

Cristiane Rezende Mochny

**FACILITAÇÃO DO CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL
AVERSIVO PELA ESTIMULAÇÃO QUÍMICA DA MATÉRIA
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do grau de Doutor em
Farmacologia
Orientador: Prof. Dr. Antonio de Pádua
Carobrez

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mochny, Cristiane Rezende

Facilitação do condicionamento contextual aversivo pela
estimulação química da matéria cinzenta periaquedutal dorsal
/ Cristiane Rezende Mochny ; orientador, Antonio de Padua
Carobrez - Florianópolis, SC, 2017.
143 p.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. neurofarmacologia. 3.
condicionamento aversivo. 4. sensibilização. 5. matéria
cinzenta periaquedutal. I. Carobrez, Antonio de Padua. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia. III. Título.

Agradecimentos

Ao meu orientador, professor Pádua, pela parceria e dedicação com o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Victor Molina, “*mi gran maestro*”, pela sua dedicação na colaboração da minha formação, por tudo que me ensinou e pela amizade que guardarei para sempre.

Ao dr. Marcelo Giachero, por sua dedicação em me transmitir seus conhecimentos e pela amizade.

A todos os colegas de laboratório e departamento de farmacologia, que tornaram prazeroso o percurso deste doutorado, em especial aqueles que se tornaram amigos para a vida toda.

À minha família, pelo apoio nos momentos difíceis e por acreditar que meu objetivo seria alcançado.

RESUMO

As memórias aversivas resultam de experiências ameaçadoras. Evidências sugerem que a codificação da associação aversiva é facilitada por eventos estressores prévios, resultando em memórias aversivas de longa duração. A estimulação química da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPd) com N-metil-D-aspartato (NMDA) induz a expressão de comportamentos defensivos (CD) evidentes e serve como estímulo incondicionado que sustenta o condicionamento aversivo a um odor neutro, demonstrado pela expressão de CD na reexposição ao odor em um novo contexto. A injeção de NMDA na MCPd induz estado emocional negativo que potencializa o comportamento de congelamento na evocação de um traço de memória contextual aversiva, 24 h após o treino. Poucos estudos investigaram o papel da estimulação de áreas cerebrais críticas para a expressão do medo como facilitadoras da aprendizagem aversiva. Este trabalho testou a hipótese de que a injeção de NMDA intra-MCPd poderia potencializar o condicionamento aversivo contextual, realizado no dia seguinte. Ratos receberam a infusão de NMDA intra-MCPd 24 h antes de um treino fraco de associação entre um choque elétrico nas patas e o contexto. Foi observado um aumento no congelamento dos animais em resposta ao choque e na reexposição ao contexto associado ao choque, sendo este efeito observado até uma semana após o condicionamento, evidenciando a expressão da memória aversiva de longa duração. A administração sistêmica de cicloheximida (CHX) após a sessão de estimulação da MCPd bloqueou o aumento do congelamento no contexto associado ao choque. A expressão da memória de longa duração no contexto associado foi prejudicada pela evocação em contexto neutro ou pela administração sistêmica de CHX antes da evocação no contexto associado ao choque. Entretanto, um odor associado à estimulação da MCPd quando apresentado na evocação em qualquer contexto favoreceu a manutenção da memória aversiva contextual associada ao choque. Estes dados sugerem que a estimulação da MCPd promove o aumento do congelamento nas diferentes etapas do condicionamento contextual aversivo e que a evocação consiste na etapa fundamental do processo de manutenção da memória formada sob influência da estimulação da MCPd. Além disso, a integração das experiências aversivas é um processo dependente de síntese proteica.

Palavras-chave: Matéria cinzenta periaquedutal dorsal, Condicionamento aversivo contextual, Integração de experiências aversivas.

ABSTRACT

Aversive memories result from threatening experiences. Evidence suggest that the encoding of aversive association is facilitated by previous stress, resulting in long lasting memories. Dorsal periaqueductal gray matter (dPAG) chemical stimulation (N-methyl-d-aspartate, NMDA) induces the expression of overt defensive behavior and serves as unconditioning stimulus supporting fear conditioning to neutral odor (CS), as shown by defensive behavior elicited by CS exposure in a novel context. NMDA injected into dPAG induces a negative emotional state that potentiates freezing at recall of a contextual fear memory (CFM) trace, 24 hours after training. Few studies investigated the stimulation of brain areas critical for fear expression as sensitizers in fear learning. The hypothesis that NMDA intra-dPAG could potentiate CFM performed the day after was tested. Rats received NMDA intra-dPAG 24 hours before a weak training, of an association of 1 mild footshock and the context. Freezing was increased in NMDA-rats immediately after shock suggesting a sensitized DB; also in a retrieval test performed in the context associated to shock. This effect was still observed in a reexposure to associated context 7 days after training, suggesting the formation of a long-term aversive contextual memory. Systemic injection of cycloheximide (CHX) after dPAG stimulation session impaired the increased freezing in reexposures do context associated to shock. The increase in long-term memory expression in context associated to shock was impaired by the retrieval in a neutral context or by CHX injected before retrieval in the associated context. However, when a neutral odor was associated to dPAG-stimulation experience, and later reexposed in the neutral context during retrieval session, the long-term contextual memory associated to shock was maintained. These data suggest that the stimulation of dPAG enhances freezing behavior in all stages of contextual fear memory processment and retrieval session is a critical step in the maintenance of contextual fear memory acquired under dPAG NMDA-stimulation influence. Moreover, the association of both the aversive experiences, i.e., dPAG stimulation, electrical footshock and retrieval, is a process dependent on protein synthesis.

Keywords: Dorsal periaqueductal gray matter, Contextual fear conditioning, Integration of aversive experiences.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais projeções ascendentes da MCP que podem influenciar processos de aprendizagem e memória.....	23
Figura 2 – Progressão dos comportamentos defensivos mediante a estimulação elétrica da MCPd.....	25
Figura 3 – Receptores glutamatérgicos.....	27
Figura 4 – Caixa de condicionamento.....	56
Figura 5 – Caixa de vidro.....	56
Figura 6 – Caixa de acrílico Plexiglas® preto.....	56
Figura 7 – Protocolo do experimento 1.....	62
Figura 8 – Protocolo do experimento 2.....	63
Figura 9 – Protocolo do experimento 3.....	64
Figura 10 – Protocolo do experimento 4.....	65
Figura 11 – Protocolo do experimento 5.....	65
Figura 12 – Protocolo do experimento 6.....	66
Figura 13 – Protocolo do experimento 7.....	67
Figura 14 – Protocolo do experimento 8.....	69
Figura 15 – Protocolo do experimento 9.....	70
Figura 16 – Protocolo do experimento 10.....	71
Figura 17 – Protocolo do experimento 11.....	72
Figura 18 – Sítios de injeção.....	73

- Figura 19 – Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre o tempo de congelamento exibido pelos ratos durante as sessões de pós-estimulação, pós-choque, teste 1 e teste 2.....75
- Figura 20 – Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre o comportamento de congelamento avaliado nas diferentes sessões do protocolo experimental quando os animais não receberam choque no dia 2.....76
- Figura 21 – Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre o comportamento de congelamento avaliado nas diferentes sessões do protocolo experimental quando o teste 1 ocorreu no contexto novo.....77
- Figura 22 – Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre o comportamento de congelamento avaliado nas diferentes sessões do protocolo experimental quando não houve reexposição no teste 1.....78
- Figura 23 – Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre o comportamento de congelamento avaliado nas diferentes sessões do protocolo experimental quando o teste 1 no contexto novo ocorreu 48 h após o choque.....80
- Figura 24 – Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre o comportamento de congelamento avaliado nas diferentes sessões do protocolo experimental quando o teste 1 no contexto novo ocorreu 7 dias após o choque.....81
- Figura 25 – Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre o comportamento de congelamento avaliado nas diferentes sessões do protocolo experimental quando o teste 1 ocorreu no contexto B.....82
- Figura 26 – Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre o comportamento de congelamento avaliado nas diferentes sessões do protocolo experimental quando o teste 1 ocorreu no contexto B impregnado com odor.....83
- Figura 27 – Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre o comportamento de congelamento avaliado nas diferentes sessões do protocolo experimental quando o teste 1 ocorreu no contexto C impregnado com odor.....85

Figura 28 – Efeito da cicloheximida administrada imediatamente após ou 6 h após a sessão de estimulação da MCPd	86
Figura 29 – Efeito da cicloheximida administrada 30 min antes da sessão de teste 1.....	87
Figura 30 - Principais vias de sinalização intracelular ativadas na consolidação sináptica de memórias aversivas.....	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos acerca dos efeitos da experiência aversiva prévia sobre diferentes paradigmas de emocionalidade	46
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAE – aminoácido excitatório
AHN – núcleo anterior do hipotálamo
AMv – núcleo anteromedial do tálamo
ANOVA – análise de variância
AP – anteroposterior
BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro
BLA – amígdala basolateral
DV – dorsoventral
CACF – condicionamento aversivo contextual fraco
CHX – cicloheximida
CPF – córtex pré-frontal
CPFm – córtex pré-frontal medial
DSM – Manual Diagnóstico e Estatísticos dos Transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*)
EC – estímulo condicionado
EI – estímulo incondicionado
EPM – erro padrão da média
ERK – quinase regulada por sinal extracelular
GABA- ácido γ -aminobutírico
GLU – glutamato
IP – injeção intraperitoneal; sistêmica
LCE – labirinto em cruz elevado
LNC – Laboratório de Neurobiologia Comportamental
LTE – labirinto em T elevado
mGLU – receptor metabotrópico de glutamato
MCP – matéria cinzenta periaquedutal
MCPd – matéria cinzenta periaquedutal dorsal
MCPdl – matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral
MCPl – matéria cinzenta periaquedutal lateral
MCPvl – matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral
ML – médio-lateral
NMDA – N-Metil-D-Aspartato
PBS – tampão salina-fosfato (*potassium buffered saline*)
PMd – núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo
PRP – proteína relacionada à plasticidade
RE – núcleo reuniens do tálamo
SAL – solução salina 0,9%
TEPT – transtorno de estresse pós-traumático

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Matéria cinzenta periaquedutal.....	19
1.1.1	Estrutura e conexões anatômicas.....	19
1.1.2	Matéria cinzenta periaquedutal dorsal, comportamento defensivo e glutamato.....	23
1.1.3	Matéria cinzenta periaquedutal dorsal: sinalização de perigo e participação no processamento cognitivo.....	28
1.2	Aprendizagem e memória.....	30
1.2.1	Substratos neurais da formação de memórias.....	33
1.2.2	Memória associativa e não-associativa.....	37
1.2.3	Fenômeno da sensibilização.....	40
1.2.4	Sensibilização comportamental.....	41
1.2.5	Interação entre experiências aversivas.....	42
1.3	Justificativa.....	48
1.4	Hipótese.....	49
1.5	Objetivos.....	49
1.5.1	Objetivo geral.....	49
1.5.2	Objetivos específicos.....	50
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.1	Animais.....	51
2.1.1	Ações de refinamento experimental.....	52
2.2	Cirurgia estereotáxica.....	52
2.3	Drogas e soluções.....	54
2.4	Aparatos experimentais.....	55
2.5	Procedimentos experimentais.....	57
2.5.1	Testes comportamentais.....	57
2.5.2	Injeção cerebral: estimulação da MCPd.....	58
2.5.3	Condicionamento aversivo contextual fraco (CACF).....	58
2.5.4	Sessões de teste.....	59
2.5.5	Sessões com estímulo olfatório.....	60
2.6	Análise histológica.....	60
2.7	Análise estatística.....	61
3	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	62
4	RESULTADOS.....	72
5	DISCUSSÃO.....	88
6	CONCLUSÕES.....	110
7	REFERÊNCIAS.....	113
	APÊNDICE A – Fases da memória.....	135

1. INTRODUÇÃO

1.1 Matéria cinzenta periaquedutal

1.1.1 Estrutura e conexões anatômicas

A matéria cinzenta periaquedutal (MCP) é uma área do sistema nervoso central localizada no mesencéfalo, constituída por neurônios organizados em colunas (dorsomedial e dorsolateral na porção dorsal, e lateral e ventrolateral na porção ventral) no eixo rostro-caudal em torno do aqueduto cerebral (Bandler, Keay *et al.*, 2000). Do ponto de vista funcional, a MCP é uma região que participa da mediação de funções distintas, devido à sua conectividade com áreas do sistema límbico, motor, sensorial e autonômico (Beitz, 1985). Dentre as funções atribuídas à MCP destacam-se: o comportamento de lordose, a vocalização, processamento e modulação da dor, regulação autonômica e reações emocionais de medo e ansiedade (Behbehani, 1995; Carobrez, Teixeira *et al.*, 2001), além de participar no controle da micção e da termorregulação e contribuir para mecanismos de vigilância e controle do sono REM (“*rapid eye movement*”) (Benarroch, 2012).

A MCP recebe projeções neuronais em abundância de vias nociceptivas do corno dorsal da medula espinhal (Craig, 1995; Keay, Feil *et al.*, 1997), do hipotálamo e de regiões do prosencéfalo, incluindo o córtex pré-frontal medial (CPFm) e o septo lateral (Bandler e Shipley, 1994; Canteras e Goto, 1999), e da amígdala, particularmente de sua porção mais caudal, o núcleo central (Beitz, 1982). As conexões com a região posterior do hipotálamo são recíprocas, encontradas principalmente nas colunas lateral e dorsolateral da MCP (Falconi-Sobrinho, Anjos-Garcia *et al.*, 2017). O núcleo pré-mamilar dorsal do

hipotálamo (PMd), região importante na amplificação dos sinais neurais hipotalâmicos envolvidos com a resposta de defesa ao predador, e com as respostas aprendidas em protocolos de condicionamento olfatório de medo (Canteras, Kroon *et al.*, 2008; Pavesi, Canteras *et al.*, 2011), envia densas projeções para a MCP, especialmente para a região dorsolateral (MCPdl) (Canteras e Swanson, 1992).

As projeções descendentes da MCP concentram-se principalmente na região do bulbo rostroventromedial e nos núcleos noradrenérgicos da ponte, que resultam na inibição de aferências nociceptivas do corno dorsal da medula espinhal, sendo esta via relacionada com o efeito antinociceptivo conferido à atividade da MCP (para revisão, ver Ossipov, 2012). Tanto a estimulação elétrica, quanto a injeção intra-cerebral de opióides principalmente na MCPvl produzem analgesia através da inibição dos disparos neuronais no corno dorsal da medula espinhal (Basbaum, Fields, 1984; Liebeskind, Guilbaud *et al.*, 1973); e a ação sistêmica de opióides pode ser bloqueada pela administração de antagonista opioide na MCP, confirmando o controle central da analgesia exercido pela MCP. Os corpos celulares e terminais opioidérgicos da MCP concentram-se na porção caudal da coluna ventrolateral, enquanto que na porção rostral a distribuição concentra-se nas colunas dorsais da MCP (Moss, Glazer, *et al.*, 1983). As aferências corticais da MCP são o substrato anatômico do controle cognitivo do sistema de analgesia, uma vez que a analgesia endógena mediada por endorfinas pode ser condicionada (para revisão, ver Basbaum e Fields, 1984).

É importante notar que os neurônios das diferentes colunas da MCP se conectam intensamente entre si, promovendo um circuito de neuromodulação intrínseca nesta área. Os neurônios de uma coluna

modulam a atividade de neurônios eferentes de outras colunas modificando sinais emitidos pela MCP (Jansen, Farkas *et al.*, 1998; Katz, Frost, 1996). Padrões de respostas opostas, por exemplo fuga e imobilidade emitidas pela MCPI e MCPvl, dependem da inibição recíproca em um circuito que previne que estas colunas sejam ativadas simultaneamente (Jansen, Farkas *et al.*, 1998).

Do ponto de vista neuroanatômico, pode-se afirmar que a MCP é uma região de interface entre o encéfalo e o tronco encefálico, responsável pela integração das respostas comportamentais a estressores internos (dor) e externos (predador). A MCP envia projeções para regiões do hipotálamo e do tálamo (Krout e Loewy, 2000; Mantyh 1983). A principal projeção ascendente da MCPdl é para o núcleo anterior do hipotálamo (AHN), região importante do sistema hipotalâmico de defesa que conecta-se com áreas de integração de informações contextuais (septo lateral) e de elaboração de respostas defensivas (PMd), além de estabelecer conexões diretas com outras regiões do sistema hipotalâmico de defesa (região perifornical do hipotálamo lateral, hipotálamo ventromedial) e com o leito da estria terminal, área pré-óptica medial e com o núcleo *reuniens* (RE) do tálamo (Risold, Canteras *et al.*, 1994; Risold, Thompson *et al.*, 1997; Canteras 2002). O núcleo RE, localizado na linha média do tálamo, recebe projeções corticais e subcorticais e tem como principal função transmitir informações emocionais e cognitivas para a formação hipocampal (Mckenna e Vertes, 2004), sendo considerada uma estrutura chave nos processos de memória, aprendizagem e emocionalidade (Izquierdo e Medina, 1997; Eichenbaum, 2008; Gray, 1982). A estimulação elétrica ou química da MCPd de ratos, assim como a exposição ao gato promove aumento na expressão da

proteína c-FOS no PMd (Vianna, Borelli et al., 2003; Canteras, Kroon et al., 2008), indicando a influência da MCP no processamento das informações relacionadas ao predador. As conexões da MCP com o tálamo se estabelecem diretamente com os núcleos reticulares, linha média e região intralaminar e indiretamente através das conexões com o AHN e PMd, que servem como caminho de transmissão da informação para o CPF, a amígdala, o hipocampo e os gânglios da base (Krout e Loewy, 2000; Canteras e Swanson, 1992; Hekenhham, 1978). Já o núcleo anteromedial (AMv) que recebe projeções diretas do AHN e do PMd (Risold, Canteras et al., 1994; Risold, Thompson et al., 1997; Canteras e Swanson, 1992) conectados com a MCPd, tem papel importante na formação de memórias, devido a suas conexões com o cortex límbico, com a formação hipocampal e com os núcleos lateral (LA) e basolateral (BLA) da amígdala, importantes para os processos associativos em experiências de caráter emocional (Shibata, 1993; van Groen, Kadish et al., 1999; LeDoux, 2000). Assim, a ativação da MCP deve influenciar o processamento cognitivo de uma experiência através de suas conexões ascendentes, representadas esquematicamente na figura 1.

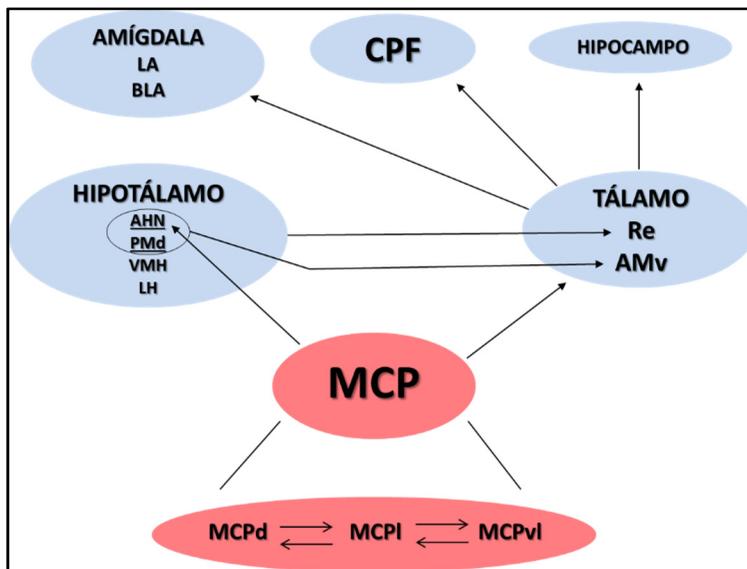


Figura 1. Principais projeções ascendentes da MCP que podem influenciar processos de aprendizagem e memória. As estruturas ilustradas em azul representam as regiões críticas para a formação de memórias. As setas indicam as eferências de cada região cerebral. Adaptado de Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012.

1.1.2 Matéria cinzenta periaquedutal dorsal, comportamento defensivo e glutamato

A MCP é uma área encefálica descrita como a via final comum da defesa e é crítica para a expressão de respostas defensivas em situações de perigo, com capacidade para coordenar e executar as respostas defensivas (Blanchard e Blanchard, 1988) e autonômicas (Carobrez, Schenberg *et al.*, 1983). A estimulação elétrica com eletrodos implantados em regiões do hipotálamo e do mesencéfalo, em especial na MCPdl de gatos, induziu a expressão de comportamentos defensivos como fuga e luta, e respostas cardiovasculares como aumento da pressão arterial e frequência cardíaca (Abrahams *et al.*, 1960). Em roedores, a

estimulação elétrica e gradual da MCPdl (em geral incrementos em torno de $1,4\mu\text{A}$), resultou em alterações comportamentais de maneira progressiva. As primeiras alterações observadas em intensidades mais baixas de estimulação são respostas autonômicas e aparente estado de alerta. Com o incremento da intensidade, em seguida observou-se a repentina imobilidade e tensão dos animais, acompanhada de micção e defecação. Em intensidades maiores de estimulação, o comportamento de imobilidade foi substituído pelo escape (estimulação em torno de $200\mu\text{A}$, figura 2), comportamento caracterizado por corrida vigorosa e saltos (Brandão, de Aguiar *et al.*, 1982, Coimbra *et al.*, 1989; Bittencourt *et al.*, 2004).

Roedores são capazes de aprender a apertar uma alavanca para desligar a estimulação elétrica aplicada na MCPdl (Delgado, Roberts, *et al.*, 1954) e pacientes submetidos a um procedimento de estimulação cerebral profunda, quando os eletrodos foram posicionados nesta região do mesencéfalo, solicitaram a interrupção da estimulação sob relatos de fortes reações emocionais, de medo intenso e morte iminente (Nashold, Wilson, *et al.*, 1969). Estas observações aliadas a outras evidências experimentais sustentam a hipótese de que esta região seja um substrato neural da aversão (Graeff, 1981). Assim, devido às similaridades entre as observações de alterações comportamentais induzidas pela estimulação da MCP, os relatos dos pacientes neurocirúrgicos e a lista dos sintomas de pânico descritas no DSM-IV (Manual Diagnóstico e Estatístico das Doenças Mentais 4ª edição), a estimulação elétrica da MCPd é utilizada por vários grupos de pesquisa como modelo animal de ataques de pânico (Graeff, 2004).

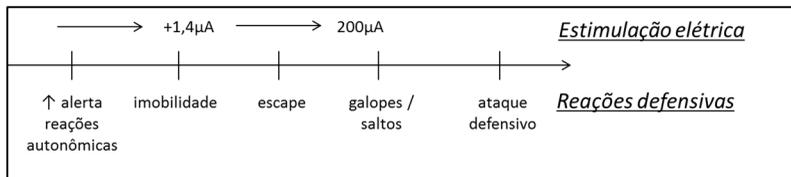


Figura 2. Progressão dos comportamentos defensivos mediante a estimulação elétrica da MCPd. O aumento gradual na intensidade da estimulação elétrica da MCPd em ratos promove a expressão de reações defensivas progressivamente evidentes (Bittencourt *et al.*, 2004).

Entretanto, a estimulação realizada com eletrodos atinge tanto os corpos celulares de neurônios como axônios de passagem, ativando indiscriminadamente várias células de vias ascendentes e descendentes dos neurônios nas quais o estímulo é aplicado (Chen, Zhou, *et al.*, 2015). Atualmente se dispõe de ferramentas experimentais mais precisas para o estudo da função exercida pela MCPd no processamento emocional. Com o auxílio da optogenética, por exemplo, foi possível ativar um grupo específico de neurônios com grande precisão temporal, na escala de milissegundos (Deisseroth, 2011). No caso da MCPd, a estimulação optogenética permitiu a expressão mais estável e moderada dos comportamentos do que a estimulação elétrica. Enquanto a estimulação elétrica promoveu o congelamento durante o período pós-estimulação, o congelamento induzido pela estimulação optogenética limitou-se à duração da estimulação. Nas intensidades mais altas, a estimulação elétrica promoveu a repentina e vigorosa corrida com saltos, enquanto que a optogenética produziu um padrão de corrida mais moderado, incluindo um estado que variou entre corrida e pausa. Estas observações levaram os pesquisadores a sugerir que estes dois tipos de estimulação possuem diferentes mecanismos de ativação neuronal (Chen, Zhou, *et al.*, 2015).

Outra ferramenta que produz a estimulação neuronal seletiva de corpos celulares é a estimulação química através da injeção intra-craniana com aminoácidos excitatórios (AAE), sendo o glutamato (GLU) o principal neurotransmissor excitatório. A figura 3 apresenta os tipos de receptores ativados pelo GLU. O receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) é um canal iônico composto por 7 subunidades NR1 e NR2 cuja função é determinada pela combinação de NR1 e NR2; possui maior permeabilidade ao Ca^{+2} do que ao Na^{+} e K^{+} ; possui sítios de ligação para glicina, Mg^{+} , Zn^{+} e poliaminas além do sítio para o GLU. Os receptores AMPA e CAINATO são mais permeáveis ao Na^{+} e K^{+} do que ao Ca^{+2} . A nomenclatura dos canais iônicos ativados pelo GLU é baseada nos seus respectivos agonistas análogos sintéticos. Os receptores metabotrópicos ativados pelo GLU (mGlu) estão acoplados a proteína G (Gi/G0/Gq) e ativam cascatas de segundos mensageiros intracelulares; estão presentes na pré- e na pós-sinapse e também nas células gliais. A MCPd é uma região com expressão abundante de receptores glutamatérgicos, especialmente do subtipo NMDA (Albin, Makowiec *et al.*, 1990), e os efeitos comportamentais induzidos pela injeção de agonistas deste receptor são observados em doses baixas (Bandler e Carrive, 1988; Bittencourt, Carobrez *et al.*, 2004), e caracterizados por reações defensivas semelhantes àquelas evocadas na presença de estímulos naturais como a exposição ao predador (Bandler e Carrive, 1988; Comoli, Ribeiro-Barbosa *et al.*, 2003). O efeito aversivo dos agonistas do receptor NMDA administrados na MCPd é observado em vários paradigmas comportamentais, e se caracteriza pelo incremento das respostas de defesa no labirinto em cruz elevado (LCE) (Carobrez, Teixeira *et al.*, 2001; Teixeira e Carobrez, 1999; Moraes, Bertoglio *et al.*, 2008) e no labirinto

em T elevado (Bertoglio e Zangrossi, 2006). A injeção de antagonistas NMDA intra-MCPd corroborou a importância destes receptores no efeito aversivo da MCPd ao abolir as respostas defensivas em animais de laboratório expostos ao LCE (Kincheski e Carobrez, 2010; Teixeira e Carobrez, 1999), ao teste de Vogel (Tonetto, Terzian *et al.*, 2009), e na exposição ao predador (Aguilar e Guimarães, 2009).

