”), que seria uma espécie de contrapartida da função estriatal fundamentalmente associada à função motora. Através de mecanismos neuroquímicos similares os sistemas nigroestriatais e nigrocoliculares regulariam os movimentos e a comporta sensorimotora, respectivamente. Do lado do controle motor temos as conhecidas vias nigroestriatais dopaminérgicas que sob ação de drogas antagonistas de receptores D2 como o haloperidol produzem catalepsia (Hornkiewicz 1973, Sanberg 1980, Ossokawa et al. 1990). Do lado do controle sensorimotor no CIC, drogas que reduzem a transmissão DA também inibem o processamento da informação de natureza aversiva com a conseqüente diminuição das respostas defensivas (Troncoso et al. 2003). De fato, a injeção de apomorfina aumenta a emissão de respostas de esquiva de ratos submetidos a um procedimento de esquiva ativa que utiliza como estímulo incondicionado a estimulação

elétrica do CI, indicando um incremento da aversão, enquanto que a clorpromazina inibe essas respostas (Troncoso et al., 2003). A redução da transmissão DA no CIC como a promovida pela injeção local de NMDA também favorece a imobilidade defensiva enquanto que os antagonistas de receptores NMDA – AP7 – reduzem esta resposta (Cardoso et al. 1994). Embora que somente evidências indiretas da modulação dopaminérgica da comporta sensorimotora, a sua regulação por mecanismos GABAérgicos está bem demonstrada por um estudo realizado recentemente neste laboratório de Neuropsicofarmacologia (Nobre et al., 2010). Dois tipos de evidências obtidas nesse trabalho foram marcantes. Primeiro, observou-se que a magnitude dos potenciais evocados auditivos (PEA) captados por eletrodos implantados no CIC era significativamente maior em ratos selecionados previamente no labirinto em cruz elevado por apresentar ansiedade traço que nos animais com reatividade aversiva normal aos braços abertos desse teste. Segundo que o agonista de receptores GABA reduziu enquanto que os antagonistas GABAérgicos, como a semicarbazida e a bicuculina, aumentaram a magnitude dos PEA. Portanto, um filtro sensorimotor regulado por GABA regula a atividade dos substratos neurais da aversão neste nível mesencefálico.

Além da necessidade de investigar outros neuromediadores deste processo algumas indagações estão associadas a esse projeto. Por exemplo, em que medida a redução da imobilidade por antagonistas NMDA ou o seu incremento por NMDA têm a ver com a catalepsia induzida por injeção sistêmica de haloperidol. A resposta a este questionamento começou a ser dada em trabalho publicado recentemente no qual foi observado que as injeções de NMDA e de seus antagonistas – AP7 e MK-801– diretamente no CI incrementou ou atenuou – respectivamente – a catalepsia induzida por injeções sistêmicas de haloperidol (Melo et al. 2010). Se os mecanismos mediados por aminoácidos excitatórios exercem papel oposto daqueles mediados por mecanismos dopaminérgicos – a exemplo do que ocorre na via córtex frontal-nucleus acumbens – está ainda em aberto (Fuster, 1989). De qualquer forma, esses dados obtidos por Melo et al. (2010) não só implicam o CI na integração sensoriomotora no mesencéfalo como apontam para a influência do CI sobre a modulação da função motora em estruturas prosencefálicas. Em

suporte a esta última possibilidade estão as evidências neuroanatômicas de conexões recíprocas entre o globo pálido caudal e o CI (Morizumi e Hattori 1991, Shammah-Lagnado et al. 1996).

