

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**

Márcio Ramos Coutinho

*Efeito da microinjeção de aminoácidos excitatórios no córtex  
cingulado anterior e avaliação das suas conexões com a  
substância cinzenta periaquedutal sobre a modulação da  
imobilidade tônica e da nocicepção em cobaias*

**RIBEIRÃO PRETO**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**

*Efeito da microinjeção de aminoácidos excitatórios no córtex cingulado anterior e avaliação das suas conexões com a substância cinzenta periaquedutal sobre a modulação da imobilidade tônica e da nocicepção em cobaias.*

**Márcio Ramos Coutinho**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

**Orientadora: Profa. Dra. Leda Menescal de Oliveira**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2010**

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

Coutinho, Márcio Ramos.

Efeito da microinjeção de aminoácidos excitatórios no córtex cingulado anterior e avaliação das suas conexões com a substância cinzenta periaquedutal sobre a modulação da imobilidade tônica e da nocicepção em cobaias. Ribeirão Preto, 2010.

99 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP – área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Leda Menescal de Oliveira.

1. Nocicepção, 2. Imobilidade Tônica, 3. Cobaias, 4. Córtex cingulado anterior, 5. Substância Cinzenta Periaquedutal, 6. Aminoácidos excitatórios

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Aluno:** Márcio Ramos Coutinho

**Título:** Efeito da microinjeção de aminoácidos excitatórios no córtex cingulado anterior e avaliação das suas conexões com a substância cinzenta periaquedutal sobre a modulação da imobilidade tônica e da nocicepção em cobaias.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.  
Área de concentração: Fisiologia

Data da defesa: 26 de agosto de 2010

### BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

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

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

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

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

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

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

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

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

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

**Dedico,**

À minha esposa, aos meus pais e minha irmã,  
pelo amor e apoio incondicional em todos os  
momentos da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A professora Dra. Leda Menescal de Oliveira por não medir esforços junto à minha formação. Por sua confiança, atenção, preocupação, carinho e amizade. Gostaria muito de poder dimensionar com palavras a minha gratidão, admiração e o quanto é importante para mim.

Às amigas especiais Mariulza Rocha Brentegani (“a Mariulssinha”) e Aparecida de S. Fin Pereira (“Cidinha”) pela convivência diária, amizade, apoio, carisma e ensinamentos.

Em especial aos amigos do Laboratório de Neurobiologia da Nociceção e do Comportamento Defensivo, Mateus Dalbem e João Zugaib pela amizade, que sei que, felizmente, não se encerrará por aqui.

Aos docentes do departamento da Fisiologia da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto pela dedicação, convivência diária, ensinamentos e contribuições na minha formação acadêmica.

Aos professores membros da banca: Norberto Coimbra, Marcus Lira Brandão, Anette Hoffmann, Luis Felipe; pelas contribuições científicas nesse trabalho, pela disponibilidade e, principalmente, pela participação significativa na minha formação acadêmica durante o período da pós-graduação.

Aos amigos da secretaria do Departamento de Fisiologia da FMRP: Elisa Aleixo, Fernando Rastello, Claudia Vanzela, Carlos Belini e Andréa de Castro; pela disponibilidade, suporte e eficiência em vários e decisivos momentos ao longo do curso.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação (SPG) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pela eficiência e disponibilidade em ajudar.

A todos os amigos pós-graduandos do Programa de Fisiologia da FMRP, em especial os grandes parceiros André Dagostin, João Henrique, João Sabino, Augusto Barbosa, Fabiana

Alves, Ricardo Kusuda, Daniel Penteado, Ernane Uchoa, Guilherme Traslaviña e Davi Moraes, pelo companheirismo e apoio dado durante todo o período de doutorado.

Aos grandes amigos da Psicobiologia e da Imunologia, em especial Rafael Almada, Lucas Albrechet, “Renatão”, Tiago e “Zé”.

Aos amigos funcionários do departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP: Rogério, Flávio, Mauro, Beto, Jaci, Lení, Maria Luíza, Leonardo, Eduardo, Humberto, Sônia e Eulália; pelo companheirismo, incentivo, conselhos, convivência diária harmônica e apoio durante esses anos.

Às grandes amigas de desde o início do mestrado: “Leandro Goiano”, “Patrícia Goiana”, “Waltão”, Daniel Zoccal, Bruno Del Bianco, Renato Soriano, Rubens Fernando de Mello, Felipe, Lys, “Giu” e Waldecy Lucas.

À turma do futebol: “Zé Luiz”, Samuel, Osvaldo, “chicão”, “seu Luiz”, Alex Adriano, Tadeu, “Junhinho”, Alceu, todo o time da Medicina, da STI e do futebol de terça; pela amizade e por ajudar a manter a minha saúde física e mental durante esses anos.

A todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para o bom andamento deste trabalho.

A CAPES pelo essencial suporte financeiro.



## RESUMO

A imobilidade tônica (IT) é uma resposta defensiva inata, caracterizada pelo estado profundo e temporário de acinesia, evocada por meio de manobras de restrição física e inversão da postura do animal. Nossos estudos prévios demonstraram que a estimulação glutamatérgica da porção dorsomedial/dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal (SCPd) diminui a duração da resposta de IT em cobaias (*Cavia porcellus*). Algumas evidências sugerem que o córtex cingulado anterior (CCA) constitui em uma importante fonte glutamatérgica para a SCPd. Além disso, sabe-se que o CCA exerce destacada função no processamento de respostas envolvidas em contextos motivacionais defensivos e de nociceção em humanos e em ratos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da microinjeção de DLH (agonista glutamatérgico) no CCA de cobaias sobre a duração dos episódios de IT e sobre a nociceção, analisada pelo teste de vocalização induzida pela aplicação de um estímulo nocivo agudo periférico e pelo teste nociceptivo de retirada da pata. Esses testes nociceptivos permitiram analisar separadamente o componente afetivo-motivacional e sensorio-discriminativo da dor, respectivamente. O presente trabalho teve o objetivo também de avaliar o efeito do bloqueio funcional da SCPd, previamente a microinjeção de DLH no CCA, sobre a duração dos episódios de IT e sobre a resposta afetivo-motivacional de dor. Por fim, o presente estudo se propôs investigar, por meio da microinjeção de neurotraçador (Texas red conjugado a dextrana de amina biotinizada), possíveis conexões que partem do CCA e se dirigem diretamente para a SCPd em cobaias. Os presentes resultados demonstraram que as microinjeções de DLH (30 nmol / 0,2 µl) diminuíram a duração da resposta de IT. Este efeito foi bloqueado pela prévia administração de 3,6 nmol de MK-801 (antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA) no CCA ou na SCPd. Os resultados do presente estudo também mostraram que a microinjeção de DLH (30 nmol / 0,2 µl) no CCA produziu aumento da resposta de vocalização induzida pela aplicação de um estímulo nociceptivo, mas não sobre o reflexo nociceptivo de retirada da pata. O referido efeito nociceptivo não foi observado quando houve o tratamento prévio com MK-801 (3,6 nmol / 0,2 µl) no CCA ou com lidocaína a 2 % (0,2 µl) na SCPd. A microinjeção de 0,2 µl do rastreador neuronal Texas red (Peso molecular: 10.000) a 10 % mostrou evidentes conexões entre o CCA e a SCPd. Dessa forma, os presentes resultados permitiram sugerir que os aminoácidos excitatórios no CCA de cobaias são capazes de diminuir a duração da resposta de IT e de facilitar a expressão do componente afetivo-motivacional da dor. O mecanismo relacionado com essas atividades possivelmente envolve a

ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA presentes no CCA e o recrutamento, por conexões diretas, de neurônios presentes na SCPd. Assim, os resultados do presente estudo reforçam a idéia de que o CCA e a SCPd parecem fazer parte de uma mesma rede neural, importante para a mediação de respostas envolvidas em contextos motivacionais, que visam o afastamento ou a esquiva do animal em relação aos estímulos aversivos.

## ABSTRACT

Tonic immobility (TI) is an innate defensive behavior evoked by physical restriction and postural inversion, and is characterized by a profound and temporary state of akinesia. Our previous studies demonstrated that glutamatergic stimulation of the dorsomedial/dorsolateral portion of periaqueductal gray matter (dPAG) decreases the duration of TI in guinea pigs (*Cavia porcellus*). Furthermore, evidences suggest that the anterior cingulate cortex (ACC) constitutes an important source of glutamate for the dPAG. The ACC is known to play a pronounced role in the processing of the motivational pain and defensive responses in human and rats. So, the current study aimed to investigate the effect of unilateral microinjection of DLH (DL-homocysteic acid; an excitatory amino acid agonist) into guinea pig's ACC on the duration of TI and on the different aspects of nociceptive responses. To evaluate the nociceptive responses, it was used the model of vocalization (Voc) induced by a noxious stimulus and paw withdrawal (PW) nociceptive reflex. These nociceptive responses permitted to assess the affective-motivational and the sensory-discriminative components of pain, respectively. In the current study, it was also investigated the existence of anatomical ACC–dPAG connection in guinea pigs and the importance of the dPAG on the ACC TI and unpleasantness pain regulation. Our results demonstrated that DLH microinjections (30 nmol / 0.2  $\mu$ l) into the ACC decreased the duration of TI. This effect was blocked by previous microinjection of 3.6 nmol of MK-801 (NMDA receptor antagonist) into the ACC or into the dPAG. Our results also showed that the vocalization response, but not PW nociceptive reflex, was significantly increased after the microinjection of DLH (30 nmol / 0.2  $\mu$ l) into ACC. This effect was blocked by previous microinjection of MK-801 (3.6 nmol / 0.2  $\mu$ l) in the same region or by previous 2 % lidocaine microinjection in the dPAG. Furthermore, the anterograde fluorescent neurotracer (Texas red-conjugated dextran amine) microinjected (0.2  $\mu$ l) into the ACC demonstrated direct eferences to the dPAG in guinea pigs. These results provide new insights that the excitatory amino acids in the ACC of guinea pigs can decrease the duration of TI and facilitate the expression of affective-motivational component of pain. The mechanism seems to be dependent of the activation of NMDA receptors in ACC and of the direct recruitment of neurons in dPAG. Thus, the current results reinforce the idea that the ACC and dPAG seem to constitute the same neural network, which is strongly involved in mediation of motivational responses that are associated with the removal or avoidance of animal from aversive stimuli.

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1 - Comportamentos defensivos .....	11
1.1.1 - Imobilidade tônica.....	12
1.2 - Comportamentos defensivos e analgesia endógena .....	13
1.3 - Substância cinzenta periaquedutal .....	15
1.4 - Córtex cingulado anterior.....	17
<b>2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>22</b>
<b>3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1 - Animais .....	23
3.2 - Procedimentos cirúrgicos .....	23
3.3 - Microinjeção das drogas.....	24
3.4 - Drogas utilizadas .....	24
3.5 - Teste de imobilidade tônica (IT) .....	25
3.6 - Teste algesimétrico de retirada da pata (TRP) .....	26
3.7 - Teste algesimétrico de vocalização .....	27
3.8 - Neurotraçamento .....	28
3.9 - Grupos experimentais.....	29
3.9.1 - Experimento I.....	29
3.9.2 - Experimento II .....	30
3.9.3 - Experimento neuroanatômico .....	31
3.10 - Histologia .....	32
3.11 - Análise dos resultados.....	32
<b>4 - RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
4.1 - EXPERIMENTO I .....	34
4.2 - EXPERIMENTO II.....	48
4.3 - EXPERIMENTO NEUROANATÔMICO .....	61
<b>5 - DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>6 - CONCLUSÕES .....</b>	<b>78</b>
<b>7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>
<b>8 - APÊNDICE .....</b>	<b>90</b>
8.1 - Tabelas .....	90

## ARTIGOS PUBLICADOS

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Comportamentos defensivos

No ambiente natural, os animais são frequentemente expostos a condições de perigo, de ameaça de vida e de situações que os fazem exibir padrões comportamentais, originados a partir de antepassados mais basais e perpetuados hereditariamente, fundamentais para a sobrevivência individual e para a manutenção das espécies (Charles Darwin, 1872, reeditado em 2000). Tais respostas são elaboradas por estruturas neurais envolvidas com um amplo repertório comportamental defensivo (Graeff, 1994), que é variado, específico e associado à gravidade do risco. A condição de perigo é avaliada pela distância, ou seja, à medida que a ameaça (geralmente o predador) se aproxima, aumenta-se o risco e inicia-se uma seqüência de respostas apropriadas, por parte da presa, que visam preservar sua integridade orgânica. A correlação entre o grau do perigo, determinado pela distância entre presa/predador, é denominada de distância defensiva (Ratner, 1967). Outros fatores, além da distância presa/predador, como por exemplo, idade da presa, velocidade de escape da presa, tamanho do predador (Ratner, 1967), podem representar uma situação de maior ou menor risco e, conseqüentemente, influenciar na seleção da resposta defensiva mais adequada ao momento.

De um modo geral, quando o perigo não é visto, mas é percebido pela presa por meio de sua passagem por um lugar desconhecido, ou com cheiro de animais mortos, a cautela acompanhada pelo medo determina um comportamento vigilante, cuidadoso, somado de uma hiperatividade motora que facilita a realização de uma fuga em caso de necessidade (Blanchard et al., 1974). Quando o perigo ainda está distante, porém já foi avistado pela presa, mas sem a percepção do predador, a conduta defensiva é denominada de congelamento. A finalidade desse comportamento é o de não despertar a atenção do predador e, assim, evitar a sua aproximação. Quando a distância se encurta e o predador percebe a presa, essa realiza a

fuga, na tentativa de afastar-se do oponente. Se isso não ocorrer e a distância presa/predador chegar a zero, inicia-se, então, a próxima reação defensiva: a luta. Em caso de distância zero prolongada, ou seja, no contato físico presa/predador associado com a impossibilidade de qualquer outra ação que leve à sobrevivência da presa, o comportamento defensivo desencadeado é a imobilidade tônica (Ratner, 1967).

### **1.1.1 - Imobilidade tônica**

A imobilidade tônica (IT) é uma resposta defensiva inata, caracterizada por um estado profundo e temporário de acinesia e de ausência relativa de reações aos estímulos ambientais. É desencadeada em muitas espécies de vertebrados e invertebrados, por diferentes tipos de estimulações sensoriais, principalmente táteis e proprioceptivas (Klemm, 1971). É geralmente emitida em ocasiões extremas, onde a presa capturada expressa a sua limitação diante do evento sem, no entanto, perder o controle da situação. A falta de movimentos geralmente induz o predador a interromper o seu ataque e cria um ambiente favorável para o escape (Rodgers e Randall, 1987).

A importância biológica da IT foi demonstrada por Sargent e Eberhardt (1975), que observaram ataques predatórios de raposas (*Vulpes fulva*) a patos e constataram que as presas que sobreviveram às investidas iniciais, em torno de 58%, emitiram o comportamento de IT. Segundo os autores, a IT representou uma oportunidade para as presas escaparem de predadores que não costumam matar imediatamente após a captura.

O trabalho produzido por Leite-Panissi et al. (2001) mostrou que, durante a IT, o sistema analgésico endógeno é ativado e contribui para a manutenção do estado de acinesia, por meio da inibição de possíveis respostas relacionadas à nocicepção. Esses dados estão de acordo com as observações de Misslin (2003), que destaca a idéia de que a ativação do

sistema defensivo não produz apenas comportamentos de defesa tais como, luta, fuga, congelamento ou IT, mas também elicia analgesia endógena.

## **1.2 - Comportamentos defensivos e analgesia endógena**

Sabe-se que durante o encontro de um animal com o seu predador ou com um co-específico agressivo, normalmente existe maior probabilidade de haver injúrias teciduais que podem desencadear reações associadas à nocicepção. A diminuição da sensibilidade dolorosa, portanto, se torna importante para impedir a expressão de comportamentos capazes de comprometer a execução das repostas de proteção (Harris, 1996).

Para Fanselow e Sigmundi (1986), os mecanismos de supressão da dor são parte do sistema defensivo que são controlados por sinais de perigo aprendidos ou inatos. Assim, o rato, na presença de seu predador natural, o gato, desencadeia tanto reações de congelamento como reações envolvidas com o controle da dor (Lester e Fanselow, 1985). A apreensão do animal pela pele da região dorsal durante 10 segundos constitui em estimulação tátil aversiva que também é capaz de eliciar respostas de imobilidade e de analgesia (Fanselow e Sigmundi, 1986). A integração entre os sistemas de controle da dor e o defensivo parece ocorrer também em situações de ameaça entre indivíduos da mesma espécie. A percepção de odores oriundos de coespecíficos estressados, a presença de um indivíduo intruso no ninho, ou o contato com uma fêmea lactante, também parece desencadear antinocicepção associada com respostas de defesa (Rodgers e Hendrie, 1983; Rodgers et al., 1983; Fanselow e Sigmundi, 1986).

Observações mais detalhadas sobre o sistema de analgesia defensiva vêm demonstrando haver mais de um tipo de mecanismo neuroquímico envolvido. Segundo Rodgers e Randall (1987), a supressão da dor depende do tipo de comportamento defensivo emitido, ou seja, o controle da dor associado com as formas ativas das repostas defensivas, aquelas que aumentam a atividade locomotora do indivíduo com o objetivo de afastá-lo do

estímulo ameaçador, são diferentes da analgesia associada com as formas passivas das respostas defensivas. Dessa maneira, estímulos agudos, aversivos que produzem reações de fuga e luta, provocam analgesia não mediada por opioides, enquanto que estimulações táteis prolongadas, que não permitem reações de fuga e que eliciam as respostas de IT, estão associadas com antinocicepção mediada por opioides. Os resultados obtidos por Leite-Panissi et al. (2001) corroboraram essa hipótese, pois demonstraram, por meio de testes algosimétricos, a participação do sistema analgésico endógeno opioide imediatamente após as respostas de IT em cobaias.

De acordo com os trabalhos de Basbaum e Fields (1984), existe um circuito neural para o controle da dor mediado pelos opioides, que envolve a porção ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal e o bulbo rostroventromedial, mais especificamente, o núcleo magno da rafe (Carrive, 1993; Bandler e Shipley, 1994). A estimulação desse núcleo por aferências oriundas da substância cinzenta periaquedutal ventrolateral faz com que as suas projeções neurais, que trafegam pelo funículo dorsolateral, inibam seletivamente populações de neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal. Há indícios de que a ativação desse sistema está associada com estimulações nocivas em tecidos superficiais que ocorrem em situações onde a presa não tem oportunidade de fuga, ou ainda de estimulações nocivas em tecidos profundos ou viscerais (Carrive 1993; Keay et al., 2001; Lumb, 2002; Keay e Bandler, 2002).

O sistema de analgesia não opioide, por outro lado, parece estar associado com os comportamentos defensivos vigorosos, fuga e luta, caracterizados pelo aumento da atividade locomotora e do estado de alerta, desencadeados em situações de ameaça, onde a presa ainda tem possibilidade de escape (Brandão et al., 1999). Embora o conhecimento funcional desse sistema necessite de mais esclarecimentos, evidências científicas mostram a participação contundente da porção dorsolateral/dorsomedial da substância cinzenta periaquedutal



(Brandão et al., 2003). Assim, dentro do contexto da atividade antinociceptiva endógena, a substância cinzenta periaquedutal (SCP) parece ser um elemento chave que participa de maneira relevante tanto da analgesia opioide, como da analgesia não opioide (Nichols et al., 1989; Coimbra et al., 2006).

### **1.3 - Substância cinzenta periaquedutal**

A SCP é uma proeminente estrutura do mesencéfalo que contorna o *aqueduto de Sylvius*. Rostralmente, possui continuidade com a substância cinzenta que contorna o terceiro ventrículo no tálamo e hipotálamo, enquanto que, no plano caudal, limita-se com a porção dorsal da ponte (Bandler e Depaulis, 1991). É um importante substrato envolvido também na mediação de respostas relacionadas ao medo, ansiedade, lordose, vocalização e regulação autonômica (Behbehani, 1995). Os circuitos neurais da SCP apresentam notável capacidade para modular e integrar as reações somáticas e autonômicas, presentes nos momentos de perigo (Carrive et al., 1989), mediando comportamentos de defesa, proteção e respostas relacionadas ao sistema de analgesia descendente (Carrive, 1993).

Estudos neuroanatômicos da SCP, envolvendo observações comportamentais e funcionais a partir de estimulações elétrica e química dos neurônios dessa estrutura, demonstraram a existência de uma organização citoarquitetônica ao longo do seu eixo rostrocaudal, que determinou a sua subdivisão em quatro porções: dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral. As porções dorsomedial, dorsolateral e lateral estão associadas com ativação somatomotora e autonômica produzida por estimulações nocivas superficiais, enquanto que a região ventrolateral está associada com inibição de respostas somatomotoras e autonômicas, geradas por estimulações nocivas em tecidos profundos (Carrive 1993; Keay et al., 2001; Lumb, 2002; Keay e Bandler, 2002). Essa disposição citoarquitetônica implica funcionalmente a SCP com a coordenação das diferentes estratégias defensivas utilizadas para

o enfrentamento do perigo. As colunas dorsomediais e dorsolaterais estão relacionadas na mediação de respostas relacionadas às estratégias ativas do comportamento defensivo, tais como fuga, luta e analgesia não opioide (Bandler e Shipley, 1994, Brandão et al., 2003). A coluna ventrolateral participa da elaboração das estratégias passivas de enfrentamento do perigo, mediando a analgesia opioide e as respostas de quiescência que diminuem o impacto emocional e fisiológico de uma situação de intenso estresse e dor.

A atividade da SCP na coordenação das respostas relacionadas aos comportamentos defensivos e à antinocicepção é modulada por conexões neurais oriundas de estruturas envolvidas na mediação desses comportamentos, tais como a amígdala, o núcleo pré-mamilar do hipotálamo, o bulbo rostroventromedial, a medula espinal e os núcleos trigeminais (Blomqvist e Craig, 1991; Yeziarski 1991; Canteras e Swanson, 1992; Behbehani, 1995; Canteras et al., 2001). Pouca atenção tem sido dada às investigações anatômicas de conexões entre as estruturas telencefálicas e a SCP, assim como, à influência funcional dessas projeções na mediação das respostas comportamentais defensivas e nociceptivas (Shipley et al., 1991).

Mesmo assim, é conhecido que projeções neurais, em ratos, entre o cíngulo e as estruturas do tronco encefálico, incluindo a SCP, possuem uma organização topográfica que sugere a possibilidade do córtex cingulado contribuir com a modulação das funções motoras, somáticas e comportamentais associadas aos contextos emocionais (Wyss e Sripanidkulchai, 1984). Estudos conduzidos por Shipley et al. (1991), baseados em técnicas de rastreamento neuronal anterógrado e retrógrado, mostraram que o córtex frontal medial de ratos envia robustas e proeminentes projeções bilaterais para todas as regiões da SCP ao longo de seu eixo rostrocaudal. A análise mais detalhada ainda mostrou que as projeções são mais evidentes unilateralmente e no plano anterior e intermediário do que no plano mais caudal. Mais recentemente, Floyd et al. (2000) também analisaram as conexões neurais entre as estruturas telencefálicas e a SCP de ratos. Contudo, nessa análise, as estruturas corticais foram

subdivididas e avaliadas isoladamente. Dessa forma, foi mostrado que o córtex cingulado anterior, por exemplo, envia densas eferências em direção à porção dorsolateral da SCP, com extensão para a região dorsomedial. Esses dados foram semelhantes aos encontrados por An et al. (1998) em estudos produzidos em encéfalos de macacos. As evidências de uma organização anatômica das conexões que partem do córtex cingulado anterior para a SCP são condizentes com a hipótese de que essas vias podem ser importantes para o controle das respostas somáticas, neuroendócrinas e autonômicas relacionadas aos comportamentos envolvidos em contextos emocionais, como, por exemplo, os comportamentos defensivos (Floyd et al., 2000).

#### **1.4 - Córtex cingulado anterior**

O córtex cingulado anterior (CCA) se constitui em uma área agranulada, localizada na convexidade dorsomedial do córtex pré-frontal orbitomedial. Corresponde à área 24 de Brodmann que está limitada rostralmente e dorsalmente com o córtex pré-límbico, posteriormente com o córtex cingulado posterior e ventralmente com a porção rostral do corpo caloso. O CCA pode ser dividido em dorsal e ventral, assim como, em rostral e posterior. Essa última se constitui em uma região de transição entre o CCA e o córtex cingulado posterior e, talvez por esse motivo, esteja mais envolvida com as funções cognitivas. O CCA dorsal tem participação em algumas atividades pré-motoras, enquanto que a porção anterior está mais envolvida na regulação das funções afetivas, mais precisamente com as repostas neurovegetativas, de vocalização e de nocicepção, presentes em comportamentos de alto contexto emocional (Vogt et al., 1987 e 1995; Vogt e Pandya, 1987; Devinsky et al., 1995; Floyd et al., 2000).

A participação do CCA na modulação da nocicepção foi comprovada em alguns trabalhos. A estimulação do CCA de ratos com a microinjeção de tACPD (0,25 µg / 0,5 µl),

um agonista glutamatérgico do tipo metabotrópico, é capaz de produzir diminuição do tempo de resposta evocada no teste algesimétrico de “tail-flick”, sugerindo uma atividade de facilitação da nocicepção por parte do CCA (Calejesan et al., 2000). A microinjeção unilateral dos agonistas glutamatérgicos NMDA (10 nM / 1 µl) e do ácido homocisteico (0,1 M / 1µl) no CCA de ratos também é capaz de aumentar as respostas nociceptivas do teste de placa quente (Zhang et al., 2005). Estudos conduzidos por Wei et al. (2001) e Zhuo (2002) sugeriram o envolvimento dos receptores NMDA, presentes no CCA, na facilitação das respostas de dores persistentes inflamatórias e de origem neuropática. Bozkurt et al. (2005) quantificaram nove tipos de receptores presentes ao longo de todo o córtex cingulado e mostraram a predominância dos receptores glutamatérgicos nessa estrutura.

Outros estudos não envolvendo diretamente a atividade glutamatérgica também evidenciaram a participação do CCA na modulação da nocicepção. Pastoriza et al. (1996) provocaram lesões bilaterais com radiofrequência no córtex medial frontal de ratos e avaliaram as respostas de dor nos testes de “tail-flick”, da formalina e da placa quente. Os seus resultados mostraram que a lesão dessa região não modificou de maneira significativa as respostas nos testes de “tail-flick” e da formalina, contudo, no teste da placa quente, houve um aumento de 82 % da latência da resposta em relação aos grupos controles. Segundo Lee et al. (1999), a lesão do córtex frontal medial de ratos produz efeitos antinociceptivos sobre as respostas de dor desencadeadas por estímulos nocivos, frio e calor, medidos, respectivamente, pelos testes algesimétrico da placa quente e da placa fria. Os resultados das pesquisas de Donahue et al. (2001) mostraram que lesões bilaterais no CCA de ratos reduzem significativamente as respostas de dor expressas durante a fase tônica do teste da formalina, contudo, não interferem na expressão de dor de natureza neuropática.

De um modo geral, os estudos descritos acima levam a crer que o CCA contribui para modulação da nocicepção por meio do aumento da expressão das respostas relacionadas aos

estímulos nocivos. Possivelmente, os principais mecanismos envolvidos ocorrem pela maior atuação do CCA no componente afetivo motivacional da dor do que no componente sensório discriminativo (Foltz et al., 1962; Devinsky et al., 1995; Rainville et al., 1997; Johansen et al., 2001). Essa hipótese é suportada por estudos realizados em seres humanos que sofreram estimulação elétrica no CCA e relataram medo e agitação, associados com respostas autonômicas, como aumento dos batimentos cardíacos, por exemplo (Devinsky et al., 1995). Portadores de dores crônicas, tratados com cingulotomia, relataram continuar apresentando a sensação de dor, porém sem a percepção do componente desagradável, de incômodo e de ansiedade (Foltz et al., 1962; Devinsky et al., 1995). Em um trabalho bastante interessante em humanos, Rainville et al. (1997) mostraram, por meio da tomografia por emissão de pósitrons, a ativação do CCA durante o aumento, induzido pela sugestão hipnótica, da percepção do componente afetivo da experiência dolorosa. Mais recentemente, em um estudo efetuado em ratos, Johansen et al. (2001) demonstraram que a integridade funcional do CCA é necessária para a resposta de esquiva induzida pela associação condicionada de um ambiente a uma estimulação nociva tônica, mas não é essencial para a expressão das respostas nociceptivas agudas evocadas pelo mesmo estímulo nocivo tônico. Outros trabalhos utilizando o mesmo modelo confirmaram esses resultados e ainda mostraram que os aminoácidos excitatórios parecem executar um papel fundamental nessa atividade (Lei et al., 2004; Johansen e Fields, 2004; Tang et al., 2005).

Não foi encontrado nenhum trabalho descrito na literatura que correlaciona a atividade do CCA com a modulação da nocicepção, avaliada pelo teste algesimétrico de vocalização, induzida pela aplicação de um estímulo nociceptivo agudo, em cobaias. A resposta de vocalização induzida por estimulação nociva é considerada uma expressão principalmente do componente afetivo-motivacional da dor (Borszcz, 1995a; Sánchez, 2003), já que vários tipos de vocalização são eliciados freqüentemente em situações emocionais aversivas, que

envolvem medo e ansiedade (Jürgen, 1978; Borszcz, 1995a; Sánchez, 2003). Além disso, os circuitos neurais que controlam a resposta de vocalização são formados pelos mesmos substratos supra-espinais envolvidos na mediação da dor (Carrive, 1993; Bandler e Shipley, 1994; Borszcz, 1995b; Jürgens, 2009). É provável que resultados produzidos utilizando o teste nociceptivo de vocalização tragam elementos interessantes, que talvez possam ser comparados com outros resultados oriundos de outras análises nociceptivas. Trabalhos conduzidos por Pastoriza et al. (1996) e Donahue et al. (2001), baseados na utilização de mais de um teste algesimétrico, mostraram que o CCA é capaz de interferir no comportamento doloroso de maneiras diferentes.

Além de modular as respostas de nociceção, o CCA parece influenciar significativamente outros comportamentos relacionados com o contexto afetivo-motivacional (Takenouchi et al., 1999; Hornak et al., 2003; Rudebeck et al., 2006). Assim, alguns trabalhos mostraram o envolvimento do CCA nas respostas de depressão, ansiedade, medo contextual, desordens relacionadas com estresse pós-traumático e vocalização associada a contextos aversivos de ameaça (Chua et al., 1999; Kyuhou e Gemba, 1999; Frankland et al., 2004; Pietersen et al., 2006; Bissiere et al., 2006; Bryant et al., 2008). Com relação a essa última resposta, evidências levam a crer que o CCA exerce influência por meio de projeções neurais que se dirigem diretamente para a SCP. Estudos com cobaias sugeriram que essas projeções têm natureza glutamatérgica (Kyuhou e Gemba, 1999; Dujardin e Jürgens, 2006). Recentemente, demonstramos que a microinjeção de agonista glutamatérgico ionotrópico e metabotrópico, o ácido D,L-homocisteico (DLH - 30 nmol / 0,2 µl), na porção dorsolateral/dorsomedial (dorsal) da SCP produz diminuição significativa na duração das resposta de IT (Ramos Coutinho et al., 2008). Esses resultados nos permitiram questionar sobre a origem das projeções glutamatérgicas que poderiam exercer a função de estimular a SCP dorsal (SCPd) e diminuir a duração do comportamento de IT. Segundo Beitz e Williams

(1991), o córtex cingulado se constitui em uma das principais fontes glutamatérgicas para a SCP em ratos, sendo capaz, portanto, de modificar as várias respostas comportamentais mediadas por essa estrutura.

Os trabalhos encontrados na literatura e descritos até o momento sugerem que o CCA apresenta um envolvimento significativo e complexo na modulação dos comportamentos associados aos contextos emocionais e aversivos. Dessa forma, com o intuito de contribuir para uma melhor compreensão da relevância funcional do CCA na mediação de respostas dessa natureza, o presente trabalho se propôs a avaliar a participação do CCA de cobaias na modulação das respostas defensivas de IT e de nociceção. Além disso, baseado nas evidências que sugerem que o CCA e a SCPd estão envolvidos conjuntamente na regulação de algumas respostas afetivo-motivacionais (Kyuhou e Gemba, 1999; Keay e Bandler, 2001), nos propusemos também avaliar a existência de possíveis conexões entre o CCA e a SCPd em cobaias, assim como a importância da SCPd sobre as respostas de IT e de nociceção, após a estimulação do CCA.

## 2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da microinjeção de agonista e antagonista glutamatérgico, mais especificamente DLH e MK-801, respectivamente, no CCA de cobaias sobre a duração dos episódios de imobilidade tônica;

- Investigar o efeito da microinjeção de agonista e antagonista glutamatérgico, mais especificamente DLH e MK-801, respectivamente, no CCA de cobaias sobre a nocicepção avaliada pelo teste de vocalização induzida pela aplicação de um estímulo nocivo periférico e pelo teste de retirada da pata. Esses testes nociceptivos foram utilizados com o intuito de se analisar separadamente o componente afetivo-motivacional e sensório-discriminativo da dor, respectivamente;

- Avaliar o efeito do bloqueio funcional da SCPd, previamente à estimulação glutamatérgica do CCA, sobre a duração dos episódios de IT e sobre a resposta afetivo-motivacional de dor;

- Estudar, por meio da microinjeção de neurotraçadores, a existência de possíveis eferências que partem do CCA e se projetam para a SCPd em cobaias.



### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Animais

No presente estudo utilizaram-se cobaias machos (*Cavia porcellus*), pesando entre 450-500 g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em caixas acrílicas, forradas com maravalha, com temperatura controlada ( $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), com ciclos de 12/12h de claro/escuro e com acesso livre a água e comida. As condições de manutenção dos animais e os procedimentos experimentais obedeceram aos padrões exigidos pelo guia para cuidados e uso de animais de laboratório, elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, mediante o protocolo de número 069/2007.

#### 3.2 - Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com uma associação de 0,2 ml de cloridrato de cetamina e 0,15 ml de xilazina. Em seguida, foram realizadas a tricotomia e assepsia da pele da cabeça, imediatamente após a fixação da mesma em um aparelho estereotáxico (Davis-Kopff) adequado para animais de pequeno porte. Posteriormente à exposição da calota craniana, foi implantada a cânula-guia, por onde foram efetuadas as administrações das drogas em estudo. A localização do implante teve como referência as coordenadas do atlas de Rössner (1965) para cobaias. Os parâmetros estereotáxicos utilizados para atingir o CCA foram 1,7 mm anteriormente ao bregma, 0,4 mm lateralmente à linha média e 4,7 mm acima da linha intraural. Para atingir a SCPd, as coordenadas foram 9,4 a 9,8 mm posteriormente ao bregma, 0,8 mm lateralmente à linha média e de 3,0 mm acima da linha intraural. O comprimento das cânulas-guias para a SCPd e para o CCA foram respectivamente de 14 mm

e de 10 mm. Os implantes foram fixados com auxílio de uma prótese de acrílico e de um parafuso rosqueado na superfície óssea. O período de recuperação foi de 6 a 7 dias, com livre acesso a comida e água.