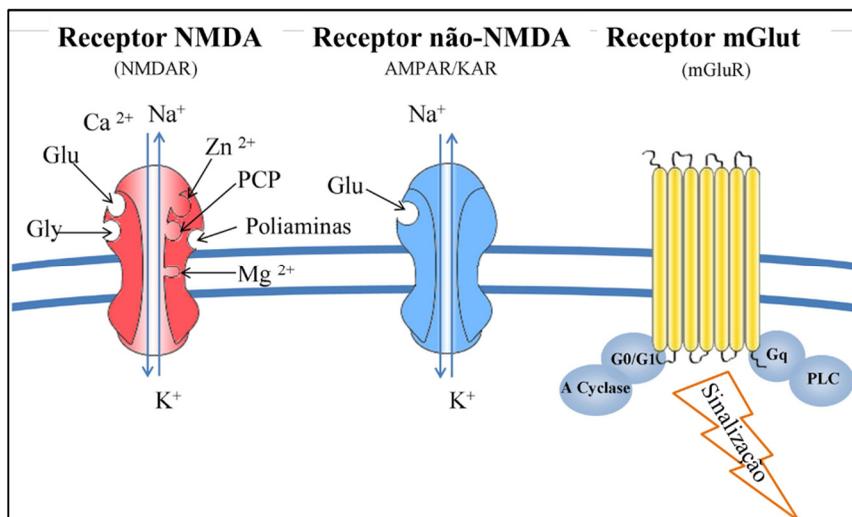


Figura 3. Receptores glutamatérgicos. Representação esquemática adaptada de Kritis, Stamoula, *et al.*, 2015; Rang, Dale, *et al.*, 2007.

A atividade glutamatérgica na MCPd tem papel importante na expressão de comportamentos defensivos e também na codificação das experiências aversivas onde predominam estímulos biologicamente relevantes, como o odor de predador. Souza e Carobrez mostraram que o bloqueio dos receptores NMDA na região rostral da MCPd prejudicou a expressão do medo incondicionado em ratos expostos ao odor do predador. A mesma manipulação quando realizada na região caudal da

MCPd não prejudicou a resposta incondicionada, mas promoveu redução duradoura da expressão do medo contextual associado à experiência do odor do predador. Esses dados sugerem uma dicotomia funcional no eixo rostro-caudal da MCP na regulação de respostas defensivas dependendo da natureza do estímulo (Souza e Carobrez, 2016). Respostas incondicionadas dependem da atividade dos neurônios da porção rostral enquanto que as respostas à estímulos associados à ameaça (condicionados) ativam a porção caudal. Este fato pode ser explicado pela diferença na conectividade anatômica de projeções para a MCP. Circuitos paralelos e independentes são recrutados dependendo de características do estímulo ameaçador, que resultam na ativação de porções diferentes da MCP para execução de respostas de defesa (Gross e Canteras, 2012). Além disso, estudos prévios mostraram que o padrão de respostas cardiovasculares evocadas pela estimulação da MCPdl não é homogêneo ao longo do seu eixo rostro-caudal (Carrive 1993; Bandler e Shipley, 1994).

1.1.3 Matéria cinzenta periaquedutal dorsal: sinalização de perigo e participação no processamento cognitivo

Além de sua importância na expressão de respostas de defesa, a MCP também merece destaque na aprendizagem aversiva. Discala e colaboradores (1987) demonstraram que a estimulação elétrica da MCP dorsal (MCPd) poderia servir como estímulo incondicionado (EI) para promover o aprendizado associativo do tipo pavloviano, semelhante ao obtido com o choque elétrico nas patas. Este mesmo efeito foi demonstrado em nosso laboratório utilizando a estimulação química da MCPdl com NMDA pareada com um odor frutado de valência neutra para

roedores (acetato de amila). Neste paradigma, denominado condicionamento olfatório aversivo, os ratos demonstraram aversão, esquiva e evitação quando reexpostos ao odor em um contexto diferente da estimulação (Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012). O PMd, região com conexões recíprocas com a MCPd, também possui características aversivas que sustentam o condicionamento olfatório aversivo, já que sua estimulação também pode ser usada como EI (Pavesi, Canteras *et al.*, 2011). Além disso, a atividade da MCPdl foi fundamental para a aquisição do aprendizado aversivo olfatório induzido pela estimulação adrenérgica do núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) do hipotálamo (Pavesi, Canteras, *et al.*, 2011). A lesão dos núcleos talâmicos RE e AMv prejudicou a aquisição do condicionamento aversivo olfatório induzido pela estimulação da MCPdl, bem como o bloqueio noradrenérgico do PMd. Assim, conhecendo as projeções ascendentes da MCPd (figura 1), fica evidente que a despolarização neuronal de corpos celulares da MCPd com NMDA resulta na atividade de neurônios pós-sinápticos localizados em regiões críticas para o estabelecimento da aprendizagem aversiva. Ainda, um estudo em ratos mostrou que a inativação temporária da MCP com muscimol prejudicou a atividade neuronal na amígdala em resposta a choques na pálpebra, além de prejudicar a formação da memória de medo condicionada ao som (Johansen, Tarpley *et al.*, 2010). Isso sugere que a plasticidade neuronal na amígdala, substrato da memória associativa, seja dependente da atividade da MCP. Segundo os autores deste estudo, o circuito neural influenciado pela MCP seria essencial para a geração de um sinal instrutivo que contribuiria com a modulação da plasticidade sináptica durante o condicionamento de medo.

Adicionalmente, a MCP também parece promover alterações emocionais duradouras decorrentes de experiências aversivas. Foi demonstrado anteriormente que a interação do estado emocional negativo provocado pela estimulação da MCPdl com a evocação de uma memória de medo já estabelecida resultou em uma memória robusta e persistente (Mochny, Kincheski, *et al.*, 2013). Mesmo ocorrendo 24 h após o treino de condicionamento, a experiência aversiva induzida pela estimulação da MCPdl com NMDA foi capaz de modificar o comportamento defensivo de ratos reexpostos ao contexto condicionado, 24 h após a manipulação na MCPdl. O aumento da expressão das respostas defensivas em situações de baixa relevância emocional, como a evocação de estímulos condicionados em treinos fracos (Mochny, Kincheski, *et al.*, 2013; Giachero, Bustos, *et al.*, 2013), sugere que os circuitos neurais recrutados nesta evocação tenham sido influenciados pela ativação da MCP ocorrida no dia anterior. Estes dados sugerem efeitos duradouros da ativação da MCPdl, possibilitando a interação com nova experiência aversiva em um intervalo de 24 h.

1.2 Aprendizagem e memória

O termo aprendizagem se refere à aquisição de informações sobre o ambiente que pode resultar em alterações comportamentais relativamente persistentes. Essas informações são processadas por circuitos cerebrais que logo coordenam a execução de movimentos que compõem a resposta comportamental. Além disso, a formação de memórias decorrente da aprendizagem permite ao indivíduo melhorar o desempenho comportamental em situações futuras e/ou semelhantes (Groves, Thompson, 1970; Einchenbaum, 2008). Em psicofarmacologia

utilizam-se testes animais nos quais se avaliam as alterações comportamentais persistentes resultantes de uma experiência como indicativo de aprendizagem, conforme descrito a seguir.

Estímulos de natureza aversiva são utilizados para o estudo da aprendizagem emocional e formação de memórias aversivas. Assim, experiências emocionais significativas geram memórias robustas e persistentes, sendo mais provável de serem lembradas do que eventos neutros (Roosendaal, McEwen, *et al.*, 2009). São fenômenos altamente adaptativos, garantindo o armazenamento de informações relevantes, que permitirão identificar, antecipar e evitar possíveis estímulos que ameaçam a integridade do organismo em experiências futuras.

Um estímulo pode ser associado a pistas presentes no ambiente, a uma recompensa ou punição, ou a uma resposta comportamental, constituindo o aprendizado associativo (Einchenbaum, 2008), fenômeno extensamente estudado principalmente em paradigmas de condicionamento clássico. Um estímulo, dependendo da sua relevância, também pode promover a alteração do limiar de ativação de respostas do organismo, constituindo o aprendizado não-associativo. Entre os fenômenos não-associativos se apresentam a habituação e a sensibilização. A habituação se refere à diminuição da resposta pela apresentação repetida de um estímulo, formando-se uma memória de habituação; a sensibilização consiste na apresentação repetida de um estímulo biologicamente relevante, que resulta no aumento da vigilância, da atenção seletiva e da responsividade a estímulos novos. O processo de formação e manutenção das memórias já foi bem estudado e compreende várias etapas, que estão discutidas no apêndice A deste trabalho.

Segundo a teoria de Rescorla-Wagner, a aprendizagem é controlada por um erro de predição (incompatibilidade entre o evento real e o esperado) que codifica a diferença entre a intensidade real do estímulo e a expectativa em relação à intensidade do estímulo (McNally, Johansen *et al.*, 2011). Ou seja, a aprendizagem ocorre preferencialmente quando o perigo é inesperado. Embora atualmente pouco se sabe sobre as representações neurais do erro de predição, um estudo implicou a MCP na modulação da expectativa em relação ao estímulo aversivo (Johansen, Tarpley, *et al.*, 2010). Através do registro eletrofisiológico das respostas neuronais na amígdala, Johansen e colaboradores (2010) analisaram os disparos neuronais em resposta aos choques elétricos em uma sessão na qual os choques foram precedidos ou não por um som sinalizador. Em condições normais, observou-se que os neurônios amigdalares responderam preferencialmente ao choque não-sinalizado do que ao choque sinalizado, mostrando que estes neurônios respondem mais quando o choque não é esperado. A inativação farmacológica da MCP prejudicou a diferença na resposta de neurônios da amígdala frente ao choque sinalizado ou não-sinalizado e diminuiu as respostas neuronais aos dois tipos de choque. Estes dados levaram os autores a concluir que a MCP estaria transmitindo a informação aversiva do choque para a amígdala; e que a diferença observada na resposta ao choque sinalizado e não-sinalizado seria resultante da expectativa processada pela MCP. Importante salientar que neste experimento observou-se o prejuízo do condicionamento quando a MCP foi inativada. Desta forma, a modulação do erro de predição exercida pela MCP teria um papel fundamental na instrução aversiva necessária para a aprendizagem.

1.2.1 Substratos neurais da formação de memórias

Estudos que utilizaram o paradigma do odor de gato contribuíram para o entendimento das vias neurais envolvidas nos processos de respostas comportamentais de defesa inatas e aprendidas. O circuito neural de resposta ao predador consiste na via que conecta o sistema olfatório a estruturas do sistema nervoso central. A expressão da resposta de congelamento defensivo frente ao gato ou ao odor de gato é resultado da ativação do sistema hipotalâmico de defesa – constituído por núcleos do hipotálamo: AHN, VMH e PMd (Canteras, 2002; Canteras, Chiavegatto, *et al.*, 1997) – que recebe sinais enviados pela amígdala medial (conectada diretamente com o sistema olfatório) e tem como alvo a MCP para a expressão do comportamento (Canteras, Pavesi, *et al.*, 2015). Neste circuito, a MCP é crítica para a integração das informações sobre a ameaça, sendo a MCPd fundamental para a expressão de diferentes estratégias comportamentais de defesa. Lesões na MCPd aboliram completamente as respostas defensivas na exposição de ratos ao odor de predador (Sukikara, Mota-Ortiz *et al.*, 2010). As respostas aprendidas no paradigma do odor de gato são caracterizadas por comportamentos de congelamento, avaliação de risco e esquiva, observados no ambiente onde o animal foi exposto ao predador ou ao odor deste (Blanchard, Yang, *et al.*, 2001). A atividade do PMd é fundamental para a formação da memória contextual associada à experiência com o predador (Canteras, Kroon, *et al.*, 2008; Do-Monte, Canteras, *et al.*, 2008). Conforme mencionado anteriormente, a estimulação noradrenérgica do PMd foi capaz de sustentar o condicionamento olfatório aversivo, possibilitando a formação de memória aversiva

contextual (Pavesi, Canteras *et al.*, 2011). Assim, esta estrutura parece ser crítica para os processos mnemônicos associados à experiência aversiva.

Os dados obtidos nos estudos com o predador e as conexões anatômicas estabelecidas pelo PMd com o AMv (Canteras e Swanson, 1992) e com a MCPd (Canteras, 2002) apontaram para a importância destas regiões para a formação de memórias a partir de experiências aversivas. De fato, a inativação farmacológica do AMv bloqueou a formação da memória contextual sem prejudicar a expressão das respostas defensivas frente ao predador (De Lima, Baldo *et al.*, 2016). Além disso, no estudo de estimulação farmacológica do PMd, o bloqueio da MCPd impediu a formação da memória aversiva, sugerindo a importância da atividade desta região para o processamento mnemônico (Pavesi, Canteras *et al.*, 2011). A estimulação glutamatérgica da MCPd também foi capaz de promover a formação de memória aversiva quando associada a um odor neutro, fenômeno que foi bloqueado pela lesão iontoforética do AMv e pela inativação farmacológica do PMd (Kincheski, 2011).

O AMv é uma região cuja posição anatômica permite a influência sobre sítios hipocâmpais e amigdalares (van Groen, Kadish *et al.*, 1999; Shi e Cassell, 1999), dois componentes fundamentais nos processos de aprendizagem e memória. A amígdala está localizada no lobo temporal medial do cérebro, entre os sistemas sensoriais aferentes e eferentes que controlam as respostas comportamentais, endócrinas e autônomas decorrentes de experiências com caráter emocional (Ledoux, 2009).

Durante o condicionamento aversivo, o núcleo lateral da amígdala recebe informações dos sistemas sensoriais através de aferências talâmicas e corticais que convergem com a chegada da

informação do estímulo aversivo transmitida por vias somatossensoriais (Ledoux, 2009). O resultado dessa convergência influencia a atividade do núcleo central da amígdala, que projeta neurônios para a MCP e diferentes áreas do tronco cerebral que controlam a resposta de defesa.

É amplamente aceito que, durante a aprendizagem, alterações fisiológicas na transmissão sináptica que conduzem a alterações estruturais na rede neural são necessárias para a formação e persistência da memória (McGaugh, 2000). No contexto do condicionamento aversivo, estudos de plasticidade sináptica em modelos celulares de LTP, conduzidos em paralelo com protocolos de manipulações farmacológicas ou de lesões no complexo amigdalóide evidenciaram a importância do GLU na aquisição do aprendizado associativo e no processamento da memória aversiva (Sweatt, 2016).

O hipocampo é particularmente importante na formação de memórias aversivas contextuais, nos quais o estímulo condicionado (EC) é o contexto onde o animal recebe o choque elétrico nas patas (EI) (Phillips e Ledoux, 1992, Selden *et al.*, 1991; Fanselow, 2000). Por outro lado, não se descarta a sua importância na formação de memórias aversivas associadas a estímulos de outra natureza, como o estímulo olfatório (Kroon, 2012).

Estudos da década de 90 já mostravam a importância da amígdala e dos receptores glutamatérgicos na aquisição de memórias aversivas (Rogan, Stäubli *et al.*, 1997; Miserendino, Sananes *et al.*, 1990). O bloqueio da atividade dos receptores NMDA na amígdala basolateral (BLA, que inclui os núcleos lateral e basomedial) reduziu a resposta de congelamento em reexposições subsequentes ao EC evidenciando um prejuízo da formação da memória associativa aversiva (Rodrigues, Schafe

et al., 2001). O tráfego de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA, na amígdala lateral, também parece ter um papel importante na manutenção da memória associativa (Rumpel, LeDoux, *et al.*, 2005). O resultado da abertura dos canais destes receptores é o aumento do cálcio intracelular e a ativação subsequente de vias de sinalização. A ativação dessas vias resulta em um aumento da eficácia sináptica, inicialmente pela fosforilação de vários receptores de membrana e, em seguida, pela ativação da transcrição gênica e da síntese de proteínas (Lamprecht e Ledoux, 2004).

De maneira geral, os circuitos neurais que sustentam a aprendizagem e formação de memórias aversivas são os mesmos circuitos que sustentam a expressão do medo, através de comportamentos defensivos (Eichenbaum, 2008). Embora a amígdala seja importante tanto na expressão quanto na codificação das memórias, sendo o núcleo lateral o sítio onde as associações são estabelecidas através da plasticidade sináptica (Blair, Schafe *et al.*, 2001), esta estrutura necessita receber um sinal de instrução aversiva para que a memória seja consolidada. A estimulação da amígdala (BLA) não foi suficiente para estabelecer o condicionamento aversivo diferente do efeito observado com a estimulação da MCPd (Kim, Horovitz *et al.*, 2013). Assim, a MCP merece destaque neste contexto, uma vez que, conforme exposto anteriormente, trata-se da região que opera na modulação da expectativa fornecendo instrução aversiva para a amígdala (Johansen, Tarpley *et al.*, 2010), além de ser responsável pela integração e coordenação das respostas defensivas frente a estímulos ameaçadores, e sustentar o condicionamento aversivo atuando como EI (DiScala, Mana *et al.*, 1987; Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012; Kim, Horovitz *et al.*, 2013).

1.2.2 Memória associativa e não-associativa

A organização neuronal que sustenta o aprendizado associativo aversivo, desde a experiência, armazenamento de memórias e expressão de respostas condicionadas está bem descrita na literatura. Os maiores avanços na compreensão de como as reações a situações aversivas se organizam no cérebro têm sido feitos através de estudos utilizando o condicionamento clássico.

O condicionamento aversivo é um procedimento comportamental no qual um estímulo emocionalmente neutro (EC) pode adquirir propriedades aversivas após repetidas associações temporais com um evento biologicamente significativo (EI). Os estudos sistemáticos de Pavlov (1927) identificaram a importância de dois parâmetros no estabelecimento e manutenção do condicionamento: o EC deve preceder o EI em um intervalo curto de tempo ou co-terminar com o EI, e o EC deve prever a ocorrência do EI, de maneira consistente (Eichenbaum, 2008). Como a associação EC-EI é aprendida, respostas fisiológicas e comportamentais inatas ficam sob o controle do EI. Algumas destas respostas incluem respostas defensivas comportamentais (como o congelamento ou “*freezing*”), autonômicas (por exemplo, aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial) e endócrinas (secreção de hormônios) bem como alterações na sensibilidade à dor (analgesia). Esta forma de condicionamento é evolutivamente conservada, tendo sido relatada em moscas, vermes, caranguejos, peixes, aves, coelhos, ratos, gatos, cães, macacos e humanos (LeDoux, 2000).

O estudo da aprendizagem associativa através do paradigma do condicionamento aversivo permitiu o entendimento detalhado das fases

do processamento das memórias. De maneira geral, a formação de uma memória consiste de uma fase inicial chamada aquisição que se inicia durante a aprendizagem, quando um estímulo nocivo e inesperado é aplicado. Ao término da experiência (sessão de associação EC-EI), a fase de consolidação é iniciada e envolve uma série de eventos sinápticos e moleculares que caracterizam o armazenamento da memória (figura 30 - apêndice A). Posteriormente, uma sessão de evocação, caracterizada pela apresentação do EC, permite o acesso à memória formada, e a expressão do comportamento em resposta ao estímulo aprendido. Informações detalhadas e referências bibliográficas acerca das fases da memória são fornecidas no apêndice A deste trabalho.

A estimulação da MCP foi inicialmente utilizada como EI por DiScala e colaboradores (1987), em um estudo sistemático que se baseou no pareamento da estimulação elétrica desta região com a apresentação de um estímulo neutro (luz). Seguindo os parâmetros postulados por Pavlov, os dados obtidos nestes experimentos demonstraram que a aversão induzida pela estimulação da MCP foi suficiente para conferir caráter aversivo à luz, permitindo que este estímulo fosse capaz de evocar respostas defensivas condicionadas, caracterizando a natureza incondicionada aversiva da estimulação da MCP. Mais tarde, Kincheski e colaboradores utilizaram a estimulação glutamatérgica da MCPdl como EI para promover um condicionamento olfatório aversivo (Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012). Neste estudo, verificou-se que o NMDA na concentração de 100 pmol microinjetado na MCPdl foi capaz de conferir caráter aversivo a um odor neutro, quando os animais sob efeito da estimulação foram colocados em um ambiente impregnado com este odor. Durante esta sessão, que teve duração de 10 min, os animais apresentaram

principalmente o comportamento de congelamento. Interessante notar que a concentração mais baixa de 50 pmol também evocou comportamentos de defesa, porém em menor intensidade, mas esta concentração não foi efetiva em estabelecer o condicionamento. A concentração de 200 pmol de NMDA evocou comportamentos de defesa mais intensos, incluindo a fuga, e também não foi capaz de estabelecer o condicionamento olfatório, provavelmente por prejudicar aspectos relacionados à atenção, necessária para a codificação do estímulo.

O termo “aprendizagem não-associativa” refere-se às formas de aprendizagem em situações nas quais um comportamento já estabelecido (definido) é modificado em resposta a um estímulo na ausência de associações ou de um evento (como punição ou reforço). (Eichenbaum, 2008). A habituação e a sensibilização são consideradas as formas mais simples de aprendizagem observadas em diferentes espécies de animais, sendo as principais formas de aprendizagem não-associativa (Parrott-Sheffer e Tikkanen, 2007). Os trabalhos pioneiros de Eric Kandel investigaram as propriedades comportamentais e fisiológicas destes fenômenos na *Aplysia*, um invertebrado simples e de fácil manipulação por apresentar neurônios grandes cujos corpos celulares são de fácil identificação (Eichenbaum, 2008). Na habituação observa-se a diminuição da resposta comportamental específica quando ocorre a exposição repetida a um determinado estímulo (Groves e Thompson, 1970), mesmo que este estímulo seja percebido por receptores sensoriais (Eichenbaum, 2008). Em invertebrados, as respostas de habituação constituem uma ferramenta experimental útil para a investigação dos processos de memória (Pedreira, Dimant *et al.*, 1995; Rose e Rankin, 2006).

1.2.3 Fenômeno da sensibilização

A sensibilização é um fenômeno adaptativo que permite que diferentes espécies de animais, vertebrados ou invertebrados, possam emitir respostas mais eficientes e rápidas em eventos futuros. Permite ao indivíduo estar alerta, executar movimentos de orientação aos estímulos com mais precisão e elaborar uma estratégia comportamental refinada dirigida a estímulos nocivos ou potencialmente perigosos. Entretanto, em algumas psicopatologias, a sensibilização pode promover efeitos indesejáveis e afetar o indivíduo de maneira negativa. No transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) a sensibilização induzida por experiências negativas prévias é um fenômeno considerado por alguns autores como um fator de vulnerabilidade para o desenvolvimento da doença (Stam, 2007). Na sensibilização, uma experiência aversiva pode promover o aumento da magnitude das respostas comportamentais a uma variedade de estímulos por um período de tempo substancial (Eichenbaum, 2008). O estímulo desencadeador da sensibilização geralmente é nocivo (Eichenbaum, 2008). Segundo Groves e Thompson (1970), “Todo estímulo capaz de evocar uma resposta comportamental tem duas propriedades: eliciar uma resposta e influenciar o estado do organismo”, através da influência do estímulo nocivo em vários circuitos reflexos (Eichenbaum, 2008).

Kandel e Schwartz (1982) descreveram o mecanismo de sensibilização no molusco *Aplysia californica*, em um experimento que consistiu na aplicação de um estímulo nocivo na cauda do animal. Foi observado que a ativação de neurônios sensoriais e posterior excitação de sinapses de neurônios modulatórios liberadores de serotonina, resultou na

ativação pós-sináptica da proteína quinase A (PKA). A PKA fosforila os canais de K^+ e Ca^{+2} sustentando a despolarização e aumentando a liberação de GLU. Desta forma, o limiar de ativação destas células passou a ser menor, ou seja, diminuiu a intensidade do estímulo necessária para a ativação da transmissão glutamatérgica. Em situações de ativação prolongada, a PKA inicia a transcrição de genes que promovem o crescimento de novos terminais sinápticos, favorecendo a plasticidade sináptica (Kandel e Schwartz , 1982).

1.2.4 Sensibilização comportamental

A sensibilização comportamental já foi descrita em diferentes espécies, desde invertebrados até humanos. Alterações na magnitude da resposta comportamental foram descritas após a aplicação de estímulos nocivos (Pinsker, Hening *et al.*, 1973) ou farmacológicos (Shuster, Webster *et al.*, 1975; Davis, Svensson *et al.*, 1975). Em modelos animais de condicionamento aversivo, além das respostas de medo ao estímulo associado, também se observam respostas comportamentais e fisiológicas excessivas a estímulos não relacionados à experiência original, o que caracteriza o fenômeno da sensibilização comportamental. Diferente da generalização, onde tais respostas podem ser observadas à quaisquer estímulos não associados independente de sua natureza, na sensibilização o aumento da resposta se restringe a estímulos de característica nociva. O estresse prévio ao condicionamento aversivo promove estas alterações comportamentais e fisiológicas, além de induzir a formação de memórias robustas e duradouras (Servatius e Shors, 1994; Molina, Heyser *et al.*, 1994), conferindo a estes modelos validade preditiva ao mimetizar

sintomas observados no TEPT (para revisão, ver Stam, 2007). A sensibilização atua então como mecanismo de interação das experiências aversivas, em um processo do tipo não-associativo. É importante salientar que a resposta aumentada, resultante do processo de sensibilização, somente é observada frente a estímulos nocivos. Existem casos nos quais observa-se a expressão de respostas de defesa a estímulos neutros, sem nenhuma característica aversiva, em indivíduos previamente expostos a situações estressantes; nestes casos, trata-se do fenômeno da generalização já que o estímulo que desencadeia a resposta não é nocivo por natureza.