## **Objetivos**

Com esse projeto visamos avançar o conhecimento atual sobre as bases neurobiológicas do medo e da ansiedade. Para tanto, utilizaremos uma abordagem comportamental, farmacológica, neuroquímica e imunoistoquímica para avaliar em que medida a neurotransmissão dopaminérgica no CIC está envolvida na atividade do chamado filtro sensorimotor que regula a passagem de informações sensoriais de natureza aversiva nessa região mesencefálica. Na primeira fase do projeto avaliaremos a extensão do envolvimento de mecanismos dopaminérgicos no processamento dessas informações aversivas no CIC. Serão analisados os efeitos de drogas agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre as respostas comportamentais defensivas geradas por estimulação elétrica ou química do CIC e sobre os potenciais evocados auditivos registrados diretamente dessa estrutura durante o congelamento pós-estimulação química com NMDA do CIC. Na segunda fase, avaliaremos por intermédio da distribuição da proteína Fos quais estruturas do SNC recrutadas pela imobilidade defensiva pós-estimulação elétrica ou química com injeções locais de NMDA nos aspectos ventrais do CIC. Em uma terceira etapa, a abordagem neuroquímica avaliará as alterações na neurotransmissão dopaminérgica nas áreas de interesse (marcadas com Fos) através do uso da técnica de microdiálise. Finalmente, analisaremos em que medida drogas agonistas e antagonistas dopaminérgicas injetadas diretamente nas estruturas prosencefálicas marcadas por Fos afetam a imobilidade defensiva gerada por estimulação do CIC.

## **Metodologia**

### **Animais e cirurgia**

Serão utilizados ratos Wistar machos, com peso médio de 270 gramas, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto.

Após 48 horas de adaptação ao biotério setorial os animais serão submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de um eletrodo (para estimulação ou registro de potenciais evocados auditivos) ou uma cânula-guia para injeção local de drogas ou para passagem de uma sonda de microdiálise direcionada às estruturas de interesse (colículo inferior ou estriado dorsal) segundo coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (2007). Os animais serão agrupados (cinco animais por caixa) em gaiolas de polipropileno (30 × 32 × 18 cm), forradas com maravalha, tendo livre acesso à água e alimento. Os animais serão mantidos em um biotério setorial com temperatura controlada de 23 °C ± 1 °C e um programa de iluminação artificial com ciclo claro-escuro 12 h × 12 h, com início do período claro às 7h00. Todos os experimentos serão realizados durante a fase clara do ciclo. Os animais serão transportados individualmente até as salas experimentais em caixas de polipropileno forradas com maravalha, medindo 28 × 17 × 13 cm. Esta descrição se aplica para todas as abordagens deste projeto temático.

### **Drogas**

O envolvimento de mecanismos dopaminérgicos nas respostas defensivas estudadas nesse projeto será investigado por pré-tratamento com agonistas (apomorfina, SKF 38393 e quimpirole) e antagonistas dopaminérgicos (SCH 23390, sulpirida, haloperidol) aplicados diretamente no colículo inferior ou no estriado dorsal. Quanto aos mecanismos mediados por AAE serão utilizados o agonista de aminoácidos excitatórios *N*-metil-D-aspartato (NMDA - Sigma, USA, 0,1 µg/µl), o antagonista não competitivo de receptores NMDA [(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d] cyclohepten-5,10-imine maleate] (MK-801 – Tocris, Brasil, 10 µg/µl), e o ácido-2-amino-7-fosfonoheptanóico (AP-7, Research Biochemicals, EUA) - antagonista seletivo para receptores NMDA (2,0 nmol/0,2 µl).

### **Microinjeções**

Durante o procedimento de microinjeção de drogas, os animais permanecerão livres em uma caixa de polipropileno forrada com maravalha, medindo 28 × 17 × 13 cm. Uma agulha dental 1 mm maior do que a cânula-guia será utilizada. A agulha estará conectada a um tubo de polietileno (PE-10; Becton-Dickinson, NJ, EUA) e a uma seringa Hamilton graduada de 10 µL. As drogas serão injetadas no BLA em um volume constante

de 0,2  $\mu$ L, durante um período de 1 min de microinjeção, com o auxílio de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, MA, EUA). O deslocamento de uma bolha de ar no interior do tubo de polietileno será utilizado para monitorar a microinjeção. Após o término da infusão, a agulha será mantida por mais 1 min para evitar refluxo da droga pela cânula-guia.