### **3.3 - Microinjeção das drogas**

A administração das drogas foi realizada com uma seringa de Hamilton (5,0 ul) adaptada por meio de um segmento de polietileno de aproximadamente 45 cm (PE-10), conectado a uma agulha dental (Mizzi, USA) de 0,3 mm de diâmetro externo e 11 mm de comprimento para atingir o CCA e de 15 mm para atingir a SCPd. A agulha da injeção e parte do tubo de polietileno, proximal à conexão com a agulha, foram preenchidas com as drogas utilizadas, enquanto que o segmento restante do polietileno, conectado com a microseringa, foi preenchido com água destilada. Vale salientar que uma pequena bolha de ar separou os dois líquidos contidos no tubo de polietileno. A extremidade da agulha Mizzi foi de 1 mm além da extremidade inferior da cânula-guia para atingir o tecido encefálico. A microinjeção ocorreu em um período de 60 segundos, e a agulha foi deixada no local por mais 40 segundos para evitar refluxo.

### **3.4 - Drogas utilizadas**

- DLH (Ácido D,L-Homocisteico a 97 %; agonista glutamatérgico;Aldrich).
- MK- 801 [(+) – Metil- 10, 11- di-hidro- 5H - dibenzo [a,d] cycloheptano- 5, 10- imina; antagonista de receptores NMDA; Sigma]
- Lidocaína (Sigma).
- As concentrações utilizadas para as microinjeções do DLH foram de 15 e 30 nmol, enquanto que para a microinjeção do MK-801 foi de 3,6 nmol (Ramos Coutinho et al., 2008). A Lidocaína foi administrada a uma concentração de 2 % (Leite-Panissi et al., 2003).

- Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina tamponada (NaCl a 0,9%), que foi usada também para controle do veículo das drogas microinjetadas.

- Para a avaliação neuroanatômica, foi utilizado o neurotraçador preferencialmente anterógrado, a dextrana de amina biotinizada de peso molecular 10.000 (BDA: 10.000 P.M.; Molecular Probes, EUA), conjugado a fluorescência Texas red. A diluição ocorreu a uma concentração de 10 %, em solução salina (Castellan-Baldan et al., 2006).

- Todas as microinjeções foram efetuadas em um volume de 0,2 µl.

### **3.5 - Teste de imobilidade tônica (IT)**

A avaliação das respostas de IT foi realizada em uma sala semi-escura e com ruído de fundo (condicionador de ar ligado na posição de ventilação). Os animais utilizados nessa etapa experimental permaneceram por um tempo de 20 minutos antes do experimento, para habituação do ambiente e redução do estresse.

Após esse período, cada animal foi submetido a 5 manobras sucessivas de indução de IT, para registro da duração dos episódios antes da cirurgia (sessão controle). As manobras foram efetuadas manualmente, apreendendo os animais ao redor do tórax e invertendo-os rapidamente, de modo a deixá-los em decúbito dorsal, até o instante em que houve interrupção da movimentação (Ratner, 1967). Nesse momento, as mãos do experimentador, por sobre o animal, foram removidas e o cronômetro acionado imediatamente para registro da duração da resposta. O cronômetro foi interrompido quando o animal retornou para a sua postura habitual, o que se constituiu em indicativo do final do episódio da IT. Após o registro da duração dos cinco episódios de cada animal, foi feita a média das durações de IT em segundos e considerada como a média da sessão controle.

No dia seguinte, os animais foram operados, conforme descrito anteriormente, e, após 5-7 dias de recuperação, submetidos a outras sessões de IT. No primeiro dia após a

recuperação, foi realizada a sessão “sham”, a qual se diferenciou da sessão controle apenas pela introdução da agulha pela cânula-guia, sem microinjeção de drogas. Vinte e quatro horas após, os animais foram submetidos à sessão experimental, determinada pela microinjeção das drogas em estudo, previamente às 5 manobras de indução de IT .

### **3.6 - Teste algométrico de retirada da pata (TRP)**

O teste algométrico de retirada da pata (TRP) foi utilizado para avaliação das respostas nociceptivas relacionadas com a expressão do componente sensório-discriminativo da dor. Inicialmente, a superfície plantar da pata posterior das cobaias foi apoiada sobre uma resistência, em temperatura ambiente ( $24 \pm 1$  °C). Em seguida, foi acionado o dispositivo elétrico que aqueceu a resistência a uma velocidade de aproximadamente 3,6 °C/s. Esse aquecimento produziu uma estimulação nociva térmica capaz de eliciar o reflexo nociceptivo de retirada da pata. A temperatura final na qual as cobaias emitiram o reflexo nociceptivo de retirada da pata, foi registrada e utilizada como parâmetro para as avaliações. Nas situações em que os animais não removeram a pata da fonte de calor até a temperatura de 70 °C (~12.8 s), houve interrupção do procedimento para prevenção de possíveis danos teciduais.

Para execução do protocolo experimental, as cobaias foram transferidas para a sala de experimentação, onde permaneceram por cerca de 20 minutos para habituação e redução do estresse. Em seguida, foram submetidas ao TRP por três vezes consecutivas, com intervalos de 1 a 3 minutos entre cada teste, para determinação da linha de base. Posteriormente, efetuaram-se as microinjeções das drogas nos sítios previamente determinados e, em seguida, realizaram-se novos TRP nos intervalos de tempo de 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após as microinjeções.

### 3.7 - Teste algesimétrico de vocalização

O teste nociceptivo de vocalização induzido por um estímulo nocivo periférico, utilizado em nosso laboratório, tem se mostrado adequado para a medição de respostas de nocicepção em cobaias (Menescal-de-Oliveira e Lico, 1977 e 1982; Menescal-de-Oliveira e Hoffmann, 1993). Esse teste consiste na aplicação de um estímulo agudo periférico nocivo (choque elétrico) na pata, que provoca a emissão de uma resposta de vocalização pelo animal, o que é interpretado como expressão do componente afetivo-motivacional de dor.

Para a aplicação do estímulo nocivo periférico, foi implantado, na região subcutânea da coxa do animal, um par de eletrodos de aço-inox, não isolados, medindo 0,3 mm de diâmetro e 10 mm de comprimento. Após esse procedimento, a cobaia foi parcialmente contida em uma caixa de acrílico preenchida com espuma de nylon, onde permaneceu sem qualquer forma de manipulação por 20 minutos para habituação à situação experimental.

Após o período de habituação, os animais foram submetidos a um estímulo elétrico com corrente alternada, frequência de 100 Hz e duração do pulso de 0,5 ms. Inicialmente, a intensidade da corrente foi de 0,6 mA para o estabelecimento do limiar da resposta de vocalização. Em caso de ausência da resposta, a intensidade da estimulação foi aumentada gradativamente até que o animal iniciasse a resposta de vocalização, ou até a intensidade máxima de 4,0 mA. As cobaias que não responderam até a intensidade máxima (4,0 mA), foram excluídas do experimento.

Estabelecida a intensidade da estimulação nociva que evocou a resposta de vocalização do animal, mais duas estimulações subsequentes foram realizadas para confecção de uma linha de base ou registro controle. Na sequência, as drogas em estudo foram administradas nos sítio previamente determinados, e em seguida, foram efetuados novos registros das amplitudes das vocalizações nos intervalos de tempo de 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após as microinjeções.

A vocalização foi captada por meio de um microfone Aiwa DM-64, conectado a um pré-amplificador (Bioelectric Preamplifier RB-5), com capacidade de converter as ondas sonoras em sinais elétricos. Esses sinais foram transmitidos para um dos canais do polígrafo (Nihon Kohden) como registros gráficos das respostas de vocalização. A amplitude dos picos do registro gráfico foi proporcional à intensidade de vocalização do animal. Dessa forma, a média dos picos de cada resposta representou um índice confiável da magnitude de vocalização.

### **3.8 - Neurotraçamento**

Para realização do estudo neuroanatômico, as cobaias foram submetidas ao implante da cânula-guia no CCA, conforme os procedimentos cirúrgicos descritos anteriormente. Após essa etapa, os animais receberam no CCA a microinjeção de 0,2 µl de solução salina (0,9 %), diluída com dextrana de amina biotinizada a 10 % (BDA: 10.000 P.M) conjugada a fluorescência Texas red. Vale salientar que a microinjeção ocorreu seguindo o mesmo esquema de microinjeção das drogas comentado previamente, exceto pelo fato de ocorrer ao abrigo da luz.

Dezenove dias após a administração do BDA conjugado ao Texas red, os animais foram anestesiados profundamente com Pentobarbital sódico (Thionembutal<sup>®</sup>, 50 mg/Kg, i.p.) e perfundidos, via intracardiaca, com solução salina tamponada, seguida de paraformaldeído a 4 %, diluído em tampão fosfato (0,1 M, pH = 7,3). Posteriormente, os encéfalos foram removidos, fixados durante 4 horas e imersos durante 48 horas em solução de sacarose a 20 %, para crioproteção dos tecidos. Todos esses procedimentos também foram realizados ao abrigo da luz para evitar degradação da fluorescência inerente no Texas red.

Na etapa seguinte, os encéfalos foram colocados em isopentana, resfriada com gelo seco, na temperatura aproximada de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, o material foi cortado sob a

temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , na espessura de  $30\ \mu\text{m}$ , em micrótomo de congelamento (Mícron HM 505 N). Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas para posterior análise em microscópio de fluorescência (AxioImager Z1; Zeiss; Alemanha), equipado com um sistema de filtros de luz com comprimento de onda de  $360\ \text{nm}$ . A análise microscópica teve o objetivo de constatar os sítios das microinjeções do BDA conjugado ao Texas red no CCA e identificar a marcação fluorescente nos neurônios da SCPd.

### **3.9 - Grupos experimentais**

#### **3.9.1 - Experimento I**

Nessa etapa experimental avaliou-se a atividade do agonista de AAE, o ácido D,L-homocisteico (DLH), e de antagonista não competitivo dos receptores glutamatérgico do tipo NMDA, o MK-801, microinjetados no CCA, sobre a duração da IT. Avaliou-se também os aspectos funcionais da conexão glutamatérgica entre o CCA e a SCPd na modulação da duração da IT :

Grupo 1: Microinjeções de solução salina a  $0,9\ \%$  ( $0,2\ \mu\text{l}$ ) previamente aos episódios de IT.

Grupo 2: Microinjeções de DLH ( $30\ \text{nmol} / 0,2\ \mu\text{l}$ ) previamente aos episódios de IT.

Grupo 3: Microinjeções de MK-801 ( $3,6\ \text{nmol} / 0,2\ \mu\text{l}$ ) + microinjeção de DLH ( $30\ \text{nmol} / 0,2\ \mu\text{l}$ ), previamente aos episódios de IT.

Grupo 4: Microinjeções de MK-801 ( $3,6\ \text{nmol} / 0,2\ \mu\text{l}$ ) previamente aos episódios de IT.

Grupo 5: Microinjeção de solução salina a  $0,9\ \%$  ( $0,2\ \mu\text{l}$ ) na SCPd, 1 minuto antes da microinjeção de solução salina a  $0,9\ \%$  ( $0,2\ \mu\text{l}$ ) no CCA. Avaliação em seguida aos episódios de IT.

Grupo 6: Microinjeção de solução salina a 0,9 % (0,2 µl) na SCPd, 1 minuto antes da microinjeção de DLH (30 nmol / 0,2 µl) no CCA. Avaliação em seguida aos episódios de IT.

Grupo 7: Microinjeção de MK-801 (3,6 nmol / 0,2 µl) na SCPd, 1 minuto antes da microinjeção de DLH (30 nmol / 0,2 µl) no CCA. Avaliação em seguida aos episódios de IT.

Grupo 8: Microinjeção de MK-801 (3,6 nmol / 0,2 µl) na SCPd, 1 minuto antes da microinjeção de solução salina a 0,9 % (0,2 µl) no CCA. Avaliação em seguida aos episódios de IT.

### **3.9.2 - Experimento II**

Nessa etapa experimental avaliou-se a atividade do agonista de AAE, o ácido D,L-homocisteico (DLH), sobre a nocicepção mensurada pelos testes de retirada da pata (TRP) e de vocalização. Avaliou-se também a atividade do antagonista não competitivo dos receptores glutamatérgico do tipo NMDA, o MK-801, microinjetado no CCA, sobre a nocicepção mensurada pelo teste de vocalização. Analisaram-se, por fim, os aspectos funcionais da conexão neuronal entre o CCA e a SCPd na modulação da nocicepção mensurada pelo teste de vocalização.

Grupo 1: Microinjeções de solução salina a 0,9 % (0,2 µl) previamente ao teste de retirada da pata (TRP).

Grupo 2: Microinjeções de DLH (15 nmol / 0,2 µl) previamente ao TRP.

Grupo 3: Microinjeções de DLH (30 nmol / 0,2 µl) previamente ao TRP.

Grupo 4: Microinjeções de solução salina a 0,9 % (0,2 µl) previamente aos testes de vocalização.

Grupo 5: Microinjeções de DLH (15 nmol / 0,2 µl) previamente aos testes de vocalização.



Grupo 6: Microinjeções de DLH (30 nmol / 0,2 µl) previamente aos testes de vocalização.

Grupo 7: Microinjeções de MK-801 (3,6 nmol / 0,2 µl) + DLH (30 nmol / 0,2 µl) previamente aos testes de vocalização.

Grupo 8: Microinjeções de MK-801 (3,6 nmol / 0,2 µl) previamente aos testes de vocalização.

Grupo 9: Microinjeção de solução salina a 0,9 % (0,2 µl) na SCPd, 10 minutos antes da microinjeção de DLH (30 nmol / 0,2 µl) no CCA. Avaliação em seguida à nocicepção causada pelo teste da vocalização.

Grupo 10: Microinjeção de solução salina a 0,9 % (0,2 µl) na SCPd, 10 minutos antes da microinjeção de solução salina a 0,9 % (0,2 µl) no CCA. Avaliação em seguida à nocicepção pelo teste da vocalização.

Grupo 11: Microinjeção de lidocaína a 2% (0,2 µl) na SCPd, 10 minutos antes da microinjeção de DLH (30 nmol / 0,2 µl) no CCA. Avaliação em seguida à nocicepção pelo teste da vocalização.

Grupo 12: Microinjeção de lidocaína a 2% (0,2 µl) na SCPd, 10 minutos antes da microinjeção de solução salina a 0,9 % (0,2 µl) no CCA. Avaliação em seguida à nocicepção pelo teste da vocalização.

### **3.9.3 - Experimento neuroanatômico**

Nessa etapa experimental, avaliou-se a existência de projeções neuroanatômicas do CCA para a SCPd.

Grupo 1: Microinjeções no CCA, a um volume de 0,2 µl de BDA (PM: 10.000) conjugado ao Texas red.

### 3.10 - Histologia

Após a realização dos protocolos experimentais, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg, ip) e submetidos à perfusão, via ventrículo esquerdo, com solução fisiológica, para retirada do sangue. Em seguida, o sistema nervoso central foi perfundido com solução de formaldeído a 10%, para fixação dos tecidos. Os cérebros foram retirados e mantidos em solução de formaldeído (10%) por no mínimo 24 horas e na solução de sacarose por no mínimo 2 dias. Após este tempo, os cérebros foram cortados no criostato (Mícron HM 505N) e corados com o método de Nissl. Os cortes foram analisados sob microscopia de luz (Axiovert 100, sistema de aquisição de imagens KS-300 Zeiss), e os sítios de microinjeção foram identificados segundo o atlas de Rössner (1965), para cobaias. Foram considerados para análise dos resultados, apenas os animais cuja microinjeção atingiu a estrutura alvo.

### 3.11 - Análise dos resultados

Os resultados dos experimentos de IT foram expressos em valores médios das durações dos 5 episódios de imobilidade tônica de cada animal e através do erro padrão da média (média  $\pm$  erro padrão da média). A análise estatística dos dados foi realizada por meio de uma variância para medidas repetidas (ANOVA) e as diferenças determinadas pelo teste DUNCAN. Os dados foram considerados estatisticamente significantes para  $p \leq 0,05$ .

Nos experimentos de vocalização, a amplitude dos picos no registro gráfico da vocalização evocada pela aplicação de um estímulo nociceptivo foi medida em milímetros (mm) e a média de cada resposta foi interpretada como uma medida quantitativa de vocalização. Os resultados em milímetros foram transformados em índice de vocalização (Ivoc) utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Ivoc} = \frac{\text{média de vocalização} - \text{valor da linha de base}}$$

**Valor da linha de base**

Nos testes de retirada da pata, os resultados registrados em graus centígrados também foram transformados em índice do teste de retirada da pata (IRP) utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{IRP} = \frac{\text{temperatura de retirada da pata} - \text{valor da linha de base}}{70 - \text{valor da linha de base}}$$

Vale lembrar que 70 é a temperatura de corte medido em graus Celsius utilizada no TRP.

Para a estatística utilizada nos teste de vocalização e de retirada da pata, foi realizada uma análise variância multivariada (MANOVA) para medidas repetidas, onde as variáveis foram o tempo (fator repetido) e o tratamento (fator independente), seguido de uma análise de variância de uma via (one-way) e teste de Duncan. Os dados foram estatisticamente significantes para  $p \leq 0,05$ .

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 - EXPERIMENTO I

**- Avaliação do efeito do agonista de AAE, o ácido D,L-homocisteico (DLH), e antagonista não competitivo dos receptores glutamatérgico do tipo NMDA, o MK-801, microinjetados no CCA, sobre a duração da IT;**

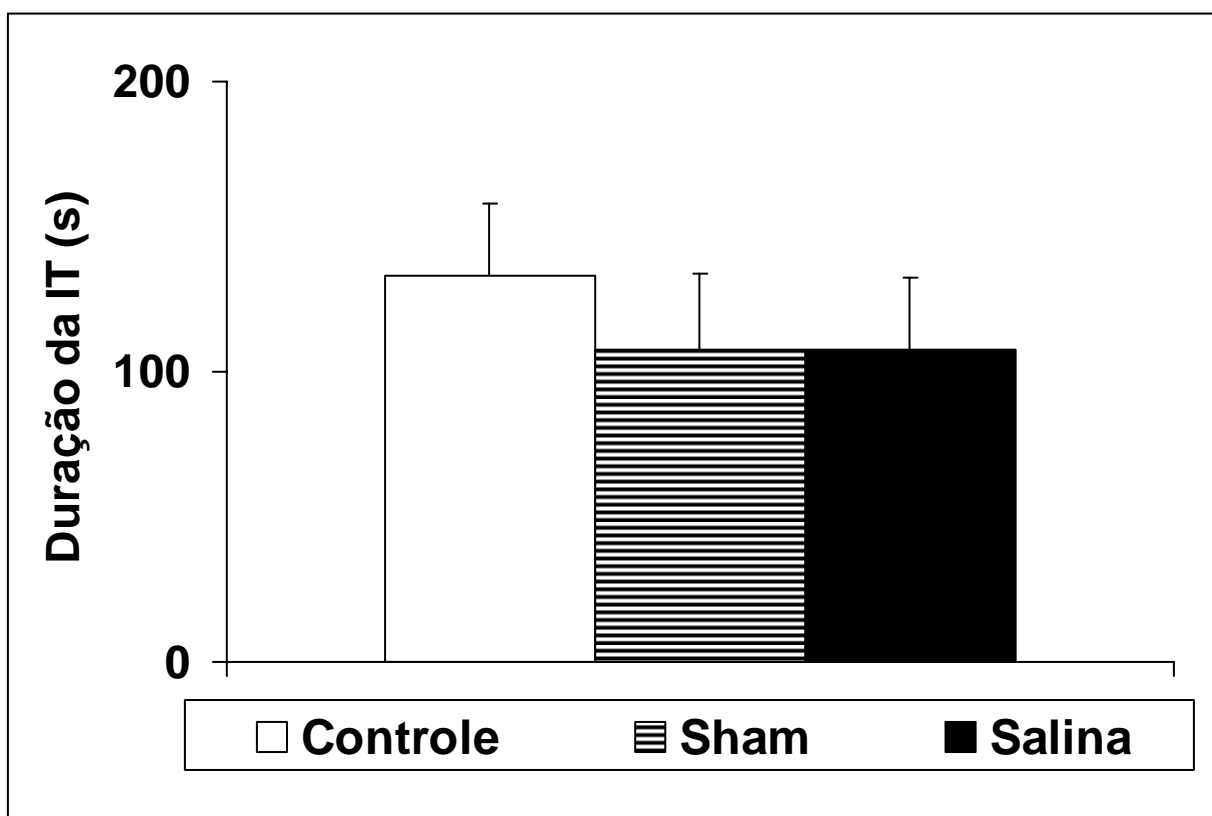
A microinjeção de DLH (30 nmol / 0,2 µl) no CCA de cobaias produziu uma diminuição significativa ( $F_{(2, 20)} = 4,07$ ;  $p = 0,033$ ) na duração dos episódios de IT (Fig. 2;  $n = 11$ ). A aplicação do pós-teste de DUNCAN mostrou diferença entre a média experimental ( $83,4 \pm 30,7$ ) e as médias controle ( $243,5 \pm 43,2$ ) e “sham” ( $238,4 \pm 55,7$ ). A administração do antagonista dos receptores NMDA, o MK-801 (3,6 nmol / 0,2 µl), previamente ao DLH produziu bloqueio do efeito da microinjeção de DLH sobre a resposta de IT. Isto é, a microinjeção do MK-801 + DLH não foi capaz de promover alteração significativa ( $p > 0,05$ ) da média de duração da IT ( $344,5 \pm 84,4$ ) em relação ao controle ( $367 \pm 58,8$ ) e ao “sham” ( $425,5 \pm 92,2$ ). Também não se observou diferença significativa entre essas duas últimas médias (Fig. 3;  $n = 10$ ). Além disso, os animais que foram submetidos à administração, *per se*, do MK-801 (3,6 nmol / 0,2 µl;  $n = 8$ ; Fig. 4) no CCA não apresentaram modificações ( $p > 0,05$ ) na duração da IT na situação controle ( $137,6 \pm 35,0$ ), “sham” ( $153,2 \pm 48,0$ ) e experimental ( $153,4 \pm 52,3$ ). Da mesma forma, a média de duração dos episódios de IT após a microinjeção de 0,2 µl de solução salina ( $107,6 \pm 24,7$ ) não foi diferente ( $p > 0,05$ ;  $n = 8$ ; Fig. 1) das médias controle ( $132,8 \pm 25,3$ ) e “sham” ( $107,6 \pm 26,1$ ).

A figura 5 mostra uma representação esquemática do CCA, contendo as microinjeções dos grupos experimentais, descritos no último parágrafo. A figura 6 mostra uma fotomicrografia de uma microinjeção localizada no CCA de cobaia.

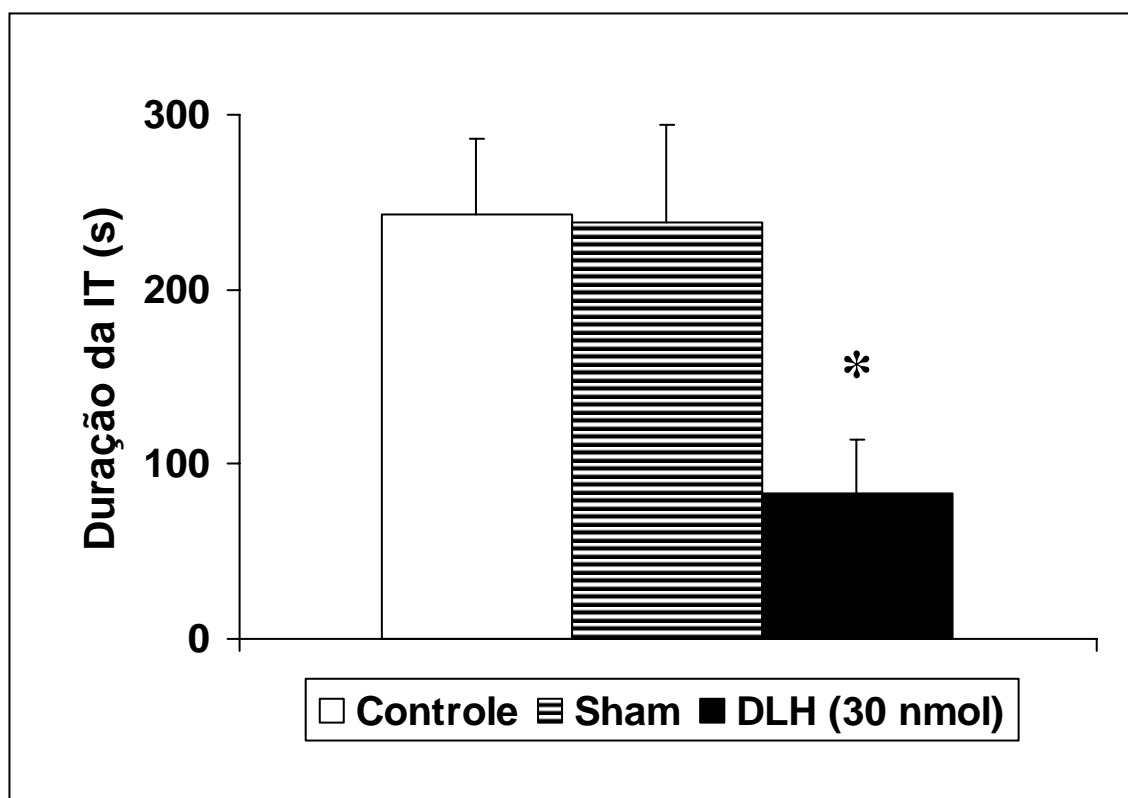
**- Avaliação dos aspectos funcionais da conexão glutamatérgica entre o CCA e a SCPd na modulação da duração da IT.**

A microinjeção de DLH (30 nmol / 0,2 µl) no CCA de cobaias, 1 minuto após a microinjeção de solução salina a 0,9 % (0,2 µl) na SCPd, produziu uma diminuição significativa ( $F_{(2, 18)} = 8,79$ ;  $p = 0,002$ ) na duração dos episódios de IT (Fig. 8;  $n = 10$ ). A aplicação do pós-teste de DUNCAN mostrou diferença significativa entre a média experimental ( $60,6 \pm 19,2$ ) quando comparada com as médias controle ( $162,3 \pm 41,7$ ) e “sham” ( $139,7 \pm 35,6$ ). Essa diminuição não foi observada no grupo que recebeu a administração do MK-801 (3,6 nmol / 0,2 µl) na SCPd 1 minuto antes da microinjeção do DLH no CCA. Isto é, a microinjeção do MK-801 na SCPd + DLH no CCA não foi capaz de promover alteração significativa ( $p > 0,05$ ) da média de duração da IT ( $88,5 \pm 33,1$ ) em relação ao controle ( $136,4 \pm 20,2$ ) e ao “sham” ( $85,2 \pm 16,6$ ). Também não se observou diferença significativa entre essas duas últimas médias (Fig. 9;  $n = 8$ ). Além disso, os animais ( $n = 8$ ) que foram submetidos à administração do MK-801 na SCPd, previamente à microinjeção de solução salina no CCA, não apresentaram modificações ( $p > 0,05$ ) nos episódios de IT na situação controle ( $236,5 \pm 32,4$ ), “sham” ( $234 \pm 69,4$ ) e experimental ( $191,4 \pm 45,1$ ), conforme mostra a figura 10. Da mesma forma, a média de duração dos episódios de IT após a microinjeção de 0,2 µl de solução salina na SCPd, previamente à microinjeção de solução salina no CCA ( $258,6 \pm 74,6$ ), não foi diferente ( $p > 0,05$ ;  $n = 8$ ; Fig. 7) das médias controle ( $255,1 \pm 31,5$ ) e “sham” ( $294,5 \pm 79,5$ ).

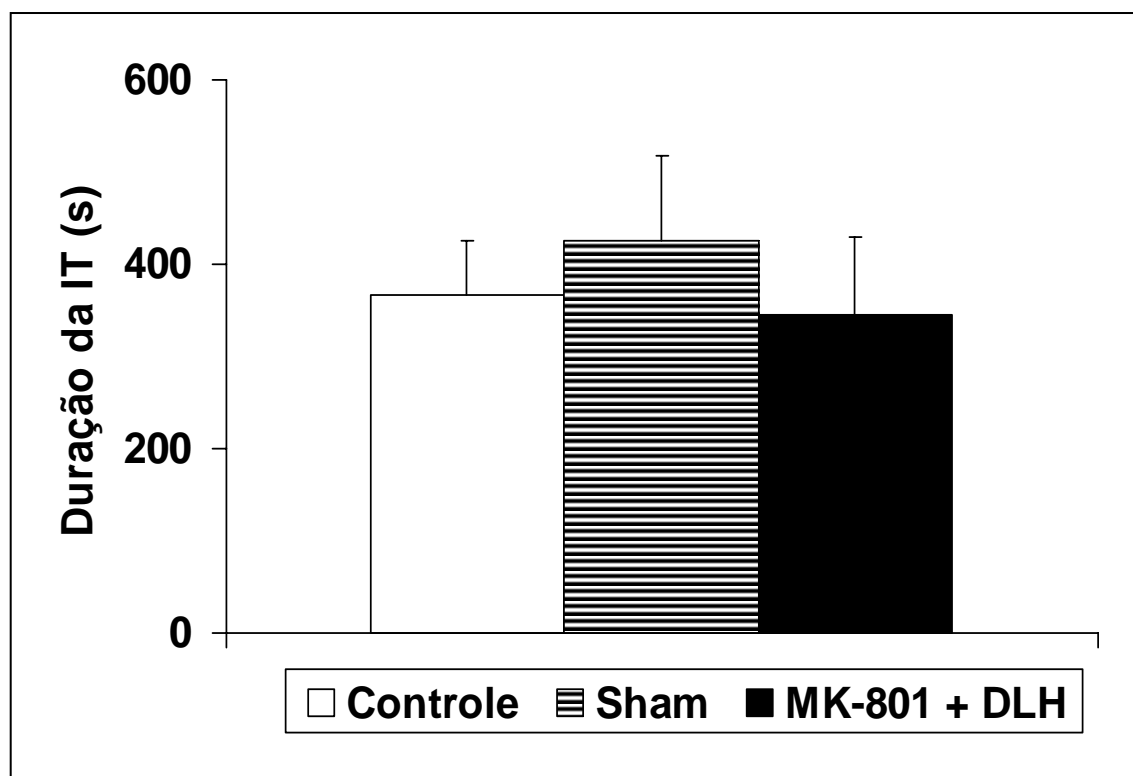
A figura 11 mostra uma representação esquemática do CCA e da SCPd, contendo as microinjeções dos grupos experimentais, descritos no último parágrafo. A figura 12 mostra uma fotomicrografia de uma microinjeção localizada na SCPd de cobaia.



**Figura 1.** Duração média dos cinco episódios de IT nos períodos pré-cirúrgico (controle), após o implante da cânula-guia (sham) e após a microinjeção de solução salina (0,2  $\mu$ l) no CCA (n = 8). As barras verticais representam o EPM.

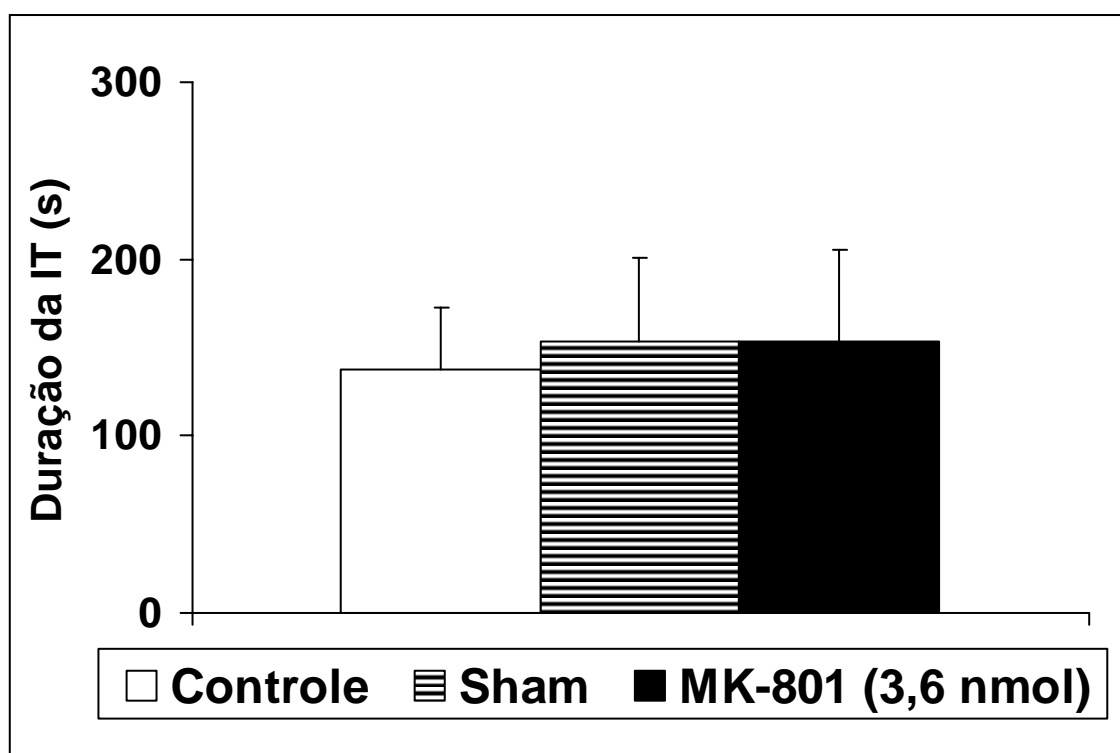


**Figura 2.** Duração média dos cinco episódios de IT nos períodos pré-cirúrgico (controle), após o implante da cânula-guia (sham) e após a microinjeção do DLH (30 nmol / 0,2  $\mu$ l) no CCA (n = 11). As barras verticais representam o EPM. \*  $p \leq 0,05$  quando comparado com o controle e o “sham”, de acordo com a análise de variância de uma via, seguida pelo “post hoc” de Duncan.

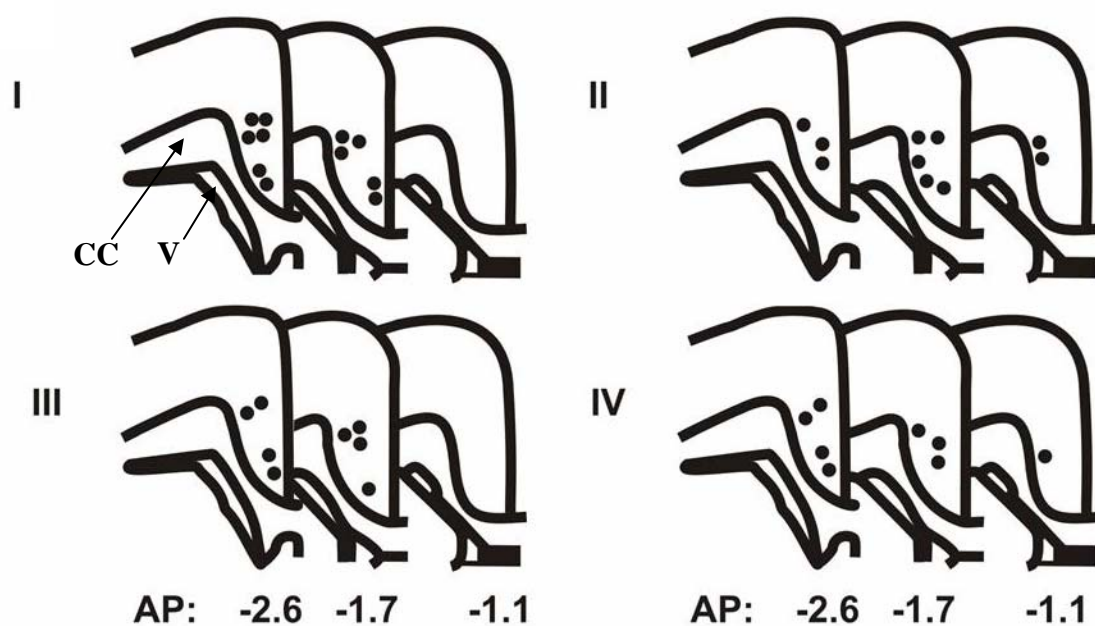


**Figura 3.** Duração média dos cinco episódios de IT nos períodos pré-cirúrgico (controle), após o implante da cânula-guia (sham) e após a microinjeção do MK-801 (3,6 nmol / 0,2  $\mu$ l) previamente à microinjeção de DLH (30 nmol / 0,2  $\mu$ l) no CCA (n = 10). As barras verticais representam o EPM.

