

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Eloisa Pavesi

PARTICIPAÇÃO DE ADRENOCEPTORES BETA NO
NÚCLEO PRÉ-MAMILAR DORSAL DO HIPOTÁLAMO
AVALIADA NO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO DE MEDO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez.

Florianópolis, 15 de outubro de 2010.

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

P337p Pavesi, Eloisa
Participação de adrenoceptores beta no núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo avaliada no condicionamento olfatório de medo [tese] / Eloisa Pavesi ; orientador, Antônio de Pádua Carobrez. - Florianópolis, SC, 2010.
113 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Animais - Comportamento. 3. Receptores Adrenérgicos. I. Carobrez, Antonio de Padua. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

Participação de adrenocetores beta no núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo avaliada no condicionamento olfatório de medo

ELOISA PAVESI

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

**Antonio de Padua Carobrez
Presidente (FMC/UFSC)**



**Thereza Christina M. De Lima
(FMC/UFSC)**



**Rui Daniel S. Prediger
(FMC/UFSC)**



**Marcus Lira Brandão
(FFCLRP-USP)**



**Claudio A. B. Toledo
(UNICID-SP)**

**Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC**

Florianópolis, 15 de Outubro de 2010.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez, primeiramente por ter aceitado que eu entrasse em seu grupo de pesquisa, pela confiança, pela amizade ao longo desses anos, todo o apoio e em especial pela sua brilhante orientação... com certeza sem a sua presença seria impossível meu crescimento científico.

Ao prof. Dr. Newton Sabino Canteras, que tão gentilmente me apresentou o PMd. Muito obrigada por toda a sua disponibilidade em sempre tirar minhas dúvidas, me orientar e conduzir na busca do conhecimento neuroanatômico.

Aos professores Dr. Marcus Lira Brandão, Dr. Claudio Toledo, Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima e Dr. Rui Daniel Schröder Prediger, que se propuseram a aceitar o convite em participar da minha banca de defesa.

Aos professores que fizeram parte da minha banca de qualificação, Dr. Leandro José Bertoglio, Dr. Rui Daniel Schröder Prediger e Dr. André Báfica, que me ajudaram durante as discussões do modelo, do protocolo deste estudo, nos conceitos teóricos, que muito contribuíram para a construção desta tese.

Aos demais professores do Departamento de Farmacologia, pela orientação científica e disponibilidade em atenderem aos alunos da pós-graduação quando necessário.

Ao apoio financeiro CAPES, CNPQ e FAPESP. Bem como a Universidade Federal de Santa Catarina, pelo espaço cedido à pesquisa e ao apoio sempre que necessário.

Ao Fabrício Do Monte, um sincero agradecimento pela sua ajuda desde os primeiros dias de lab, por todo o ensinamento e apoio nas cirurgias estereotáxicas, nas dúvidas com as drogas adrenérgicas, e todo o conhecimento científico que me ajudaram a entender o sistema defensivo.

A Ju Kroon, pela sincera amizade de muitos anos, companheirismo e ajuda especial no modelo do condicionamento olfatório.

A Grasi, um agradecimento especial pela grande amizade e ajuda sempre. Muito obrigada pelas horas de perfusões inesquecíveis, pela troca de conhecimento e por todas as idéias e discussões sobre os experimentos.

Aos demais colegas do laboratório labPadua, Xima, Frank, Ju Cavalli, Cris Mochny, Cris Stern, Lucas, Taiane. Com certeza sem a amizade e convívio diário não seria tão bom o tempo no laboratório.

Ao Fabinho, pelas lindas gravuras, que sempre embelezaram nossos trabalhos e apresentações.

As amigas Dra. Sandra Mota-Ortiz e Dra. Marcia Harumi Sukikara, que além da amizade e troca de experiências, ajudaram imensamente nas dúvidas e conceitos de neuroanatomia.

Aos funcionários do departamento de Farmacologia, Diana, Rita, Zu, Pedro e Murilo, sempre dispostos a atenderem nossos pedidos diversos.

A todos os amigos que me acompanharam durante essa jornada, e que indiretamente me ajudaram a concluir mais uma etapa.

A minha família, por todo o apoio e dedicação. Em especial a minha mãe e meu pai, que ajudaram de tantas formas, e a Sabrina, sempre presente. Obrigada pela presença em mais uma etapa da minha vida. Muito obrigada por tudo.

Ao meu amor Marcelo, muito obrigada por estar comigo sempre, confiando, ajudando com as “coisas de computador”, pela paciência, e principalmente por sua dedicação.

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano”

Isaac Newton

Resumo

Palavras-chave: condicionamento olfatório de medo, núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo, adrenoceptores beta.

O condicionamento de medo é um modelo capaz de testar várias etapas das reações comportamentais de animais expostos a situações de perigo. As memórias para odores são geralmente associadas com experiências emocionais, e a associação entre cinco choques elétricos nas patas (estímulo incondicionado, EI) com o odor neutro (estímulo condicionado, EC) é capaz de estabelecer o condicionamento olfatório de medo (COM). O núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo (PMd) dos roedores é uma estrutura chave para o processamento neural das reações de defesa decorrentes da exposição ao predador, e adrenoceptores beta no PMd estão relacionados com estas respostas de medo. O PMd também está envolvido com a expressão das respostas de medo para o odor pareado com choque nas patas. Assim, no presente trabalho o modelo do COM foi utilizado para verificar a participação de adrenoceptores beta no PMd durante a aquisição e a expressão das respostas de medo em ratos. O atenolol (ATE, antagonista adrenérgico beta1, 80 nmol) microinjetado no PMd 10 min antes da fase de aquisição do COM impediu a associação entre o odor neutro (acetato de amila) e o EI. O ATE (10 e 40 nmol) microinjetados 10 min antes da exposição ao odor (EC1) reduziu as respostas de medo provocadas pelo estímulo olfatório, e impediu o condicionamento de segunda ordem associado ao contexto (EC2). Estes resultados sugerem a participação de adrenoceptores beta na aquisição e expressão do COM, de modo similar à redução nas respostas de medo observada ao odor de gato. Foi então investigado se a estimulação farmacológica do PMd promoveria um estado emocional semelhante às mudanças provocadas pela exposição ao predador, e se esta estimulação poderia ser usada como EI, buscando o entendimento da modulação da aquisição do condicionamento de medo e sua expressão comportamental. Ratos foram condicionados pelo pareamento entre a microinjeção de isoproterenol (ISO, agonista beta) no PMd e o odor. O ISO (10 e 40 nmol) induziu a aquisição do COM e o condicionamento de segunda ordem pela ativação de receptores beta1 no PMd, uma vez que o ATE (40 nmol), mas não a butoxamina (antagonista adrenérgico beta2, 10 nmol), microinjetado antes do ISO impediu a associação ISO-EC. De maneira semelhante que no COM decorrente da associação entre odor e choques nas patas, o ATE (40 nmol) no PMd também impediu a expressão do comportamento

defensivo ao EC1 no condicionamento promovido por ISO. A injeção sistêmica de nadolol, um antagonista beta adrenérgico periférico, não impediu o COM promovido por ISO no PMd. Considerando as densas projeções glutamatérgicas do PMd para a matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPd), foi verificado se o bloqueio de receptores NMDA na MCPd poderia interferir com o condicionamento de medo. O antagonista de receptores NMDA (AP5, 6 nmol) na MCPd foi capaz de impedir a aquisição e a expressão do COM promovido por ISO no PMd. Assim, a ativação de adrenoceptores beta1 no PMd é um modelo adequado para mimetizar as mudanças emocionais a ponto de funcionar como EI e promover o COM. Além disso, a ativação do PMd é capaz de mobilizar os mesmo sistemas neurais envolvidos na aquisição e expressão do condicionamento contextual relacionado com o predador.

Abstract

Keywords: olfactory fear conditioning, dorsal preammyllary nucleus, beta-adrenoceptors.

The fear conditioning model is a paradigm able to test frame-by-frame how subjects behave to cope with the various threatening situations. Olfactory memories are often associated with emotional experiences, and olfactory fear conditioning (OFC) has been used as a valuable tool to study fear-related systems. The association of five footshocks with a neutral odor (CS1) is able to establish an OFC. The dorsal preammyllary nucleus (PMd) of rodents is a key brain structure in the neural processing of anti-predatory defensive behavior, and beta-adrenoceptors in the PMd have shown to mediate unconditioned and conditioned responses toward predator odor. Furthermore, PMd has also been shown to mediate the expression of conditioned fear responses to the shock-paired odor. For this reason, cued OFC was conducted to verify the role of adrenoceptors in the PMd during the acquisition and/or the expression of conditioned emotional response. Atenolol (ATE; a beta-1adrenoceptors antagonist) 80 nmol injected in the PMd 10 min before the conditioning session impaired the amyl acetate odor-US (five footshocks) association. Moreover, ATE 10 e 40 nmol injected 10 min before the CS1 exposure, reduced the defensive behavior elicited by the olfactory CS1, and impaired the second order association to the context (CS2) associated to CS1. These results suggest a role of the beta-adrenoceptors in the PMd in the acquisition and expression of OFC, in addition to its well known effects in reducing the defensive responses to predatory odor. In the second set of experiments, it was sought to mimic the internal state changes in response to a predator threat by pharmacologically stimulating the PMd, and could also be used as US and bring new insights to understand the modulation of fear conditioning acquisition and its behavioral expression. Rats were conditioned by pairing which was an intra-PMd microinjection of isoproterenol (ISO; beta-adrenoceptor agonist) with CS1. ISO 10 and 40 nmol induced the acquisition of the OFC and the second order association by activation of beta-1 receptors in the PMd, once ATE40 injected before ISO impaired the ISO-CS conditioning. Furthermore, similar to what had been found for OFC promoted by foot shocks, ATE40 in the PMd also impaired the expression of OFC promoted by ISO. A systemic injection of nadolol, a peripheral beta-blocker, failed to impair the ISO-CS conditioning. Considering the strong glutamatergic projections from the PMd to the dorsal periaqueductal gray (dPAG), it

was tested how the glutamatergic blockade of the dPAG would interfere with the OFC induced by ISO. Accordingly, microinjections of NMDA receptor antagonist (AP5, 6 nmol) into the dPAG were able to block both the acquisition and the expression of the OFC induced by ISO in the PMd. In conclusion, PMd beta-1 adrenoceptors stimulation seems to be a suitable model to mimic predatory threat-induced internal state changes, working as a US to promote OFC. Furthermore, it is able to mobilize the same systems involved in the acquisition and expression of predator related contextual conditioning.

Lista de ilustrações

Figura 1. Diagrama representando as conexões do hipotálamo..	23
Figura 2. Representação esquemática comparando circuitos neurais mediando condicionamento aversivo (esquerdo) e respostas incondicionadas à exposição ao gato (direito).....	28
Figura 3. Fotomicrografia de um corte transversal do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo (PMd) mostrando a marcação da proteína Fos em ratos expostos ao odor de café previamente pareado com choque elétrico nas patas (A) ou em ratos expostos apenas ao odor de café (B).	35
Figura 4. Diagrama esquemático representando o protocolo do condicionamento olfatório de medo.	44
Figura 5. Diagrama esquemático de um corte coronal do encéfalo de rato.....	53
Figura 6. Efeito do atenolol no PMd na aquisição do condicionamento olfatório de medo.	56
Figura 7. Efeito da butoxamina no PMd na aquisição do condicionamento olfatório de medo.	58
Figura 8. Efeito do atenolol no PMd na expressão do comportamento defensivo ao estímulo condicionado olfatório.....	59
Figura 9. Efeito do isoproterenol no PMd em animais expostos ao odor de acetato de amila durante 3 min e 20 s na promoção do condicionamento olfatório de medo.	61
Figura 10. Efeito do isoproterenol no PMd funcionando como um estímulo incondicionado para promover condicionamento olfatório de medo.....	62
Figura 11. Efeito do atenolol e da butoxamina na aquisição do condicionamento olfatório de medo promovido por isoproterenol no PMd.....	64
Figura 12. Efeito do atenolol na expressão do condicionamento olfatório de medo promovido por isoproterenol no PMd.	66
Figura 13. Efeito da injeção sistêmica de nadolol na aquisição do condicionamento olfatório de medo promovido por isoproterenol no PMd.....	67
Figura 14. Efeito do AP5 na MCPd na aquisição do condicionamento olfatório de medo promovido pela microinjeção de isoproterenol no PMd.....	69
Figura 15. Efeito do AP5 na MCPd na expressão do condicionamento olfatório de medo promovido por isoproterenol no PMd.....	71

Figura 16. Diagrama esquemático ilustrando o processamento do condicionamento de medo Pavloviano.....	78
Figura 17. Mecanismo de sinalização adrenérgica.....	80
Figura 18. Diagrama esquemático ilustrando as conexões do sistema defensivo hipotalâmico medial.	89

Lista de tabelas

Tabela 1. Sumário dos neurotransmissores relacionados com as reações de defesa no PMd.	34
---	----

Lista de abreviaturas e siglas

AHN – núcleo hipotalâmico anterior
AMPc – adenosina monofosfato cíclica
AMv – região ventral do núcleo anteromedial do tálamo
ANOVA – análise de variância
AP5 – ácido (\pm)-2-Amino-5-fosfopentanóico
ATE – atenolol
BLA – núcleo basolateral da amígdala
BMAp – parte posterior do núcleo basomedial da amígdala
BSTif – núcleo do leito da estria terminal
BUT – butoxamina
CEA – núcleo central da amígdala
cm – centímetro
COM – condicionamento olfatório de medo
CREB – elemento de ligação a proteína responsivo ao AMPc
EC – estímulo condicionado
EI – estímulo incondicionado
e.p.m. – erro padrão da média
EUA – Estados Unidos da América
GABA – ácido gama-aminobutírico
Gs – proteína G estimulatória
Gi – proteína G inibitória
GLU – glutamato
h – hora
i.p. – intraperitoneal
ISO – isoproterenol
LA – núcleo lateral da amígdala
LC – *locus coeruleus*
LCE – labirinto em cruz elevado
LHA – área hipotalâmica lateral
LS – septo lateral
mA – miliampere
min – minuto
MEApv – parte posteroventral do núcleo medial da amígdala
MCPd – matéria cinzenta periaquedutal dorsal
mm – milímetro
NA – noradrenalina
nmol – nanomolar
NMDA – N-metil-D-aspartato
NTS – núcleo do trato solitário

P – fosfato
PBS – tampão fosfato
PKA – proteína cinase A
PMd – núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo
PMv – núcleo pré-mamilar ventral do hipotálamo
PVH – núcleo paraventricular
RE – núcleo *reuniens* do tálamo
s – segundo
TEPT – transtorno de estresse pós-traumático
TMT – trimetiltiazolína
VMH – núcleo ventromedial do hipotálamo
VMHdm – parte dorsomedial do VMH
 μ l – microlitro
 μ m – micrometro

Sumário

1. Introdução	21
1.1 Ansiedade e comportamento defensivo.....	21
1.2 O hipotálamo e o comportamento defensivo.....	22
1.2.1 O núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo	26
1.3 Condicionamento Pavloviano de medo.....	29
1.3.1 Condicionamento olfatório de medo	32
1.4 O sistema noradrenérgico no condicionamento de medo.....	36
2. Objetivos	40
2.1 Objetivo principal	40
2.2 Objetivos específicos	40
3. Material e Métodos	41
3.1 Animais	41
3.2 Cirurgia estereotáxica.....	41
3.3 Drogas	42
3.4 Microinjeção intracerebral	42
3.5 Modelo Experimental.....	43
3.6 Protocolo Experimental.....	46
3.6.1 Etapa 1 – Efeito do bloqueio dos adrenoceptores beta no PMd nas fases de aquisição e expressão do condicionamento olfatório de medo	46
3.6.2 Etapa 2 – Efeito da ativação de adrenoceptores beta no PMd na aquisição do condicionamento olfatório de medo.....	48
3.7 Perfusão e histologia	52
3.8 Análise Estatística	54
4. Resultados	55
4.1 Etapa 1 – Efeito do bloqueio dos adrenoceptores beta no PMd nas fases de aquisição e expressão do condicionamento olfatório de medo	55
4.1.1 <i>Experimento 1</i> : Efeito do atenolol e da butoxamina na aquisição do condicionamento olfatório de medo.....	55
4.1.2 <i>Experimento 2</i> : Efeito do atenolol na expressão do comportamento defensivo.....	57
4.2 Etapa 2 – Efeito da ativação de adrenoceptores beta no PMd na promoção do condicionamento olfatório de medo.....	57

4.2.1 <i>Experimento 3</i> – Efeito do isoproterenol na aquisição do condicionamento olfatório de medo	57
4.2.2 <i>Experimento 4</i> – Efeito do atenolol e da butoxamina na aquisição do condicionamento olfatório de medo induzido por isoproterenol	63
4.2.3 <i>Experimento 5</i> – Efeito do atenolol na expressão do condicionamento olfatório de medo induzido por isoproterenol	63
4.2.4 <i>Experimento 6</i> – Efeito do nadolol sistêmico na aquisição do condicionamento olfatório de medo induzido por isoproterenol	65
4.2.5 <i>Experimento 7</i> – Participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na MCPd na aquisição do condicionamento induzido por isoproterenol	65
4.2.6 <i>Experimento 8</i> – Participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da MCPd na expressão do condicionamento induzido por isoproterenol	68
5. Discussão	72
6. Conclusões	92
7. Referências bibliográficas	93
8. Apêndice	112

1. Introdução

1.1 Ansiedade e comportamento defensivo

A ansiedade é caracterizada como um estado emocional, que envolve componentes comportamentais, fisiológicos e endócrinos, a um evento com características aversivas (Graeff, 2007; Blanchard e Blanchard, 2008). Sendo assim, a ansiedade é um comportamento normal e necessário para motivar uma ação. Reações de medo e ansiedade são respostas emocionais para eventos aversivos, no entanto a ansiedade estaria mais relacionada a um medo potencial do que a um perigo presente e claro (Blanchard e Blanchard, 2008). A ativação dos sistemas de medo e ansiedade envolve uma série de respostas, como ativação do sistema nervoso autônomo e liberação de hormônios, de valor adaptativo visando reduzir os danos perigosos ao organismo. Assim, do ponto de vista evolutivo, a ansiedade e o medo são emoções partilhadas pelos animais para a manutenção da integridade física e das espécies (Nesse, 1999; 2005).

Entretanto, em algumas situações, a ansiedade pode tornar-se intensa ou permanente, prejudicando as funções fisiológicas e cognitivas, a ponto de gerar respostas a estímulos incorretos que não são necessariamente perigosos. Nesse momento a ansiedade deixa de ser um mecanismo de defesa normal e passa a ser tratada como transtorno de ansiedade (Bremner, Krystal *et al.*, 1996). A qualidade com que um estímulo é percebido como “perigoso” depende de muitos fatores, e inclui desde tendências pré-programadas ou incondicionadas, aprendizados específicos por experiências diretas, ou pela observação de experiências sofridas por outros, bem como alguns estressores passados ou presentes não específicos (Blanchard e Blanchard, 2008). Esses diferentes fatores que fazem com que um estímulo promova medo e ansiedade necessita de modelos comportamentais de ansiedade, sendo que vários modelos e os mais variados estímulos que provocam medo podem ser utilizados.

Charles Darwin já havia relatado em seu trabalho sobre as emoções nos homens e nos animais (Darwin, 1872), que ambos compartilham do mesmo padrão emocional de comportamentos, e por isso o estudo de reações defensivas nos animais em situações de perigo e ameaça permite a analogia da ansiedade exibida pelo homem. Os roedores apresentam diferentes padrões de estratégia comportamental flexível e adaptativa (Blanchard, Yudko *et al.*, 1993). As respostas defensivas exibidas pelos animais variam entre fuga, esquiva, congelamento, ataque defensivo, avaliação de risco, e o ato de

enterrarem objetos potencialmente perigosos. Todos esses comportamentos dependem do contexto onde o estímulo ameaçador é apresentado, podendo ser representado pelo predador, pelo ataque de um co-específico, ou uma característica perigosa do ambiente. As respostas exibidas pelos animais são persistentes, e podem ainda ser condicionadas ao contexto onde foram expostos (Blanchard e Blanchard, 2008).

A investigação das respostas defensivas frente a estímulos aversivos permite a elucidação das bases neurobiológicas do medo. Nos últimos anos uma série de modelos tem sido utilizada em roedores para o estudo da neurobiologia da ansiedade (para revisão, ver Canteras e Blanchard, 2008; McNaughton e Zangrossi, 2008). Os modelos utilizados podem ser classificados em dois grandes grupos, os que utilizam respostas incondicionadas e geram, portanto, padrões comportamentais não aprendidos, e os modelos que necessitam de um condicionamento permitindo a análise das mudanças nos comportamentos aprendidos (Panksepp, 1990).

Com os estudos das respostas defensivas nos animais de laboratório, foi possível identificar e correlacionar as áreas cerebrais envolvidas nos diferentes processos comportamentais do medo. As estruturas formadas pelo hipotálamo medial, amígdala e matéria cinzenta periaquedutal dorsal são reconhecidas por formarem um sistema neural responsável pela geração e elaboração de estados aversivos no encéfalo (Brandão, Anseloni *et al.*, 1999; McNaughton e Corr, 2004). Estudos anatômicos tem demonstrado que estas estruturas são interconectadas, sugerindo um sistema cerebral de defesa altamente organizado (Canteras e Blanchard, 2008). Nesse contexto, será abordado o papel do hipotálamo nas respostas defensivas dos animais.

1.2 O hipotálamo e o comportamento defensivo

O hipotálamo é uma estrutura encefálica responsável por integrar funções endócrinas, autonômicas e comportamentais, críticas para a sobrevivência individual e das espécies (Swanson, 1987). O hipotálamo é uma estrutura altamente organizada, e possui conexões com diferentes estruturas no encéfalo (Fig. 1). Essa organização estrutural contribui para desempenhar sua função na integração das três classes básicas do comportamento motivado para a sobrevivência de todos os animais: ingestivo, reprodutivo e defensivo (Swanson, 1987). O hipotálamo possui como estrutura básica três zonas longitudinais distintas (periventricular, medial e lateral), sendo dividido em quatro níveis rostro-caudais: pré-óptica, anterior, tuberal e mamilar (Swanson, 1987).

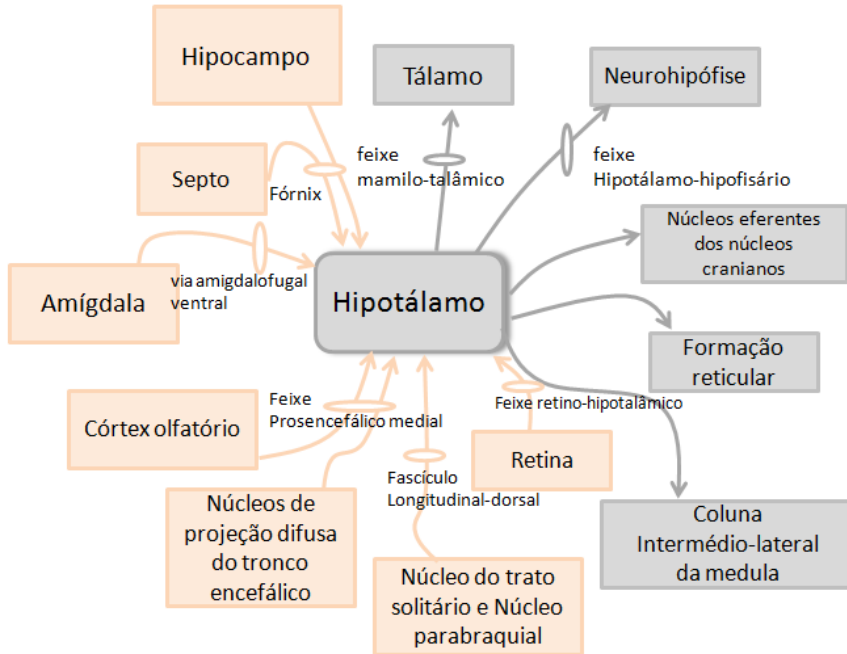


Figura 1. Diagrama representando as conexões do hipotálamo.
Adaptado de Swanson (1987).

Dentre os núcleos do hipotálamo, a zona medial contém uma coluna de grupo celular distinto e inclui, no sentido rostro-caudal, o núcleo pré-óptico medial, núcleo hipotalâmico anterior, núcleo ventromedial, núcleo pré-mamilar dorsal e ventral e corpos mamilares. Esses núcleos em conjunto formam a chamada “coluna de controle comportamental” (Swanson, 2000).

Em relação ao comportamento defensivo, os primeiros estudos no final do século 19 mostraram que animais (cães e gatos) cujo córtex cerebral havia sido removido continuavam apresentando expressão de emoções comportamentais. Experimentos com lesões encefálicas sustentavam a hipótese de que as reações de raiva envolviam uma área compreendida entre a metade caudal do hipotálamo e a região caudal do tálamo ventral, sendo o hipotálamo a estrutura chave para a expressão das emoções (Bard, 1928).

Trabalhos posteriores com estimulação elétrica de vários pontos do diencéfalo de gatos identificaram duas regiões do hipotálamo, a região perifornical e o hipotálamo lateral, como sítios responsáveis em integrar as respostas defensivas (Hilton e Zbrozyna, 1963). Outros trabalhos com estimulação elétrica confirmaram o papel do hipotálamo nas respostas defensivas, e incluíram a amígdala, a estria terminal, o núcleo do leito da estria terminal, e a substância cinzenta periaquedutal (Hunsperger, 1956; Fernandez De Molina e Hunsperger, 1962). Entretanto, foram Wasman e Flynn que afirmaram que o comportamento defensivo seria primeiramente produzido por sítios do hipotálamo medial (Wasman e Flynn, 1962). Outros estudos em macacos (Delgado, 1964) e roedores (Panksepp, 1971b; a) confirmaram que o hipotálamo medial, particularmente o núcleo ventromedial, estava envolvido no comportamento defensivo.

Já na década de 80, trabalhos em roedores mostraram que a inibição da neurotransmissão inibitória GABAérgica (Di Scala, Schmitt *et al.*, 1984; Schmitt, Di Scala *et al.*, 1985; Brandão, Di Scala *et al.*, 1986; Milani e Graeff, 1987) ou estimulação elétrica (Yardley e Hilton, 1986) no hipotálamo medial promovia um padrão de respostas autonômicas e somáticas e expressão de comportamento defensivo. Apesar da injeção de aminoácido excitatório glutamato no hipotálamo medial ter falhado em promover respostas defensivas (Bandler, 1982), a injeção do aminoácido excitatório ácido caínico nessa região promoveu uma série de respostas comportamentais nos ratos semelhantes às expressões visualizadas quando esses eram expostos a um predador natural (Silveira e Graeff, 1992). Em conjunto, esses resultados indicariam que o hipotálamo medial contém grupos de neurônios que

comandam o comportamento defensivo e que são tonicamente inibidos pela neurotransmissão GABAérgica. Nesse contexto, já foi demonstrado que a neurotransmissão GABA também é responsável em controlar respostas de medo para estímulos condicionados em núcleos localizados nas áreas rostrais do hipotálamo medial (Santos, Macedo *et al.*, 2008).

Apesar dos trabalhos com estimulação apontarem o hipotálamo medial como a estrutura chave em orquestrar as respostas defensivas, esses métodos são inadequados em delimitar as estruturas que participam do circuito defensivo. Na década de 90, utilizando técnicas experimentais de traçamento para estudar as conexões do hipotálamo medial, foram identificados três núcleos fortemente interconectados, o núcleo hipotalâmico anterior (AHN), a parte dorsomedial do núcleo hipotalâmico ventromedial (VMHdm) e o núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) (Canteras e Swanson, 1992; Canteras, Simerly *et al.*, 1994; Risold, Canteras *et al.*, 1994). Esse circuito, nomeado como sistema defensivo hipotalâmico medial, foi primariamente associado com a integração das respostas defensivas ao predador natural (Canteras, Chiavegatto *et al.*, 1997; Canteras, 2002; Canteras, 2008; Canteras e Blanchard, 2008). Assim, a apresentação dos roedores ao gato induz uma série de comportamentos de congelamento, fuga, avaliação de risco, acompanhado pelo aumento da expressão de Fos (um marcador da ativação neuronal) apenas nessas três estruturas, o AHN, o VMHdm e o PMd (Canteras, Chiavegatto *et al.*, 1997; Cezario, Ribeiro-Barbosa *et al.*, 2008). Esse mesmo circuito apresenta-se ativado na exposição ao odor de gato (Dielenberg, Hunt *et al.*, 2001). Além de serem interconectados, os núcleos do sistema defensivo hipotalâmico medial recebe e envia aferências para outras estruturas não hipotalâmicas que participam igualmente do comportamento defensivo, dentre elas, a amígdala, o núcleo do leito da estria termina, o hipocampo, o córtex pré-frontal, o septo lateral e a substância cinzenta periaquedutal (Canteras, 2002).

Dentre essas estruturas, o PMd é o sítio que apresenta o maior aumento de expressão de Fos, tanto na exposição ao gato quanto ao odor de gato (Canteras, Chiavegatto *et al.*, 1997; Dielenberg, Hunt *et al.*, 2001), e lesões nesse núcleo reduzem drasticamente as respostas defensivas ao predador natural (Canteras, Chiavegatto *et al.*, 1997; Blanchard, Li *et al.*, 2003). Por isso, muitos estudos tem investigado a participação do PMd dentro do sistema defensivo hipotalâmico medial.

1.2.1 O núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo

O PMd, como já foi mencionado, é uma estrutura chave dentro do sistema defensivo hipotalâmico medial. A ativação do PMd foi relacionada com a exposição ao gato ou seus odores (Canteras, Chiavegatto *et al.*, 1997; Dielenberg, Hunt *et al.*, 2001; Blanchard, Canteras *et al.*, 2005), mas não está associado com outros odores aversivos, como o TMT (trimetiliazolina), um composto sintético isolado de fezes de raposa, que apesar de ser muito utilizado para mimetizar o odor de predador, não promove a ativação das estruturas do sistema defensivo hipotalâmico medial (Staples, McGregor *et al.*, 2008). Além desses estudos em ratos, o mesmo padrão de ativação do PMd frente a uma pista aversiva é encontrado em camundongos quando esses são expostos ao predador natural, o rato (Martinez, Carvalho-Netto *et al.*, 2008), indicando que a especificidade do circuito defensivo estaria preservada em diferentes espécies. De maneira similar, o PMd também é importante na expressão das respostas de medo quando os animais subordinados são confrontados com o dominante da mesma espécie (Motta, Goto *et al.*, 2009).