### **Testes comportamentais**

Os animais serão colocados em uma arena circular (50 x 60 cm) e conectados através de um cabo de estimulação a um estimulador de onda senoidal (Del Vecchio, Ribeirão Preto, Brasil) ligado a um osciloscópio para monitoração da corrente aplicada. Os estímulos serão aplicados em intensidades crescentes, a passos de 5  $\mu$ A por 15 s, até que ocorram as reações de alerta, congelamento e fuga. Os limiares de cada uma dessas respostas serão registrados bem como tempo do congelamento pós-estimulação definido como interrupção completa dos movimentos exceto os necessários para a respiração. O tempo de congelamento pós-estimulação também será registrado por 30 min após a injeção intra-CIC de NMDA, como previamente relatado (Cardoso et al., 1994). Os comportamentos emitidos pelos animais serão registrados por uma câmera de vídeo posicionada em frente à arena.

As vocalizações ultrassônicas (VUSs) na faixa de 20 a 24 KHz serão também avaliadas nesse período. As VUSs são respostas defensivas comumente encontradas em ratos em condições consideradas ameaçadoras (Bassi et al. 2007). Os animais serão colocados em uma caixa experimental (30 x 20 x 20 cm) feitas de barra de aço inoxidável, espaçadas por 12 mm. Esta caixa ficará situada no interior de uma câmara maior, acolchoada, isolada acusticamente e ventilada constantemente (60x40 x 45 cm). Uma lâmpada vermelha (6 W) situada no teto fornecerá a iluminação necessária no interior da caixa. Os equipamentos utilizados para registro e análise das vocalizações ultrassônicas consistem de um microfone especial para este tipo de frequência (Emkay FG-3629; Avisoft Bioacoustics, Berlim, Alemanha), O microfone é conectado através de um dispositivo de áudio (Avisoft UltraSoundGate116 USB a um computador onde os dados acústicos são exibidos em tempo real por software (Avisoft Recorder (version 2.7; Avisoft Bioacoustics)

e registrados numa frequência de amostragem de 214.285 Hz em formato de 16 bits. As sessões consistirão em colocar os animais individualmente na caixa experimental por 15 minutos e registrar os comportamentos e emissões de vocalizações nas frequências emitidas em três blocos de 5 minutos. O número e a duração em segundos das vocalizações ultrassônicas serão transferidos para um processador (SASLab Pro, versão 4.38; Avisoft Bioacoustics, Berlim, Alemanha) fornecido pelo fabricante do aparelho (Avisoft, Alemanha). O registro de todo o espectro de frequências de VUS de cada animal é armazenado no hardisk e depois transferidos para planilhas do Excel para posterior análise das variáveis de interesse.

Para fins de análise comparativa, os registros de VUS também serão realizados em animais tornados catalepticos após tratamento com haloperidol (2 mg/kg, IP). Para verificação da catalepsia os ratos são posicionados cuidadosamente com suas patas dianteiras em uma barra horizontal de madeira situada a 8 cm do assoalho da caixa experimental. A medida da catalepsia é dada pelo registro do tempo que ambas as patas permanecem sobre a barra (Morelli e Dichiaro 1985). A sessão experimental consistirá de três medidas de catalepsia, separadas por um intervalo de 10 min.

### **Neuroquímica**

Há um consenso sobre a importância de pesquisas que procuram determinar em que extensão os sistemas de neurotransmissão mediados pelos neuropeptídeos, bem como pela dopamina, participam do processamento de informações associadas a estímulos estressantes. Assim, o objetivo do presente estudo é examinar o conteúdo extracelular de substância P e de dopamina nas seguintes áreas do SEA: núcleos central e basolateral da amígdala, SCPd, no hipotálamo medial, bem como no córtex frontal medial e no colículo inferior. O conteúdo extracelular será coletado utilizando a técnica de microdiálise durante as respostas incondicionadas de medo por estimulação do CIC. A análise das frações coletadas será realizada por meio das técnicas de radioimunoensaio (RIA para SP) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE para dopamina).