1.2.5 Interação entre experiências aversivas

Estudos na década de 50 já colocaram em discussão o papel do estresse na sensibilização de vários sistemas fisiológicos. Em humanos, a sensação de medo sensibilizada, manifestada na forma de ansiedade generalizada é uma característica do TEPT (Pitman, 1997). A tabela 1 apresenta alguns trabalhos sobre a influência do estresse em alterações comportamentais de caráter emocional, importantes para o presente estudo.

Na faixa adaptativa, as alterações biológicas decorrentes de eventos emocionais têm efeito sobre experiências futuras, garantindo o armazenamento de informações relevantes que permitirão identificar, antecipar e evitar possíveis estímulos que ameaçam a integridade do organismo. No entanto, o processamento eficiente de experiências emocionais negativas pode tornar-se inadequado; o estresse severo muitas vezes torna-se uma fonte de transtornos afetivos, tais como ansiedade,

fobias, depressão e TEPT. Neste contexto, foi demonstrado que a exposição a experiências aversivas antes de testes de emocionalidade ou protocolos de avaliação de formação de memórias associativas aversivas resultou no aumento da magnitude da resposta defensiva, aumento que persistiu por um período substancial após as manipulações iniciais (Stam, 2007). Este resultado foi evidenciado com vários procedimentos aversivos como, por exemplo, sessões longas de choques elétricos inescapáveis, de estresse por contenção, de confronto com animais (exposição ao predador, ao odor de predador ou ainda a um agressor co-específico) ou a combinação de vários destes estressores individuais. Além disso, a estimulação glutamatérgica da MCPd, com NMDA na concentração de 100pmol, foi capaz de promover alterações emocionais que resultaram no aumento do comportamento defensivo na reexposição ao EC, de uma memória previamente estabelecida (Mochny, Kincheski *et al.*, 2013). Os dados obtidos evidenciaram, pela primeira vez, que a estimulação da MCPd, mesmo realizada isoladamente (separada de outros estímulos), foi capaz de interferir com outro paradigma experimental: o condicionamento contextual aversivo. Além de modificar a resposta comportamental a um estímulo (contexto) associado ao choque aplicado em uma sessão prévia (24 h antes), resultou na potencialização da formação da memória, já que as alterações comportamentais foram observadas uma semana após os eventos aversivos, confirmando que não se tratou apenas de um efeito transitório, mas sim de alterações persistentes que resultaram no aumento da magnitude da expressão comportamental. Resultados semelhantes foram observados em um protocolo experimental similar, no qual o estresse por restrição foi a experiência aversiva aplicada entre o condicionamento contextual fraco e

o teste de evocação, também em intervalos de 24 h (Giachero, Bustos *et al.*, 2013). Dados obtidos recentemente em nosso laboratório mostraram que, no desenho experimental de Giachero e cols., o efeito promotor do estresse sobre a evocação do traço de memória foi bloqueado pela inativação farmacológica da MCPd, antes do estresse, sugerindo que o processamento de informações decorrentes da experiência aversiva promovida pela restrição seja dependente da atividade da MCPd (Giachero e Carobrez, dados não publicados).

Muitos trabalhos têm como objetivo avaliar o efeito das consequências de uma experiência prévia sobre o processamento de uma memória aversiva associativa, por mimetizar aspectos comportamentais importantes do TEPT (aumento de comportamentos tipo-ansioso, hipervigilância, resistência à extinção). Assim, uma facilitação da formação de uma memória aversiva foi demonstrada em ratos submetidos a uma sessão de estresse por contenção 24 h antes de um protocolo de condicionamento contextual (Rodríguez-Manzanares, Isoardi *et al.*, 2005). Outros resultados demonstraram que uma única experiência de contenção provocou uma hiperexcitabilidade neuronal na BLA, que resultou da redução da inibição GABAérgica (Isoardi, Martijena *et al.*, 2004). Este ponto de vista foi confirmado por evidência farmacológica, já que a infusão de midazolam (MDZ) intra-BLA, um modulador positivo do receptor GABA-A, impediu o aumento das reações emocionais exibidas pelos animais estressados (Rodríguez-Manzanares, Isoardi *et al.*, 2005; Bignante, Paglini *et al.*, 2010).

A facilitação do condicionamento contextual também foi observada quando ratos de laboratório foram previamente expostos a um protocolo de 15 choques nas patas, realizado em um contexto diferente

(Rau, DeCola *et al.*, 2005). Demonstrou-se que os efeitos comportamentais observados neste modelo são persistentes (Rau e Fanselow, 2009) e que a sessão de 15 choques promove comportamento tipo-ansioso (redução na locomoção) no campo aberto, sobressalto exagerado a um estímulo sonoro e fenótipo tipo-depressivo no teste do nado forçado, avaliados 24 h após a aplicação dos choques (Perusini, Meyer *et al.*, 2016). A administração intra-BLA de muscimol 20 min antes do estressor prévio bloqueou a sensibilização induzida pelos 15 choques, mas este efeito não foi observado quando o muscimol foi injetado após a sessão de 15 choques, sugerindo que a atividade da amígdala é fundamental para o processamento da aversão induzida pelo estresse (Perusini, Meyer *et al.*, 2016).

Tabela 1. Estudos acerca dos efeitos da experiência aversiva prévia sobre diferentes paradigmas de emocionalidade.

Estresse prévio	Modelo	Efeito	Referência
Choque na cauda de ratos em tubos de contenção	Condicionamento auditivo aversivo	↑ sobressalto e ↑ respostas condicionadas	Servatius e Shors, 1994
1 semana de estresse crônico variável ou 1 semana morfina i.p./dia	Nado forçado	↑ imobilidade	Molina, Heyser <i>et al.</i> , 1994
Exposição ao gato	LCE - 7 dias após	↓ tempo nos braços abertos ↑ avaliação de risco	Adamec, Burton <i>et al.</i> , 1999b
Estresse por contenção	Condicionamento contextual aversivo	↑ congelamento	Rodriguez-Manzanares, Isoardi <i>et al.</i> , 2005; Maldonado, Martijena, <i>et al.</i> , 2011.
Exposição ao predador	LCE Condicionamento contextual aversivo	↓ tempo nos braços abertos Resistência à extinção	Goswami, Cascardi <i>et al</i> 2010
Estresse por contenção	LCE	↑ comportamento tipo-ansioso ↓ fluxo de cloreto no córtex	Martijena, Calvo <i>et al</i> 1997
Estresse por contenção	Condicionamento contextual aversivo	↑ congelamento ↑ BDNF e espinhas dendríticas no hipocampo	Giachero, Bustos <i>et al</i> 2013
Derrota social ou corticosterona i.p.	LCE	↑ comportamento tipo-ansioso ↑ c-FOS no hipocampo e septo lateral	Calfa, Volosin <i>et al.</i> , 2006
Estimulação da MCPd com NMDA	Condicionamento contextual aversivo	↑ congelamento na evocação do contexto	Mochny, Kincheski <i>et al.</i> , 2013

Os dados apresentados apontam para o envolvimento da amígdala no efeito promotor da experiência aversiva prévia sobre o condicionamento contextual. Entretanto, conforme discutido anteriormente, a amígdala é uma estrutura que necessita de um sinal de instrução aversiva para que os estímulos aversivos sejam codificados. Desta forma, a MCP deve ter participação no processamento da experiência prévia, provavelmente fornecendo a instrução aversiva (conforme sugerido por Johansen, Tarpley, *et al.*, 2010) necessária para influenciar experiências futuras.

De fato, evidências apontam para a importância da ativação da MCP durante a experiência prévia no efeito promotor do estresse prévio sobre experiências aversivas. Estudos que utilizaram a exposição do rato ao gato, que promove a expressão da proteína c-FOS na MCP (Canteras e Goto, 1999; Dielenberg, Hunt, *et al.*, 2001), demonstraram que esta experiência promoveu: 1) aumento do potencial evocado por neurônios de projeção da amígdala central para a MCP lateral, relacionado com o aumento de comportamentos tipo-ansioso e a facilitação da LTP nesta via – alterações persistentes por até 12 dias (Adamec, Blundell *et al.*, 2003); 2) aumento de pCREB na MCP (porções dorsal, lateral e ventral) (Blundell e Adamec, 2006); e 3) comportamento do tipo “ansiedade extrema” em ratos da linhagem Lewis, associado a um congelamento exagerado na extinção do comportamento de defesa associado ao contexto condicionado (Goswami, Cascardi *et al.*, 2010).

Desta maneira, a ativação da MCP parece ter relação com os efeitos tardios sobre os comportamentos defensivos observados em manipulações realizadas posteriormente. Adicionalmente aos efeitos imediatos da estimulação da MCPd, foi observada a supressão das

vocalizações ultrassônicas na frequência de 50Hz, emitidas por ratos submetidos à estimulação elétrica repetida desta região. Considerada uma medida afetiva positiva, a supressão destas vocalizações ocorreu até 18 dias após as estimulações, avaliadas na caixa-moradia dos animais, e relacionadas com a diminuição na exploração do campo aberto e diminuição no consumo de sacarose. Este conjunto de dados sugere um efeito aversivo duradouro nos animais que receberam a estimulação da MCPd (Wright e Panksepp, 2011). Este efeito pode ser resultante de alterações estruturais e/ou neuroquímicas induzidas pela ativação da MCP, que seriam integradas a novas experiências de natureza aversiva. Portanto, além de induzir a plasticidade sináptica necessária para a formação de associações seguindo os preceitos temporais do condicionamento aversivo clássico (Maren, 2001), é possível que alterações resultantes da estimulação da MCP possam promover a sensibilização e serem associadas a novos estímulos, em experiências aversivas separadas no tempo, influenciando inclusive novas associações aversivas.

1.3 Justificativa

As evidências da literatura apresentadas sugerem que experiências aversivas prévias podem modificar a expressão e o processamento de novas experiências de natureza aversiva, mesmo que os estímulos sejam completamente diferentes e dissociados no tempo. Os substratos neurais desta interação ainda são desconhecidos, embora alguns estudos tenham apontado o envolvimento da amígdala no efeito promotor da experiência prévia. A atividade da MCPd é crítica para o comportamento defensivo em situações de ameaça ao organismo, além de

ser fundamental para a formação das memórias relacionadas a estes eventos (Kincheski, Mota-Ortiz SR *et al.*, 2012; Pavesi, Canteras *et al.*, 2011) e influenciar o processamento do traço de memória previamente estabelecido (Mochny, Kincheski *et al.*, 2013). Assim, considerando a importância da MCPd na expressão do medo e no seu papel como EI no estabelecimento de um condicionamento aversivo, o presente trabalho testou a hipótese de que a estimulação da MCPd poderia modificar um condicionamento contextual aversivo, como se fosse uma experiência estressante prévia.

1.4 Hipótese

A estimulação glutamatérgica da MCPd facilita a aquisição do condicionamento contextual aversivo, facilitando a formação da memória aversiva contextual.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre o condicionamento contextual aversivo realizado 24 h após a injeção de NMDA intra-MCPd. Verificar a expressão da resposta defensiva de ratos submetidos à estimulação da MCPd durante as diferentes etapas do condicionamento contextual aversivo.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito facilitatório da estimulação química da MCPd sobre o congelamento durante as fases do condicionamento aversivo contextual.
- Avaliar o efeito do choque nas patas sobre os efeitos comportamentais induzidos pela estimulação química da MCPd durante as fases do condicionamento aversivo contextual.
- Verificar o efeito do contexto novo na manutenção da memória aversiva contextual.
- Verificar o efeito da ausência de evocação sobre a persistência da memória aversiva contextual.
- Verificar o efeito da evocação no contexto novo 48 horas após o choque sobre a manutenção da memória aversiva contextual.
- Avaliar o efeito da evocação no contexto novo 7 dias após o choque sobre a manutenção da memória aversiva contextual.
- Avaliar o efeito da evocação no contexto associado à estimulação da MCPd sobre a manutenção da memória aversiva contextual associada ao choque.
- Avaliar o efeito do odor associado à estimulação da MCPd sobre a manutenção da memória aversiva contextual associada ao choque, apresentado no contexto da estimulação.
- Avaliar o efeito do odor associado à estimulação da MCPd sobre a manutenção da memória aversiva contextual associada ao choque, apresentado no contexto novo.

- Verificar o efeito da cicloheximida sobre a facilitação do condicionamento aversivo contextual induzida pela estimulação química da MCPd.
- Verificar o efeito da cicloheximida sobre a evocação da memória aversiva contextual.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos machos, da linhagem *Wistar*, com 3-4 meses de idade pesando entre 280g e 340g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (50 x 30 x 15 cm) em grupos de três ou quatro, com livre acesso a água e alimento e aclimatizados com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) sob ciclo de luz claro/escuro de 12 h (período claro das 7 às 19 h), no biotério do Laboratório de Neurobiologia Comportamental (LNC) por uma semana antes do início dos experimentos. Os procedimentos experimentais utilizados no presente trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (042/CEUAPROPESC/2013, projeto de pesquisa PP0849/2013) e estão de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em conformidade com a Lei Arouca (11.794/2008).

2.1.1 Ações de refinamento experimental

Com o objetivo de reduzir o estresse em decorrência da manipulação dos animais, algumas ações foram adotadas na rotina dos experimentos:

- Os animais foram retirados de suas caixas-moradia pela cauda em movimentos delicados.

- As injeções (intra-cerebrais ou intra-peritoneais) foram realizadas com o auxílio de uma flanela que cobriu o corpo e os olhos dos animais.

- O procedimento cirúrgico incluiu o uso de anestésico local, aplicação de salina fisiológica nos olhos para evitar o ressecamento, uso de uma flanela para aquecer o corpo durante a cirurgia e aplicação de analgésico, anti-inflamatório e antibiótico para melhor recuperação pós-cirúrgica.

- Os animais foram observados diariamente durante toda sua estadia no biotério do LNC. Quando foi constatada presença de lesões na região da cirurgia e/ou sinais de sofrimento, o animal foi retirado para eutanásia para preservar o bem estar dos demais animais da colônia.

2.2 Cirurgia estereotáxica

Uma semana antes do início dos experimentos, os ratos foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas-guias direcionadas para a porção dorsal da MCP (unilateral, do lado esquerdo). As cânulas foram confeccionadas em nosso laboratório a partir de agulhas hipodérmicas (25 x 7mm, BD Precision Glide[®], Brasil) e o tamanho foi ajustado para 10 mm com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, Brasil).

Cada rato foi anestesiado com uma injeção intraperitoneal (IP) de uma solução de xilazina (10 mg/ml/kg, Xilazin[®], cloridrato de xilazina

2%, Syntec, Brasil) e quetamina (100 mg/ml/kg, Cetamin[®], cloridrato de cetamina 10%, Syntec Brasil). Depois de confirmada a perda total dos reflexos, o animal foi fixado em um aparelho estereotáxico (Stoelting Co., EUA); um pedaço de algodão embebido em salina fisiológica foi colocado sobre os olhos para prevenir o ressecamento e realizou-se a tricotomia na região superior da cabeça. Após assepsia desta área com álcool 70%, uma solução de lidocaína (3%) com adrenalina (1:50.000, Dentsply Pharmaceutical, Brasil) foi injetada por via subcutânea. Devido ao efeito vasoconstritor e anestésico local, a formação de uma pápula ovalada auxiliou a retirada da pele no local. Em seguida, o periósteo foi removido com o objetivo de expor a calota craniana, permitindo a visualização das suturas lambdoide, sagital e coronária e o alinhamento do *Bregma* e do *Lambda* no plano horizontal. Com o auxílio de uma broca odontológica, a calota craniana foi perfurada para a fixação de um parafuso de aço inoxidável no osso frontal e de uma cânula guia de 10 mm direcionada para a MCPd, cujas coordenadas para implantação (anteroposterior (AP) = -7,6 mm em relação ao Bregma, médio-lateral (ML) = +1,9 mm e dorsoventral (DV) = -2 mm a partir da superfície externa do osso craniano em um ângulo de 22°) foram obtidas do atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1998). Um mandril n° 26 foi inserido na cânula para prevenir a sua obstrução. Uma vez adaptados o parafuso e a cânula, a superfície craniana foi seca e a área aberta foi preenchida com acrílico auto-polimerizável que, decorridos alguns minutos para secagem, fixou todas as peças formando uma prótese sólida. Os animais foram então retirados do estereotáxico e receberam a administração por via subcutânea de uma solução de flunixin meglumina (Banamine[®] 2.5 mg/kg; Schering-Plough, Brasil), um fármaco com

propriedades anti-inflamatória, analgésica e antipirética, e por via intramuscular uma associação de antibióticos (benzilpenicilina e esptreptomicina, Pentabiótico®, 1.0ml/kg; Fort Dodge, Brasil) para prevenir infecções e garantir a boa recuperação dos animais após as cirurgias.

Ao término das cirurgias, os ratos foram mantidos em uma sala aquecida até o desaparecimento completo dos efeitos da anestesia geral. Em seguida, os ratos retornaram ao biotério do LNC para suas caixas moradia com livre acesso à água e alimento, onde permaneceram em recuperação por sete dias antes do início da fase experimental.

Os animais cujos implantes ocasionaram lesões na região da cabeça foram excluídos dos experimentos.

2.3 Drogas e soluções

A estimulação química dos neurônios da porção dorsal da MCP foi realizada através da infusão de NMDA ($\geq 98\%$ por TLC, $PM=147,13/mol$; Sigma Aldrich, E.U.A.). A droga foi dissolvida em uma solução 0,1M de salina tampão fosfato (*phosphate-buffered saline*, PBS; pH 7,4). O PBS livre de droga foi utilizado como veículo nos grupos controle.

As concentrações do NMDA (50, 100 e 200 pmol) foram selecionadas com base em publicações anteriores do LNC (Moraes, Bertoglio *et al.*, 2008; Kincheski *et al.*, 2012). O volume injetado foi de 0,2 μl /rato e, segundo Bandler e Carrive (1988), este volume de AAE se espalha por no máximo 1mm.

- Acetato de amila (Aldrich Chemical, EUA), substância sintética volátil com odor característico de banana, na concentração 5% em propilenoglicol, foi utilizada como estímulo olfatório. A escolha desta substância foi baseada em trabalhos anteriores do nosso laboratório (Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012; Pavesi, Canteras *et al.*, 2011, Souza, Dal Bó *et al.*, 2014).

- Cicloheximida (cicloheximida de fonte microbiana $\geq 94\%$ por TLC, Sigma Aldrich, E.U.A.). A cicloheximida (CHX) é um antibiótico que inibe a síntese de proteínas por interferência no processo de translação, com duração de efeito limitada até 24 h (Williams, Guevremont *et al.*, 2007). Esta substância foi selecionada para este estudo com o objetivo de avaliar a importância da síntese proteica em algumas etapas do protocolo experimental proposto. A dose de 1mg/kg e o volume injetado (1ml/kg) pela via intraperitoneal foi selecionada a partir de trabalho da literatura (Briggs e Olson, 2013).

2.4 Aparatos experimentais

Três caixas de materiais e dimensões diferentes foram utilizadas no presente estudo: uma caixa de condicionamento, uma caixa de vidro coberta por uma grade metálica e uma caixa plástica. Durante os experimentos, as caixas foram acomodadas em uma sala com som atenuado e com nível de iluminação na intensidade de 80 lux, dentro de uma capela acoplada a um exaustor de ar. As caixas foram higienizadas com toalhas de papel embebidas em uma solução de etanol 10 % (v/v) antes e depois da passagem de cada animal.

A caixa de condicionamento (figura 4) foi designada como contexto A (50 x 35 x 26 cm) e consiste de paredes de aço inoxidável (laterais e fundo) e acrílico transparente (parede frontal e tampa), e um piso gradeado, com barras metálicas espaçadas 0,5 cm entre si conectadas a um gerador de choque (Insight[®], Ribeirão Preto, SP, Brasil) que, quando necessário, possibilitou a emissão de choques elétricos na intensidade e tempo de disparos programados.



Figura 4. Caixa de condicionamento (contexto A).

Uma caixa de vidro (28 x 28 x 28cm), coberta com uma grade metálica, designada como contexto B (figura 5), foi utilizada para colocar os animais imediatamente após a injeção na MCPd.



Figura 5. Caixa de vidro (contexto B).

O terceiro contexto (figura 6), uma caixa confeccionada em Plexiglas[®] preto (40 x 26 x 36cm) foi designada como contexto C.



Figura 6. Caixa de acrílico Plexiglas[®] preto (contexto C).

2.5 Procedimentos experimentais

Todos os experimentos foram realizados durante a fase diurna, entre 8 e 14 h. Antes do início dos experimentos, os animais foram colocados em uma sala de ambientação por 30 min. O transporte individual dos animais para a sala de experimentos foi feito em uma caixa plástica pequena contendo um pouco de maravalha. Cada sessão foi filmada por uma vídeo-câmera, instalada na sala de experimentos e conectada a um computador para gravação das sessões, localizado em uma sala adjacente. A aleatorização foi feita em todas as sessões, por sorteio da sequência de animais a ser submetido a cada sessão individual.

2.5.1 Testes comportamentais

A medida de comportamento defensivo utilizada no presente trabalho foi o tempo de congelamento (*freezing*). O congelamento é caracterizado pela imobilidade total do animal, onde se observa ausência de movimentos do corpo, da cabeça e das vibrissas, exceto daqueles movimentos necessários para a respiração (Blanchard e Blanchard, 1969). O tempo total gasto no comportamento de congelamento em cada sessão foi quantificado em segundos e expresso como porcentagem do tempo total da sessão. O comportamento de congelamento foi a reação defensiva cuja expressão foi mais robusta e consistente observada em todos os grupos que receberam a infusão de NMDA; por este motivo foi escolhido como o índice comportamental de avaliação da resposta defensiva neste trabalho.

2.5.2 Injeção cerebral: estimulação da MCPd

Os ratos foram aleatoriamente retirados de suas caixas-moradia para a infusão de droga (NMDA) ou veículo (PBS) intra-MCPd. Cada rato foi levado individualmente para a sala de experimentos, e com o auxílio de uma flanela com um orifício, todo o corpo foi coberto deixando apenas a região do implante craniano exposta para a injeção. O mandril foi cuidadosamente retirado com o auxílio de um alicate, e inseriu-se uma lima para desobstrução completa da cânula. A agulha injetora (diâmetro externo = 0,3 mm) foi confeccionada no tamanho de 13,2 mm, sendo que quando introduzida na cânula-guia (10 mm) estendeu-se 3,2 mm abaixo do final da cânula, atingindo a porção dorsal da MCP. Um tubo de polietileno (PE10; Clay Adams, USA) foi utilizado para conectar a parte superior da agulha a uma microseringa (5 μ l; Hamilton[®]) e uma bolha de ar formada dentro deste tubo foi utilizada para monitorar a vazão da droga. A injeção intracerebral da droga ou veículo (volume = 0,2 μ l) foi realizada com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight[®], Ribeirão Preto, SP, Brasil) na razão de 0,6 μ l/min. Para maximizar a difusão e evitar possível refluxo da droga, a agulha só foi removida da cânula 20 s após o final da infusão da droga. Ao final deste procedimento, o rato foi colocado no contexto B e mantido nesta caixa por 10 min, período no qual o tempo de congelamento foi mensurado. Ao término desta sessão, o rato foi devolvido ao biotério.

2.5.3 Condicionamento aversivo contextual fraco (CACF)

Se a associação entre o EI e o estímulo neutro (EN) não acontecer em magnitude suficiente para que o EC passe a evocar respostas defensivas,

é possível que o condicionamento não tenha sido eficiente em conferir um caráter emocional relevante ao estímulo inicialmente neutro. O resultado desta associação pode ser um traço de memória que poderia ser potencializado por eventos traumáticos, prévios ou posteriores. Dados anteriores obtidos no LNC mostraram que 5 choques de leve intensidade são necessários para promover um condicionamento olfatório de medo (Kroon e Carobrez, 2009). Em um trabalho anterior, um traço de memória aversiva contextual foi obtido em um protocolo de 3 choques de baixa intensidade, permitindo a potencialização do congelamento expresso na evocação, consequência da estimulação da MCP dorsolateral (Mochny, Kincheski *et al.*, 2013). No presente estudo, o protocolo de CACF adotado foi de 1 choque elétrico nas patas de intensidade 0,4 mA e duração de 3 s, baseado em outros estudos do laboratório que definiram estes parâmetros após um estudo de padronização. Os animais foram colocados na caixa de condicionamento e durante 3 min exploraram livremente o aparato (período pré-choque). Ao final dos 3 min foi aplicado o choque e, em seguida, os animais foram mantidos por mais 50 s (período pós-choque) nesta caixa para avaliação do comportamento de congelamento.

2.5.4 Sessões de teste

As sessões de teste foram realizadas no contexto A, B ou C, dependendo do protocolo experimental empregado. Os ratos foram colocados no contexto selecionado por 3 min e o tempo de congelamento foi quantificado. Esta sessão foi realizada 24 h ou 7 dias após a sessão de CACF, dependendo da etapa experimental.

2.5.5. Sessões com estímulo olfatório

Nos experimentos em que o estímulo olfatório foi utilizado, 50 μ l da solução de acetato de amila foi aplicado em um papel de filtro (0,5 x 3 cm) com o auxílio de uma micropipeta, e este papel foi posicionado dentro de um frasco de vidro (altura=5cm, diâmetro=2,5cm) fixado na parede do contexto B (sessão de estimulação da MCPd) ou C (sessão de teste). Um exaustor foi ligado nos intervalos entre um rato e outro para evitar o acúmulo de odor na sala.