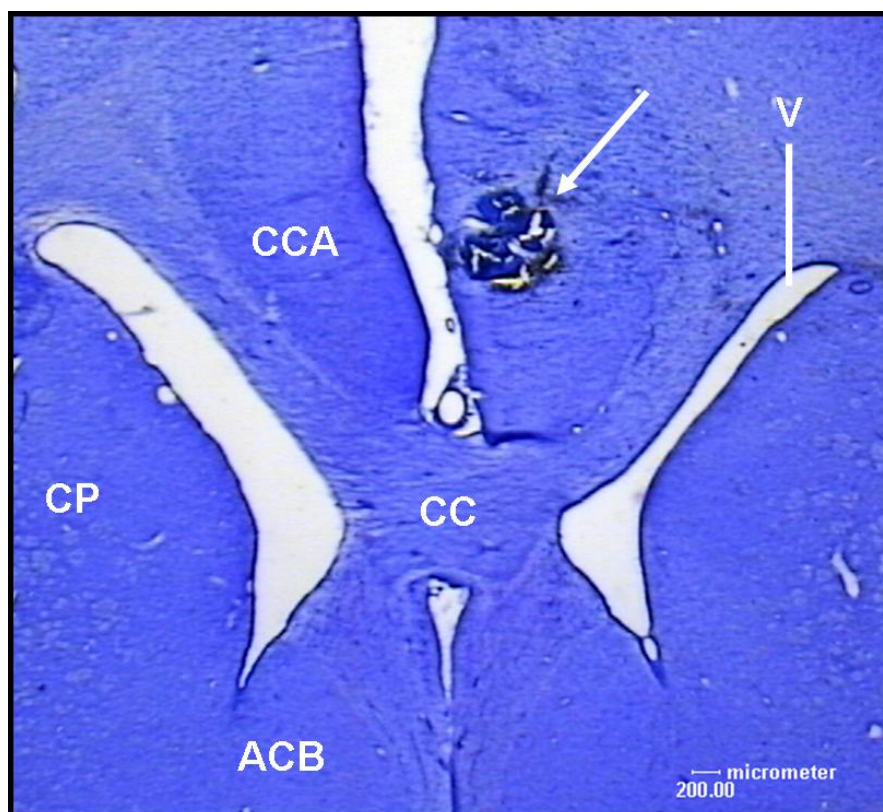




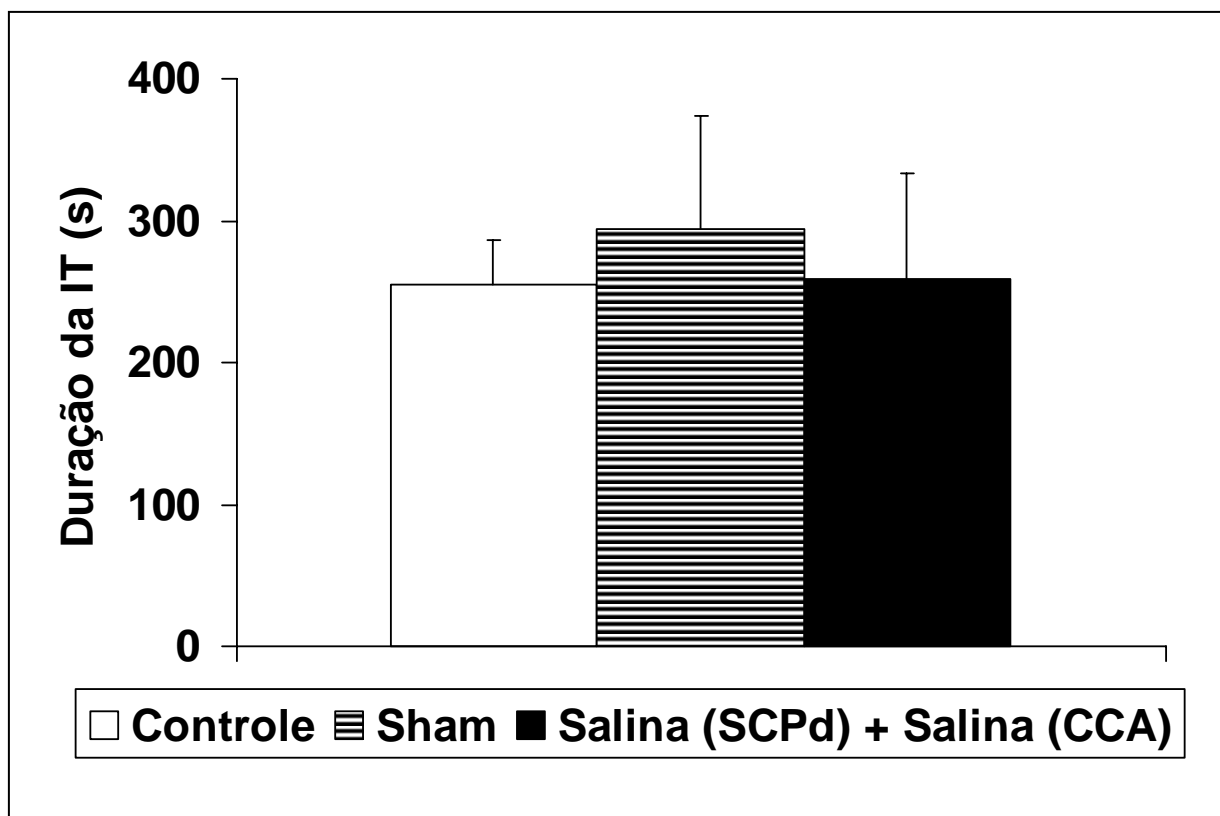
**Figura 4.** Duração média dos cinco episódios de IT nos períodos pré-cirúrgico (controle), após o implante da cânula-guia (sham) e após microinjeção do MK-801 (3,6 nmol / 0,2  $\mu$ l) no CCA (n = 8). As barras verticais representam o EPM.



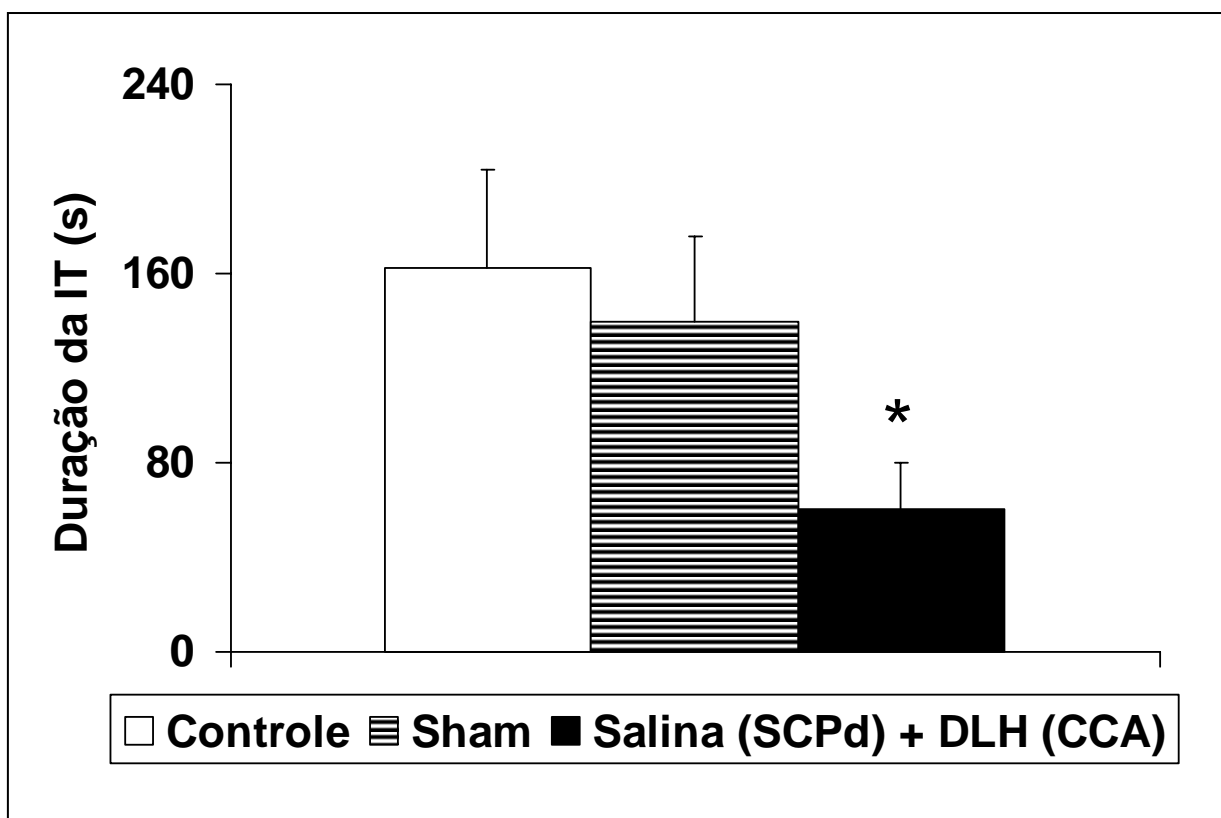
**Figura 5.** Representação esquemática de secções frontais do CCA de cobaias. Os círculos preenchidos (●) indicam os sítios das microinjeções: I – DLH (30 nmol); II – MK-801 + DLH; III – MK-801 (3,6 nmol); IV – Solução salina. AP = plano ântero – posterior; CC = corpo caloso; V = ventrículo lateral. Os esquemas foram modificados a partir do atlas de Rössner (1965), para cobaias.



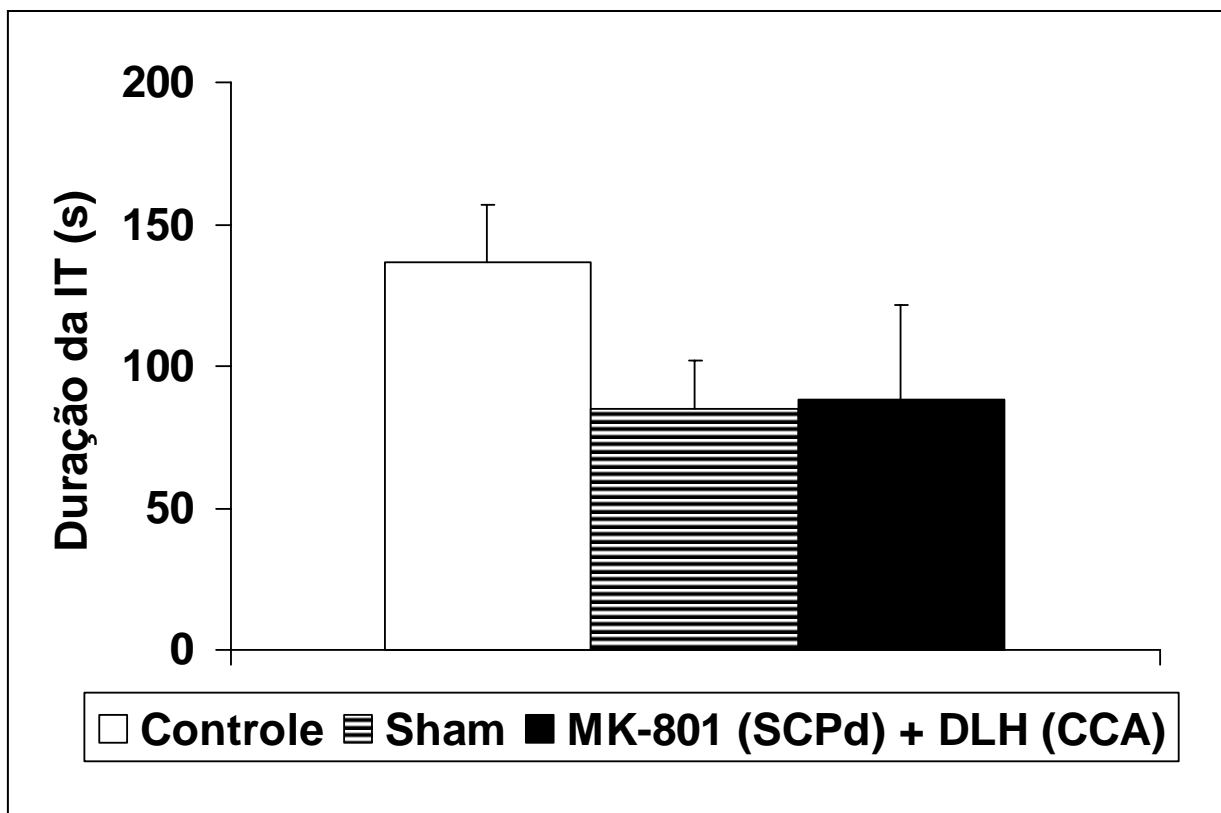
**Figura 6.** Fotomicrografia de secção coronal de cérebro de cobaia de um animal do grupo onde o sítio (seta) de uma microinjeção está localizado no córtex cingulado anterior (CCA). ACB = núcleo acumbens; CC = corpo caloso; CP = complexo caudado-putamen; V = ventrículo lateral.



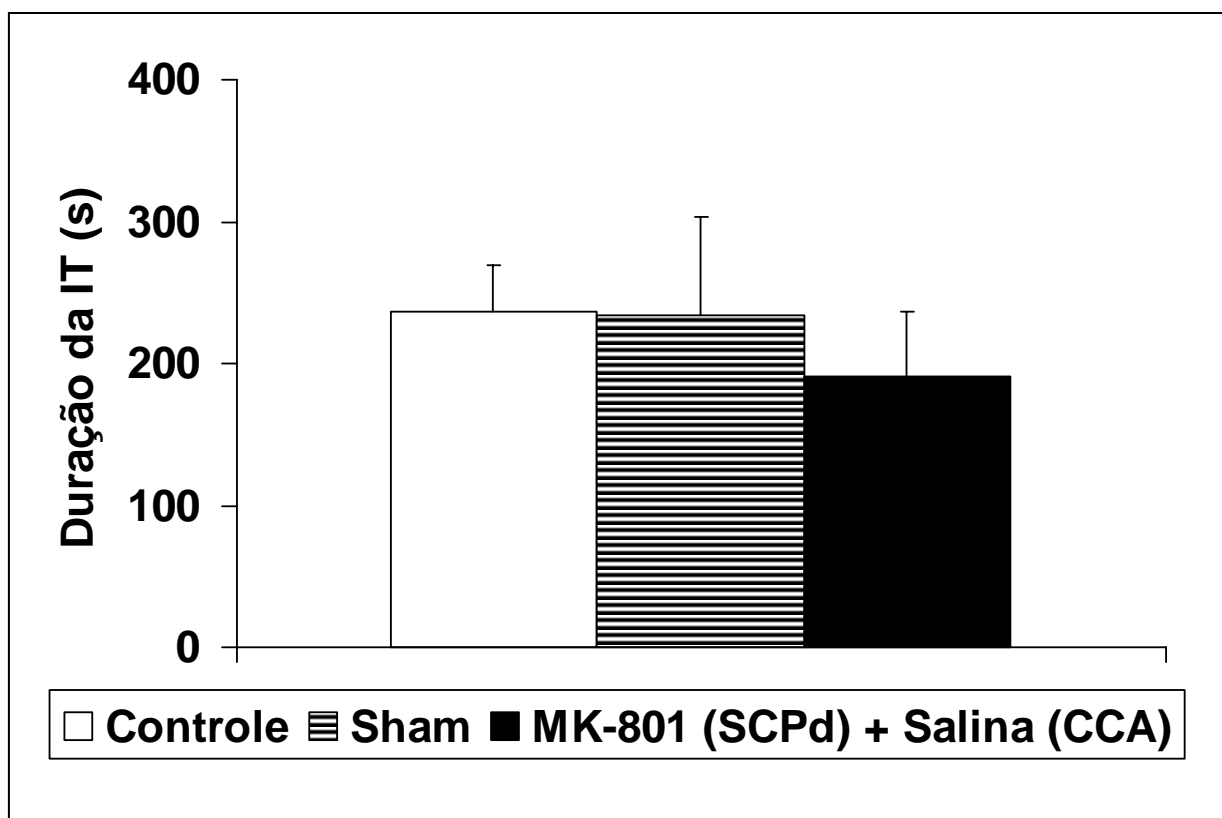
**Figura 7.** Duração média dos cinco episódios de IT nos períodos pré-cirúrgico (controle), após o implante da cânula-guia (sham) e após a microinjeção de 0,2  $\mu$ l de solução salina na SCPd 1 minuto antes da administração de solução salina (0,2  $\mu$ l) no CCA (n = 8). As barras verticais representam o EPM.



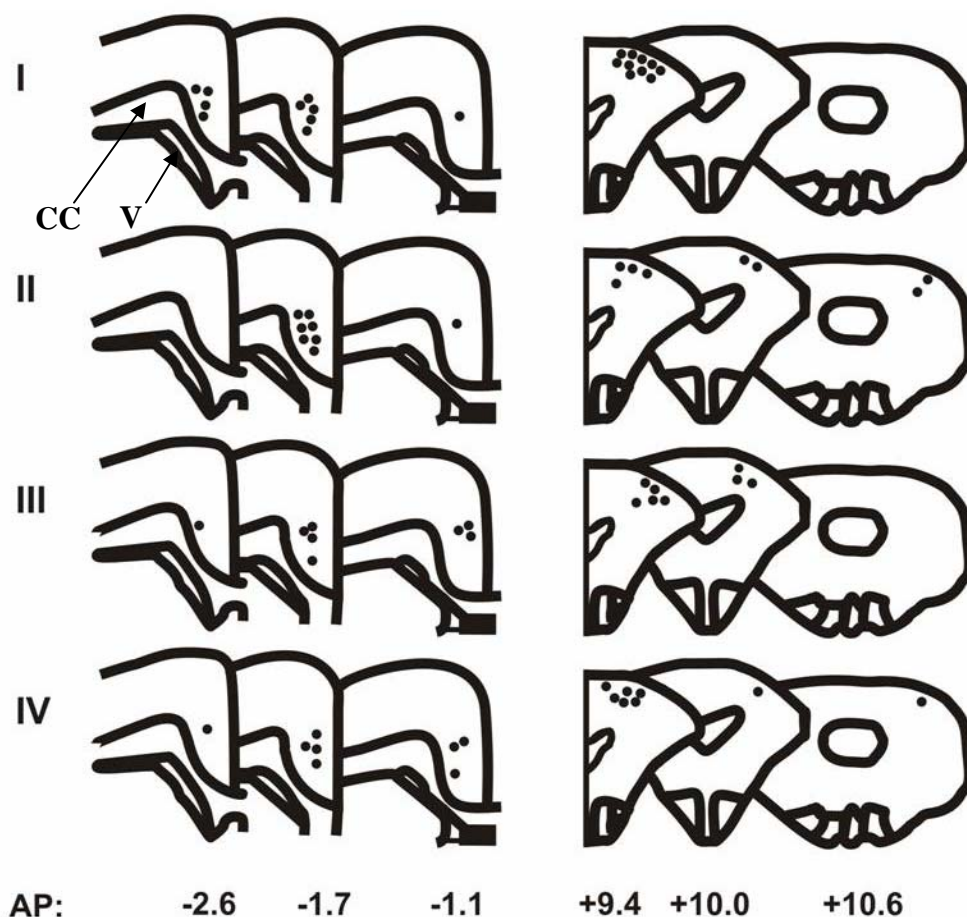
**Figura 8.** Duração média dos cinco episódios de IT nos períodos pré-cirúrgico (controle), após o implante da cânula-guia (sham) e após a microinjeção do DLH (30 nmol / 0,2  $\mu$ l) no CCA 1 minuto após a microinjeção de 0,2  $\mu$ l de solução salina na SCPd (n = 10). As barras verticais representam o EPM. \*  $p \leq 0,05$  quando comparado com o controle e o “sham”, de acordo com a análise de variância de uma via, seguida pelo “post hoc” de Duncan.



**Figura 9.** Duração média dos cinco episódios de IT nos períodos pré-cirúrgico (controle), após o implante da cânula-guia (sham) e após a microinjeção do MK-801 (3,6 nmol / 0,2  $\mu$ l) na SCPd 1 minuto antes da administração de DLH (30 nmol / 0,2  $\mu$ l) no CCA (n = 8). As barras verticais representam o EPM.

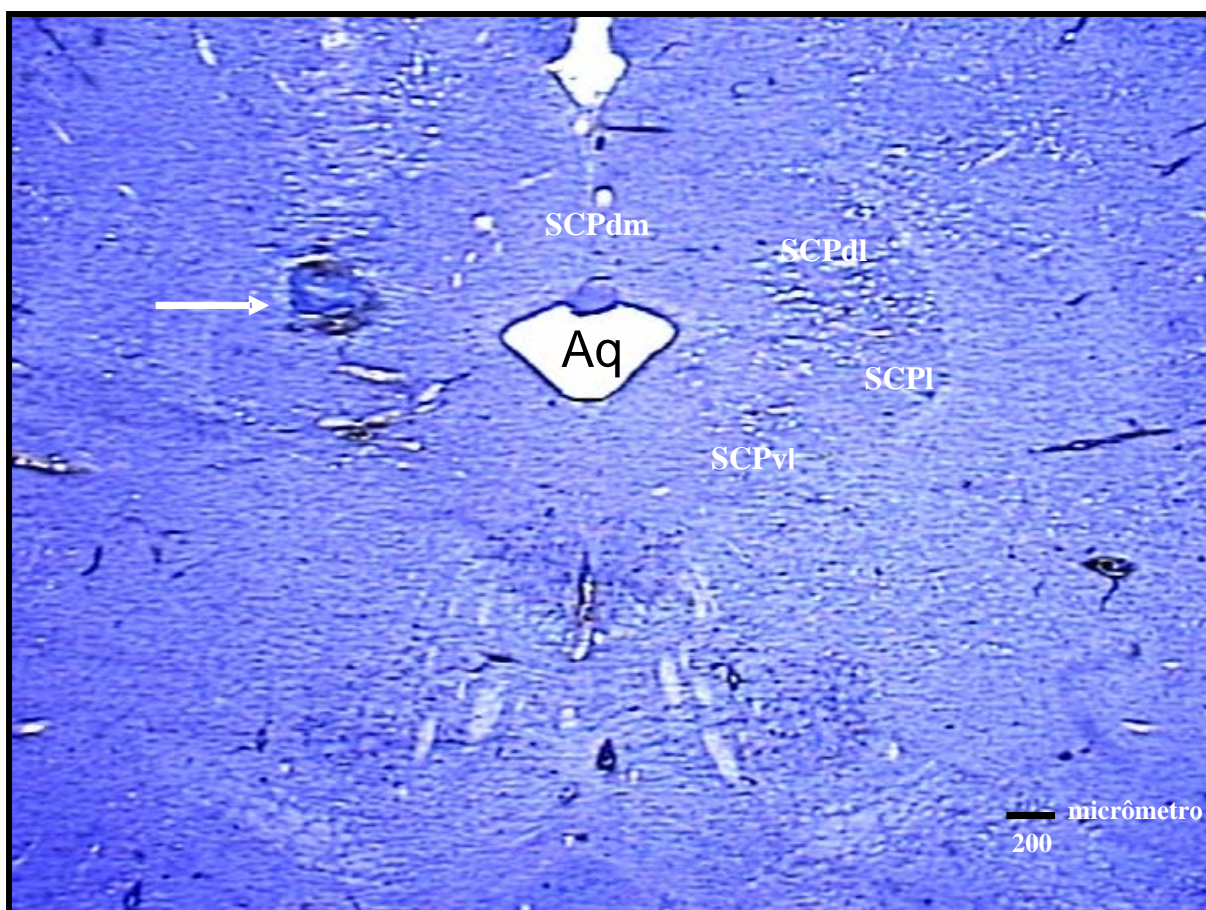


**Figura 10.** Duração média dos cinco episódios de IT nos períodos pré-cirúrgico (controle), após o implante da cânula-guia (sham) e após a microinjeção do MK-801 (3,6 nmol / 0,2  $\mu$ l) na SCPd 1 minuto antes da administração de 0,2  $\mu$ l de solução salina no CCA (n = 8). As barras verticais representam o EPM.



**Figura 11.** Representação esquemática de seções frontais do CCA e da SCPd de cobaias. Os círculos preenchidos (●) indicam os sítios das microinjeções: I – Solução salina na SCPd + DLH no CCA; II – MK-801 na SCPd + DLH no CCA; III – MK-801 na SCPd + solução salina no CCA; IV – Solução salina na SCPd + solução salina no CCA. AP = plano ântero – posterior; CC = corpo caloso; V = ventrículo lateral. Os esquemas foram modificados a partir do atlas de Rössner (1965), para cobaias.





**Figura 12.** Fotomicrografia de secção coronal de mesencéfalo de cobaia de um animal do grupo onde o sítio (seta) de uma microinjeção está localizado na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd). SCPli = substância cinzenta periaquedutal lateral; SCPvl = substância cinzenta periaquedutal ventrolateral; SCPdm = substância cinzenta periaquedutal dorsomedial; Aq = aqueduto cerebral.

## 4.2 - EXPERIMENTO II

**- Avaliação do efeito do agonista de AAE, o ácido D,L-homocisteico (DLH), sobre a nocicepção mensurada pelos testes de retirada da pata (TRP) e vocalização. Avaliação do efeito do antagonista não competitivo dos receptores glutamatérgico do tipo NMDA, o MK-801, microinjetado no CCA, sobre a nocicepção mensurada pelo teste de vocalização.**

Nessa etapa experimental, foi observado o decurso temporal do efeito do tratamento de 15 nmol de DLH e de solução salina a 0,9% (0,2 µl), microinjetados no CCA, sobre as respostas nociceptivas de retirada da pata e de vocalização. As figuras 13 e 14 mostraram que tanto no TRP, como no teste nociceptivo de vocalização, respectivamente, a microinjeção de 15 nmol de DLH e de solução salina não provocaram alteração das respostas relacionadas às estimulações nociceptivas nos períodos avaliados. Além disso, nos dois testes, também não foi observada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre o grupo que recebeu a microinjeção de DLH (15 nmol) e o grupo que recebeu a microinjeção de solução salina no CCA. A administração de uma concentração aumentada de DLH (30 nmol) no CCA de cobaias também não provocou mudanças ( $p > 0,05$ ) no índice de retirada da pata (IRP) durante os intervalos de tempo avaliados (Figura 15). No teste nociceptivo de vocalização, o tratamento de 30 nmol de DLH foi capaz de influenciar a intensidade das respostas relacionadas à estimulação nociceptiva periférica aguda. Inicialmente, mais precisamente aos 2 minutos após a microinjeção de 30 nmol de DLH no CCA, verificou-se um aumento no índice de vocalização ( $p \leq 0,05$ ). Esse efeito pró-nociceptivo deixou de existir nos 5 minutos seguintes ao tratamento e assim se manteve por todo período de avaliação. O aumento do índice de vocalização aos 2 minutos após a microinjeção de DLH (30 nmol) não foi observado no grupo que foi tratado previamente com a microinjeção de MK-801 (3,6 nmol) no mesmo sítio. Nesse mesmo grupo (MK-801 + DLH), também não se constataram alterações no índice de

vocalização nos períodos restantes avaliados ( $p > 0,05$ ). Além disso, a microinjeção do MK-801 *per se*, assim como de 0,2  $\mu$ l de solução salina na mesma região, também não provocou mudanças ( $p > 0,05$ ) na resposta nociceptiva de vocalização, mensurada durante os 30 minutos após os tratamentos (Figura 17). A aplicação do “two-way ANOVA” para medidas repetidas entre os grupos demonstrou haver diferença estatística para o tempo ( $F_{(5, 130)} = 2,530$ ;  $p = 0,032$ ). A aplicação do pós-teste de Duncan mostrou que aos 2 minutos o tratamento com o DLH (30 nmol) foi estatisticamente distinto ( $p \leq 0,05$ ) dos demais tratamentos (MK-801 + DLH; MK-801; Salina) que não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ). Na figura 18 observa-se um exemplo de registros poligráficos da vocalização de animais representativos dos grupos experimentais acima mencionados nos intervalos de tempo onde houve a aplicação do estímulo nocivo periférico.

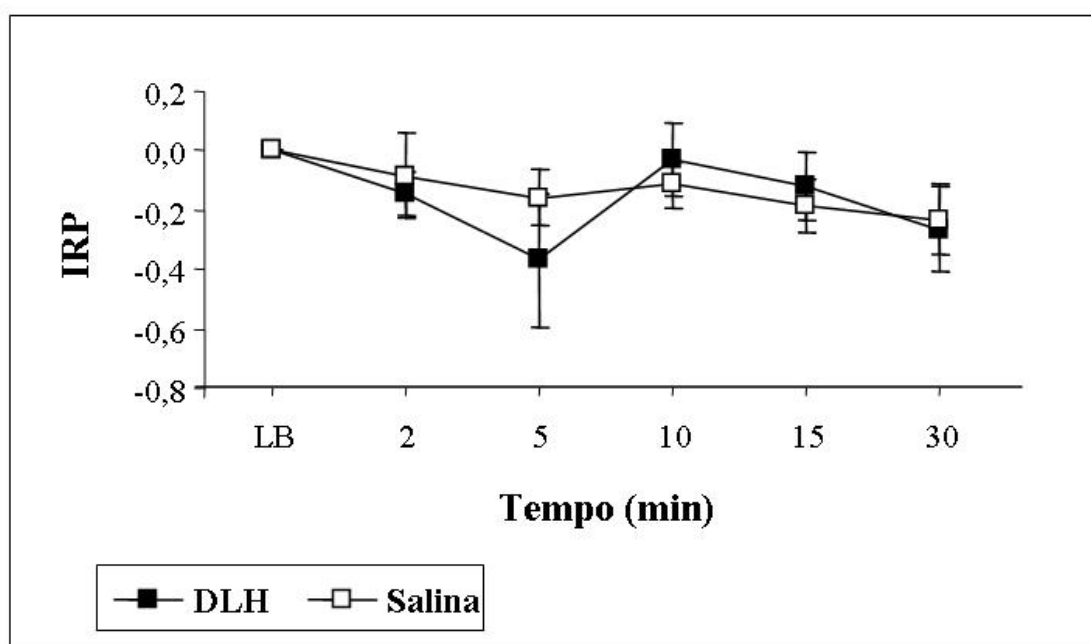
As figuras 16 e 19 mostram as representações esquemáticas do CCA, contendo as microinjeções dos grupos experimentais relacionados, respectivamente, com o TRP e o teste de vocalização.

#### **- Avaliação dos aspectos funcionais da conexão neuronal entre o CCA e a SCPd na modulação da nociceção medida pelo teste de vocalização.**

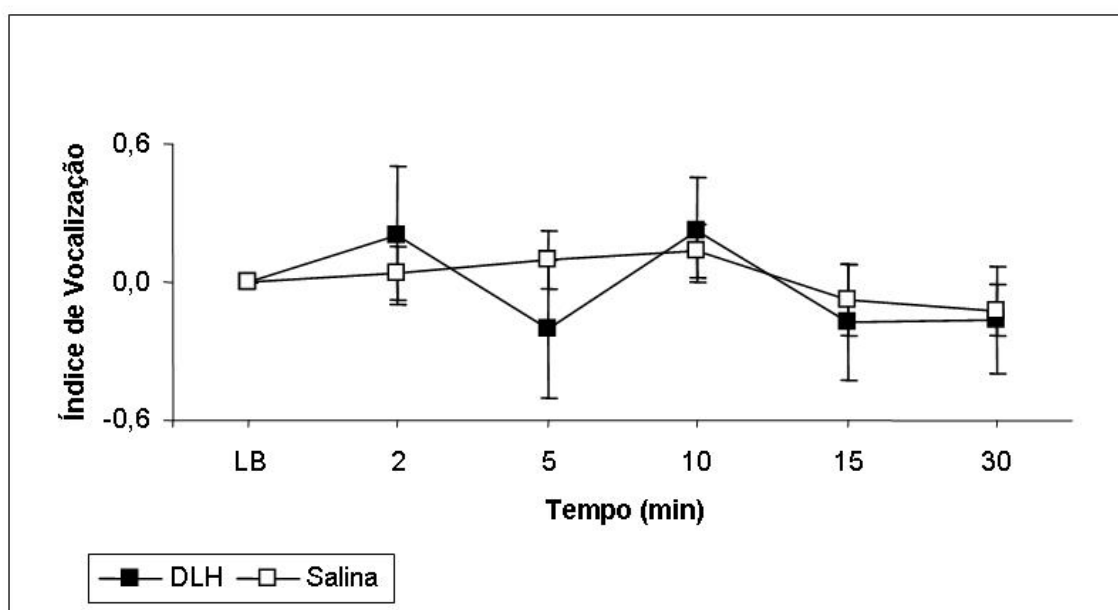
Nesse protocolo experimental foi observado o decurso temporal do efeito do tratamento de 30 nmol de DLH no CCA, 10 minutos após a microinjeção de solução salina na SCPd, sobre a resposta nociceptiva de vocalização. Inicialmente, nos 2 minutos após a microinjeção do DLH (30 nmol) no CCA, verificou-se um aumento no índice de vocalização ( $p \leq 0,05$ ), que deixou de existir já nos 5 minutos seguintes após o tratamento. O aumento do índice de vocalização nos 2 minutos não foi observado nos animais que receberam microinjeção de lidocaína (0,2  $\mu$ l) na SCPd, 10 minutos antes do DLH (30 nmol) administrado no CCA. Nesse mesmo grupo, também não foram constatadas alterações no

índice de vocalização nos períodos seguintes avaliados ( $p > 0,05$ ). Além disso, a microinjeção de lidocaína (0,2  $\mu$ l) na SCPd, 10 minutos antes do tratamento com solução salina (0,2  $\mu$ l) no CCA, também não provocou mudanças na respostas nociceptivas de vocalização ( $p > 0,05$ ). Da mesma forma, a microinjeção de solução salina na SCPd, 10 minutos antes da administração de solução salina no CCA, não influenciou significativamente ( $p > 0,05$ ) as respostas de vocalização induzidas pela estimulação nociva periférica aguda (Figura 20). A aplicação do “two-way ANOVA” para medidas repetidas entre os grupos demonstrou haver diferença significativa para o tempo ( $F_{(5, 95)} = 3,150$ ;  $p = 0,011$ ). A aplicação do pós-teste de Duncan mostrou que aos 2 minutos, o tratamento com o DLH (30 nmol) no CCA, 10 minutos após o tratamento com solução salina na SCPd, foi estatisticamente diferente ( $p \leq 0,05$ ) dos demais tratamentos, que não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ). Na figura 21, observa-se um exemplo de registros poligráficos da vocalização de animais representativos dos grupos experimentais acima mencionados nos intervalos de tempo onde houve a aplicação do estímulo nocivo periférico.