Animais serão anestesiados com tribromoethanol (250 mg/kg, i.p.) e colocados em um estereotáxico para implantação de cânulas-guia dirigidas para as estruturas do SEA de

interesse. Sete dias depois as sondas de microdiálise (CMA/12, CMA/Microdialysis AB, Stockholm, Sweden) serão inseridas bilateralmente nas estruturas do SEA através das cânulas-guia. Numa cuba de microdiálise, serão coletados três dialisados basais para cada estrutura encefálica investigada e, após esse período, os animais serão transferidos e expostos a cada um dos procedimentos de medo condicionado (contextual, medo condicionado à luz e ao som usados como estímulos condicionados) e incondicionado (altura, espaços abertos, novidade e isolamento) usados rotineiramente nesse laboratório. A seguir, os animais retornarão para a cuba de microdiálise e serão coletadas outras dez amostras de dialisados. As concentrações de dopamina e seu metabólito o ácido 3,4 di-hidroxifenilacético (DOPAC) nas frações coletadas serão analisadas por CLAE acoplado a um detector eletroquímico. Esta técnica é realizada rotineiramente nesse laboratório (Macedo et al., 2005a,b, 2007). O sistema CLAE consiste de um detector eletroquímico (BAS, West Lafayette, IN, USA) com um eletrodo de carbono de vidro e uma bomba (PM-92e, BAS, West Lafayette, IN, USA). O potencial será estabelecido em 650 mV (comparado com um eletrodo Ag-AgCl de referência). A fase móvel consistirá de 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 0.5 mM n-octyl sodium sulfate, and 15% metanol (pH ajustado a 5.5) filtrada e bombeada no sistema através de um fluxo de 80 µL/min. O volume de injeção será de 20 µL. Será utilizada uma coluna de fase-reversa ODS, C-18, 3 µm, UniJet 100 × 10 mm (BAS, West Lafayette, IN, USA).

### **Deteção da Proteína Fos**

Para cada região, serão coletados três cortes histológicos coronais, seriados, com espessura de 40 µm. Um corte será coletado em PBS 0,1M, para o ensaio de imunistoquímica; o segundo corte será colocado em lâminas e corados com Nissl – útil para localização e comparação neuroanatômica –; o terceiro corte servirá como backup (Borelli et al., 2005). Os cortes serão tratados com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% em PBS 0,1M) seguido de quatro lavagens com PBS 0,1M (5 minutos cada). Posteriormente, os cortes serão incubados overnight com anticorpo primário policlonal anti-fos, produzido em coelho (Santa Cruz, USA, SC-52), na concentração de 1:2000 em PBS+ (PBS 0,1M acrescido de soro albumina bovina, 1 mg/mL e do detergente triton X-100, 2 µL/mL)

seguido de três lavagens e incubadas com o anticorpo secundário (anticorpo policlonal antioelho biotilado, Kit ABC Elite, Vectastain), na concentração 1:400 em PBS+, durante 1 hora. O tecido será novamente lavado por três vezes e incubado por 1 hora com o complexo de peroxidase avidina-biotina (reagentes A e B; Kit ABC Elite, Vectastain) em PBS 0,1M, na concentração de 1:250 cada, para formação dos complexos entre a avidina e a peroxidase-biotilada; lavados em PBS 0,1M por três vezes e finalmente será revelada a reação tetracloro de 3,3'-di-amino-benzidina (DAB, Sigma) acrescido de peróxido de hidrogênio 0,02% em PBS 0,1M.