2.6 Análise histológica

O sítio de injeção atingido pelas drogas injetadas na MCPd durante os experimentos foi confirmado ao final de todos os experimentos através da análise histológica dos encéfalos. Após os testes comportamentais, todos os ratos foram profundamente anestesiados com isoflurano (solução inalatória de isoflurano 100%, 1ml por rato, Vetflurano®, Virbac, Brasil) até que se constatou a parada cardíaca. Em seguida, procedeu-se a eutanásia por deslocamento cervical. Para marcação do sítio de injeção, cada rato recebeu a injeção de 0,2 μ l de corante Azul de Evans 3% (Evans Blue, Sigma Aldrich, E.U.A.), utilizando a mesma agulha e cânula do experimento comportamental. Os encéfalos foram então removidos e colocados em frascos contendo solução formaldeído 10% em água, onde ficaram imersos por no mínimo 48 h, e posteriormente transferidos para uma solução de sacarose 30% em água e mantidos em geladeira por no mínimo 24 h antes de serem processados. Cortes histológicos de 50 μ m de espessura foram obtidos com o auxílio de um criostato (- 22°C, CM1850; Leica, Alemanha) e dispostos em lâminas de vidro previamente

gelatinizadas. Posteriormente, os cortes foram submetidos à coloração de Giemsa permitindo a confirmação do sítio de injeção com o auxílio de um estereoscópio e do atlas do cérebro de ratos Paxinos e Watson (1998).

2.7 Análise estatística

Os dados comportamentais coletados foram submetidos primeiramente ao teste de normalidade Kolmogorov Smirnov. Uma vez confirmado que os dados respeitavam uma distribuição normal, foi realizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, considerando como fatores o tratamento (injeção na MCPd) e a sessão. Os resultados foram expressos pela média + erro padrão da média (EPM) e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. A ANOVA para medidas repetidas foi utilizada para comparação dos dados e detecção de diferenças significativas. Quando a ANOVA detectou diferenças significativas, comparações *post-hoc* usando teste de Tukey para amostras desiguais foram utilizadas, considerando o rigor deste teste para a análise do comportamento exibido pelos animais em diferentes etapas do protocolo experimental.

3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Experimento 1. Efeito facilitatório da estimulação química da MCPd sobre o congelamento durante as fases do condicionamento aversivo contextual.

No primeiro dia, os animais foram aleatoriamente selecionados para receber a infusão de NMDA nas concentrações de 50 pmol, 100 pmol ou 200 pmol, ou veículo (PBS). Após a injeção cerebral, cada rato foi colocado no contexto B, durante 10 min para quantificação do tempo gasto na postura de congelamento.

No dia seguinte, todos os ratos foram submetidos ao CACF descrito anteriormente (aplicação do choque elétrico nas patas no contexto A).

No terceiro dia, procedeu-se o teste 1 no contexto A. No décimo dia, foi realizado o teste 2 no contexto A. O grupo que recebeu a infusão de PBS intra-MCPd serviu como controle. A figura 7 apresenta o desenho experimental de forma esquematizada.

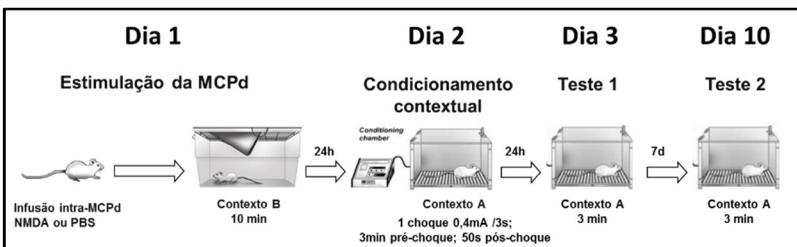


Figura 7. Protocolo do experimento 1.

Experimento 2. Efeito do choque sobre as alterações comportamentais induzidas pela estimulação da MCPd.

Este experimento foi realizado com o objetivo de controlar os efeitos do choque sobre as alterações comportamentais induzidas pela estimulação da MCPd. Para isto, dois grupos adicionais foram conduzidos: um grupo microinjetado com NMDA 100 pmol e um grupo microinjetado com PBS no dia 1, foram expostos à caixa de condicionamento – contexto A, no dia 2 – durante 3 min e 50 s e não recebeu nenhum choque elétrico nas patas (figura 8).

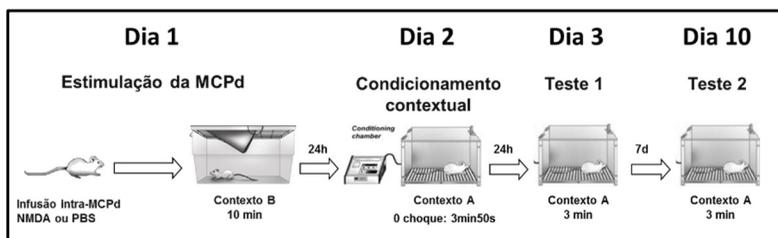


Figura 8. Protocolo do experimento 2.

Experimento 3. Efeito do contexto novo na manutenção da memória aversiva contextual.

No primeiro dia, os animais foram aleatoriamente selecionados para receber a infusão de NMDA na concentração de 100 pmol ou veículo (PBS).

No dia seguinte, todos os ratos foram submetidos ao CACF.

No terceiro dia, procedeu-se o teste 1 no contexto C. O objetivo deste experimento foi verificar se a expressão da memória aversiva contextual observada no décimo dia depende da reexposição ao contexto

associado ao choque no terceiro dia. No décimo dia, foi realizado o teste 2 no contexto A. O grupo que recebeu a infusão de PBS intra-MCPd serviu como controle. A figura 9 apresenta o desenho experimental de forma esquematizada.

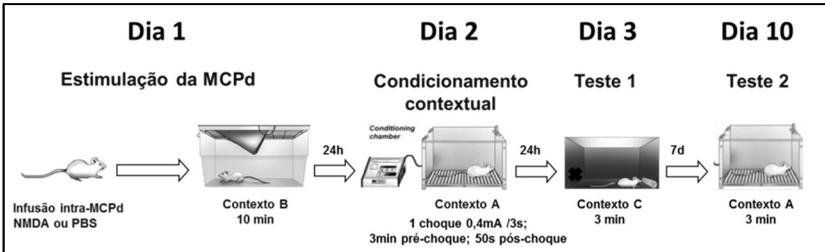


Figura 9. Protocolo do experimento 3.

Experimento 4. Efeito da ausência de evocação sobre a persistência da memória aversiva contextual.

Neste experimento foi avaliado se a expressão do congelamento observada no teste 2 (décimo dia) é dependente da experiência contextual que ocorre no dia 3, ou seja, 24 h após o choque.

No primeiro dia, os animais foram aleatoriamente selecionados para receber a infusão de NMDA na concentração de 100 pmol ou veículo (PBS).

No dia seguinte, todos os ratos foram submetidos ao CACF descrito anteriormente.

Sete dias após o CACF, foi realizado o teste 2 no contexto A. O grupo que recebeu a infusão de PBS intra-MCPd serviu como controle. A figura 10 apresenta o desenho experimental de forma esquematizada.

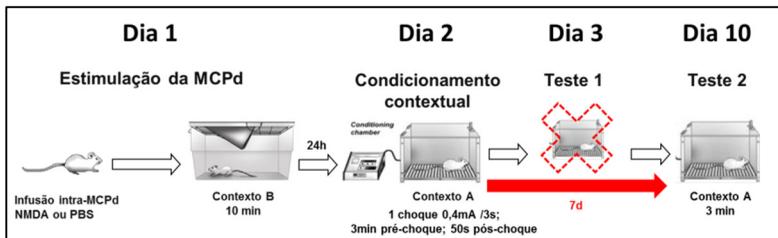


Figura 10. Protocolo do experimento 4.

Experimento 5. Efeito da evocação no contexto novo 48 horas após o choque sobre a manutenção da memória aversiva contextual.

Este experimento avaliou a relação temporal entre a exposição ao contexto C e a persistência da resposta comportamental no contexto A.

No primeiro dia, os animais foram aleatoriamente selecionados para receber a infusão de NMDA na concentração de 100 pmol ou veículo (PBS).

No dia seguinte, todos os ratos foram submetidos ao CACF.

Quarenta e oito horas após o CACF, procedeu-se o teste 1 no contexto C. Seis dias após esta sessão no contexto C, foi realizado o teste 2 no contexto A. O grupo que recebeu a infusão de PBS intra-MCPd serviu como controle. A figura 11 apresenta o desenho experimental de forma esquematizada.

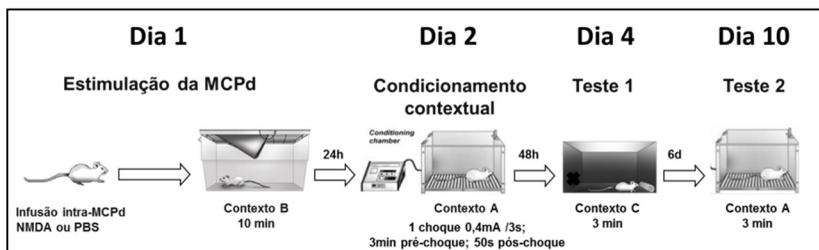


Figura 11. Protocolo do experimento 5.

Experimento 6. Efeito da evocação no contexto novo 7 dias após o choque sobre a manutenção da memória aversiva contextual.

Este experimento avaliou a relação temporal entre a exposição ao contexto C e a persistência da resposta comportamental no contexto A, em um intervalo maior de tempo.

No primeiro dia, os animais foram aleatoriamente selecionados para receber a infusão de NMDA na concentração de 100 pmol ou veículo (PBS).

No dia seguinte, todos os ratos foram submetidos ao CACF.

Sete dias após o CACF, procedeu-se o teste 1 no contexto C. Vinte e quatro horas após esta sessão no contexto C, foi realizado o teste 2 no contexto A. O grupo que recebeu a infusão de PBS intra-MCPd serviu como controle. A figura 12 apresenta o desenho experimental de forma esquematizada.

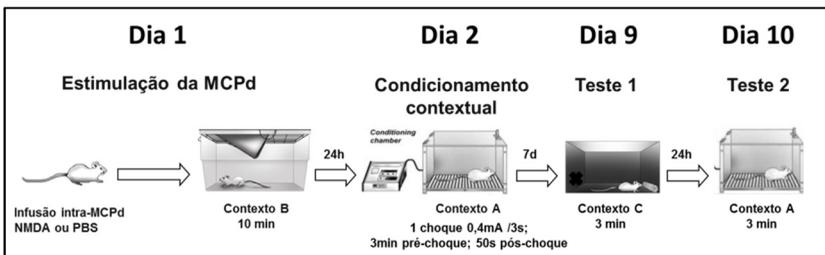


Figura 12. Protocolo do experimento 6.

Experimento 7. Efeito da evocação no contexto associado à estimulação da MCPd sobre a manutenção da memória aversiva contextual associada ao choque.

Neste experimento foi avaliado se reexposição ao contexto da sessão de estimulação da MCPd com NMDA poderia interferir com a manutenção da memória aversiva contextual formada em associação com o choque.

No primeiro dia, os animais foram aleatoriamente selecionados para receber a infusão de NMDA na concentração de 100 pmol ou veículo (PBS).

No dia seguinte, todos os ratos foram submetidos ao CACF.

No terceiro dia, procedeu-se o teste 1 no contexto B.

No décimo dia, foi realizado o teste 2 no contexto A. O grupo que recebeu a infusão de PBS intra-MCPd serviu como controle. A figura 13 apresenta o desenho experimental de forma esquematizada.

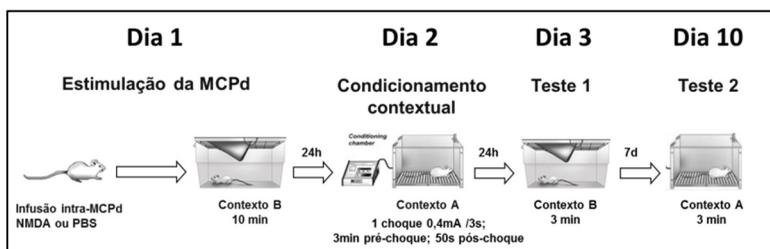


Figura 13. Protocolo do experimento 7.

Experimento 8. Efeito do odor associado à estimulação da MCPd sobre a manutenção da memória aversiva contextual associada ao choque, apresentado no contexto da estimulação.

Um odor neutro quando associado à experiência induzida pela estimulação da MCPd com NMDA adquire propriedades aversivas, sendo capaz de evocar respostas de defesa (Kincheski *et al.*, 2012).

Neste experimento foi avaliado se reexposição ao odor condicionado na sessão de estimulação da MCPd com NMDA poderia interferir com a manutenção da memória aversiva contextual formada em associação com o choque.

No primeiro dia, os animais foram aleatoriamente selecionados para receber a infusão de NMDA na concentração de 100 pmol ou veículo (PBS). Após a injeção cerebral, cada rato foi colocado no contexto B, impregnado com odor de acetato de amila, para quantificação do tempo gasto na postura de congelamento.

No dia seguinte, todos os ratos foram submetidos ao CACF.

No terceiro dia, procedeu-se o teste 1 no contexto B, na presença do estímulo olfatório (acetato de amila).

No décimo dia, foi realizado o teste 2 no contexto A, na ausência de odor. O grupo que recebeu a infusão de PBS intra-MCPd serviu como controle. A figura 14 apresenta o desenho experimental de forma esquematizada.

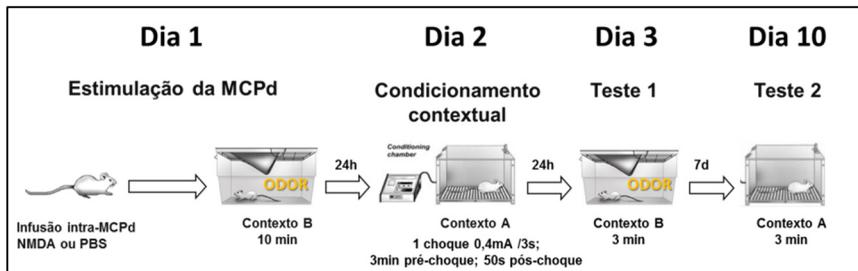


Figura 14. Protocolo do experimento 8.

Experimento 9. Efeito do odor associado à estimulação da MCPd sobre a manutenção da memória aversiva contextual associada ao choque, apresentado no contexto novo.

Este experimento testou o efeito do odor pareado com a estimulação da MCPd na evocação no contexto C.

No primeiro dia, os animais foram aleatoriamente selecionados para receber a infusão de NMDA na concentração de 100 pmol ou veículo (PBS), e colocados no contexto B impregnado com odor.

No dia seguinte, todos os ratos foram submetidos ao CACF.

No terceiro dia, procedeu-se o teste 1 no contexto C, na presença do odor.

No décimo dia, foi realizado o teste 2 no contexto A na ausência de odor. O grupo que recebeu a infusão de PBS intra-MCPd serviu como controle. A figura 15 apresenta o desenho experimental de forma esquematizada.

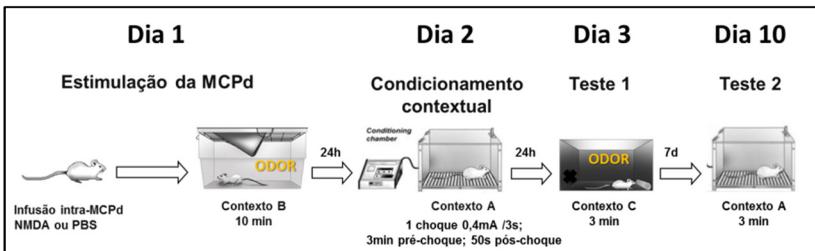


Figura 15. Protocolo do experimento 9.

Experimento 10. Efeito da cicloheximida sobre a facilitação do condicionamento aversivo contextual induzida pela estimulação química da MCPd.

Neste experimento foi testado o efeito do inibidor de síntese proteica administrado após a estimulação da MCPd.

No primeiro dia, os animais foram aleatoriamente selecionados para receber a infusão de NMDA na concentração de 100 pmol ou veículo (PBS). Imediatamente após, ou seis horas após a sessão de estimulação, cada rato recebeu a administração intraperitoneal de cicloheximida (CHX) ou veículo (salina, SAL), formando os seguintes grupos experimentais: NMDA- SAL, NMDA- CHX, NMDA- CHX 6h, PBS- SAL, PBS- CHX. O grupo NMDA- CHX 6h foi considerado controle da consolidação da experiência induzida pela estimulação química da MCPd.

No dia seguinte, todos os ratos foram submetidos ao CACF.

No terceiro dia, procedeu-se o teste 1 no contexto. No décimo dia, foi realizado o teste 2 no contexto A. O grupo NMDA-SAL serviu como controle do efeito da CHX. A figura 16 apresenta o desenho experimental de forma esquematizada.

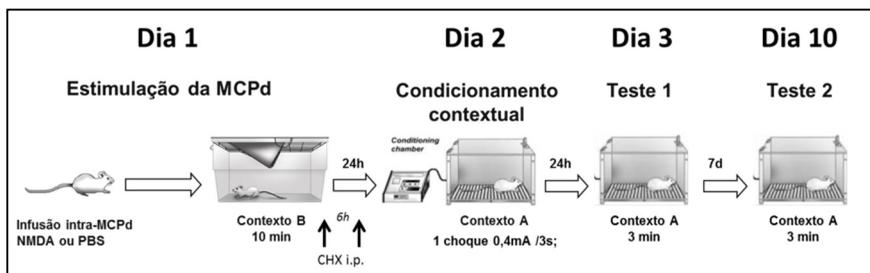


Figura 16. Protocolo do experimento 10.

Experimento 11. Efeito da cicloheximida sobre a evocação da memória aversiva contextual.

Neste experimento avaliou-se o efeito da inibição da síntese proteica sobre a evocação da memória contextual aversiva na manutenção da memória observada no T2.

No primeiro dia, os animais foram aleatoriamente selecionados para receber a infusão de NMDA na concentração de 100 pmol.

No dia seguinte, todos os ratos foram submetidos ao CACF.

No terceiro dia, 30 min antes da sessão de teste 1 no contexto A, todos os ratos receberam uma injeção IP de CHX ou SAL.

No décimo dia, foi realizado o teste 2 no contexto A, que também consistiu de uma sessão de 3 min na qual o tempo de congelamento foi mensurado. O grupo NMDA- SAL serviu como controle do efeito da CHX. A figura 17 apresenta o desenho experimental de forma esquematizada.

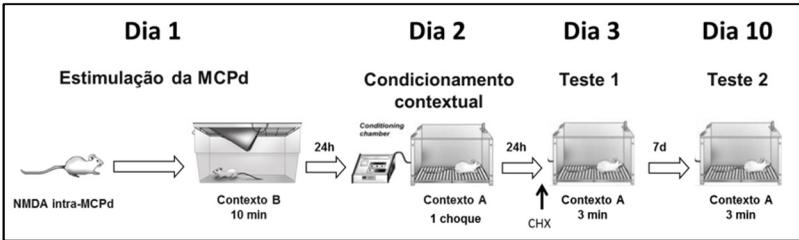


Figura 17. Protocolo do experimento 11.

4 RESULTADOS

Descrição geral

No presente estudo foram utilizados 222 ratos no total, sendo que 199 foram submetidos à todas as sessões dos protocolos experimentais sem apresentar nenhum prejuízo à análise comportamental, e portanto, compõem os dados apresentados nesta seção de resultados. Dos animais excluídos, 4 ratos apresentaram presença de lesões na região do implante, diarreia, ou perda do implante durante o experimento; 17 animais foram injetados na região do colículo superior; em 1 rato a infusão da droga ou veículo atingiu o aqueduto e 1 rato foi descartado por impedimento na análise histológica (marcação do corante não foi bem sucedida e impediu a visualização do sítio de injeção).

A figura 18 representa a localização mais frequente dos sítios corretos de injeção (MCPd), entre -6,72 e -8,0mm AP a partir do Bregma, para os resultados apresentados neste trabalho.

A)

B)

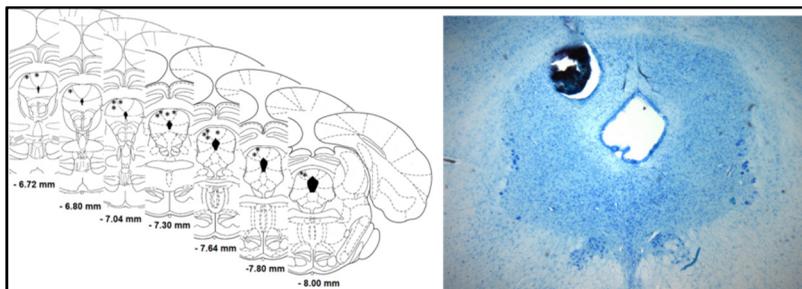


Figura 18. Sítios de injeção. (A) Representação esquemática. (Paxinos e Watson, 1998). (B) Fotomicrografia, marcação com corante Azul de Evans.

Embora não tenha sido objeto de análise, o comportamento de fuga foi observado na sessão de estimulação da MCPd, em alguns animais que receberam NMDA 100 pmol e mais frequente no grupo que recebeu NMDA 200pmol. Nesta sessão de condicionamento, o grupo dos animais que recebeu NMDA na concentração de 200pmol exibiu tentativa de fuga imediatamente após a aplicação do choque. Isto pode explicar porque este grupo de animais apresentou menor porcentagem de congelamento total após o choque em relação ao grupo que recebeu a concentração de 100pmol NMDA. No grupo NMDA 200pmol houve a expressão de reação defensiva mais intensa após o choque, incluindo tentativas de escape do aparato, portanto a estratégia comportamental adotada foi diferente.

Experimento 1. Efeito facilitatório da estimulação química da MCPd sobre o congelamento durante as fases do condicionamento aversivo contextual.

O primeiro experimento teve como objetivo avaliar o efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd com agonista do receptor NMDA sobre o comportamento defensivo nas diferentes etapas do protocolo experimental (figura 7). Foram avaliadas a sessão pós-estimulação da MCPd, a sessão de condicionamento contextual aversivo (período pós-choque), a sessão de teste 1 no contexto A e de teste 2 no contexto A. Os resultados obtidos neste experimento estão representados no gráfico da figura 19. A ANOVA mostrou que houve um efeito significativo somente do tratamento [$F(3,31) = 12,66; p = 0,00001$] na expressão do congelamento avaliada em todas as sessões. Não foram detectados efeitos do tempo [$F(3,93) = 2,69; p = 0,051$] ou da interação tratamento *vs* tempo [$F(9,93) = 1,77; p = 0,085$].

O teste *post-hoc* mostrou que independente da sessão avaliada, o tratamento com NMDA 100 pmol ($p = 0,0004$) e 200 pmol ($p = 0,0001$) provocou aumento do congelamento em relação ao grupo tratado com PBS; nenhuma alteração significativa na magnitude do congelamento foi detectada após o tratamento com NMDA 50 pmol.

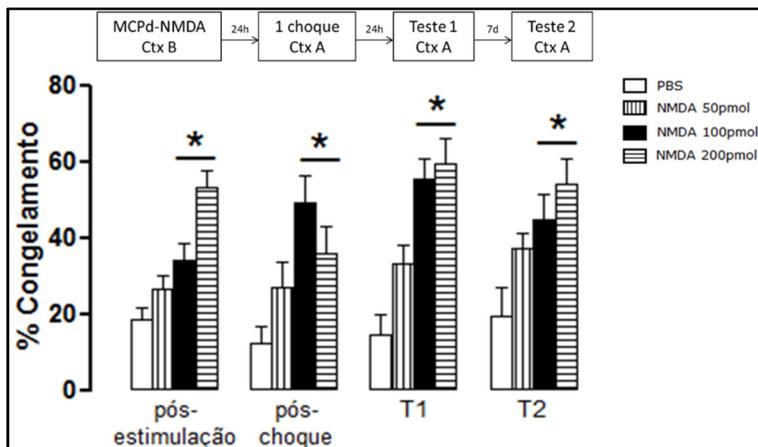


Figura 19. Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre o tempo de congelamento exibido pelos ratos durante as sessões de pós-estimulação (injeção intra-MCPd com NMDA ou PBS), pós-choque, teste 1 (T1) e teste 2 (T2). As barras representam a média + EPM. PBS: n=11; NMDA 50: n=9; NMDA 100: n=10; NMDA 200: n=11. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo PBS. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Experimento 2. Efeito do choque sobre as alterações comportamentais induzidas pela estimulação da MCPd.

Como controle do efeito da estimulação da MCPd sobre a experiência com choque, foi realizado um grupo independente de animais que recebeu a infusão de PBS ou NMDA 100 pmol no dia 1 e não recebeu choque no dia 2 (grupo 0-choque, figura 8), cujos resultados estão ilustrados na figura 20. A ANOVA revelou efeito do tratamento [$F(1,10) = 28,16; p = 0,0003$], efeito entre as sessões [$F(3,30) = 46,64; p = 0,0001$] e da interação entre a injeção e as sessões [$F(3,30) = 30,83; p = 0,0001$]. O teste *post-hoc* revelou aumento significativo do congelamento do grupo NMDA em relação ao grupo PBS durante a sessão pós-estimulação. Não

foram detectadas diferenças estatísticas no comportamento exibido nas sessões subsequentes.

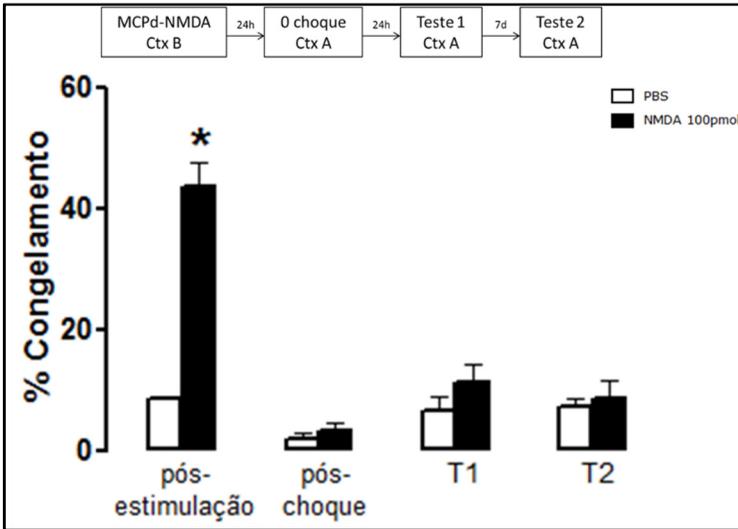


Figura 20. Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre o comportamento de congelamento avaliado nas diferentes sessões do protocolo experimental quando os animais não receberam choque no dia 2. As barras representam a média + EPM. PBS: n=6; NMDA 100: n=6. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo PBS. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Experimento 3. Efeito do contexto novo na manutenção da memória aversiva contextual.