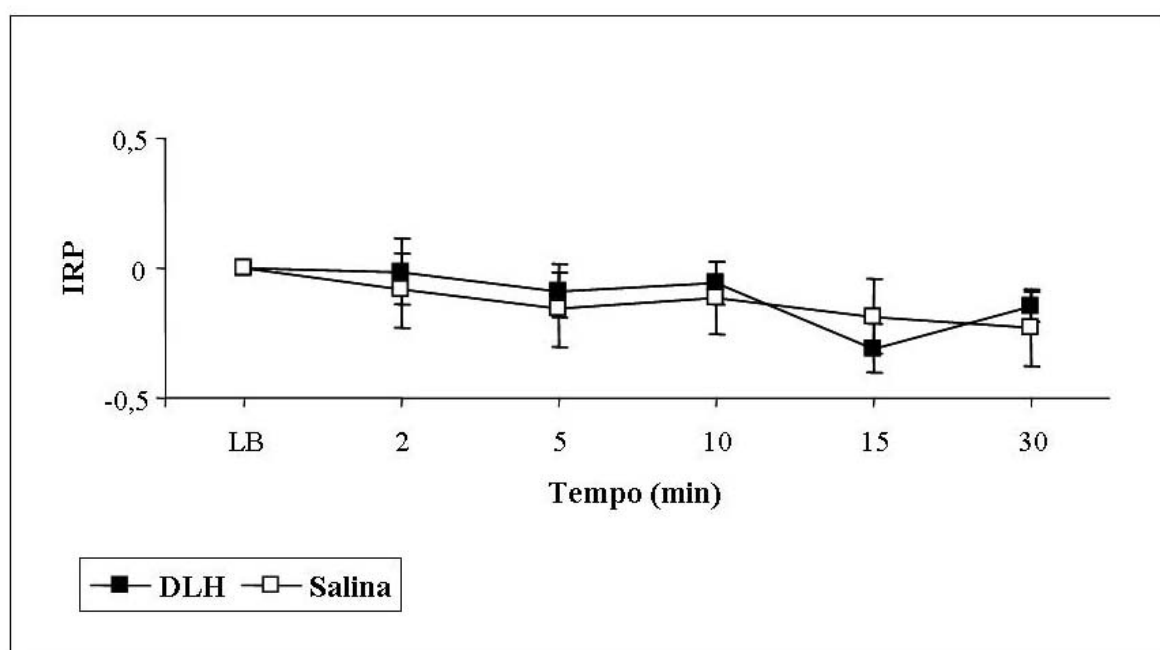
A figura 22 mostra uma representação esquemática do CCA e da SCPd, contendo as microinjeções dos grupos experimentais, descritos no último parágrafo.



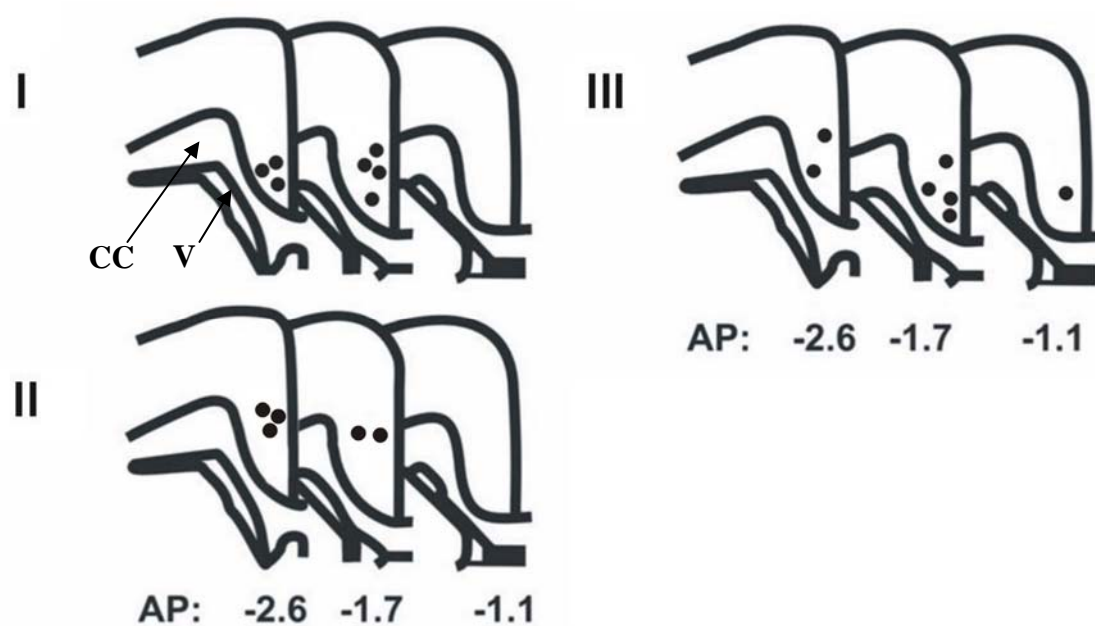
**Figura 13.** Decurso temporal da média do índice do teste algesimétrico de retirada da pata (IRP) no período controle e após os tratamentos com 15 nmol de DLH ( $n = 5$ ) ou com solução salina a 0,9 % ( $n = 7$ ) no CCA. As barras verticais representam o erro padrão da média (EPM). LB (linha de base) representa o índice de vocalização no período controle.



**Figura 14.** Decurso temporal da média do índice algesimétrico de vocalização no período controle e após os tratamentos com 15 nmol de DLH ( $n = 8$ ) ou com solução salina a 0,9 % ( $n = 7$ ) no CCA. As barras verticais representam o erro padrão da média (EPM). LB (linha de base) representa o índice de vocalização no período controle.

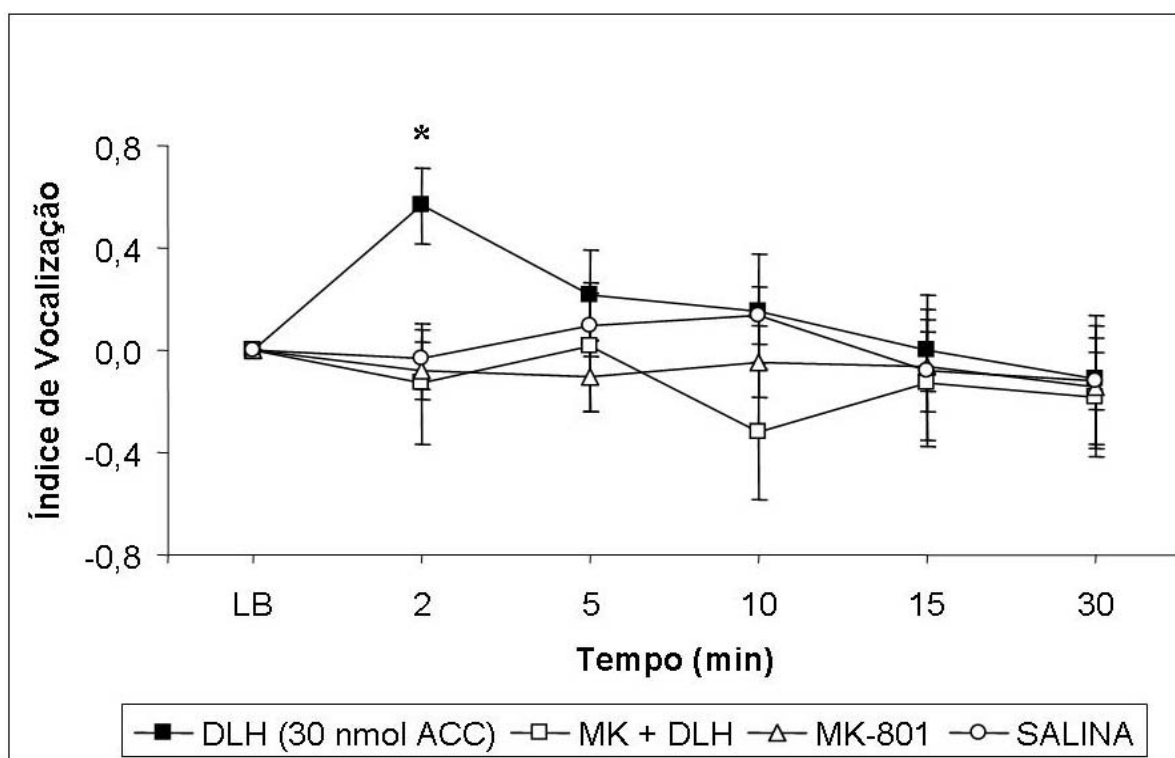


**Figura 15.** Decurso temporal da média do índice algesimétrico do teste de retirada da pata (IRP) no período controle e após os tratamentos com 30 nmol de DLH ( $n = 7$ ) ou com solução salina a 0,9 % ( $n = 7$ ) no CCA. As barras verticais representam o erro padrão da média (EPM). LB (linha de base) representa o índice de vocalização no período controle.

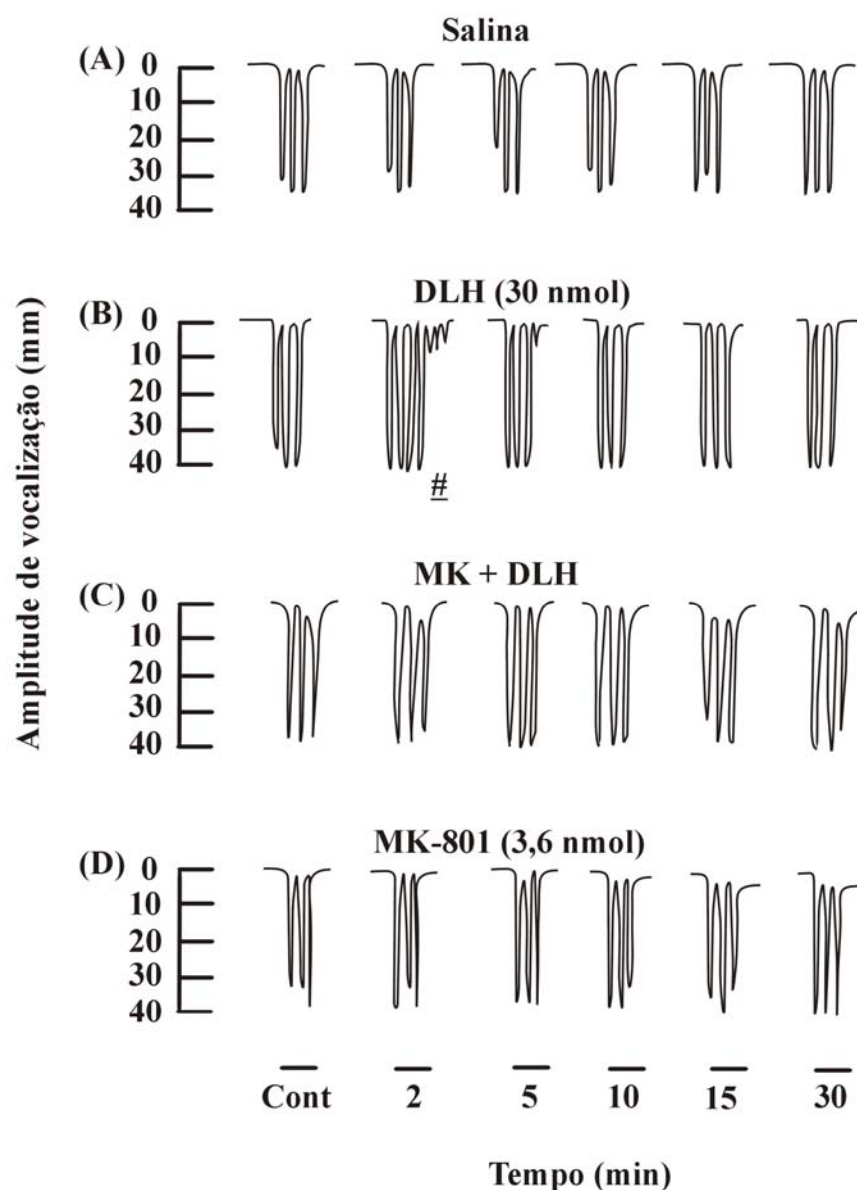


**Figura 16.** Representação esquemática de seções frontais do CCA de cobaias. Os círculos preenchidos (●) indicam os sítios das microinjeções efetuadas durante o teste algesimétrico de retirada da pata: I – Solução salina; II – 15 nmol de DLH; III – 30 nmol de DLH. AP = plano ântero – posterior; CC = corpo caloso; V = ventrículo lateral. Os esquemas foram modificados a partir do atlas de Rössner (1965), para cobaias.

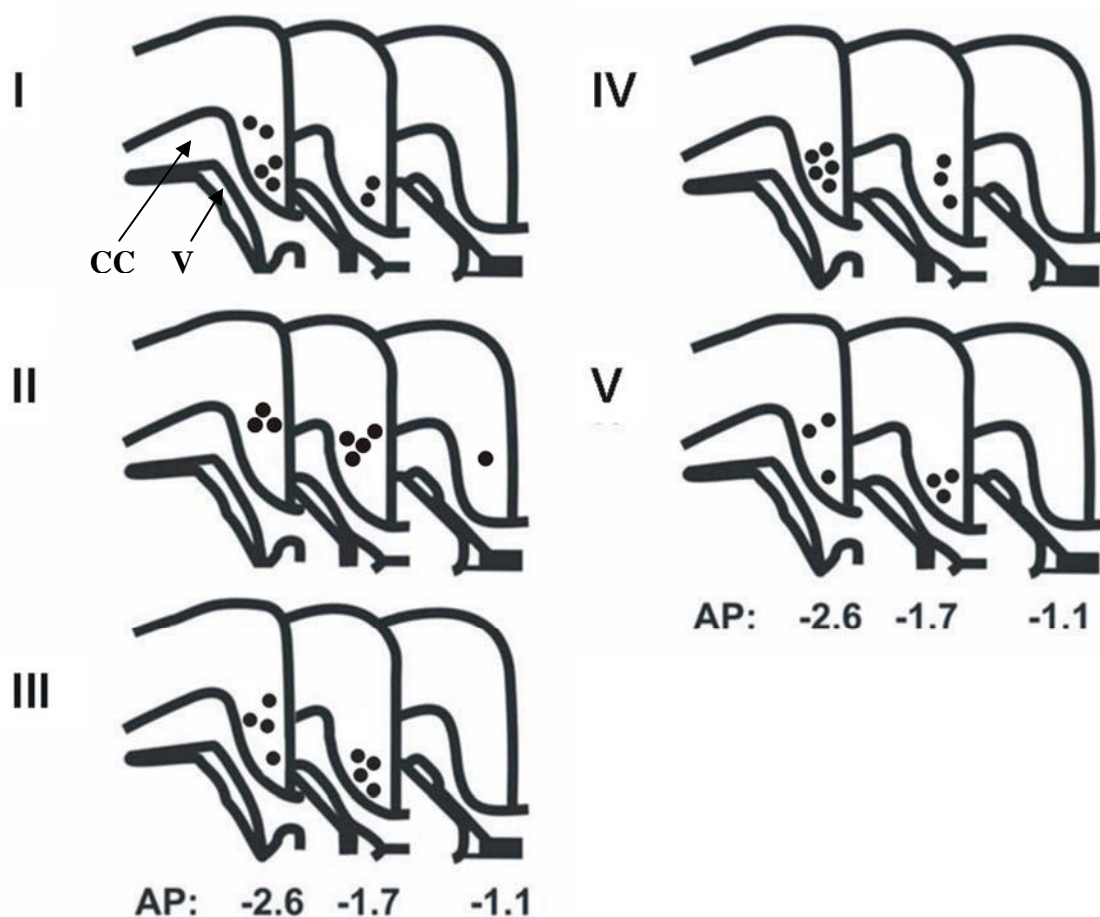




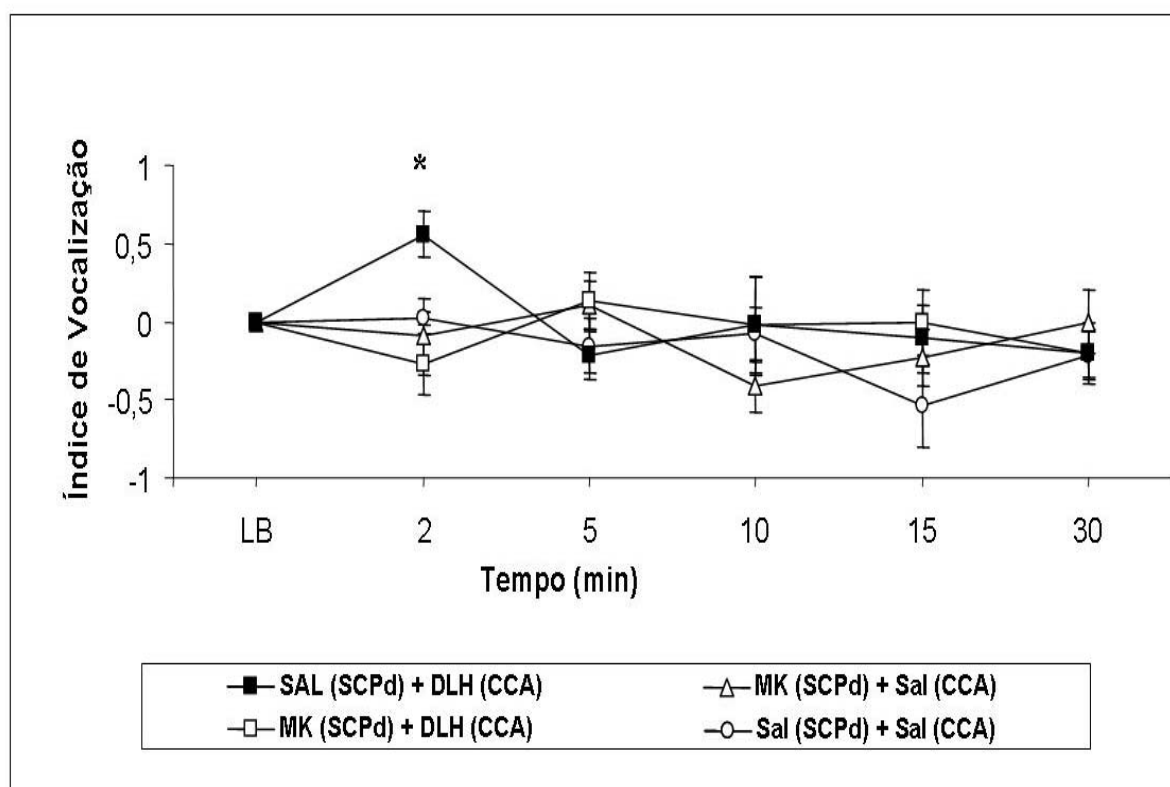
**Figura 17** – Decurso temporal da média do índice algesimétrico de vocalização no período controle e após os tratamentos com 30 nmol de DLH (n = 8); com 3,6 nmol de MK-801 + 30 nmol de DLH (n = 8); com 3,6 nmol de MK-801 (n = 6); ou com solução salina a 0,9 % (n = 7) no CCA. As barras verticais representam o erro padrão da média (EPM). LB (linha de base) representa o índice de vocalização no período controle. O \* foi considerado como  $p < 0,05$  quando comparado com os demais grupos.



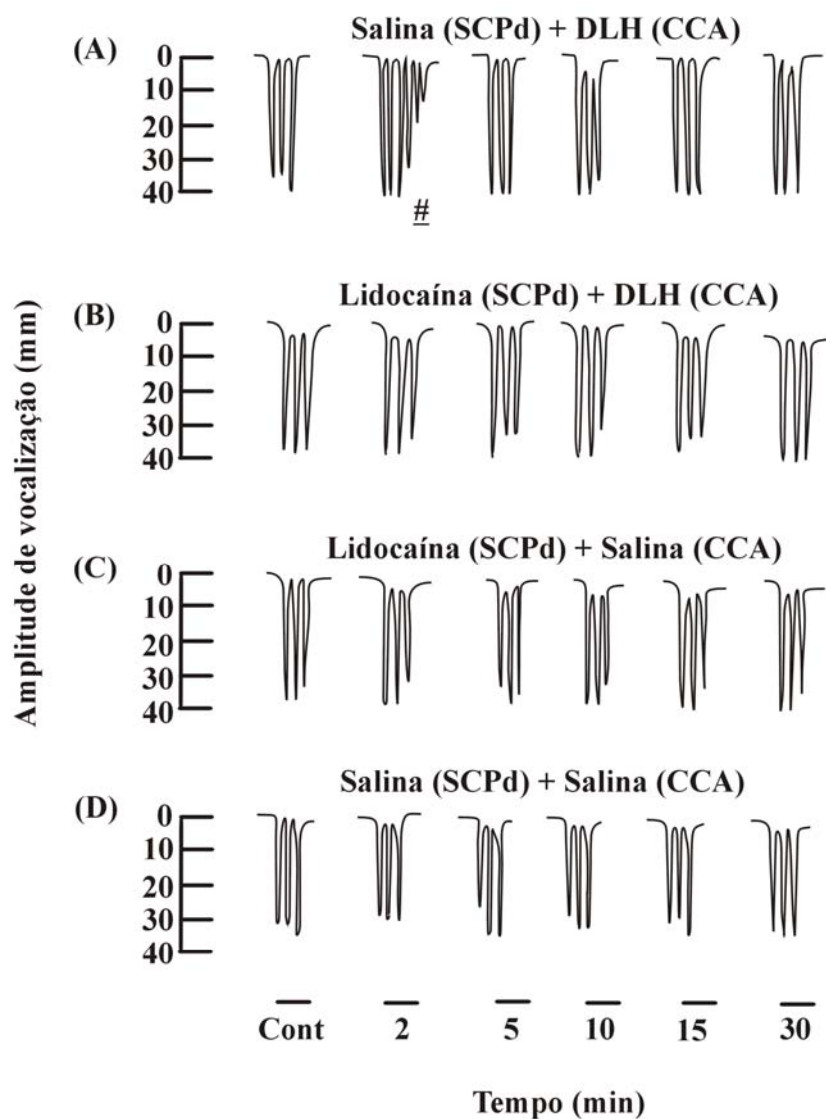
**Figura 18** – Registro poligráfico da amplitude (mm) de vocalização de um animal representativo de cada grupo após as microinjeções no CCA de cobaias: (A) – Salina; (B) – DLH (30 nmol); (C) – MK + DLH; (D) – MK-801 (3,6 nmol). As barras horizontais indicam o período de aplicação do estímulo nocivo (3 s) nos diferentes intervalos de tempo (min). O controle (Cont) representa o registro de vocalização antes da microinjeção das drogas. O # indica a pós-descarga.



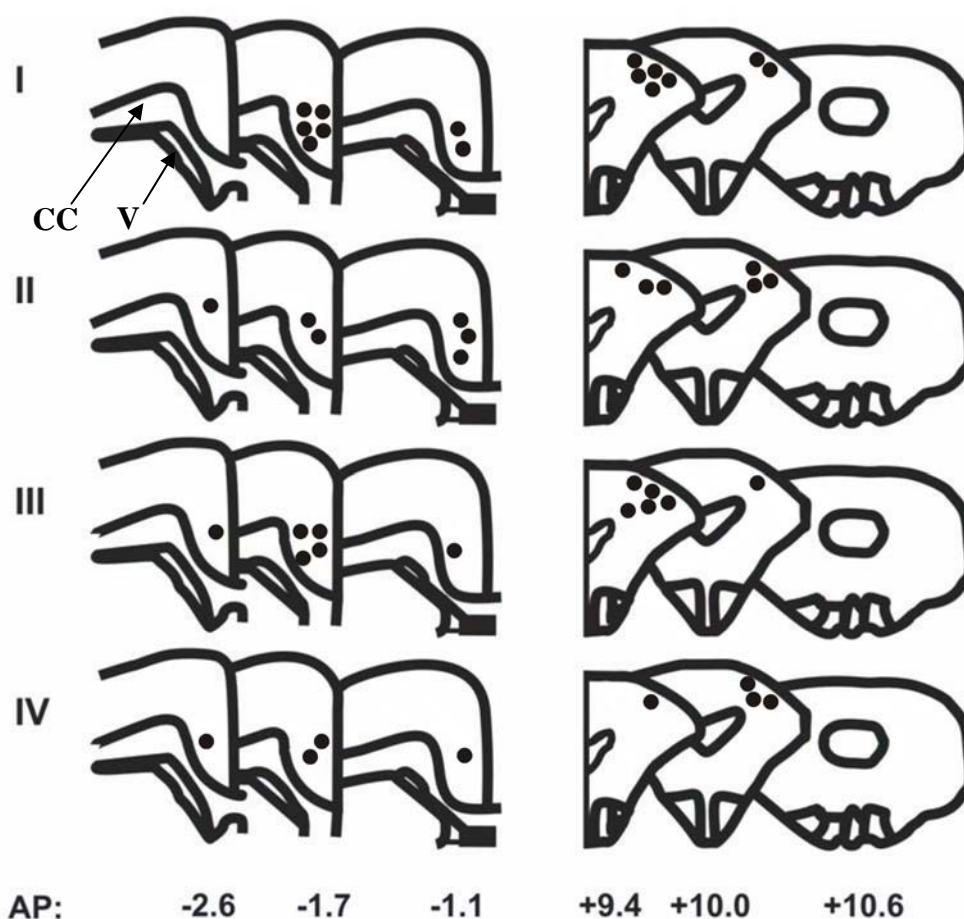
**Figura 19.** Representação esquemática de seções frontais do CCA de cobaias. Os círculos preenchidos (●) indicam os sítios das microinjeções efetuadas durante o teste algesimétrico de vocalização: I – Solução salina; II – 15 nmol de DLH; III – 30 nmol de DLH; IV – MK + DLH (30 nmol); V – MK-801 (3,6 nmol). AP = plano ântero – posterior; CC = corpo caloso; V = ventrículo lateral. Os esquemas foram modificados a partir do atlas de Rössner (1965), para cobaias.



**Figura 20** – Decurso temporal da média do índice algesimétrico de vocalização no período controle e após os tratamentos com 30 nmol de DLH microinjetado no CCA 10 minutos após a microinjeção de solução salina na SCPd ( $n = 7$ ); com 30 nmol de DLH microinjetado no CCA 10 minutos após a microinjeção de lidocaína a 2% na SCPd ( $n = 6$ ); com solução salina no CCA 10 minutos após a microinjeção de lidocaína a 2% na SCPd ( $n = 6$ ); solução salina no CCA 10 minutos após microinjeção de solução salina a 0,9 % ( $n = 4$ ) na SCPd. As barras verticais representam o erro padrão da média (EPM). LB (linha de base) representa o índice de vocalização no período controle. O \* foi considerado como  $p < 0,05$  quando comparado com os demais grupos.



**Figura 21** - Registro poligráfico da amplitude (mm) de vocalização de um animal representativo de cada grupo após as microinjeções no CCA, 10 minutos após as microinjeções na SCPd de cobaias: A – Salina (SCPd) + DLH (CCA); B – Lidocaína (SCPd) + DLH (CCA); C – Lidocaína (SCPd) + Salina (CCA); D – Salina (SCPd) + Salina (CCA). As barras horizontais indicam o período de aplicação do estímulo nocivo (3 s) nos diferentes intervalos de tempo (min). O controle (Cont) representa o registro de vocalização antes da microinjeção das drogas. O # indica a pós-descarga.



**Figura 22.** Representação esquemática de seções frontais do CCA e da SCPd de cobaias. Os círculos preenchidos (●) indicam os sítios das microinjeções efetuadas durante o teste algesimétrico de vocalização: I – Solução salina na SCPd + DLH no CCA; II – Lidocaína a 2 % na SCPd + DLH no CCA; III – Lidocaína a 2 % na SCPd + solução salina no CCA; IV – Solução salina na SCPd + solução salina no CCA. AP = plano ântero – posterior; CC = corpo caloso; V = ventrículo lateral. Os esquemas foram modificados a partir do atlas de Rössner (1965), para cobaias.

### **4.3 - EXPERIMENTO NEUROANATÔMICO**

#### **- Avaliação da existência de projeções neuroanatômicas do CCA para a SCPd.**

Nesse estudo foi utilizado o neurotraçador BDA, conjugado a Texas red, com o objetivo de identificar, em cobaias, a presença de projeções neurais que saem do CCA e se dirigem para a SCPd. A administração, no CCA (n = 4), de 0,2 µl de BDA conjugado ao Texas red (figura 23A e B) foi capaz de produzir marcações de axônios, dendritos e corpos neuronais na SCPd (figura 24). Foi observada, também nessa região, a marcação de botões terminais que sugerem a ocorrência de sinapses locais (figura 24). Vale salientar que foram encontradas marcações tanto no lado ipsilateral como no lado contralateral à microinjeção do neurotraçador no CCA. Além disso, as projeções foram muito mais discerníveis na porção dorsolateral do que na porção dorsomedial da estrutura avaliada.

As microinjeções do BDA no CCA permitiram também a identificação de neurônios e fibras positivas em outros substratos neurais não abordados no presente estudo. Assim, foram observados, bilateralmente, botões terminais, soma e axônios positivos para BDA, presentes, por exemplo, no colículo superior. A distribuição de fibras eferentes ao colículo superior foi identificada nas camadas intermediárias, principalmente estendendo-se em direção às camadas profundas dessa estrutura e para as colunas dorsolateral e lateral da SCP (figura 25).

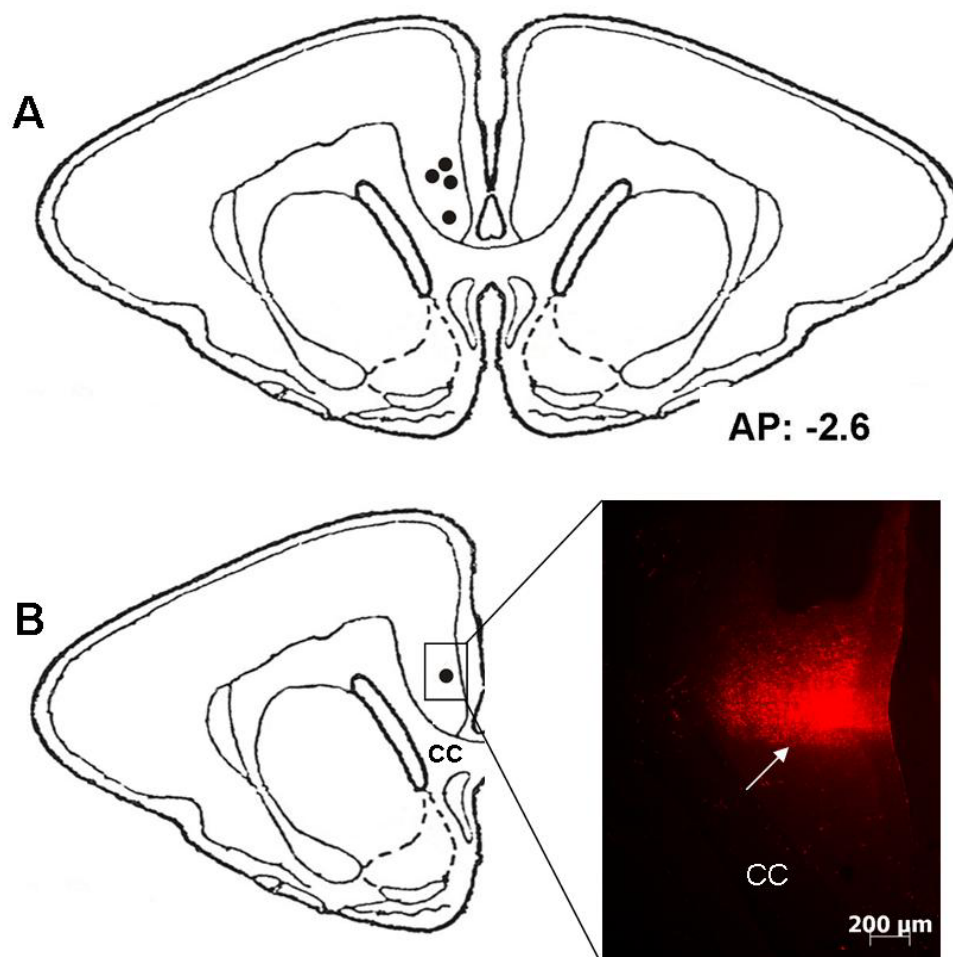


Figura 23: A - Representação esquemática de secção frontal do CCA de cobaias, contendo a ilustração dos sítios (●) das microinjeções de BDA conjugado ao Texas red. B – Fotomicrografia de secção coronal de cérebro de cobaia, representativa do sítio de uma microinjeção (seta branca) de BDA conjugado ao Texas red, localizada no CCA. CC = corpo caloso.



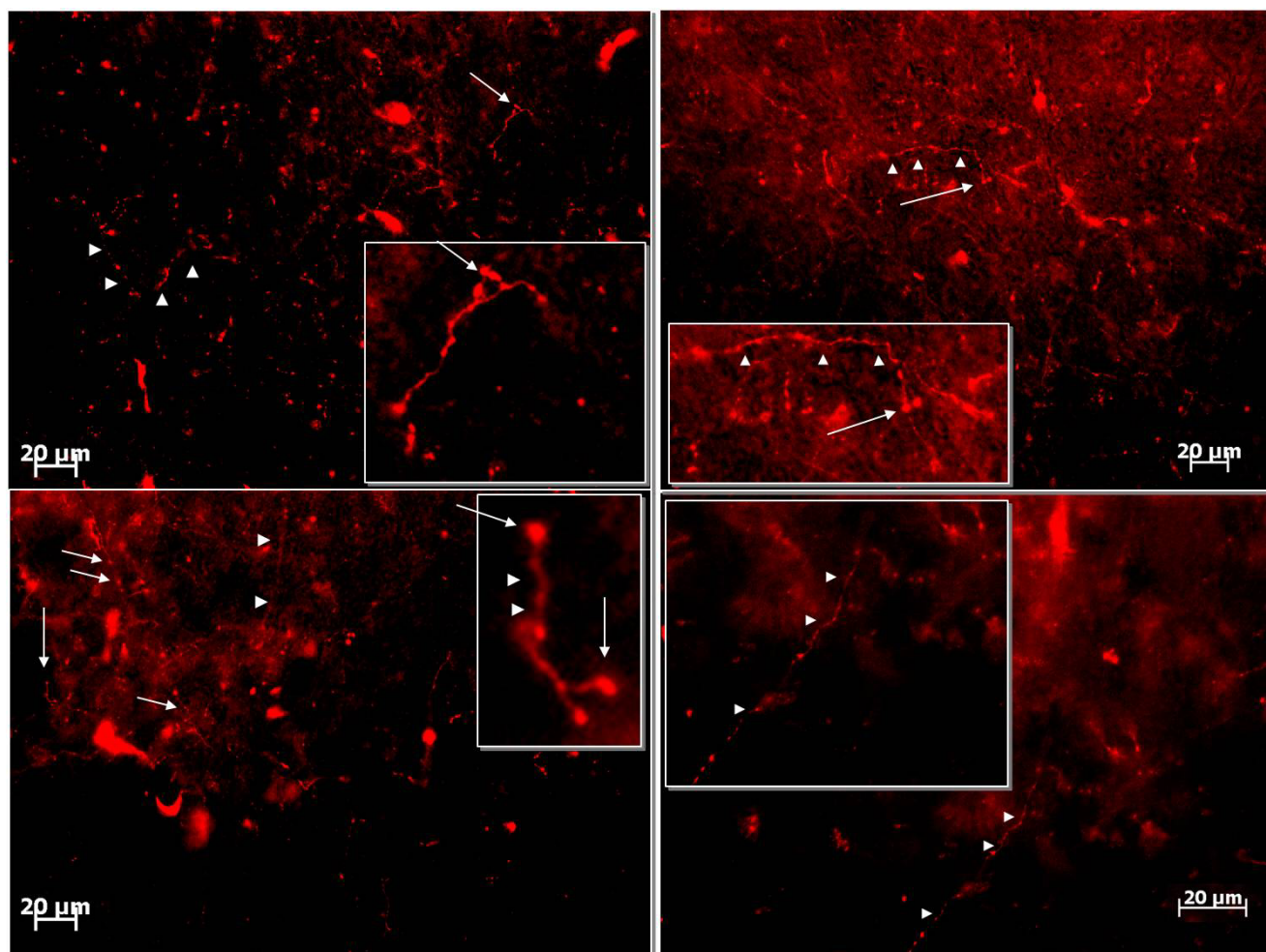


Figura 24: Fotomicrografias de secções coronais do mesencéfalo de cobaias após a microinjeção do neurotraçador BDA conjugado ao Texas red no CCA, mostrando a presença de fibras neuroniais (pontas das setas brancas) e botões terminais (setas branca) na SCPd.