### **Potenciais evocados auditivos (PEA)**

Para o registro eletrofisiológico será utilizada uma gaiola de contenção de acrílico (25 x 12 x 9 cm) com piso composto de barras de aço inoxidável, localizados dentro de uma gaiola de Faraday (60 x 40 x 45 cm) que oferece um ruído constante de 50 dB. A iluminação será fornecida por uma lâmpada vermelha de 15 W localizada no topo da gaiola. Os animais serão conectados ao amplificador através de um cabo bipolar cujas terminações estarão ligadas ao eletrodo no animal e a um swivel localizado no topo da gaiola de Faraday. Outro cabo similar conectará o swivel ao amplificador biológico. Os animais serão habituados a caixa experimental por 15 minutos, antes do início dos experimentos. Os estímulos sonoros (100 cliques, 110 dB, pulso de onda quadrada, 300 Hz, 10 ms de duração, frequência de apresentação de 1 Hz) serão apresentados através de dois tweeters (12  $\Omega$ , 200 W, LeSon, Brazil), montados isoladamente, 5 cm acima do piso, nas laterais da caixa de isolamento acústico e 15 cm distantes da caixa de teste. Os PEA serão registrados e analisados por um programa de aquisição de sinais biológicos (Bionspector, Lynx, Brasil), que também controlará a apresentação e seqüência dos estímulos sonoros.

Os grupos serão divididos de forma aleatória de acordo com a droga em estudo (haloperidol, apomorfina, SCH 23390, quimpirole). Quinze minutos após a injeção de NMDA um agonista ou antagonista de receptores dopaminérgicos será administrado localmente no CI. A sessão de linha de base consistirá da apresentação de um conjunto de 100 cliques. A sessão teste se inicia 10 min após a injeção intra-IC de NMDA. Essa sessão

consistirá da apresentação de três conjuntos de 100 cliques a intervalos de 10 min. Para cada grupo (salina ou droga em estudo) os PEA serão apresentados como resultado da promediação na sessão de linha de base e nos tempos de 10, 20 e 30 min da sessão teste. A resposta de congelamento pós-estimulação com NMDA será medida durante todo o período da sessão.

Para fins de análise comparativa, os registros de PEA também serão realizados em animais tornados catalepticos após tratamento com haloperidol (2 mg/kg, IP).

### **Análise dos Dados**

Todos os resultados obtidos neste estudo serão apresentados como médias  $\pm$  EPM. Os limiares de congelamento e fuga, tempo de imobilidade pós-estimulação obtidos nos estudos comportamentais assim como ao número de células Fos-imunorreativas e concentrações extracelulares de DA e seu metabólito DOPAC no estudo neuroquímico serão analisados pela análise de variância (ANOVA). Os dados de VUSs e PEA serão submetidos a uma ANOVA de duas vias com os tratamentos sendo um dos fatores e as medidas repetidas nas diversas frequências registradas (18, 20, 22, 24 e 26 kHz no experimento VUS) e períodos de registro (linha de base, 10, 20, 30 min após as injeções intra-IC no experimento PEA). Quando estas análises produzirem resultados significativos elas serão seguidas pelo teste *post hoc* de Tukey. Um valor de  $p < 0,05$  será considerado significativo.

### **Histologia**

O protocolo da histologia dos estudos comportamentais segue a rotina convencional do laboratório. A histologia do estudo imunoistoquímico seguirá protocolo descrito na seção específica. No estudo neuroquímico, após todas as amostras terem sido coletadas, os animais serão sacrificados com uretana a 25% (5 ml/ kg, *i.p.*) e perfundidos intracardiamente com solução salina (0,9%) seguida de formalina (10%). Em seguida, o cérebro será retirado e estocado em solução de formalina (10%). Após um prazo mínimo de 3 dias, os cérebros serão fatiados em micrótomo de congelamento nas áreas correspondentes ao núcleo basolateral da amígdala ou ao núcleo accumbens parte shell ou a parte core. Os cortes serão corados em cresil-violeta e analisados quanto a localização das sondas de diálise com o auxílio de microscópio óptico. A localização das

sondas de microdiálise será determinada por comparação com as pranchas e diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (2005).