O experimento 3 avaliou o efeito da estimulação da MCPd sobre o congelamento nas diferentes etapas do protocolo experimental quando a sessão de teste 1 ocorreu no contexto C e de teste 2 no contexto A (figura 9). Os dados obtidos estão ilustrados na figura 21. A análise estatística revelou efeito da injeção na MCPd [$F(1,10) = 5,19; p$

= 0,04], entre as sessões [$F(3,30) = 1,17$; $p = 0,033$] e da interação entre a injeção e as sessões [$F(3,30) = 9,39$; $p = 0,0001$]. Não foi encontrada diferença estatística no comportamento dos animais durante as sessões T1 e T2. O teste *post-hoc* de Tukey revelou uma diminuição significativa no congelamento dos animais durante o teste 1 ($p = 0,0001$) e também no teste 2 ($p = 0,01$), em relação ao congelamento exibido no período pós-estimulação (dia 1), no grupo que recebeu a injeção de NMDA.

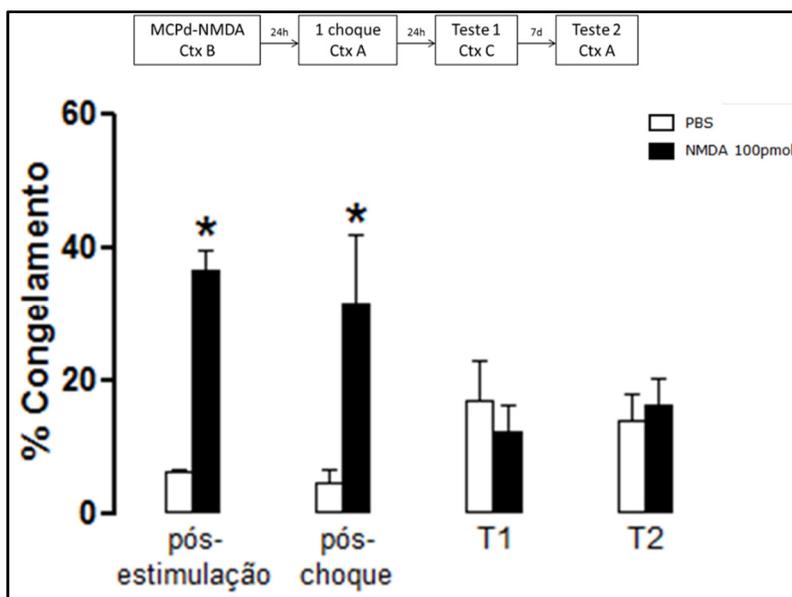


Figura 21. Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre o comportamento de congelamento avaliado nas diferentes sessões do protocolo experimental quando o teste 1 ocorreu no contexto novo. As barras representam a média + EPM. PBS: n=5; NMDA 100: n=9; * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo PBS. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Experimento 4. Efeito da ausência de evocação sobre a persistência da memória aversiva contextual.

Os dados obtidos no experimento 4 estão ilustrados na figura 22. ANOVA revelou efeito da injeção na MCPd [$F(1,11) = 52,68$; $p = 0,00002$]. A análise *post-hoc* indicou um aumento significativo no congelamento durante a sessão T2 dos animais que receberam a infusão de NMDA em relação aos que receberam PBS ($p = 0,0002$), pós-estimulação ($p = 0,04$) e pós-choque ($p = 0,005$).

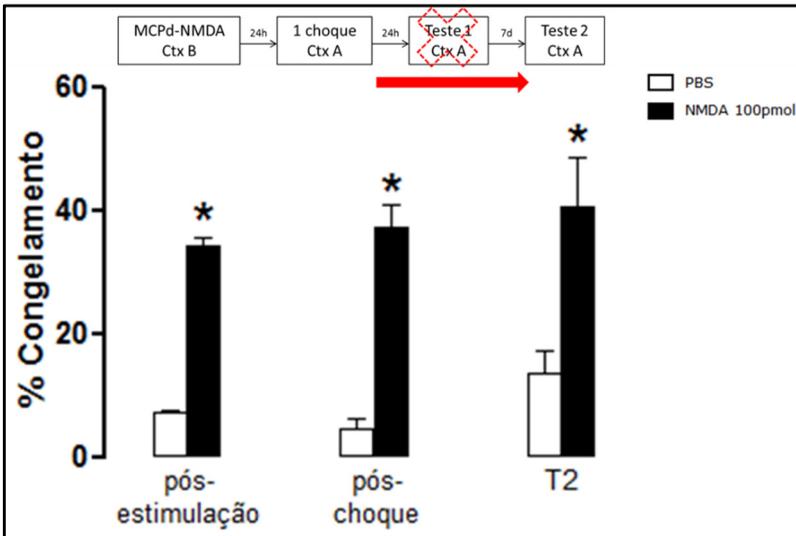


Figura 22. Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre o comportamento de congelamento avaliado nas diferentes sessões do protocolo experimental quando não houve reexposição no teste 1. As barras representam a média + EPM. PBS: $n=5$; NMDA: $n=8$. * $p<0,05$ em relação ao respectivo grupo PBS. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Experimento 5. Efeito da evocação no contexto novo 48 horas após o choque sobre a manutenção da memória aversiva contextual.

O experimento 5 avaliou as alterações no comportamento de congelamento quando a sessão T1 ocorreu 48 h após o condicionamento contextual. Os dados obtidos neste experimento estão demonstrados na figura 23. ANOVA detectou efeito da injeção na MCPd [$F(1,16) = 49,45$; $p = 0,000003$], efeito entre as sessões [$F(3,48) = 5,47$; $p = 0,0003$] e efeito da interação entre a injeção e as sessões [$F(3,48) = 10,09$; $p = 0,00003$]. Aplicando-se o teste de Tukey, constatou-se uma diferença significativa no congelamento dos animais durante a sessão pós-injeção do grupo NMDA em relação ao grupo PBS ($p = 0,004$). No período pós-choque, os animais NMDA apresentaram maior magnitude de congelamento que os animais PBS ($p = 0,004$). Durante a sessão T1, não houve diferença entre os grupos NMDA e PBS; entretanto, a análise *post-hoc* revelou um aumento significativo do congelamento dos animais NMDA em relação ao grupo PBS ($p = 0,03$) durante o T2. A análise mostrou ainda que o congelamento dos animais que receberam NMDA foi significativamente menor na sessão T1 em relação ao congelamento pós-estimulação ($p = 0,0001$), pós-choque ($p = 0,0001$) e também em relação à sessão T2 ($p = 0,0001$).

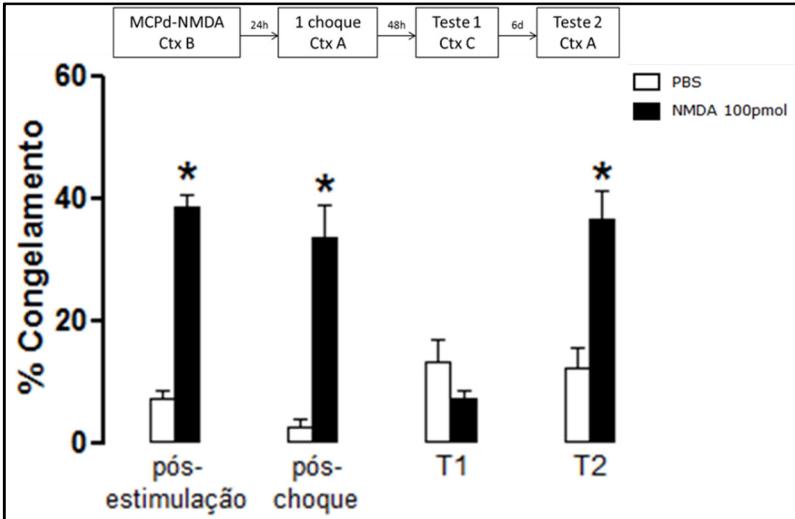


Figura 23. Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre o comportamento de congelamento avaliado nas diferentes sessões do protocolo experimental quando o teste 1 no contexto novo ocorreu 48 h após o choque. As barras representam a média + EPM. PBS: n=6; NMDA: n=12. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo PBS e em relação ao grupo NMDA em T1. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Experimento 6. Efeito da evocação no contexto novo 7 dias após o choque sobre a manutenção da memória aversiva contextual.

O experimento 6 avaliou as alterações no comportamento de congelamento quando a sessão T1 ocorreu 7 dias após o condicionamento contextual. Os dados obtidos estão ilustrados na figura 24. A análise estatística revelou efeito da injeção na MCPd [$F(1,9) = 92,74$; $p = 0,000005$], efeito entre as sessões [$F(3,27) = 12,58$; $p = 0,00002$] e efeito da interação entre a injeção e as sessões [$F(3,27) = 12,75$; $p = 0,00002$]. Aplicando-se o teste *post-hoc*, constatou-se uma

diferença significativa no congelamento dos animais na sessão pós-estimulação do grupo NMDA em relação ao grupo PBS ($p = 0,02$) e no pós-choque ($p = 0,002$). Durante a sessão T1, não houve diferença entre os grupos NMDA e PBS; porém a análise *post-hoc* revelou um aumento significativo do congelamento dos animais NMDA em relação ao grupo PBS ($p = 0,0008$) durante a sessão T2. O teste *post-hoc* revelou ainda diferença no congelamento durante o T2 em relação ao T1 ($p = 0,0001$) no grupo NMDA.

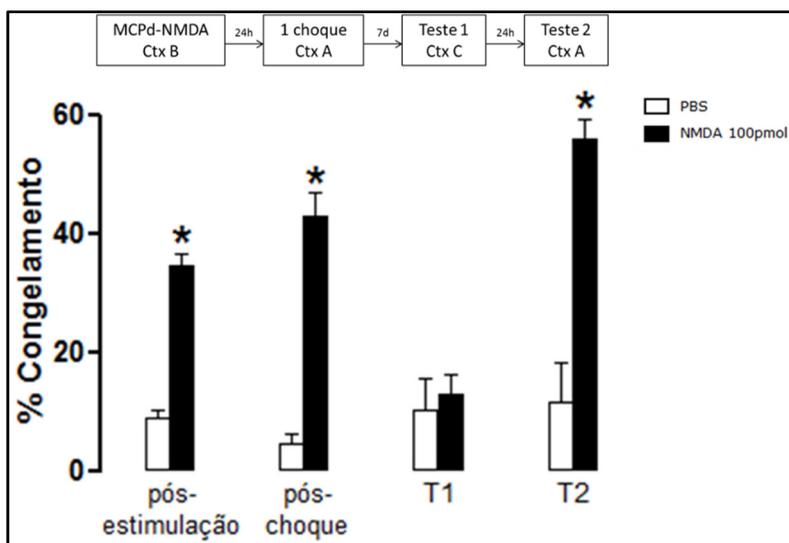


Figura 24. Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre o comportamento de congelamento avaliado nas diferentes sessões do protocolo experimental quando o teste 1 no contexto novo ocorreu 7 dias após o choque. As barras representam a média + EPM. PBS: $n=5$; NMDA: $n=6$. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo PBS e em relação ao grupo NMDA em T1. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Experimento 7. Efeito da evocação no contexto associado à estimulação da MCPd sobre a manutenção da memória aversiva contextual associada ao choque.

O experimento 7 avaliou o efeito da estimulação da MCPd sobre o congelamento nas diferentes etapas do protocolo experimental quando o T1 ocorreu no contexto B. Os resultados estão representados na figura 25. ANOVA detectou efeito da injeção [$F(1,11) = 4,54; p = 0,05$], uma tendência no efeito entre as sessões [$F(3,33) = 0,97; p = 0,41$] e efeito significativo da interação [$F(3,33) = 3,12; p = 0,03$]. Não foi encontrada diferença estatística no comportamento dos animais (NMDA vs. PBS) durante as sessões T1 e T2. O teste de Tukey revelou uma tendência de diferença no congelamento exibido pelo grupo NMDA durante o período pós-choque comparado ao congelamento em T1 ($p = 0,09$) e T2 ($p = 0,07$).

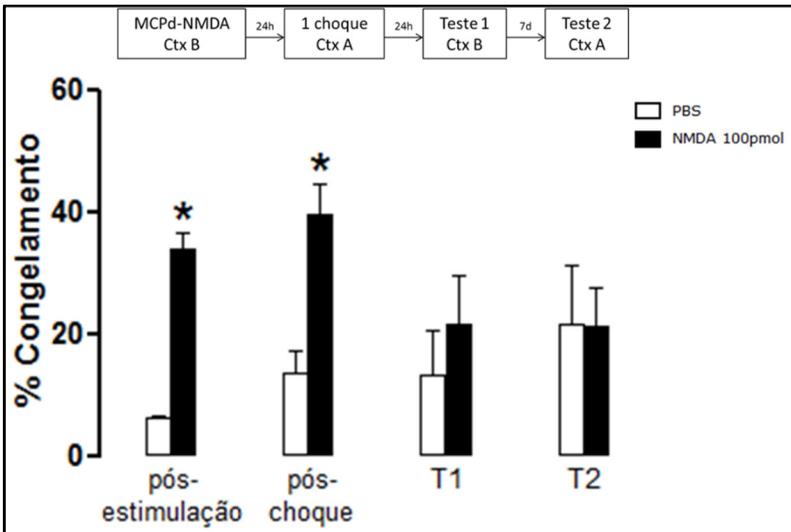


Figura 25. Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre o comportamento de congelamento avaliado nas diferentes sessões do protocolo experimental quando o teste 1 ocorreu no contexto B. As barras representam a média + EPM. PBS: n=5; NMDA: n=9. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo PBS. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Experimento 8. Efeito do odor associado à estimulação da MCPd sobre a manutenção da memória aversiva contextual associada ao choque, apresentado no contexto B.

Neste experimento foi avaliado o efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd na presença do odor neutro, sobre o congelamento exibido pelos animais nas diferentes etapas do protocolo experimental, sendo que a sessão T1 ocorreu no contexto B na presença do odor. Os dados obtidos estão ilustrados na figura 26. ANOVA revelou efeito do tratamento [$F(1,12) = 43,47; p = 0,00002$]. O teste *post-hoc* de Tukey revelou que o congelamento dos animais que receberam a infusão de NMDA foi significativamente maior que o congelamento dos animais que receberam a infusão de PBS ($p = 0,0002$) em todas as sessões avaliadas.

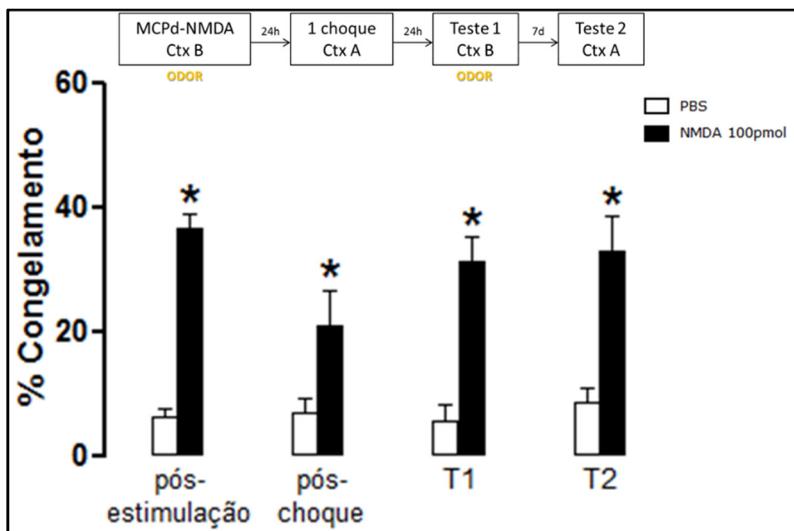


Figura 26. Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd na presença de odor neutro sobre o comportamento de congelamento avaliado nas diferentes sessões do protocolo experimental. O teste 1 ocorreu no contexto B impregnado com odor. As barras representam a média + EPM. PBS: n=5; NMDA: n=9. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo PBS. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Experimento 9. Efeito do odor associado à estimulação da MCPd sobre a manutenção da memória aversiva contextual associada ao choque, apresentado no contexto novo.

Neste experimento foi avaliado o efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd na presença do odor neutro, sobre o congelamento exibido pelos animais nas diferentes etapas do protocolo experimental, quando T1 ocorreu no contexto C na presença do odor. Os resultados encontram-se representados na figura 27.

A análise estatística revelou efeito da injeção na MCPd [$F(1,9) = 39,29$; $p = 0,0001$], efeito entre as sessões [$F(3,27) = 3,55$; $p = 0,02$] e efeito da interação entre a injeção e as sessões [$F(3,27) = 3,36$; $p = 0,03$]. O teste *post-hoc* de Tukey revelou que o congelamento dos animais que receberam a infusão de NMDA foi significativamente maior que o congelamento dos animais que receberam a infusão de PBS na sessão pós-estimulação ($p = 0,04$) e durante a sessão de T2 ($p = 0,006$). Além disso, o teste *post-hoc* também revelou que o comportamento do grupo NMDA aumentou significativamente na sessão T2 em relação à sessão T1 ($p = 0,001$).

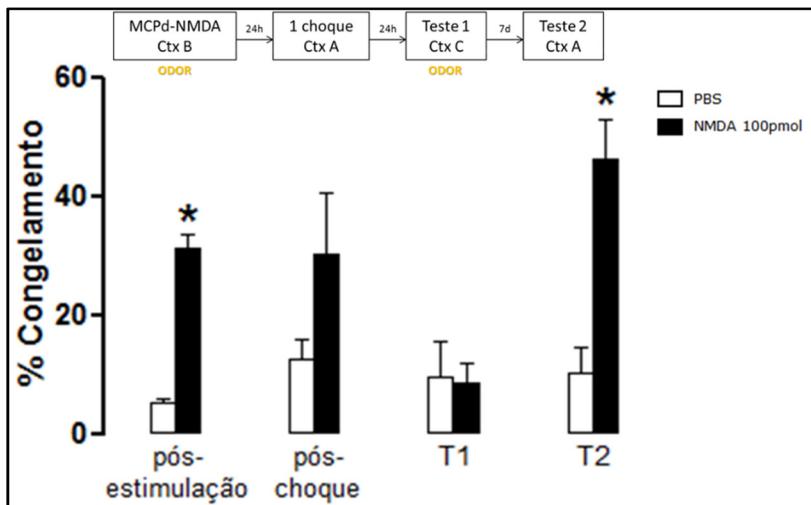


Figura 27. Efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd na presença de odor neutro sobre o comportamento de congelamento avaliado nas diferentes sessões do protocolo experimental. O teste 1 ocorreu no contexto C impregnado com odor. As barras representam a média + EPM. PBS: n=5; NMDA: n=6. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo PBS e em relação ao grupo NMDA em T1. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Experimento 10. Efeito da cicloheximida sobre a facilitação do condicionamento aversivo contextual induzida pela estimulação química da MCPd.

O experimento 10 avaliou o efeito da CHX administrada por via sistêmica imediatamente após a sessão pós-estimulação na MCPd, sobre o comportamento de congelamento avaliado nas sessões seguintes do protocolo experimental. Os dados deste experimento estão ilustrados na figura 28. A ANOVA revelou um efeito da injeção na MCPd [$F(4,31) = 38,21$; $p = 0,0000001$], efeito entre as sessões [$F(3,93) = 7,93$; $p =$

0,00009] e efeito da interação entre a injeção e as sessões [$F(12,93) = 8,30; p = 0,0000001$]. O teste *post-hoc* revelou diferenças significativas no congelamento dos animais tratados com CHX após a infusão de NMDA intra-MCPd (NMDA-CHX). Estes animais apresentaram redução do congelamento durante o T1 em relação à sessão pós-estimulação ($p = 0,01$) e em relação ao período pós-choque ($p = 0,0001$). O congelamento exibido por este grupo (NMDA-CHX) também foi reduzido na sessão T2 em relação ao congelamento pós-choque ($p = 0,0001$). Ainda, o congelamento dos ratos NMDA-CHX foi significativamente menor que o congelamento dos ratos do grupo NMDA-SAL ($p = 0,0004$) e do grupo NMDA-CHX-6h ($p = 0,0002$) durante o T1. O grupo NMDA-SAL apresentou um congelamento significativamente maior que o grupo PBS-CHX tanto no T1 ($p = 0,04$) como no T2 ($p = 0,02$).

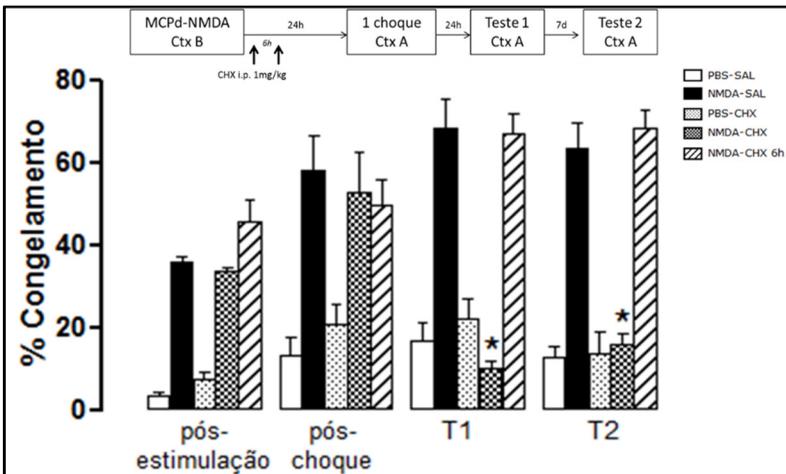


Figura 28. Efeito da cicloheximida administrada imediatamente após ou 6h após a sessão de estimulação da MCPd. As barras representam a média + EPM. PBS-SAL: n=6; NMDA-SAL: n=7; PBS-CHX: n=5; NMDA-CHX: n=10; NMDA-CHX 6 h: n=9. * $p < 0,05$ em relação aos grupos NMDA-SAL e NMDA-CHX. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Experimento 11. Efeito da cicloheximida sobre a evocação da memória aversiva contextual.

O experimento 11 avaliou o efeito da CHX administrada por via sistêmica 30 min antes da sessão T1, sobre o comportamento de congelamento avaliado nas sessões seguintes do protocolo experimental. Os dados obtidos estão representados na figura 29. A análise estatística detectou um efeito da injeção na MCPd [$F(1,12) = 13,04$; $p = 0,003$], efeito entre as sessões [$F(3,36) = 16,09$; $p = 0,000001$] e efeito da interação entre a injeção e as sessões [$F(3,36) = 13,29$; $p = 0,000005$]. A análise *post-hoc* (Tukey) revelou que durante a sessão T2 o congelamento exibido pelo grupo NMDA-CHX foi significativamente menor ($p = 0,001$) que o congelamento do grupo NMDA-SAL. Além disso, o congelamento do grupo NMDA-CHX diminuiu significativamente na sessão T2 em relação à sessão T1 ($p = 0,0001$).

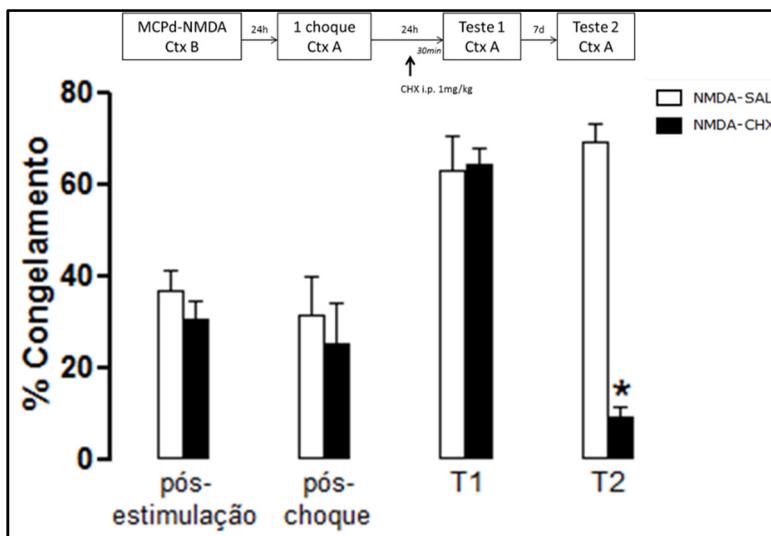


Figura 29. Efeito da cicloheximida administrada 30 min antes da sessão de teste 1. As barras representam a média + EPM. NMDA-SAL: $n=6$; NMDA-CHX: $n=8$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo NMDA-SAL. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou o efeito da estimulação glutamatérgica da MCPd sobre uma tarefa de aprendizagem aversiva, no qual ratos foram submetidos a dois eventos aversivos distintos, separados por 24h, e o comportamento defensivo foi analisado em sessões subsequentes, ao longo de 2 semanas. Utilizando o protocolo experimental proposto, foi possível observar o efeito da atividade desta região mesencefálica sobre o comportamento defensivo em experiências aversivas posteriores. A análise comportamental sugeriu que a sinalização de perigo promovida por esta área exerce influência sobre outras experiências de caráter ameaçador, em períodos iguais ou superiores a 24h, modificando o comportamento defensivo de roedores. Mesmo na ausência da droga, as reações de defesa foram potencializadas pela estimulação prévia da MCPd, resultando na facilitação da formação de uma memória aversiva.

A estimulação da MCPd promove a sensibilização do comportamento defensivo

A experiência aversiva induzida pela injeção de NMDA intra-MCPd foi evidenciada pela expressão de respostas defensivas imediatamente após a injeção. No período pós-estimulação da MCP, os animais apresentaram comportamentos de defesa evidentes, como congelamento e fuga. A infusão de NMDA intra-MCPd nas concentrações de 100 pmol e 200 pmol promoveu experiência aversiva mais intensa em relação aos demais grupos, onde foi observada uma maior porcentagem de tempo em congelamento. Entre os sujeitos, foi observada uma variabilidade individual na magnitude das respostas frente

ao estímulo químico. Cerca de 30% dos animais apresentaram fuga no início da sessão e 100% dos animais apresentaram comportamento de congelamento, que teve intensidade variada ao longo dos 10 min da sessão (observação não quantificada). O incremento da concentração de NMDA produziu o mesmo efeito observado com o incremento da frequência da estimulação com eletrodos, resultando em respostas progressivamente mais intensas (Brandão, de Aguiar, *et al.*, 1982, Coimbra, Leão-Borges, *et al.*, 1989; Bittencourt, Carobrez, *et al.*, 2004).