Estudos com lesões eletrolíticas ou por ácido ibotênico no PMd impediram a expressão das respostas defensivas frente as pistas do predador (Canteras, Chiavegatto *et al.*, 1997; Blanchard, Li *et al.*, 2003; Blanchard, Canteras *et al.*, 2005), mas não impediram a habilidade dos roedores em detectarem outras pistas olfatórias não aversivas, como a percepção de feromônios do sexo oposto (Markham, Blanchard *et al.*, 2004). Assim, o PMd dentro do circuito de defesa parece participar apenas na detecção dos odores aversivos de predadores.

Os núcleos hipotalâmicos AHN e VMHdm enviam densas projeções bilaterais para o PMd (Canteras e Swanson, 1992; Canteras, Simerly *et al.*, 1994; Risold, Canteras *et al.*, 1994). Este tipo de arranjo sináptico permite ao PMd servir como um amplificador dos processos neurais hipotalâmicos processando as vias relacionadas ao predador.

Além da forte expressão de proteína Fos durante a exposição ao gato, a ativação do PMd ocorre também após exposição ao contexto associado ao gato, sugerindo que o PMd é responsável pelo processamento aversivo ao predador e também participa no processo de formação de memória aversiva contextual (Canteras, Ribeiro-Barbosa *et al.*, 2001; Cezario, Ribeiro-Barbosa *et al.*, 2008). Lesões químicas específicas ao corpo celular do PMd eliminam totalmente as respostas de medo ao contexto associado com o predador, como o comportamento de escape, congelamento e avaliação de risco, (Canteras, Chiavegatto *et*

al., 1997; Cezario, Ribeiro-Barbosa *et al.*, 2008; Carvalho-Netto, Martinez *et al.*, 2010).

Alguns estudos já comprovaram a participação de diferentes neurotransmissores no PMd envolvidos nesse papel de detecção das pistas relacionadas com o predador. As respostas defensivas podem ser impedidas com o bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, e a redução das respostas defensivas é acompanhada por diminuição da ativação neuronal do PMd (Beijamini e Guimarães, 2006). Um trabalho recente do nosso laboratório demonstrou que o bloqueio de receptores NMDA do PMd foi capaz de bloquear tanto a expressão das respostas comportamentais a exposição ao odor de gato, quanto o condicionamento ao contexto onde o odor de gato havia sido apresentado (Canteras, Kroon *et al.*, 2008), fortalecendo a hipótese de que receptores glutamatérgicos nessa região são essenciais para a expressão das respostas comportamentais aos perigos do ambiente. Além da neurotransmissão glutamatérgica, o óxido nítrico poderia ser outro potencial neurotransmissor envolvido no processamento das respostas defensivas ao estímulo de predador (Beijamini e Guimarães, 2006). Recentemente foi demonstrado que receptores adrenérgicos do PMd também são importantes tanto para a expressão do comportamento defensivo frente ao odor de predador, como no condicionamento ao contexto associado ao predador (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008).

O PMd não está envolvido com o comportamento defensivo em modelos que utilizam outros estímulos aversivos diferentes das pistas relacionadas com o predador, como no condicionamento contextual com choque elétrico nas patas, no labirinto em cruz elevado (Blanchard, Li *et al.*, 2003), ou na resposta de sobressalto potencializada pelo medo (Santos, Macedo *et al.*, 2008). Corroborando com essa idéia, estudos com condicionamento aversivo clássico que utilizam o som como estímulo condicionado não apresentam ativação de proteína Fos no PMd (Pezzone, Lee *et al.*, 1992; Smith, Banerjee *et al.*, 1992). Como pode ser visualizado na figura 2, o PMd, dentro do sistema defensivo hipotalâmico medial, seria um elo importante na mediação das respostas defensivas às pistas provenientes do predador natural ou ao contexto associado. Porém, em relação ao comportamento defensivo promovido pela associação de estímulo incondicionado, outras estruturas encefálicas parecem ser mais importantes, como a amígdala lateral e basolateral (Ledoux, 2000).

Assim, o PMd parece ser específico apenas para a expressão e associação de respostas de medo associadas a perigos ambientais de

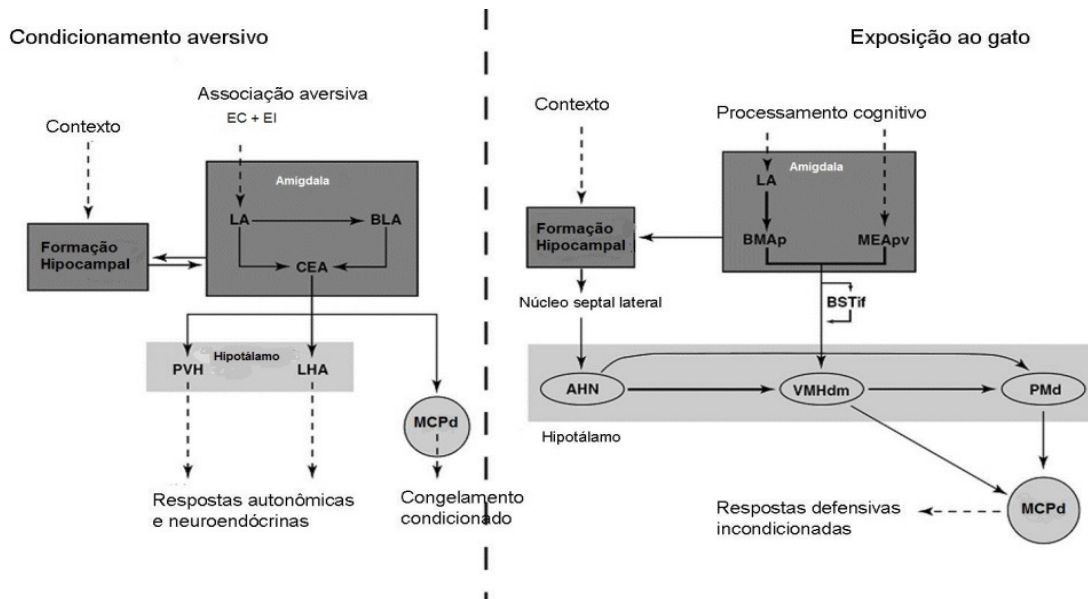


Figura 2. Representação esquemática comparando circuitos neurais mediante condicionamento aversivo (esquerdo) e respostas incondicionadas à exposição ao gato (direito). Legenda: AHN, núcleo hipotálamico anterior; BLA, núcleo basolateral da amígdala; BMAp, parte posterior do núcleo basomedial da amígdala; BSTif, núcleo do leito da estria terminal; CEA, núcleo central da amígdala; EC, estímulo condicionado; EI, estímulo incondicionado; LA, núcleo lateral da amígdala; LHA, área hipotalâmica lateral; MEApv, parte posteroventral do núcleo medial da amígdala; MCPd, matéria cinzenta periaquedutal dorsal; PMd, núcleo pré-mamilar dorsal; PVH, núcleo paraventricular; VMHdm, parte dorsomedial do núcleo ventromedial. Adaptado de Canteras (2008).

predadores. Neste trabalho, buscou-se investigar a participação do PMD nas respostas de medo associados com odor aversivo no condicionamento olfatório de medo.

1.3 Condicionamento Pavloviano de medo

O condicionamento Pavloviano, ou condicionamento clássico, foi proposto pelo investigador Pavlov, no início do século 20. Nos estudos para entender o processo de salivação mediante a apresentação da comida, também chamada de resposta incondicionada, Pavlov percebeu que o animal poderia prever a apresentação da comida pela simples associação a pistas, como o toque de uma campainha. Assim, Pavlov percebeu que o estímulo neutro (EN, som da campainha) poderia ser associado ao estímulo incondicionado (EI, comida), e assim passar a ser um estímulo condicionado (EC) e promover a resposta de salivação, ou seja, respostas condicionadas.

Em humanos, um estudo pioneiro mostrando a capacidade de promover condicionamento data de 1920. Watson e Rayner condicionaram respostas de medo em uma criança de nove meses, o pequeno Albert. Eles fizeram algumas associações entre um som alto, que promovia reação de medo na criança, a um rato branco (estímulo neutro), e após algumas associações a apresentação do rato ou objetos peludos similares promovia as respostas de medo condicionadas (Watson e Rayner, 1920). Com esse estudo, o condicionamento Pavloviano de medo ficou conhecido por também ser aplicado a humanos. Em estudos posteriores, em roedores, Skinner adaptou o condicionamento Pavloviano com comportamentos em progresso, mostrando que um som que havia sido pareado com choque elétrico nas patas adquiria a habilidade de suprimir um comportamento. Assim, os ratos aprendiam que ao pressionar uma barra, após a apresentação de um som condicionado, o choque elétrico nas patas não aconteceria (Estes e Skinner, 1941).

Nos últimos anos grandes avanços no conhecimento de memórias traumáticas foram observados sobre as características comportamentais e mecanismos neurais da aquisição de eventos aversivos. Muito desse progresso pode ser atribuído ao modelo do condicionamento de medo Pavloviano. Diferente das respostas de medo a estímulos incondicionados, o condicionamento Pavloviano de medo envolve a geração de reações defensivas para estímulos que predizem uma consequência aversiva. As recentes pesquisas realizadas com o condicionamento Pavloviano tem sido úteis para delimitar a nível anatômico, celular e molecular nos substratos do aprendizado aversivo

(Ledoux, 2000; Maren, 2001). O início da percepção de muitas reações emotivas são produtos de condicionamento.

No condicionamento aversivo clássico um estímulo inicialmente neutro (isto é, o EN, como som, luz, ou mesmo um odor), ao ser pareado com um estímulo incondicionado aversivo (EI, como o choque elétrico das patas) adquire caráter emocional relevante, podendo provocar respostas condicionadas na ausência do EI (Kim e Fanselow, 1992; Gewirtz e Davis, 2000; Ledoux, 2000). O choque nas patas promove uma série de respostas autonômicas, ou respostas de medo incondicionado. Após alguns pareamentos, a presença do EC é capaz de provocar uma resposta emocional condicionada. Nos roedores, as respostas de medo podem ser caracterizadas pelo congelamento (cessação total dos movimentos, exceto dos necessários para a respiração), aumento na amplitude de uma resposta de medo a um som elevado (sobressalto potencializado pelo medo), aumento da pressão sanguínea, hipotalgesia, mudanças na frequência respiratória, emissão de vocalização ultrassônica, esquiva de lugares onde o choque ocorreu, entre outras respostas defensivas, além da liberação de hormônios do estresse (Helmstetter, 1992; Watkins, Wiertelak *et al.*, 1993; Fendt e Fanselow, 1999; Ledoux, 2000; Walker e Davis, 2002b). Assim, as associações com diferentes estímulos aversivos permitem aos animais identificar e evitar perigos ambientais potenciais. As respostas de medo condicionadas podem ser geradas pela associação de um único pareamento EN-EI (Anagnostaras, Josselyn *et al.*, 2000; Frankland, Josselyn *et al.*, 2004), ou após várias associações (Rodrigues, Farb *et al.*, 2004; Kroon e Carobrez, 2009), e podem persistir por um longo intervalo de vida do animal (Gale, Anagnostaras *et al.*, 2004).

Geralmente, nos modelos de condicionamento de medo clássico, os pesquisadores utilizam o choque elétrico nas patas como EI, mas o condicionamento não está limitado apenas para este estímulo. Outros EI também podem dar suporte ao condicionamento aversivo, dentre eles um som alto (Leaton e Cranney, 1990), inalação de dióxido de carbono (Mongeluzi, Rosellini *et al.*, 1996), e a apresentação do predador, que pode condicionar o contexto associado (Dielenberg e McGregor, 2001), ou substâncias que causam náuseas, como o cloreto de lítio (Guitton e Dudai, 2004), drogas que induzem um estado ansiogênico, como o pentilenotetrazol (Cavalli, Bertoglio *et al.*, 2009), ou mesmo a ativação direta de estruturas cerebrais que causam aversão, podem ser pareados a pistas na mesma dimensão que o choque elétrico nas patas (Di Scala, Mana *et al.*, 1987).

No condicionamento Pavloviano de medo várias etapas do processo podem ser estudadas em uma análise longitudinal da resposta comportamental. As reações provocadas pelo EC são geralmente medidas durante as sessões de aquisição e expressão. A aquisição é um aprendizado inicial de uma associação entre o EN e o EI durante as sessões de treino do condicionamento aversivo, quando o animal aprende primeiro a associar os dois estímulos. O teste de expressão, ou evocação, envolve uma sessão onde o EC é apresentado sozinho. O teste de expressão que ocorre dentro de poucas horas após a aquisição mede a memória de curta-duração (MCD), enquanto os testes realizados em intervalos maiores (geralmente 24 h após o aprendizado) medem a memória de longa-duração (MLD). Os testes de MCD e MLD são usados para estudar a consolidação da memória, um processo em que a memória instável de MCD é convertida em uma memória mais estável MLD (McGaugh, 2000; Dudai, 2004; Rodrigues, Schafe *et al.*, 2004). Além disso, os testes da etapa de expressão também são usados para estudar o processo de reconsolidação. A reconsolidação ocorre quando a memória aversiva é evocada e entra em um estado lábil que requer a estabilização, via síntese de proteína, para persistir e se tornar uma MLD (Nader, Schafe *et al.*, 2000; Nader, 2003; Dudai, 2006). Os testes de expressão também podem ser utilizados para medir o processo de extinção, que é a redução gradual da habilidade do EC em provocar respostas de medo condicionadas, e a extinção ocorre quando o EC é apresentado repetidamente na ausência do EI (Berlau e McGaugh, 2006; Quirk e Mueller, 2008). Outro ponto que pode ser estudado nos modelos de condicionamento Pavloviano de medo é o condicionamento de segunda ordem. Rescorla e Gillan, em 1980, identificaram pela primeira vez o processo de associação de segunda ordem, em estudos relacionados à formação de aprendizados associativos entre estímulos (Rescorla e Gillan, 1980). Nesse processo, as características aversivas do EC passam a ter valor motivacional tão relevante que podem substituir o EI. Assim, no condicionamento de segunda ordem, o EC pode ser associado a novas pistas, como um som, odor, luz, ou mesmo o contexto (EC2) e promover assim um novo condicionamento. Esse EC2, após ser pareado com o EC, pode gerar respostas defensivas por si, e sofrer todos os processos de consolidação, reconsolidação e extinção (Gewirtz e Davis, 1998; 2000; Paschall e Davis, 2002b).

O condicionamento Pavloviano de medo é especialmente importante para o estudo das bases neuroanatômicas do medo, uma vez que os circuitos podem ser descritos em termos de vias processando o EC e controlando as respostas defensivas. Dentre os mecanismos

anatômicos envolvidos no condicionamento Pavloviano, a amígdala tem papel crucial no processo de aquisição, armazenamento e expressão das respostas aversivas condicionadas. O envolvimento da amígdala nos processos de condicionamento aversivo foi identificado pela primeira vez pelo casal Blanchard, que mostraram que lesões na amígdala impediam as respostas de congelamento ao contexto associado ao choque elétrico nas patas (Blanchard e Blanchard, 1972). Posteriormente, foi demonstrado que lesões de células da amígdala lateral bloquearam o congelamento para pistas sonoras condicionadas com choque (Iwata, Ledoux *et al.*, 1986). O núcleo lateral da amígdala (LA) parece ser a região responsável em associar as respostas incondicionadas e condicionadas, e envia projeções diretas, e indiretas via núcleo basolateral (BLA), para o núcleo central da amígdala (CEA) (Ledoux, 2000; Maren, 2001).

Dentre os estímulos condicionados que podem ser utilizados no condicionamento Pavloviano clássico, os estímulos sonoros, visuais e contextuais são amplamente utilizados, pela facilidade em gerar respostas condicionadas. Entretanto, outras pistas podem ser associadas ao estímulo incondicionado, e pistas olfativas é uma delas. Apesar da importância que o sistema olfatório tem para os roedores, ainda há poucos estudos que utilizam deste sistema para gerar condicionamento de medo. Nos roedores, o sistema olfatório é extremamente importante para muitas funções, tais como o reconhecimento e discriminação entre os indivíduos da mesma espécie, a reprodução, o cuidado parenteral, a alimentação, e o reconhecimento de predador (Brennan e Keverne, 1997; Sam, Vora *et al.*, 2001; Restrepo, Arellano *et al.*, 2004). Um estímulo olfatório neutro pode ser facilmente pareado com choque nas patas em ratos, apenas com poucas sessões de treino (Otto, Cousens *et al.*, 2000; Paschall e Davis, 2002a). Por isso o condicionamento de medo utilizando estímulos olfatórios é uma boa alternativa para estudar as bases neurais do comportamento defensivo.

1.3.1 Condicionamento olfatório de medo

O estímulo olfatório pode ser utilizado como estímulo sensorial em muitos paradigmas de aprendizado. Os roedores adquirem aprendizado olfatório rapidamente e conseguem discriminar entre pares de odores após poucas sessões de aprendizados (Otto e Eichenbaum, 1992; Eichenbaum e Otto, 1993). Nos modelos de aprendizado aversivo, quando o odor é utilizado como EC, os ratos apresentam respostas robustas de congelamento após o pareamento entre odor e choque elétrico nas patas (Otto, Cousens *et al.*, 1997) e também respostas de

sobressalto acústico ao odor condicionado (Richardson, Vishney *et al.*, 1999; Paschall e Davis, 2002a). Recentemente foi demonstrado que ratos submetidos ao condicionamento olfatório de medo (COM), com choque elétrico nas patas, apresentaram respostas comportamentais ao odor pareado similares às que são apresentadas ao predador natural (Kroon e Carobrez, 2009).

Pistas olfatórias também já foram associadas a transtornos de ansiedade em humanos. No transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), odores relacionados ao trauma podem servir como fortes lembranças emocionais e podem precipitar memórias traumáticas (Vermetten e Bremner, 2003). Estudos em humanos indicam o envolvimento de uma circuitaria neural que distribui elementos olfatórios para regiões que processam a memória quando expostos a estímulos relacionados ao evento traumático (Vermetten, Schmahl *et al.*, 2007). Memórias para odores que são associados com experiências emocionais intensas são fortemente gravadas. Os odores são importantes porque podem servir como uma pista contextual relevante para formação de memórias emocionais, incluindo as relacionadas com pistas para “flashbacks” emocionais (Vermetten e Bremner, 2003).

Nos roedores, o odor pareado com choque elétrico nas patas pode ocasionar respostas emocionais de longa-duração (Otto, Cousins *et al.*, 2000). Além disso, após ser pareado o odor adquire valor emocional significativo, a ponto de promover condicionamento de segunda ordem, e assim passa a ser associado a outras pistas, induzindo um novo condicionamento (Paschall e Davis, 2002b; Kroon e Carobrez, 2009). A extinção da potencialização de sobressalto acústico é mais lenta quando são utilizadas pistas olfatórias que pistas auditivas ou visuais (Richardson, Tronson *et al.*, 2002). Esses achados sugerem que o odor pode ser processado por um sistema de memória diferente das que utilizam pistas auditivas ou visuais. De fato, em ratos as vias neuroanatômicas que processam a informação olfatória são levemente diferentes de outras modalidades sensoriais. Enquanto as sensações visuais e auditivas são processadas dentro do tálamo antes de irem para a amígdala, a informação olfatória é transmitida diretamente para a amígdala (Price, 1973), pois o bulbo olfatório principal e o bulbo olfatório acessório enviam projeções diretas para áreas da amígdala. Estímulos olfatórios tem acesso “privilegiado” à amígdala e podem rapidamente promover associações emocionais. A participação da amígdala no COM já foi demonstrada em vários trabalhos. Lesões com aminoácidos excitotóxicas (Cousens e Otto, 1998) ou inativação reversível (Kilpatrick e Cahill, 2003) na amígdala basolateral impedem

a associação e expressão das respostas de medo ao odor condicionado. Confirmando esses resultados, a infusão de antagonistas de receptores glutamatérgicos nessa região impede o COM (Walker, Paschall *et al.*, 2005).

Recentemente foi visto que o sistema defensivo hipotalâmico medial, em particular o PMd, estaria envolvido no reconhecimento e no processamento emocional para pistas olfatórias pareadas com choque nas patas (Canteras, Kroon *et al.*, 2008). Como pode ser visualizado na figura 3, ratos que foram condicionados com odor e choque elétrico nas patas, ao serem reexpostos ao odor pareado, apresentaram intensa ativação de Fos no PMd (Fig. 3A). Ratos que foram apresentados ao mesmo odor, mas sem terem sido pareados com choque nas patas, e, portanto, sem relevância emocional, não apresentaram ativação de Fos no PMd (Fig. 3B).

O bloqueio dos receptores NMDA no PMd foi capaz de bloquear as respostas de medo ao odor condicionado (Canteras, Kroon *et al.*, 2008). Esses resultados mostram o papel do PMd no processamento das memórias emocionais, dando suporte a idéia de que o processamento neural ao odor pareado e ao odor de gato poderiam agir em circuitos neurais similares, usando o PMd como amplificador de informação.

Sabendo que os sistemas hipotalâmicos são bem conhecidos por integrar vários comportamentos críticos para a sobrevivência, isso explica porque essa estrutura é tão importante na mediação das respostas do comportamento defensivo. A tabela 1 apresenta os neurotransmissores que já foram identificados na mediação das reações de defesa pelo PMd. Dentre eles, a noradrenalina tem sido relacionada com a formação das memórias aversivas, e por modular a ansiedade em modelos animais (Bremner, Krystal *et al.*, 1996).

Tabela 1. Sumário dos neurotransmissores relacionados com as reações de defesa no PMd.

	Modelo experimental	Referências
NMDA	Exposição ao gato	Beijamini e Guimarães, 2006
	Odor de gato	Canteras, Kroon <i>et al.</i> , 2008
	Condicionamento olfatório de medo	Canteras, Kroon <i>et al.</i> , 2008
GABA	Exposição ao gato	Cezario, Ribeiro-Barbosa <i>et al.</i> , 2008
Óxido nítrico Adrenoceptores beta	Exposição ao gato	Beijamini e Guimarães, 2006
	Odor de gato	Do Monte, Canteras <i>et al.</i> , 2008

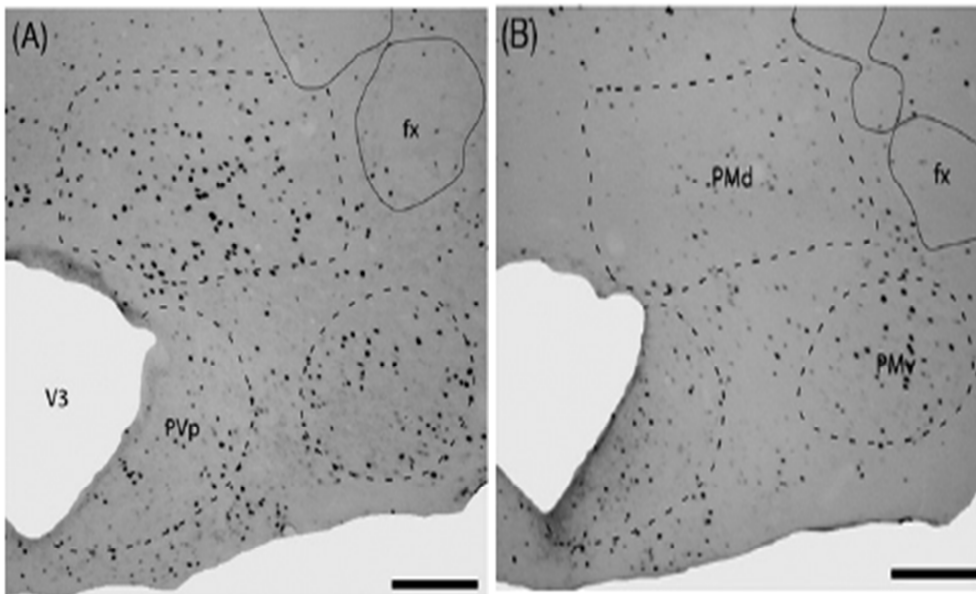


Figura 3. Fotomicrografia de um corte transversal do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo (PMd) mostrando a marcação da proteína Fos em ratos expostos ao odor de café previamente pareado com choque elétrico nas patas (A) ou em ratos expostos apenas ao odor de café (B). A ativação do PMd ocorreu apenas quando os animais são expostos ao odor condicionado.
Figura extraída de Canteras, Kroon *et al.* (2008).

1.4 O sistema noradrenérgico no condicionamento de medo

A noradrenalina, também chamada de noraepinefrina, é uma catecolamina produzida a partir da dopamina pela dopamina β -hidroxilase (Coyle, 1977), e é liberada ou como um hormônio da medula adrenal na corrente sanguínea (Rodrigues, Ledoux *et al.*, 2009) ou como um neurotransmissor no encéfalo. A noradrenalina no encéfalo é sintetizada principalmente por neurônios localizados no *locus coeruleus* e, em menor extensão, pela área tegmental ventral (Nicholas, Hokfelt *et al.*, 1996; Smythies, 2005). Os corpos celulares de neurônios noradrenérgicos no encéfalo foram primeiramente localizados por Dahlstrom e Fuxe (1964) que visualizaram neurônios catecolaminérgicos (noradrenalina e dopamina) em cortes histológicos de encéfalos de ratos. Os axônios do *locus coeruleus* possuem conexões difusas (Bloom, 2010), e hoje são identificados receptores adrenérgicos, ou adrenoceptores, em várias regiões encefálicas (Loizou, 1969; Nicholas, Hokfelt *et al.*, 1996). Os neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* projetam-se para todas as regiões corticais do prosencéfalo, bem como para o cerebelo, a medula espinhal, regiões límbicas e núcleos hipotalâmicos (Loizou, 1969; Moore e Bloom, 1979). Esse arranjo anatômico permite o controle noradrenérgico de uma variedade de funções, como na formação das memórias relacionadas com experiências de medo (Izquierdo, Medina *et al.*, 1998).

Cinco tipos de adrenoceptores já foram identificados: alfa1, alfa2, beta1, beta2 e beta3 (Wikberg, 1982; Nicholas, Hokfelt *et al.*, 1996). Esses receptores pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteína G com sete domínios transmembrana (para revisão, Nicholas, Hokfelt *et al.*, 1996). Os receptores do tipo beta são acoplados a proteína Gs, que estimula a atividade da adenilato ciclase, produzindo o segundo mensageiro 3,5 adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Os receptores alfa1 são acoplados a proteína Gq/11 e ativam a fosfolipase C, gerando inositol 1,4,5-trifosfato e diacilglicerol como segundos-mensageiros enquanto que os receptores do subtipo alfa2 são acoplados a proteína Gi, que inibe a atividades da adenilato ciclase (Tully e Bolshakov, 2010).

A observação de que algumas experiências são lembradas vividamente, ao passo que outras não são lembradas, ou algumas vezes muito remotamente, levou à sugestão de que haveria um mecanismo endógeno para regular o armazenamento das memórias (McGaugh, 1966). Hoje, várias evidências comprovam a participação de adrenoceptores na formação de memórias associadas a experiências emocionais (Cahill, Prins *et al.*, 1994; Cahill e McGaugh, 1996; Van

Stegeren, Everaerd *et al.*, 1998). A hipótese de que o sistema noradrenérgico desempenha papel importante nos mecanismos de aprendizagem e consolidação de memórias aversivas foi sugerida por Kety (1972), relatando que a liberação de catecolaminas associadas com estados afetivos poderia modular seletivamente as sinapses de circuitos neurais recentemente ativados e consolidar um novo e significativo padrão sensorial (Kety, 1972). Estudos posteriores de van Buskirk e colaboradores foram os primeiros a sugerir o envolvimento da noradrenalina central nos mecanismos de memória. Em experimentos de esquiva inibitória, eles encontraram diminuição dos níveis de noradrenalina no encéfalo sugerindo um aumento na liberação e no metabolismo durante o treino de aprendizado (Gold e Van Buskirk, 1978). Além disso, infusões intracerebroventriculares de noradrenalina facilitam a retenção do aprendizado, reforçando o papel da noradrenalina central agindo na modulação da memória (Haycock, Van Buskirk *et al.*, 1977). Desde então alguns estudos tem comprovado o envolvimento do sistema noradrenérgico nos mecanismos de consolidação de memórias (McGaugh e Roozendaal, 2009). Propranolol, um antagonista de receptores beta, já foi associado com o prejuízo de diferentes tipos de aprendizado, como na consolidação das memórias associadas à exposição ao predador (Adamec, Muir *et al.*, 2007; Do Monte, Canteras *et al.*, 2008), na reexposição ao labirinto em cruz elevado (Stern, Carobrez *et al.*, 2008), no aprendizado ao labirinto aquático de Morris (Cahill, Pham *et al.*, 2000; Ebrahimi, Rashidy-Pour *et al.*, 2010), reconhecimento de objeto (Dornelles, De Lima *et al.*, 2007), na aquisição do condicionamento de aversão ao odor (Miranda, Ferry *et al.*, 2007) entre outros. O bloqueio de adrenoceptores beta também já foi associado ao prejuízo na consolidação do condicionamento de medo (Gallagher, Kapp *et al.*, 1977; Sternberg, Korol *et al.*, 1986; Ferry, Roozendaal *et al.*, 1999a; Roozendaal, Quirarte *et al.*, 2002), ou nos mecanismos de extinção de memórias aversivas (Cain, Blouin *et al.*, 2004; Do-Monte, Kincheski *et al.*, 2010). Além disso, já foi demonstrado que a reconsolidação também é prejudicada pelo propranolol (Przybyslawski, Rouillet *et al.*, 1999; Debiec e Ledoux, 2004; Abrari, Rashidy-Pour *et al.*, 2008; Muravieva e Alberini, 2010). No condicionamento de medo utilizando pistas olfatórias, o bloqueio de adrenoceptores beta pelo propranolol interfere com as etapas de aquisição, consolidação e expressão das respostas de medo ao odor (Kroon e Carobrez, 2009).