### **Referências**

- Arias P, Cudeiro J. Effects of rhythmic sensory stimulation (auditory, visual) on gait in Parkinson's disease patients. *Exp Brain Res* 186: 589–601, 2008.
- Baker K, Rochester L, Nieuwboer A. The immediate effect of attentional, auditory, and a combined cue strategy on gait during single and dual tasks in Parkinson's disease. *Arch Phys Med Rehabil* 88: 1593–1600, 2007.
- Bassi GS, Nobre MJ, Carvalho MC, Brandão ML. Substance P injected into the dorsal periaqueductal gray causes anxiogenic effects similar to the long-term isolation as assessed by ultrasound vocalizations measurements. *Behav Brain Res* 182:301-7, 2007..
- Borelli KG, Ferreira-Netto C, Brandão ML. Distribution of Fos immunoreactivity in the rat brain after freezing or escape elicited by inhibition of glutamic acid decarboxylase or antagonism of GABA-A receptors in the inferior colliculus. *Behav Brain Res* 170:84-93, 2006.
- Brandão ML, Anseloni VZ, Pandóssio JE, De Araujo JE, Castilho VM. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 863–875, 1999.
- Brandão ML, Borelli KG, Nobre MJ, Santos JM, Albrechet-Souza L, Oliveira AR, Martinez RC. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1299–1311, 2005
- Brandão ML, Coimbra NC, Osaki MY. Changes in the auditory-evoked potentials induced by fear-evoking stimulations, *Physiol Behav* 72 :365–372, 2001
- Brandão ML, Melo LL, Cardoso SH. Mechanisms of defense in the inferior colliculus, *Behav. Brain Res* 58: 49–55, 1993.
- Brandão ML, Tomaz C, Leão-Borges PC, Coimbra NC, Bagri A. Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus, *Physiol. Behav.* 44 : 361–365, 1988.
- Brandão ML, Zanoveli JM, Ruiz-Martinez RC, Oliveira LC, Landeira-Fernandez J. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. *Behav Brain Res* 188:1-13, 2008.

- Cardoso SH, Coimbra NC, Brandão ML. Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. *Behav Brain Res* 63: 17–24, 1994.
- Casseday JH, Covey E. A neuroethological theory of the operation of the inferior colliculus. *Brain Behav Evol* 47: 311–336, 1996.
- Coimbra NC, Brandão ML. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behavior elicited by midbrain tectum stimulation. *Behav Brain Res* 59:131-139, 1993.
- Cuadra G, Zurita A, Macedo CE, Molina VA, Brandão ML. Electrical stimulation of the midbrain tectum enhances dopamine release in the frontal cortex. *Brain Res Bull* 52:413–418, 2000.
- Ferreira-Netto C, Borelli KG, Brandao ML. Distinct Fos expression in the brain following freezing behavior elicited by stimulation with NMDA of the ventral or dorsal inferior colliculus. *Exp Neurol* 204:693-704, 2007
- Fuster JM. *The prefrontal cortex: anatomy, physiology, and neuropsychology of the frontal lobe*, Raven Press, New York, 1989.
- Hornykiewicz O. Dopamine in the basal ganglia: its role and therapeutic implications (including the clinical use of L-DOPA). *Br. Med. Bull.* 29: 172–178, 1973.
- Koch M. The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol* 59: 107–128, 1999.
- Macedo CE, Cuadra G, Molina V, Brandao ML. Aversive stimulation of the inferior colliculus changes dopamine and serotonin extracellular levels in the frontal cortex: modulation by the basolateral nucleus of amygdala. *Synapse* 55:58-66, 2005.
- Macedo CE, Martinez RC, Brandão ML. Conditioned and unconditioned fear organized in the inferior colliculus are differentially sensitive to injections of muscimol into the basolateral nucleus of the amygdala. *Behav Neurosci* 120:625-631, 2006.
- Maisonnette SS, Kawasaki MC, Coimbra NC, Brandão ML. Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus, *Brain Res Bull* 40: 93–98, 1996.
- Matsui H, Nishinaka K, Oda M, Hara N, Komatsu K, Kubori T, Udaka F. Hypoperfusion of the auditory and prefrontal cortices in Parkinsonian patients with verbal hallucinations. *Mov Disord* 21: 2165–2169, 2006.