Os dados obtidos no experimento 1 mostraram que a infusão de NMDA intra-MCPd nas concentrações de 100 pmol e 200 pmol promoveu o aumento do congelamento em resposta aos estímulos aversivos apresentados em todas as sessões do protocolo experimental (figura 19). Este dado revela que o procedimento de estimulação glutamatérgica dos neurônios da MCPd foi capaz de promover alterações duradouras na resposta comportamental frente a novos estímulos, incondicionados ou aprendidos. O efeito observado sugere que uma experiência prévia, de característica aversiva, pode interferir no processamento de novas experiências aversivas, resultando na modificação da estratégia comportamental adotada como resposta.

Na sessão de condicionamento aversivo contextual 24h após a injeção de NMDA intra-MCPd, foi possível avaliar a resposta dos animais após a aplicação de um estímulo incondicionado novo, diferente da experiência anterior induzida pela estimulação da MCPd: o choque elétrico nas patas. Ficou evidente que os animais que receberam NMDA no dia anterior apresentaram reações defensivas mais robustas após o choque em relação aos animais que receberam PBS: os animais que receberam NMDA nas concentrações de 100pmol e 200pmol passaram

mais tempo em congelamento imediatamente após o choque nas patas, em relação aos demais grupos. Assim, os dados sugerem que a estimulação da MCPd com NMDA promoveu aumento da responsividade ao choque. É possível inferir que a experiência aversiva induzida pela ativação da MCPd tenha promovido alguma alteração neuronal, em projeções descendentes de controle motor e autonômico, que tenha contribuído para o aumento da responsividade ao choque, resultando no aumento da magnitude da resposta. É importante salientar que o aumento do comportamento defensivo observado 24h após a estimulação da MCPd somente foi observado quando houve a aplicação do choque, pois apenas a exposição dos animais à caixa de condicionamento (contexto A, experimento 2) não foi suficiente para evocar resposta de congelamento (figura 20). Este dado indica que a estimulação da MCPd realizada no dia anterior não prejudicou a exploração do contexto novo, e descarta a hipótese de que a expressão da resposta defensiva seja resultante de generalização do comportamento para qualquer ambiente. Foi necessária a apresentação do estímulo aversivo para que a resposta fosse observada. Em um trabalho que utilizou 15 choques nas patas no contexto A como experiência prévia, a administração intra-cerebroventricular de antagonista NMDA, AP5, antes desta sessão, não reverteu o aumento da resposta de medo ao contexto B, sugerindo ser o efeito comportamental resultante de um processo não-associativo e não depende da associação formada na experiência prévia (Rau, DeCola, *et al.*, 2005).

Estímulos nocivos aplicados em um sistema simples de circuito neuronal (como o reflexo da retração defensiva em moluscos) promoveram o aumento da resposta reflexa por até 3 semanas após o treino (Pinsker, Hening, *et al.*, 1973). O mecanismo neuronal que sustenta

esta evidência comportamental de sensibilização é a facilitação sináptica, elucidado no modelo do molusco *Aplysia* (Montarolo, Goelet, *et al.*, 1986): um choque elétrico na cauda do animal promove a liberação de glutamato ativando os neurônios sensoriais, promovendo a excitação de interneurônios modulatórios liberadores de serotonina nos terminais sinápticos. O aumento da transmissão serotoninérgica resulta no aumento da excitabilidade dos neurônios motores, facilitando assim a resposta a novos estímulos. Além disso, Montarolo e colaboradores (1986) também demonstraram que este circuito pode sofrer alterações que duram semanas, já que os receptores serotoninérgicos estão acoplados a proteína G e quando ativados iniciam a ativação de cascatas de sinalização intracelular que resultam em transcrição gênica e no crescimento de novos terminais sinápticos, permitindo a facilitação sináptica de longa duração. Desta forma, novos estímulos resultam em resposta facilitada devido à diminuição do limiar para ativação dos neurônios motores. Não se descarta a possibilidade de um fenômeno semelhante ocorrer nas projeções descendentes da MCPd após sua estimulação, sendo responsável pelo aumento da magnitude da resposta ao choque.

A MCP parece funcionar como uma interface do processamento da experiência aversiva no SNC: recebe as informações periféricas através de aferências do tronco encefálico (para revisão ver Almeida, Roizenblatt, *et al.*, 2004) e transmite a informação aversiva através de suas projeções ascendentes para o processamento cognitivo em regiões como a amígdala (Johanssen, Tarpley, *et al.*, 2010). Na expressão do congelamento em resposta ao estímulo, é ativada novamente, através da via que conecta o núcleo central da amígdala (via de saída da informação processada nesta estrutura) com a coluna ventrolateral da MCP (MCPvl)

(Gross e Canteras, 2012), estimulando as projeções descendentes e periféricas na execução do comportamento (Almeida, Roizenblatt, *et al.*, 2004). A sensibilização da MCP induzida pela estimulação prévia, pode ser o mecanismo de base para o aumento da resposta de congelamento observado após o choque neste experimento. Portanto, o procedimento adotado neste trabalho corrobora a teoria da sensibilização, que descreve que a exposição a um estímulo aversivo promove o aumento da responsividade a novos estímulos de característica nociva (Eichenbaum, 2008). Desta forma, o presente estudo contribui para a pesquisa da neurobiologia da sensibilização emocional ao demonstrar que a exposição prévia à estimulação glutamatérgica da MCPd favorece o aumento das respostas de defesa a estímulos que normalmente induzem respostas comportamentais defensivas reduzidas.

A estimulação glutamatérgica da MCPd via receptores NMDA promove a facilitação do condicionamento aversivo contextual

O efeito promotor da estimulação da MCPd sobre a memória da associação choque-contexto, foi evidenciado na sessão T1 quando todos os animais foram re-expostos ao contexto A um dia após o condicionamento aversivo contextual, e na sessão T2, sete dias depois (figura 19). Este resultado indica que a resposta sensibilizada contribuiu para a formação da memória aversiva persistente, e que o perfil comportamental observado no T1 não reflete apenas um estado emocional transitório. Desta forma, a expressão aumentada do comportamento observada em T1 e T2, depende da sequência de dois eventos: a infusão de NMDA intra-MCPd no primeiro dia e da associação choque-contexto no segundo dia. O aumento da resposta apresentado pelos grupos NMDA-

MCPd mostra que a estimulação da MCPd promoveu alterações que refletiram no congelamento pós-choque, incrementando esta resposta, e modificaram a aquisição da associação choque-contexto, já que o grupo PBS não apresentou congelamento no contexto A. Assim, os resultados apresentados neste trabalho corroboram os trabalhos que mostraram o efeito facilitatório da exposição prévia ao predador (Goswami, Cascardi, *et al.*, 2010) ou do estresse por contenção (Maldonado, Martijena, *et al.*, 2011; Rodríguez-Manzanares, Isoardi, *et al.*, 2005) sobre a formação de uma memória contextual aversiva. Neste contexto, dados recentes mostraram que a interação de uma experiência aversiva com um traço de memória aversiva já estabelecida resultou em uma memória robusta e persistente (Giachero, Bustos *et al.*, 2013; Mochny, Kincheski, *et al.*, 2013). Adicionalmente, um estudo em andamento no nosso laboratório demonstrou que a influência do estresse foi impedida pela inativação da MCPd com muscimol, o que sugere que esta estrutura é fundamental na instrução do efeito promotor do estresse sobre a evocação de um traço de memória contextual aversiva (Giachero e Carobrez, dados não publicados).

Desta forma, o efeito observado em nosso experimento com a estimulação da MCPd poderia ser atribuído à hiperexcitabilidade de estruturas rostrais, como por exemplo hipocampo e amígdala, importantes para o processamento das experiências aversivas e formação de memórias associativas, promovida pelas projeções ascendentes ativadas por esta estimulação, da mesma forma que ocorre com o estresse por contenção (Maldonado, Espejo, *et al.*, 2014; Giachero, Bustos, *et al.*, 2013; Rodríguez-Manzanares, Isoardi, *et al.*, 2005). A ativação da proteína ERK na BLA já foi relacionada com o efeito promotor do estresse na facilitação

do condicionamento contextual aversivo (Maldonado, Espejo, *et al.*, 2014), bem como a expressão de BDNF no hipocampo (Giachero, Bustos, *et al.*, 2013). Estas alterações neuroquímicas poderiam ser investigadas, a partir da estimulação da MCPd, como indicadores de hiperexcitabilidade nestas regiões resultante da atividade da MCPd, sob a hipótese de que estas alterações moleculares sustentam a facilitação do condicionamento contextual aversivo. Cabe salientar a importância dos receptores NMDA no condicionamento aversivo: a ativação destes receptores está relacionada com a indução de plasticidade sináptica em regiões encefálicas responsáveis pela codificação da experiência aversiva, como a amígdala e o hipocampo (Maren, 2001). Assim, pode-se especular que a injeção de NMDA na MCPd ao promover a ativação local destes receptores pode resultar, entre outros efeitos, no aumento da transmissão glutamatérgica nestas áreas, através de uma via ascendente indireta.

Evidências anteriores sugerem que a estimulação da MCPd exerce influência sobre a amígdala na plasticidade neuronal necessária para o estabelecimento do condicionamento aversivo. A estimulação da BLA não foi suficiente para promover o condicionamento de medo, entretanto, sua inativação bloqueou o condicionamento induzido pela estimulação da MCPd, sugerindo que a BLA recebe a informação aversiva da MCPd para processar a experiência de medo (Kim *et al.*, 2013). Além disso, um estudo acerca da plasticidade neural na BLA induzida por aferências da região do subículo mostrou que a estimulação prévia da MCPd foi capaz de modular a LTP na BLA induzida pela estimulação de seus aferentes subiculares (Horovitz e Richter-Levin, 2015). Estes dados sustentam a hipótese de que a atividade da MCPd

exerce influência sobre regiões límbicas sendo capaz de modular a plasticidade sináptica através do envio de informações de perigo.

Deste modo, a estimulação da MCPd com NMDA exógeno estaria mimetizando a instrução aversiva transmitida ao sistema neural para codificação da experiência. Este procedimento demonstrou-se eficaz em produzir alterações comportamentais em até 24h após, quando modificou a evocação de um traço de memória contextual aversiva (Mochny, Kincheski, *et al.*, 2013). Assim, é possível que alterações neuronais resultantes desta instrução estejam presentes no momento em que os animais foram submetidos ao condicionamento contextual realizado neste estudo, favorecendo a aprendizagem deste treino fraco.

A evocação da memória aversiva contextual formada sob influência da estimulação da MCPd é uma etapa crítica para a manutenção da memória

O período de 24h pós-condicionamento parece ser importante para a manutenção da memória aversiva contextual formada sob influência da estimulação prévia da MCPd. Foi necessário avaliar se a sessão de re-exposição ao contexto associado ao choque (contexto A), 24h após o condicionamento com o choque, é crítica para a expressão do congelamento no contexto A na semana seguinte. Assim, o experimento 4 avaliou o efeito da associação entre as experiências da estimulação da MCPd e do choque uma semana depois (figura 10). O aumento significativo na expressão do congelamento dos animais que receberam NMDA intra-MCPd em relação ao grupo controle que recebeu PBS, 7d após o condicionamento (figura 22), indicou que a memória aversiva contextual foi formada e persistiu por uma semana. A facilitação da

aquisição do condicionamento contextual parece ocorrer devido a uma sensibilização emocional induzida pela infusão de NMDA na MCPd, provavelmente por sensibilizar os circuitos neurais responsáveis pelo processamento do aprendizado associativo que se dá na sessão de pareamento entre o choque e o contexto. Sendo assim, é esperado que, uma vez que a associação seja formada nestas condições, a memória resultante possa ser expressa de forma significativa independentemente do intervalo de tempo decorrido após o condicionamento. Este experimento mostrou que de fato a associação formada sob o estado emocional sensibilizado é robusta e persistente, podendo ser expressa em resposta defensiva uma semana depois, não sendo necessária a re-exposição ao contexto A no terceiro dia (sessão T1).

No protocolo proposto neste estudo é de fundamental importância avaliar a influência da evocação no contexto associado ao choque 24h depois sobre a memória resultante. Com este propósito, grupos distintos de animais submetidos à estimulação da MCPd no dia 1 e ao condicionamento com 1 choque no dia 2, foram expostos ao contexto C (contexto novo) e o congelamento foi mensurado. A ausência de diferença no congelamento entre os grupos NMDA e PBS no contexto C (figura 21) sugere que o aumento do congelamento observado nos experimentos anteriores é específico para o contexto A, não havendo generalização do comportamento para ambientes não-relacionados com a experiência anterior. Curiosamente, não houve diferença no congelamento dos animais expostos ao contexto A avaliado em T2, realizado uma semana após o T1. A análise comportamental sugere que a exposição ao contexto novo tenha interferido com processos de manutenção da memória associativa que ainda estejam em curso.

Segundo a teoria da consolidação tardia de Dudai e Eisenberg (2004), a consolidação sistêmica das memórias não é finalizada no período de horas após o evento, como ocorre com a consolidação sináptica / celular. Desta forma, memórias recentes estariam susceptíveis a modificações quando informações novas, apresentadas em uma experiência com novidade, poderiam ser incorporadas à informação aprendida. Outra condição importante considerada na consolidação tardia é a competição entre os traços de memória formados durante a aprendizagem: o traço que prevalece é aquele cujo comportamento predomina, sendo este traço o que está sujeito à manutenção (Eisenberg, Kobilov, *et al.*, 2003). No experimento 3, a ausência de congelamento no contexto C durante a sessão T1 pode refletir o comportamento que prevalece, e esta informação poderia ser incorporada à memória cuja consolidação sistêmica ainda esteja em curso. Esta hipótese é uma possível explicação para o efeito observado na sessão T2, no contexto A, na qual se observou também a ausência de diferença no congelamento dos animais tratados com NMDA ou PBS. Outra possibilidade a ser considerada é que o contexto C seja capaz de induzir a evocação dos eventos anteriores, ainda que não tenha nenhuma pista relacionada. Não podemos afirmar se houve evocação ou não, já que este é um processo subjetivo e que não pode ser acessado apenas com a análise do comportamento; a ausência de expressão comportamental não reflete necessariamente a ausência de evocação. Por este motivo, deve-se considerar que uma evocação no contexto C permitiria a indução de desestabilização da memória associativa formada anteriormente e conseqüentemente a possibilidade de atualizar a memória no processo de reconsolidação (Lee, 2010). Segundo esta hipótese, a ausência de congelamento seria o comportamento predominante que

representa a ausência de caráter aversivo desta sessão, modificando a representação emocional da memória, e portanto, resultando na diminuição do congelamento na exposição posterior ao contexto A.

Os resultados dos experimentos anteriores indicaram que uma experiência de exposição a um contexto novo em T1, pode interferir com a manutenção da memória aversiva contextual, já que o T1 realizado no contexto C prejudicou a expressão em T2. Entretanto, na ausência da experiência contextual em T1, houve a expressão do congelamento em T2, sugerindo que possivelmente exista uma janela temporal para o efeito interferente do contexto novo. Segundo a hipótese de Dudai e Eisenberg (2004), à medida em que as memórias “envelhecem”, diminui a susceptibilidade à modificações, pois a consolidação sistêmica ocorreria com o passar do tempo, que pode variar de acordo com o protocolo experimental empregado. Desta forma, no experimento seguinte avaliou-se o efeito da exposição ao contexto C 48h após o condicionamento aversivo contextual (T1), sobre a expressão da memória aversiva no contexto A em T2, na semana seguinte (figura 11). Os dados revelaram que houve um aumento significativo da expressão do congelamento em T2 dos animais que receberam NMDA intra-MCPd em relação ao grupo controle (figura 23), em oposição ao efeito observado quando os animais foram expostos ao contexto C 24h após o condicionamento contextual (T1). Com este resultado, pode-se inferir que no período de 24h após a experiência com o choque a memória contextual ainda está sujeita a interferência do contexto novo; entretanto, no período de 48h após o choque, a experiência no contexto novo não teve efeito sobre a diferença na expressão do congelamento observada em T2, sugerindo que em 48h a memória não está mais susceptível a modificação. A idade da memória

é um fator limitante para que a desestabilização da memória aversiva possa ocorrer (Bustos, Giachero, *et al.*, 2009). Isto é, quanto mais recente for a experiência que originou a memória associativa, mais sujeita estará a procedimentos experimentais capazes de interferir com a memória original. Assim, é possível que no protocolo experimental proposto, a memória contextual formada a partir da experiência com o choque, em ratos previamente submetidos a estimulação da MCPd esteja susceptível a modificações no período de 24h após o choque, e não mais após este período.

Um grupo adicional de ratos foi submetido ao teste 1 realizado no contexto novo 6 dias após o choque, e 24h antes do teste 2, com o objetivo de avaliar se este procedimento poderia interferir com a expressão do congelamento no contexto A durante o T2. Este experimento foi realizado para verificar se informações adquiridas no contexto C poderiam ser incorporadas na experiência de evocação no contexto A, 24 após (figura 12). A análise do congelamento revelou que a exposição ao contexto neutro no dia anterior à sessão de T2 não prejudicou o aumento do congelamento dos animais NMDA-MCPd em relação ao grupo controle (figura 24), confirmando que a memória foi evocada e expressa, portanto não foi prejudicada pela experiência do dia anterior. Este resultado corrobora o dado do experimento anterior e sustenta a hipótese de que a memória aversiva contextual formada sob influência da estimulação da MCPd somente é susceptível à modificações em uma janela temporal de 24h após o choque.

A pista olfatória associada à estimulação da MCPd favorece a manutenção da memória aversiva associada ao choque

Os resultados indicaram que a sessão de T1 é uma etapa determinante para a susceptibilidade da memória a modificações. Foram avaliados os efeitos do T1 realizado no contexto do choque e no contexto neutro, discutidos anteriormente. Além disso, foi importante também avaliar a exposição ao contexto da estimulação da MCPd durante o T1, para verificar se a pista contextual associada à primeira experiência poderia favorecer ou prejudicar a manutenção da memória associada ao choque. Desta forma, o experimento 7 (figura 13) testou o efeito da re-exposição ao contexto B durante o T1 sobre a expressão do congelamento durante o T2. Não houve diferença entre os grupos quando expostos ao contexto B na sessão do dia 3 (T1, figura 25). Interessante notar que no contexto da experiência de estimulação da MCPd não houve expressão aumentada de congelamento. Uma possível explicação para este resultado baseia-se no fato de que a estimulação da MCPd com NMDA na concentração de 100 pmol ocorre no limiar de fuga, e provavelmente nesta situação a representação contextual seja comprometida pela necessidade de escapar. Ou seja, é plausível supor que este procedimento não permita ao animal adquirir informações contextuais que o possibilitem evocar esta experiência e expressar o comportamento de congelamento quando re-expostos nesse contexto. Curiosamente, não houve diferença no congelamento destes animais também em T2, realizado uma semana após o T1, no contexto A. Portanto, o efeito da exposição ao contexto B durante o T1 foi semelhante ao efeito observado quando da exposição ao contexto C em T1, sugerindo que o contexto B,

por não ter adquirido relevância emocional, teve o mesmo efeito interferente da experiência neutra induzida pelo contexto C.

Entretanto a pergunta ainda persistiu: será que um estímulo associado à experiência induzida pela estimulação da MCPd poderia ser utilizado para promover a experiência emocional em T1 necessária para a expressão do congelamento em T2? Para responder esta pergunta utilizamos a associação da estimulação da MCPd com um estímulo olfatório neutro (odor de acetato de amila), já que o estímulo olfatório é processado por uma via direta que conecta o bulbo olfatório a núcleos amigdaloides (Meurisse, Chaillou, *et al.*, 2009), permitindo o processamento cognitivo do odor independente de processos de atenção possivelmente prejudicados pelo comportamento de fuga. Dados anteriores do nosso laboratório revelaram que concentrações baixas de NMDA (25) ou altas (200 pmol) não demonstraram efeito em sustentar o condicionamento olfatório aversivo em ratos, sugerindo que 100 pmol é a concentração efetiva para promover alterações cognitivas de ordem superior e promover o aprendizado (Kincheski, 2012). Com base neste conhecimento, decidimos averiguar o efeito da introdução do estímulo olfatório na sessão de estimulação da MCPd com NMDA 100 pmol e avaliar o congelamento nos contextos B ou C (T1) impregnados com o odor pareado com a estimulação (figura 14). Quando os animais submetidos ao condicionamento contextual e previamente injetados com NMDA intra-MCPd na presença de odor foram re-expostos ao contexto B com odor na sessão T1, observou-se maior expressão de congelamento em relação aos animais injetados com veículo (figura 26). Este padrão comportamental foi mantido na sessão T2 realizada no contexto A. O aumento do congelamento no contexto B na presença do odor confirma

dados prévios do nosso laboratório mostrando que o odor pareado com a estimulação da MCPd com NMDA 100pmol adquire propriedade aversiva capaz de evocar comportamentos de defesa em uma sessão de reexposição (Kincheski, 2012). Entretanto, quando o T1 foi realizado no contexto C, o odor presente nesta sessão não foi capaz de eliciar o congelamento dos animais. No trabalho de Kincheski (2012), o odor pareado com a estimulação da MCPd foi reapresentado aos animais em um contexto distinto daquele onde ocorreu o pareamento, entretanto, os parâmetros comportamentais avaliados refletiram respostas sutis de defesa em um aparato que permite ao animal executar maior variedade de comportamentos defensivos. No presente trabalho, quando os animais foram re-expostos ao contexto A uma semana depois, na ausência do odor, a diferença nos níveis de congelamento novamente foi observada. O sistema olfatório de roedores conecta-se diretamente com neurônios da amígdala, permitindo que a informação sensorial seja processada pela circuitaria neural envolvida em processos de aprendizagem associativa, além de ser de grande importância biológica para a espécie. O efeito sobre o comportamento observado em T2 no contexto A, na ausência do odor, sugere que a exposição ao odor, quando realizada no teste 1, independente do contexto, é capaz de manter a relevância da associação choque-contexto A formada sob a influência da estimulação glutamatérgica da MCPd, talvez por resgatar a sensação aversiva vivenciada no dia 1 e contribuir para processos cognitivos que ainda estejam em curso nesta fase. Cabe comentar que a ausência de congelamento observada em T1 neste experimento não necessariamente reflete ausência de evocação, ou seja, o odor pode evocar a sensação de medo que não é detectado pela análise de um comportamento robusto e definido como o congelamento.

A interação entre as experiências aversivas depende da síntese de proteínas

Os dados apresentados até aqui sustentam a hipótese de que a experiência aversiva prévia facilita a aprendizagem de uma associação aversiva contextual de um treino fraco. Segundo Wiedenmayer (2004), uma única experiência aversiva é potente o suficiente para afetar e alterar a transmissão sináptica em estruturas cerebrais do processamento do medo, como a amígdala, hipocampo e MCP. Estas alterações são duradouras e de acordo com a literatura, parecem sustentar as alterações comportamentais induzidas por uma ameaça. Por outro lado, a sustentação da LTP e da LTD depende da síntese de proteínas relacionadas à plasticidade (PRPs) durante a etapa de consolidação, nas sinapses ativadas durante a experiência (para revisão, ver Izquierdo, Furini *et al.*, 2016).

Entretanto, as memórias formadas nos chamados “treinos fracos” de condicionamento de medo contextual, não são expressas na postura de congelamento nos testes subsequentes, possivelmente porque a intensidade da memória não seja o suficiente para evocar esta resposta. Um condicionamento de medo contextual fraco pode ser potencializado por uma experiência aversiva prévia, resultando na expressão de respostas comportamentais não observadas em animais sujeitos somente ao condicionamento. O presente estudo investigou se a estimulação da MCPd poderia promover a síntese de proteínas que poderiam ser utilizadas na formação da memória contextual de medo gerada pelo choque no contexto A. O aumento de PRPs produzidas por neurônios de projeção ascendente poderia estar associado à facilitação da transmissão

sináptica da MCPd, estimulados pela injeção de NMDA, com neurônios pós-sinápticos de regiões importantes para a aprendizagem aversiva contextual. Foi utilizada a administração sistêmica do inibidor de síntese proteica (CHX) imediatamente após a sessão de estimulação da MCPd com NMDA. Os resultados da análise do congelamento durante o condicionamento contextual aversivo mostraram que o tratamento com CHX não prejudicou o aumento do congelamento pós-choque induzido pelo NMDA intra-MCPd, verificado pela ausência de diferença entre os grupos NMDA-CHX e NMDA-SAL. O efeito da injeção sistêmica de CHX não teve repercussão sobre o aumento da expressão de congelamento pós-choque induzida pela estimulação prévia da MCPd, indicando que a sensibilização da resposta ao choque não depende de síntese proteica. É possível que a estimulação dos receptores NMDA na MCPd tenha promovido a sensibilização de vias descendentes por mecanismos independentes da síntese proteica. Por outro lado, quando esta comparação foi feita nas sessões de T1 e T2, uma diferença significativa na expressão do congelamento foi constatada, representada pela diminuição da resposta dos animais tratados com CHX em relação aos animais NMDA-SAL. Estes resultados sugerem que, embora a responsividade ao choque não tenha sido modificada pela CHX, a potencialização do condicionamento foi prejudicada, já que os animais NMDA-CHX apresentaram níveis de congelamento similares aos animais controle que não receberam NMDA intra-MCPd. Assim, parece que o tratamento pós-estimulação da MCPd com CHX preveniu a síntese proteica em projeções importantes para a formação da memória aversiva contextual. Se considerarmos o hipocampo e a amígdala, regiões recrutadas para o armazenamento de experiências emocionais, ativados

em consequência da estimulação da MCPd, seja por vias ascendentes indiretas, é provável que proteínas sintetizadas após este evento estejam contribuindo para a facilitação da consolidação da associação choque-contexto. O prejuízo da resposta ao contexto A nos animais NMDA-CHX foi duradouro, observado no T2 uma semana após os eventos aversivos e a administração das drogas. Portanto, pode-se inferir que o prejuízo sobre a formação da memória foi robusto, já que mesmo uma semana depois não se observou a expressão de resposta defensiva no contexto A. Com este dado, é possível especular que a estimulação da MCPd induz a síntese de proteínas responsáveis por alterações na excitabilidade de regiões envolvidas na consolidação da associação choque-contexto. Proteínas sintetizadas no hipocampo após a estimulação da MCPd poderiam estar disponíveis para facilitar a consolidação da associação choque-contexto segundo a teoria da marcação sináptica (Moncada, Ballarini, *et al.*, 2015). De acordo com esta hipótese, a formação de memórias duradouras depende de pelo menos de dois processos: a formação de uma marca da aprendizagem (*learning tag*) e a síntese de PRPs, que uma vez capturadas nos sítios sinápticos marcados permite a consolidação da memória. Esta teoria explica como treinos fracos, capazes de induzir apenas formas transitórias de memória, podem resultar em memórias duradouras quando ocorrerem temporalmente próximos a outra experiência comportamental relevante. Para que a interação destas experiências ocorra, é necessária uma coincidência temporal, ou seja, por tratar-se de processos transitórios, a síntese das marcas de aprendizagem e das PRPs devem ocorrer dentro de uma janela temporal (para revisão ver Moncada, Ballarini, *et al.*, 2015). A hipótese da marcação comportamental foi testada em uma variedade de modelos para estudo da formação de

memórias. Basicamente, a experiência de um treino fraco foi potencializada por exposições prévias a eventos caracterizados pela novidade, partindo da ideia de que ambas as experiências sejam processadas pelo hipocampo. Com base nisso, seria necessário que os dois eventos ativessem circuitos neurais coincidentes para que haja a interação. Desta forma, a administração de inibidores de síntese proteica no hipocampo imediatamente após a novidade bloqueou o efeito potencializador da memória do treino fraco em diversos trabalhos, sustentando a ideia de que as PRPs formadas na novidade são utilizadas na consolidação desta memória (para revisão ver Moncada, Ballarini, *et al.*, 2015). Porém, nenhum trabalho estudou, sob a hipótese da marcação comportamental, a interação entre duas experiências de caráter emocional negativo.