O papel do sistema noradrenérgico na formação da memória emocional já foi demonstrado em humanos. Van Stegeren e colegas

(1998) verificaram que o propranolol (que possui ações periféricas e centrais), mas não o nadolol (antagonista beta que age somente em receptores periféricos) impediu a formação da memória com caráter emocional, sugerindo o envolvimento de mecanismos centrais na formação da memória de uma história que envolvia características emocionais (Van Stegeren, Everaerd *et al.*, 1998). Esses resultados, assim como a evidência de que a administração do propranolol impede o aumento da memória de longa duração, sugerem que a superestimulação de sistemas modulatórios podem contribuir para o desenvolvimento de sintomas de estresse crônico, como no transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) (Pitman, 1989). A administração periférica de propranolol em indivíduos que tiveram experiências traumáticas reduziu a incidência de TEPT (Pitman, Sanders *et al.*, 2002). O TEPT ocorre pela exposição à pelo menos um evento traumático durante a vida, e uma das características da doença é a recorrência das memórias associadas à experiência traumática. Muitos estudos indicam que o aumento da atividade noradrenérgica durante o trauma aumenta a codificação da memória (O'Donnell, Hegadoren *et al.*, 2004). Os níveis elevados de noradrenalina no fluido encéfalo-espinhal de indivíduos com TEPT, e a correlação com a severidade dos sintomas, sugerem que o aumento da atividade noradrenérgica também está relacionado com a manutenção dos sintomas do TEPT (Geraciotti, Baker *et al.*, 2001).

Vários mecanismos neurais já foram associados com os efeitos do sistema noradrenérgico na formação de memórias de medo. A amígdala vem sendo amplamente estudada pelo seu papel na aquisição do aprendizado associativo (Nader, Schafe *et al.*, 2000; McGaugh, 2004; Rodrigues, Schafe *et al.*, 2004; Roozendaal, McEwen *et al.*, 2009), e antagonistas de adrenoceptores, beta e alfa, modulam as respostas relacionados aos eventos aversivos (Ferry, Roozendaal *et al.*, 1999b; a; Roozendaal, Williams *et al.*, 1999; Ferry e McGaugh, 2000; Roozendaal, Quirarte *et al.*, 2002).

Recentemente foi demonstrado que o sistema hipotalâmico defensivo medial, em particular o PMd, é um importante alvo do sistema noradrenérgico na formação de memórias aversivas. A injeção sistêmica de propranolol, além de bloquear o comportamento defensivo frente à exposição ao odor de gato, também reduz a expressão de Fos no PMd. Já o bloqueio de adrenoceptores periféricos, através da injeção sistêmica de nadolol, não reduz a ativação de neurônios no PMd nem as respostas defensivas frente a pista do predador (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008). Vale ressaltar que somente o propranolol é capaz de impedir o condicionamento de medo ao contexto associado ao do odor de

predador. Esses resultados confirmam que adrenoceptores centrais são importantes na formação de memórias aversivas. O bloqueio de receptores beta1 com atenolol no PMd também impede as respostas de medo provocadas pela exposição ao odor de gato, bem como o condicionamento contextual associado (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008), confirmando que adrenoceptores beta no PMd são importantes em mediar essas respostas.

Sabendo-se que o PMd participa no processo de expressão do comportamento defensivo para pistas olfatórias previamente condicionadas (Canteras, Kroon *et al.*, 2008), e que adrenoceptores beta dentro do PMd são importantes nos processos relacionados com as respostas de medo ao odor de gato e na aquisição do condicionamento contextual ao predador (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008), duas hipóteses foram delineadas para este trabalho. A primeira hipótese seria que adrenoceptores beta no PMd participam nos processos envolvidos na aquisição e expressão do comportamento defensivo no processo de condicionamento olfatório de medo. A segunda hipótese seria que a ativação de adrenoceptores beta no PMd poderia funcionar como estímulo incondicionado para promover o condicionamento olfatório de medo. Para testar essas hipóteses, o objetivo principal delineado para este estudo foi verificar a participação de adrenoceptores beta no PMd na mediação da respostas defensivas exibidas pelos ratos utilizando o paradigma do COM.

2. Objetivos

2.1 Objetivo principal

Verificar a participação de adrenoceptores beta no PMd na mediação da aquisição e expressão das respostas defensivas ao condicionamento olfatório de medo (COM).

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Verificar a participação de adrenoceptores beta no PMd na aquisição e expressão do COM promovido pela associação do odor com choque elétrico nas patas.

2.2.2 Verificar se a ativação de adrenoceptores beta no PMd é capaz de promover o COM agindo como estímulo incondicionado em substituição ao choque elétrico nas patas.

2.2.3 Verificar o efeito do bloqueio de adrenoceptores beta no PMd na aquisição e expressão do COM induzido por isoproterenol no PMd.

2.2.4 Verificar o efeito do bloqueio de receptores adrenérgicos sistêmicos na aquisição do COM induzido por isoproterenol.

2.2.5 Verificar a participação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na MCPd na aquisição e expressão do COM induzido por isoproterenol.

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Neste projeto foram utilizados 361 ratos machos da linhagem Wistar, na idade de 3 meses (300-400 g). Os ratos foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e, após o desmame, foram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia da mesma universidade. Aproximadamente 15 dias antes do início dos experimentos, os animais foram alocados no biotério do Laboratório de Neurobiologia Comportamental, onde foram realizados todos os procedimentos experimentais.

Os ratos foram mantidos entre 3-4 ratos/caixa, em uma caixa de acrílico branca (50 cm x 30 cm x 15 cm) forrada de maravalha, a uma temperatura controlada entre 22-24° C e iluminação claro/escuro, no ciclo de 12-12 h, sendo as luzes acesas as 7 h. Todos os animais tiveram livre acesso à água e comida.

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais de Laboratório (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número (23080.008789/2009-46/UFSC). Todos os cuidados foram realizados de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e com o guia comportamental para o uso de animais de laboratório.

3.2 Cirurgia estereotáxica

Todos os animais deste projeto foram submetidos ao procedimento de cirurgia estereotáxica 10 dias antes do início dos experimentos, para o implante de cânulas-guia no PMd. Os ratos foram anestesiados com uma solução de quetamina (15 mg/kg Dopalen; Agribands, Brasil) e xilazina (2.5 mg/kg, Rompum; Bayer, Brasil) 3:2 v/v, 1 ml/kg do peso corporal, e foram posicionados no aparelho estereotáxico (Insight®, Ribeirão Preto, Brasil). Xilocaína (0,1 ml, 2 mg/ml; Probem, Brasil) foi subcutaneamente injetada na cabeça e uma incisão longitudinal foi feita. Os ratos receberam uma cânula-guia na posição mediana, 3 mm acima do PMd, nas coordenadas a partir do Bregma: AP= 4,16 mm; ML= 0,8 mm; DV= 6,5 mm da superfície do osso em um ângulo de 10°. Ratos que foram microinjetados no PMd e na MCPd receberam uma segunda cânula implantada 3,2 mm acima da MCPd, coordenadas a partir do Bregma: AP= 8,0 mm; ML= 2,0 mm; DV= 1,9 mm da superfície do osso em um ângulo de 21°. Todas as coordenadas estereotáxicas foram adaptadas do atlas de rato de Paxinos e Watson (1998).

Dois parafusos de níquel foram fixados no crânio, e a superfície craniana foi recoberta por uma camada de acrílico auto-polimerizante (Jet, Brasil), permitindo a formação de uma prótese sólida após o endurecimento do acrílico. Em cada cânula-guia foi colocado um mandril (no tamanho da cânula), para evitar possíveis obstruções. Após o término da cirurgia, os animais foram tratados com antibiótico veterinário (benzilpenicilina e estreptomicina) intramuscular (10 mg/kg; 60 000 IU; 0,2 ml; Fort Dodge, Brasil) e solução analgésica (flunixin meglumina) via subcutânea (2,5 mg/kg; 0,2 ml; Schering-Plough, Brasil) e foram colocados em uma sala escura e com aquecimento até a completa recuperação do anestésico.

3.3 Drogas

Neste projeto foram utilizados como antagonistas de adrenoceptores beta, o atenolol, antagonista beta1 [(RS)-Atenolol; Tocris, Cookson, EUA], e a butoxamina, antagonista beta2 [hidroclorato de butoxamina; Sigma, St.Louis, EUA]. Como agonista de adrenoceptores beta foi utilizado o isoproterenol [(±)1-3'4' diidroxifenil -2-isopropil aminoetanol; Sigma, St.Louis, EUA]. Todos foram dissolvidos em tampão fosfato 0,1M (PBS; pH 7,4), que sozinho foi usado como veículo controle de injeção do PMd.

Como antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, foi utilizado ácido (±)-2-Amino-5-fosfopentanóico (AP5; RBI, St.Louis, EUA) dissolvido em PBS, que foi usado como veículo controle de injeção na MCPd.

As concentrações utilizadas e o volume de microinjeção foram baseados em trabalhos anteriores (Watanabe, Nakagawa *et al.*, 2003; Do Monte, Canteras *et al.*, 2008; Kincheski e Carobrez, 2010), e testados em grupos pilotos.

Para a injeção intraperitoneal (i.p.), foi utilizado como antagonista de adrenoceptores beta o nadolol (Sigma, St. Louis, EUA) na dose de 10 mg/kg, dissolvido (10mg/ml) em solução salina (0,9% NaCl), que foi utilizado como veículo controle da injeção i.p. O volume injetado foi de 1 ml/kg. A dose utilizada e o volume injetado foram baseados em experimentos anteriores (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008).

3.4 Microinjeção intracerebral

Para a administração das drogas nos sítios de microinjeção, os animais foram gentilmente segurados com o auxílio de uma flanela, o mandril foi removido e uma agulha injetora (comprimento de 18 mm

para o PMd e 16,2 mm para a MCPd) foi inserida na cânula-guia. Cada agulha estava conectada a uma micro-seringa (Haminton[®], 5 µl) por meio de um tubo de polietileno (PE-10). As micro-seringas estavam acopladas à bomba de infusão (modelo B12000, Insight[®] Ltda, Ribeirão Preto, Brasil), o que permitiu a administração automática do volume (0,3 µl no PMd e 0,2 µl na MCPd) na cânula-guia, em uma velocidade constante de 0,6 µl/s. As agulhas injetoras foram mantidas no interior das cânulas por um período adicional de 20 s para maximizar a difusão e evitar possível refluxo da droga.

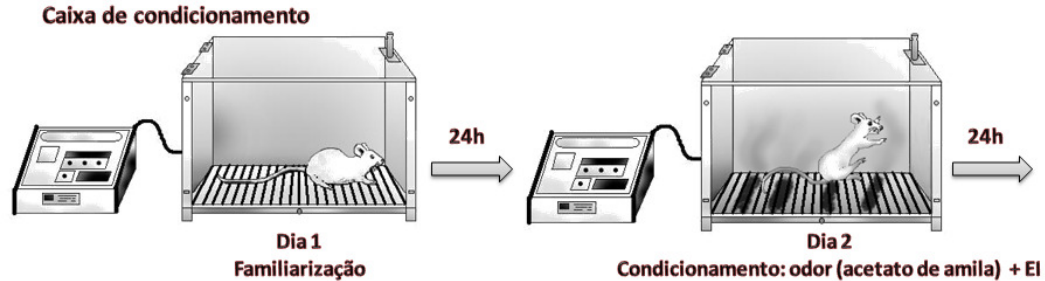
3.5 Modelo Experimental

Para este estudo foi utilizado o modelo do condicionamento olfatório de medo (COM), previamente descrito em trabalhos anteriores do nosso laboratório (Cavalli, Bertoglio *et al.*, 2009; Kroon e Carobrez, 2009), realizado durante cinco dias consecutivos. Para a realização deste protocolo foram utilizados dois aparatos: a caixa de condicionamento e a caixa de odor. Os primeiros dois dias foram realizados na caixa de condicionamento para a aquisição do COM. Os três dias seguintes ocorreram na caixa de odor para verificar a expressão das respostas defensivas. A figura 4 representa as fases do modelo experimental. Todos os experimentos foram realizados entre 9 h e 15 h, durante a fase clara do ciclo do rato.

O COM foi realizado em uma caixa medindo 50 x 26 x 35 cm (Insight[®] Ltda, Ribeirão Preto, Brasil), com paredes de aço inoxidável, exceto da parede frontal e o teto que foram construídos de acrílico transparente, e piso gradeado, compostos de barras de aço inoxidável (3 mm de espessura) espaçadas 1 cm. O piso gradeado foi conectado a um sistema gerador de choques que, quando necessário, possibilitava a emissão de choques elétricos na intensidade e tempo de disparos programados.

Um compartimento em forma de gaveta localizado abaixo do piso gradeado da caixa serviu para a instalação da fonte do estímulo olfatório durante a sessão de condicionamento. Um pedaço de papel filtro (5 X 5 cm) embebido com 250 µl de solução 5% de acetato de amila (Aldrich Chemical, EUA) foi utilizado como fonte de odor. A caixa foi limpa com solução de etanol 10% e seca com papel toalha após a retirada de cada animal. O condicionamento foi realizado num ambiente com som atenuado, temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e intensidade de luz de 80 lux. No dia do condicionamento, após a retirada do rato do aparato, um exaustor acoplado a parede lateral permanecia ligado durante alguns

Aquisição do condicionamento olfatório de medo



Expressão do condicionamento olfatório de medo



Figura 4. Diagrama esquemático representando o protocolo do condicionamento olfatório de medo.
Legenda: EC, estímulo condicionado; EI, estímulo incondicionado. Adaptado de Kroon e Carobrez (2009).

minutos, permitindo assim a completa retirada de odor volátil de acetato de amila do ambiente.

Os animais foram colocados na caixa de condicionamento no primeiro dia (Dia 1) para exploração do ambiente, numa sessão denominada familiarização. No dia seguinte (Dia 2), na sessão de condicionamento, os animais foram re-expostos à caixa onde era realizado o pareamento entre o estímulo olfatório (EN, odor de acetato de amila) e o estímulo incondicionado (EI, choque elétrico nas patas ou estimulação de adrenoceptores beta no PMd).

A análise do comportamento de defesa exibido pelos animais para o EC foi realizada na caixa de odor, para reduzir interferências contextuais e isolar como único estímulo condicionado o odor de acetato de amila. Este aparato, construído em acrílico preto, foi dividido em dois compartimentos, um aberto (40 x 26 x 40 cm) e um fechado (20 x 26 x 40 cm) com cobertura. Uma pequena abertura (6 x 6 cm), situada na parede divisória, permitiu o livre acesso do animal a ambos compartimentos. Na parede oposta ao compartimento fechado foi colocada uma flanela laranja, enrolada, sem odor ou impregnada com 250 µl de acetato de amila 5%, como fonte do estímulo olfatório condicionado. No piso da caixa, uma marcação localizada a 7 cm da flanela, serviu como referência para delimitar a área próxima a fonte de odor.

Todos os animais foram colocados na caixa de odor em uma sessão denominada de familiarização (Dia 3) para se habituarem ao ambiente e o nível basal do comportamento defensivo foi obtido na ausência do EC. No dia seguinte (Dia 4), os parâmetros comportamentais da expressão do medo foram medidos nos ratos confrontados com o EC (teste EC1). Vinte e quatro horas após, os ratos foram novamente colocados na caixa de odor, sem a presença de acetato de amila (Dia 5). Essa última sessão foi conduzida para determinar a ocorrência do condicionamento de segunda-ordem (teste EC2), como resultado da associação entre o acetato de amila (EC1) e o contexto onde o odor foi apresentado. Durante as sessões de familiarização e teste EC2 (Dias 3 e 5), uma flanela neutra foi usada somente como uma pista visual. No dia do teste EC1, quando o odor de acetato de amila estava presente na caixa de odor, após a retirada do sujeito do aparato, o exaustor foi ligado para evitar acúmulo do odor na sala. Durante os três dias de exposição à caixa de odor, todos os animais foram colocados no compartimento aberto junto à parede divisória com a cabeça direcionada para a flanela.

Para permitir a visualização dos animais no modelo, as paredes frontais, tanto do compartimento aberto quanto do fechado, foram construídas em acrílico transparente, e uma câmera conectada a um sistema de televisão/DVD permitiu a filmagem e gravação dos animais nas diferentes sessões. As sessões realizadas nesse aparato foram conduzidas sob iluminação branca de 4 lux. A caixa foi limpa com solução de etanol 10 % e seca com papel toalha antes da introdução de cada rato.

A análise do comportamento defensivo foi realizada pelo observador sem conhecimento prévio do estado experimental do sujeito, durante os três dias de exposição à caixa de odor ao longo de cada sessão de 10 min de exposição. Os parâmetros analisados foram baseados em experimento de exposição ao odor de gato (Dielenberg e McGregor, 2001; Do Monte, Canteras *et al.*, 2008), caracterizado pelos seguintes padrões comportamentais:

- *tempo de aproximação* - tempo em que os ratos permaneceram com pelo menos a cabeça ou uma das patas próxima a fonte de odor, na distância delimitada de 7 cm da flanela;

- *tempo escondido* - tempo em que os ratos permaneceram com as 4 patas no compartimento fechado na caixa;

- *tempo de head-out* - tempo em que os ratos permaneceram no compartimento fechado da caixa, e com a cabeça invadindo o compartimento aberto, um comportamento de avaliação de risco.

3.6 Protocolo Experimental

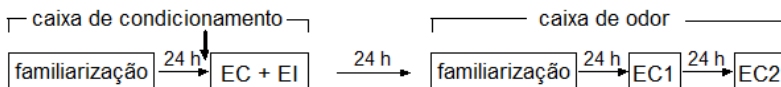
3.6.1 Etapa 1 – Efeito do bloqueio dos adrenoceptores beta no PMd nas fases de aquisição e expressão do condicionamento olfatório de medo

3.6.1.1 *Experimento 1*: Efeito do atenolol e da butoxamina na aquisição do condicionamento olfatório de medo

Este experimento foi realizado para verificar o papel dos adrenoceptores beta no PMd durante a aquisição do COM. Esta etapa foi dividida em dois grupos experimentais.

No primeiro grupo experimental, os animais foram mantidos em uma sala adjacente por pelo menos trinta minutos antes do início dos experimentos. Em seguida, eles foram individualmente transferidos para a sala experimental e colocados na caixa de condicionamento para explorarem o modelo durante 3 min e 20 s (tempo necessário para realizar a etapa de condicionamento olfatório de medo. No dia seguinte,

os ratos foram aleatoriamente divididos para receberem atenolol (antagonista de adrenoceptores beta1) nas doses de 10, 40 ou 80 nmol no PMd (flecha vertical do esquema abaixo).



Após a microinjeção, os animais voltaram para a caixa moradia. Dez minutos após foram colocados na caixa de condicionamento na presença de acetato de amila (EC), e após 40 s receberam 5 séries de choques elétricos (EI) (0,4 mA, 2 s de duração) em intervalos de 40 s entre os choques. Após o último choque, os ratos foram removidos e colocados no biotério. Nos três dias seguintes, a análise do comportamento defensivo foi realizada na caixa de odor, em três fases: familiarização (Dia 3), teste EC1 (Dia 4) e teste EC2 (Dia 5), conforme anteriormente explicado.

No segundo grupo experimental, no dia do condicionamento, 10 min antes da associação do odor com choque nas patas (Dia 2), os animais foram aleatoriamente divididos para receberem butoxamina (antagonista de adrenoceptores beta2) nas doses de 3 ou 10 nmol. O condicionamento e a expressão do medo condicionado foram realizados conforme o conjunto experimental anterior.

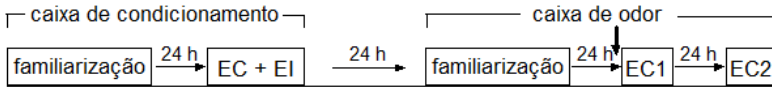
O grupo controle, ratos microinjetados com PBS, foi o mesmo nos dois grupos de experimentos, uma vez que os grupos tratados foram submetidos aos experimentos de forma combinada.

3.6.1.2 Experimento 2: Efeito do atenolol na expressão do comportamento defensivo

Este experimento foi realizado para verificar o papel dos adrenoceptores beta1 no PMd durante a expressão das respostas defensivas ao odor condicionado.

Os animais foram submetidos ao protocolo de familiarização à caixa de condicionamento como explicado no experimento 1. No dia seguinte, todos os animais foram individualmente submetidos ao condicionamento com odor de acetato de amila e choque nas patas, na mesma intensidade e intervalos do experimento anterior.

No dia 3, os animais foram levados para explorar a caixa de odor no dia da familiarização. Vinte e quatro horas após (Dia 4), antes da sessão de teste EC1, os animais foram aleatoriamente divididos para receber PBS (grupo controle), atenolol 10 ou 40 nmol (flecha vertical do esquema abaixo). Após a microinjeção, os ratos voltaram para a caixa moradia, e 10 min após foram colocados na caixa de odor na presença de acetato de amila. No dia 5 os ratos foram colocados na caixa de odor apenas com a flanela neutra.

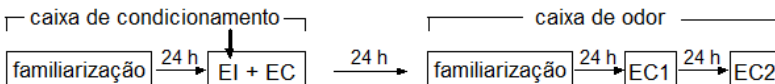


3.6.2 Etapa 2 – Efeito da ativação de adrenoceptores beta no PMd na aquisição do condicionamento olfatório de medo

Nesta etapa experimental, os animais foram submetidos ao COM, mas o condicionamento foi realizado pela associação entre o odor e a microinjeção de agonista de adrenoceptores beta, o isoproterenol, no PMd (EI) ao invés de choque nas patas.

3.6.2.1 *Experimento 3* – Efeito do isoproterenol na aquisição do condicionamento olfatório de medo

Os animais foram mantidos em uma sala adjacente por pelo menos 30 min antes do início dos experimentos. Em seguida, eles foram individualmente transferidos para a sala experimental e colocados na caixa de condicionamento para explorarem o modelo durante 3 min e 20 s. No dia seguinte, na etapa de aquisição do COM, os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos (flecha vertical do esquema abaixo): 1) PBS (controle), 2) isoproterenol (ISO) 10 nmol, 3) ISO 40 nmol. Após a microinjeção, os animais voltaram para a caixa moradia, e cinco minutos após foram colocados na caixa de condicionamento na presença de acetato de amila, e permaneceram em contato com o odor durante 3 min e 20 s, que é o mesmo intervalo de tempo de exposição nos experimentos onde foram utilizados choques nas patas como EI.

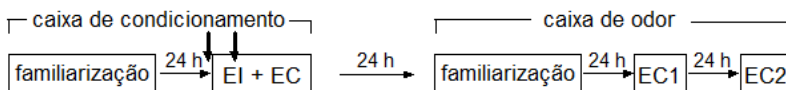


A expressão do COM foi realizada na caixa de odor nos três dias consecutivos, 10 min cada sessão, conforme já descrito no experimento 1.

Para verificar a necessidade de um tempo maior de exposição ao odor de acetato de amila para promover condicionamento de medo, os animais foram submetidos ao mesmo procedimento de familiarização na caixa de odor. Na etapa do condicionamento, os animais foram divididos em grupos experimentais similar ao experimento acima: 1) PBS, 2) ISO 10 nmol, 3) ISO 40 nmol. Cinco minutos após a microinjeção os animais foram colocados na caixa de condicionamento com o odor de acetato de amila, entretanto permaneceram em contato com o odor durante 10 min. Um grupo de animais recebeu ISO 40 nmol, mas entraram em contato com apenas odor neutro durante 10 min na caixa de condicionamento. Em todos os grupos, a expressão do COM foi realizada conforme descrito no experimento 1.

3.6.2.2 Experimento 4 – Efeito do atenolol e da butoxamina na aquisição do condicionamento olfatório de medo induzido por isoproterenol

O isoproterenol é um agonista não seletivo de adrenoceptores beta. Para identificar o subtipo de receptores envolvidos, os ratos receberam (primeira flecha vertical do esquema abaixo) o atenolol (ATE, 40 nmol) ou a butoxamina (BUT, 10 nmol) 5 min antes da microinjeção de ISO (segunda flecha vertical). Os animais foram divididos em seis grupos experimentais: 1) PBS + PBS, 2) PBS + ISO, 3) ATE + ISO, 4) ATE + PBS, 5) BUT + ISO, 6) BUT + PBS. Cinco minutos após a última microinjeção, todos os animais foram colocados na caixa de condicionamento na presença do odor de acetato de amila durante 10 min.

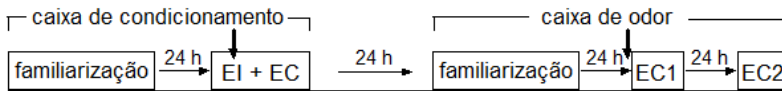


Os animais foram analisados nos três dias consecutivos na caixa de odor em sessões de 10 min cada, de acordo com o experimento descrito anteriormente.

3.6.2.3 Experimento 5 – Efeito do atenolol na expressão do condicionamento olfatório de medo induzido por isoproterenol

Este experimento foi realizado para verificar o papel dos adrenoceptores beta1 no PMd durante a expressão das respostas defensivas ao odor condicionado.

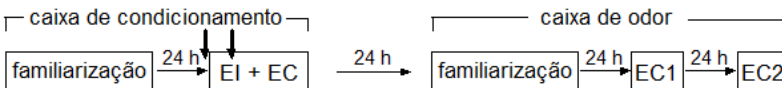
Todos os animais foram pareados com ISO 40 nmol no PMd (primeira flecha vertical do esquema abaixo) e odor de acetato de amila durante 10 min. Dez minutos antes da sessão de teste EC1, os animais foram divididos para receber PBS (controle) ou ATE 40 nmol no PMd (segunda flecha vertical). Ratos que receberam PBS na sessão de condicionamento e PBS antes da sessão EC1 teste serviram como grupo controle.



A análise dos parâmetros do comportamento defensivo foi realizada na caixa de odor como descrito no experimento 1.

3.6.2.4 Experimento 6 – Efeito do nadolol sistêmico na aquisição do condicionamento olfatório de medo induzido por isoproterenol

Para verificar se a microinjeção de ISO no PMd poderia induzir o condicionamento de medo pela ativação do sistema beta-adrenérgico periférico, os animais foram pré-tratados com nadolol, um antagonista de adrenoceptores beta que não atravessa a barreira hematoencefálica (Cruickshank, Neil-Dwyer *et al.*, 1980). Os animais foram divididos para receberem (primeira flecha vertical do esquema abaixo) salina ou nadolol 10 mg/kg 30 min antes da microinjeção de ISO 40 nmol no PMd (segunda flecha vertical). Cinco minutos após a microinjeção, todos os animais foram colocados na presença de acetato de amila durante 10 min.

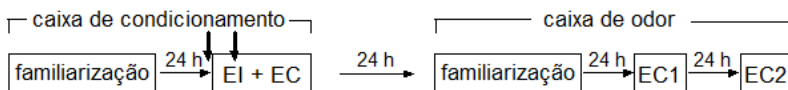


A análise dos parâmetros do comportamento defensivo foi realizada na caixa de odor como descrito no experimento 1.

3.6.2.5 *Experimento 7* – Participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na MCPd na aquisição do condicionamento induzido por isoproterenol

Este experimento foi conduzido para verificar se a capacidade da infusão de ISO no PMd em promover a aquisição do condicionamento de medo ocorre através de vias descendentes glutamatérgicas para a MCPd. Todos os ratos receberam duas cânulas, direcionadas para o PMd e a MCPd.

No dia do condicionamento (Dia 2), os animais foram microinjetados na MCPd (primeira flecha vertical do esquema abaixo) e 5 min após no PMd (segunda flecha vertical). Os animais permaneceram em uma caixa moradia, porém isolados dos outros animais entre as microinjeções. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: 1) PBS (MCPd) + PBS (PMd), 2) PBS + ISO 40 nmol, 3) AP5 6 nmol + ISO 40 nmol. Após a última microinjeção os animais retornaram à caixa moradia com os outros ratos, e 5 min após foram colocados na caixa de condicionamento na presença do odor de acetato de amila durante 10 min.



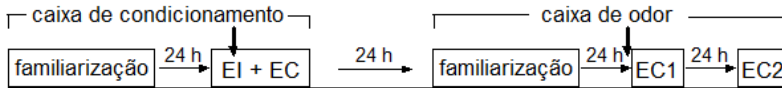
A análise do comportamento defensivo foi realizada nos três dias consecutivos, conforme já descrito no experimento anterior.

3.6.2.6 *Experimento 8* – Participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na MCPd na expressão do condicionamento induzido por isoproterenol

Este experimento foi delineado para verificar a participação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na MCPd durante a expressão das respostas defensivas frente ao EC.

Todos os animais deste experimento tiveram duas cânulas implantadas, uma no PMd e outra na MCPd. No dia da aquisição do COM, os ratos foram microinjetados com ISO 40 nmol no PMd (primeira flecha vertical do esquema abaixo) e cinco minutos após foram colocados na presença de odor de acetato de amila durante 10 min. Dez minutos antes da sessão de teste EC1, os animais foram divididos para receberem PBS ou AP5 6 nmol na MCPd (segunda flecha vertical). Um grupo de animais recebeu PBS no PMd no dia do

condicionamento e PBS na MCPd antes da sessão de teste EC1, e esse grupo foi considerado o controle. A análise do comportamento defensivo durante as sessões de familiarização, teste EC1 e teste EC2 foi realizado como previamente descrito.