- Melo LL, Santos P, Medeiros P, Mello RO, Ferrari EAM, Brandão ML, Coimbra NC. Glutamatergic neurotransmission mediated by NMDA receptors in the inferior colliculus can modulate haloperidol-induced catalepsy. *Brain Res* 1349: 41-47, 2010.
- Morelli M, Di Chiara G. Catalepsy induced by SCH 23390 in rats. *Eur J Pharmacol* 117:179-185, 1985.
- Moreira FA, Molchanov ML, Guimarães FS. Flight reactions to nitric oxide in the inferior colliculus of rats depend on NMDA receptor activation. *Pharmacol Biochem Behav* 76: 35-41, 2003.
- Moriizumi T, Hattori T. Pallidotectal projection to the inferior colliculus of the rat. *Exp Brain Res* 87: 223-226, 1991.
- Nobre MJ, Lopes MG, Brandão ML. Defense reaction mediated by NMDA mechanisms in the inferior colliculus is modulated by GABAergic nigro-collicular pathways. *Brain Res* 999: 124-131, 2004.
- Nobre MJ, Cabral A, Brandão ML. GABAergic regulation of auditory sensory gating in low- and high-anxiety rats submitted to a fear conditioning procedure. *Neuroscience* 171:1152-1163, 2010.
- Olazábal UE, Moore JK. Nigrotectal projection to the inferior colliculus: horseradish peroxidase transport and tyrosine hydroxylase immunohistochemical studies in rats, cats, and bats. *J Comp Neurol* 282: 98-118, 1989.
- Ossowska K, Karcz M, Wardas J, Wolfarth S. Striatal and nucleus accumbens D1/D2 dopamine receptors in neuroleptic catalepsy. *Eur J Pharmacol* 182: 327-334, 1990.
- Paxinos G, Watson P. *The rat brain in stereotaxic coordinates* (3rd edition), Academic Press, San Diego (1997).
- Reimer A, Oliveira AR, Brandão ML. Selective involvement of GABAergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray and inferior colliculus on the memory of the contextual fear as assessed by the fear potentiated startle test. *Brain Res Bull* 76: 545-550, 2008.
- Ruiz-Martinez RC, Oliveira AR, Brandão ML. Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. *Neurobiol Learn Mem* 85:58-65, 2006.
- Sanberg PR. Haloperidol-induced catalepsy is mediated by postsynaptic dopamine receptors. *Nature* 284: 472-473, 1980.

- Shammah-Lagnado SJ, Alheid GF, Heimer L. Efferent connections of the caudal part of the globus pallidus in the rat. *J Comp Neurol* 376: 489–507, 1996.
- Troncoso AC, Osaki MY, Mason S, Borelli KG, Brandão ML. Apomorphine enhances conditioned responses induced by aversive stimulation of the inferior colliculus. *Neuropsychopharmacology* 28: 284–291, 2003.
- Vianna DML, landeira-Fernandez J, Brandão ML. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 711-719, 2001.
- Willems AM, Nieuwboer A, Chavret F, Desloovere K, Dom R, Rochester L, Kwakkel G, van Wegen E, Jones D. Turning in Parkinson's disease patients and controls: the effect of auditory cues. *Mov. Disord.* 22: 1871–1878, 2007.
- Yasui Y, Nakano K, Kayahara T, Mizuno N. Non-dopaminergic projections from the substantia nigra pars lateralis to the inferior colliculus in the rat. *Brain Res* 559: 139–144, 1991.

### **CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PROJETO**

Desenvolvimento/ Ano	2011b	2012a	2012b	2013a
Coleta de dados	X	X	X	
Comunicações em congressos		X	X	
Redação dos trabalhos		X	X	X
Envio dos trabalhos p/ revistas especializadas		X	X	X

A: 1º semestre. B: 2º semestre