Não se descarta a hipótese de que a ativação da MCPd possa promover a hiperexcitabilidade da amígdala, através de vias de projeção indiretas. O aumento da expressão da proteína ERK 1/2 fosforilada quantificada na amígdala, foi resultante de uma experiência de estresse por contenção e o bloqueio desta via prejudicou o efeito facilitatório do estresse sobre a aquisição de um condicionamento aversivo contextual (Maldonado, Espejo, *et al.*, 2014). Como a administração foi sistêmica, com este experimento não é possível afirmar em qual estrutura encefálica que esta interação acontece, entretanto, com base na literatura, pode-se especular que a amígdala e o hipocampo estejam envolvidos neste processamento, já que se trata de regiões importantes tanto para o processamento de estímulos aversivos (componente não-associativo) como da associação choque-contexto (componente associativo). Seria importante realizar a infusão do inibidor de síntese proteica diretamente

nestas áreas com o objetivo de confirmar que os dois eventos realizados neste protocolo (ativação da MCPd e o choque) ativam sinapses coincidentes nestas regiões, assim como experimentos de neuroquímica que poderiam indicar com precisão quais áreas são ativadas pela informação ascendente a partir da infusão de NMDA na MCPd.

É importante salientar que a síntese proteica após uma experiência aversiva acontece dentro de uma janela temporal de aproximadamente 6 horas, estabelecida a partir de evidências da literatura e confirmada posteriormente por outros pesquisadores (Schafe e LeDoux, 2000; McGaugh, 2015). Assim, os inibidores de síntese proteica que interferem com o armazenamento da informação devem produzir seus efeitos quando administrados em até 6h após o evento. Então, como grupo controle do efeito da CHX sobre a informação transmitida pela estimulação da MCPd, foi feita a administração sistêmica de CHX 6h após o término da sessão de estimulação da MCPd com NMDA. Este tratamento não prejudicou o aumento da resposta de congelamento nas sessões subsequentes, induzido pela estimulação da MCPd. Desta forma, a síntese proteica, que ocorre após a estimulação da MCPd e que é necessária para a facilitação do condicionamento aversivo contextual, deve ocorrer dentro de uma janela temporal limitada de no máximo 6h. De acordo com este resultado, é possível inferir que PRPs sintetizadas dentro da janela de 6h após a estimulação da MCPd estariam disponíveis para utilização no dia seguinte, quando ocorrer o condicionamento contextual. Com os dados obtidos neste trabalho não se pode afirmar quais regiões cerebrais irão captar estas PRPs, entretanto, com base no conhecimento neuroanatômico das projeções ascendentes da MCPd, pode-se sugerir que áreas importantes para a aquisição da memória

aversiva contextual como o hipocampo e a amígdala podem participar deste processo, já que estas áreas são influenciadas indiretamente pela ativação da MCPd (através das conexões talâmicas e hipotalâmicas).

A etapa de evocação da memória aversiva contextual, que no desenho experimental deste trabalho é representada pela sessão de T1, também promove a síntese de proteínas que é fundamental para a manutenção da memória (Nader, Schafe, *et al.*, 2000). Conforme discutido anteriormente, a evocação no contexto A em T1 tem papel importante na manutenção da memória aversiva contextual. Foi avaliado se a evocação ao contexto A envolveu a síntese proteica e se haveria relação deste fenômeno com o aumento da expressão do congelamento na semana seguinte. Para este objetivo, a CHX foi administrada sistemicamente 30min antes da sessão T1. A administração da CHX 30min antes da sessão de teste 1 foi escolhida com o objetivo de se avaliar tanto os efeitos sobre a expressão da memória contextual como possíveis efeitos sobre a evocação e a reconsolidação. A indução de LTP após a estimulação elétrica de neurônios do giro denteado de ratos é dependente do aumento da expressão dos receptores AMPA subtipos GluR1–3 na densidade pós-sináptica e em sítios extra-sinápticos, em um processo dependente de síntese proteica. Também induz um acúmulo tardio de receptores NMDA, na superfície da membrana e na densidade pós-sináptica, também dependente de síntese proteica. A CHX administrada sistemicamente na dose de 5mg/kg 1h antes do estímulo de alta frequência, promoveu o prejuízo destes processos (Williams, Guevremont, *et al.*, 2007). Além disso, o prejuízo na expressão do comportamento de defesa no teste um dia após a re-exposição ao EC foi

observado quando a CHX foi administrada 1h antes da sessão de re-exposição (Pedreira, Pérez-Cuesta, *et al.*, 2002).

Os dados revelaram que este tratamento não prejudicou a expressão do congelamento em T1, mas houve uma redução significativa do congelamento em T2. Este resultado corrobora os dados da literatura que sugerem a existência da etapa de reconsolidação da memória aversiva contextual, induzida pela re-exposição ao estímulo condicionado (evocação, T1) e dependente de síntese proteica para ser expressa em re-exposição subsequente ao estímulo condicionado (T2). Assim, parece que a sessão T1 que ocorre no terceiro dia do protocolo experimental proposto neste estudo, é uma etapa na qual a memória formada pela associação dos eventos anteriores é susceptível a modificações e sensível à inibição da síntese proteica, sustentando a ideia que esta fase permite a atualização da memória aversiva.

Deste modo, este trabalho fornece uma perspectiva do papel na MCPd em produzir estados aversivos duradouros que contribuem para o processamento associativo de novas experiências aversivas.

6 CONCLUSÕES

A partir da análise dos dados comportamentais obtidos neste estudo, é possível concluir que:

- A estimulação química da MCPd com NMDA tem efeito potencializador sobre o congelamento exibido pelos animais durante as fases do condicionamento aversivo contextual, atuando na facilitação da formação da memória contextual associada ao choque aplicado 24 h após a estimulação da MCPd.
- Os efeitos comportamentais induzidos pela estimulação química da MCPd durante as fases do condicionamento aversivo contextual somente são observados quando a experiência com o choque nas patas é associada 24 h após.
- A exposição ao contexto novo durante a etapa de evocação (dia 3) não elicia a expressão de comportamento defensivo, e promove o prejuízo da manutenção da memória aversiva contextual.
- A ausência de evocação não interfere com a persistência da memória aversiva contextual, observando-se a expressão da memória formada uma semana após o condicionamento.
- A exposição ao contexto novo 48 horas após o choque não prejudica a manutenção da memória aversiva contextual.
- A exposição ao contexto novo 7 dias após o choque não prejudica a manutenção da memória aversiva contextual.

- A evocação no contexto associado à estimulação da MCPd não promove a expressão de congelamento e prejudica a manutenção da memória aversiva contextual associada ao choque.
- O odor associado à estimulação da MCPd apresentado no contexto da estimulação promove a expressão de congelamento e a manutenção da memória aversiva contextual associada ao choque.
- O odor associado à estimulação da MCPd apresentado no contexto novo não promove a expressão de congelamento neste ambiente, mas favorece a manutenção da memória aversiva contextual associada ao choque. Desta forma, pode-se concluir que embora não se observe a expressão do comportamento de congelamento, ocorreu a evocação que contribuiu para a manutenção da associação formada nas experiências aversivas anteriores.
- A cicloheximida administrada por via sistêmica após a sessão de estimulação da MCPd prejudica a facilitação do condicionamento aversivo contextual induzida pela estimulação química da MCPd. Assim, pode-se concluir que o efeito sobre a formação da memória condicionada ao choque depende de proteínas sintetizadas após a estimulação da MCPd.
- A cicloheximida administrada por via sistêmica antes da evocação da memória aversiva contextual no dia 3 prejudica a manutenção da memória aversiva contextual associada ao choque, avaliada uma semana depois. Conclui-se que a etapa de evocação envolve a síntese de proteínas necessárias para a

manutenção da memória formada sob influência da estimulação da MCPd.

O presente trabalho contribui para a expansão do conhecimento acerca dos efeitos promovidos pela estimulação da MCPd. Em resumo, os dados obtidos levam a concluir que a estimulação glutamatérgica da MCPd com agonista do receptor NMDA parece transmitir informação de perigo e promover um estado de alerta duradouro que resulta no aumento da expressão de comportamentos defensivos, associando-se a novas experiências aversivas. Assim, conclui-se que a estimulação da MCP pode servir como experiência aversiva prévia que tem efeito promotor na facilitação do condicionamento contextual aversivo, sendo um componente importante no circuito neural que fornece instrução aversiva para o processamento de experiências aversivas posteriores.

7 REFERÊNCIAS

Abrahams S, Hilton M., Zbrozyna A. Active muscle vasodilatation produced by stimulation of the brain stem: its significance in the defence reaction. *J Physiol.* V.3. p. 491–513. 1960.

Adamec, RE, Burton, P. Shallow T, Budgell J. NMDA receptors mediate lasting increases in anxiety-like behavior produced by the stress of predator exposure—implications for anxiety associated with posttraumatic stress disorder. *Physiol & Behav.* v. 65, p. 723–737. 1999.

Adamec RE, Blundell J, Burton P. Phosphorylated cyclic AMP response element binding protein expression induced in the periaqueductal gray by predator stress: its relationship to the stress experience, behavior and limbic neural plasticity. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.*, v. 8, n. 27 p. 1243–1267. 2003.

Aguiar, DC, Guimarães, FS. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. *J Neurosci Res*, v.87, n.11, p.2418-2429. 2009.

Albin, RL, Makowiec RL, Hollingsworth Z, Dure LS, Penney JB, Young AB. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. *Neurosci Lett*, v.118, n.1, p.112-115. 1990.

Almeida, TF, Roizenblatt, S, Tufik S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res.* v.1000. p. 40 – 56. 2004.

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

Bandler R, Carrive P. Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain Res.* v. 439, p. 95-106. 1988.

Bandler, R., K. A. Keay, Floyd N, Price J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active *vs.* passive emotional coping. *Brain Res Bull*, v.53, n.1, p.95-104. 2000.

Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Ann. Rev. Neurosci.* v. 7. p. 309-38. 1984.

Baratti CM, Boccia MM, Blake MG. Pharmacological effects and behavioral interventions on memory consolidation and reconsolidation. *Braz J Med Biol Res*, v.42, n.2, Feb, p.148-54. 2009.

Behbehani MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol.* v. 46. p. 575–605. 1995.

Beitz, A. J. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal grey of the rat. *Neuroscience.* v. 7. n. 1. p. 33-59. 1982.

Beitz, AJ. The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. *J Comp Neurol*, v.237, n.4, p.445-459. 1985.

Belova MA, Paton JJ, *et al.* Expectation modulates neural responses to pleasant and aversive stimuli in primate amygdala. *Neuron.* v. 55, p. 970-984. 2007.

Benarroch EE . Periaqueductal gray: an interface for behavioral control. *Neurology.* v. 78. n. 3. P. 210-7. 2012.

Bertoglio, LJ, Zangrossi Jr, H. Involvement of dorsolateral periaqueductal gray N-methyl-D aspartic acid glutamate receptors in the regulation of risk assessment and inhibitory avoidance behaviors in the rat elevated T-maze. *Behav Pharmacol*, v.17, n.7, p.589-596. 2006.

Bignante EA, Paglini G, Molina VA. Previous stress exposure enhances both anxiety-like behaviour and p35 levels in the basolateral amygdala complex: modulation by midazolam. *Eur Neuropsychopharmacol*. v. 20, n. 6, p. 388-397. 2010.

Bittencourt, AS., Carobrez AP, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of n-methyl-d aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience*, v.125, n.1, p.71-89. 2004.

Blanchard, RJ, Blanchard DC. Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol*, v.67, n.3, p.370-375. 1969.

Blanchard RJ, Yang M, *et al*. Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. *Neurosci Biobehav Rev*. v. 7-8, p. 587-595. 2001.

Blanchard, DC, Blanchard RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol*, v.39, p.43-68. 1988.

Blair HT, Schafe GE, Bauer EP, Rodrigues SM, LeDoux JE. Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn Mem.* v. 8, p. 229-242. 2001.

Blundell J, Adamec R. Elevated pCREB in the PAG after exposure to the elevated plus maze in rats previously exposed to a cat. *Behav Brain Res.* v. 2, n. 175, p. 285-295. 2006.

Brandão ML, de Aguiar JC, Graeff FG. GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. *Pharmacol Biochem Behav.* v. 16, p. 397-402. 1982.

Briggs JF, Olson BP. Reexposure to the amnesic agent alleviates cycloheximide-induced retrograde amnesia for reactivated and extinction memories. *Learn Mem.* v. 20, p. 285-288. 2013.

Bustos SG, Maldonado H, Molina VA. Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. *Neuroscience.* v. 139, p. 831-842. 2006.

Bustos SG, Maldonado H, Molina VA. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology.* v.34, n.2, p.446-57. 2009.

Calfa G, Volosin M, Molina VA. Glucocorticoid receptors in lateral septum are involved in the modulation of the emotional sequelae induced by social defeat. *Behav Brain Res.* v. 2, n. 172, p 324-332. 2006.

Canteras NS, Goto M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *NeuroReport.* v. 2, n. 10, p. 413-418.1999.

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

Canteras, NS. The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. *Pharmacol Biochem Behav*, v.71, n.3, p.481-491. 2002.

Canteras NS, Chiavegatto S, Ribeiro do Valle LE, Swanson LW. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res Bull.*v. 44, p. 297-305. 1997.

Canteras NS, Kroon JA, Do-Monte FH, Pavesi E, Carobrez AP. Sensing danger through the olfactory system: the role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. *Neurosci Biobehav Rev.* v. 7, p. 1228-1235. 2008.

Canteras NS, Pavesi E, Carobrez AP. Olfactory instruction for fear: neural system analysis. *Front Neurosci.* v. 9, n. 276, p. 1-10. 2015.

Carbó-Tano M, Molina VA, Maldonado H, Pedreira ME. Memory consolidation and reconsolidation in an invertebrate model: the role of the GABAergic system. *Neurosci.* v. 158, p. 387-401. 2009.

Carobrez AP, Schenberg LC, Graeff FG. Neuroeffector mechanisms of the defense reaction in the rat. *Physiol Behav*, v. 31, p. 439-444. 1983.

Carobrez, AP, Teixeira, KV, Graeff FG.. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B 45 receptor. *Neurosci Biobehav Rev*, v.25, n.7-8, p.697-709. 2001.

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

Chen S, Zhou H, Guo S, Zhang J, Qu Y, Feng Z, Xu K, Zheng X. Optogenetics based rat-robot control: optical stimulation encodes "stop" and "escape" commands. *Ann Biomed Eng.* v. 43, p. 1851-1864. 2015.

Coimbra NC, Leão-Borges PC, Brandão ML. GABAergic fibers from substantia nigra pars reticulata modulate escape behavior induced by midbrain central gray stimulation. *Braz J Med Biol Res.* v. 22, p. 111-114. 1989.

Comoli E, Ribeiro-Barbosa ER, Canteras NS. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. *Behav Brain Res.* v. 138, p. 17-28. 2003.

Craig AD. Distribution of brainstem projections from spinal lamina I neurons in the cat and the monkey. *J Comp Neurol.* v. 361. n.2. p. 225-248. 1995.

Davis M, Svensson TH, Aghajanian GK. Effects of d- and l-amphetamine on habituation and sensitization of the acoustic startle response in rats. *Psychopharmacologia.* v. 1, p. 1-11. 1975.

Davis HP, Squire LR. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull.* v. 96. p. 518–559. 1984.

De Lima MA, Baldo MV, Canteras NS. A role for the anteromedial thalamic nucleus in the acquisition of contextual fear memory to predatory threats. *Brain Struct Funct.* v. 222, n. 1, p. 113-129. 2016.

Delgado JMR, Roberts WW, Miller NE. Learning motivated by electrical stimulation of the brain. *Am J Physiol*, v. 179, p. 587–593. 1954.

De Oliveira Alvares L, Crestani AP, Cassini LF, Haubrich J, Santana F, Quillfeldt JA. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*. v. 244. p. 42-48. 2013.

Deisseroth K. Optogenetics. *Nature Met.* v. 8, p. 26–29. 2011.

Di Scala, G., M. J. Mana, Jacobs WJ, Phillips AG. 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.

Dielenberg RA, Hunt GE, McGregor IS. When a rat smells a cat: the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience*, v. 4, n. 104, p. 1085–1097. 2001.

Do Monte FH, Canteras NS, Fernandes D, Assreuy J, Carobrez AP. New perspectives on beta-adrenergic mediation of innate and learned fear responses to predator odor. *J Neurosci*. v. 28, p. 13296-302. 2008.

Dudai Y, Eisenberg M. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron*. v. 44. p. 93–100. 2004.

Dudai, Y. The restless engram: consolidations never end. *Annu. Rev. Neurosci.* v. 35. p. 227–47. 2012.

Duvarci S, Nader K, LeDoux JE. Activation of extracellular signal-regulated kinase- mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for

memory reconsolidation of auditory fear conditioning. *Eur J Neurosci.* v. 21. p. 283-289. 2005.

Eichenbaum, H. *Learning & Memory.* New York, USA: Ed. WW Norton & Company, 2008.

Eisenberg M, Kobilov T, Berman DE, Dudai Y. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science.* v. 301. p. 1102–1104. 2003.

Fanselow MS. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res.* v. 1-2, n. 110, p.73-81. 2000.

Falconi-Sobrinho LL, Anjos-Garcia TD, Elias-Filho DH, Coimbra NC. Unravelling cortico-hypothalamic pathways regulating unconditioned fear-induced antinociception and defensive behaviours. *Neuropharmacol.* v. 113. p. 367-385. 2017.

Forcato C, Rodríguez ML, Pedreira ME, Maldonado H. Reconsolidation in humans opens up declarative memory to the entrance of new information. *Neurobiol Learn Mem.* v. 93. p. 77-84. 2010.

Forcato C, Argibay PF, Pedreira ME, Maldonado H. Human reconsolidation does not always occur when a memory is retrieved: the relevance of reminder structure. *Neurobiol Learn Mem.* v. 91, p. 50-57. 2009.

Giachero M, Bustos SG, Calfa G, Molina VA. A BDNF sensitive mechanism is involved in the fear memory resulting from the interaction between stress and the retrieval of an established trace. *Learn Mem.* v. 5, n. 20, p. 245-255. 2013.

Goswami S, Cascardi M, Rodríguez-Sierra OE, Duvarci S, Paré D. Impact of predatory threat on fear extinction in Lewis rats. *Learn Mem.* v. 10, n. 17, p. 494-501. 2010.

Graeff FG. Minor tranquilizers and brain defense systems. *Braz J Med Biol Res.* v. 14, p. 239–265. 1981.

Graeff FG. Serotonin, the periaqueductal gray and panic disorder. *Neurosci Biobeh Rev.* v. 28, p. 239–259. 2004.

Gray, JA. *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system.* Oxford: Oxford University Press. 1982.

Gross CT, Canteras NS. The many paths to fear. *Nat Rev Neurosci.* v.13, p. 651-8. 2012.

Groves PM, Thompson RF. Habituation: a dual-process theory. *Psychol Rev.* v. 5, n 77, p. 419-450. 1970.

Horovitz O, Richter-Levin G. Dorsal periaqueductal gray simultaneously modulates ventral subiculum induced-plasticity in the basolateral amygdala and nucleus accumbens. *Front Behav Neurosci.* v. 9. p. 53. 2015.

Isoardi NA, Martijena ID, Carrer HF, Molina VA. Increased fear learning coincides with neuronal dysinhibition and facilitated LTP in the basolateral amygdala following benzodiazepine withdrawal in rats. *Neuropsychopharmacol.* v. 10, n. 29, p. 1852-1864. 2004.

Izquierdo I, Medina JH. 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, Furini CR, Myskiw JC. Fear Memory. *Physiol Rev*. v. 96 p. 695-750. 2016.

Jansen ASP, Farkas E, Mac Sams J, Loewy AD. Local connections between the columns of the periaqueductal gray matter: a case for intrinsic neuromodulation. *Brain Res*. v. 797. n. 2. p. 329-336. 1998.

Johansen, JP, Tarpley JW, LeDoux JE, Blair HT. Neural substrates for expectation-modulated fear learning in the amygdala and periaqueductal gray. *Nat Neurosci*, v.13, n.8, p. 979-986. 2010.

Kandel ER, Schwartz JH. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science*. v. 218, n. 4571, p. 433-443. 1982.

Katz PS, Frost WN. Intrinsic neuromodulation: altering neuronal circuits from within, *Trends Neurosci*. v. 19. p. 54-61. 1996.

Keay KA, Feil K, Gordon BD, Herbert H, Bandler R. Spinal afferents to functionally distinct periaqueductal gray columns in the rat: an anterograde and retrograde tracing study. *J Comp Neurol*. v. 385. n. 2. p. 207-229. 1997.

Kelly A, Laroche S, Davis S. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci*. v. 23. p. 5354-5360. 2003.

Kim EJ, Horovitz O, Pellman BA, Tan LM, Li Q, Richter-Levin G, Kim JJ. Dorsal periaqueductal gray-amygdala pathway conveys both innate and learned fear responses in rats. *Proc Natl Acad Sci*, v. 110, p. 14795-14800. 2013.

Kincheski, GC, Carobrez, AP. 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.120-126. 2010.

Kincheski, GC. Condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação química da matéria cinzenta periaqueductal dorsolateral de ratos. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina. 2011.

Kincheski, GC, Mota-Ortiz SR, Pavesi E, Canteras NS, Carobrez AP. The dorsolateral periaqueductal gray and its role in mediating fear learning to life threatening events. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11. 2012.

Kritis AA, Stamoula EG, Paniskaki KA, Vavilis TD. Researching glutamate - induced Cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Front Cell Neurosci*. v. 9, n 91. 2015.

Kroon, JA. O Hipocampo e o Condicionamento Olfatório Aversivo: Mediação por receptores glutamatérgicos subtipo NMDA. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina. 2012.

Kroon, JA, Carobrez AP. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, propranolol or scopolamine. *Neurobiol Learn Mem*, v.91, n.1, p.32-40. 2009.

Krout KE, Loewy AD. Periaqueductal gray matter projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J Comp Neurol.* v. 424. p. 111–141. 2000.

Lamprecht R, LeDoux J. Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci.* v. 5, n. 1, p. 45-54. 2004.

LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci.* n. 23, p. 155-84. 2000.

LeDoux JE. The amygdala. *Current Biology* v. 17, n. 20. 2009.

Lee, JL. Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci,* v. 32, n. 8, p.413-420. 2009.

Lee, JL. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci,* v.11, n.11, p.1264-1266. 2008.

Lee JL. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front Behav Neurosci.* v. 11, n.168. 2010.

Lee SH, Choi JH, Lee N, Lee HR, Kim JI, Yu NK, Choi SL, Lee SH, Kim H, Kaang BK. Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science.* v. 319, p. 1253-1256. 2008.

Liebeskind JC, Guilbaud G, Besson JM, Oliveras JL. Analgesia from electrical stimulation of the periaqueductal gray matter in the cat: Behavioral observations and inhibitory effects on spinal cord interneurons. *Brain Res.* v. 50. p. 441-446. 1973.

Lopez J, Gamache K, Schneider R, Nader K. Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. *J Neurosci.* v. 35. n. 6. p. 2465-2475. 2015.

Maldonado NM, Martijena ID, Molina VA. Facilitating influence of stress on the consolidation of fear memory induced by a weak training: reversal by midazolam pretreatment. *Behav Brain Res.* v. 225, p. 77-84. 2011.

Maldonado NM, Espejo PJ, Martijena ID, Molina VA. Activation of ERK2 in basolateral amygdala underlies the promoting influence of stress on fear memory and anxiety: influence of midazolam pretreatment. *Eur Neuropsychopharmacol.* v. 2, p. 262-270. 2014.

Mantyh PW. Connections of midbrain periaqueductal gray in the monkey: I: ascending efferent projections. *J Neurophysiol.* v. 49. p. 567-581. 1983.

Maren, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annual Review of Neuroscience.* v. 24. p. 897-931. 2001.