3.7 Perfusão e histologia

Para analisar os sítios de microinjeção, os ratos foram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (40mg/kg; Cristália, Brasil) e foram microinjetados com corante Azul de Evans (0,5%; Sigma-Aldrich, St.Louis, EUA) no volume de 0,3 μ l (PMd) ou 0,2 μ l (MCPd) com as mesmas agulhas injetoras usadas no protocolo experimental. Os animais foram perfundidos via intracardíaca com salina (0,9% 150 ml) e 500 ml de formaldeído 10% (Vetec, Brasil). Após a decapitação, as calotas cranianas foram removidas e os encéfalos retirados e armazenados em solução de formaldeído 10% até a realização das análises histológicas.

Um dia antes da histologia, os encéfalos foram colocados em solução de sacarose 30% (Vetec, Brasil) para criopreservação. Foram realizados cortes coronais (50 μ m) em um criostato (Leica[®] CM1850) e as fatias marcadas com o sítio de microinjeção foram montadas em lâminas gelatinizadas. Os cortes foram analisados no microscópio óptico para determinar o sítio de microinjeção delimitado pelo corante Azul de Evans. Posteriormente, os cortes foram corados com solução de Giemsa (Sigma-Aldrich, St.Louis, EUA) e fotografados para registro.

Neste estudo foram considerados os animais que tiveram o sítio de microinjeção localizado no PMd (n=296), o que correspondeu em aproximadamente 50% dos animais submetidos à cirurgia estereotáxica. Na figura 5 pode ser visualizado um esquema obtido do atlas de Paxinos e Watson (1998) mostrando o local de microinjeção no PMd (Fig. 5A), e uma foto ilustrando o trajeto da cânula e a marcação do corante Azul de Evans direcionada ao PMd (Fig. 5B). Alguns animais (n=65) receberam microinjeção localizadas em regiões mais caudais (núcleo mamilar medial) da região do PMd, e estes animais foram considerados grupo-fora. Para o experimento 7 e 8, foram considerados os animais que tiveram a segunda cânula localiza na MCPd (n=51), entre o Bregma

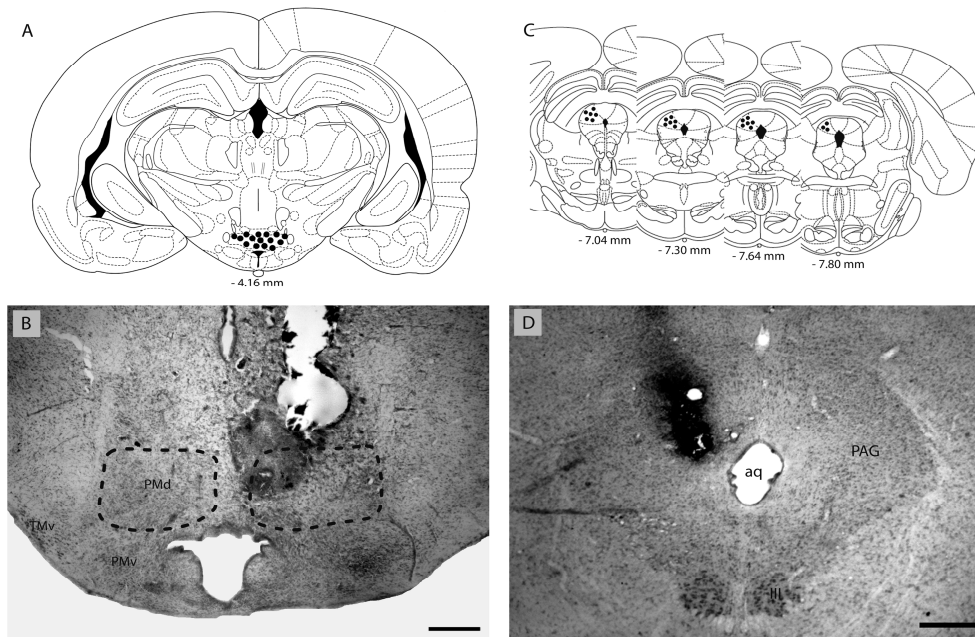


Figura 5. Diagrama esquemático de um corte coronal do encéfalo de rato, localizando o PMd (A) e a MCPd (C) (Paxinos e Watson, 1998). Os círculos pretos indicam o local de microinjeção dos animais. Devido à sobreposição do local da microinjeção, o número de círculos representados é menor do que o número de animais utilizados nesse protocolo experimental. Fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de rato na região do PMd (B) e na MCPd (D), corado com Giemsa mostrando a localização da cânula e o local de microinjeção. A mancha escura é o local de injeção do Azul de Evans. Barra de escala 500 μ m. Legenda: aq, aqueduto; PAG, matéria cinzenta periaquedutal; PMd, núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo; PMv, núcleo pré-mamilar ventral do hipotálamo, TMv, núcleo túbero-mamilar.

-7,04 a -7,8 (Fig. 5C) do atlas de Paxinos e Watson (1998). Os animais que tiveram a microinjeção desta segunda cânula acima da MCPd (colículo superior) foram considerados grupo-fora (n=19). A figura 5 D ilustra uma foto indicando o trajeto da cânula e a marcação do corante Azul de Evans direcionada a MCPd. Animais que não tiveram o sítio de microinjeção nas estruturas relacionadas acima foram desconsiderados da análise deste estudo.

3.8 Análise Estatística

Os dados obtidos durante a etapa de familiarização na caixa de odor foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) de uma via. Como foi verificada ausência de diferenças estatísticas entre os grupos nesta etapa, os valores obtidos foram agrupados e representados como média \pm 95% do intervalo de confiança.

Para as etapas EC1 e EC2, os efeitos do tratamento foram analisados através de ANOVA para medidas repetidas. O tempo de aproximação, o tempo escondido e o tempo de *head-out*, medidos ao longo dos 10 min do experimento, foram transformados em porcentagem de cada medida e usados como variáveis dependentes. Quando apropriado, comparações de *post hoc* usando teste de Newman-Keuls foram utilizadas.

Todas as análises foram realizadas através do programa Statistica[®] (versão 9.1; StatSoft[®], Tulsa, EUA). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Os dados foram representados em média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e os gráficos foram desenhados pelo programa Prisma 5.0 (GraphPad Prism[®], San Diego, EUA).

4. Resultados

4.1 Etapa 1 – Efeito do bloqueio dos adrenoreceptores beta no PMd nas fases de aquisição e expressão do condicionamento olfatório de medo

4.1.1 *Experimento 1*: Efeito do atenolol e da butoxamina na aquisição do condicionamento olfatório de medo

Os ratos que receberam PBS ou atenolol (10, 40 ou 80 nmol) e foram submetidos ao protocolo do condicionamento olfatório de medo não apresentaram diferenças significativas durante a etapa de familiarização na caixa de odor.

Nas etapas de testes EC1 e EC2, ANOVA detectou diferenças significativas ($p < 0,00001$) no fator tratamento para o de tempo de aproximação [$F(4,38)=10,40$] e para o tempo escondido [$F(4,38)=26,01$], mas não para o de tempo de *head-out* [$F(4,38)=2,81$, $p > 0,05$]. Além disso, foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) também no fator repetição para o tempo de aproximação [$F(1,38)=4,30$] e para o tempo escondido [$F(1,38)=16,42$].

A análise *post hoc* revelou que ratos tratados com ATE 80 nmol no PMd antes da etapa de aquisição apresentaram aumento do tempo de aproximação e diminuição do tempo escondido na sessão de teste EC1 em relação ao grupo controle PBS. Na sessão de teste EC2 o tempo escondido continuou menor para o grupo ATE 80 em relação ao grupo controle. Para os ratos que receberam atenolol 10 ou 40 nmol antes da etapa de aquisição do condicionamento olfatório de medo não foram encontradas diferenças significativas para os parâmetros analisados em relação ao grupo PBS. Os animais microinjetados com atenolol (10, 40 ou 80 nmol) fora do PMd foram agrupados e constituíram o grupo ATE-fora, e esses animais não apresentaram diferenças significativas para os parâmetros analisados nos testes EC1 e EC2 em relação ao grupo PBS (Fig. 6).

Esses dados demonstram que doses maiores de antagonista beta1 interferem com na aquisição do COM.

Para os ratos que receberam PBS ou butoxamina (3 ou 10 nmol) antes da etapa de aquisição, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na etapa de familiarização.

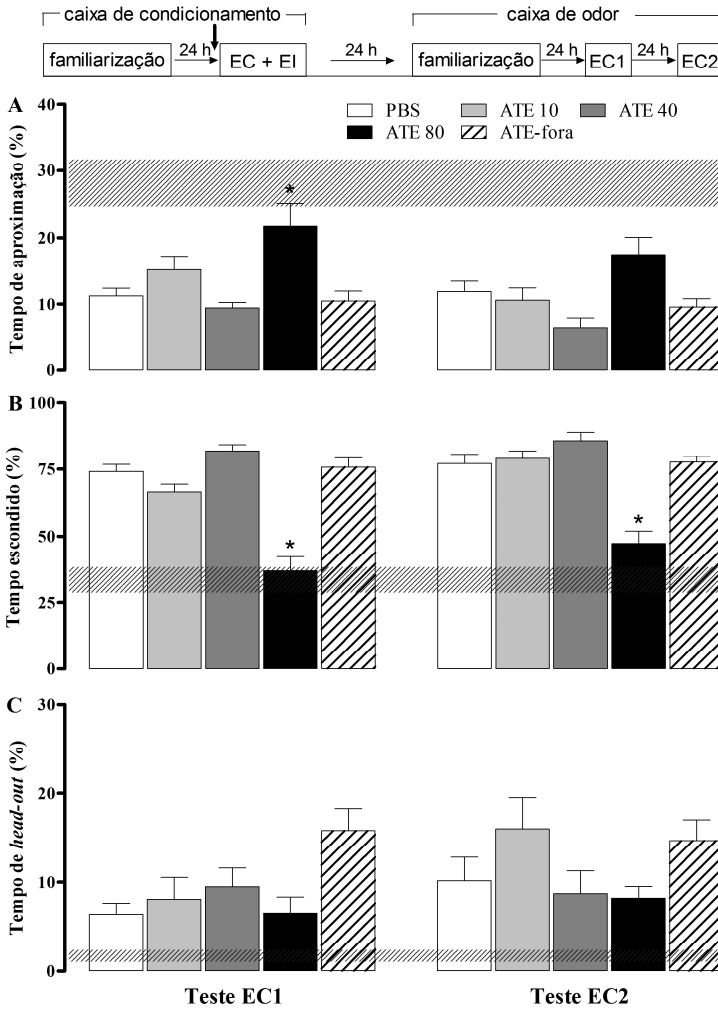


Figura 6. Efeito do atenolol no PMd na aquisição do condicionamento olfatório de medo. Acima da figura está exemplificado o protocolo experimental. A flecha vertical representa o momento da microinjeção no PMd. PBS (n=8), atenolol 10 nmol (ATE10, n=7), atenolol 40 nmol (ATE40, n=9), atenolol 80 nmol (ATE80, n=8) e ATE-fora (n=13). Teste EC1 representa a exposição ao EC na caixa de odor e o teste EC2 representa o condicionamento de segunda ordem ao contexto associado com o EC. As barras horizontais hachuradas representam o intervalo de confiança de 95% dos animais no dia da familiarização. As barras verticais representam o tempo de aproximação (A), o tempo escondido (B) e o tempo de head-out (C) nas sessões de testes EC1 e EC2. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA com medidas repetidas seguida de Newman Keuls).

Nas etapas de testes EC1 e EC2, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos (PBS, BUT3, BUT10 ou BUT-fora) para os parâmetros analisados [tempo de aproximação $F(3,27)=1,26$; tempo escondido $F(3,27)=1,34$; tempo de *head-out* $F(3,27)= 2,82$] (Fig. 7).

4.1.2 Experimento 2: Efeito do atenolol na expressão do comportamento defensivo

Para os ratos que receberam PBS ou atenolol (10 ou 40 nmol), 10 min antes da etapa de expressão do medo condicionado (teste EC1), não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos na etapa de familiarização na caixa de odor.

Nas sessões de testes EC1 e EC2, diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos foram detectadas por ANOVA no fator tratamento para o tempo de aproximação [$F(3,38)=21,92$], para o tempo escondido [$F(3,38)=58,11$] e para o tempo de *head-out* [$F(3,38)=4,15$]. A análise *post hoc* revelou aumento no tempo de aproximação e diminuição nos tempos escondido e de *head-out* para os animais dos grupos ATE 10 e ATE 40 comparados com o grupo controle no teste EC1. Na sessão EC2, o tempo de aproximação continuou aumentado e o tempo escondido diminuído para os grupos que receberam atenolol 10 ou 40 nmol antes do teste EC1. Um grupo de animais que recebeu atenolol (10 ou 40 nmol) fora do PMd foram agrupados e constituíram o grupo ATE-fora, e esses animais não apresentaram diferenças significativas para os parâmetros analisados nos testes EC1 e EC2 em relação ao grupo PBS (Fig. 7).

Esses resultados demonstram que o bloqueio de receptores beta1 no PMd interfere com a expressão das respostas de medo ao odor condicionado, bem como impedem o condicionamento de segunda ordem ao contexto de exposição ao odor.

4.2 Etapa 2 – Efeito da ativação de adrenoceptores beta no PMd na promoção do condicionamento olfatório de medo

4.2.1 Experimento 3 – Efeito do isoproterenol na aquisição do condicionamento olfatório de medo

No primeiro conjunto de dados, o protocolo experimental foi realizado pela microinjeção de PBS ou ISO (10 ou 40 nmol) seguida pela exposição ao odor de acetato de amila na caixa de condicionamento durante 3 min e 20 s. Esse tempo de exposição ao odor foi

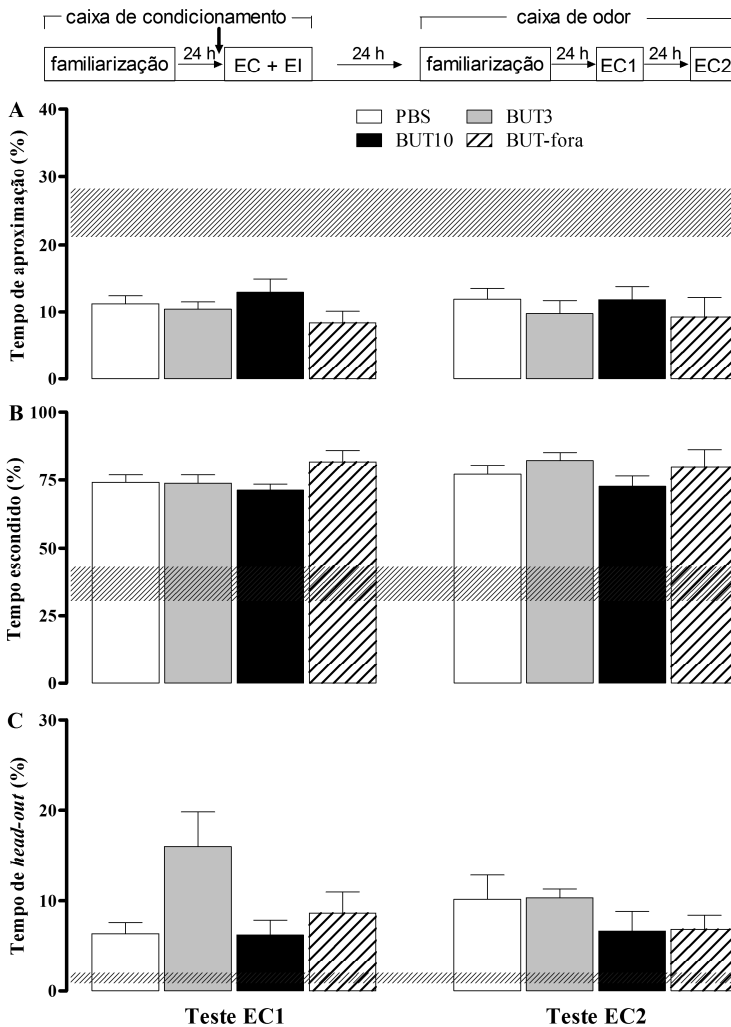


Figura 7. Efeito da butoxamina no PMd na aquisição do condicionamento olfatório de medo.

Acima da figura está exemplificado o protocolo experimental. A flecha vertical representa o momento da microinjeção no PMd. PBS (n=8), butoxamina 3 nmol (BUT3, n=8), butoxamina 10 nmol (BUT10, n=8) e BUT-fora (n=9). Teste EC1 representa a exposição ao EC na caixa de odor e o teste EC2 representa o condicionamento de segunda ordem ao contexto associado com o EC. As barras horizontais hachuradas representam o intervalo de confiança de 95% dos animais no dia da familiarização. As barras verticais representam o tempo de aproximação (A), o tempo escondido (B) e o tempo de head-out (C) nas sessões de testes EC1 e EC2. (ANOVA com medidas repetidas seguida de Newman Keuls).

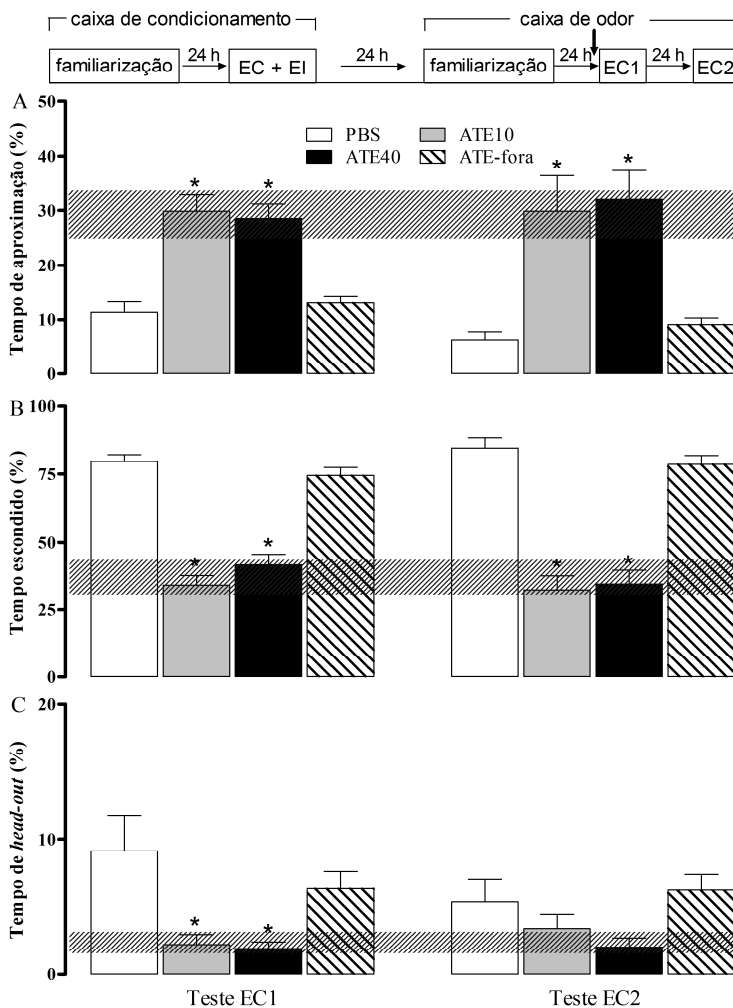


Figura 8. Efeito do atenolol no PMd na expressão do comportamento defensivo ao estímulo condicionado olfatório. Acima da figura está exemplificado o protocolo experimental. A flecha vertical representa o momento da microinjeção no PMd. PBS (n=9), atenolol 10 nmol (ATE10, n=8), atenolol 40 nmol (ATE40, n=8) e ATE-fora (n=17). Teste EC1 representa a exposição ao EC na caixa de odor e o teste EC2 representa o condicionamento de segunda ordem ao contexto associado com o EC. As barras horizontais hachuradas representam o intervalo de confiança de 95% dos animais no dia da familiarização. As barras verticais representam o tempo de aproximação (A), o tempo escondido (B) e o tempo de *head-out* (C) nas sessões de testes EC1 e EC2. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA com medidas repetidas seguida de Newman Keuls).

escolhido para comparar com o intervalo de tempo que é necessário para realizar o protocolo de choque elétrico nas patas.

Para os ratos que receberam PBS ou ISO (10 ou 40 nmol) não foram encontradas diferenças significativas na etapa de familiarização na caixa de odor. Nas sessões de testes EC1 e EC2, ANOVA não detectou diferenças significativas entre os grupos para o fator tratamento para o tempo de aproximação [$F(3,26)=4,86$], para o tempo escondido [$F(3,26)=3,0$] e para o tempo de *head-out* [$F(3,26)=1,61$] (Fig. 9).

Para o segundo conjunto de experimentos, um intervalo maior (10 min) de exposição ao odor de acetato de amila foi escolhido, uma vez que para promover condicionamento olfatório de medo com estimulação de estrutura um tempo maior de exposição ao odor seja necessário, comparado com a utilização de choques elétricos nas patas como EI.

Para os grupos que receberam PBS ou ISO (10 ou 40 nmol) no PMd antes da exposição ao odor de acetato de amila na caixa de condicionamento, nenhuma diferença estatística significativa foi detectada entre os grupos na etapa de familiarização na caixa de odor.

Nas etapas de testes EC1 e EC2, ANOVA detectou diferenças significativas ($p < 0,00001$) no fator tratamento para o tempo de aproximação [$F(4,46)=25,43$], o tempo escondido [$F(4,46)=45,12$] e o tempo de *head-out* [$F(4,46)=20,50$]. Além disso, a ANOVA detectou diferenças significativas ($p < 0,05$) no fator interação para o tempo de aproximação [$F(4,46)=3,81$]. A análise *post hoc* revelou que os ratos que receberam ISO 10 ou 40 nmol, e foram condicionados ao odor de acetato de amila durante 10 min, apresentaram diminuição no tempo de aproximação e aumento no tempo escondido e no tempo de *head-out*, tanto na sessão de teste EC1 quanto na sessão EC2, comparados ao grupo controle PBS. Para os ratos que receberam ISO 40 nmol, mas foram condicionados ao odor neutro no dia 2, não foram observadas diferenças significativas nas sessões EC1 e EC2 em relação ao grupo controle. Os animais que receberam ISO 10 ou 40 fora do PMd, condicionados ao odor de acetato de amila durante 10 min, foram agrupados em grupo ISO-fora e esse grupo não apresentou diferentes estatísticas comparado ao grupo PBS (Fig. 10).

Com isso, pode-se verificar o estabelecimento do condicionamento olfatório de medo pela microinjeção de isoproterenol no PMd e exposição ao odor de acetato de amila durante 10 min.

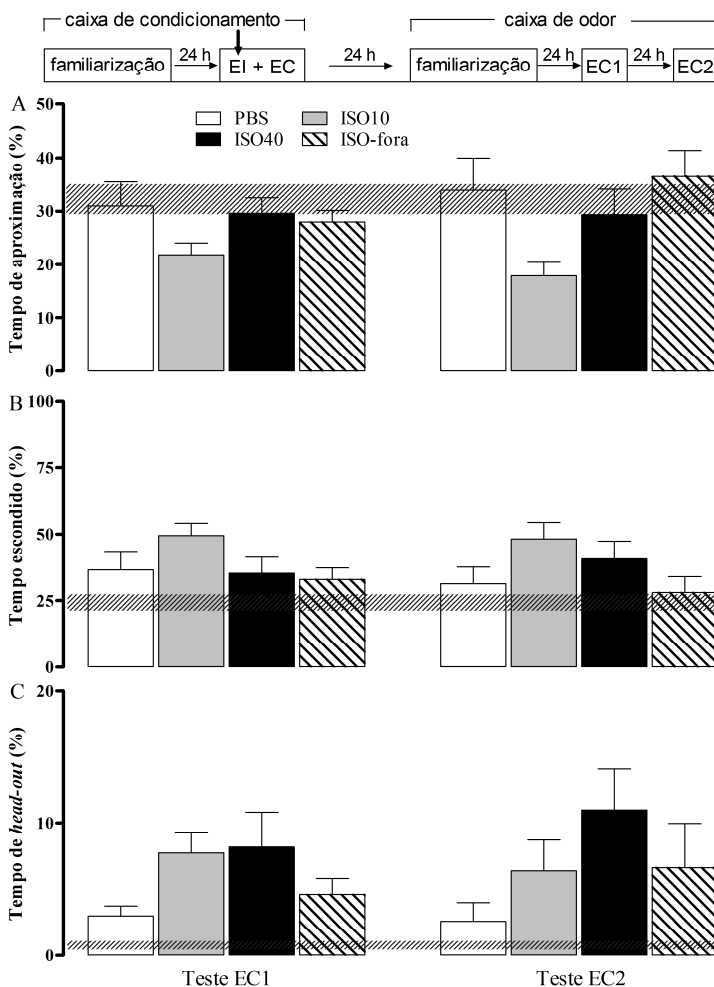


Figura 9. Efeito do isoproterenol no PMd em animais expostos ao odor de acetato de amila durante 3 min e 20 s na promoção do condicionamento olfatório de medo. Acima da figura está exemplificado o protocolo experimental. A flecha vertical representa o momento da microinjeção no PMd. PBS (n=6), isoproterenol 10 nmol (ISO10, n=7), isoproterenol 40 nmol (ISO40, n=8) e ISO-fora (n=9) foram condicionados com odor de acetato de amila (EC) durante 3 min e 20 s. Teste EC1 representa a exposição ao EC na caixa de odor e o teste EC2 representa o condicionamento de segunda ordem ao contexto associado com o EC. As barras horizontais hachuradas representam o intervalo de confiança de 95% dos animais no dia da familiarização. As barras verticais representam o tempo aproximação (A), o tempo escondido (B) e o tempo de *head-out* (C) nas sessões de testes EC1 e EC2. (ANOVA com medidas repetidas seguida de Newman Keuls).

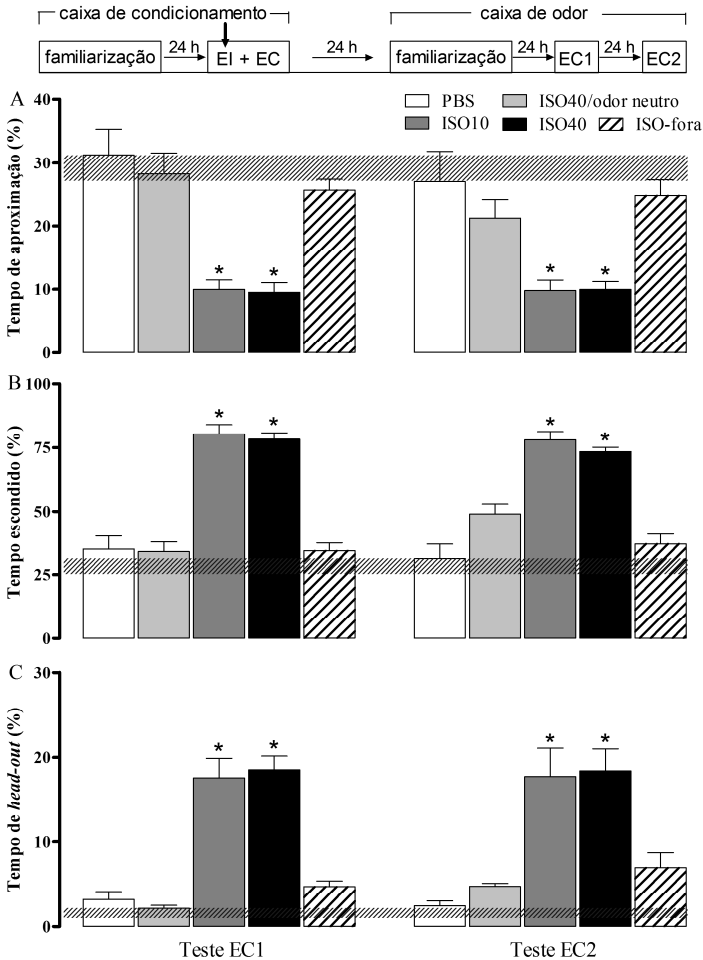


Figura 10. Efeito do isoproterenol no PMd funcionando como um estímulo incondicionado para promover condicionamento olfatório de medo. Acima da figura está exemplificado o protocolo experimental. A flecha vertical representa o momento da microinjeção no PMd. PBS (n=7), isoproterenol 10 nmol (ISO10, n=9), isoproterenol 40 nmol (ISO40, n=11) e ISO-fora (n=17) foram condicionados com odor de acetato de amila (EC) durante 10 min. Ratos do grupo ISO 40/odor neutro (n=7) não foram expostos ao EC durante a sessão de condicionamento. Teste EC1 representa a exposição ao EC na caixa de odor e o teste EC2 representa o condicionamento de segunda ordem ao contexto associado com o EC. As barras horizontais hachuradas representam o intervalo de confiança de 95% dos animais no dia da familiarização. As barras verticais representam o tempo aproximação (A), o tempo escondido (B) e o tempo de *head-out* (C) nas sessões de testes EC1 e EC2. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle PBS (ANOVA com medidas repetidas seguida de Newman Keuls).

4.2.2 *Experimento 4* – Efeito do atenolol e da butoxamina na aquisição do condicionamento olfatório de medo induzido por isoproterenol

Nesta etapa experimental, os animais receberam duas microinjeções no PMd, espaçadas 5 min cada, para verificar se o pré-tratamento com antagonistas beta1 ou beta2 antagonizariam os efeitos do isoproterenol em promover o condicionamento olfatório de medo.

Na etapa de familiarização na caixa de odor, nenhuma diferença estatística significativa foi detectada entre os grupos nos parâmetros analisados.

Nas etapas de testes EC1 e EC2, a ANOVA detectou diferenças significativas ($p < 0,00001$) no fator tratamento para o tempo de aproximação [$F(5,44)=11,89$], o tempo escondido [$F(5,44)=31,45$] e o tempo de *head-out* [$F(5,44)=13,35$]. Além disso, a ANOVA detectou diferenças significativas ($p < 0,05$) no fator repetição para o tempo de aproximação [$F(1,44)=5,99$], o tempo escondido [$F(1,44)=5,51$] e o tempo de *head-out* [$F(1,44)=6,50$]. A análise *post hoc* detectou que nos grupos PBS+ISO e BUT+ISO, o tempo de aproximação estava diminuído ao passo que o tempo escondido e de *head-out* estavam aumentados quando comparados ao controle PBS+PBS nas etapas de teste EC1 e EC2 (Fig. 11).