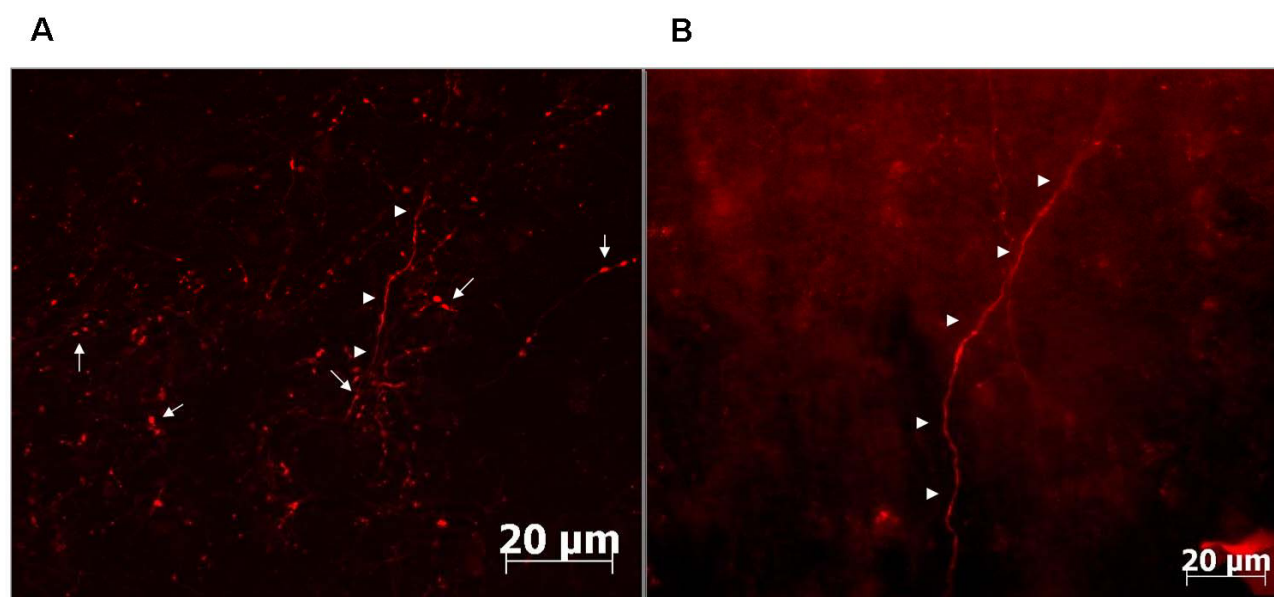


Figura 25: Fotomicrografia de secção coronal do mesencéfalo de cobaias após a microinjeção do neurotraçador BDA conjugado ao Texas red no CCA mostrando a presença de fibras neuronais (pontas das setas brancas) e varicosidades sugerindo botões terminais (setas branca), localizados nas camadas intermediárias (A) e profundas (B) do colículo superior.

## 5 - DISCUSSÃO

Os resultados do experimento I do presente trabalho demonstraram que a microinjeção de 30 nmol de DLH no CCA de cobaias foi capaz de reduzir a duração dos episódios de IT. Esse efeito foi bloqueado pelo antagonista de receptores NMDA, o MK-801 (3,6 nmol), administrado previamente no CCA ou na SCPd. Assim, os resultados apontaram para a possibilidade da existência de uma atividade glutamatérgica no CCA, capaz de modular a resposta de IT por meio dos receptores NMDA, presentes no CCA e na SCPd.

Considerando que a resposta de IT é uma reação defensiva eliciada em situações cujo medo é bastante evidente (Gallup, 1977), os resultados do presente trabalho reforçam a idéia de que o CCA se constitui em uma importante estrutura do sistema nervoso central, envolvida com a mediação de comportamentos relacionados ao contexto emocional aversivo (Devinsky et al., 1995; Johansen e Fields, 2004; Lei et al., 2004; Tang et al., 2005; Pietersen et al., 2006). Além disso, os presentes resultados também sugerem que os AAE e os seus receptores NMDA localizados no CCA são bastante relevantes para a mediação de repostas dessa natureza. De acordo com Bozkurt et al. (2005), a densidade dos receptores glutamatérgicos em todo o córtex cingulado, incluindo a porção anterior (CCA), é muito mais expressiva do que a grande maioria dos receptores avaliados na referida estrutura. Isso é um indicativo da provável importância dos receptores glutamatérgicos para a modulação de atividades processadas pelo córtex cingulado. Nesse sentido, os trabalhos de Tang et al. (2005) mostraram, em ratos, que a estimulação glutamatérgica do CCA provoca o aumento do estado de alerta associado ao medo contextual. Estudos conduzidos por Pietersen et al. (2006) mostraram que respostas de congelamento atribuídas ao medo condicionado em ratos produzem aumento da expressão da proteína *c-fos* no CCA. A administração sistêmica de antagonista dos receptores NMDA é capaz de bloquear tanto a expressão da proteína *c-fos* no

CCA, como a expressão comportamental da resposta de congelamento. A aplicação de antagonista de receptores NMDA diretamente no CCA também impede a expressão comportamental e da proteína *c-fos* no CCA, ocasionada pelo processamento do componente afetivo da dor em ratos (Lei et al., 2004). De acordo com Johansen e Fields (2004), a estimulação do CCA de ratos, utilizando o ácido homocisteico, é suficiente para gerar reações de esquiva associadas com contexto aversivo.

Além de demonstrar o envolvimento do CCA na mediação da resposta defensiva de IT, o presente estudo mostrou também que a atuação do CCA nessa resposta é no sentido de diminuir a duração da mesma. Tem sido descrito que o CCA se constitui em um substrato neural envolvido com a modulação de reações defensivas antecipatórias, que visam a esquiva do perigo em potencial (Johansen et al., 2001) ou a preparação do indivíduo para o encontro danoso quando a ameaça é inevitável (Nitschke et al., 2006; Ploghaus et al., 1999). Assim, diferentes estudos têm relacionado o CCA com a mediação de respostas dentro desses contextos, nos quais evidenciam a ansiedade (Shah e Treit, 2003; Hasler et al., 2007) e o medo condicionado, em humanos e em ratos, como os estados emocionais prevalentes (Tang et al., 2005; Johansen e Fields, 2004; Lei et al., 2004; Pietersen et al., 2006; Hasler et al., 2007). Há evidências que levam a crer que a contribuição do CCA na modulação dessas respostas ocorre por meio da regulação da expressão dos componentes autonômicos, endócrinos e comportamentais (Devisnky et al., 1995; Nitschke et al., 2006), que atuam para aumentar o estado de alerta, a reatividade e o foco de atenção do indivíduo para o estímulo aversivo (Graeff, 1994). Diferentemente, a resposta de IT é evocada em um contexto distinto, no qual o perigo deixa de ser ameaça em potencial para se tornar ameaça concreta. Mais especificamente, quando a presa se encontra em contato prolongado com o predador, em uma situação cujas possibilidades de fuga são muito pouco prováveis (Ratner, 1967; Klemm 1971). Assim, baseado nas evidências descritas acima e nos nossos resultados mostrando que

a estimulação do CCA diminui a resposta de IT, é possível sugerir que o aumento da atividade do CCA compromete a duração dos episódios de IT, provavelmente, porque contribui com a indução de respostas distintas, relacionadas com o afastamento do animal em relação ao estímulo aversivo.

Essa hipótese está de acordo com os trabalhos de Prestrude (1977), que avaliou minuciosamente as respostas de IT em filhotes de animais de diferentes espécies, e concluiu que o aumento do nível de complexidade do neocórtex produz efeitos inibitórios sobre as respostas de IT. Contrariamente, o bloqueio funcional do córtex cerebral de ratos, incluindo o CCA, produz facilitação da duração dos episódios de IT em cerca de 5 a 10 vezes (Tescheke et al., 1975). Em pacientes com estresse pós-traumático, as respostas emocionais exageradas parecem estar relacionadas com disfunção ou atividade reduzida do CCA (Hamner et al., 1999; Shin et al., 2001; Kitayama et al., 2006). Curiosamente, nesse tipo de paciente, reações emocionais atribuídas ao comportamento de IT são evocadas de maneira relativamente comum durante alguns tipos de violência (Heidt et al., 2005; Fiszman et al., 2008; Rocha-Rego et al., 2009).

Segundo Klemm (1971 e 1990), estruturas neocorticais atuam inibindo continuamente a resposta de IT, por meio da supressão das atividades de áreas do tronco encefálico, envolvidas com a elaboração e manutenção dessa resposta. Em situações de medo extremo, associado com contato físico prolongado da presa com o predador, esse sistema inibitório neocortical, se torna inibido pelo aumento da atividade de sítios límbicos e talâmicos, o que contribui para a indução e expressão da IT. Sendo o CCA uma estrutura neocortical, é possível pensar que provavelmente, durante a vigência da IT, o mesmo se encontra com suas atividades suprimidas, sem ação inibitória sobre as áreas localizadas no tronco encefálico, envolvidas diretamente com a manutenção da resposta de IT. Os resultados do nosso trabalho

dão suporte a essa proposição, já que a estimulação do CCA com a microinjeção de DLH (30 nmol) reduziu a duração dos episódios de IT.

Conforme já comentado anteriormente, a diminuição da resposta de IT, após a microinjeção de DLH no CCA, pode ter ocorrido também devido a ativação de circuitos relacionados com a modulação de respostas defensivas ativas. Os trabalhos conduzidos por Shipley et al. (1991), An et al. (1998) e Floyd et al. (2000) indicaram a existência de robustas eferências que partem do CCA em direção à porção dorsal da SCP do rato. Essa região tem sido considerada como uma via final comum das reações defensivas ativas, já que a sua estimulação elétrica e química provoca respostas de luta e fuga observadas em gatos e ratos (Carrive, 1993; Bandler e Shipley, 1994; Fanselow, 1991; Vianna et al., 2003). Além disso, tem sido descrito que estimulação da SCPd produz ativação de vias descendente que se dirigem para importantes áreas da formação reticular bulbar, que são consideradas como essenciais para a mediação das respostas autonômicas e somáticas presentes nos comportamentos defensivos ativos (Keay e Bandler, 2001). Assim, é plausível aventar a possibilidade de que algumas ações do CCA, na modulação de várias respostas defensivas, possam ser efetuadas pelo recrutamento de neurônios da SCPd. De acordo com Keay e Bandler em 2001, o CCA e a SCP dorsolateral fazem parte de um mesmo circuito que é ativado em determinadas situações aversivas.

Com relação à resposta comportamental de IT, essa premissa parece ser verdadeira. Os estudos neuroanatômicos do presente trabalho demonstraram conexões neuroniais entre o CCA e a SCPd de cobaias, após as marcações neurônicas na SCPd, provenientes da microinjeção do rastreador neuronal, BDA conjugado ao Texas red, no CCA. Tais dados neuroanatômicos corroboram os nossos resultados funcionais já descritos, nos quais a estimulação com DLH (30 nmol), tanto no CCA como na SCPd, produziu efeitos similares de redução dos episódios de IT (resultados do presente trabalho e de Ramos Coutinho et al.,

2008). A microinjeção prévia do antagonista de receptores NMDA na SCPd bloqueou esses efeitos. Estudos imuno-histoquímicos em ratos, realizados por Beitz e Williams (1991), mostraram que o córtex cingulado anterior se constitui em uma das principais fontes glutamatérgicas para a SCP, sendo capaz, portanto, de influenciar as várias respostas comportamentais mediadas por essa estrutura. Respostas de vocalização, por exemplo, eliciadas pela estimulação elétrica do CCA de cobaias, são também bloqueadas pela administração de antagonistas de receptores glutamatérgicos NMDA na SCP (Kyuhou e Gemba, 1999).

Embora as evidências apresentadas até o momento levem-nos a crer que a ativação da SCPd, ocasionada pela estimulação do CCA, ocorra mediante conexões diretas entre os dois substratos, não podemos descartar a possibilidade dessa ação também se fazer por vias indiretas. No presente trabalho, foi observada de forma bastante evidente a existência de projeções entre o CCA e o colículo superior. Existem descrições de que o colículo superior juntamente com a SCPd formam o teto mesencefálico, que compõe o sistema encefálico relacionado com a organização de respostas associadas a contextos aversivos (Brandão et al., 2003). Assim, de forma semelhante com o que ocorre com a SCPd, a estimulação elétrica e química das camadas profundas e intermediárias do colículo superior também evoca respostas defensivas, relacionadas com o aumento do estado de alerta e atenção (Bittencourt et al., 2005). Além disso, sabe-se que as projeções neurais entre o colículo superior e a SCPd de ratos são essenciais para a elaboração de várias respostas inseridas no contexto emocional-aversivo (Redgrave e Dean, 1991). Vale lembrar que o CCA também está intimamente envolvido na modulação de reações dessa natureza (Chua et al., 1999; Johansen et al., 2001; Nitshke et al., 2006; Pietersen et al., 2006; Mobbs et al., 2007). Dessa forma, pode-se pensar que o efeito produzido pela estimulação do CCA sobre a resposta de IT depende da

integridade dos neurônios da SCPd, que podem ser acionados diretamente e/ou indiretamente por meio de outros substratos neurais, incluindo os colículos superiores.

Quando ativada, a SCPd provavelmente contribui para a diminuição da resposta de IT por meio do recrutamento de estruturas mais caudais, localizadas em regiões bulbares, como o núcleo mágno da rafe, por exemplo. Sabe-se que a estimulação glutamatérgica da SCP de ratos é capaz de produzir liberação de AAE no núcleo magno da rafe (Beitz, 1990). Além disso, sabe-se da existência de robustas projeções, entre as duas estruturas, essenciais para os ajustes das respostas somáticas e autonômicas, presentes nos comportamentos defensivos (Keay e Bandler, 2001). Da Silva e Menescal-de-Oliveira (2006), utilizando um agonista colinérgico, mostraram que, da mesma forma que ocorre na SCPd (Monassi et al., 1997), a ativação do núcleo magno da rafe também é capaz de diminuir os episódios de IT.

Com relação às respostas nociceptivas, avaliadas no experimento II do presente trabalho, foi demonstrado que a microinjeção de DLH (30 nmol) no CCA de cobaias foi capaz de aumentar as respostas de vocalização evidente aos 2 minutos após o tratamento. Esse efeito foi bloqueado pela administração prévia do antagonista de receptores NMDA, o MK-801, nos mesmos sítios, ou pela prévia microinjeção de lidocaína a 2 % (0,2 µl) na SCPd. A administração de DLH (15 e 30 nmol) no CCA de cobaias não foi efetiva em produzir efeitos sobre as respostas nociceptivas avaliadas pelo teste de retirada da pata. Dessa forma, os presentes resultados argüem a favor da função do CCA em facilitar as respostas nociceptivas, por meio do aumento da expressão do componente afetivo-motivacional da dor. Dentro desse contexto, a integridade funcional dos receptores NMDA do CCA e das atividades dos neurônios da SCPd parecem ser essenciais.

O CCA tem sido considerado como um substrato neural essencial na modulação do componente afetivo-motivacional da dor. As evidências vêm de relatos de pacientes portadores de dores persistentes que, após a ablação cirúrgica do CCA, descreveram o alívio



da sensação desagradável sem influenciar a percepção dos componentes sensoriais-discriminativos (Foltz e White, 1962; Hurt e Ballantine, 1974). Segundo Rainville et al. (1997), o aumento induzido, pela sugestão hipnótica, da percepção do componente desagradável da dor produz elevação significativa da ativação do CCA. Curiosamente, esse efeito não é observado em outras estruturas límbicas e corticais, envolvidas com a modulação da nocicepção. Registros de atividades neuroniais no CCA de ratos, durante estimulações nociceptivas térmicas, apresentaram como características: o aumento duradouro da atividade neural, campos receptivos bilaterais sem preferência contralateral, respostas antecipadas ao estímulo nocivo e maior atividade durante a expressão do medo condicionado à dor do que durante a aplicação de um estímulo nocivo agudo. Esses achados constituem evidências eletrofisiológicas da importante participação do CCA na mediação do componente afetivo-motivacional da dor (Wang et al, 2003; Kuo et al, 2009). De fato, Johansen et al. (2001) demonstraram, também em ratos, que a lesão do CCA é capaz de comprometer a expressão das respostas de esquiva condicionadas à estimulação nociceptiva, sem interferir com a expressão das respostas relacionadas com o componente sensório-discriminativo da dor. Similarmente, como já mencionado, foi demonstrado, no presente trabalho, que a estimulação do CCA de cobaias foi capaz de produzir aumento da resposta de vocalização, sem modificar a intensidade da resposta nociceptiva de retirada da pata.

A resposta nociceptiva de retirada da pata é vista como uma resposta reflexa, cuja organização depende essencialmente da medula espinhal e das informações sensoriais oriundas do estímulo nocivo periférico. Conseqüentemente, tem sido considerada como uma expressão principalmente do componente sensório-discriminativo da dor (Pearson e Gordon, 2003; Kuo et al., 2009). A resposta de vocalização induzida pela aplicação de um estímulo nociceptivo agudo, por outro lado, é organizada por complexos circuitos supra-espinhais, envolvidos também com a modulação da dor (Carrive, 1993; Bandler and Shipley, 1994;

Borszcz, 1995b; Jürgens, 2009) e com a expressão de vários tipos de estados afetivos e motivacionais do indivíduo (Jurgens, 1979; Dujardin e Jurgens, 2006). Dessa forma, vários trabalhos têm mostrado evidências consistentes de que a resposta de vocalização associada à estimulação nociceptiva, constitui uma manifestação de dor relacionada principalmente com o componente afetivo-motivacional (Borszcz, 1995a e b; Borszcz et al., 1996; Borszcz e Leaton, 2003). A expressão da dor desagradável é ainda mais discernível na resposta de vocalização quando a mesma apresenta pós-descargas (Borszcz, 1995a), o que foi observado no presente trabalho (figura 18B). Sendo assim, o fato da microinjeção de DLH no CCA ter modificado a resposta nociceptiva de vocalização, mas não a de retirada da pata, permite-nos ratificar a hipótese, mencionada anteriormente, de que o CCA é um substrato neural envolvido com a modulação do componente afetivo-motivacional da dor.

É importante ressaltar, no entanto, que a maior participação do CCA na modulação da dor emocional não possibilita a afirmar que o CCA não apresenta alguma relação também com o componente sensorial-discriminativo. Alguns trabalhos que mostraram a maior contribuição do CCA na modulação da dimensão afetiva da dor, mostraram também, em humanos e ratos, que essa estrutura é ativada com menos intensidade durante estimulação nociceptiva aguda (Rainville et al., 1997; Kuo et al., 2009). Além disso, já foi demonstrado que a abordagem por meio de estimulação elétrica e glutamatérgica de áreas do CCA pode influenciar algumas respostas nociceptivas reflexas (Calejesan et al., 2000). A existência de algum envolvimento do CCA com o processamento das informações sensoriais, referentes à estimulação nociva, faz sentido se pensarmos que esses elementos são essenciais para a determinação da dimensão afetiva da dor, que é a contribuição principal do CCA na nocicepção (Price, 2000).

Ainda no que diz respeito à resposta nociceptiva de vocalização observada nesse trabalho, vale lembrar que a mesma foi induzida pela aplicação de um estímulo nocivo agudo,

sem treinamentos prévios, impossibilitando os animais de associarem estímulos condicionados a estímulos não condicionados. Dessa forma, ao contrário da maioria dos trabalhos que utilizaram o modelo de condicionamento Pavloviano para demonstrar a relação do CCA com a expressão do componente afetivo-motivacional da dor (Johansen et al., 2001; Johansen and Fields, 2004; Lei et al., 2004; Kuo et al., 2009), o presente estudo demonstrou essa relação por meio de uma resposta nociceptiva inata, que não necessitou de aprendizados prévios.

No que concerne aos mecanismos envolvidos, observou-se que o aumento da resposta nociceptiva de vocalização, após a estimulação glutamatérgica no CCA, foi bloqueada pelo antagonista de receptores NMDA, o MK-801. Esse dado constitui um indicativo de que a ativação dos receptores NMDA presentes no CCA são importantes para a facilitação da expressão do componente desagradável da dor. Como já descrito anteriormente, a densidade de receptores glutamatérgicos em todo o córtex cingulado é bastante significativa, denotando, assim, a provável importância desses receptores e dos aminoácidos excitatórios na modulação das diversas atividades processadas pelo córtex cingulado (Bozkurt et al., 2005). Registros intracelulares de potenciais pós-sinápticos produzidos pela estimulação elétrica de neurônios das camadas V e VI, do CCA de cobaias, mostraram potenciais excitatórios pós-sinápticos com componentes tardios, que foram bloqueados com uso de antagonista de receptores NMDA (Higashi et al., 1991). Estudos comportamentais, associados com técnicas de imunomarcção e registros eletrofisiológicos, demonstraram que a exposição de ratos a experiências negativas aversivas, relacionadas com a dor, aumenta a expressão dos receptores NMDA no CCA (Li et al., 2009). Por sua vez, o aumento da expressão da atividade dos receptores NMDA no CCA também eleva as respostas de dores persistentes, associadas aos contextos emocionais negativos, sem afetar a intensidade responsiva da estimulação nociceptiva aguda (Wei et al., 2001). Os receptores NMDA do CCA de ratos também

parecem ser críticos na modulação de respostas de esquiva condicionadas à estimulação nociceptiva e de dor visceral em indivíduos previamente sensibilizados (Lei et al., 2004; Cao et al., 2008).

A provável função da ativação dos receptores glutamatérgicos do CCA, na facilitação da expressão das respostas nociceptivas, deve ser especificamente relacionada com o aumento da percepção do componente desagradável da dor em si. Esse aumento, por sua vez, deve ser importante para acionar os mecanismos envolvidos diretamente com a elaboração das respostas motoras e viscerais, condizentes com o estado aversivo do indivíduo, após a estimulação nociceptiva. Essa hipótese, associada com a evidência de que o CCA está conectado com várias estruturas diretamente implicadas com a elaboração de respostas afetivas-motivacionais (Floyd et al., 2000 e 2001), está de acordo com a função do CCA em contribuir para a facilitação de respostas que visam livrar o indivíduo das experiências danosas (Rainville et al., 1997; Hasler et al., 2007; Mobss et al., 2007; Maren, 2007). O aumento da percepção de uma estimulação nociva, a partir da ativação do CCA, pode ser expresso pela intensificação dos componentes autonômicos, endócrinos e comportamentais (Critchley et al., 2000; Devisnky et al., 1995; Nitschke et al., 2006), que contribuem para melhorar o estado de alerta, a reatividade e o foco de atenção do indivíduo para o estímulo danoso (Graeff, 1994; Han et al., 2003; Nitschke et al., 2006; McRae et al., 2008). Assim, é provável que a ativação do CCA seja capaz de produzir diretamente aumento da percepção aversiva da dor e, dessa forma, elevar a expressão das respostas nociceptivas, por meio do recrutamento de estruturas mais caudais, envolvidas diretamente com a elaboração de respostas motoras e viscerais, relacionadas com contextos emocionais intensos (Rainville et al., 1997; Mobss et al., 2007; Maren, 2007).

Os resultados do presente trabalho alicerçaram essa hipótese, já que demonstraram que a inativação funcional da SCPd, pela microinjeção prévia de lidocaína a 2 %, foi capaz de

bloquear o efeito do DLH (30 nmol) sobre a resposta nociceptiva de vocalização. Assim também, como já descrito, os nossos estudos neuroanatômicos demonstraram a existência de conexões entre o CCA e a SCPd de cobaias. Além disso, a SCPd é uma estrutura mesencefálica intimamente implicada com a iniciação de respostas relacionadas com modulação da dor e em contextos aversivos. A sua estimulação elétrica ou química normalmente elicia respostas motoras e viscerais, relacionadas às estratégias ativas do comportamento defensivo, que visam livrar o animal de situações danosas (Carrive, 1993; Bandler e Shipley, 1994, Brandão et al., 2003). Assim, os nossos resultados apóiam a idéia de que o CCA provavelmente modula a expressão das respostas afetivas motivacionais de dor, por meio do controle das atividades da SCPd. Os mecanismos envolvidos nessa modulação, entretanto, são objetos de maiores discussões. Sabe-se que as projeções descendentes conspícuas, que partem da SCPd e se dirigem para núcleos bulbares, são parte essencial do importante sistema de modulação endógena da dor (Basbaum e Fields, 1984; Carrive, 1993; Bandler e Shipley, 1994). Sabe-se também que a estimulação da SCPd é capaz de ativar esse sistema e produzir analgesia bastante evidente (Basbaum e Fields, 1984; Carrive, 1993; Bandler e Shipley, 1994). Dessa forma, é possível que a estimulação do CCA provavelmente produza facilitação da expressão do componente desagradável da dor, por meio da inibição da SCPd e do sistema de modulação endógena da dor que parte dessa estrutura.

Um outro mecanismo possível de ser especulado diz respeito ao tipo de neurotransmissor liberado pelo sistema de modulação endógena da dor, após a ativação do CCA, ou, ainda, a população de neurônios bulbares atingida por esse sistema. Estudos recentes do nosso laboratório demonstraram que a microinjeção de agonista GABAérgico no núcleo magno da rafe, uma estrutura alvo do sistema de modulação endógena da dor, também é capaz de provocar aumento da resposta de vocalização induzida por estimulação nociceptiva aguda em cobaias (Da Silva et al., 2010). Segundo Calejesan et al. (2000), existem sítios

localizados em regiões do bulbo rostroventral que são essenciais para a facilitação da transmissão nociceptiva espinhal, eliciada pela estimulação do CCA. De fato, Zang et al. (2005) demonstraram que a lesão do núcleo reticular dorsal do bulbo é capaz de bloquear o aumento da resposta nociceptiva, induzida pela ativação elétrica e glutamatérgica do CCA de ratos.

Independentemente do mecanismo exato, é provável que o aumento da percepção do componente afetivo-motivacional da dor deva, em alguns momentos, apresentar um importante valor adaptativo. Durante a vigência da resposta de IT, por exemplo, o aumento do estado de percepção, em relação aos estímulos desagradáveis, poderia contribuir para a interrupção da acinesia e, conseqüentemente, para a iniciação de respostas que visariam afastar o animal da ameaça. Na hipótese dessa proposição ser verdadeira, o CCA poderia ser bastante relevante no controle dessas atividades. A sua estimulação, durante a vigência da IT, possivelmente geraria elevação do estado de aversão e, dessa forma, o acionamento dos mecanismos relacionados diretamente com respostas de escape. Os nossos resultados fornecem respaldo a essa idéia, já que mostraram que a ativação do CCA de cobaias é capaz de produzir diminuição dos episódios de IT e aumento da expressão do componente afetivo-motivacional de dor.

Em resumo, os resultados do experimento I do presente trabalho mostraram que a microinjeção de DLH no CCA de cobaias foi capaz de diminuir a duração dos episódios de IT. O efeito foi bloqueado pelo antagonista de receptores NMDA, o MK-801 (3,6 nmol), administrado previamente no CCA ou na SCPd. Os resultados do experimento II demonstraram que a microinjeção de DLH (30 nmol) no CCA de cobaias foi capaz de aumentar a resposta de vocalização induzida pela estimulação nociva periférica aguda nos 2 minutos após o tratamento. Esse efeito foi bloqueado pela administração prévia do antagonista de receptores NMDA, o MK-801, nos mesmos sítios, ou pela prévia microinjeção de

lidocaína a 2 % (0,2 µl) na SCPd. A administração de DLH (15 e 30 nmol) no CCA de cobaias não foi efetiva em produzir efeitos sobre as respostas nociceptivas avaliadas pelo teste de retirada da pata. Por fim, os experimentos neuroanatômicos demonstraram conexões neurais entre o CCA e a SCPd de cobaias. Dessa forma, os resultados apontaram para a possibilidade da existência de uma atividade glutamatérgica no CCA, capaz de modular a resposta de IT e o componente afetivo-motivacional da dor, por meio dos receptores NMDA existentes nessa estrutura. Essa atividade do CCA parece depender também da integridade funcional da SCPd. Assim, os resultados do presente estudo reforçam a idéia de que o CCA e a SCPd fazem parte de uma mesma rede neural, importante para a mediação de respostas defensivas que visam o afastamento ou a esquiva do animal em relação aos estímulos aversivos.

## 6 - CONCLUSÕES

A microinjeção do ácido DL-homocisteico (DLH) no córtex cingulado anterior promoveu pró-nocicepção e diminuição da duração da imobilidade tônica. Esses efeitos foram bloqueados pela aplicação prévia do antagonista de receptores NMDA, o MK-801, indicando a participação dos receptores NMDA do córtex cingulado anterior na modulação da nocicepção e da imobilidade tônica em cobaias.

A microinjeção de DLH no córtex cingulado anterior não produziu alteração da resposta nociceptiva de retirada da pata, sugerindo a participação dessa estrutura principalmente na modulação do componente afetivo-motivacional da dor em cobaias.

O efeito da microinjeção glutamatérgica no CCA sobre a resposta de imobilidade tônica também foi bloqueado pela administração prévia do antagonista de receptores NMDA, o MK-801, na região dorsal da substância cinzenta periaquedutal. Isso mostra a dependência funcional dos receptores NMDA da substância cinzenta periaquedutal dorsal na modulação da imobilidade tônica efetuada a partir da estimulação glutamatérgica do córtex cingulado anterior de cobaias.

O aumento da resposta de vocalização induzida pela aplicação de um estímulo nocivo periférico após a microinjeção de DLH no córtex cingulado anterior foi bloqueado também pela aplicação prévia de lidocaína na região dorsal da substância cinzenta periaquedutal.

A microinjeção de um neurotraçador no córtex cingulado anterior evidenciou conexões diretas dessa estrutura para a substância cinzenta periaquedutal dorsal. Esse achado neuroanatômico reforça as evidências funcionais do presente estudo onde a participação da substância cinzenta periaquedutal dorsal foi importante para a modulação das respostas de nocicepção e de imobilidade tônica pela ativação do córtex cingulado anterior.



## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida A, Cobos A, Tavares I, Lima D. Brain afferents to the medullary dorsal reticular nucleus: a retrograde and anterograde tracing study in the rat. *Eur J Neurosci.* 2002; 16: 81-95.

An X, Bandler R, Ongur D, Price JL. Prefrontal cortical projections to longitudinal columns in the midbrain periaqueductal gray in macaque monkeys. *J Comp Neurol.* 1998; 401: 455-479.

Bandler, R., Depaulis, A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and the rat. In: Depaulis, A., Bandler, R. (eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization.* Plenum Press, New York, 1991; 175-198.

Bandler R, Shipley MT. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci.* 1994; 17: 379-389.

Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci.* 1984; 7: 309-338.

Behbehani MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Progress in neurobiology* 1995; 46: 575-605.

Beitz AJ, Williams FG. Localization of putative amino acid transmitters in the PAG and their relationship to the PAG-Raphe magnus pathway. In: Depaulis, A., Bandler, R. (eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization.* Plenum Press, New York, 1991; 305-327.

Bissiere S, McAllister KH, Olpe HR, Cryan JF. The rostral anterior cingulate cortex modulates depression but not anxiety-related behaviour in the rat. *Behav Brain Res.* 2006; 175: 195-199.

Bittencourt AS, Nakamura-Palacios EM, Mauad H, Tufik S, Schenberg LC. Organization of electrically and chemically evoked defensive behaviors within the deeper collicular layers as compared to the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience* 2005; 133: 873-892.

Blanchard RJ, Kelley MJ, Blanchard DC. Defensive reactions and exploratory behavior in rats. *J Comp. Physiol. Psychology* 1974; 87: 1129-33.

Blomqvist A., Craig A.D. Organization of spinal and trigeminal input to the PAG. In: Depaulis, A., Bandler, R. (eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. Plenum Press, New York, 1991; 345-363.

Borszcz GS. Increases in vocalization and motor reflex thresholds are influenced by the site of morphine microinjection: comparisons following administration into the periaqueductal gray, ventral medulla, and spinal subarachnoid space. *Behavioral Neuroscience* 1995a; 109: 502-522.

Borszcz GS. Pavlovian Conditional Vocalizations of the Rat: A Model System for Analyzing the Fear of Pain. *Behavioral Neuroscience* 1995b; 109: 648-662

Borszcz GS, Johnson CP, Thorp MV. The Differential Contribution of Spinopetal Projections to Increases in Vocalization and Motor Reflex Thresholds Generated by the Microinjection of Morphine Into the Periaqueductal Gray. *Behavioral Neuroscience* 1996; 110: 368-388

Borszcza GS, Leaton RN. The effect of amygdala lesions on conditional and unconditional vocalizations in rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 2003; 79: 212–225

Bozkurt A, Zilles K, Schleicher A, Kamper L, Arigita ES, Uylings HB, Köter R. Distributions of transmitter receptors in the macaque cingulate cortex. *Neuroimage* 2005; 25: 219-229.

Brandao ML, Anseloni VZ, Pandossio JE, De Araujo JE, Castilho VM. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci Biobehav Rev.* 1999; 23: 863-875.

Brandao ML, Troncoso AC, de Souza Silva MA, Huston JP. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. *Eur J Pharmacol.* 2003; 463: 225-233.

Bryant RA, Felmingham K, Whitford TJ, Kemp A, Hughes G, Peduto A, Williams LM. Rostral anterior cingulate volume predicts treatment response to cognitive-behavioural therapy for posttraumatic stress disorder. *J Psychiatry Neurosci.* 2008; 33: 142-146.

Buchanan SL, Thompson RH, Max BL, Powell DA. Efferent connections of the medial prefrontal cortex in the rabbit. *Exp Brain Res.* 1994; 100: 469-83.

Calejesan AA, Kim SJ, Zhuo M. Descending facilitatory modulation of a behavioral nociceptive response by stimulation in the adult rat anterior cingulate cortex. *Eur. J. Pain* 2000; 4: 83-96.

Canteras NS, Ribeiro-Barbosa ER, Comoli E. Tracing from the dorsal premammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2001; 25: 661-668.

Canteras NS, Swanson LW. The dorsal premammillary nucleus: An unusual component of the mammillary body. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 10089-10093.

Cao Z, Wu X, Chen S, Fan J, Zhang R, Owyang C, Li Y. Anterior cingulate cortex modulates visceral pain as measured by visceromotor responses in viscerally hypersensitive rats. *Gastroenterology* 2008; 134: 535-543.

Carrive P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav. Brain Res.* 1993; 58: 27-47.

Carrive P, Bandler R, Dampney RA. Somatic and autonomic integration in the midbrain of the anaesthetized decerebrate cat: a distinctive pattern evoked by excitation of neurons in the subtentorial portion of the midbrain periaqueductal grey. *Brain Res.* 1989; 483: 251-258.

Castellan-Baldan L, Da Costa Kawasaki M, Ribeiro SJ, Calvo F, Corrêa VM, Coimbra NC. Topographic and functional neuroanatomical study of GABAergic disinhibitory striatum-nigral inputs and inhibitory nigrocollicular pathways: neural hodology recruiting the substantia nigra, pars reticulata, for the modulation of the neural activity in the inferior colliculus involved with panic-like emotions. *J. Chem. Neuroanat.* 2006; 32: 1-27.