Martijena ID, Calvo N, Volosin M, Molina VA. Prior exposure to a brief restraint session facilitates the occurrence of fear in response to a conflict situation: behavioral and neurochemical correlates. *Brain Research.* v.752, p. 136-142. 1997.

McGaugh JL. Time-dependent processes in memory storage. *Science.* v. 16. n. 153. p. 1351-1358. 1966.

McGaugh JL. Memory--a century of consolidation. *Science.* v. 287, n. 5451, p. 248-251. 2000.

McGaugh JL. Consolidating memories. *Annu Rev Psychol.* v. 66, p. 1-24. 2015.

Mckenna JT, Vertes RP. Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *J Comp Neurol*, v. 480, n.2, p.115-142. 2004.

McNally, GP, Johansen, JP, Blair HT. Placing prediction into the fear circuit. *Cell.* v. 334, n.6, p 283-292. 2011.

McNally GP, Pigg M, Weidemann G. Opioid receptors in the midbrain periaqueductal gray regulate extinction of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci.* v. 24, p. 6912-6919. 2004.

McNally GP. Facilitation of fear extinction by midbrain periaqueductal gray infusions of RB101(S), an inhibitor of enkephalin-degrading enzymes. *Behav Neurosci.* v. 119, p. 1672-7. 2005.

McNally GP, Lee BW, Chiem JY, Choi EA. The midbrain periaqueductal gray and fear extinction: opioid receptor subtype and roles of cyclic AMP, protein kinase A, and mitogen-activated protein kinase. *Behav Neurosci.* v. 119, p. 1023-1033. 2005.

Meurisse M, Chaillou E, Lévy F. Afferent and efferent connections of the cortical and medial nuclei of the amygdala in sheep. *J Chem Neuroanat.* v. 37, p. 87-97. 2009.

Miserendino MJ, Sananes CB, Melia KR, Davis M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature.* v. 21, p. 716-718. 1990.

Mochny, CR, Kincheski, GC, Molina VA, Carobrez AP. Dorsolateral periaqueductal gray prior to retrieval potentiates a contextual fear memory in rats. *Behav Brain Res.* v. 237, p. 76– 81. 2013.

Molina VA, Heyser CJ, Spear LP. Chronic variable stress or chronic morphine facilitates immobility in a forced swim test: reversal by naloxone. *Psychopharmacology (Berl).* v. 3, p. 433-440. 1994.

Moncada D, Ballarini F, Viola H. Behavioral Tagging: A Translation of the Synaptic Tagging and Capture Hypothesis. *Neural Plast.*v. 2015. 2015

Montarolo PG, Goelet P, Castellucci VF, Morgan J, Kandel ER, Schacher S. A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science.* v. 234, p. 1249-1254. 1986.

Moraes, CL, Bertoglio LJ, Carobrez AP. Interplay between glutamate and serotonin within the dorsal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior of rats exposed to the elevated plus-maze. *Behav Brain Res,* v.194, n.2, p.181-186. 2008.

Moss MS, Glazer, EJ, Basbaum AI. The peptidergic organization of the cat periaqueductal grey: The distribution of enkephalin-containing neurons and terminals. *J. Neurosci.* v. 3. p. 603-616. 1983.

Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature,* v. 406, p. 722-726. 2000.

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

Nader K, Hardt O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat. Rev. Neurosci.* v.10, p. 224–234. 2009.

Nashold, BS, Jr., Wilson WP, Slaughter DG. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg.* v.30, n.1, p.14-24. 1969.

Ossipov, MH. The perception and endogenous modulation of pain. *Scientifica.* v. 2012, p. 1-25. 2012.

Pavesi, E., Canteras NS, Carobrez AP. Acquisition of pavlovian fear conditioning using beta Adrenoceptor activation of the dorsal premammillary nucleus as an unconditioned stimulus to mimic live predator-threat exposure. *Neuropsychopharmacology.* v. 36, p. 926–939. 2011.

Pavlov, IP. *Conditioned Reflexes.* New York: Dover. 1927.

Parrott-Sheffer, C., Tikkanen, A. Animal Learning. In: *Encyclopedia Britannica online.* 2007. Disponível em: <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/1349539/animal-learning/61996/Types-of-learning?anchor=ref320590>> acesso em 05/01/2017.

Parsons RG, Gafford GM, Helmstetter FJ. Regulation of extinction related plasticity by opioid receptors in the ventrolateral periaqueductal gray matter. *Front Behav Neurosci.* v. 4. 2010.

Pedreira, ME, Dimant B. Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav.* v.52, n.2, p. 385-95. 1995.

Pedreira ME, Maldonado H. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* v. 38, p. 863–869. 2003.

Pedreira ME, Pérez-Cuesta LM, Maldonado H. Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *J Neurosci*. v. 22, p. 8305-8311. 2002.

Perusini JN, Meyer EM, Long VA, Rau V, Nocera N, Avershal J, Maksymetz J, Spigelman I, Fanselow MS. Induction and expression of fear sensitization caused by acute traumatic stress. *Neuropsychopharmacology*. v.1, p. 45-57. 2016.

Phillips, RG, Ledoux, JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci*, v. 106, p. 274-285, 1992.

Pinsker HM, Hening WA, Carew TJ, Kandel ER. Long-term sensitization of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*. v.182, n. 4116, p. 1039-1042. 1973.

Pitman RK. Overview of biological themes in PTSD. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. v.821, p. 1-9. 1997.

Przybylski J, Sara SJ. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res*. v. 84. p. 241-246. 1997.

Rang, HP, Dale, MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia*. 7a. edição. 2007.

Rau V, DeCola JP, Fanselow MS. Stress-induced enhancement of fear learning: an animal model of posttraumatic stress disorder. *Neurosci Biobehav Rev.* v. 29, n 8, p. 1207-1223. 2005.

Rau V, Fanselow MS. Exposure to a stressor produces a long lasting enhancement of fear learning in rats. *Stress.* v.12, n. 2, p. 125-133. 2009.

Risold PY, Canteras NS, Swanson LW. 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.

Risold PY, Thompson RH, Swanson LW. The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. *Brain Res Rev.* v. 24, n. 2-3, p.197-254. 1997.

Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE. Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron.* v. 44, p. 75-91. 2004.

Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE. Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci.* v. 21, n. 17, p. 6889-6896. 2001.

Rodríguez-Manzanares PA, Isoardi NA, Carrer HF, Molina VA. Previous stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition, and increases synaptic plasticity in the rat basolateral amygdala. *J Neurosci.* v.25, n. 38, p. 8725-34. 2005.

Rogan MT, Stäubli UV, LeDoux JE . Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature.* v. 390. p. 604-607. 1997.

Rose, JK e Rankin CH. Blocking memory reconsolidation reverses memory-associated changes in glutamate receptor expression. *J Neurosci*, v.26, n.45, p.11582-11587. 2006.

Roosendaal B, McEwen BS, Chattarji S. Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci*. v. 10, p. 423-33. 2009.

Rumpel S, LeDoux JE, Zador A, Malinow R. Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science*. v. 308, n. 5718, p. 83-88. 2005.

Sara SJ. Strengthening the shaky trace through retrieval. *Nat Rev Neurosci*. v. 3. p. 212-3. 2000.

Schafe GE, LeDoux JE. Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci*. v. 20, n. 18. 2000.

Selden, NR, Everitt, BJ, Jarrard LE, Robbins TW. Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neurosci*. v. 42, p. 335-350, 1991.

Servatius RJ, Shors TJ. Exposure to inescapable stress persistently facilitates associative and nonassociative learning in rats. *Behav Neurosci*. v. 108, n. 6, p. 1101-1106. 1994.

Shi CJ, Cassell MD. Perirhinal cortex projections to the amygdaloid complex and hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol*. v. 406, p. 299-328. 1999.

Shuster L, Webster GW, Yu G. Increased running response to morphine in morphine-pretreated mice. *J Pharmacol Exp Ther.* v.192, n. 1, p. 164-7. 1975.

Souza RR, Carobrez AP. Acquisition and expression of fear memories are distinctly modulated along the dorsolateral periaqueductal gray axis of rats exposed to predator odor. *Behav Brain Res.* n.315, p. 160–167. 2016.

Souza RR, Dal Bó S, de Kloet ER, Oitzl MS, Carobrez AP. Paradoxical mineralocorticoid receptor-mediated effect in fear memory encoding and expression of rats submitted to an olfactory fear conditioning task. *Neuropharmacology.* v. 79, p. 201-211. 2014.

Squire R. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol. Learn. Mem.* v. 82. p. 171–177. 2004.

Stam R. PTSD and stress sensitisation: A tale of brain and body Part 2: Animal models. *Neurosci Biobehav Rev.* v. 4, n. 31. P. 558–584. 2007.

Sukikara MH, Mota-Ortiz SR, Baldo MV, Felicio LF, Canteras NS. The periaqueductal gray and its potential role in maternal behavior inhibition in response to predatory threats. *Behav Brain Res.* v. 209, p. 226-33. 2010.

Sweatt JD. Neural plasticity & behavior - sixty years of conceptual advances. *J Neurochem.* v. 139, p. 179-199. 2016.

Teixeira, KV, Carobrez AP. Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plusmaze task. *Behav Neurosci,* v.113, n.1, p.196-203. 1999.

Tonetto, LL, Terzian AL, Del Bel EA, Guimarães FS, Resstel LB. Inhibition of the NMDA receptor/Nitric Oxide pathway in the dorsolateral periaqueductal gray causes anxiolytic-like effects in rats submitted to the Vogel conflict test. *Behav Brain Funct*, v.5, p.40. 2009.

Tronson NC, Taylor JR. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Rev*. v 8, p. 262-75. 2007.

van Groen T, Kadish I, Wyss JM. Efferent connections of the anteromedial nucleus of the thalamus of the rat. *Brain Res Rev*. v. 30, n. 1, p. 1-26. 1999.

Vianna DM, Borelli KG, Ferreira-Netto C, Macedo CE, Brandão ML. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. *Brain Res Bull*, v.6 2, n.3, p.179-189. 2003.

Wiedenmayer CP. Adaptations or pathologies? Long-term changes in brain and behavior after a single exposure to severe threat. *Neurosci Biobehav Rev*. v. 1. p. 1-12. 2004.

Williams, JM, Guevremont D, Mason-Parker SE, Luxmanan C, Tate WP, Abraham WC. Differential trafficking of ampa and NMDA receptors during long-term potentiation in awake adult animals. *J Neurosci*. v. 27, p. 14171–14178. 2007.

Wright, JS, Panksepp, J. Toward affective circuit-based preclinical models of depression: Sensitizing dorsal PAG arousal leads to sustained suppression of positive affect in rats. *Neurosci Behav Rev*. v. 9, p. 1902-1915. 2011.

Zhang S, Cranney J. The role of GABA and anxiety in the reconsolidation of conditioned fear. *Behav Neurosci.* v. 122, p. 1295-1305. 2008.

APÊNDICE A – Fases da memória

As memórias são formadas e expressas em diferentes etapas do processamento da experiência. A formação da memória compreende a etapa inicial, aquisição, que ocorre durante a experiência e a consolidação, que ocorre ao término do evento a ser armazenado. As memórias associativas podem ser evocadas posteriormente através da apresentação de um estímulo associado à experiência inicial e expressa através de respostas comportamentais, fisiológicas e endócrinas. Já as memórias não associativas podem ser evocadas mediante a apresentação de estímulo idêntico (na memória de habituação) ou semelhante (na sensibilização) ao inicial.

Manipulações farmacológicas realizadas antes do início do evento a ser aprendido podem interferir na aquisição enquanto que as manipulações realizadas após o evento podem interferir na sua consolidação. Por exemplo, em ratos de laboratório, a administração sistêmica de agentes amnésicos como a escopolamina, midazolam ou propranolol, 30 min antes da sessão de condicionamento foi capaz de promover o prejuízo na aprendizagem, refletido na redução da expressão das respostas condicionadas observadas em sessões de teste posteriores (Kroon e Carobrez, 2009). O resultado desta manipulação foi interpretado como prejuízo na aquisição, já que a experiência foi realizada sob efeito das drogas injetadas.

A consolidação da memória refere-se a uma etapa que consiste no armazenamento das informações adquiridas na experiência. Atualmente sugere-se que a consolidação ocorre em dois níveis de descrição e análise: a consolidação sináptica / celular e a consolidação sistêmica. A consolidação sináptica constitui um fenômeno no qual o

estímulo induz a ativação de cascatas de sinalização intracelular que resulta em modificações pós-translacionais, modulação da expressão gênica e síntese de produtos gênicos que alteram a eficácia sináptica (McGaugh, 2000; Dudai, 2012). O estímulo capaz de desencadear este processo pode ser de natureza interoceptiva ou informações fornecidas através da percepção do meio externo (Dudai, 2012). Postulou-se que a consolidação sináptica ocorre dentro de uma janela temporal que inicia-se após o evento e tem duração aproximada de 6 h, período no qual intervenções farmacológicas ou comportamentais podem interferir com a síntese proteica (Pedreira *et al.*, 1995). Através destas alterações moleculares, a informação é codificada em um registro físico e duradouro em sinapses do circuito neural ativado durante a aprendizagem, caracterizando o chamado *engrama* (ou traço da memória) (Dudai, 2012). A figura 30 ilustra as principais vias de sinalização intracelular ativadas na consolidação de memórias aversivas. Os principais modelos celulares que representam a memória são a LTP (potenciação de longa-duração, “*long-term potentiation*”) e a LTD (depressão de longa-duração, “*long-term depression*”), que consistem em alterações da eficácia de uma ou várias sinapses envolvidas durante a aprendizagem (para revisão ver Izquierdo, Furini, *et al.*, 2016). Portanto, a interferência na etapa da consolidação é feita através de intervenções realizadas imediatamente após o evento. A administração de drogas com propriedades amnésicas (benzodiazepínicos, antagonistas de receptores muscarínicos, inibidores de síntese proteica, inibidores da enzima sintase-óxido-nítrico) após a aprendizagem prejudicaram a expressão das respostas condicionadas em paradigmas de condicionamento (Baratti, Boccia *et al.*, 2009), caracterizando a interferência na fase de consolidação.

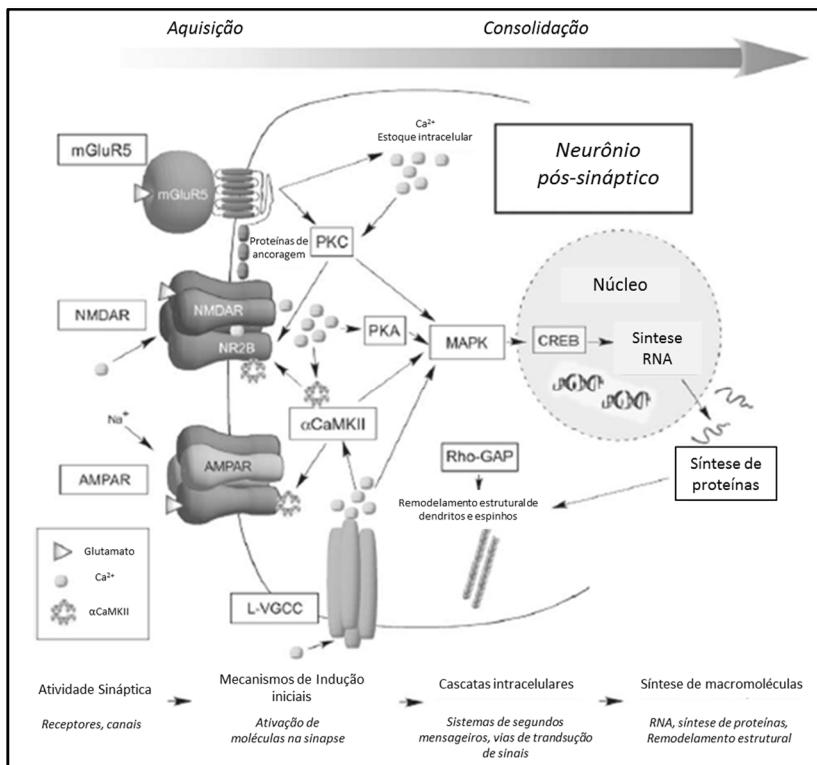


Figura 30. Principais vias de sinalização intracelular ativadas na consolidação sináptica de memórias aversivas. Adaptado de Rodrigues, Schafe *et al.*, 2004.

Após a consolidação, a memória passa a ser chamada de memória de longa-duração (LTM, “*long-term memory*”) (McGaugh, 1996). A consolidação sistêmica refere-se a um processo hipotético de reorganização na distribuição da LTM nos circuitos neurais, especificamente no sistema cortico-hipocampal, que ocorre após a codificação da representação interna da experiência (Eichenbaum, 2008). Este processo pode ter duração prolongada por anos após a experiência,

dependendo do sistema ao qual pertence a memória, da tarefa aprendida e de características da representação interna dos estímulos codificados (Squire, 2004; Dudai, 2012).

A evocação das memórias aversivas formadas em processos associativos ocorre na reexposição ao EC. Evocação é o termo que refere ao acesso à memória e remete a uma lembrança consciente da experiência inicial. Durante esta sessão, se observa a expressão da resposta comportamental condicionada, evidenciando a evocação e confirmando a formação da associação EC-EI em animais de laboratório (Davis e Squire, 1984). Entretanto, a ausência da expressão de comportamento defensivo não significa necessariamente que não houve evocação, pois avaliando-se apenas o comportamento não é possível afirmar sobre a ativação dos circuitos neurais que armazenam a memória durante a reexposição ao EC. Por muito tempo acreditou-se que a evocação seria um processo passivo, entretanto, Lopez e colaboradores demonstraram recentemente que trata-se de um processo ativo que requer níveis estáveis do receptor GluA1 (subtipo AMPA) na pós-sinapse para que a expressão do comportamento ocorra (Lopez, Gamache *et al.*, 2015). O tratamento intra-amígdala com inibidores de síntese proteica (rapamicina e anisomicina) realizado antes da re-exposição ao EC promoveu um prejuízo transitório da expressão da resposta defensiva condicionada não mais observado na sessão subsequente realizada 3 h após, na ausência da droga (Lopez, Gamache, *et al.*, 2015), sugerindo que a LTM armazenada não foi afetada pelo tratamento.

Por outro lado, a administração de agentes amnésicos e inibidores de síntese proteica após a expressão da memória no teste de evocação pode interferir com a manutenção da LTM. Segundo a hipótese tradicional da

consolidação, as memórias seriam formadas em um período finito e uma vez codificadas, estariam acessíveis e não mais sujeitas a interferências. Entretanto, em 1968 Misanin e colaboradores desafiaram esta teoria ao mostrar que a apresentação da pista seguida da administração de um agente amnésico bloqueou a LTM, sugerindo que um novo período de labilidade da memória ocorreu deixando-a novamente susceptível a interferência (Misanin *et al.*, 1968 *apud* Nader, 2003). Este mecanismo pelo qual a memória acessada se torna novamente lábil foi denominado “reativação” e esta etapa do processamento da memória ficou conhecida como “reconsolidação”, por caracterizar-se por um período no qual ocorre um processo molecular tipo-consolidação (Pzybyslawski e Sara, 1997). Através de estudos de condicionamento aversivo em animais de laboratório, verificou-se que a LTM reativada poderia ser bloqueada por uma variedade de agentes amnésicos e inibidores de síntese proteica administrados sistemicamente ou localmente na amígdala ou no hipocampo após a evocação, interferindo com a reconsolidação sináptica / celular, ou ainda por lesões no hipocampo, prejudicando assim a reconsolidação sistêmica (Nader, Schafe, *et al.*, 2000; Nader, 2003).

O estudo da etapa de reconsolidação despertou o interesse dos neurocientistas por oferecer uma oportunidade de modificar a memória original, que teria importância clínica para o possível tratamento de patologias associadas à memórias traumáticas. Estudos foram conduzidos utilizando uma variedade de paradigmas, inclusive em humanos (Schiller e Phelps, 2011; Forcato, Argibay, *et al.*, 2009), para investigar as características deste fenômeno. Entretanto, a re-exposição ao EC nem sempre é capaz de reativar a memória e torná-la susceptível à interferência (Bustos *et al.*, 2009; Forcato, Argibay, *et al.*, 2009): a identificação do

instante exato para que a intervenção tenha sucesso depende da tarefa e da cinética da apresentação da pista (Dudai, 2012). Manipulações experimentais da re-exposição ao EC e de características da memória associativa foram investigadas a fim de caracterizar a reativação. (Bustos et al., 2009). Em animais de laboratório foram estabelecidas algumas condições limitantes para a observação do fenômeno, como a intensidade do treino de condicionamento (Suzuki et al., 2004), a idade da memória, isto é, manipulações no intervalo entre o treino e a reexposição ao EC (Suzuki et al., 2004), e o tempo de exposição ao EC (Pedreira e Maldonado, 2003). Ainda assim, achados contraditórios apontam para a dificuldade em estabelecer critérios e condições para que a sessão de reativação seja eficaz em reativar a memória (para revisão, ver Nader e Hardt, 2009).

Do ponto de vista molecular, muitos avanços foram alcançados e contribuíram para o entendimento da evocação como um fenômeno ativo, desencadeado pela reexposição ao EC. Protocolos experimentais nos quais a sessão de reexposição ao EC foi capaz de induzir a susceptibilidade da memória a intervenções que modificaram a expressão comportamental no teste subsequente foram amplamente aceitos como modelos para estudo da etapa de reconsolidação. Esta sessão de re-exposição foi denominada “reativação”, embora seja importante salientar que nem toda re-exposição apresenta as características necessárias para reativar a memória. Esta inferência só é coerente quando tratamentos conhecidamente amnésicos, aplicados nesta fase, são capazes de promover o prejuízo da expressão da memória em testes subsequentes, após 24 h, no mínimo, e que este prejuízo seja duradouro, podendo ser observado após no mínimo uma semana. Trata-se de um procedimento

sensível a ação de inibidores de síntese proteica (Nader, Schafe *et al.*, 2000; Pedreira, Pérez-Cuesta *et al.*, 2002), dependente da atividade de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA (Pedreira, Pérez-Cuesta, *et al.*, 200) e da cascata de sinalização intracelular da MAPK/ERK (Duvarci, Nader *et al.*, 2005; Kelly, Laroche *et al.*, 2003). A modulação da transmissão GABAérgica através de agonistas do sítio benzodiazepínico como, por exemplo o midazolam (Bustos, Maldonado *et al.*, 2006) ou o agonista clássico do sítio de ligação para o GABA, muscimol), apresentam efeito amnésico quando administrados imediatamente após a sessão de reativação, enquanto que a administração do antagonista GABA (bicuculina), não tem efeito nesta etapa (Zhang e Cranney, 2008). Dentre os fatores de transcrição cuja ativação já foi relacionada com a etapa de reconsolidação, destaca-se o Zif268, que parece ser o marcador dissociativo da consolidação, que é ativado apenas nas condições da reativação da memória após a reexposição ao EC (Lee *et al.*, 2004). Para revisão dos mecanismos moleculares e sistemas de neurotransmissão elucidados para a etapa de reconsolidação, ver Tronson e Taylor, 2007. Adicionalmente, é importante comentar que o processo molecular que sustenta a reativação da memória é dependente da degradação de proteínas sinápticas via proteassoma-ubiquitina. Este mecanismo foi elucidado em um experimento que verificou que a administração do composto β -lactona-clasto-lactacistina (β -lac), um inibidor de proteassoma, reverteu o efeito amnésico da anisomicina (inibidor de síntese proteica) administrada no hipocampo de ratos após a re-exposição ao EC, mas não após o treino, em um paradigma de condicionamento aversivo contextual (Lee, Choi *et al.*, 2008). O conhecimento dos processos moleculares descritos fornece ferramentas

importantes para a investigação experimental da reconsolidação de memórias aversivas.

Segundo Dudai (2012), a reconsolidação é uma nomenclatura dada a um processo que ocorre durante a consolidação tardia (ou sistêmica), cuja função seria atualizar a informação aprendida. Dados obtidos com estudos em humanos mostram que a evocação permite que novas informações sejam incorporadas à memória original (Forcato, Rodríguez *et al.*, 2010), sustentando a ideia de que este fenômeno teria um propósito adaptativo. Lee (2010) demonstrou que a atualização de uma memória contextual com a informação nova do choque é dependente da transcrição do Zif268 e da reativação da memória dependente da degradação proteica, em um protocolo experimental no qual o choque foi apresentado na re-exposição ao contexto. A condição para que a memória reativada seja atualizada é que exista informação nova, durante a reativação, para ser incorporada à memória original (Dudai, 2012; De-Oliveira Álvares, Crestani, *et al.*, 2013). Por exemplo, em um paradigma de treino forte de condicionamento aversivo auditivo, somente a re-exposição ao EC-EI no mesmo intervalo do treino foi insuficiente para tornar a memória sensível a ação da anisomicina administrada intra-LA imediatamente após. Entretanto, quando a rerepresentação da associação EC-EI foi modificada temporalmente, a anisomicina foi capaz de promover a redução da resposta condicionada, indicando que a modificação do intervalo temporal da associação EC-EI foi interpretada como novidade e incorporada à memória original (Días-Mataix *et al.*, 2013) confirmando a importância dos aspectos temporais relacionados com a aprendizagem. Adicionalmente, a valência emocional da memória também pode ser atualizada, e promover a redução da aversividade.

Haubrich e colaboradores (2015) utilizaram a introdução de um estímulo apetitivo prazeroso durante a reativação de uma memória aversiva e verificaram o prejuízo da resposta condicionada no teste subsequente, em um mecanismo dependente da ativação de receptores NMDA no hipocampo durante a reativação.

Outra função biológica atribuída à reconsolidação é o fortalecimento da memória original (Sara, 2000). Uma sessão de treino adicional é capaz de fortalecer o treino de condicionamento aversivo contextual apenas quando o processo de desestabilização da memória ocorre através da evocação, em um desenho experimental que permite a reativação, e é dependente da expressão de Zif268 e da degradação proteica (Lee, 2008).

Assim, pode-se afirmar que a aprendizagem e manutenção de memórias aversivas é um processo dinâmico e sensível a novas experiências que definem a importância e o armazenamento da informação.