Os ratos que receberam atenolol (ATE+ISO ou ATE+PBS), e também os animais tratados com butoxamina antes do PBS, não foram detectados diferenças significativas nos testes EC1 e EC2 em relação ao grupo controle (PBS+PBS) (Fig. 11).

Esses resultados confirmam o estabelecimento do condicionamento olfatório de medo pela microinjeção de isoproterenol no PMd, e indicam que o atenolol, mas não a butoxamina, é capaz de bloquear o efeito do ISO em promover o condicionamento.

4.2.3 *Experimento 5* – Efeito do atenolol na expressão do condicionamento olfatório de medo induzido por isoproterenol

Para os animais que foram condicionados com PBS ou ISO 40 nmol e acetato de amila durante 10 min, e receberam PBS ou ATE 40 nmol antes do teste EC1, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos na etapa de familiarização na caixa de odor.

A ANOVA detectou diferenças significativas ($p < 0,00001$) no fator tratamento por ANOVA para medidas repetidas para o tempo

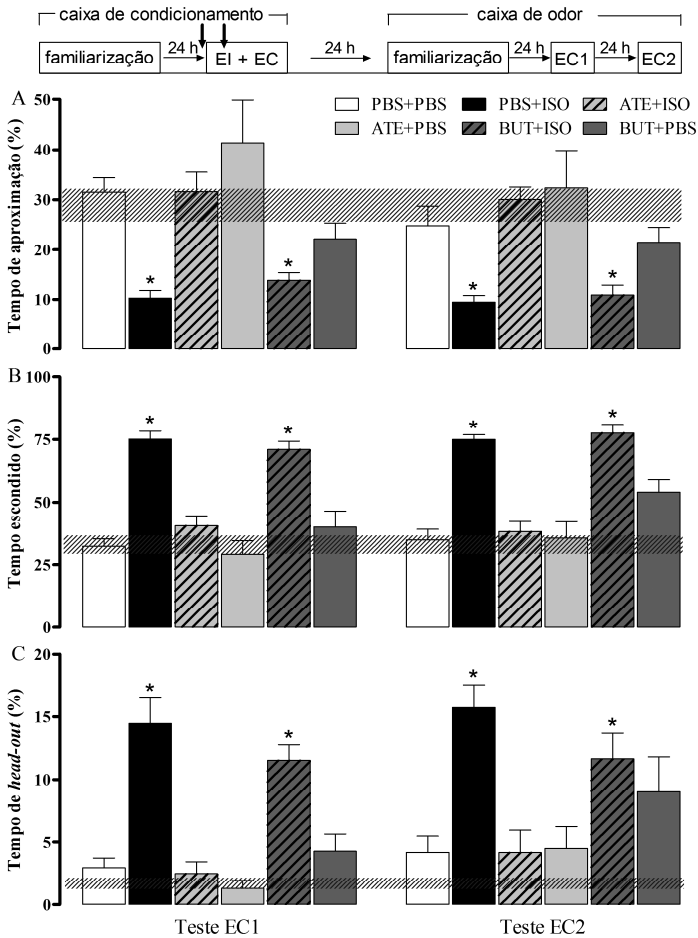


Figura 11. Efeito do atenolol e da butoxamina na aquisição do condicionamento olfatório de medo promovido por isoproterenol no PMd. Acima da figura está exemplificado o protocolo experimental. As flechas verticais representam o momento da microinjeção de atenolol 40 nmol (ATE) ou butoxamina 10 nmol (BUT) e isoproterenol 40 nmol (ISO) no PMd (intervalo de 5 min entre as microinjeções). Os grupos PBS+PBS (n=9), PBS+ISO (n=11), ATE + ISO (n=8), ATE + PBS (n=6), BUT + ISO (n=8) ou BUT + PBS (n=8) foram condicionados com odor de acetato de amila (EC) na caixa de condicionamento durante 10 min. Teste EC1 representa a exposição ao EC na caixa de odor e o teste EC2 representa o condicionamento de segunda ordem ao contexto associado com o EC. As barras horizontais hachuradas representam o intervalo de confiança de 95% dos animais no dia da familiarização. As barras verticais representam o tempo de aproximação (A), o tempo escondido (B) e o tempo de *head-out* (C) nas sessões de testes EC1 e EC2. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle PBS+PBS (ANOVA com medidas repetidas seguida de Newman Keuls).

de aproximação [$F(3,26)=19,51$], o tempo escondido [$F(3,26)=43,51$] e o tempo de *head-out* [$F(3,26)=30,89$]. Além disso, a ANOVA detectou diferenças ($p < 0,05$) no fator repetição para o tempo de aproximação [$F(1,26)=5,41$]. A análise *post hoc* detectou que os animais microinjetados com ISO no condicionamento e PBS antes do teste EC1 (grupo ISO/PBS) apresentaram diminuição no tempo de aproximação e aumento nos tempos escondido e de *head-out* comparados ao grupo controle (PBS/PBS), tanto na sessão EC1 quanto na sessão EC2.

A análise *post hoc* não detectou diferenças significativas entre os grupos injetados com atenolol 40 nmol antes do teste EC1 (grupos ISO/ATE e PBS/ATE), comparados com o grupo controle (PBS/PBS) (Fig. 12).

Esses resultados mostram que o atenolol microinjetado no PMd é capaz de impedir a expressão do COM promovido pela estimulação de receptores beta no PMd.

4.2.4 Experimento 6 – Efeito do nadolol sistêmico na aquisição do condicionamento olfatório de medo induzido por isoproterenol

Os ratos que receberam salina ou nadolol (i.p.) antes da microinjeção de ISO no PMd na sessão de condicionamento, não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros analisados na familiarização à caixa de odor.

Durante as etapas de testes EC1 e EC2, ANOVA não detectou diferenças significativas entre os grupos no fator tratamento para o tempo de aproximação [$F(1,13)=0,66$], tempo escondido [$F(1,13)=0,03$] ou tempo de *head-out* [$F(1,13)=1,30$] (Fig. 13).

Com esses dados é possível verificar que o efeito da estimulação de receptores beta no PMd em promover o COM é independente da estimulação de receptores adrenérgicos periféricos.

4.2.5 Experimento 7 – Participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na MCPd na aquisição do condicionamento induzido por isoproterenol

Neste protocolo experimental, não houve diferenças significativas entre os grupos no dia da familiarização na caixa de odor. Nas sessões de teste EC1 e EC2, a ANOVA detectou diferenças significativas ($p < 0,00001$) no fator tratamento para o tempo de aproximação [$F(3,34)=17,94$], tempo escondido [$F(3,34)=32,40$] e tempo de *head-out* [$F(3,34)=21,89$]. A análise *post hoc* indicou que durante a sessão de

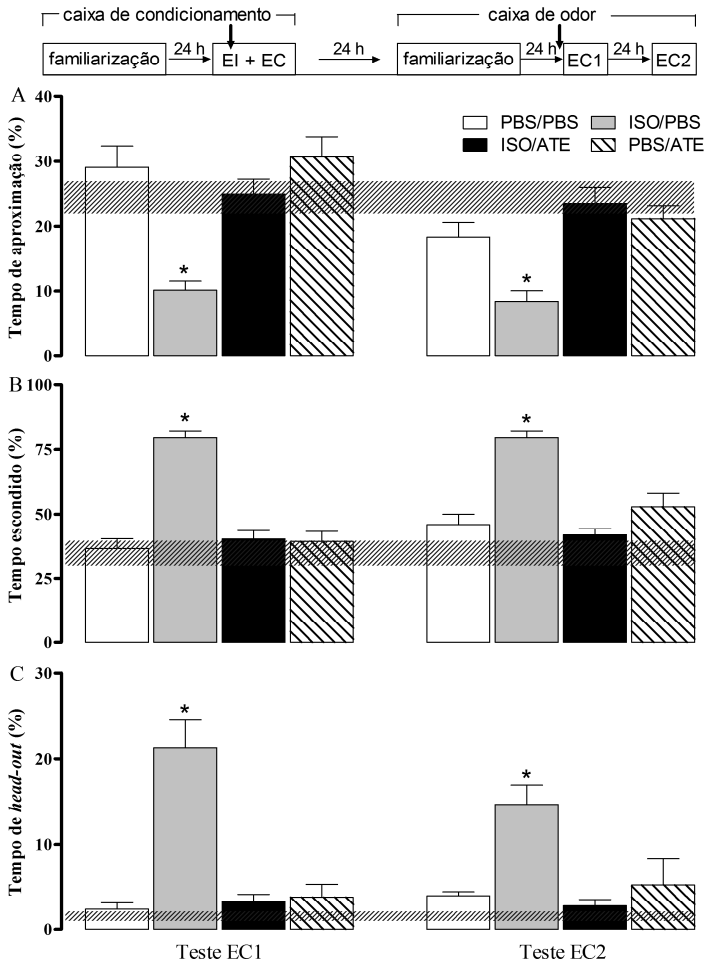


Figura 12. Efeito do atenolol na expressão do condicionamento olfatório de medo promovido por isoproterenol no PMd. Acima da figura está exemplificado o protocolo experimental. As flechas verticais representam o momento da microinjeção de isoproterenol 40 nmol (ISO) ou atenolol 40 nmol (ATE) no PMd. Os grupos PBS/PBS (n=8), ISO/PBS (n=9), ISO/ATE (n=8) e PBS/ATE (n=8) foram condicionados com o odor de acetato de amila (EC) durante 10 min e receberam a segunda microinjeção antes da expressão do condicionamento olfatório de medo.

Teste EC1 representa a exposição ao EC na caixa de odor e o teste EC2 representa o condicionamento de segunda ordem ao contexto associado com o EC. As barras horizontais hachuradas representam o intervalo de confiança de 95% dos animais no dia da familiarização. As barras verticais representam o tempo de aproximação (A), o tempo escondido (B) e o tempo de *head-out* (C) nas sessões de testes EC1 e EC2. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle PBS/PBS (ANOVA com medidas repetidas seguida de Newman Keuls).

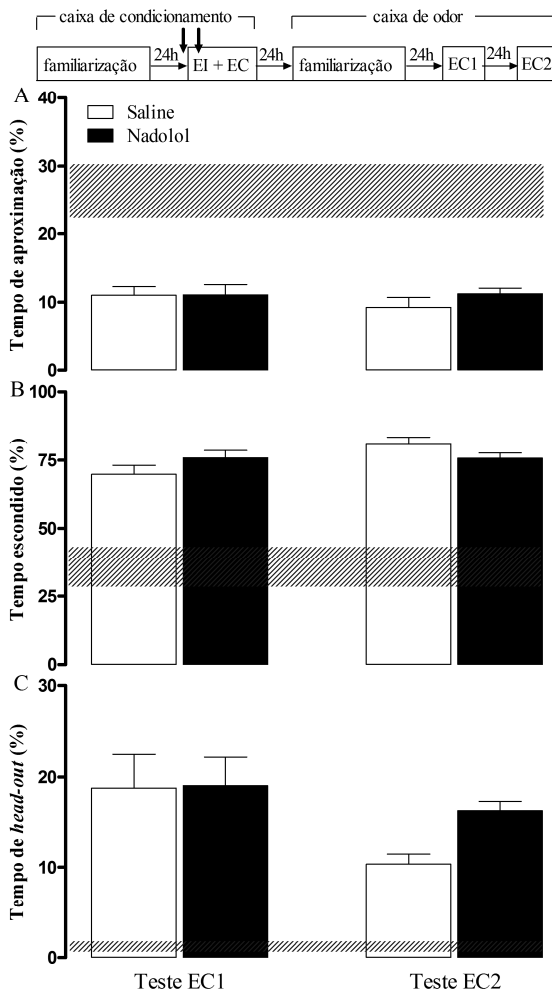


Figura 13. Efeito da injeção sistêmica de nadolol na aquisição do condicionamento olfatório de medo promovido por isoproterenol no PMd. Acima da figura está exemplificado o protocolo experimental. A primeira flecha vertical representa o momento da microinjeção de salina (n=7) ou nadolol 10 mg/kg (n=8) injetado (i.p.) 30 min antes do condicionamento com isoproterenol 40 nmol no PMd (segunda flecha vertical) e acetato de amila (EC) durante 10 min. Teste EC1 representa a exposição ao EC na caixa de odor e o teste EC2 representa o condicionamento de segunda ordem ao contexto associado com o EC. As barras horizontais hachuradas representam o intervalo de confiança de 95% dos animais no dia da familiarização. As barras verticais representam o tempo de aproximação (A), o tempo escondido (B) e o tempo de *head-out* (C) nas sessões de testes EC1 e EC2. (ANOVA com medidas repetidas seguida de Newman Keuls).

teste EC1 os animais microinjetados com PBS na MCPd seguido por ISO 40 nmol no PMd (grupo PBS/ISO) ou ratos microinjetados com AP5 6 nmol fora da MCPd (grupo AP5-fora/ISO) apresentaram diminuição no tempo de aproximação e aumento no tempo escondido e no tempo de *head-out* comparado com o grupo controle PBS/PBS. O bloqueio de receptores glutamatérgicos NMDA com AP5 na MCPd foi responsável pela falta de efeito significativo do ISO no PMd (grupo AP5/ISO) em relação ao grupo controle (Fig. 14).

Durante a sessão de teste EC2, animais do grupo PBS/ISO continuaram a apresentar diminuição no tempo de aproximação e aumento no tempo escondido e tempo de *head-out* comparado com o grupo controle. Animais do grupo AP5-fora/ISO mostraram aumento no tempo escondido e no tempo de *head-out* no teste EC2 em relação ao grupo PBS/PBS. Não houve diferenças significativas nos parâmetros analisados durante a sessão EC2 entre os grupos AP5/ISO e o grupo controle (Fig. 14).

Em conjunto, esses resultados demonstram que o bloqueio de receptores NMDA na MCPd antes da injeção de ISO no PMd impede a associação efetiva de ISO-EC em promover respostas defensivas condicionadas para o EC.

4.2.6 Experimento 8 – Participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da MCPd na expressão do condicionamento induzido por isoproterenol

Não houve diferenças significativas entre os grupos nas respostas defensivas à caixa de odor no dia da familiarização. A ANOVA detectou diferenças significativas ($p < 0,01$) no fator tratamento para o tempo de aproximação [$F(3,28)=6,13$], o tempo escondido [$F(3,28)=17,06$] e o tempo de *head-out* [$F(3,28)=13,47$]. Foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,01$) também no fator interação sessão X tratamento para o tempo de aproximação [$F(3,28)=6,05$] e o tempo escondido [$F(3,28)=4,81$]. Comparações *post hoc* mostraram que durante a sessão de teste EC1, houve redução significativa no tempo de aproximação e aumento no tempo escondido e no tempo de *head-out* nos animais que receberam ISO 40 nmol no PMd na sessão de condicionamento e PBS na MCPd antes da sessão EC1 (grupo ISO/PBS) e nos animais que receberam ISO no PMd e AP5 fora da MCPd (grupo ISO/AP5-fora). Os ratos que receberam ISO 40 nmol no PMd e AP5 6 nmol na MCPd antes de teste EC1 (grupo ISO/AP5) apresentaram diminuição no tempo de aproximação na sessão EC1. Um

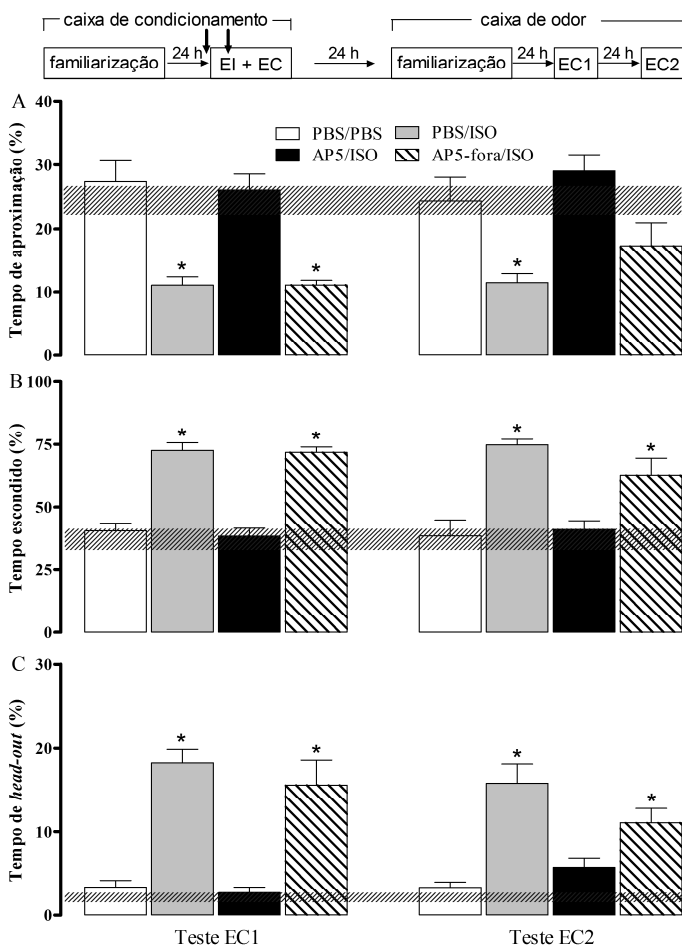


Figura 14. Efeito do AP5 na MCPd na aquisição do condicionamento olfatório de medo promovido pela microinjeção de isoproterenol no PMd. Acima da figura está exemplificado o protocolo experimental. As flechas verticais representam o momento da microinjeção de AP5 6 nmol na MCPd e isoproterenol 40 nmol (ISO) no PMd (intervalo de 5 min entre as microinjeções). Os grupos PBS/PBS (n=7), PBS/ISO (n=10) ou AP5/ISO (n=11) e AP5-fora/ISO (n=10) foram condicionados com odor de acetato de amila (EC) na caixa de condicionamento durante 10 min. Teste EC1 representa a exposição ao EC na caixa de odor e o teste EC2 representa o condicionamento de segunda ordem ao contexto associado com o EC. As barras horizontais hachuradas representam o intervalo de confiança de 95% dos animais no dia da familiarização. As barras verticais representam o tempo de aproximação (A), o tempo escondido (B) e o tempo de *head-out* (C) nas sessões de testes EC1 e EC2. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle PBS/PBS (ANOVA com medidas repetidas seguida de Newman Keuls).

bloqueio de receptores glutamatérgicos na MCPd antes da sessão de expressão das respostas de medo ao odor foi responsável pela ausência de diferença na expressão das respostas de medo promovido pelo condicionamento com ISO, tanto no tempo escondido quanto no tempo de *head-out* (Fig. 15).

Durante o teste EC2, os animais do grupo ISO/PBS e ISO/AP5- fora continuaram a apresentar aumento no tempo escondido comparado ao grupo controle. Não foram detectadas diferenças significativas durante o teste EC2 entre o grupo ISO/AP5 e o grupo controle nos parâmetros analisados (Fig. 15).

Esses resultados demonstram que o bloqueio de receptores NMDA na MCPd impedem a expressão do comportamento defensivo para o COM promovido por ISO no PMd, e também bloqueiam o condicionamento de segunda ordem ao contexto associado ao odor pareado.

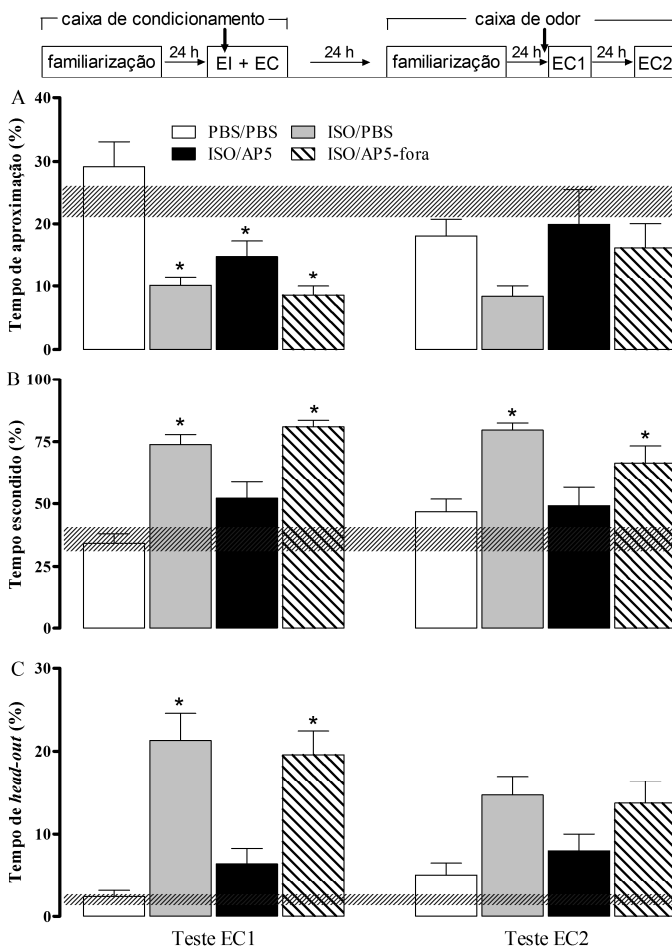


Figura 15. Efeito do AP5 na MCPd na expressão do condicionamento olfatório de medo promovido por isoproterenol no PMd. Acima da figura está exemplificado o protocolo experimental. As flechas verticais representam o momento da microinjeção de isoproterenol 40 nmol (ISO) no PMd e de AP5 6 nmol na MCPd. Os grupos PBS/PBS (n=7), ISO/PBS (n=9), ISO/AP5 (n=7) e ISO/AP5-fora (n=9) foram condicionados com o odor de acetato de amila (EC) na caixa de condicionamento durante 10 min e receberam a segunda microinjeção antes da expressão do condicionamento olfatório de medo. Teste EC1 representa a exposição ao EC na caixa de odor e o teste EC2 representa o condicionamento de segunda ordem ao contexto associado com o EC. As barras horizontais hachuradas representam o intervalo de confiança de 95% dos animais no dia da familiarização. As barras verticais representam o tempo de aproximação (A), o tempo escondido (B) e o tempo de head-out (C) nas sessões de testes EC1 e EC2. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle PBS/PBS (ANOVA com medidas repetidas seguida de Newman Keuls).

5. Discussão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que adrenoceptores beta1 no PMd participam na mediação do comportamento defensivo de ratos, no modelo do condicionamento olfatório de medo.

Os receptores beta1 no PMd interferem com a aquisição e expressão do comportamento defensivo no condicionamento olfatório de medo

Na primeira etapa experimental deste estudo, foi realizado o bloqueio dos adrenoceptores beta no PMd utilizando o modelo do COM. Em um trabalho anterior do nosso laboratório, Do Monte e colaboradores (2008) verificaram que adrenoceptores beta1 no PMd medeiam as respostas defensivas ao odor de gato. Foi demonstrado também que o bloqueio dos receptores beta1 no PMd interfere com a aquisição do condicionamento ao contexto associado à exposição ao odor de gato (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008). O modelo de odor de gato promove respostas emocionais importantes nos roedores, e é capaz de ativar circuitos neurais de medo relacionados ao sistema defensivo hipotalâmico medial (Blanchard, Canteras *et al.*, 2005; Canteras, 2008). Vários pesquisadores que utilizam o odor de predador mostraram que esse modelo promove respostas defensivas e induz a um estado de ansiedade biologicamente relevante em roedores (Zangrossi e File, 1992; Blanchard, Yudko *et al.*, 1993; Dielenberg, Hunt *et al.*, 2001; Dielenberg e McGregor, 2001; McGregor, Schrama *et al.*, 2002; McGregor, Hargreaves *et al.*, 2004; Staples, Hunt *et al.*, 2005). As respostas dos ratos mediante a presença do odor de predador é intensa e imediata, apesar destes roedores, nascidos e criados dentro de laboratório, nunca terem entrado em contato com um gato antes. Enquanto odores aversivos, como o TMT ou o formol, causam apenas esquiva nos roedores, o odor de gato causa uma série de respostas comportamentais como aumento da avaliação de risco, fuga, redução da atividade locomotora, e aumento do tempo de imobilidade (Blanchard e Blanchard, 1989; Dielenberg e McGregor, 2001; McGregor, Schrama *et al.*, 2002; Pagani e Rosen, 2009) e, além disso, quando os ratos são reexpostos ao ambiente em que foram apresentados ao odor de gato (contexto), passam a apresentar um aumento das respostas defensivas caracterizadas como medo condicionado (Dielenberg e McGregor, 1999; Do Monte, Canteras *et al.*, 2008).

Entretanto, apesar da relevância biológica que esse estímulo exerce sobre os roedores, a impossibilidade de medir a real quantidade de odor usada para gerar medo limita a sua utilização com boa reprodutibilidade entre os laboratórios. Além disso, a aquisição do odor de gato pode variar em função da temperatura, umidade relativa do ar, condições de alojamento e grau de estresse do felino, entre outros, o que dificulta ainda mais sua padronização. Com base nesses fatos, uma proposta do nosso grupo foi verificar se, ao condicionar um odor neutro com um estímulo aversivo, as respostas emocionais geradas nos roedores, bem como os circuitos neuroanatômicos responsáveis em processar essa informação, seriam os mesmos mobilizados quando da exposição ao odor de gato. Desta forma, foi recentemente demonstrado que ratos submetidos ao COM com 5 choques elétricos nas patas e odor neutro emitem respostas comportamentais similares aquelas visualizadas na presença do odor de gato (Canteras, Kroon *et al.*, 2008; Kroon e Carobrez, 2009). Além disso, o aumento da expressão de Fos no PMd após a exposição ao estímulo olfatório previamente condicionado (EC1) (ver Fig. 3 da introdução) de maneira semelhante ao detectado em ratos expostos ao predador ou ao seus odores, sugere que o COM poderia constituir em um modelo animal capaz de mimetizar a ativação de áreas hipotalâmicas envolvidas com estímulos relacionados ao predador (Canteras, Kroon *et al.*, 2008).

O modelo do COM já foi demonstrado por alguns pesquisadores (Otto, Cousens *et al.*, 1997; Richardson, Vishney *et al.*, 1999; Schettino e Otto, 2001; Paschall e Davis, 2002a; Cavalli, Bertoglio *et al.*, 2009; Kroon e Carobrez, 2009; Zhang, Okutani *et al.*, 2010). No protocolo experimental utilizado neste trabalho, as respostas de medo são visualizadas em um aparato diferente do utilizado para o condicionamento, com o objetivo de isolar apenas a pista olfatória como EC. Os parâmetros analisados foram o tempo escondido, ou seja, no compartimento fechado e afastado da fonte de odor, o tempo de aproximação do estímulo olfatório e o tempo em que os ratos permanecem realizando um comportamento de avaliação de risco (tempo de *head-out*). Ratos que foram condicionados com cinco choques elétricos nas patas, e que receberam microinjeção de PBS no PMd como controle, apresentaram respostas de medo ao odor condicionado no dia do teste EC1. Esses animais apresentaram comportamento de esquiva ao odor, pois permaneceram mais tempo escondidos e fazendo *head-out*, e menos tempo próximos da pista olfatória, em relação ao dia da familiarização na caixa de odor, quando o estímulo aversivo não estava presente. Estes resultados indicam que

ocorreu aumento das respostas defensivas dos ratos para o estímulo EC1. Vale ressaltar que a ausência das respostas de medo no dia da familiarização na caixa de odor exclui a possibilidade de generalização a outras pistas do ambiente.

Além disso, a apresentação do odor na caixa promoveu o condicionamento de segunda ordem, ou seja, os ratos passaram a contextualizar o ambiente onde foram expostos ao odor condicionado, e apresentaram o mesmo padrão de comportamento defensivo durante a sessão de teste EC2. O condicionamento de segunda ordem já foi elucidado utilizando diferentes estímulos (Rescorla e Gillan, 1980; Gewirtz e Davis, 1998; 2000; Rescorla, 2008), e, como já foi mencionado na introdução, refere-se à capacidade de um estímulo previamente condicionado, ser associado a outro estímulo neutro, que passa a ser denominado então de estímulo condicionado 2. Este novo estímulo passa então a gerar respostas de medo, sem ter sido associado diretamente ao EI. No condicionamento olfatório de medo, o odor previamente pareado com choque nas patas adquire caráter relevante, e é capaz de ser associado a outras pistas, como uma luz, ou mesmo o contexto associado ao odor aversivo (Paschall e Davis, 2002b; Cavalli, Bertoglio *et al.*, 2009; Kroon e Carobrez, 2009).

No modelo do COM, a administração sistêmica de propranolol interfere com o processo de aquisição, consolidação e expressão das respostas de medo ao estímulo EC1 (Kroon e Carobrez, 2009). Isso demonstra que o sistema adrenérgico é importante na mediação das respostas de medo para estímulos aversivos que envolvem pistas olfatórias. Muito das ações do propranolol em interferir nos processos de ansiedade e formação de memórias aversivas são decorrências de suas ações centrais. Como por exemplo, o efeito do propranolol em reduzir as respostas de medo ao odor de gato está relacionado com a diminuição da expressão de proteína Fos no PMd (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008).

O envolvimento de adrenoceptores no PMd nas etapas de aquisição do medo condicionado a um estímulo olfatório foi demonstrado pela primeira vez por este trabalho. O bloqueio de receptores beta1 no PMd impede a aquisição do condicionamento de medo para um estímulo olfatório. Os ratos microinjetados com atenolol 80 nmol no PMd antes da etapa de aquisição do COM apresentaram diminuição das respostas de medo ao EC1, aumentando o tempo de aproximação da fonte de odor e diminuindo o tempo escondido em relação aos ratos controles. Além disso, estes animais apresentaram diminuição no tempo escondido e uma tendência no aumento do tempo

de aproximação na sessão de teste EC2, indicando que não ocorreu o condicionamento de segunda ordem ao contexto, uma vez que o odor de acetato de amila não parece apresentar relevância emocional aversiva. Atenolol nas doses de 10 e 40 nmol e butoxamina nas doses de 3 e 10 nmol não impediram o aprendizado do COM, apenas a dose maior de atenolol foi efetiva para interferir com as respostas de medo ao aprendizado olfatório. Estes resultados poderiam ser explicados pelo fato de que apenas doses maiores de antagonistas são efetivas em impedir o aprendizado associativo quando se utiliza choque elétrico nas patas como EI. Em experimentos utilizando pistas auditivas para promover condicionamento de medo, Debiec e Ledoux (2004) utilizaram doses elevadas de antagonistas adrenérgicos para bloquear a aquisição do condicionamento ao choque nas patas, quando comparadas com outras tarefas de aprendizado associativo. Recentemente, um trabalho demonstrou que no condicionamento de medo ao som tanto o atenolol como a butoxamina impediram a consolidação do aprendizado associativo (Qu, Guo *et al.*, 2008). Como doses maiores de butoxamina não foram realizadas em nosso protocolo experimental, por dificuldades de diluição e outros problemas técnicos, a possibilidade de que os receptores beta2 estejam participando na aquisição do COM não pode ser descartada.