Chua P, Krams M, Toni I, Passingham R, Dolan R. A functional anatomy of anticipatory anxiety. *Neuroimage* 1999; 9: 563-571.

Coimbra NC, de OR, Freitas RL, Ribeiro SJ, Borelli KG, Pacagnella RC, Moreira JE, Silva LA, Melo LL, Lunardi LO, Brandão ML. 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.* 2006; 197: 93-112.

Critchley HD, Corfield DR, Chandler MP, Mathias CJ, Dolan RJ. Cerebral correlates of autonomic cardiovascular arousal: a functional neuroimaging investigation in humans. *J. Physiol* 2000; 523: 259-270.

Da Silva LF, Menescal-de-Oliveira L. Cholinergic modulation of tonic immobility and nociception in the NRM of guinea pig. *Physiol Behav.* 2006; 87: 821-827.

Da Silva LF, Coutinho MR, Menescal-de-Oliveira L. Opioidergic and GABAergic mechanisms in the rostral ventromedial medulla modulate the nociceptive response of vocalization in guinea pigs. *Brain Res Bull.* 2010; 82: 177-83.

Darwin C. A origem das espécies. Ediouro, Rio de Janeiro, (reeditado), 2004.

Devinsky O, Morrell MJ, Vogt BA. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain* 1995; 118: 279-306.

Donahue RR, Lagraize SC, Fuchs PN. Electrolytic lesion of the anterior cingulate cortex decreases inflammatory, but not neuropathic nociceptive behavior in rats. *Brain Res.* 2001; 897: 131-138.

Dujardin E, Jurgens U. Call type-specific differences in vocalization-related afferents to the periaqueductal gray of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Behav Brain Res.* 2006; 168: 23-36.

Fanselow MS. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: Depaulis A, Bandler R, eds. *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. New York: Plenum Press; 1991: 151- 174.

Fanselow MS, Sigmundi RA. Species-specific danger signals, endogenous opioid analgesia, and defensive behavior. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 1986; 12: 301-309.

Fizman A, Mendlowicz MV, Marques-Portella C, Volchan E, Coutinho ES, Souza WF, Rocha V, Lima AA, Salomao FP, Mari JJ, Figueira I. Peritraumatic tonic immobility predicts a poor response to pharmacological treatment in victims of urban violence with PTSD. *J.Affect.Disord.* 2008; 107: 193-197.

Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R. Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *J Comp Neurol.* 2000; 422: 556-578.

Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R. Orbitomedial prefrontal cortical projections to hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol.* 2001; 432: 307-28.

Foltz EL, White LEJ. Pain relief by frontal cingulotomy. *J Neurosurg.* 1962; 19: 89-100.

Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 2004; 304: 881-883.

Gallup GG, Jr. Tonic Immobility: The role of fear and predation. *The psychological record* 1977; 1: 41-61.

Gallup GG, Jr., Nash RF, Donegan NH, McClure MK. The immobility response: A predator-induced reaction in chickens. *The psychological record* 1971; 21: 513-519.

Ghashghaei HT, Hilgetag CC, Barbas H. Sequence of information processing for emotions based on the anatomic dialogue between prefrontal cortex and amygdala. *Neuroimage* 2007; 34:905-923.

Graeff FG. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1994; 27: 811-829.

Hamner MB, Lorberbaum JP, George MS. Potential role of the anterior cingulate cortex in PTSD: review and hypothesis. *Depress.Anxiety.* 1999; 9: 1-14.

Han CJ, O'Tuathaigh CM, Van TL, Quinn JJ, Fanselow MS, Mongeau R, Koch C, Anderson DJ. Trace but not delay fear conditioning requires attention and the anterior cingulate cortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003; 100: 13087-13092.

Harris JA. Descending antinociceptive mechanisms in the brainstem: their role in the animal's defensive system. *J Physiol Paris* 1996; 90: 15-25.

Hasler G, Fromm S, Alvarez RP, Luckenbaugh DA, Drevets WC, Grillon C. Cerebral blood flow in immediate and sustained anxiety. *J Neurosci* 2007; 27: 6313-6319.

Heidt JM, Marx BP, Forsyth JP. Tonic immobility and childhood sexual abuse: a preliminary report evaluating the sequela of rape-induced paralysis. *Behav.Res.Ther.* 2005; 43: 1157-1171.

Higashi H, Tanaka E, Nishi S. Synaptic responses of guinea pig cingulate cortical neurons in vitro. *Neurophysiol.* 1991; 4: 822-833.

Hornak J, Bramham J, Rolls ET, Morris RG, O'Doherty J, Bullock PR, et al. Changes in emotion after circumscribed surgical lesions of the orbitofrontal and cingulate cortices. *Brain* 2003; 126: 1691-1712.

Hurt RW, Ballantine HT. Stereotactic Anterior cingulate lesions for persistent pain: a report on 68 cases. *Clin Neurosurg* 1974; 21: 334-351.

Johansen JP, Fields HL. Glutamatergic activation of anterior cingulate cortex produces an aversive teaching signal. *Nat Neurosci.* 2004; 7: 398-403.

Johansen JP, Fields HL, Manning BH. The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 8077-8082.

Jurgens U. Vocalization as an emotional indicator. A neuroethological study in the squirrel monkey. *Behaviour* 1979; 69: 88-117.

Jurgens U. The Neural Control of Vocalization in Mammals: A Review. *Journal of voice* 2009; 23: 1-10.

Key KA, Bandler R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2001; 25: 669-678.

Key KA, Bandler R. Distinct central representations of inescapable and escapable pain: observations and speculation. *Exp. Physiol.* 2002; 87: 275-276.

Key KA, Clement CI, Depaulis A, Bandler R. Different representations of inescapable noxious stimuli in the periaqueductal gray and upper cervical spinal cord of freely moving rats. *Neurosci. Lett.* 2001; 313: 17-20.

Kitayama N, Quinn S, Bremner JD. Smaller volume of anterior cingulate cortex in abuse-related posttraumatic stress disorder. *J.Affect.Disord.* 2006; 90: 171-174.

Klemm WR. Neurophysiologic studies of the immobility reflex ("animal hypnosis"). *Neurosci. Res.* 1971; 4: 165-212.

Klemm WR, 1990. Behavioral inhibition. In: *Brainstem Mechanisms of behavior*. New York: Wiley-Interscience. 489-533.

Kuo CC, Chiou R, Liang KC, Yen CT. Differential involvement of anterior cingulate and primary sensorimotor cortices in sensory and affective functions of pain. *J. Neurophysiol.* 2009; 101: 1201-1210.

Kyuhou S, Gemba H. Injection of orphanin FQ/nociceptin into the periaqueductal gray suppresses the forebrain-elicited vocalization in the guinea pig. *Neurosci Lett.* 1999; 260: 113-116.

LaGraize SC, Labuda CJ, Rutledge MA, Jackson RL, Fuchs PN. Differential effect of anterior cingulate cortex lesion on mechanical hypersensitivity and escape/avoidance behavior in animal model of neuropathic pain. *Exp Neurol.* 2004; 188: 139-148.

Lee DE, Kim SJ, Zhuo M. Comparison of behavioral responses to noxious cold and heat in mice. *Brain Res.* 1999; 845: 117-121.

Lei LG, Sun S, Gao YJ, Zhao ZQ, Zhang YQ. NMDA receptors in the anterior cingulate cortex mediate pain-related aversion. *Exp Neurol.* 2004; 189: 413-421.

Leite-Panissi CR, Ferrarese AA, Terzian ALB, Menescal-de-Oliveira L. Serotonergic activation of the basolateral amygdala and modulation of tonic immobility in guinea pig. *Brain Res. Bull.* 2006; 69: 356-364.

Leite-Panissi CR, Rodrigues CL, Brentegani MR, Menescal-de-Oliveira L. Endogenous opiate analgesia induced by tonic immobility in guinea pigs. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2001; 34: 245-250.

Lester LS, Fanselow MS. Exposure to a cat produces opioid analgesia in rats. *Behav. Neurosci.* 1985; 99: 756-759.

Li TT, Ren WH, Xiao X, Nan J, Cheng LZ, Zhang XH, Zhao ZQ, Zhang YQ. NMDA NR2A and NR2B receptors in the rostral anterior cingulate cortex contribute to pain-related aversion in male rats. *Pain* 2009; 146:183-93.

Lumb BM. Inescapable and escapable pain is represented in distinct hypothalamic-midbrain circuits: specific roles for A- $\delta$  and C-nociceptors. *Exp. Physiol.* 2002; 87: 281-286.

Mantyh P. Forebrain projections to the periaqueductal gray in the monkey, with observations in the cat and rat. *J. Comp.Neurol.* 1982; 206: 146-158.

McRae K, Reiman EM, Fort CL, Chen K, Lane RD. Association between trait emotional awareness and dorsal anterior cingulate activity during emotion is arousal-dependent. *Neuroimage* 2008; 41, 648-655.

Maren S. The threatened brain. *Science* 2007; 317: 1043-1044.

Menescal de OL, Lico MC. Pain modulation in the adrenergically stimulated area postrema in the alert guinea pig. *Physiol. Behav.* 1977; 19: 359-364.

Menescal de OL, Lico MC. Pain reaction after topical NA and lesion of the obex region in the alert guinea pig. *Physiol. Behav.* 1982; 28: 413-416.

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

Misslin R. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. *Neurophysiologie clinique* 2003; 33: 55-66.

Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ, Frith CD. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science* 2007; 317: 1079-1083.

Monassi CR, Hoffmann A, Menescal-de-Oliveira L. Involvement of the cholinergic system and periaqueductal gray matter in the modulation of tonic immobility in the guinea pig. *Physiol. Behav.* 1997; 62: 53-59.

Nichols DS, Thorn BE, Berntson GG. Opiate and serotonergic mechanisms of stimulation-produced analgesia within the periaqueductal gray. *Brain Res. Bull.* 1989; 22: 717-724.

Nitschke JB, Sarinopoulos I, Mackiewicz KL, Schaefer HS, Davidson RJ. Functional neuroanatomy of aversion and its anticipation. *Neuroimage* 2006; 29: 106-116.

Pastoriza LN, Morrow TJ, Casey KL. Medial frontal cortex lesions selectively attenuate the hot plate response: possible nocifensive apraxia in the rat. *Pain* 1996; 64: 11-17.

Pearson K, Gordon J. Os reflexos espinhais. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. (eds.), *Princípios de Neurociência*. Manole, Barueri, 2003; 713-736.

Petrovic P, Kalso E, Petersson KM, Ingvar M. Placebo and opioid analgesia-- imaging a shared neuronal network. *Science* 2002; 295: 1737-1740.

Pietersen CY, Bosker FJ, Postema F, Fokkema DS, Korf J, den Boer JA. Ketamine administration disturbs behavioural and distributed neural correlates of fear conditioning in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006; 30: 1209-1218.

Ploghaus A, Tracey I, Gati JS, Clare S, Menon RS, Matthews PM, Rawlins JNP. Dissociating Pain from its anticipation in the human brain. *Science* 1999; 284: 1979-1981.

Prestrude AM. Some Phylogenetic comparisons of tonic immobility with special reference to habituation and fear. *Psychological record* 1977; 1: 21-39.



Price DD. Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. *Science* 2000; 288: 1769-1772.

Rainville P, Duncan GH, Price DD, Carrier B, Bushnell C. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science* 1997; 277: 968-971.

Ramos Coutinho M, Da Silva LFS, Menescal-de-Oliveira L. Modulation of tonic immobility in guinea pig PAG by homocysteic acid, a glutamate agonist. *Physiol Behav* 2008; 94:468-473.

Ratner CS. Comparative aspects of hypnosis. *Handbook of clinical and experimental hypnosis* Macmillan 1967; 550-587.

Redgrave P, Dean P. Does the PAG learn about emergencies from the superior colliculus ? In: Depaulis, A., Bandler, R. (eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. Plenum Press, New York, 1991; 199-209.

Rocha-Rego V, Fiszman A, Portugal LC, Garcia Pereira M, De Oliveira L, Mendlowicz MV, Marques-Portella C, Berger W, Freire Coutinho ES, Mari JJ, Figueira I, Volchan E. Is tonic immobility the core sign among conventional peritraumatic signs and symptoms listed for PTSD ? *J Affect Disord*. 2009; 115: 269-73.

Rodgers RJ, Hendrie CA. Social conflict activates status-dependent endogenous analgesic or hyperalgesic mechanisms in male mice: effects of naloxone on nociception and behaviour. *Physiol. Behav.* 1983; 30: 775-780.

Rodgers RJ, Hendrie CA, Waters AJ. Naloxone partially antagonizes post-encounter analgesia and enhances defensive responding in male rats exposed to attack from lactating conspecifics. *Physiol. Behav.* 1983; 30: 781-786.

Rogers RJ, Randall JJ. Defensive analgesia in rats and mice. *Psychol. Rec.* 1987; 37: 335-347.

Rössner W. *Stereotaktischen hirntees vom meerchweinchen*. Palla Velag, Munich. 1965.

Rudebeck PH, Buckley MJ, Walton ME, Rushworth MF. A role for the macaque anterior cingulate gyrus in social valuation. *Science* 2006; 313: 1310-1312.

Sánchez C. Stress-induced vocalization in adult animals. A valid model of anxiety? *European Journal of Pharmacology* 2003; 463: 133– 143.

Sargeant AB, Eberhardt LE. Death feigning by ducks in response to predation by red foxes (*Vulpes fulva*). *American Midland Naturalist* 1975; 94: 108-119.

Shah AA, Treit D. Excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex attenuate fear responses in the elevated-plus maze, social interaction and shock probe burying tests. *Brain Res.* 2003; 969: 183-194.

Shin LM, Whalen PJ, Pitman RK, Bush G, Macklin ML, Lasko NB, Orr SP, McInerney SC, Rauch SL. An fMRI study of anterior cingulate function in posttraumatic stress disorder. *Biol.Psychiatry* 2001; 50: 932-942.

Shiple MT, Ennis M, Rizvi TA, Behbehani MM. Topographical specificity of forebrain periaqueductal gray: evidence for discrete longitudinally organized input columns. In: Depaulis, A., Bandler, R. (eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. Plenum Press, New York, 1991; 417-448.

Takenouchi K, Nishijo H, Uwano T, Tamura R, Takigawa M, Ono T. Emotional and behavioral correlates of the anterior cingulate cortex during associative learning in rats. *Neuroscience* 1999; 93: 1271-1287.

Tang J, Ko S, Ding HK, Qiu CS, Calejesan AA, Zhuo M. Pavlovian fear memory induced by activation in the anterior cingulate cortex. *Mol Pain* 2005; 1: 6.

Teschke EJ, Maser JD, Gallup GG, Jr. Cortical involvement in tonic immobility (“animal hypnosis”): Effect of spreading cortical depression. *Behav Biol* 1975; 13: 139-143.

Thompson RKR, Foltin RW, Boylan RJ, Sweet A, Graves CA, Lowitz CE. Tonic immobility in Japanese quail can reduce the probability of sustained attack by cats. *Animal Learning & Behavior* 1981; 9: 145-149.

Valet M, Sprenger T, Boecker H, Willoch F, Rummeny E, Conrad B, et al. Distraction modulates connectivity of the cingulo-frontal cortex and the midbrain during pain--an fMRI analysis. *Pain* 2004; 109: 399-408.

Vianna DM, Borelli KG, Ferreira-Netto C, Macedo CE, Brandao ML. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. *Brain Res. Bull.* 2003; 62: 179-189.

Vogt BA, Nimchinsky EA, Vogt LJ, Hof PR. Human cingulate cortex: surface features, flat maps, and cytoarchitecture. *J Comp Neurol.* 1995; 359: 490-506.

Vogt BA, Pandya DN. Cingulate cortex of the rhesus monkey: II. Cortical afferents. *J Comp Neurol.* 1987; 262: 271-289.

Vogt BA, Pandya DN, Rosene DL. Cingulate cortex of the rhesus monkey: I. Cytoarchitecture and thalamic afferents. *J Comp Neurol.* 1987; 262: 256-270.

Wang JY, Luo F, Chang JY, Woodward DJ, Han JS. Parallel pain processing in freely moving rats revealed by distributed neuron recording. *Brain Res.* 2003; 992: 263-271.

Wei F, Wang GD, Kerchner GA, Kim SJ, Xu HM, Chen ZF, et al. Genetic enhancement of inflammatory pain by forebrain NR2B overexpression. *Nat Neurosci.* 2001; 4: 164-169.

Wyss JM, Sripanidkulchai K. The topography of the mesencephalic and pontine projections from the cingulate cortex of the rat. *Brain Res.* 1984; 293: 1-15.

Yeziarski R.P. Somatosensory input the periaqueductal gray: a spinal relay to a descending control center. In: Depaulis, A., Bandler, R. (eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. Plenum Press, New York, 1991; 365-386.

Zhang L, Zhang Y, Zhao ZQ. Anterior cingulate cortex contributes to the descending facilitatory modulation of pain via dorsal reticular nucleus. *Eur J Neurosci.* 2005; 22: 1141-1148.

Zhuo M. Glutamate receptors and persistent pain: targeting forebrain NR2B subunits. *Drug Discov Today* 2002; 7: 259-267.

## 8 - APÊNDICE

### 8.1 - Tabelas

**Tabela I.** Resultados individuais da média de cinco episódios de IT (em segundos) em animais na situação controle, após o período cirúrgico (sham) e após a microinjeção de solução salina (0,2 µl) no CCA.

Imobilidade tônica (duração em segundos)			
Animais	Controle	Sham	Salina
1	249,4	52,8	52,8
2	128,1	66,2	83,6
3	47,6	96,2	153
4	79,8	96,6	236,6
5	175,2	107,2	40,4
6	134,6	30,2	32,2
7	194,9	269,1	146,3
8	52,4	142,2	116
<b>MÉDIA</b>	<b>132,8</b>	<b>107,6</b>	<b>107,6</b>
<b>DPM</b>	<b>71,5</b>	<b>73,9</b>	<b>69,7</b>
<b>EPM</b>	<b>25,3</b>	<b>26,1</b>	<b>24,7</b>

**Tabela II.** Resultados individuais da média de cinco episódios de IT (em segundos) em animais na situação controle, após o período cirúrgico (sham) e após a microinjeção de DLH (30 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Imobilidade tônica (duração em segundos)			
Animais	Controle	Sham	DLH (30 nmol)
1	241,4	60,4	0,4
2	266	337,2	326,2
3	504,6	241,4	39,4
4	260	143,4	217,4
5	492,2	261,6	16,6
6	267,2	122	52,6
7	59,2	74	54
8	148,8	64,4	58,6
9	141,6	669,6	13,6
10	184,2	227	123,2
11	113	421	15,3
<b>MÉDIA</b>	<b>243,5</b>	<b>238,4</b>	<b>83,4</b>
<b>DPM</b>	<b>143,3</b>	<b>184,7</b>	<b>101,8</b>
<b>EPM</b>	<b>43,2</b>	<b>55,7</b>	<b>30,7</b>

**Tabela III.** Resultados individuais da média de cinco episódios de IT (em segundos) em animais na situação controle, após o período cirúrgico (sham) e após a microinjeção de MK-801 (3,6 nmol / 0,2 µl) previamente a microinjeção de DLH (30 nmol / 0,2 µl) no CCA.

<b>Imobilidade tônica (duração em segundos)</b>			
<b>Animais</b>	<b>Controle</b>	<b>Sham</b>	<b>DLH + MK-801</b>
1	240,8	238,4	372,8
2	618	569,6	757,6
3	462,6	196,6	22,5
4	179,6	787,4	551,6
5	287,6	143,2	196,4
6	130,6	64,2	28,2
7	523,2	734,4	181
8	483,2	750,8	425,6
9	581,4	621,6	723,2
10	162,8	148,4	186
<b>MÉDIA</b>	<b>367,0</b>	<b>425,5</b>	<b>344,5</b>
<b>DPM</b>	<b>185,9</b>	<b>291,7</b>	<b>267,1</b>
<b>EPM</b>	<b>58,8</b>	<b>92,2</b>	<b>84,4</b>

**Tabela IV.** Resultados individuais da média de cinco episódios de IT (em segundos) em animais na situação controle, após o período cirúrgico (sham) e após a microinjeção de MK-801 (3,6 nmol / 0,2 µl) no CCA.

<b>Imobilidade tônica (duração em segundos)</b>			
<b>Animais</b>	<b>Controle</b>	<b>Sham</b>	<b>MK-801</b>
1	138,6	130	22,4
2	79,2	38	63,4
3	56,6	361,8	380,6
4	134	52	30,8
5	86,6	367,4	369,4
6	112,4	143,4	206,8
7	120,4	77	67,2
8	372,6	56	86,6
<b>MÉDIA</b>	<b>137,6</b>	<b>153,2</b>	<b>153,4</b>
<b>DPM</b>	<b>99,1</b>	<b>135,6</b>	<b>148,0</b>
<b>EPM</b>	<b>35,0</b>	<b>48,0</b>	<b>52,3</b>

**Tabela V.** Resultados individuais da média de cinco episódios de IT (em segundos) em animais na situação controle, após o período cirúrgico (sham) e após a microinjeção de solução salina (0,2 µl) na SCPd previamente a administração de solução salina (0,2 µl) no CCA.

Animais	Imobilidade tônica (duração em segundos)		
	Controle	Sham	Salina (SCPd) + Salina (CCA)
1	246,2	440,4	94
2	344,4	147,4	148,8
3	368,6	191	264
4	149,8	38,6	201,8
5	162,2	327,8	77,2
6	313,8	570,8	392,2
7	298,8	599,4	718
8	157,2	40,2	172,4
<b>MÉDIA</b>	<b>255,1</b>	<b>294,5</b>	<b>258,6</b>
<b>DPM</b>	<b>89,1</b>	<b>224,9</b>	<b>211,0</b>
<b>EPM</b>	<b>31,5</b>	<b>79,5</b>	<b>74,6</b>

**Tabela VI.** Resultados individuais da média de cinco episódios de IT (em segundos) em animais na situação controle, após o período cirúrgico (sham) e após a microinjeção de solução salina (0,2 µl) na SCPd previamente a administração de DLH (30 nmol /0,2 µl) no CCA.

Animais	Imobilidade tônica (duração em segundos)		
	Controle	Sham	Salina (SCPd) + DLH (CCA)
1	64,6	45,8	21,4
2	89,4	65	22,6
3	319,2	359,4	90,6
4	440,4	314	207,4
5	64,4	75,4	21,6
6	254,4	109,8	83,8
7	152,6	71	93
8	59,2	70,8	22,2
9	98,8	86,4	16,2
10	80,2	199,6	27,4
<b>MÉDIA</b>	<b>162,3</b>	<b>139,7</b>	<b>60,6</b>
<b>DPM</b>	<b>131,8</b>	<b>112,5</b>	<b>60,6</b>
<b>EPM</b>	<b>41,7</b>	<b>35,6</b>	<b>19,2</b>

**Tabela VII.** Resultados individuais da média de cinco episódios de IT (em segundos) em animais na situação controle, após o período cirúrgico (sham) e após a microinjeção de MK-801 (3,6 nmol / 0,2 µl) na SCPd previamente a administração de DLH (30 nmol / 0,2 µl) no CCA.

<b>Imobilidade tônica (duração em segundos)</b>			
<b>Animais</b>	<b>Controle</b>	<b>Sham</b>	<b>MK-801 (SCPd) + DLH (ACCA)</b>
1	152,6	71	305,6
2	50,6	49,2	38,2
3	186,6	75	81,6
4	198,8	57,8	77,6
5	141	175,4	49,4
6	87,7	27,6	15
7	80,6	109,8	114,8
8	193,4	116	25,6
<b>MÉDIA</b>	<b>136,4</b>	<b>85,2</b>	<b>88,5</b>
<b>DPM</b>	<b>57,1</b>	<b>46,8</b>	<b>93,7</b>
<b>EPM</b>	<b>20,2</b>	<b>16,6</b>	<b>33,1</b>

**Tabela VIII.** Resultados individuais da média de cinco episódios de IT (em segundos) em animais na situação controle, após o período cirúrgico (sham) e após a microinjeção de MK-801 (3,6 nmol / 0,2 µl) na SCPd previamente a administração de solução salina (0,2 µl) no CCA.

<b>Imobilidade tônica (duração em segundos)</b>			
<b>Animais</b>	<b>Controle</b>	<b>Sham</b>	<b>MK-801 (SCPd) + Salina (CCA)</b>
1	182,6	449,6	171
2	344,4	147,4	286,6
3	368,6	191	264
4	162,2	327,8	173,8
5	149,8	38,6	201,8
6	313,8	570,8	392,2
7	149,2	41	28
8	221	105,8	13,4
<b>MÉDIA</b>	<b>236,5</b>	<b>234,0</b>	<b>191,4</b>
<b>DPM</b>	<b>91,7</b>	<b>196,4</b>	<b>127,5</b>
<b>EPM</b>	<b>32,4</b>	<b>69,4</b>	<b>45,1</b>

**Tabela IX.** Valores individuais do índice de retirada da pata durante aplicação de estímulo nocivo térmico nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de salina (0,2 µl) no CCA.

<b>Índice de retirada da pata (tempo em minutos)</b>						
<b>Animais</b>	<b>LB</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>30</b>
1	0,0	-0,2	-0,1	0,0	0,0	0,0
2	0,0	0,2	-0,1	0,0	-0,2	-0,2
3	0,0	0,3	0,2	0,1	0,1	-0,1
4	0,0	-0,2	-0,2	0,0	0,2	-0,1
5	0,0	-0,3	-0,1	-0,3	-0,4	0,0
6	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
7	0,0	0,1	-0,2	-0,1	-0,2	-0,2
<b>MÉDIA</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>-0,1</b>	<b>0,0</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,1</b>
<b>DPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>
<b>EPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>

**Tabela X.** Valores individuais do índice de retirada da pata durante aplicação de estímulo nocivo térmico nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de DLH (15 nmol / 0,2 µl) no CCA.

<b>Índice de retirada da pata (tempo em minutos)</b>						
<b>Animais</b>	<b>LB</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>30</b>
1	0,0	0,1	-0,6	0,1	-0,1	-0,3
2	0,0	-0,1	-0,1	0,0	0,0	0,2
3	0,0	-0,2	-1,1	0,3	-0,6	-0,7
4	0,0	-0,3	-0,2	-0,5	-0,1	-0,3
5	0,0	-0,2	0,1	-0,1	0,1	-0,2
<b>MÉDIA</b>	<b>0,0</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,4</b>	<b>0,0</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,3</b>
<b>DPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,2</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>
<b>EPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>



**Tabela XI.** Valores individuais do índice de retirada da pata durante aplicação de estímulo nocivo térmico nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de DLH (30 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Animais	Índice de vocalização (tempo em minutos)					
	LB	2	5	10	15	30
1	0	-0,3	-0,5	-0,2	-0,2	0,1
2	0	-0,3	-0,2	0	-0,3	-0,1
3	0	0,5	-0,2	0,3	-0,8	-0,4
4	0	-0,2	-0,2	-0,4	-0,4	-0,3
5	0	0,1	0,2	0,1	-0,2	-0,2
6	0	0,4	0,3	-0,1	0,1	0
7	0	-0,3	-0,1	-0,2	-0,4	-0,2
<b>MÉDIA</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,3</b>	<b>-0,2</b>
<b>DPM</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>
<b>EPM</b>	<b>0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>

**Tabela XII.** Valores individuais do índice de vocalização durante aplicação de estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de solução salina (0,2 µl) no CCA.

Animais	Índice de vocalização (tempos em minutos)					
	LB	2	5	10	15	30
1	0,0	0,0	0,5	0,6	0,6	-0,3
2	0,0	0,0	0,0	0,1	-0,1	-0,3
3	0,0	-0,3	-0,4	-0,3	-0,7	-0,4
4	0,0	0,0	0,6	0,5	-0,5	0,1
5	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4
6	0,0	0,0	0,0	0,1	-0,1	0,0
7	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	-0,3
<b>MÉDIA</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,1</b>
<b>DPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>
<b>EPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>

**Tabela XIII.** Valores individuais do índice de vocalização durante aplicação de estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de DLH (15 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Animais	Índice de vocalização (tempo em minutos)					
	LB	2	5	10	15	30
1	0,0	-1,0	-1,0	0,1	-0,3	-0,3
2	0,0	-0,1	-0,3	-0,6	-0,7	-0,9
3	0,0	1,0	1,0	0,7	-1,0	-0,3
4	0,0	1,5	-0,7	1,2	0,8	-0,1
5	0,0	0,4	-0,7	-0,6	-0,3	-0,2
6	0,0	-0,5	1,0	0,4	0,3	0,7
7	0,0	0,8	0,2	0,8	0,8	0,8
8	0,0	0,4	0,2	-0,3	-0,9	-1,0
<b>MÉDIA</b>	<b>0,0</b>	<b>0,3</b>	<b>0,0</b>	<b>0,2</b>	<b>-0,2</b>	<b>-0,2</b>
<b>DPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,8</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>	<b>0,7</b>	<b>0,7</b>
<b>EPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>

**Tabela XIV.** Valores individuais do índice de vocalização durante aplicação de estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de DLH (30 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Animais	Índice de vocalização (tempo em minutos)					
	LB	2	5	10	15	30
1	0,0	0,5	-0,6	-0,3	-0,3	-1,0
2	0,0	0,4	0,9	0	0,1	-0,1
3	0,0	1,0	0,7	0,7	0,3	0,3
4	0,0	0,3	0,0	0,0	0,3	-0,3
5	0,0	-0,2	-0,2	-0,3	-0,8	-1
6	0,0	1,0	0,8	-0,9	-1,0	-1,0
7	0,0	0,9	0,7	0,7	0,4	0,8
8	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0	0,4
<b>MÉDIA</b>	<b>0,0</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>	<b>0</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,2</b>
<b>DPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,7</b>
<b>EPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>

**Tabela XV.** Valores individuais do índice de vocalização durante aplicação de estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de MK-801 (3,6 nmol / 0,2 µl) previamente a administração de DLH (30 nmol / 0,2 µl) no CCA.

<b>Animais</b>	<b>Índice de vocalização (tempos em minuto)</b>					
	<b>LB</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>30</b>
1	0,0	-0,6	-0,5	-1,0	-0,4	-0,6
2	0,0	0,4	0,3	-0,1	-0,4	-0,3
3	0,0	0,0	-0,1	-1,0	-1,0	-0,4
4	0,0	-0,2	0,5	0,1	0,1	0,0
5	0,0	-1,0	-0,9	-0,9	-1,0	-1,0
6	0,0	0,9	0,9	0,5	0,2	-0,7
7	0,0	-0,9	-0,9	-1,0	0,7	0,7
8	0,0	0,3	0,8	0,9	0,9	0,9
<b>MÉDIA</b>	<b>0,0</b>	<b>-0,1</b>	<b>0,0</b>	<b>-0,3</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,2</b>
<b>DPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,7</b>	<b>0,7</b>	<b>0,8</b>	<b>0,7</b>	<b>0,7</b>
<b>EPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>

**Tabela XVI.** Valores individuais do índice de vocalização durante aplicação de estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de MK-801 (3,6 nmol / 0,2 µl) no CCA.

<b>Animais</b>	<b>Índice de vocalização (tempo em minutos)</b>					
	<b>LB</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>30</b>
1	0,0	0,0	-0,1	0,4	0,8	0,8
2	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
3	0,0	-0,5	-0,6	-0,6	-0,8	-1,0
4	0,0	0,0	0,1	-0,1	-1,0	-0,2
5	0,0	-0,3	-0,4	0,1	0,2	-0,2
6	0,0	0,3	0,3	-0,2	0,3	-0,4
<b>MÉDIA</b>	<b>0,0</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,1</b>	<b>0,0</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,1</b>
<b>DPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,7</b>	<b>0,6</b>
<b>EPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>

**Tabela XVII.** Valores individuais do índice de vocalização durante aplicação de estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de solução salina na SCPd (0,2 µl) seguida da microinjeção de solução salina (0,2 µl) no CCA.

Animais	Índice de Vocalização (tempo em minutos)					
	LB	2	5	10	15	30
1	0,0	-0,1	-0,5	0,1	-0,3	-0,1
2	0,0	0,1	0,2	-0,6	-0,9	-0,2
3	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
4	0,0	0,0	-0,4	0,1	-1,0	-0,6
<b>MÉDIA</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>-0,2</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,5</b>	<b>-0,2</b>
<b>DPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>
<b>EPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>

**Tabela XVIII.** Valores individuais do índice de vocalização durante aplicação de estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de solução salina na SCPd (0,2 µl) seguida da microinjeção de DLH (30 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Animais	Índice de vocalização (tempo em minuto)					
	LB	2	5	10	15	30
1	0,0	0,3	-0,2	0,0	-0,1	-0,4
2	0,0	0,3	0,3	1,7	0,9	0,2
3	0,0	0,3	-1,0	-0,1	-0,2	-0,5
4	0,0	1,0	-0,5	-1,0	-1,0	-0,9
5	0,0	1,2	0,0	-0,3	-0,3	-0,7
6	0,0	0,2	0,0	-0,2	-0,1	0,0
7	0,0	0,6	-0,2	-0,2	0,0	-0,1
<b>MÉDIA</b>	<b>0,0</b>	<b>0,6</b>	<b>-0,2</b>	<b>0,0</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,3</b>
<b>DPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>
<b>EPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>

**Tabela XIX.** Valores individuais do índice de vocalização durante aplicação de estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de lidocaína a 2 % na SCPd (0,2 µl) seguida da microinjeção de DLH (30 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Animais	Índice de vocalização (tempo em minutos)					
	LB	2	5	10	15	30
1	0	-0,1	0,2	-1	-0,9	-1
2	0	-0,3	-0,6	-0,6	-1	-0,4
3	0	0,1	0,3	0,1	0,9	0,4
4	0	0,1	0	0	0	0
5	0	-0,5	0	0,3	0,1	-1
6	0	0,5	-0,8	-0,1	0,3	-0,4
<b>MÉDIA</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,2</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,4</b>
<b>DPM</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>	<b>0,7</b>	<b>0,5</b>
<b>EPM</b>	<b>0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>

**Tabela XX.** Valores individuais do índice de vocalização durante aplicação de estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de lidocaína a 2 % na SCPd (0,2 µl) seguida da microinjeção de solução salina (0,2 µl) no CCA.