Os resultados desta etapa experimental não conseguem discriminar se o efeito do atenolol no PMd interfere na fase de aquisição inicial do condicionamento com choque nas patas ou na fase de consolidação da memória de medo, uma vez que o tempo de meia-vida de ação do atenolol não foi determinado.

Estudos com condicionamento de medo Pavloviano tipicamente utilizam o choque elétrico nas patas como EI. A ativação de receptores nociceptivos das patas ativa vias ascendentes da dor, e através de projeções para a lâmina 1 na medula espinhal, ativam estruturas encefálicas como o hipotálamo e a amígdala (Craig, 2002). Muitos estudos mostram a amígdala como o principal alvo para aquisição, consolidação e expressão das memórias de medo ao estímulo condicionado (Fendt e Fanselow, 1999; Ledoux, 2000; Otto, Cousens *et al.*, 2000; Maren, 2001; McGaugh, 2004). O núcleo lateral da amígdala está envolvido durante a fase de aquisição do medo condicionado (Goossens e Maren, 2001; Holahan e White, 2004; Rodrigues, Schafe *et al.*, 2004; Knapska, Walasek *et al.*, 2006; Lanuza, Moncho-Bogani *et al.*, 2008), até mesmo quando são utilizados estímulos condicionados olfatórios (Otto, Cousens *et al.*, 2000). Esses estudos indicam que o núcleo lateral da amígdala é responsável por associar as respostas

condicionadas e incondicionadas, e envia projeções, via núcleo basolateral, para o núcleo central da amígdala. Estudos com lesão do núcleo basolateral demonstram a participação dessa região na consolidação do COM (Cousens e Otto, 1998; Kilpatrick e Cahill, 2003) e o bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA impede a aquisição do condicionamento de medo ao odor (Walker, Paschall *et al.*, 2005), confirmando a participação dessa região nos processos de consolidação da memória de medo para estímulos olfatórios. Quando os estímulos utilizados envolvem um odor, conexões da amígdala para o sistema defensivo hipotalâmico medial são extremamente importantes para a expressão dessas respostas de medo. Canteras e colaboradores (2008) sugeriram que o núcleo lateral da amígdala poderia influenciar o sistema defensivo hipotalâmico através de projeções para a parte posterior do núcleo basomedial da amígdala, que possui conexões com o núcleo hipotalâmico ventromedial. Além disso, o núcleo lateral também se projeta para a região CA1 do hipocampo e *subículum*, que pode conectar-se ao sistema hipotalâmico medial via núcleo hipotalâmico anterior (Risold, Canteras *et al.*, 1994). Desta forma, o bloqueio dos receptores beta1 no PMd são importantes em mediar o aprendizado do COM.

As doses de atenolol que não interferiram com a aquisição do COM, quando injetadas antes do teste EC1, interferiram com a expressão das respostas defensivas. O atenolol micronjetado no PMd reduziu as respostas de medo ao odor. Apesar dessas doses de antagonistas não serem eficazes em impedir a aquisição do COM, elas impediram a aquisição do medo associado ao contexto do odor, ou seja, o atenolol no PMd impediu o condicionamento de segunda ordem. A seletividade deste efeito pode ser visualizada através do comportamento dos animais que receberam atenolol em regiões fora do PMd e exibiram respostas de medo condicionado. Isso demonstra a especificidade de adrenoceptores no PMd nos processos relacionados a sensação de medo a partir de estímulos olfatórios.

O PMd, até recentemente, era caracterizado como estrutura chave apenas para detecção de pistas relacionadas com o predador natural, pois estudos com lesão indicam que o PMd não participa nas respostas de medo ao labirinto em cruz elevado nem no condicionamento de medo contextual (Blanchard, Li *et al.*, 2003; Blanchard, Canteras *et al.*, 2005). Corroborando esses trabalhos, a inibição do PMd com agonista dos receptores GABA subtipo A, muscimol, não interfere com as respostas de medo potencializado pelo sobressalto acústico (Santos, Macedo *et al.*, 2008). Entretanto, quando a pista aversiva envolve o sistema

olfatório, foi demonstrado que o bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA do PMd antes da etapa de expressão ao medo condicionado impede as respostas de medo ao odor pareado de forma similar à inibição das respostas ao odor de gato (Canteras, Kroon *et al.*, 2008). Esses achados, juntamente com os resultados deste trabalho, confirmam que o PMd participa das respostas defensivas no modelo do COM. Isso demonstra que o sistema hipotalâmico defensivo medial pode ser importante na detecção de outras respostas de medo além do predador. E dados deste trabalho mostram que adrenoceptores beta1, juntamente com os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, são importantes em mediar essas respostas.

O aumento da atividade do sistema adrenérgico central tem sido implicado na expressão das respostas de medo e ansiedade (Bremner, Krystal *et al.*, 1996; Charney, 2003; Morilak, Barrera *et al.*, 2005). Durante situações de estresse, a noradrenalina está aumentada (Bremner, Krystal *et al.*, 1996; Crane, French *et al.*, 2005) como resultado de um aumento acentuado no *locus coeruleus*, regiões límbicas, como hipotálamo, hipocampo e amígdala, e córtex cerebral (Tsuda e Tanaka, 1985). Assim, o aumento da liberação da noradrenalina central durante experiências de medo é essencial para induzir a formação de memórias aversivas (Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo, Medina *et al.*, 1998). O choque elétrico nas patas aumenta a concentração de noradrenalina no encéfalo (Swiergiel, Li *et al.*, 2008), e a reexposição ao ambiente previamente associado com o choque nas patas aumenta a atividade de neurônios noradrenérgicos no hipotálamo (Yokoo, Tanaka *et al.*, 1990), indicando que neurônios noradrenérgicos nessa região do encéfalo medeiam respostas de medo tanto aos estímulos incondicionados como ao contexto associado com o medo (Neophytou, Aspley *et al.*, 2001). A figura 16 representa um esquema ilustrando as possíveis conexões encefálicas envolvidas com o aprendizado associativo e a expressão das respostas de medo no condicionamento de medo Pavloviano.

Antagonistas de adrenoceptores beta apresentam efeito ansiolítico em vários modelos animais de ansiedade, como o labirinto em cruz elevado (Gorman e Dunn, 1993; Cecchi, Khoshbouei *et al.*, 2002; Stern, Carobrez *et al.*, 2008; Stern, Monte *et al.*, 2010), o campo aberto (Angrini, Leslie *et al.*, 1998), a exposição ao odor de gato (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008) e nas respostas decorrentes do sobressalto potencializado pelo som (Walker e Davis, 2002a). Atualmente, beta-bloqueadores como o propranolol podem ser utilizados clinicamente para o tratamento da ansiedade em humanos (Mueller e Cahill, 2010).

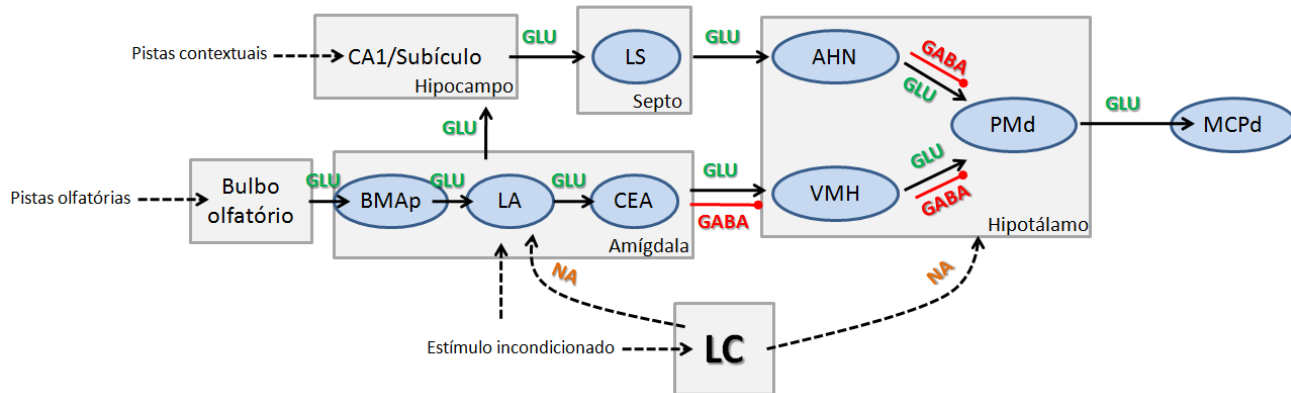


Figura 16. Diagrama esquemático ilustrando o processamento do condicionamento de medo Pavloviano.

Pistas olfatórias são detectadas pelo bulbo olfatório e pistas contextuais pelo hipocampo. O PMd recebe aferências do AHN e do VMH, e possui modulação GABAérgica (inibitória), adrenérgica e glutamatérgica. Legenda: AHN, núcleo hipotalâmico anterior; BMAp, parte posterior do núcleo basomedial da amígdala; CEA, núcleo central da amígdala; GLU, glutamato; LC, *locus coeruleus*; LA, núcleo lateral da amígdala; LS, septo lateral; MCPd, matéria cinzenta periaquedutal dorsal; NA, noradrenalina; PMd, núcleo pré-mamilar dorsal; VMH, núcleo ventromedial do hipotálamo. Baseado em trabalhos de McGaugh (2004); Canteras, Kroon *et al.* (2008).

Apesar do efeito ansiolítico dos antagonistas beta, o sistema noradrenérgico é amplamente estudado pela sua participação na formação de memórias de medo. As memórias emocionais são associadas com aumento da sinalização noradrenérgica em receptores do tipo beta (McGaugh, 2000), e o bloqueio dos receptores beta impede a formação de memórias com características emocionais em humanos (Cahill, Prins *et al.*, 1994; Grillon, Cordova *et al.*, 2004). Nos roedores, propranolol interfere com os mecanismos de consolidação nos modelos do condicionamento Pavloviano de medo (Introini-Collison, Saghafi *et al.*, 1992; Przybyslawski, Rouillet *et al.*, 1999; Miranda, Lalumiere *et al.*, 2003; Grillon, Cordova *et al.*, 2004; Miranda, Ferry *et al.*, 2007; Rodriguez-Romaguera, Sotres-Bayon *et al.*, 2009). Essas evidências indicam o papel do sistema noradrenérgico participando nas respostas de medo para diferentes estímulos condicionados.

Mecanismos adrenérgicos estão envolvidos na ativação da circuitaria de medo da amígdala (Liang, Juler *et al.*, 1986). A noradrenalina liberada dentro da amígdala aumenta durante as experiências de medo, e essa ativação noradrenérgica é essencial para induzir a formação de memória (McGaugh e Roozendaal, 2002). A noradrenalina, ou agonistas de receptores beta, infundidos na amígdala basolateral após o treino de esquiva inibitória melhora a retenção da memória de medo (Ferry, Roozendaal *et al.*, 1999b), e também aumenta a consolidação da memória do condicionamento contextual aversivo (Lalumiere, Buen *et al.*, 2003). Já a utilização de antagonistas de receptores beta na amígdala basolateral impede a consolidação das memórias emocionais (Gallagher, Kapp *et al.*, 1977; Hatfield e McGaugh, 1999; Miranda, Lalumiere *et al.*, 2003). Nosso trabalho confirma o papel do sistema noradrenérgico na aquisição das respostas de medo, indicando que esse sistema está envolvido na regulação da consolidação da memória para diferentes tipos de informação. Além disso, os dados deste trabalho mostram que a aquisição do COM, bem como a expressão do medo condicionado, não depende exclusivamente da amígdala quando o estímulo condicionado é uma pista olfatória.

O mecanismo proposto para o efeito da noradrenalina na consolidação das memórias emocionais envolve a ativação de adrenoceptores beta. Estes receptores possuem via de sinalização intracelular, que envolve a formação de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) pela estimulação da adenilato ciclase via ativação da proteína Gs (Bylund, Eikenberg *et al.*, 1994). O aumento da concentração intracelular de AMPC ativa a proteína cinase A (PKA) dependente de AMPC, que fosforila proteínas, e dentre elas o CREB nuclear, induzindo

o processo de transcrição gênica (Fig. 17). Esse mecanismo endógeno permite o aumento da síntese de proteínas o que, por sua vez, está relacionado ao mecanismo de plasticidade sináptica envolvido na consolidação das memórias (Sara, 2009).

O bloqueio dos adrenoceptores beta impede, portanto, essa via de sinalização intracelular, impedindo a formação da memória para os estímulos condicionados. Além disso, resultam em efeitos ansiolíticos nos diferentes modelos animais e humanos. No PMd, receptores beta1 são importantes na mediação do comportamento defensivo para pistas olfatórias.

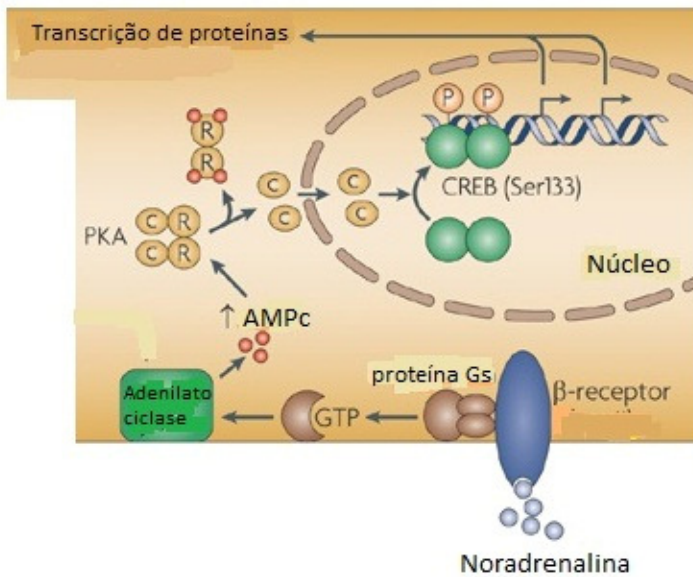


Figura 17. Mecanismo de sinalização adrenérgica. A cascata de sinalização de receptores beta envolve a ativação da proteína Gs, ativando a adenilato ciclase, que aumenta a concentração de AMPc e PKA endógena. A ativação de PKA fosforila a proteína CREB nuclear que ativa fatores de transcrição gênica, aumentando a transcrição de proteínas. Legenda: AMPc, adenosina monofosfato cíclica; CREB, elemento de ligação a proteína responsivo a AMPc; Gs, proteína G estimulatória; GTP, guanosina trifosfato; P, fosfato; PKA, proteína cinase A. Adaptado de Sara (2009).

Aquisição do condicionamento olfatório de medo promovida pela ativação de adrenocetores beta no PMd

Na segunda etapa experimental deste trabalho, foi testada a hipótese de que a ativação de adrenocetores beta no PMd resulta em modificações internas interoceptivas fortes o suficiente para permitir o COM. Estudos com condicionamento de medo geralmente utilizam o choque nas patas como estímulo incondicionado aversivo, uma vez que esse procedimento está bem padronizado (Walker e Davis, 2002b; Baldi, Lorenzini *et al.*, 2004). Entretanto, a utilização desse estímulo exibe algumas limitações, sendo que seu caráter aversivo, além de estar relacionado ao medo, envolve também processos nociceptivos, e muitas vezes o efeito de algumas substâncias bloqueando a aquisição do medo condicionado poderia afetar mais a sensação nociceptiva que a consolidação da memória. A substituição do choque nas patas por um estímulo incondicionado alternativo, que utiliza respostas de sensações interoceptivas por compostos que modificam o estado fisiológico e de humor dos animais, pode providenciar uma alternativa para entender como os mecanismos de medo condicionado operam em condições naturais (Lal e Emmett-Oglesby, 1983). Neste estudo, nós induzimos um estado emocional pela estimulação de adrenocetores beta no PMd, que foi utilizada como EI para promover o COM. No primeiro grupo experimental, os animais foram mantidos durante 3 min e 20 s em contato com o odor na caixa de condicionamento, uma vez que esse intervalo de tempo é o mesmo utilizado para realizar a sessão de 5 choques nas patas. Os resultados indicaram que os animais injetados com ISO não foram diferentes dos controles injetados com PBS, sugerindo não ter havido o COM. Para não descartar a ausência de efeito do ISO no condicionamento, e propondo que o efeito do agonista requer um processo intracelular prolongado, ou mesmo a estimulação simultânea e mobilização de toda uma circuitaria encefálica responsável em interpretar o estado aversivo promovido pelo ISO, foi realizado o mesmo protocolo experimental com o intervalo de 10 min de exposição ao odor. A microinjeção de isoproterenol no PMd, seguida da apresentação do odor de acetato de amila durante 10 min, promoveu condicionamento de medo nos ratos. Diferente da etapa da familiarização, os animais dos grupos ISO10 e ISO40, quando em contato com o odor previamente condicionado, apresentaram diminuição no tempo próximo ao odor, e aumento no tempo escondido e no tempo realizando avaliação de risco do compartimento fechado (tempo de *head-out*).

As respostas de medo exibidas pelos ratos condicionados com ISO no PMd foram similares quando comparadas ao grupo controle dos experimentos da etapa 1, condicionados com choque nas patas (Apêndice A). A comparação entre os ratos controle dos experimentos 1 e 2, condicionados com choques elétricos nas patas, e os ratos condicionados com ISO 40 nmol no PMd (experimentos 3-8), indica que ISO no PMd foi eficaz em promover o COM nos parâmetros comportamentais deste modelo experimental (Fig. I, Apêndice A). Além disso, os ratos condicionados com ISO no PMd apresentaram aumento no comportamento de avaliação de risco comparado aos ratos condicionados com choques nas patas, sugerindo aumento de vigilância nos ratos estimulados com ISO no PMd. O comportamento de avaliação de risco é bem característico nos ratos expostos ao predador natural (McGregor, Schrama *et al.*, 2002), e isso explicaria o aumento do tempo de *head-out* quando o sistema envolvido com as respostas de medo do predador foi ativado.

Os animais que receberam a microinjeção de isoproterenol fora do PMd, ou ratos injetados com PBS no PMd, não foram capazes de adquirir o COM e portanto não expressaram respostas de medo ao odor de acetato de amila. Isso indica que neurônios adrenérgicos localizados no PMd são responsáveis em promover o COM, uma vez que devem promover um estado emocional semelhante à exposição ao predador. O PMd, como já foi ressaltado anteriormente, apresenta aumento na expressão de proteína Fos em contato com o gato ou seus odores, da mesma forma que quando em contato com um odor pareado com choque nas patas (Staples, Hunt *et al.*, 2005; Canteras, Kroon *et al.*, 2008; Cezario, Ribeiro-Barbosa *et al.*, 2008). Em adição, o PMd recebe conexões bilaterais do AHN e do VMH dentro do circuito de defesa hipotalâmico medial, e esse arranjo sináptico permite servir como um amplificador das respostas de medo frente ao perigo (Canteras, 2002). Por isso a estimulação direta de receptores beta no PMd sinaliza uma situação de perigo, promovendo um estado aversivo interoceptivo, capaz de funcionar como EI no COM. Por sua vez, o odor que foi condicionado com a injeção de ISO no PMd adquire características relevantes o suficiente para realizar o condicionamento de segunda ordem, e as respostas de medo observadas no contexto associado ao odor condicionado (teste EC2) são similares às respostas de medo exibidas no teste EC1. Vale ressaltar que os animais condicionados com a microinjeção de ISO no PMd e odor de acetato de amila, ao serem expostos na caixa de odor, não exibiram respostas de medo à caixa e, assim como no experimento anterior, a generalização dos animais pode

ser descartada, sendo que as respostas de medo emitidas foram exclusivamente para a pista olfatória previamente pareada.

Recentemente foi demonstrado que a injeção sistêmica de pentilenotetrazol, um fármaco ansiogênico que atua bloqueando a atividade GABAérgica central, foi capaz de agir como EI aversivo alterando durante o processo associativo a valência emocional de um odor neutro para estímulo incondicionado aversivo (Cavalli, Bertoglio *et al.*, 2009). Outras possibilidades de pareamento aversivo utilizam sensações internas (estímulos interoceptivos), como náuseas e mal estar induzidas por substâncias nocivas (Guitton e Dudai, 2004; Parker, 2006), promovendo condicionamento contextual associado (Miranda, Lalumiere *et al.*, 2003) ou mesmo associado ao odor (Miranda, Ferry *et al.*, 2007). A interocepção está relacionada com a interpretação que se tem sobre determinado estímulo, e é importante para expressar as emoções (Panksepp, 1990). Assim, é possível evocar emoções pela ativação de certos circuitos encefálicos, como a ativação do PMd, demonstrado neste estudo.

Estudos anteriores demonstraram que é possível realizar o condicionamento de medo Pavloviano pela ativação da MCPd (Di Scala, Mana *et al.*, 1987). A estimulação elétrica ou química de regiões subcorticais já foi anteriormente relacionada à promoção de comportamentos motivados (Delgado, Roberts *et al.*, 1954; Schenberg e Graeff, 1978; Cazala, 1979) e a estimulação elétrica da MCPd (Castilho e Brandão, 2001; Castilho, Macedo *et al.*, 2002) pode provocar sensações aversivas no animal atuando como EI. Nossos resultados comprovam que EIs, capazes de promover um COM, podem ser gerados por sensações internas relevantes o suficiente a ponto dos animais evitarem os estímulos associados. Essas evidências também comprovam que o PMd é capaz de promover um aprendizado associativo, por meio de conexões para outras estruturas responsáveis em armazenar pistas ou contextos associados a perigos.

A injeção sistêmica de isoproterenol tem sido relacionada com episódios de pânico em humanos (Pohl, Rainey *et al.*, 1985; Pohl, Yeragani *et al.*, 1988), devido a sintomas de ansiedade associada com o aumento da frequência cardíaca (Yeragani, Pohl *et al.*, 2007). Nos roedores, o isoproterenol também induz comportamento do tipo ansiogênico quando analisado no modelo do labirinto em cruz elevado. Quando ISO40 foi injetado no PMd, verificou-se uma diminuição do tempo nos braços abertos e nas entradas nos braços abertos (Apêndice B), corroborando os efeitos tipo ansiogênico do isoproterenol observados nos humanos. Essas evidências sugerem que as emoções

promovidas pela estimulação de receptores beta seriam responsáveis em associar esse estímulo interoceptivo com a pista olfatória.

Vale ressaltar que a ativação de receptores beta pelo isoproterenol resulta em aumento de longa-duração da amplitude do potencial excitatório pós-sináptico (Wang, Huang *et al.*, 1996). Na amígdala, o isoproterenol aumenta a amplitude da corrente de receptores glutamatérgicos tipo NMDA, participando da plasticidade sináptica durante o processo de aprendizagem (Huang, Lin *et al.*, 1998). Em um aprendizado aversivo ao odor, a indução da plasticidade sináptica em neurônios do bulbo olfatório é dependente da ativação de adrenoceptores beta, e o aprendizado olfatório de medo pode ser mimetizado por injeções de isoproterenol no bulbo olfatório de ratos jovens (Zhang, Okutani *et al.*, 2010). O aprendizado olfatório apetitivo durante o período pós-natal dos roedores ocorre através de vias adrenérgicas do *locus coeruleus* para o bulbo olfatório (Sullivan, Stackenwalt *et al.*, 2000). Esse aprendizado de reconhecimento ao odor pode ser promovido pela ativação de receptores beta no bulbo olfatório ou no *locus coeruleus* com o isoproterenol, e esse efeito estimulatório é bloqueado com o pré-tratamento de injeções sistêmicas de propranolol (Sullivan, McGaugh *et al.*, 1991; Sullivan, Stackenwalt *et al.*, 2000). Isso demonstra que o aprendizado associativo ao odor, sendo este aprendizado aversivo ou não, pode ser realizado pela estimulação de receptores adrenérgicos centrais.

Como o isoproterenol é um agonista não seletivo de receptores beta, foi realizado o pré-tratamento com antagonistas seletivos (beta1 e beta2) antes da microinjeção de ISO. Somente a microinjeção de atenolol foi capaz de impedir o COM pela injeção de ISO no PMd, mostrando que o bloqueio de receptores beta1, mas não dos receptores beta2, impede o efeito do ISO em promover o condicionamento de medo. Esses resultados, corroborando trabalhos anteriores (Crissman, Makhay *et al.*, 2001; Do-Monte, Kincheski *et al.*, 2010), indicam que o efeito estimulatório do isoproterenol na promoção do COM é devido as suas ações nos receptores beta1. O bloqueio de receptores beta1 antes da injeção de ISO no PMd impediu a expressão das respostas de medo ao odor no teste EC1, e os animais apresentaram comportamento semelhante ao grupo controle. Além disso, nessa etapa experimental, o uso dos antagonistas atenolol e butoxamina associado ao PBS (ATE+PBS e BUT+PBS) mostrou que os antagonistas sozinhos não são capazes de promover nenhum comportamento defensivo frente ao odor, indicando a especificidade do agonista em promover COM.

O bloqueio de receptores beta1 antes da fase de expressão ao medo condicionado promovido por ISO impediu as respostas de medo frente ao odor no teste EC1. O PMd apresenta um aumento elevado da expressão de Fos não somente para a presença do predador, mas também para o contexto associado à exposição ao gato (Staples, Hunt *et al.*, 2005; Cezario, Ribeiro-Barbosa *et al.*, 2008). A inativação farmacológica do PMd com muscimol impede a expressão das respostas de medo ao contexto do predador (Cezario, Ribeiro-Barbosa *et al.*, 2008). Como já havia sido discutido anteriormente, o bloqueio de receptores beta no PMd também impede o condicionamento ao contexto associado ao odor de gato (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008) e neste trabalho foi demonstrado que a expressão das respostas de medo no condicionamento de segunda ordem é impedido por atenolol no PMd. Estes resultados, em conjunto, indicam que receptores beta1 no PMd são importantes para a expressão das respostas de medo a estímulos olfatórios aversivos, e também são importantes para promover associação ao contexto associado com o perigo. Essa etapa experimental também mostrou que receptores beta1 no PMd, mesmo após a etapa de estimulação com ISO, estão reativos a ponto de responderem ao bloqueio com atenolol. Assim, uma única injeção de isoproterenol, nas doses utilizadas, não é capaz de promover lesão em neurônios noradrenérgicos no PMd.

Em um experimento subsequente, foi verificado que o bloqueio de receptores adrenérgicos periféricos com nadolol não interfere com o efeito de ISO no PMd na promoção do COM. A estimulação de estruturas encefálicas envolvidas com o comportamento defensivo de roedores, como MCPd, ativa o sistema nervoso simpático periférico, aumentando a frequência cardíaca e respiratória devido à liberação de adrenalina e noradrenalina sistêmica (Carobrez, Schenberg *et al.*, 1983). Alguns trabalhos sugerem que a consolidação de memórias emocionais é mediada pela liberação de hormônios da glândula supra-renal e por neurotransmissores que modulam o sistema noradrenérgico, convergindo para o sistema nervoso central (McGaugh e Roozendaal, 2002). Estudos que utilizam aprendizado contextual com choque elétrico nas patas mostram que o nervo vago tem papel crítico em mediar os efeitos periféricos da adrenalina e da noradrenalina nos sistemas encefálicos envolvidos na consolidação de memórias (Clark, Smith *et al.*, 1998). O núcleo do trato solitário é uma região que recebe aferências periféricas vagais e contém populações de neurônios noradrenérgicos (Williams, Men *et al.*, 2000) e envia a informação para estruturas envolvidas com o aprendizado e a memória, como a amígdala,

sugerindo que neurônios noradrenérgicos centrais provenientes do núcleo do trato solitário poderiam mediar os efeitos periféricos da liberação de adrenalina e noradrenalina na consolidação da memória (Williams e McGaugh, 1993). Como o tratamento com nadolol realizado antes da sessão de condicionamento com ISO não impediu o COM, a possibilidade de que a ativação dos receptores adrenérgicos periféricos esteja participando no processo de COM promovido por ISO está descartada. Este resultado sugere que o efeito da estimulação de receptores beta no PMd no condicionamento de medo não ocorre devido à ativação do sistema nervoso simpático periférico e estimulação de receptores beta sistêmicos.

Em um estudo anterior, a mesma dose de nadolol utilizada neste trabalho, impediu a taquicardia promovida por dopamina (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008), indicando que há bloqueio de adrenoceptores periféricos na dose utilizada. No estudo de Do Monte e colaboradores (2008), os autores mostraram que o tratamento com nadolol não interfere com as respostas de medo ao odor de predador, e também não bloqueia a ativação de neurônios no PMd quando comparado ao propranolol. Além disso, o condicionamento ao contexto do odor de gato não é dependente da ativação beta adrenérgica sistêmica (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008). Comparando essas evidências com os estudos envolvendo consolidação de memória pela ativação vagal, os resultados sustentam a idéia de que a estimulação de receptores beta no PMd, ou o condicionamento contextual promovido pela exposição ao predador, pode envolver processamento de circuitos encefálicos semelhantes porém diferentes daqueles observados com os procedimentos baseados em choque nas patas do condicionamento Pavloviano clássico, que envolve um estímulo aversivo físico mais do que uma sinalização interoceptiva.

A última etapa experimental deste estudo avaliou a participação de receptores glutamatérgicos da MCPd na mediação da aquisição e da expressão das respostas de medo ao COM promovido por ISO no PMd. Essa hipótese surgiu das evidências de que os efeitos do PMd na sinalização do perigo à pista de predador depende de vias, possivelmente glutamatérgicas, para a MCP (Canteras e Swanson, 1992; Chiavegatto, Scavone *et al.*, 1998; Cezario, Ribeiro-Barbosa *et al.*, 2008). Assim, o bloqueio de receptores NMDA com AP5 na MCPd antes da estimulação de receptores beta no PMd impediu o aprendizado associativo ao odor. As respostas de medo verificadas na sessão EC1 mostraram que a microinjeção de AP5 na MCPd foi capaz de impedir a aquisição do COM pela injeção de ISO no PMd. Consequentemente os

animais não expressaram as respostas de medo ao odor de acetato de amila (teste EC1), nem expressaram respostas de medo ao contexto associado (teste EC2). As respostas comportamentais dos animais desse grupo foram similares ao grupo controle, e apresentaram desempenho comportamental semelhante ao dia da familiarização na caixa de odor. A resposta decorrente do processo cirúrgico envolvendo dupla canulação não interferiu na aquisição do COM, uma vez que ratos recebendo PBS na MCPd e ISO no PMd apresentaram aumento das respostas de medo ao odor de acetato de amila e ao contexto associado, indicando mais uma vez a eficiência da injeção de ISO no PMd em promover o condicionamento de medo. Além disso, a injeção de AP5 em regiões acima da MCP, como no colículo superior, não interferiu com o aprendizado associativo promovido por ISO no PMd.

A participação de receptores glutamatérgicos na MCPd também foi verificada durante a expressão das respostas de medo ao odor condicionado com ISO. Os animais que foram condicionados com ISO no PMd e microinjetados com AP5 na MCPd antes do teste EC1 apresentaram respostas de medo frente ao odor reduzidas, e os ratos deste grupo não apresentaram respostas de medo ao contexto associado ao odor (condicionamento de segunda ordem), indicado pela ausência das respostas defensivas no teste EC2. Assim, neurônios glutamatérgicos na MCPd estão envolvidos na aquisição do COM e também na aquisição do condicionamento de segunda ordem ao contexto associado, bem como durante a expressão das respostas de medo ao odor. Estes resultados em conjunto indicam que vias glutamatérgicas do PMd para a MCPd estariam envolvidas na mediação da aquisição e da expressão das respostas de medo ao COM promovido por estimulação de receptores beta no PMd.

A MCPd é uma região do mesencéfalo de ratos associada com respostas de medo (Carrive, 1993). Estudos anteriores já demonstraram que é possível realizar condicionamento de medo Pavloviano pela associação de luz com a ativação da MCP (Di Scala, Mana *et al.*, 1987). A inativação da MCP com muscimol é capaz de bloquear o condicionamento de medo ao choque nas patas (Johansen, Tarpley *et al.*, 2010). Além disso, o bloqueio farmacológico da MCP com muscimol é capaz de bloquear o condicionamento de medo contextual ao ambiente associado com a presença do gato (Cezario, Ribeiro-Barbosa *et al.*, 2008). Por isso, a hipótese de que neurônios glutamatérgicos na MCPd são importantes na mediação da expressão das respostas de medo e também no aprendizado associativo foi testada. Recentemente foi demonstrado que a ativação da MCPd, através da microinjeção de

NMDA, é capaz de permitir o COM na mesma magnitude que neste projeto (Kincheski *et al.*, 2010). Esses resultados juntamente com os dados deste trabalho sustentam a hipótese de que vias neurais integrando a MCPd são importantes no aprendizado associativo também para pistas olfatórias.

A ativação de neurônios adrenérgicos na amígdala basolateral ativa mecanismos glutamatérgicos, que facilitam a neuroplasticidade dependente de NMDA (Huang, Tsai *et al.*, 1994; Lennartz, Hellems *et al.*, 1996), sugerindo que o efeito da noradrenalina na consolidação da memória envolve uma sinalização dependente de mecanismos glutamatérgicos. Os dados deste trabalho poderiam sugerir, então, que a estimulação de adrenoreceptores beta poderia modular neurônios glutamatérgicos, sendo que a MCPd seria um alvo importante na aquisição e expressão das respostas de medo ao COM.

Considerando as similaridades para o padrão de comportamento dos roedores para as pistas de predador e para o odor previamente condicionado com choque nas patas ou com isoproterenol no PMd, ambos os procedimentos poderiam providenciar a mesma circuitaria encefálica responsável em processar o condicionamento de medo. Recentemente foi verificado que lesões com NMDA nos principais alvos talâmicos do sistema defensivo hipotalâmico medial, o núcleo *reuniens* (RE) e a região ventral do núcleo anteromedial (AMv), poderiam ocasionar uma total perda do condicionamento contextual ao predador, sem interferir com as repostas de medo a presença do gato (Carvalho-Netto, Martinez *et al.*, 2010). Assim, a influência desses dois núcleos talâmicos no condicionamento contextual poderia envolver uma via anatômica formada pela região retrosplenial agranular e área posrinal, que são relacionadas com o condicionamento contextual em estudos de pareamento ao contexto com choque nas patas, provavelmente por meio de projeções para o hipocampo e núcleo da amígdala lateral (Burwell e Amaral, 1998; Bucci, Phillips *et al.*, 2000; Burwell, Saddoris *et al.*, 2004). Além disso, projeções da MCPd para os núcleos do sistema hipotalâmico medial também poderiam influenciar esses alvos talâmicos para o processamento contextual. A estimulação elétrica ou química da MCPd é associada a um aumento de expressão de Fos no PMd (Vianna, Borelli *et al.*, 2003). Assim, o papel da MCPd na aquisição do condicionamento de medo poderia ser mediado pelos mesmos alvos talâmicos RE e AMV.

Na figura 18 está ilustrada a proposta de que as vias provenientes do PMd e da MCPd (via projeções para o PMd) para alvos talâmicos (RE e AMv) são responsáveis no processamento e armazenamento da

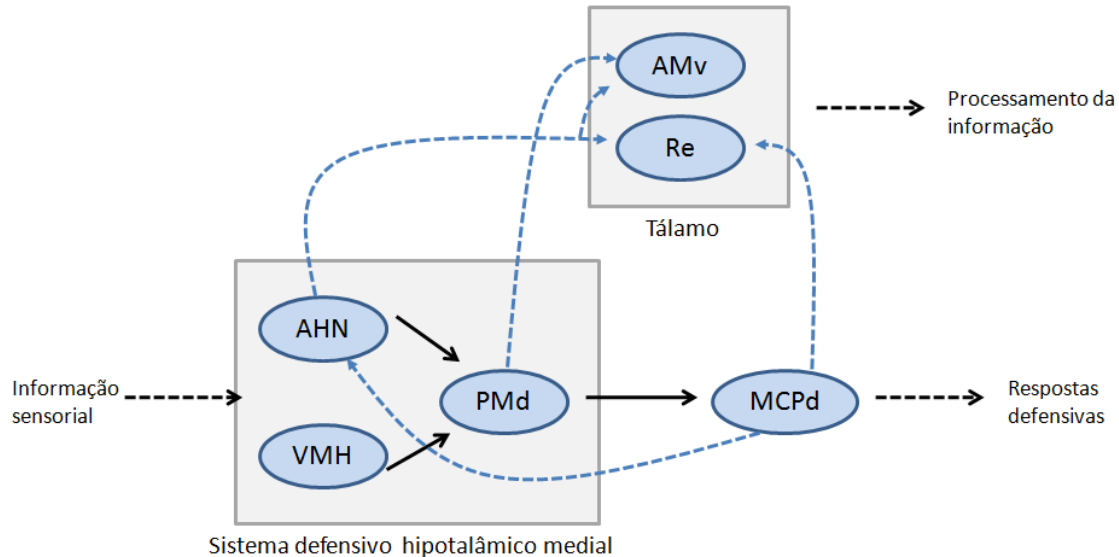


Figura 18. Diagrama esquemático ilustrando as conexões do sistema defensivo hipotalâmico medial, composto pelo AHN, VMH e PMd, responsável em detectar a informação sensorial aversiva, e as projeções do PMd para a MCPd, importante para a associação do condicionamento de medo ao odor, e para núcleos talâmicos, responsáveis no processamento da informação. Legenda: AHN, núcleo hipotalâmico anterior; AMv, região ventral do núcleo anteromedial; LHA, área hipotalâmica lateral; MCPd, matéria cinzenta periaquedutal dorsal; PMd, núcleo pré-mamilar dorsal; Re, núcleo *reuniens*; VMHdm, parte dorsomedial do núcleo ventromedial. Adaptado de Cezario, Ribeiro-Barbosa *et al.* (2008).

informação. Por isso a ativação de receptores beta1 no PMd serve como um EI eficiente em promover o COM. Em particular, os dados obtidos mostram que a estimulação do PMd é um bom modelo para mimetizar as mudanças emocionais ocasionadas pela exposição ao predador, uma vez que é capaz de mobilizar os mesmos circuitos neurais relacionados com a aquisição e expressão do condicionamento contextual associado ao predador.

Resultados anteriores que mostraram aumento da expressão de Fos no PMd relacionado com as respostas de medo ao odor previamente condicionado com choque nas patas (Canteras, Kroon *et al.*, 2008), em conjunto com os dados deste trabalho, demonstram que adrenoceptores beta no PMd são importantes por interferir com a aquisição do COM, com as respostas de medo ao EC e também com o condicionamento associado ao contexto da exposição do odor condicionado. Além do mais, a estimulação de receptores beta no PMd promove COM por atuar como EI interoceptivo, substituindo o choque elétrico nas patas.

O entendimento da circuitaria encefálica responsável em interpretar e armazenar respostas de medo condicionadas pode ter importantes implicações para o tratamento da ansiedade patológica no homem. Muitas formas de ansiedade humana envolvem a geração de respostas de medo aos estímulos ambientais associadas com trauma, similares às respostas de medo expressas pelos animais nos modelos experimentais de condicionamento Pavloviano. Homens também são condicionados ao medo e respondem ao estímulo associado ao trauma com as mesmas reações de medo, como congelamento e liberação de hormônio de estresse (Cain e Ledoux, 2008).

Dados deste trabalho poderão contribuir em parte para explicar os mecanismos envolvidos em modelos de condicionamento de medo, além do propor um modelo capaz de gerar condicionamento em situações reais, onde o aumento de ativação da noradrenalina central assemelha-se a um trauma mais natural do que choque elétrico nas patas.

Os principais resultados que sustentam esta afirmação são:

1. Adrenoceptores beta1 são importantes na etapa de aquisição e da expressão do condicionamento olfatório de medo (COM) induzido por choque elétrico nas patas.

2. A ativação de adrenoceptores beta no PMd pode funcionar como um estímulo incondicionado (EI) aversivo, dando suporte ao COM.

3. O bloqueio de receptores beta1 no PMd impede a aquisição e a expressão do COM promovido pela microinjeção de ISO no PMd.

4. O COM promovido pela microinjeção de ISO no PMd é independente da ativação de receptores adrenérgicos sistêmicos.

5. O COM promovido pela microinjeção de ISO no PMd é depende da ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA presentes na MCPd - o bloqueio de receptores NMDA na MCPd impede a aquisição e a expressão do COM produzido pela aplicação de ISO no PMd.

6. Conclusões

Os resultados deste trabalho mostram que adrenoceptores beta no PMd interferem com a aquisição e com a expressão das respostas de medo em ratos submetidos ao protocolo do condicionamento olfatório de medo, demonstrando que o modelo do condicionamento olfatório de medo e do odor de gato parecem utilizar circuitos neurais semelhantes para associar respostas de defesa.

Os dados deste trabalho também sugerem que a ativação de receptores beta no PMd produz um estado emocional semelhante ao de ratos expostos ao predador natural, a ponto de funcionar como um estímulo incondicionado aversivo e promover condicionamento de medo ao odor. Esse condicionamento é capaz de promover respostas de medo semelhantes ao condicionamento com choque elétrico nas patas, por isso a estimulação de receptores beta no PMd pode substituir o estímulo nociceptivo e promover condicionamento de medo em condições mais naturais, como a interocepção gerada pela ativação de circuitos de medo. Além disso, a ativação do PMd mobiliza as mesmas estruturas encefálicas, como a matéria cinzenta periaquedutal dorsal, que participam no comportamento defensivo ao predador natural.

Em conjunto, os dados deste trabalho mostram que receptores beta1 no PMd são importantes para mediar respostas de medo a um estímulo olfatório aversivo.

7. Referências bibliográficas

- ABRARI, K.; RASHIDY-POUR, A.; SEMNANIAN, S.; FATHOLLAHI, Y. Administration of corticosterone after memory reactivation disrupts subsequent retrieval of a contextual conditioned fear memory: dependence upon training intensity. **Neurobiol Learn Mem**, v. 89, n. 2, p. 178-84, 2008.
- ADAMEC, R.; MUIR, C.; GRIMES, M.; PEARCEY, K. Involvement of noradrenergic and corticoid receptors in the consolidation of the lasting anxiogenic effects of predator stress. **Behav Brain Res**, v. 179, n. 2, p. 192-207, 2007.
- ANAGNOSTARAS, S. G.; JOSSELYN, S. A.; FRANKLAND, P. W.; SILVA, A. J. Computer-assisted behavioral assessment of Pavlovian fear conditioning in mice. **Learn Mem**, v. 7, n. 1, p. 58-72, 2000.
- ANGRINI, M.; LESLIE, J. C.; SHEPHARD, R. A. Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 59, n. 2, p. 387-97, 1998.
- BALDI, E.; LORENZINI, C. A.; BUCHERELLI, C. Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. **Neurobiol Learn Mem**, v. 81, n. 3, p. 162-6, 2004.
- BANDLER, R. Induction of 'rage' following microinjections of glutamate into midbrain but not hypothalamus of cats. **Neurosci Lett**, v. 30, n. 2, p. 183-8, 1982.
- BARD, P. A diencephalic mechanism for the expression of rage with special reference to the sympathetic nervous system. **American Journal of Physiology**, v. 84, p. 490-515, 1928.
- BEIJAMINI, V.; GUIMARÃES, F. S. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. **Behav Brain Res**, v. 170, n. 1, p. 52-61, 2006.
- BERLAU, D. J.; MCGAUGH, J. L. Enhancement of extinction memory consolidation: the role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala. **Neurobiol Learn Mem**, v. 86, n. 2, p. 123-32, 2006.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **J Comp Physiol Psychol**, v. 81, n. 2, p. 281-90, 1972.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Defensive behaviors, fear, and anxiety. In: BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; NUTT, D. J. (Ed.). **Handbook of anxiety and fear**. Amsterdam: Elsevier, v.17, 2008. cap. 2.4, p.63-80.

BLANCHARD, D. C.; CANTERAS, N. S.; MARKHAM, C. M.; PENTKOWSKI, N. S.; BLANCHARD, R. J. Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 8, p. 1243-53, 2005.

BLANCHARD, D. C.; LI, C. I.; HUBBARD, D.; MARKHAM, C. M.; YANG, M.; TAKAHASHI, L. K.; BLANCHARD, R. J. Dorsal premammillary nucleus differentially modulates defensive behaviors induced by different threat stimuli in rats. **Neurosci Lett**, v. 345, n. 3, p. 145-8, 2003.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **J Comp Psychol**, v. 103, n. 1, p. 70-82, 1989.

BLANCHARD, R. J.; YUDKO, E. B.; RODGERS, R. J.; BLANCHARD, D. C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav Brain Res**, v. 58, n. 1-2, p. 155-65, 1993.

BLOOM, F. E. The catecholamine neuron: Historical and future perspectives. **Prog Neurobiol**, v. 90, n. 2, p. 75-81, 2010.

BRANDÃO, M. L.; ANSELONI, V. Z.; PANDOSSIO, J. E.; DE ARAUJO, J. E.; CASTILHO, V. M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 6, p. 863-75, 1999.

BRANDÃO, M. L.; DI SCALA, G.; BOUCHET, M. J.; SCHMITT, P. Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 24, n. 3, p. 497-501, 1986.

BREMNER, J. D.; KRYSZAL, J. H.; SOUTHWICK, S. M.; CHARNEY, D. S. Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. **Synapse**, v. 23, n. 1, p. 28-38, 1996.

BRENNAN, P. A.; KEVERNE, E. B. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. **Prog Neurobiol**, v. 51, n. 4, p. 457-81, 1997.

BUCCI, D. J.; PHILLIPS, R. G.; BURWELL, R. D. Contributions of postrhinal and perirhinal cortex to contextual information processing. **Behav Neurosci**, v. 114, n. 5, p. 882-94, 2000.

BURWELL, R. D.; AMARAL, D. G. Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. **J Comp Neurol**, v. 398, n. 2, p. 179-205, 1998.

BURWELL, R. D.; SADDORIS, M. P.; BUCCI, D. J.; WIIG, K. A. Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning. **J Neurosci**, v. 24, n. 15, p. 3826-36, 2004.

BYLUND, D. B.; EIKENBERG, D. C.; HIEBLE, J. P.; LANGER, S. Z.; LEFKOWITZ, R. J.; MINNEMAN, K. P.; MOLINOFF, P. B.; RUFFOLO, R. R.; JR.; TRENDELENBURG, U. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. **Pharmacol Rev**, v. 46, n. 2, p. 121-36, 1994.

CAHILL, L.; MCGAUGH, J. L. Modulation of memory storage. **Curr Opin Neurobiol**, v. 6, n. 2, p. 237-42, 1996.

CAHILL, L.; PHAM, C. A.; SETLOW, B. Impaired memory consolidation in rats produced with beta-adrenergic blockade. **Neurobiol Learn Mem**, v. 74, n. 3, p. 259-66, 2000.

CAHILL, L.; PRINS, B.; WEBER, M.; MCGAUGH, J. L. Beta-adrenergic activation and memory for emotional events. **Nature**, v. 371, n. 6499, p. 702-4, 1994.

CAIN, C. K.; BLOUIN, A. M.; BARAD, M. Adrenergic transmission facilitates extinction of conditional fear in mice. **Learn Mem**, v. 11, n. 2, p. 179-87, 2004..

CAIN, C. K.; LEDOUX, J. E. Brain mechanisms of Pavlovian and instrumental aversive conditioning. In: BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; NUTT, D. J. (Ed.). **Handbook of anxiety and fear**. Amsterdam: Elsevier, v.17, 2008. cap. 3.1, p.103-124.

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

CANTERAS, N. S. Neural systems activated in response to predators and partial predator stimuli. In: BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; NUTT, D. J. (Ed.). **Handbook of anxiety and fear**. Amsterdam: Elsevier, v.17, 2008. cap. 3.2, p.125-140.

CANTERAS, N. S.; BLANCHARD, D. C. A behavioral and neural systems comparison of unconditioned and conditioned defensive behavior. In: BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; NUTT, D. J. (Ed.). **Handbook of anxiety and fear**. Amsterdam: Elsevier, v.17, 2008. cap. 3.3, p.141-156.

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

CANTERAS, N. S.; KROON, J. A.; DO-MONTE, F. H.; PAVESI, E.; CAROBREZ, A. P. Sensing danger through the olfactory system: the role of the

hypothalamic dorsal preammillary nucleus. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 32, n. 7, p. 1228-35, 2008.

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

CANTERAS, N. S.; SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. **J Comp Neurol**, v. 348, n. 1, p. 41-79, 1994.

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

CAROBREZ, A. P.; SCHENBERG, L. C.; GRAEFF, F. G. Neuroeffector mechanisms of the defense reaction in the rat. **Physiol Behav**, v. 31, n. 4, p. 439-44, 1983.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. **Behav Brain Res**, v. 58, n. 1-2, p. 27-47, 1993.

CARVALHO-NETTO, E. F.; MARTINEZ, R. C.; BALDO, M. V.; CANTERAS, N. S. Evidence for the thalamic targets of the medial hypothalamic defensive system mediating emotional memory to predatory threats. **Neurobiol Learn Mem**, 2010.

CASTILHO, V. M.; BRANDÃO, M. L. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT_{2A} receptors in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 155, n. 2, p. 154-62, 2001.

CASTILHO, V. M.; MACEDO, C. E.; BRANDÃO, M. L. Role of benzodiazepine and serotonergic mechanisms in conditioned freezing and antinociception using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray as unconditioned stimulus in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 165, n. 1, p. 77-85, 2002.

CAVALLI, J.; BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. **Neurobiol Learn Mem**, v. 92, n. 4, p. 512-8, 2009.

CAZALA. Rewarding and aversive properties of electrical stimulation in the dorsal and ventral regions of the lateral hypothalamus in the mouse. **Behav Neural Biol**, v. 25, n. 2, p. 166-75, 1979.

CECCHI, M.; KHOSHBOUEI, H.; JAVORS, M.; MORILAK, D. A. Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. **Neuroscience**, v. 112, n. 1, p. 13-21, 2002.

CEZARIO, A. F.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; BALDO, M. V.; CANTERAS, N. S. Hypothalamic sites responding to predator threats--the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. **Eur J Neurosci**, v. 28, n. 5, p. 1003-15, 2008.

CHARNEY, D. S. Neuroanatomical circuits modulating fear and anxiety behaviors. **Acta Psychiatr Scand Suppl**, n. 417, p. 38-50, 2003.

CHIAVEGATTO, S.; SCAVONE, C.; CANTERAS, N. S. Nitric oxide synthase activity in the dorsal periaqueductal gray of rats expressing innate fear responses. **Neuroreport**, v. 9, n. 4, p. 571-6, 1998.

CLARK, K. B.; SMITH, D. C.; HASSERT, D. L.; BROWNING, R. A.; NARITOKU, D. K.; JENSEN, R. A. Posttraining electrical stimulation of vagal afferents with concomitant vagal efferent inactivation enhances memory storage processes in the rat. **Neurobiol Learn Mem**, v. 70, n. 3, p. 364-73, 1998.

COUSENS, G.; OTTO, T. Both pre- and posttraining excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. **Behav Neurosci**, v. 112, n. 5, p. 1092-103, 1998.

COYLE, J. T. Biochemical aspects of neurotransmission in the developing brain. **Int Rev Neurobiol**, v. 20, p. 65-103, 1977.

CRAIG, A. D. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 8, p. 655-66, 2002.

CRANE, J. W.; FRENCH, K. R.; BULLER, K. M. Patterns of neuronal activation in the rat brain and spinal cord in response to increasing durations of restraint stress. **Stress**, v. 8, n. 3, p. 199-211, 2005.

CRISSMAN, A. M.; MAKHAY, M. M.; O'DONNELL, J. M. Discriminative stimulus effects of centrally administered isoproterenol in rats: mediation by beta-1 adrenergic receptors. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 154, n. 1, p. 70-5, 2001.

CRUICKSHANK, J. M.; NEIL-DWYER, G.; CAMERON, M. M.; MCAINSH, J. beta-Adrenoreceptor-blocking agents and the blood-brain barrier. **Clin Sci (Lond)**, v. 59 Suppl 6, p. 453s-455s, 1980.

DAHLSTROM, A.; FUXE, K. Localization of monoamines in the lower brain stem. **Experientia**, v. 20, n. 7, p. 398-9, 1964.

DARWIN, C. R. **The expression of emotions in man and animals**. London: John Murray, 1872.

DEBIEC, J.; LEDOUX, J. E. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. **Neuroscience**, v. 129, n. 2, p. 267-72, 2004.

DELGADO, J. M. Free Behavior and Brain Stimulation. **Int Rev Neurobiol**, v. 6, p. 349-449, 1964.

DELGADO, J. M.; ROBERTS, W. W.; MILLER, N. E. Learning motivated by electrical stimulation of the brain. **Am J Physiol**, v. 179, n. 3, p. 587-93, 1954.

DI SCALA, G.; MANA, M. J.; JACOBS, W. J.; PHILLIPS, A. G. Evidence of Pavlovian conditioned fear following electrical stimulation of the periaqueductal grey in the rat. **Physiol Behav**, v. 40, n. 1, p. 55-63, 1987.

DI SCALA, G.; SCHMITT, P.; KARLI, P. Flight induced by infusion of bicuculline methiodide into periventricular structures. **Brain Res**, v. 309, n. 2, p. 199-208, 1984.

DIELENBERG, R. A.; HUNT, G. E.; MCGREGOR, I. S. "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. **Neuroscience**, v. 104, n. 4, p. 1085-97, 2001.

DIELENBERG, R. A.; MCGREGOR, I. S. Habituation of the hiding response to cat odor in rats (*Rattus norvegicus*). **J Comp Psychol**, v. 113, n. 4, p. 376-87, 1999.

DIELENBERG, R. A.; MCGREGOR, I. S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 7-8, p. 597-609, 2001.

DO-MONTE, F. H.; KINCHESKI, G. C.; PAVESI, E.; SORDI, R.; ASSREUY, J.; CAROBREZ, A. P. Role of beta-adrenergic receptors in the ventromedial prefrontal cortex during contextual fear extinction in rats. **Neurobiol Learn Mem**, v. 94, n. 3, p. 318-28, 2010.

DO MONTE, F. H.; CANTERAS, N. S.; FERNANDES, D.; ASSREUY, J.; CAROBREZ, A. P. New perspectives on beta-adrenergic mediation of innate and learned fear responses to predator odor. **J Neurosci**, v. 28, n. 49, p. 13296-302, 2008.

DORNELLES, A.; DE LIMA, M. N.; GRAZZIOTIN, M.; PRESTI-TORRES, J.; GARCIA, V. A.; SCALCO, F. S.; ROESLER, R.; SCHRODER, N. Adrenergic enhancement of consolidation of object recognition memory. **Neurobiol Learn Mem**, v. 88, n. 1, p. 137-42, 2007.

DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annu Rev Psychol**, v. 55, p. 51-86, 2004.

- DUDAI, Y. Reconsolidation: the advantage of being refocused. **Curr Opin Neurobiol**, v. 16, n. 2, p. 174-8, 2006.
- EBRAHIMI, S.; RASHIDY-POUR, A.; VAFAEI, A. A.; AKHAVAN, M. M. Central beta-adrenergic receptors play an important role in the enhancing effect of voluntary exercise on learning and memory in rat. **Behav Brain Res**, v. 208, n. 1, p. 189-93, 2010.
- EICHENBAUM, H.; OTTO, T. Odor-guided learning and memory in rats: is it 'special'? **Trends Neurosci**, v. 16, n. 1, p. 22-6; 1993.
- ESTES, W. K.; SKINNER, B. F. Some quantitative properties of anxiety. **J. Exp. Psychol.**, v. 29, p. 390-400, 1941.
- FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 5, p. 743-60, 1999.
- FERNANDEZ DE MOLINA, A.; HUNSPERGER, R. W. Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat. **J Physiol**, v. 160, p. 200-13, 1962.
- FERRY, B.; MCGAUGH, J. L. Role of amygdala norepinephrine in mediating stress hormone regulation of memory storage. **Acta Pharmacol Sin**, v. 21, n. 6, p. 481-93, 2000.
- FERRY, B.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Involvement of alpha-adrenoceptors in the basolateral amygdala in modulation of memory storage. **Eur J Pharmacol**, v. 372, n. 1, p. 9-16, 1999a.
- FERRY, B.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: a critical involvement of the amygdala. **Biol Psychiatry**, v. 46, n. 9, p. 1140-52, 1999b.
- FRANKLAND, P. W.; JOSSELYN, S. A.; ANAGNOSTARAS, S. G.; KOGAN, J. H.; TAKAHASHI, E.; SILVA, A. J. Consolidation of CS and US representations in associative fear conditioning. **Hippocampus**, v. 14, n. 5, p. 557-69, 2004.
- GALE, G. D.; ANAGNOSTARAS, S. G.; GODSIL, B. P.; MITCHELL, S.; NOZAWA, T.; SAGE, J. R.; WILTGEN, B.; FANSELOW, M. S. Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. **J Neurosci**, v. 24, n. 15, p. 3810-5, 2004.
- GALLAGHER, M.; KAPP, B. S.; MUSTY, R. E.; DRISCOLL, P. A. Memory formation: evidence for a specific neurochemical system in the amygdala. **Science**, v. 198, n. 4315, p. 423-5, 1977.

GERACIOTI, T. D. Jr.; BAKER, D. G.; EKHATOR, N. N.; WEST, S. A.; HILL, K. K.; BRUCE, A. B.; SCHMIDT, D.; ROUNDS-KUGLER, B.; YEHUDA, R.; KECK, P. E. Jr.; KASCKOW, J. W. CSF norepinephrine concentrations in posttraumatic stress disorder. **Am J Psychiatry**, v. 158, n. 8, p. 1227-30, 2001.

GEWIRTZ, J. C.; DAVIS, M. Application of Pavlovian higher-order conditioning to the analysis of the neural substrates of fear conditioning. **Neuropharmacology**, v. 37, n. 4-5, p. 453-9, 1998.

GEWIRTZ, J. C.; DAVIS, M. Using pavlovian higher-order conditioning paradigms to investigate the neural substrates of emotional learning and memory. **Learn Mem**, v. 7, n. 5, p. 257-66, 2000.

GOLD, P. E.; VAN BUSKIRK, R. Posttraining brain norepinephrine concentrations: correlation with retention performance of avoidance training and with peripheral epinephrine modulation of memory processing. **Behav Biol**, v. 23, n. 4, p. 509-20, 1978.

GOOSENS, K. A.; MAREN, S. Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. **Learn Mem**, v. 8, n. 3, p. 148-55, 2001.

GORMAN, A. L.; DUNN, A. J. Beta-adrenergic receptors are involved in stress-related behavioral changes. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 45, n. 1, p. 1-7, 1993.

GRAEFF, F. G. [Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 29 Suppl 1, p. S3-6, 2007.

GRILLON, C.; CORDOVA, J.; MORGAN, C. A.; CHARNEY, D. S.; DAVIS, M. Effects of the beta-blocker propranolol on cued and contextual fear conditioning in humans. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 175, n. 3, p. 342-52, 2004.

GUITTON, M. J.; DUDAI, Y. Anxiety-like state associates with taste to produce conditioned taste aversion. **Biol Psychiatry**, v. 56, n. 11, p. 901-4, 2004.