Animais	Índice de Vocalização (tempo em minutos)					
	LB	2	5	10	15	30
1	0,0	-0,2	0,2	0,3	0,2	0,3
2	0,0	-0,3	-0,8	-0,2	-0,4	-0,8
3	0,0	-0,3	-0,2	-0,3	0,1	0,2
4	0,0	0,4	-0,3	0,2	0,1	0,4
5	0,0	0,2	0,2	0,1	-0,6	0,1
6	0,0	0,0	0,0	-0,3	-0,3	0,0
<b>MÉDIA</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>-0,1</b>	<b>0,0</b>	<b>-0,1</b>	<b>0,0</b>
<b>DPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>
<b>EPM</b>	<b>0,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>

*Artigos Publicados*

---



## Modulation of tonic immobility in guinea pig PAG by homocysteic acid, a glutamate agonist

Márcio Ramos Coutinho, Luís Felipe Souza da Silva, Leda Menescal-de-Oliveira\*

Department of Physiology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 November 2007

Received in revised form 19 February 2008

Accepted 25 February 2008

#### Keywords:

PAG

Tonic immobility

Defensive behavior

Excitatory amino acid

DL-homocysteic acid

Guinea pig

### ABSTRACT

Tonic immobility (TI) is an innate defensive behavior elicited by physical restriction and postural inversion, and is characterized by a profound and temporary state of motor inhibition. The participation of the periaqueductal gray matter (PAG) in TI modulation has previously been described. In addition, the excitatory amino acids (EAA) are important mediators involved in the adjustment of several defensive responses produced by PAG. In the present study, we investigated the effect of microinjection of the EAA agonist DL-homocysteic acid (DLH) and the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist (MK-801) into the ventrolateral and dorsal PAG over the duration of TI in guinea pigs. Microinjection of 15 nmol/0.2  $\mu$ l of DLH into the ventrolateral PAG (vPAG) and 30 nmol/0.2  $\mu$ l of DLH into the dorsal PAG (dPAG) promoted an increase and decrease in TI duration, respectively. These responses were blocked by prior microinjection of the NMDA receptor antagonist, MK-801 (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l) at the same site. Microinjection of MK-801 alone into the vPAG and dPAG did not alter the duration of TI episodes. These results suggest that NMDA receptors are involved in the modulation of TI in both the vPAG and dPAG. In addition, PAG excitatory amino acids modulate the TI response via columnar organization of the PAG. In this manner, the vPAG facilitates TI modulation whereas dPAG has an inhibitory role in TI.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Tonic immobility (TI) is an innate defensive response characterized by a temporary state of profound akinesia and a relative lack of responsiveness to external stimuli. This response is triggered in many vertebrate and invertebrate species by different types of sensory stimuli, mainly those from prolonged physical contact with predators [1,2]. Generally, TI is elicited in extreme conditions, when the captured prey expresses its limitation without loss of control of the situation [1,2]. The lack of movement caused by TI frequently interrupts the predator attack and consequently promotes a condition where the seized prey may be able to escape [3].

Studies carried out in our laboratory showed the participation of periaqueductal gray matter (PAG) in the modulation of the TI response. This participation is distinct between the longitudinal columns. The cholinergic stimulation of dorsal PAG (dPAG) decreases TI duration, while the same stimulation in the ventrolateral PAG (vPAG) increases the TI response [4].

Some research has associated the vPAG with modulation of passive strategies of defensive reactions, whereas the dPAG is associated with the mediation of active forms of defense to cope with threats [5,6]. In this context, administration of excitatory amino

acids (EAA), specifically the DL-homocysteic acid (DLH), into distinct regions of the rat and cat PAG changes somatomotor and autonomic responses [7–10]. According to Carrive [5] and Bandler and Shipley [6], stimulation of the vPAG of rats and cats by DLH microinjection causes opioid-mediated antinociception, quiescence, bradycardia, hypotension and a decreased responsiveness to the environment (hyporeactivity). In contrast, EAA microinjection into the dPAG produces reactions associated with fight and flight [5,6,11].

Some studies have demonstrated the presence of a high density of glutamatergic receptors and neurotransmitters in the PAG of rats and cats [12–14], suggesting that EAA are involved in the PAG modulation of behavioral activities. Nonetheless, the participation of EAA in the mediation of TI responses has still not been demonstrated. The present study investigated the effects of injecting agonists (DLH) and antagonists (MK-801) into the ventrolateral and dorsomedial/dorsolateral (dorsal) PAG upon the TI duration in guinea pig, with the aim of contributing to the understanding of the role of EAA in modulation of the TI response.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Animals

Adult male guinea pigs (*Cavia porcellus*) weighing 400 to 500 g were obtained from the animal care facility of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto (FMRP). The animals ( $n=90$ ) were kept in Plexiglas wall cages (56×37×39 cm, five animals per cage) in a room

\* Corresponding author. Tel.: +55 16 3602 3025; fax: +55 16 3633 0017.  
E-mail address: [lmolive@fmrp.usp.br](mailto:lmolive@fmrp.usp.br) (L. Menescal-de-Oliveira).

maintained at  $24 \pm 1$  °C, on a 12-h light cycle, with free access to water and food. The experiments were carried out in compliance with the recommendations of Brazilian Association for Laboratory Animal Science (COBEA), with the approval (Proc.no. 051/2005) of the Ethical Committee for Animal Experimentation of the Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo. All efforts were made to minimize animal suffering.

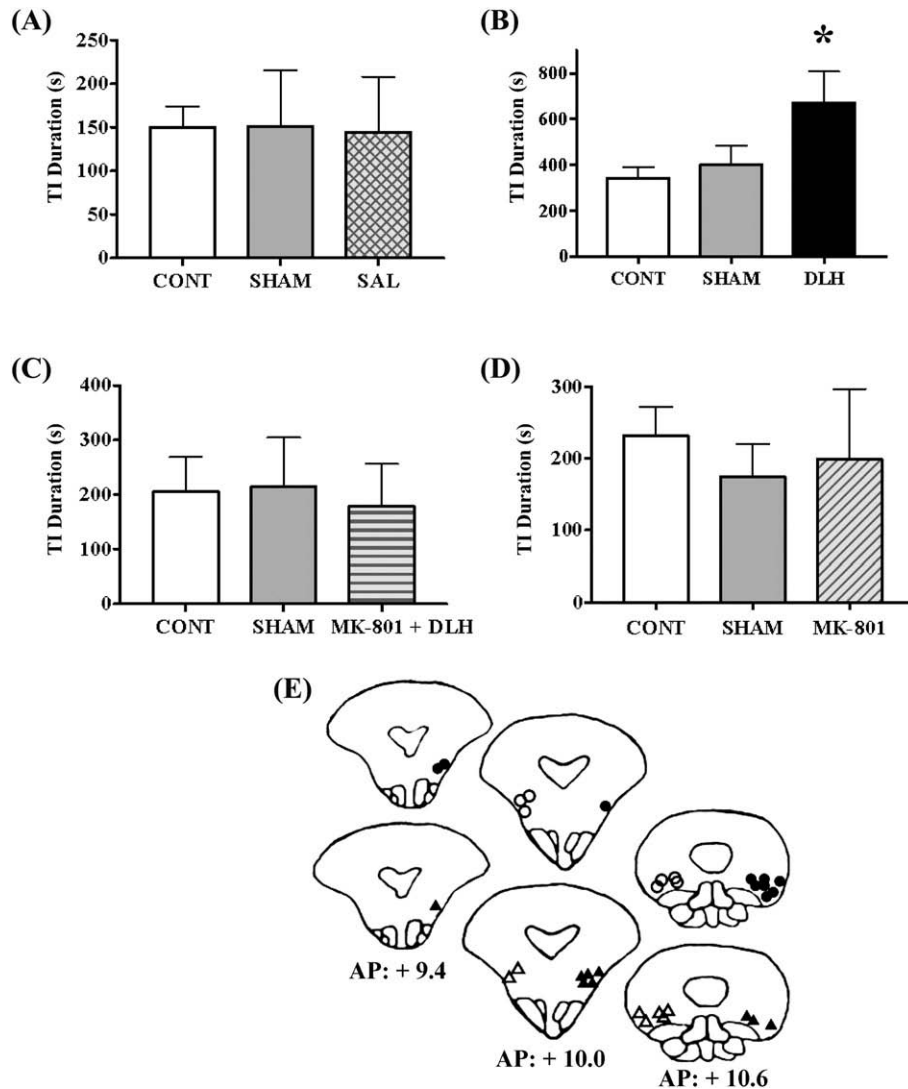
## 2.2. Tonic immobility recordings

In the present study, each animal was submitted to five control maneuvers of TI induction and the duration of the episodes was recorded. Induction of TI was carried out by holding the animal around the thorax, quickly inverting it and pressing it down into a V-shaped plywood trough ( $30 \times 17 \times 17$  cm). The pressure applied by the hands of the experimenter was proportional to the resistance offered by the animal to the restraining maneuver. When the animal stopped moving, the experimenter slowly withdrew their hands and

a chronometer was activated to measure the duration (in seconds) of the response, which ended when the animal resumed the upright position. If the animal did not become motionless within 60 s, the episode was recorded as having zero duration. For group analysis, the mean of five episodes per animal was considered. It was established that, in one and the same trial group, the animals serve as their own controls, that is, the mean of TI episodes in the control situation was compared with the mean of the sham and of the trial situation.

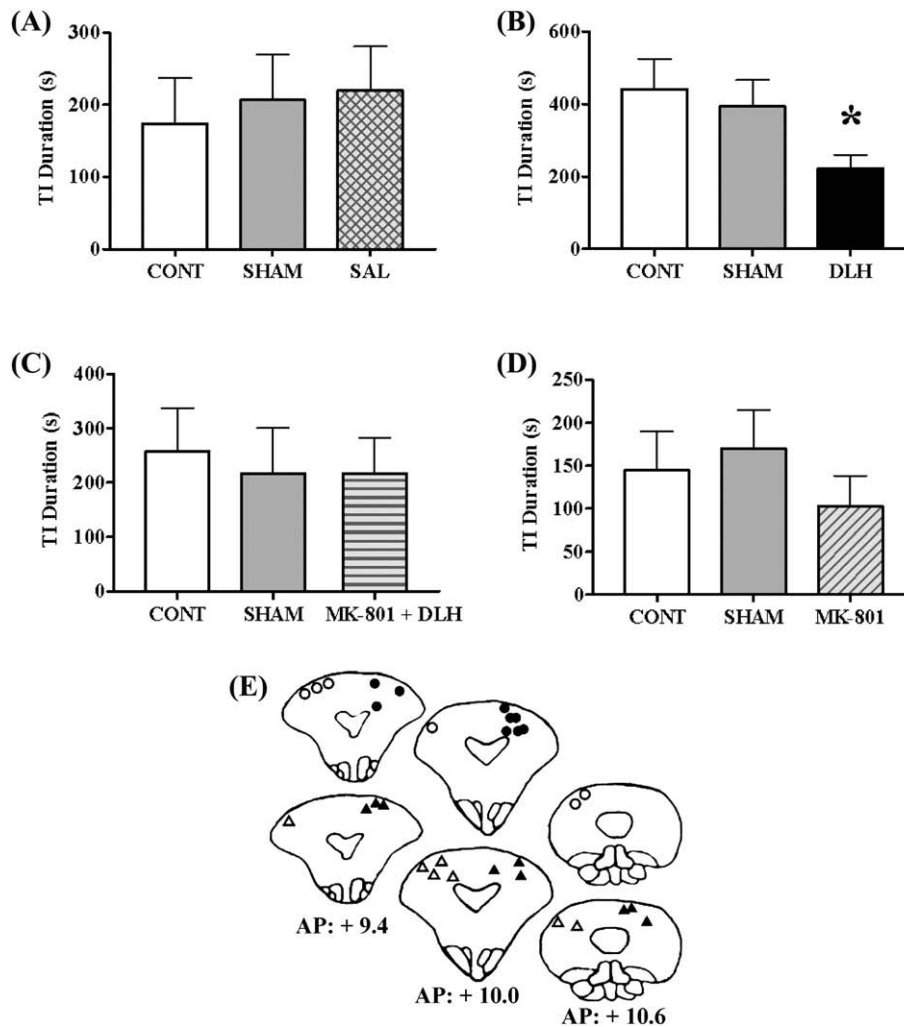
## 2.3. Surgical procedures

One day after the control TI episode, the animals were anesthetized by intramuscular injection of 40 mg/kg ketamine plus 5 mg/kg xylazine, and placed in a stereotaxic apparatus (David-Kopf Instruments, USA) with the mouthpiece 21.4 mm below the interauricular line, and a guide cannula (14 mm long and 0.6 mm outer diameter, prepared from a hypodermic needle) was implanted into the PAG.



**Fig. 1.** Duration of tonic immobility (TI) episodes. Mean  $\pm$  S.E.M. TI duration under control conditions (CONT), after surgery (SHAM) and after microinjection of different drugs into the ventrolateral periaqueductal gray matter (vlPAG). (A) TI duration after saline (SAL) microinjection (0.2  $\mu$ l;  $n=7$ ); (B) TI duration after DLH microinjection (15 nmol /0.2  $\mu$ l;  $n=10$ ); (C) TI duration ( $n=7$ ) after MK-801 microinjection (3.6 nmol /0.2  $\mu$ l) and prior DLH microinjection (15 nmol/0.2  $\mu$ l); (D) TI duration after MK-801 microinjection (3.6 nmol /0.2  $\mu$ l;  $n=9$ ). \* $p < 0.05$  compared to CONT and SHAM. (E) Schematic drawing of frontal sections obtained at representative levels of the guinea pig periaqueductal gray matter. The open circles (○) represent the sites where saline solution was microinjected; the filled circles (●) represent the sites where DLH (15 nmol) was microinjected; the open triangles (△) represent the sites where MK-801 + DLH were microinjected; the filled triangles (▲) represent the sites where MK-801 (3.6 nmol) was microinjected. All microinjections were made on the right side, however DLH and MK-801 are illustrated on the left side for clarity.





**Fig. 2.** Duration of tonic immobility (TI) episodes. Mean  $\pm$  S.E.M. TI duration under control conditions (CONT), after surgery (SHAM) and after microinjection of different drugs into the dorsal periaqueductal gray matter (dPAG). (A) TI duration after saline microinjection (0.2  $\mu$ l;  $n=6$ ); (B) TI duration after DLH microinjection (30 nmol/0.2  $\mu$ l;  $n=9$ ); (C) TI duration ( $n=7$ ) after MK-801 microinjection (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l) and prior DLH microinjection (30 nmol/0.2  $\mu$ l); (D) TI duration after MK-801 microinjection (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l;  $n=9$ ). \* $p < 0.05$  compared to CONT and SHAM. (E) Schematic drawing of frontal sections obtained at representative levels of the guinea pig periaqueductal gray matter. The open circles (○) represent the sites where saline solution was microinjected; the filled circles (●) represent the sites where DLH (30 nmol) was microinjected; the open triangles (△) represent the sites where MK-801 (3.6 nmol) was microinjected. All microinjections were made on the right side, however DLH and MK-801 are illustrated on the left side for clarity.

Stereotaxic coordinates for the vPAG were 9.4 to 9.8 mm caudal to the bregma, 0.6 to 0.8 mm lateral to the midline, and 2.8 mm above the intraural line using the coordinates of the Rössner atlas [15] for guinea pigs as a reference. The parameters for the dPAG were the same, except that the last coordinate was changed to 3.2 to 3.4 mm above the interaural line. The guide cannula was lowered to a depth of 1 mm above the target region and fixed to the skull using autopolymerizing resin and an additional anchoring screw. All animals were allowed to recover from surgery for 6–7 days.

#### 2.4. Experimental procedures

After 6–7 days of recovery from surgery, the different animal groups were submitted to a TI session with injection cannulas lowered into the vPAG (experiment 1) and dPAG (experiment 2) and then microinjected with drugs and submitted to the TI maneuver.

In experiment 1, we tested the effects of DL-homocysteic acid (DLH) and of MK-801 microinjection into the vPAG on TI duration. In this experiment, the animals whose cannula was implanted in the vPAG were assigned to one of six groups. In group 1 ( $n=7$ ), the animals were

microinjected with saline (0.2  $\mu$ l); in group 2 ( $n=7$ ) and group 3 ( $n=10$ ), the animals were microinjected with DLH (5 and 15 nmol/0.2  $\mu$ l, respectively); in group 4 ( $n=7$ ) the animals were microinjected with MK-801 (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l), followed 1 min later by DLH (15 nmol/0.2  $\mu$ l); in group 5 ( $n=9$ ) and group 6 ( $n=10$ ) the animals were microinjected with MK-801 (3.6 and 10.8 nmol/0.2  $\mu$ l, respectively).

In experiment 2, we also tested the effect of DLH and MK-801 on TI duration, but this time the drugs were microinjected into the dPAG. In this experiment, the animals were assigned to five groups. In group 1 ( $n=6$ ), the animals were microinjected with saline (0.2  $\mu$ l); in group 2 ( $n=9$ ) and group 3 ( $n=9$ ), the animals were microinjected with DLH (15 and 30 nmol/0.2  $\mu$ l, respectively); in group 4 ( $n=7$ ) the animals were microinjected with MK-801 (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l) followed 1 min later by DLH (30 nmol/0.2  $\mu$ l); in group 5 ( $n=9$ ) the animals were microinjected with MK-801 (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l).

Microinjections were performed with a Hamilton microsyringe (5.0  $\mu$ l) connected to a PE-10 polyethylene catheter, which in turn was coupled to a Mizzy needle segment (0.3 mm outer diameter; 1.0 mm longer than the guide cannula). In all experimental groups, a volume of 0.2  $\mu$ l was microinjected over a period of 1 min and

the Mizzy needle was left in place for an additional 40 s to avoid reflux.

### 2.5. Drugs

The drugs used were DLH (DL-homocysteic acid from Aldrich) MK-801 (maleate salt, from Sigma), diluted in saline. The doses were based on studies by Finn et al [16] and Jensen and Yaksh [17].

### 2.6. Histological analysis

Following all tests, the injection site was marked by microinjecting 0.2  $\mu$ l of 2% pontamine sky blue dye. Each animal was deeply anesthetized with sodium pentobarbital and was perfused intracardially with saline followed by 10% formalin. The brains were removed and fixed in 10% formalin. Routine histological procedures were used for sectioning, and stained preparations were observed under a light microscope to determine the location of the stimulated sites according to the Rössner atlas [15].

### 2.7. Statistical analysis

The TI results are reported as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of the mean duration of five TI episodes. Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) for repeated measures. The degree of freedom of the repeated measure (treatment) was corrected by the Huynh–Feldt  $\epsilon$  parameter. The Duncan test was used to determine the difference between treatments, with the level of significance set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Experiment 1

Microinjection of DLH (15 nmol/0.2  $\mu$ l) into the vPAG promoted an increase in the duration of TI in guinea pigs and prior application of MK-801 (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l) blocked this response (Fig. 1B and C respectively). ANOVA for repeated measures indicated a significant difference between treatments ( $F_{(2,18)} = 7.77$ ;  $p < 0.05$ ) and Duncan's post-test showed that treatment with DLH differed from the other treatments (control and sham), which did not differ from one another. In addition, microinjection of MK-801 alone or saline did not alter the mean duration of TI when compared to the control and sham situations ( $p > 0.05$ ; Fig. 1D and A). Microinjection of a low dose (5.0 nmol/0.2  $\mu$ l) of DLH into the vPAG did not differ significantly from the control situation or sham or from microinjection of a high dose of MK-801 ( $p > 0.05$ ; data not shown). Fig. 1E shows a schematic representation of the sites of microinjection in the vPAG.

### 3.2. Experiment 2

Microinjection of DLH (30 nmol/0.2  $\mu$ l) into the dPAG promoted a decrease in the duration of TI in guinea pigs and prior application of MK-801 (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l) blocked this effect (Fig. 2B and C respectively). ANOVA for repeated measures indicated a significant difference between treatments ( $F_{(2,16)} = 4.67$ ;  $p < 0.05$ ;) and Duncan's post-test showed that treatment with DLH differed from the other treatments (control and sham), which did not differ from one another. In addition, microinjection of MK-801 alone or saline did not alter the mean duration of TI when compared to the control and sham situations ( $p > 0.05$ ; Fig. 2D and A).

The DLH microinjections (30 nmol) also promoted some behavioral changes which were analyzed qualitatively. These included vocalization (55.6% of sample), an increase in the alert state (55.6%), running (33.3%), arching of the back (11.1%) and tooth-beating (11.1%). In contrast to the vPAG, microinjection of a low dose (15 nmol) of DLH

into the dPAG was not able to alter the duration of TI episodes ( $p > 0.05$ ; data not shown), even though it also had provoked behavioral changes in 55.6% of the sample (5 animals). These changes included vocalization (33.3% of group), arching of the back (11.1%) and an increase in locomotor activity (11.1%). Fig. 2E shows a schematic representation of the sites of dPAG microinjections.

## 4. Discussion

The results presented here demonstrate that microinjection of DLH into the vPAG produces an increase in TI duration, while injection into the dPAG decreases this response in the guinea pig. These effects are blocked by prior administration of MK-801 into the same sites, suggesting that NMDA receptors are involved in the mediation of TI responses evoked by DLH. The glutamatergic TI modulation in the PAG appears to operate in accordance with the principles of topographic organization proposed by Bandler and Shipley [6]. They described an association of the vPAG with passive coping strategies to threats, whereas the dPAG was associated with active coping strategies.

DLH stimulation of the vPAG evokes similar responses to the reactions of an animal subsequent to injury, or after defeat in a social encounter [9,10]. Therefore, Bandler and Shipley [6] proposed that the vPAG may participate in passive coping strategies to lessen the physiological and emotional impact of an inescapable stressful or painful encounter. Within this context, it is known that the TI response is elicited in nature by proprioceptive and tactile stimuli which arise from prolonged prey/predator contact coupled with physical restraint of the prey [1,2,18]. According to Morgan and Carrive [19] and Walker and Carrive [20], the vPAG is an essential neural substrate. Its main role is to impose immobility reactions during different situations such as during contextual conditioned fear and poststress recovery. Based on this hypothesis, it has been suggested that the vPAG is involved in TI mediation, since this response is characterized by evident immobility. Results from a study by Monassi et al. [4] corroborate this proposition, since they showed that microinjection of carbachol, a cholinergic agonist, into the vPAG increases TI episodes, while injection into the dPAG produces a decrease of this response.

It is known that the dPAG is associated with the mediation of the somatomotor and neurovegetative responses in active defense strategies such as flight, fight and hyperactive immobility that are elicited by the presence of an escapable threat [4,21,22]. According to Fanselow [21], during the manifestation of circa-strike defensive behaviors, which are characterized by audible vocalization and vigorous locomotor behaviors, there is dominance in the activation of the lateral and dorsal PAG. It has been described that the electrical [22,23] and chemical [24,25], including EEA [11,23] stimulation of dPAG in rats [11,22] and cats [6,23–25] initiates defense reactions produced when the animal is faced with threatening situation. These responses include exophthalmus [11,23], alertness, hyperactive immobility [6,11,22], defensive rage behavior [23–25], evident escape behavior [6,22]. In the present study, DLH microinjection (15 and 30 nmol) into the dPAG of the guinea pig produced responses associated with active defense strategies such as vocalization, an apparently hyperactive immobility state, back arching, tooth-beating, an increase in locomotor activity and escape.

Curiously, the microinjection of 15 nmol of DLH into the dPAG did not influence the duration of TI response, while injection into the vPAG produced a significant increase in the TI duration. Therefore, considering just the TI response, DLH microinjection into the dPAG only had an effect with the 30 nmol dose. One possible explanation for this result may be the fact that the TI response is part of the passive repertoire of defensive reactions. It is probable that during TI expression, the vPAG is activated whereas the dPAG is inhibited. Consequently, the alteration of TI episodes by dPAG stimulation is possible shortly after this stimulation overcomes previous activation

of the vIPAG. Within this context, it is thought that it may be necessary to increase the dose of DLH (30 nmol) into the dPAG in order to modify TI episodes.

The dPAG mechanism that promotes the decrease of TI duration probably involves inhibition of neural circuits of the vIPAG, since this substrate is considered indispensable for defense responses associated with quiescent states [19,26]. According to Katz and Frost [27], the PAG has an intrinsic neuromodulator circuit that permits the activation or inhibition of a specific column to affect the projecting neurons of the others. This reciprocal inhibitory network prevents opposite functional columns (e.g., ventrolateral and dorsolateral) from being simultaneously activated [28,29]. It was demonstrated that GABAergic elements, mostly local interneurons, play an important tonic inhibitory role in a wide variety of PAG functions [30]. In the dorsal PAG, GABAergic elements have a tonic inhibitory effect on the active defensive reactions elicited by this neural substrate [31]. Jansen et al. [28] suggested that GABAergic neurons participate in this system of intrinsic neural control.

It has been reported that descending projections to the lower brainstem provide the essential substrates for PAG-mediated active and passive coping strategies [32]. Therefore, it is possible that activation of the dorsal and ventrolateral PAG alter the duration of TI episodes by recruitment of portions of the ventromedial brainstem, such as the nucleus raphe magnus (NRM). According to Beitz [33], DLH microinjection into rat PAG releases EAA in the NRM by a PAG–NRM pathway. Moreover, Silva and Menescal-de-Oliveira [34,35] showed that under the influence of opiodergic, GABAergic and cholinergic neurotransmitters, the NRM is capable of distinct modulation of the TI response. According to Keay and Bandler [32], the PAG–NRM pathway regulates several autonomic and somatomotor responses present in various defensive behaviors. This regulation may be achieved by activation of distinct neuronal populations within NRM, or by inhibitory or excitatory effects of different neurotransmitters released into this nucleus.

In the present study, prior microinjection of MK-801 (NMDA receptor antagonist) into the dorsal and ventrolateral PAG blocked the decrease and increase of TI duration, which were elicited by microinjection of DLH into dorsal and ventrolateral PAG, respectively. On the other hand, microinjection of MK-801 alone into the dPAG (3.6 nmol) and vIPAG (3.6 and 10.8 nmol) had no significant effect. These results suggest that NMDA receptors participate in the PAG in control of the TI response. Albin et al. [12] examined the density of EAA binding site subtypes in rat PAG and demonstrated the presence of NMDA receptors in this neuronal substrate. Based on these results, the authors proposed that the role of EAA receptors in PAG function is likely to be complex and may be important in mediating defensive behaviors. However, we cannot discard the possibility that the release of EAA in the PAG by projections from other diencephalic and prosencephalic structures can also contribute to modulate the duration of the TI through NMDA activity. According to Beitz and Williams [13], defensive behaviors can be modulated by glutamatergic projections from the cingulate cortex, hypothalamus and amygdala. Results from our laboratory have demonstrated the involvement of the lateral and medial hypothalamus, and also the central nucleus of the amygdala in the TI response [36–38]. Therefore, further research is needed to check the possibility of the hypothesis that glutamatergic projections on the PAG can also contribute to modulate the TI response.

The regulation of TI episodes seems to be mediated by a balance between ventrolateral and dorsal PAG activity that determines the increase or decrease of TI expression. The activation of PAG columns appears to be associated with mounting a strategy to cope with the threat, and more specifically, may relate to whether the prey manages to escape or not. The mechanisms are complex and probably involve EAA, whose activities are mediated by NMDA receptors, as shown by this study.

In summary, the present study shows that microinjection of DLH into the vIPAG increases the duration of TI episodes, whereas EAA

stimulation of dorsomedial and dorsolateral sites reduces the duration of this behavior. This suggests that the PAG may modulate TI and that the different neuronal regions of the PAG play different roles in the organization of this behavior. This study also demonstrates that, in addition to rats and cats, guinea pigs also show a sharp distinction between the response patterns triggered by the dorsal and ventral PAG.

## Acknowledgements

We would like to thank Mrs. Mariulza Rocha Brentegani and Mr. Rubens Fernando de Melo for technical assistance and histological processing. This work was supported by CAPES, FAEPA and CNPq.

## References

- [1] Klemm WR. Neurophysiologic studies of the immobility reflex ("animal hypnosis"). *Neurosci Res* 1971;4:165–212.
- [2] Ratner CS. Comparative aspects of hypnosis. In: Gordon JE, editor. *Handbook of clinical and experimental hypnosis*. New York: Macmillan; 1967. p. 550–87.
- [3] Sargeant AB, Eberhardt LE. Death feigning by ducks in response to predation by red foxes (*Vulpes fulva*). *Am Midl Nat* 1975;94:108–19.
- [4] Monassi CR, Hoffmann A, Menescal-de-Oliveira L. Involvement of the cholinergic system and periaqueductal gray matter in the modulation of tonic immobility in the guinea pig. *Physiol Behav* 1997;62:53–9.
- [5] Carrive P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res* 1993;58:27–47.
- [6] Bandler R, Shipley MT. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci* 1994;17:379–89.
- [7] Bandler R, Carrive P. Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain Res* 1988;439:95–106.
- [8] Carrive P, Bandler R, Dampney RA. Somatic and autonomic integration in the midbrain of the unanesthetized decerebrate cat: a distinctive pattern evoked by excitation of neurones in the subtentorial portion of the midbrain periaqueductal grey. *Brain Res* 1989;483:251–8.
- [9] Zhang SP, Bandler R, Carrive P. Flight and immobility evoked by excitatory amino acid microinjection within distinct parts of the subtentorial midbrain periaqueductal gray of the cat. *Brain Res* 1990;520:73–82.
- [10] Bandler R, Depaulis A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and the rat. In: Depaulis A, Bandler R, editors. *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. New York: Plenum Press; 1991. p. 175–98.
- [11] Bittencourt AS, Carobrez AP, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of *N*-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience* 2004;125:71–89.
- [12] Albin RL, Makowiec RL, Hollingsworth Z, Dure LS, Penney JB, Young AB. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. *Neurosci Lett* 1990;118:112–5.
- [13] Beitz AJ, Williams FG. Localization of putative amino acid transmitters in the PAG and their relationship to the PAG–Raphé magnus pathway. In: Depaulis A, Bandler R, editors. *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. New York: Plenum Press; 1991. p. 305–27.
- [14] Barbaresi P, Gazzanelli G, Malatesta M. Glutamate-positive neurons and terminals in the cat periaqueductal gray matter (PAG): a light and electron microscopic immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 1997;383:381–96.
- [15] Rössner W. *Stereotaktischer Hirnatlas vom meerschweinchen*. Munich: Pallas Verlag; 1965.
- [16] Finn DP, Jhaveri MD, Beckett SR, Roe CH, Kendall DA, Marsden CA, et al. Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats. *Neuropharmacology* 2003;45:594–604.
- [17] Jensen TS, Yaksh TL. The antinociceptive activity of excitatory amino acids in the rat brainstem: an anatomical and pharmacological analysis. *Brain Res* 1992;569:255–67.
- [18] Heidt JM, Marx BP, Forsyth JP. Tonic immobility and childhood sexual abuse: a preliminary report evaluating the sequela of rape-induced paralysis. *Behav Res Ther* 2005;43:1157–71.
- [19] Morgan MM, Carrive P. Activation of the ventrolateral periaqueductal gray reduces locomotion but not mean arterial pressure in awake, freely moving rats. *Neuroscience* 2001;102:905–10.
- [20] Walker P, Carrive P. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery. *Neuroscience* 2003;116:897–912.
- [21] Fanselow MS. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: Depaulis A, Bandler R, editors. *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. New York: Plenum Press; 1991. p. 151–74.
- [22] Vianna DM, Borelli KG, Ferreira-Netto C, Macedo CE, Brandão ML. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. *Brain Res Bull* 2003;62:179–89.

- [23] Siegel A, Schubert KL, Shaikh MB. Neurotransmitters regulating defensive rage behavior in the cat. *Neurosci Biobehav Rev* 1997;21:733–42.
- [24] Bhatt S, Bhatt R, Zalcman SS, Siegel A. Role of IL-1 beta and 5-HT<sub>2</sub> receptors in midbrain periaqueductal gray (PAG) in potentiating defensive rage behavior in cat. *Brain Behav Immun* 2008 Feb;22(2):224–33.
- [25] Bhatt S, Siegel A. Potentiating role of interleukin 2 (IL-2) receptors in the midbrain periaqueductal gray (PAG) upon defensive rage behavior in the cat: role of neurokinin NK(1) receptors. *Behav Brain Res* 2006 Feb 28;167(2):251–60.
- [26] Carrive P, Leung P, Harris J, Paxinos G. Conditioned fear to context is associated with increase fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. *Neuroscience* 1997;78:165–77.
- [27] Katz PS, Frost WN. Intrinsic neuromodulation: altering neuronal circuits from within. *Trends Neurosci* 1996;19:54–61.
- [28] Jansen ASP, Farkas E, Sarns JM, Loewy AD. Local connections between the columns of the periaqueductal gray matter: a case for intrinsic neuromodulation. *Brain Res* 1998;784:329–36.
- [29] De Oca BM, DeCola JP, Maren S, Fanselow MS. Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. *J Neurosci* 1998;18:3426–32.
- [30] Reichling DB. GABAergic neuronal circuitry in the periaqueductal gray matter. In: Depaulis A, Bandler R, editors. *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. New York: Plenum Press; 1991. p. 329–44.
- [31] Brandão ML, Aguiar C, Graef FC. GABA mediation of the anti-aversive action of the minor tranquilizers. *Pharmacol Biochem Behav* 1982;16:397–402.
- [32] Keay KA, Bandler R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neurosci Biobehav Rev* 2001;25:669–78.
- [33] Beitz AJ. Relationship of glutamate and aspartate to the periaqueductal gray-raphé magnus projection: Analysis using immunocytochemistry and microdialysis. *J Histochem Cytochem* 1990;38:1755–65.
- [34] Silva LFS, Menescal-de-Oliveira L. Cholinergic modulation of tonic immobility and nociception in the NRM of guinea pig. *Physiol Behav* 2006;87:821–7.
- [35] Silva LFS, Menescal-de-Oliveira L. Role of opioidergic and GABAergic neurotransmission of the nucleus raphe magnus in the modulation of tonic immobility in guinea pig. *Brain Res Bull* 2007;72:25–31.
- [36] Oliveira L, Hoffmann A, Menescal-de-Oliveira L. Participation of the medial and anterior hypothalamus in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. *Physiol Behav* 1997;62:1171–8.
- [37] Oliveira L, Hoffmann A, Menescal-de-Oliveira L. The lateral hypothalamus in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. *Neuroreport* 1997;8:3489–93.
- [38] Leite-Panissi CR, Menescal-de-Oliveira L. Central nucleus of the amygdala and the control of tonic immobility in guinea pigs. *Brain Res Bull* 2002;58:13–9.





## Research report

Role of homocysteic acid in the guinea pig (*Cavia porcellus*) anterior cingulate cortex in tonic immobility and the influence of NMDA receptors on the dorsal PAG

Márcio Ramos Coutinho, Leda Menescal-de-Oliveira\*

Department of Physiology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 November 2009

Accepted 30 November 2009

Available online 4 December 2009

## Keywords:

Anterior cingulate cortex

Defensive behavioural

MK-801

Excitatory amino acids

Tonic immobility

NMDA

Periaqueductal gray matter

Guinea pig

## ABSTRACT

Tonic immobility (TI) is an innate defensive behaviour elicited by physical restriction and postural inversion, and is characterised by a profound and temporary state of akinesia. Our previous studies demonstrated that glutamatergic stimulation of the dorsomedial/dorsolateral portion of periaqueductal gray matter (dPAG) decreases the duration of TI in guinea pigs (*Cavia porcellus*). Furthermore, evidence suggests that the anterior cingulate cortex (ACC) constitutes an important source of glutamate for the dPAG. Hence, in the current study, we investigated the effects of microinjection of the excitatory amino acid (EAA) agonist DL-homocysteic acid (DLH) and the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist MK-801 into the ACC on the duration of TI in guinea pigs. We also assessed the effect of the NMDA receptor antagonist (MK-801) into the dorsal periaqueductal gray matter (dPAG) prior to DLH microinjection into the ACC on the TI duration in the guinea pig. Our results demonstrated that DLH microinjections into the ACC decreased the duration of TI. This effect was blocked by previous MK-801 microinjections into the ACC or into the dPAG. The MK-801 microinjections alone did not influence TI duration. These results provide the new insight that EAAs in the ACC can decrease the duration of TI. The mechanism seems to be dependent on the NMDA receptors present in the ACC and in the dPAG.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Tonic immobility (TI) is an inborn defence response characterised by a dramatic and profound state of motor inhibition. It is elicited in a wide variety of species under fear circumstances and is associated with a brief period of physical restraint. TI is considered to be the last resource used by prey in a sequence of distance-dependent antipredator behaviours [30,43]. Its adaptive value has been associated with the state of akinesia, which seems to reduce the probability of continued predatory attack [45,51].