HATFIELD, T.; MCGAUGH, J. L. Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. **Neurobiol Learn Mem**, v. 71, n. 2, p. 232-9, 1999.

HAYCOCK, J. W.; VAN BUSKIRK, R.; MCGAUGH, J. L. Effects of catecholaminergic drugs upon memory storage processes in mice. **Behav Biol**, v. 20, n. 3, p. 281-310, 1977.

HELMSTETTER, F. J. The amygdala is essential for the expression of conditional hypoaesthesia. **Behav Neurosci**, v. 106, n. 3, p. 518-28, 1992.

HILTON, S. M.; ZBROZYNA, A. W. Amygdaloid region for defence reactions and its efferent pathway to the brain stem. **J Physiol**, v. 165, p. 160-73, 1963.

HOLAHAN, M. R.; WHITE, N. M. Amygdala c-Fos induction corresponds to unconditioned and conditioned aversive stimuli but not to freezing. **Behav Brain Res**, v. 152, n. 1, p. 109-20, 2004.

HUANG, C. C.; LIN, C. H.; GEAN, P. W. Potentiation of N-methyl-D-aspartate currents by isoproterenol in the acutely dissociated rat amygdalar neurons. **Neurosci Lett**, v. 253, n. 1, p. 9-12, 1998.

HUANG, C. C.; TSAI, J. J.; GEAN, P. W. Actions of isoproterenol on amygdalar neurons in vitro. **Chin J Physiol**, v. 37, n. 2, p. 73-8, 1994.

HUNSPERGER, R. W. [Affective reaction from electric stimulation of brain stem in cats.]. **Helv Physiol Pharmacol Acta**, v. 14, n. 1, p. 70-92, 1956.

INTROINI-COLLISON, I.; SAGHAFI, D.; NOVACK, G. D.; MCGAUGH, J. L. Memory-enhancing effects of post-training dipivefrin and epinephrine: involvement of peripheral and central adrenergic receptors. **Brain Res**, v. 572, n. 1-2, p. 81-6, 1992.

IWATA, J.; LEDOUX, J. E.; MEELEY, M. P.; ARNERIC, S.; REIS, D. J. Intrinsic neurons in the amygdaloid field projected to by the medial geniculate body mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. **Brain Res**, v. 383, n. 1-2, p. 195-214, 1986.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem**, v. 68, n. 3, p. 285-316, 1997.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M.; DE SOUZA, M. M.; MELLO E SOUZA, T. Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. **Neurobiol Learn Mem**, v. 69, n. 3, p. 219-24, 1998.

JOHANSEN, J. P.; TARPLEY, J. W.; LEDOUX, J. E.; BLAIR, H. T. Neural substrates for expectation-modulated fear learning in the amygdala and periaqueductal gray. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 8, p. 979-86, 2010.

KETY, S. S. The possible role of the adrenergic systems of the cortex in learning. **Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis**, v. 50, p. 376-89, 1972.

KILPATRICK, L.; CAHILL, L. Modulation of memory consolidation for olfactory learning by reversible inactivation of the basolateral amygdala. **Behav Neurosci**, v. 117, n. 1, p. 184-8, 2003.

KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v. 256, n. 5057, p. 675-7, 1992.

KINCHESKI, G. C.; CAROBREZ, A. P. The dorsal periaqueductal gray modulates the increased fear-like behavior exhibited by experienced rats in the elevated plus-maze. **Behav Brain Res**, v. 206, n. 1, p. 120-6, 2010.

KNAPSKA, E.; WALASEK, G.; NIKOLAEV, E.; NEUHAUSSER-WESPY, F.; LIPP, H. P.; KACZMAREK, L.; WERKA, T. Differential involvement of the central amygdala in appetitive versus aversive learning. **Learn Mem**, v. 13, n. 2, p. 192-200, 2006.

KROON, J. A.; CAROBREZ, A. P. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, propranolol or scopolamine. **Neurobiol Learn Mem**, v. 91, n. 1, p. 32-40, 2009.

LAL, H.; EMMETT-OGLESBY, M. W. Behavioral analogues of anxiety. Animal models. **Neuropharmacology**, v. 22, n. 12B, p. 1423-41, 1983.

LALUMIERE, R. T.; BUEN, T. V.; MCGAUGH, J. L. Post-training intra-basolateral amygdala infusions of norepinephrine enhance consolidation of memory for contextual fear conditioning. **J Neurosci**, v. 23, n. 17, p. 6754-8, 2003.

LANUZA, E.; MONCHO-BOGANI, J.; LEDOUX, J. E. Unconditioned stimulus pathways to the amygdala: effects of lesions of the posterior intralaminar thalamus on foot-shock-induced c-Fos expression in the subdivisions of the lateral amygdala. **Neuroscience**, v. 155, n. 3, p. 959-68, 2008.

LEATON, R. N.; CRANNEY, J. Potentiation of the acoustic startle response by a conditioned stimulus paired with acoustic startle stimulus in rats. **J Exp Psychol Anim Behav Process**, v. 16, n. 3, p. 279-87, 1990.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annu Rev Neurosci**, v. 23, p. 155-84, 2000.

LENNARTZ, R. C.; HELLEMS, K. L.; MOOK, E. R.; GOLD, P. E. Inhibitory avoidance impairments induced by intra-amygdala propranolol are reversed by glutamate but not glucose. **Behav Neurosci**, v. 110, n. 5, p. 1033-9, 1996.

LIANG, K. C.; JULER, R. G.; MCGAUGH, J. L. Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdala noradrenergic system. **Brain Res**, v. 368, n. 1, p. 125-33, 1986.

LOIZOU, L. A. Projections of the nucleus locus coeruleus in the albino rat. **Brain Res**, v. 15, n. 2, p. 563-6, 1969.

- MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 897-931, 2001.
- MARKHAM, C. M.; BLANCHARD, D. C.; CANTERAS, N. S.; CUYNO, C. D.; BLANCHARD, R. J. Modulation of predatory odor processing following lesions to the dorsal premammillary nucleus. **Neurosci Lett**, v. 372, n. 1-2, p. 22-6, 2004.
- MARTINEZ, R. C.; CARVALHO-NETTO, E. F.; AMARAL, V. C.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTERAS, N. S. Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. **Behav Brain Res**, v. 192, n. 2, p. 185-90, 2008.
- MCGAUGH, J. L. Time-dependent processes in memory storage. **Science**, v. 153, n. 742, p. 1351-8, 1966.
- MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248-51, 2000.
- MCGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annu Rev Neurosci**, v. 27, p. 1-28, 2004.
- MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. **Curr Opin Neurobiol**, v. 12, n. 2, p. 205-10, 2002.
- MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Drug enhancement of memory consolidation: historical perspective and neurobiological implications. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 202, n. 1-3, p. 3-14, 2009.
- MCGREGOR, I. S.; HARGREAVES, G. A.; APFELBACH, R.; HUNT, G. E. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. **J Neurosci**, v. 24, n. 17, p. 4134-44, 2004.
- MCGREGOR, I. S.; SCHRAMA, L.; AMBERMOON, P.; DIELENBERG, R. A. Not all 'predator odours' are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats. **Behav Brain Res**, v. 129, n. 1-2, p. 1-16, 2002.
- MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 3, p. 285-305, 2004.
- MCNAUGHTON, N.; ZANGROSSI, H. Theoretical approaches to the modeling of anxiety in animals. In: BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; NUTT, D. J. (Ed.). **Handbook of anxiety and fear**. Amsterdam: Elsevier, v.17, 2008. cap. 2.1, p.11-27.

MILANI, H.; GRAEFF, F. G. GABA-benzodiazepine modulation of aversion in the medial hypothalamus of the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 28, n. 1, p. 21-7, 1987.

MIRANDA, M. A.; FERRY, B.; FERREIRA, G. Basolateral amygdala noradrenergic activity is involved in the acquisition of conditioned odor aversion in the rat. **Neurobiol Learn Mem**, v. 88, n. 2, p. 260-3, 2007.

MIRANDA, M. I.; LALUMIERE, R. T.; BUEN, T. V.; BERMUDEZ-RATTONI, F.; MCGAUGH, J. L. Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amygdala impairs taste memory. **Eur J Neurosci**, v. 18, n. 9, p. 2605-10, 2003.

MONGELUZI, D. L.; ROSELLINI, R. A.; CALDARONE, B. J.; STOCK, H. S.; ABRAHAMSEN, G. C. Pavlovian aversive context conditioning using carbon dioxide as the unconditional stimulus. **J Exp Psychol Anim Behav Process**, v. 22, n. 3, p. 244-57, 1996.

MOORE, R. Y.; BLOOM, F. E. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. **Annu Rev Neurosci**, v. 2, p. 113-68, 1979.

MORILAK, D. A.; BARRERA, G.; ECHEVARRIA, D. J.; GARCIA, A. S.; HERNANDEZ, A.; MA, S.; PETRE, C. O. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 29, n. 8, p. 1214-24, 2005.

MOTTA, S. C.; GOTO, M.; GOUVEIA, F. V.; BALDO, M. V.; CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 12, p. 4870-5, 2009.

MUELLER, D.; CAHILL, S. P. Noradrenergic modulation of extinction learning and exposure therapy. **Behav Brain Res**, v. 208, n. 1, p. 1-11, 2010.

MURAVIEVA, E. V.; ALBERINI, C. M. Limited efficacy of propranolol on the reconsolidation of fear memories. **Learn Mem**, v. 17, n. 6, p. 306-13, 2010.

NADER, K. Memory traces unbound. **Trends Neurosci**, v. 26, n. 2, p. 65-72, 2003.

NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 722-6, 2000.

NEOPHYTOU, S. I.; ASPLEY, S.; BUTLER, S.; BECKETT, S.; MARSDEN, C. A. Effects of lesioning noradrenergic neurones in the locus coeruleus on conditioned and unconditioned aversive behaviour in the rat. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 25, n. 6, p. 1307-21, 2001.

- NESSE, R. M. Proximate and evolutionary studies of anxiety, stress and depression: synergy at the interface. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 7, p. 895-903, 1999.
- NESSE, R. M. Maladaptation and natural selection. **Q Rev Biol**, v. 80, n. 1, p. 62-70, 2005.
- NICHOLAS, A. P.; HOKFELT, T.; PIERIBONE, V. A. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. **Trends Pharmacol Sci**, v. 17, n. 7, p. 245-55, 1996.
- O'DONNELL, T.; HEGADOREN, K. M.; COUPLAND, N. C. Noradrenergic mechanisms in the pathophysiology of post-traumatic stress disorder. **Neuropsychobiology**, v. 50, n. 4, p. 273-83, 2004.
- OTTO, T.; COUSENS, G.; HERZOG, C. Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. **Behav Brain Res**, v. 110, n. 1-2, p. 119-28, 2000.
- OTTO, T.; COUSENS, G.; RAJEWSKI, K. Odor-guided fear conditioning in rats: 1. Acquisition, retention, and latent inhibition. **Behav Neurosci**, v. 111, n. 6, p. 1257-64, 1997.
- OTTO, T.; EICHENBAUM, H. Complementary roles of the orbital prefrontal cortex and the perirhinal-entorhinal cortices in an odor-guided delayed-nonmatching-to-sample task. **Behav Neurosci**, v. 106, n. 5, p. 762-75, 1992.
- PAGANI, J. H.; ROSEN, J. B. The medial hypothalamic defensive circuit and 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) induced fear: comparison of electrolytic and neurotoxic lesions. **Brain Res**, v. 1286, p. 133-46, 2009.
- PANKSEPP, J. Aggression elicited by electrical stimulation of the hypothalamus in albino rats. **Physiol Behav**, v. 6, n. 4, p. 321-9, 1971a.
- PANKSEPP, J. Effects of hypothalamic lesions on mouse-killing and shock-induced fighting in rats. **Physiol Behav**, v. 6, n. 4, p. 311-6, 1971b.
- PANKSEPP, J. The psychoneurology of fear: Evolutionary perspectives and the role of animal models in understanding human anxiety. In: BURROWS, G. D.; ROTH, M.; NOYES, R. Jr. (Ed.). **Handbook of Anxiety**. Amsterdam: Elsevier, v.3, 1990. p.3-58.
- PARKER, L. A. The role of nausea in taste avoidance learning in rats and shrews. **Auton Neurosci**, v. 125, n. 1-2, p. 34-41, 2006.
- PASCHALL, G. Y.; DAVIS, M. Olfactory-mediated fear-potentiated startle. **Behav Neurosci**, v. 116, n. 1, p. 4-12, 2002a.

PASCHALL, G. Y.; DAVIS, M. Second-order olfactory-mediated fear-potentiated startle. **Learn Mem**, v. 9, n. 6, p. 395-401, 2002b.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 4. San Diego: Academic Press, 1998.

PEZZONE, M. A.; LEE, W. S.; HOFFMAN, G. E.; RABIN, B. S. Induction of c-Fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. **Brain Res**, v. 597, n. 1, p. 41-50, 1992.

PITMAN, R. K. Post-traumatic stress disorder, hormones, and memory. **Biol Psychiatry**, v. 26, n. 3, p. 221-3, 1989.

PITMAN, R. K.; SANDERS, K. M.; ZUSMAN, R. M.; HEALY, A. R.; CHEEMA, F.; LASKO, N. B.; CAHILL, L.; ORR, S. P. Pilot study of secondary prevention of posttraumatic stress disorder with propranolol. **Biol Psychiatry**, v. 51, n. 2, p. 189-92, 2002.

POHL, R.; RAINEY, J.; ORTIZ, A.; BALON, R.; SINGH, H.; BERCHOU, R. Isoproterenol-induced anxiety states. **Psychopharmacol Bull**, v. 21, n. 3, p. 424-7, 1985.

POHL, R.; YERAGANI, V. K.; BALON, R.; RAINEY, J. M.; LYCAKI, H.; ORTIZ, A.; BERCHOU, R.; WEINBERG, P. Isoproterenol-induced panic attacks. **Biol Psychiatry**, v. 24, n. 8, p. 891-902, 1988.

PRICE, J. L. An autoradiographic study of complementary laminar patterns of termination of afferent fibers to the olfactory cortex. **J Comp Neurol**, v. 150, n. 1, p. 87-108, 1973.

PRZYBYSLAWSKI, J.; ROULLET, P.; SARA, S. J. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. **J Neurosci**, v. 19, n. 15, p. 6623-8, 1999.

QU, L. L.; GUO, N. N.; LI, B. M. Beta1- and beta2-adrenoceptors in basolateral nucleus of amygdala and their roles in consolidation of fear memory in rats. **Hippocampus**, v. 18, n. 11, p. 1131-9, 2008.

QUIRK, G. J.; MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 56-72, 2008.

RESCORLA, R. A. Evaluating conditioning of related and unrelated stimuli using a compound test. **Learn Behav**, v. 36, n. 2, p. 67-74, 2008.

RESCORLA, R. A.; GILLAN, D. J. An analysis of the facilitative effect of similarity on second-order conditioning. **J Exp Psychol Anim Behav Process**, v. 6, n. 4, p. 339-51, 1980.

- RESTREPO, D.; ARELLANO, J.; OLIVA, A. M.; SCHAEFER, M. L.; LIN, W. Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. **Horm Behav**, v. 46, n. 3, p. 247-56, 2004.
- RICHARDSON, R.; TRONSON, N.; BAILEY, G. K.; PARNAS, A. S. Extinction of conditioned odor potentiation of startle. **Neurobiol Learn Mem**, v. 78, n. 2, p. 426-40, 2002.
- RICHARDSON, R.; VISHNEY, A.; LEE, J. Conditioned odor potentiation of startle in rats. **Behav Neurosci**, v. 113, n. 4, p. 787-94, 1999.
- RISOLD, P. Y.; CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. Organization of projections from the anterior hypothalamic nucleus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. **J Comp Neurol**, v. 348, n. 1, p. 1-40, 1994.
- RODRIGUES, S. M.; FARB, C. R.; BAUER, E. P.; LEDOUX, J. E.; SCHAFE, G. E. Pavlovian fear conditioning regulates Thr286 autophosphorylation of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II at lateral amygdala synapses. **J Neurosci**, v. 24, n. 13, p. 3281-8, 2004.
- RODRIGUES, S. M.; LEDOUX, J. E.; SAPOLSKY, R. M. The influence of stress hormones on fear circuitry. **Annu Rev Neurosci**, v. 32, p. 289-313, 2009.
- RODRIGUES, S. M.; SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J. E. Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 75-91, 2004.
- RODRIGUEZ-ROMAGUERA, J.; SOTRES-BAYON, F.; MUELLER, D.; QUIRK, G. J. Systemic propranolol acts centrally to reduce conditioned fear in rats without impairing extinction. **Biol Psychiatry**, v. 65, n. 10, p. 887-92, 2009.
- ROOZENDAAL, B.; MCEWEN, B. S.; CHATTARJI, S. Stress, memory and the amygdala. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 423-33, 2009.
- ROOZENDAAL, B.; QUIRARTE, G. L.; MCGAUGH, J. L. Glucocorticoids interact with the basolateral amygdala beta-adrenoceptor--cAMP/cAMP/PKA system in influencing memory consolidation. **Eur J Neurosci**, v. 15, n. 3, p. 553-60, 2002.
- ROOZENDAAL, B.; WILLIAMS, C. L.; MCGAUGH, J. L. Glucocorticoid receptor activation in the rat nucleus of the solitary tract facilitates memory consolidation: involvement of the basolateral amygdala. **Eur J Neurosci**, v. 11, n. 4, p. 1317-23, 1999.

SAM, M.; VORA, S.; MALNIC, B.; MA, W.; NOVOTNY, M. V.; BUCK, L. B. Neuropharmacology. Odorants may arouse instinctive behaviours. **Nature**, v. 412, n. 6843, p. 142, 2001.

SANTOS, J. M.; MACEDO, C. E.; BRANDÃO, M. L. Gabaergic mechanisms of hypothalamic nuclei in the expression of conditioned fear. **Neurobiol Learn Mem**, v. 90, n. 3, p. 560-8, 2008.

SARA, S. J. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 3, p. 211-23, 2009.

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

SCHETTINO, L. F.; OTTO, T. Patterns of Fos expression in the amygdala and ventral perirhinal cortex induced by training in an olfactory fear conditioning paradigm. **Behav Neurosci**, v. 115, n. 6, p. 1257-72, 2001.

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

SILVEIRA, M. C.; GRAEFF, F. G. Defense reaction elicited by microinjection of kainic acid into the medial hypothalamus of the rat: antagonism by a GABA receptor agonist. **Behav Neural Biol**, v. 57, n. 3, p. 226-32, 1992.

SMITH, M. A.; BANERJEE, S.; GOLD, P. W.; GLOWA, J. Induction of c-fos mRNA in rat brain by conditioned and unconditioned stressors. **Brain Res**, v. 578, n. 1-2, p. 135-41, 1992.

SMYTHIES, J. Section III. The norepinephrine system. **Int Rev Neurobiol**, v. 64, p. 173-211, 2005.

STAPLES, L. G.; HUNT, G. E.; CORNISH, J. L.; MCGREGOR, I. S. Neural activation during cat odor-induced conditioned fear and 'trial 2' fear in rats. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 8, p. 1265-77, 2005.

STAPLES, L. G.; MCGREGOR, I. S.; APFELBACH, R.; HUNT, G. E. Cat odor, but not trimethylthiazoline (fox odor), activates accessory olfactory and defense-related brain regions in rats. **Neuroscience**, v. 151, n. 4, p. 937-47, 2008.

STERN, C. A.; CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic-like effect in the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 90, n. 4, p. 545-50, 2008.

STERN, C. A.; MONTE, F. H.; GAZARINI, L.; CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. **Neuroscience**, 2010.

STERNBERG, D. B.; KOROL, D.; NOVACK, G. D.; MCGAUGH, J. L. Epinephrine-induced memory facilitation: attenuation by adrenoceptor antagonists. **Eur J Pharmacol**, v. 129, n. 1-2, p. 189-93, 1986.

SULLIVAN, R. M.; MCGAUGH, J. L.; LEON, M. Norepinephrine-induced plasticity and one-trial olfactory learning in neonatal rats. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 60, n. 2, p. 219-28, 1991.

S

ULLIVAN, R. M.; STACKENWALT, G.; NASR, F.; LEMON, C.; WILSON, D. A. Association of an odor with activation of olfactory bulb noradrenergic beta-receptors or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach responses to that odor in neonatal rats. **Behav Neurosci**, v. 114, n. 5, p. 957-62, 2000.

SWANSON, L. W. **The hypothalamus**. Amsterdam: Elsevier, 1987.

SWANSON, L. W. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. **Brain Res**, v. 886, n. 1-2, p. 113-164, 2000.

SWIERGIEL, A. H.; LI, Y.; WEI, Z. Y.; DUNN, A. J. Effects of chlordiazepoxide on footshock- and corticotropin-releasing factor-induced increases in cortical and hypothalamic norepinephrine secretion in rats. **Neurochem Int**, v. 52, n. 6, p. 1220-5, 2008.

TSUDA, A.; TANAKA, M. Differential changes in noradrenaline turnover in specific regions of rat brain produced by controllable and uncontrollable shocks. **Behav Neurosci**, v. 99, n. 5, p. 802-17, 1985.

TULLY, K.; BOLSHAKOV, V. Y. Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity. **Mol Brain**, v. 3, p. 15, 2010.

VAN STEGEREN, A. H.; EVERAERD, W.; CAHILL, L.; MCGAUGH, J. L.; GOOREN, L. J. Memory for emotional events: differential effects of centrally versus peripherally acting beta-blocking agents. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 138, n. 3-4, p. 305-10, 1998.

VERMETTEN, E.; BREMNER, J. D. Olfaction as a traumatic reminder in posttraumatic stress disorder: case reports and review. **J Clin Psychiatry**, v. 64, n. 2, p. 202-7, 2003.

VERMETTEN, E.; SCHMAHL, C.; SOUTHWICK, S. M.; BREMNER, J. D. Positron tomographic emission study of olfactory induced emotional recall in veterans with and without combat-related posttraumatic stress disorder. **Psychopharmacol Bull**, v. 40, n. 1, p. 8-30, 2007.

VIANNA, D. M.; BORELLI, K. G.; FERREIRA-NETTO, C.; MACEDO, C. E.; BRANDÃO, M. L. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. **Brain Res Bull**, v. 62, n. 3, p. 179-89, 2003.

WALKER, D. L.; DAVIS, M. Light-enhanced startle: further pharmacological and behavioral characterization. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 159, n. 3, p. 304-10, 2002a.

WALKER, D. L.; DAVIS, M. Quantifying fear potentiated startle using absolute versus proportional increase scoring methods: implications for the neurocircuitry of fear and anxiety. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 164, n. 3, p. 318-28, 2002b.

WALKER, D. L.; PASCHALL, G. Y.; DAVIS, M. Glutamate receptor antagonist infusions into the basolateral and medial amygdala reveal differential contributions to olfactory vs. context fear conditioning and expression. **Learn Mem**, v. 12, n. 2, p. 120-9, 2005.

WANG, S. J.; HUANG, C. C.; HSU, K. S.; TSAI, J. J.; GEAN, P. W. Blockade of isoproterenol-induced synaptic potentiation by tetra-9-aminoacridine in the rat amygdala. **Neurosci Lett**, v. 214, n. 2-3, p. 87-90, 1996.

WASMAN, M.; FLYNN, J. P. Directed attack elicited from hypothalamus. **Arch Neurol**, v. 6, p. 220-7, 1962.

WATANABE, T.; NAKAGAWA, T.; YAMAMOTO, R.; MAEDA, A.; MINAMI, M.; SATOH, M. Involvement of noradrenergic system within the central nucleus of the amygdala in naloxone-precipitated morphine withdrawal-induced conditioned place aversion in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 170, n. 1, p. 80-8, 2003.

WATKINS, L. R.; WIERTELAK, E. P.; MAIER, S. F. The amygdala is necessary for the expression of conditioned but not unconditioned analgesia. **Behav Neurosci**, v. 107, n. 2, p. 402-5, 1993.

WATSON, J. B.; RAYNER, R. Conditioned emotional reactions. **Journal of Experimental Psychology**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 1920.

WIKBERG, J. E. Adrenergic receptors: classification, ligand binding and molecular properties. **Acta Med Scand Suppl**, v. 665, p. 19-36, 1982.

WILLIAMS, C. L.; MCGAUGH, J. L. Reversible lesions of the nucleus of the solitary tract attenuate the memory-modulating effects of posttraining epinephrine. **Behav Neurosci**, v. 107, n. 6, p. 955-62, 1993.

WILLIAMS, C. L.; MEN, D.; CLAYTON, E. C. The effects of noradrenergic activation of the nucleus tractus solitarius on memory and in potentiating

norepinephrine release in the amygdala. **Behav Neurosci**, v. 114, n. 6, p. 1131-44, 2000.

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

YERAGANI, V. K.; POHL, R.; BAR, K. J.; CHOKKA, P.; TANCER, M. Exaggerated beat-to-beat R amplitude variability in patients with panic disorder after intravenous isoproterenol. **Neuropsychobiology**, v. 55, n. 3-4, p. 213-8, 2007.

YOKOO, H.; TANAKA, M.; YOSHIDA, M.; TSUDA, A.; TANAKA, T.; MIZOGUCHI, K. Direct evidence of conditioned fear-elicited enhancement of noradrenaline release in the rat hypothalamus assessed by intracranial microdialysis. **Brain Res**, v. 536, n. 1-2, p. 305-8, 1990.

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

ZHANG, J. J.; OKUTANI, F.; HUANG, G. Z.; TANIGUCHI, M.; MURATA, Y.; KABA, H. Common properties between synaptic plasticity in the main olfactory bulb and olfactory learning in young rats. **Neuroscience**, 2010.

8. Apêndice

Apêndice A – Análise comparativa entre os animais submetidos ao condicionamento olfatório de medo com choque elétrico nas patas e aquele originado com isoproterenol no PMd

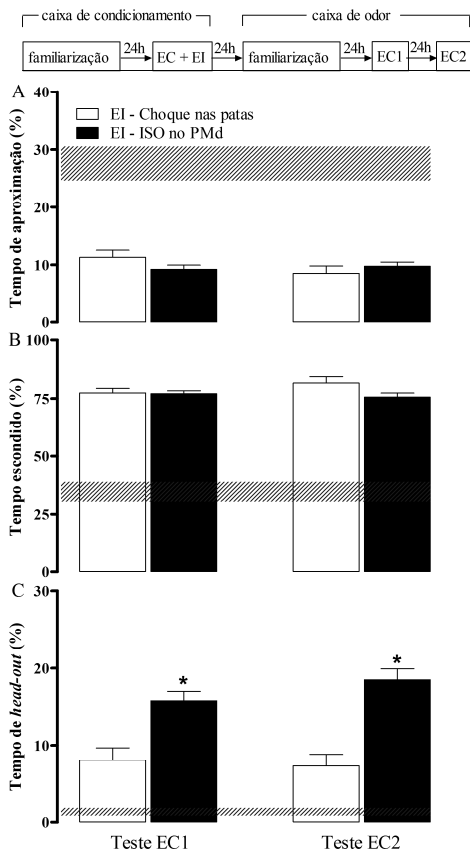


Figura I. Análise comparativa de animais do grupo controle (Experimentos 1-4, n=15), que receberam PBS no PMd, e foram submetidos ao COM através de choque nas patas, e animais que foram condicionados com ISO 40 nmol (Experimentos 3-8, n=34) no PMd e expostos ao odor de acetato de amila durante 10 min. A análise estatística ANOVA com medidas repetidas não detectou diferenças entre os grupos no de tempo de aproximação [$F(1,47)=0,15$] e no tempo escondido [$F(1,47)=2,54$]. Foram detectadas diferenças entre os grupos para o fator tratamento no tempo de head-out [$F(1,47)=28,66$, $p < 0,05$], indicando que ratos condicionados com ISO no PMd apresentaram aumento no tempo de avaliação de risco nas sessões EC1 e EC2 comparados ao grupo condicionado com choque nas patas.

Apêndice B – Animais injetados com ISO 40 nmol no PMd foram analisados no modelo de ansiedade clássico para verificar o estado emocional promovido por estimulação de receptores beta.

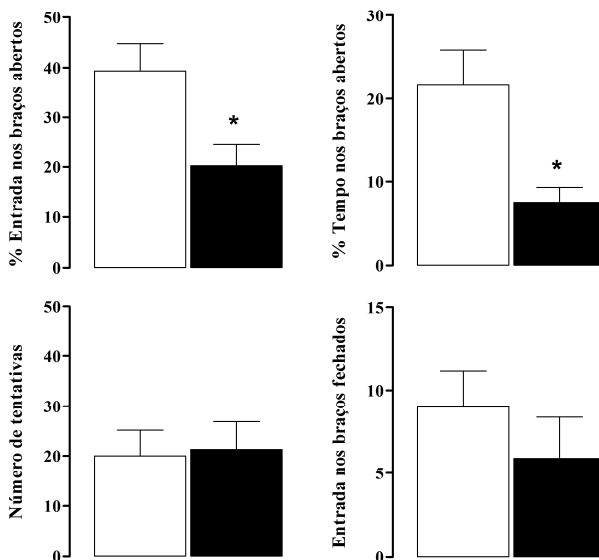


Figura II. Os ratos foram submetidos ao modelo do labirinto em cruz elevado (composto de dois braços abertos e dois braços fechados), 5 min após a microinjeção de ISO 40 nmol no PMd. Os parâmetros analisados, durante 5 min de exposição ao labirinto, foram número de entradas nos braços abertos, tempo nos braços abertos (esses dois parâmetros foram utilizados como índice de ansiedade), número de tentativas de entrada nos braços abertos (comportamento de avaliação de risco) e número de entrada nos braços fechados (como índice de locomoção). A análise estatística ANOVA indicou diferenças significativas ($p < 0,05$) para o número de entradas nos braços abertos e o tempo nos braços abertos. Ratos que receberam ISO 40 no PMd apresentaram diminuição no número de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos, indicando um comportamento tipo ansiogênico promovido por ISO.