Results from our laboratory have showed the role of some of the neural substrates involved in TI modulation [13,14,16,36]. In this context, Ramos Coutinho et al. [42] demonstrated that the microinjection of DL-homocysteic acid (DLH), an excitatory amino acid (EAA) agonist, into the dorsolateral/dorsomedial portion of the periaqueductal gray matter (dPAG) produces a decrease in TI duration in the guinea pig. This effect was blocked by previous administration of MK-801 (NMDA receptor antagonist) into the same site. These results were expected since the dPAG seems to be strongly involved in the mediation of active strategies to cope with aversive situations [3,10].

Interestingly, the Ramos Coutinho et al. [42] study also raised questions concerning the origin of glutamatergic projections that could be capable of releasing EAA into the dPAG and causing early disruption of the TI duration in some specific situations. Beitz and Williams [5] used retrograde trace techniques combined with immunohistochemical techniques for assessing glutamate to demonstrate that the cingulate cortex sends one of the most robust projections of EAA to the dPAG in rats. Other detailed works demonstrated a high density of axons from the anterior cingulate cortex (ACC) to the dPAG in the rat [47] and monkey [2].

The ACC is part of the rostral limbic system, which is involved in modulation of several affective and motivational responses such as conditioned fear, anxiety, pain, vocalisation and posttraumatic stress disorder [8,11,18,26,31]. The extensive connections with the dPAG may be important in the regulation of these responses. In accordance with Floyd et al. [17], the projections between the ACC and dPAG comprised part of the circuitry engaged in generating active emotional coping in response to stress that has a strong psychological component. Taken together, these data provide support for our hypothesis that the ACC modulates TI responses by releasing EAA into the dPAG. In order to address this issue, the current study investigated the effects of DLH and MK-801 injection into the ACC on the TI duration in the guinea pig, as well as the effect of MK-801 microinjection into the dPAG prior to ACC activation by DLH on the TI duration in guinea pigs.

\* Corresponding author. Tel.: +55 16 3602 3333; fax: +55 16 3633 0017.  
E-mail address: [Imdolive@fmrp.usp.br](mailto:Imdolive@fmrp.usp.br) (L. Menescal-de-Oliveira).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Adult male guinea pigs (*Cavia porcellus*) weighing 400–500 g were obtained from the animal care facility of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto (FMRP). The animals ( $n=71$ ) were kept in Plexiglas-walled cages (56 cm  $\times$  37 cm  $\times$  39 cm, five animals per cage) in a room maintained at  $24 \pm 1$  °C, on a 12-h light cycle, with free access to water and food. The experiments were carried out in compliance with the recommendations of the Brazilian Association for Laboratory Animal Science (COBEA), which are based on the US National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. The experimental procedures were approved (Proc. no. 069/2007) by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. All efforts were made to minimise animal suffering. The guinea pigs were selected for this study since they are considered moderately susceptible to tonic immobility [29].

### 2.2. Tonic immobility recording

In the present study, each animal was subjected to five control procedures of TI induction, and the duration of the episodes was recorded. Induction of TI was performed by holding the animal around the thorax with the hands, quickly inverting it and pressing it down into a V-shaped plywood trough (30 cm  $\times$  17 cm  $\times$  17 cm). The restraint and postural inversion maneuvers used in the laboratory are an attempt to simulate the preying condition. This restraining was applied by the hands of the experimenter and it was proportional to the resistance offered by the animal to the induction of TI. When the animal stopped moving, the experimenter slowly withdrew his hands and a chronometer was activated to measure the duration (in seconds) of the response, which ended when the animal resumed an upright position. If the animal did not become motionless within 60 s, the episode was recorded as having zero duration. For group analyses, the mean of five episodes per animal was considered.

### 2.3. Surgical procedures

One day after the control TI episode, the animals were anaesthetised by intramuscular injection of 40 mg/kg ketamine plus 5 mg/kg xylazine and placed in a stereotaxic apparatus (David-Kopf Instruments, USA) with the mouthpiece 21.4 mm below the interauricular line. A guide cannula (14 mm long and 0.6 mm outer diameter, prepared from a hypodermic needle) was implanted into the ACC (experiments 1 and 2) and into the dPAG (experiment 2). Stereotaxic coordinates for the ACC were 3.2–1.1 mm rostral to the bregma, 0.2–0.6 mm lateral to the midline, and 4.7 mm above the intraural line. The parameters for the dPAG were 9.4–9.8 mm caudal to the bregma, 0.6–0.8 mm lateral to the midline, and 3.2–3.4 mm above the intraural line. These references were obtained from the Rössner atlas [44] for guinea pigs. The guide cannula was lowered to a depth of 1 mm above the target region and fixed to the skull by means of autopolymerising resin and an additional anchoring screw. All animals were allowed to recover from surgery for 6–7 days. The choice of the ACC region as a site for microinjecting was the anterior region of the ACC which is more related with the modulation of responses involved in emotional contexts [15,53].

### 2.4. Experimental procedures

After recovery from surgery for 6–7 days, the different animal groups were subjected to a TI session with cannulas implanted into the ACC (experiment 1) and into the ACC plus dPAG (experiment 2) and then microinjected with the drugs and subjected to the TI procedure.

In experiment 1, we tested the effect of DLH (DL-homocysteic acid (DLH) and of the MK-801 microinjection into the ACC on TI duration. In this experiment, the animals for which the cannula was implanted in the ACC were assigned to one of four groups. In group 1 ( $n=8$ ), the animals were microinjected with saline (0.2  $\mu$ l); in group 2 ( $n=11$ ), the animals were microinjected with DLH (30 nmol/0.2  $\mu$ l); in group 3 ( $n=10$ ), the animals were microinjected with MK-801 (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l) followed 1 min later by DLH (30 nmol/0.2  $\mu$ l); in group 4 ( $n=8$ ), the animals were microinjected with MK-801 (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l).

In experiment 2, we evaluated the role of the functional block of NMDA receptors within dPAG 1 min before the microinjection of DLH into the ACC on the TI duration. In this experiment, the animals were assigned to four groups. In group 1 ( $n=10$ ), the animals were microinjected with saline (0.2  $\mu$ l) into dPAG previously to the DLH (30 nmol/0.2  $\mu$ l) microinjection into the ACC; in group 2 ( $n=8$ ), the animals were microinjected with MK-801 (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l) into the dPAG prior to DLH (30 nmol/0.2  $\mu$ l) microinjection into the ACC; in group 3 ( $n=8$ ), the animals were microinjected with MK-801 (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l) into the dPAG followed 1 min later by saline (0.2  $\mu$ l) into the ACC; in group 4 ( $n=8$ ), the animals were microinjected with saline (0.2  $\mu$ l) into the dPAG 1 min before the microinjection of saline (0.2  $\mu$ l) into the ACC.

Microinjections were performed with a Hamilton microsyringe (5.0  $\mu$ l) connected to a PE-10 polyethylene catheter, which in turn was coupled to a Mizzy needle segment (0.3 mm outer diameter; 1.0 mm longer than the guide cannula). In all experimental groups, a volume of 0.2  $\mu$ l was microinjected over a period of 1 min and the Mizzy needle was left in place for an additional 40 s to avoid reflux.



**Fig. 1.** Photomicrograph of a coronal section of the guinea pig's brain showing the microinjection site into the anterior cingulate cortex (ACC).

### 2.5. Drugs

The drugs used were DLH (DL-homocysteic acid from Aldrich) and MK-801 (maleate salt, from Sigma St. Louis, MO, USA), diluted in saline. The doses were based on studies by Ramos Coutinho et al. [42].

### 2.6. Histological analysis

Following all tests, the injection site was marked by microinjecting 0.2  $\mu$ l of 2% pontamine sky blue dye. Each animal was deeply anaesthetised with sodium pentobarbital and then intracardially perfused with saline followed by 10% formalin. Brains were removed, maintained in formalin solution for 24 h, and cryoprotected in 30% sucrose for at least 48 h. Serial 40  $\mu$ m coronal brain sections were cut using a cryostat ( $-21$  °C), mounted on gelatin-coated slides, and stained with Cresyl Violet (0.25%; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) to localize the positions of the microinjection sites according to the atlas of Rössner atlas [44]. The microinjection sites were evaluated by microscopic examination. Fig. 1 shows a photomicrography of a coronal section representing the microinjection site in ACC.

### 2.7. Statistical analysis

The TI results are reported as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.) for the mean duration of five TI episodes. Data were analysed by a repeated-measures analysis of variance (ANOVA). The degree of freedom of the repeated measure (treatment) was corrected by the Huynh–Feldt  $\epsilon$  parameter. The Duncan test was used to determine the difference between treatments, with the level of significance set at  $P < 0.05$ .

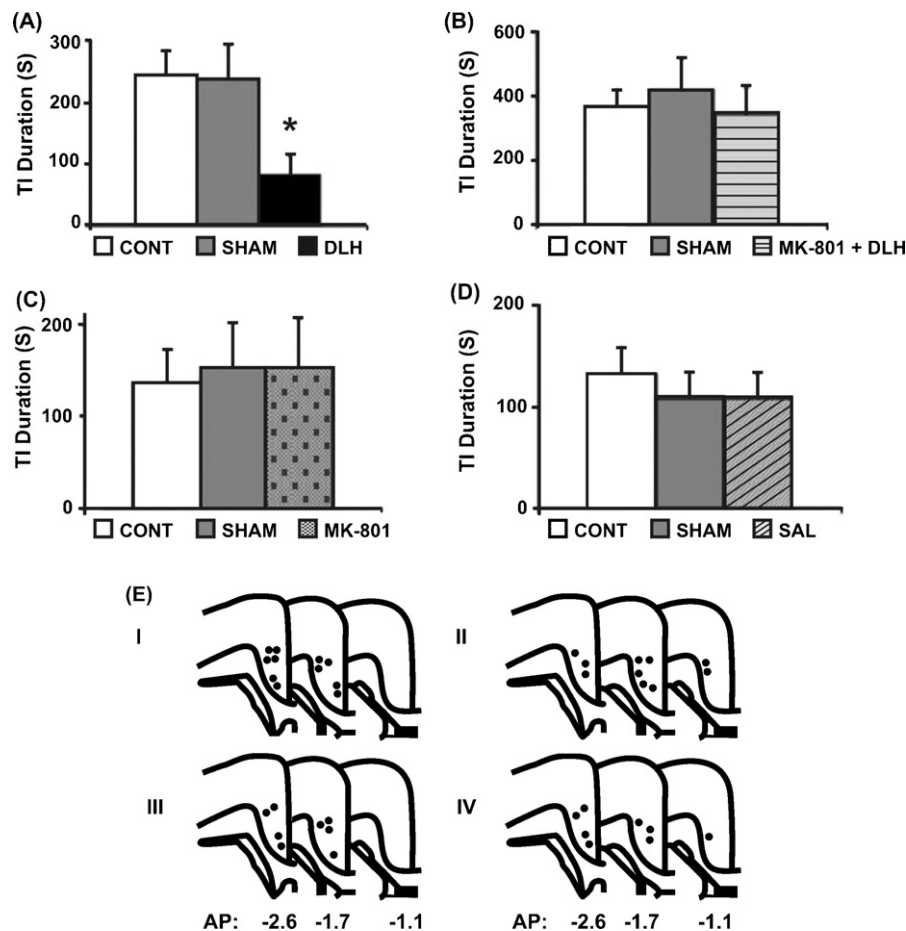
## 3. Results

### 3.1. Experiment 1

Microinjection of DLH (30 nmol/0.2  $\mu$ l) into the ACC promoted a decrease in the duration of TI in guinea pigs and prior application of MK-801 (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l) blocked this response (Fig. 2A and B, respectively). The repeated-measures ANOVA indicated a significant difference between treatments ( $F_{2,20} = 4.07$ ;  $P = 0.033$ ) and a Duncan's post-test showed that treatment with DLH differed from the other treatments (control and sham), which did not differ from one another. In addition, microinjection with either MK-801 alone or saline did not alter the mean duration of TI when compared to the control and sham situations ( $P > 0.05$ ; Fig. 2C and D, respectively). Fig. 2E shows a schematic representation of the microinjection sites in the ACC.

### 3.2. Experiment 2

Microinjection of DLH (30 nmol/0.2  $\mu$ l) into the ACC 1 min after saline (0.2  $\mu$ l) microinjection into the dPAG promoted a decrease in the duration of TI in guinea pigs. The ANOVA for repeated measures



**Fig. 2.** Duration of tonic immobility (TI) episodes. Mean  $\pm$  S.E.M. TI duration under control conditions (CONT), after surgery (SHAM) and after microinjection of different drugs into the anterior cingulate cortex (ACC). (A) TI duration after DLH microinjection (30 nmol/0.2  $\mu$ l;  $n = 11$ ). (B) TI duration ( $n = 10$ ) after MK-801 microinjection (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l) prior DLH microinjection (30 nmol/0.2  $\mu$ l). (C) TI duration after MK-801 microinjection (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l;  $n = 8$ ). (D) TI duration after saline (SAL) microinjection (0.2  $\mu$ l;  $n = 8$ ). \*  $P < 0.05$  compared to CONT and SHAM. (E) Schematic drawing of frontal sections obtained at representative levels of the guinea pig ACC. The filled circles (●) represent the sites where there were microinjections: I, DLH (30 nmol); II, MK-801 + DLH; III, MK-801 (3.6 nmol); IV, saline solution.

indicated a significant difference between treatments ( $F_{2,18} = 8.79$ ;  $P = 0.002$ ) and a Duncan's post-test showed that treatment with saline into the dPAG + DLH into the ACC differed from the other situations (control and sham), which did not differ from one another (Fig. 3A). The application of MK-801 (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l) into the dPAG prior the microinjection of DLH into the ACC blocked this effect (Fig. 3B). In addition, microinjection of MK-801 into the dPAG prior to saline microinjection into the ACC did not alter the mean duration of TI when compared to the control and sham situations ( $P > 0.05$ ; Fig. 3C). Similarly, the microinjection of saline into the dPAG 1 min prior the microinjection of saline into the ACC did not alter the TI duration either (Fig. 3D). Fig. 3E shows a schematic representation of the sites of the dPAG and ACC microinjections.

#### 4. Discussion

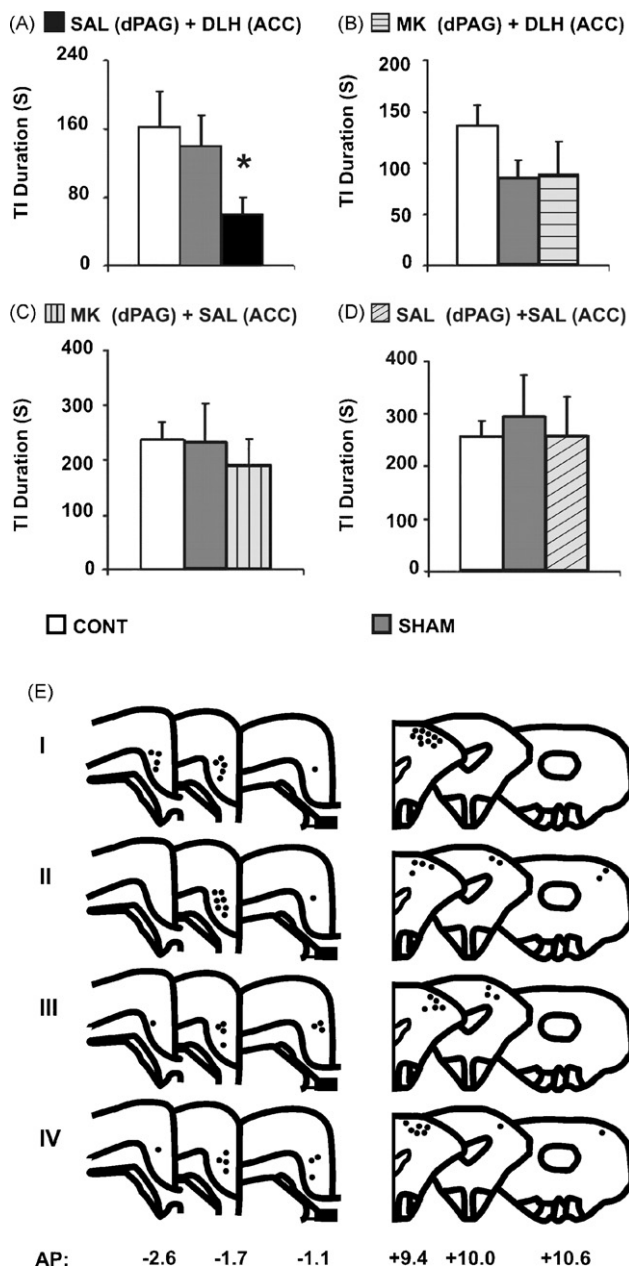
The results of the current study demonstrated that the microinjection of DLH (30 nmol/0.2  $\mu$ l) into the ACC in guinea pigs was capable of reducing the TI duration. This effect was blocked by prior administration of the NMDA antagonist, MK-801 (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l), into the ACC or dPAG. Thus, the results provide new insights into the possibility that glutamatergic activity in the ACC is capable of modulating the TI response by NMDA receptors present in the ACC and dPAG.

Considering that the TI response is a reaction elicited in intensely stressful and fear-inducing situations [20], the present results reinforce the idea that the ACC is an important neural substrate

involved with mediation of responses associated with aversive circumstances [15,25,32,39,49]. Furthermore, the current results also suggest that the EAA and its NMDA receptor in the ACC play a role in adjusting these responses. According to Bozkurt et al. [6], the density of glutamatergic receptors in whole primate cingulate cortex is significantly higher than the great majority of the other receptors evaluated in their study. This is likely indicative of the importance of glutamatergic receptors relative to all other receptors evaluated by the authors in activities modulated by this substrate. For example, studies by Tang et al. [49] showed that glutamatergic stimulation of the ACC in mice contributed to the elevated expression of pain-related fear memory. Results from a study by Pietersen et al. [39] showed that fear conditioning in rats produced an increase in the expression of the freezing response as well as *c-fos* expression in the ACC. The systemic administration of the NMDA receptor antagonist abolishes both effects. The application of the NMDA receptor antagonist directly into the ACC also blocks increases in pain-related aversion responses and the consequent enhancement of *c-fos* activity in the ACC [32]. According to Johansen and Fields [25], ACC stimulation by homocysteic acid is sufficient to generate an aversive teaching signal in rats.

In the current study, the results showed that glutamatergic stimulation in the ACC produces a reduction of the TI duration. It has been established that the ACC is involved with the processing of anticipative reactions, with the ultimate goal being that the animal avoids the potential danger or prepares against inevitable threat [15,26,38,39,40]. Thus, the ACC seems to mod-





**Fig. 3.** Duration of tonic immobility (TI) episodes. Mean  $\pm$  S.E.M. TI duration under control conditions (CONT), after surgery (SHAM) and after different drugs microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter (dPAG) 1 min before the microinjections of different drugs into the anterior cingulate cortex (ACC). (A) TI duration ( $n=10$ ) after saline microinjection into dPAG prior DLH microinjection (30 nmol/0.2  $\mu$ l) into ACC. (B) TI duration ( $n=8$ ) after MK-801 microinjection (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l) into the dPAG prior DLH microinjection (30 nmol/0.2  $\mu$ l) into the ACC. (C) TI duration ( $n=8$ ) after MK-801 microinjection (3.6 nmol/0.2  $\mu$ l) into the dPAG prior saline solution microinjected into ACC. (D) TI duration ( $n=8$ ) after saline (SAL) microinjection (0.2  $\mu$ l) into the dPAG prior saline solution microinjected into ACC. \* $P < 0.05$  compared to CONT and SHAM. (E) Schematic drawing of frontal sections obtained at representative levels of the guinea pig ACC and dPAG. The filled circles (●) represent the sites where there were microinjections: I, saline into the dPAG + DLH (30 nmol) into the ACC; II, MK-801 into the dPAG + DLH into the ACC; III, MK-801 (3.6 nmol) into the dPAG + saline solution into the ACC; IV, saline solution into the dPAG + saline solution into the ACC.

ulate aversive responses by means of regulating the expression of autonomic, endocrine and behavioural components [12,15,38] that act to increase alertness, reactivity and attention from the aversive stimulus [22,24,35,48]. The TI response is evoked in a distinct circumstance in which the potential danger becomes an extreme

threat. Moreover, during TI episodes a distinct state of little reactivity from environmental stimulus is evident [29,43]. Therefore, we propose that stimulation of the ACC likely decreased the TI duration via activation of circuitry involved in mediating responses with divergent characteristics from the TI response.

In agreement with this hypothesis, Prestrude [41] carefully evaluated TI responses in puppies from different species and concluded that an increase in the level of neocortex complexity produces inhibitory effects on the TI duration. In addition, the functional block of the cortex, including the ACC, facilitates the TI duration in rats [50]. In posttraumatic stress disorder patients that reported a TI-like response, the ACC activity may also be reduced, since the exaggerated emotional responses in these patients have been associated with dysfunction and low activity of this neural substrate [23,28,46].

According to Klemm [29,30], the principal mechanisms involved with the control of TI are present in the brainstem and are suppressed by neo-cortical structures. In situations of extreme fear associated with prolonged physical contact between prey and predator, this inhibitory system from neo-cortical structures becomes inhibited by an increase in the activity of the thalamic and limbic nuclei. Hence, it is plausible that during the expression of TI responses, the ACC is also inhibited and permitting the influence of the inhibitory system in the brainstem that is directly implicated in the maintenance of TI episodes. In the present study, the ACC was stimulated by DLH microinjection. Based on the arguments described above, a reduction in the duration of TI episodes was expected.

Another potential explanation for the reduction of the TI response by DLH microinjection in ACC is the possible activation of circuitry directly implicated in vigorous defence responses. According to An et al. [2], Floyd et al. [17] and Shipley et al. [47] there are robust efferences from the ACC to the lateral and dorsal PAG. These regions have been considered as the final common pathway to active strategies of defensive responses, since the electrical and chemical stimulus clearly evoke responses of fight and flight in cats and rats [1,3,7,10,52]. Furthermore, it has been described that dPAG stimulation triggers activation of descending pathways that travels to important areas that are considered essential for mediating autonomic and somatomotor responses of active defence behaviour [27]. Thus, it is reasonable to consider the possibility that at least a portion of the contribution of the ACC in several defence responses may be affected by recruitment of dPAG neurons. According to Key and Bandler [27], the ACC and the dPAG are present in the same system, which is mainly activated when an individual is faced with aversive situations without physical contact—"psychological stress".

Considering the TI response, the ACC and dPAG also seem to constitute the same neural network. The stimulation of both the ACC (current study) and dPAG [42] using the DLH (30 nmol) microinjection reduces TI episodes in guinea pigs. Moreover, as previously mentioned, the microinjection of an NMDA receptor antagonist into the dPAG blocks the decrease of TI duration produced by DLH microinjection in the ACC. Retrograde trace techniques combined with immunohistochemical staining for glutamate have demonstrated that the cingulate cortex sends one of the most robust projections of EAA to the dPAG [5]. These data suggest that the dPAG may be involved in the modulation of the behavioural responses triggered by the ACC. Vocalisation responses, for example, elicited by electrical stimulation of the ACC, may be abolished by administration of an NMDA antagonist into the PAG [31].

Since the dPAG is activated by ACC stimulation, it is reasonable to hypothesise that it contributes to diminishing the TI response by recruiting the more caudal substrates in the medullary region, such as the nucleus raphe magnus (NRM), for instance. It has been reported that descending projections to the lower brainstem



provide the essential substrates for PAG-mediated active coping strategies [27]. Moreover, Da Silva and Menescal-de-Oliveira [13] showed that the stimulation of the NRM by carbachol, a cholinergic agonist, is capable of diminishing the TI response. According to Beitz [4], EAA microinjection into the rat PAG releases EAA in the NRM by a PAG-NRM pathway. Furthermore, a review by Keay and Bandler [27] suggests that the PAG-NRM pathway regulates several autonomic and somatomotor responses present in various defensive behaviours. This regulation may be achieved by activation of distinct neuronal populations within the NRM, or by inhibitory or excitatory effects of different neurotransmitters released into this nucleus.

Although activation of the dPAG promoted by stimulation of the ACC might have been effected via direct connections between these two neural substrates [2,17,31,47,54], we should not dismiss the possibility that this action occurs by indirect pathways. According to Devinsky et al. [15], the ACC, PAG and the amygdaloid complex are included in the same neural network – the rostral limbic system – that is involved in the modulation of several functions. In addition, several studies have shown direct neural connections from the ACC to the basolateral amygdala nucleus [9,21] and between the basolateral amygdala nucleus to the dPAG [2]. Leite-Panissi et al. [33] demonstrated that stimulation of the serotonergic basolateral amygdala nucleus is also capable of decreasing TI episodes. Taken together, this evidence supports the notion that the effect produced by stimulation of the ACC on the TI response depends on the integrity of neurons from the dPAG, which may be mobilised directly and/or by means of another nucleus, such as the basolateral amygdala, for example.

Interestingly, Mobbs et al. [37] and Maren [34] showed that distant aversive stimuli are capable of increasing ACC activity in humans and rats. Moreover, Thompson et al. [51] and Gallup et al. [19,20] suggested that the perception of predator withdrawal constitutes an important stimulus for disrupting the TI response. In the present study, we demonstrated that ACC stimulation by DLH microinjection diminishes the TI duration. Taken together these data provide support for the idea that the perception of predator withdrawal may contribute to activation of the ACC in the prey during expression of the TI response. This possible activation may be important for earlier disruption of the TI response and for achieving a possible escape response. Within this context, the NMDA receptors in the ACC and dPAG may be relevant, since blocking them using previous MK-801 microinjection prevents the effect produced by DLH stimulation in the ACC.

The current research demonstrated that DLH microinjection in the ACC reduces the TI duration in guinea pigs. This effect is blocked by previous administration of the NMDA receptor antagonist, MK-801, in the ACC or in the dPAG. These results provide new insights into the existence of glutamatergic activity in the ACC that is capable of modulating the TI response by means of NMDA receptors in this structure. In addition, this modulation appears to be dependent on direct or indirect glutamatergic connections with the dPAG that act by NMDA receptors present in this substrate.

## Acknowledgements

We would like to thank Mrs. Mariulza Rocha Brentegani and Mr. Rubens Fernando de Melo for technical assistance and histological processing. This work was supported by CAPES and FAPEA.

## References

- [1] Aguiar DC, Moreira FA, Guimaraes FS. Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-D-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;83:296–301.

- [2] An X, Bandler R, Ongur D, Price JL. Prefrontal cortical projections to longitudinal columns in the midbrain periaqueductal gray in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 1998;401:455–79.
- [3] Bandler R, Shipley MT. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci* 1994;17:379–89.
- [4] Beitz AJ. Relationship of glutamate and aspartate to the periaqueductal gray-raphe magnus projection: Analysis using immunocytochemistry and microdialysis. *J Histochem Cytochem* 1990;38:1755–65.
- [5] Beitz AJ, Williams FG. Localization of putative amino acid transmitters in the PAG and their relationship to the PAG-Raphe magnus pathway. In: Depaulis A, Bandler R, editors. *The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization*. New York: Plenum Press; 1991. p. 305–27.
- [6] Bozkurt A, Zilles K, Schleicher A, Kamper L, Arigita ES, Uylings HB, et al. Distributions of transmitter receptors in the macaque cingulate cortex. *Neuroimage* 2005;25:219–29.
- [7] Brandao ML, Anseloni VZ, Pandossio JE, De Araujo JE, Castilho VM. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci Biobehav Rev* 1999;23:863–75.
- [8] Bryant RA, Felmingham K, Whitford TJ, Kemp A, Hughes G, Peduto A, et al. Rostral anterior cingulate volume predicts treatment response to cognitive-behavioural therapy for posttraumatic stress disorder. *J Psychiatry Neurosci* 2008;33:142–6.
- [9] Buchanan SL, Thompson RH, Maxwell BL, Powell DA. Efferent connections of the medial prefrontal cortex in the rabbit. *Exp Brain Res* 1994;100:469–83.
- [10] Carrive P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res* 1993;58:27–47.
- [11] Chua P, Krams M, Toni I, Passingham R, Dolan R. A functional anatomy of anticipatory anxiety. *Neuroimage* 1999;9:563–71.
- [12] Critchley HD, Corfield DR, Chandler MP, Mathias CJ, Dolan RJ. Cerebral correlates of autonomic cardiovascular arousal: a functional neuroimaging investigation in humans. *J Physiol* 2000;523:259–70.
- [13] Da Silva LFS, Menescal-de-Oliveira L. Cholinergic modulation of tonic immobility and nociception in the NRM of guinea pig. *Physiol Behav* 2006;87:821–7.
- [14] De Oliveira L, Hoffmann A, Menescal-de-Oliveira L. Participation of the medial and anterior hypothalamus in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. *Physiol Behav* 1997;62:1171–8.
- [15] Devinsky O, Morrell MJ, Vogt BA. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain* 1995;118:279–306.
- [16] Ferreira MD, Menescal-de-Oliveira L. Role of dorsal raphe nucleus 5-HT1A and 5-HT2 receptors in tonic immobility modulation in guinea pigs. *Brain Res* 2009;1285:69–76.
- [17] Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R. Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *J Comp Neurol* 2000;422:556–78.
- [18] Frankland PW, Bontempi B, Tolton LE, Kaczmarek L, Silva AJ. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 2004;304:881–3.
- [19] Gallup Jr G. Tonic immobility: the role of fear and predation. *Psychol Rec* 1977;1:41–61.
- [20] Gallup Jr G, Nash RF, Donegan NH, McClure MK. The tonic immobility response: a predator-induced reaction in chickens. *Psychol Rec* 1971;21:513–9.
- [21] Ghashghaei HT, Hilgetag CC, Barbas H. Sequence of information processing for emotions based on the anatomic dialogue between prefrontal cortex and amygdala. *Neuroimage* 2007;4:905–23.
- [22] Graeff FG. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res* 1994;27:811–29.
- [23] Hamner MB, Lorberbaum JP, George MS. Potential role of the anterior cingulate cortex in PTSD: review and hypothesis. *Depress Anxiety* 1999;9:1–14.
- [24] Han CJ, O'Tuathaigh CM, Van Trigt L, Quinn JJ, Fanselow MS, Mongeau R, et al. Trace but not delay fear conditioning requires attention and the anterior cingulate cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:13087–92.
- [25] Johansen JP, Fields HL. Glutamatergic activation of anterior cingulate cortex produces an aversive teaching signal. *Nat Neurosci* 2004;7:398–403.
- [26] Johansen JP, Fields HL, Manning BH. The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8077–82.
- [27] Keay KA, Bandler R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neurosci Biobehav Rev* 2001;25:669–78.
- [28] Kitayama N, Quinn S, Bremner JD. Smaller volume of anterior cingulate cortex in abuse-related posttraumatic stress disorder. *J Affect Disord* 2006;90:171–4.
- [29] Klemm WR. Neurophysiologic studies of the immobility reflex (“animal hypnosis”). *Neurosci Res* 1971;4:165–212.
- [30] Klemm WR. Behavioral inhibition. In: *Brainstem mechanisms of behavior*. New York: Wiley-Interscience; 1990. p. 489–533.
- [31] Kyuhou S, Gemba H. Injection of orphanin FQ/nociceptin into the periaqueductal gray suppresses the forebrain-elicited vocalization in the guinea pig. *Neurosci Lett* 1999;260:113–6.
- [32] Lei LG, Sun S, Gao YJ, Zhao ZQ, Zhang YQ. NMDA receptors in the anterior cingulate cortex mediate pain-related aversion. *Exp Neurol* 2004;189:413–21.
- [33] Leite-Panissi CR, Ferrarese AA, Terzian AL, Menescal-de-Oliveira L. Serotonergic activation of the basolateral amygdala and modulation of tonic immobility in guinea pig. *Brain Res Bull* 2006;69:356–64.
- [34] Maren S. The threatened brain. *Science* 2007;317:1043–4.

- [35] McRae K, Reiman EM, Fort CL, Chen K, Lane RD. Association between trait emotional awareness and dorsal anterior cingulate activity during emotion is arousal-dependent. *Neuroimage* 2008;41:648–55.
- [36] Menescal-de-Oliveira L, Hoffmann A. The parabrachial region as a possible region modulating simultaneously pain and tonic immobility. *Behav Brain Res* 1993;56:127–32.
- [37] Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, et al. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science* 2007;317:1079–83.
- [38] Nitschke JB, Sarinopoulos I, Mackiewicz KL, Schaefer HS, Davidson RJ. Functional neuroanatomy of aversion and its anticipation. *Neuroimage* 2006;29:106–16.
- [39] Pietersen CY, Bosker FJ, Postema F, Fokkema DS, Korf J, Den Boer JA. Ketamine administration disturbs behavioural and distributed neural correlates of fear conditioning in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006;30:1209–18.
- [40] Ploghaus A, Tracey I, Gati JS, Clare S, Menon RS, Matthews PM, et al. Dissociating pain from its anticipation in the human brain. *Science* 1999;284:1979–81.
- [41] Prestrude AM. Some phylogenetic comparisons of tonic immobility with special reference to habituation and fear. *Psychol Rec* 1977;1:21–39.
- [42] Ramos Coutinho M, Da Silva LFS, Menescal-de-Oliveira L. Modulation of tonic immobility in guinea pig PAG by homocysteic acid, a glutamate agonist. *Physiol Behav* 2008;94:468–73.
- [43] Ratner C. Comparative aspects of hypnosis. In: Gordon JE, editor. *Handbook of clinical and experimental hypnosis*. New York: Macmillan; 1967. p. 550–87.
- [44] Rössner W. *Stereotaktischer hirnatlas vom meerschweinchen*. Munich: Pallas Verlag; 1965.
- [45] Sargeant A, Eberhardt L. Death feigning by ducks in response to predation by red foxes (*Vulpes fulva*). *Am Midl Nat* 1975;94:108–19.
- [46] Shin LM, Whalen PJ, Pitman RK, Bush G, Macklin ML, Lasko NB, et al. An fMRI study of anterior cingulate function in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 2001;50:932–42.
- [47] Shipley MT, Ennis M, Rizvi TA, Behbehani MM. Topographical specificity of forebrain periaqueductal gray: evidence for discrete longitudinally organized input columns. In: Depaulis A, Bandler R, editors. *The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization*. New York: Plenum Press; 1991. p. 417–48.
- [48] Straube T, Schmidt S, Weiss T, Mentzel HJ, Miltner WH. Dynamic activation of the anterior cingulate cortex during anticipatory anxiety. *Neuroimage* 2009;44:975–81.
- [49] Tang J, Ko S, Ding HK, Qiu CS, Calejesan AA, Zhuo M. Pavlovian fear memory induced by activation in the anterior cingulate cortex. *Mol Pain* 2005;1:1–16.
- [50] Teschke EJ, Maser JD, Gallup Jr GC. Cortical involvement in tonic immobility (“animal hypnosis”): effect of spreading cortical depression. *Behav Biol* 1975;13:139–43.
- [51] Thompson R, Foltin RW, Boylan RJ, Sweet A, Graves CA, Lowitz CE. Tonic immobility in Japanese quail can reduce the probability of sustained attack by cats. *Anim Learn Behav* 1981;9:145–9.
- [52] Vianna DM, Borelli KG, Ferreira-Netto C, Macedo CE, Brandao ML. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. *Brain Res Bull* 2003;62:179–89.
- [53] Vogt BA, Vogt LJ, Farber NB. Cingulate cortex and disease models. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. San Diego: Elsevier Academic Press; 2004. p. 705–27.
- [54] Wyss JM, Sripanidkulchai K. The topography of the mesencephalic and pontine projections from the cingulate cortex of the rat. *Brain Res* 1984;293:1–15.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)