

Caroline Ferraz Webber

**PAPEL DOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> DA MATÉRIA CINZENTA  
PERIAQUEDUTAL DORSAL NA AQUISIÇÃO DO  
CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a obtenção do  
Grau de mestre em Farmacologia  
Orientador: Prof. Dr. Antonio de Pádua Carobrez  
Coorientador: Profa. Dra. Eloisa Pavesi

Florianópolis  
2016

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

Webber, Caroline Ferraz

Papel dos receptores 5-HT1A da matéria cinzenta periaquedutal dorsal na aquisição do condicionamento aversivo olfatório / Caroline Ferraz Webber ; orientador, Antonio de Pádua Carobrez, coorientadora, Eloisa Pavesi, 2016.

72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2016.

Inclui referências.

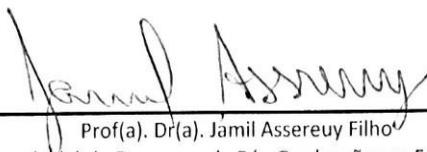
1. Farmacologia. 2. Condicionamento aversivo olfatório. 3. Sistema serotoninérgico. 4. Matéria cinzenta periaquedutal. 5. Comportamento defensivo . I. Carobrez, Antonio de Pádua . II. Pavesi, Eloisa. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

**“Papel dos receptores 5-HT1A da matéria cinzenta periaquedutal dorsal na aquisição do condicionamento aversivo olfatório”**

Por

**Caroline Ferraz Webber**

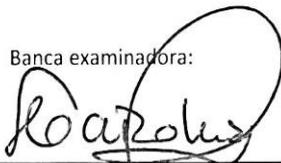
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (30/PPGPMC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



---

Prof(a). Dr(a). Jamil Assereuy Filho  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



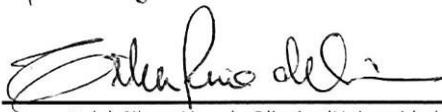
---

Dr(a) Antônio de Pádua Carobrez (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



---

Dr(a) Hélio Zangrossi Junior (Universidade de São Paulo - videoconferência)



---

Dr(a) Cilene Lino de Oliveira (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr(a) Carlos Rogério Tonussi (Universidade Federal de Santa Catarina)

Este trabalho é dedicado aos meus pais,  
Carlos e Sônia, por serem minha base.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Antonio de Pádua Carobrez por ter aberto as portas do laboratório, me orientado e por ter contribuído para meu crescimento pessoal e profissional.

À Dra. Eloisa Pavesi pela co-orientação, ajuda e amizade desses dois anos de trabalho.

À Marina, Suélen e Ana Idalina agradeço imensamente pela amizade e acolhimento com que me receberam nesta fase de mudança.

Aos funcionários e professores do Departamento de Farmacologia.

Às amigas (Marialine, Juliana, Lauren, Gleice, Bianca, Adriéli, Mariana e Carlise) de Getúlio Vargas por não desistirem de mim mesmo me ausentando por longos períodos até o final deste processo.

Gratidão incondicional aos meus pais por apoiarem sempre meu crescimento apesar das dificuldades.

Ao CNPQ e Capes pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Pistas olfatórias em modelos animais de condicionamento aversivo ativam estruturas encefálicas relacionadas à respostas de defesa, como a região dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPd). A estimulação química dessa região é capaz de promover um estímulo de caráter motivacional de valência negativa que dá suporte a um condicionamento aversivo para estímulos olfatórios. Vias serotoninérgicas oriundas do núcleo dorsal da rafe inibem a MCPd por atuar em receptores 5-HT<sub>1A</sub> naquela região, assim, o presente estudo foi delineado para testar a hipótese que os receptores 5-HT<sub>1A</sub> atuam na MCP modulando os comportamentos defensivos e a aquisição de memórias aversivas em animais. Para verificar a participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> da MCPd na aquisição de um condicionamento aversivo olfatório utilizou-se o agonista hidrobrometo de 8-hidroxi-2-dipropilaminotetralina (8-OH-DPAT) e o antagonista (maleato de N-[2- [4- (2-metoxifenil) -1-piperazinil] etil] -N- 2- piridinilciclohexanocarboxamida) WAY100635, além do N-Metil-D aspartato (NMDA), aminoácido excitatório utilizado para estimulação da região encefálica. Os animais receberam 8-OH-DPAT ou WAY antes da estimulação química da MCPd com NMDA permanecendo em contato com a pista olfatória (100µL de acetato de amila) por 10 minutos. No dia seguinte, os animais foram expostos a caixa de odor para livre exploração, em ambiente neutro e 24h depois foram reexpostos ao estímulo condicionado (odor) por 10 minutos. Foram avaliados os comportamentos exploratórios tais como a exploração vertical e a horizontal, e os defensivos como congelamento, agachar-cheirar e fuga. Os animais que receberam doses de NMDA (12,5; 25, 50 e 100pmol) apresentaram um aumento nas respostas defensivas e redução das respostas exploratórias na sessão de condicionamento e a dose de 50pmol foi capaz de dar suporte a aquisição de um condicionamento aversivo olfatório. Os resultados confirmaram a hipótese da modulação serotoninérgica influenciar a aquisição de um condicionamento olfatório, bem como produzir mudanças nas respostas comportamentais dos animais. O 8-OH-DPAT 4nmol associado à estimulação com NMDA 100pmol foi capaz de diminuir as respostas defensivas extremas nos animais, além de ambas doses (4 e 8nmol) facilitarem a aquisição do condicionamento olfatório. Por outro lado, o bloqueio dos receptores 5HT<sub>1A</sub>, produzido por WAY 0,4 e 0,8nmol anterior à utilização de NMDA 25pmol gerou aumento nas respostas defensivas e diminuição dos comportamentos exploratórios dos animais, além de favorecer o condicionamento aversivo olfatório. Doses maiores (0,8 e 2,0nmol) também foram capazes de provocar aprendizado sem a necessidade de NMDA como estímulo incondicionado. Por fim, o presente estudo confirmou a hipótese de a modulação serotoninérgica

influenciar a aquisição de um condicionamento olfatório pela estimulação química da MCPd, bem como produzir mudanças nas respostas comportamentais dos animais. Os receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> da MCPd modulam as respostas defensivas durante a aquisição de um condicionamento aversivo olfatório.

**Palavras-chave:** Condicionamento aversivo olfatório. Matéria cinzenta periaquedutal. Sistema serotoninérgico. Comportamento defensivo.

## ABSTRACT

Olfactory cues in animal aversive conditioning models activate encephalic structures related to the defensive response, as the dorsal periaqueductal gray matter (dPAG). The chemical stimulation of this region is able to promote a motivational character stimulus of negative valence, which supports an olfactory aversive conditioning. There are serotonergic tracks, originated from the dorsal raphe nucleus, which inhibit the dPAG by acting on 5-HT<sub>1A</sub> receptors in that region. The present study was outlined to test the hypothesis that the 5-HT<sub>1A</sub> receptors act on the dPAG modulating the defensive behaviors and the acquisition of aversive memories in animals. In order to verify the participation of dPAG's 5-HT<sub>1A</sub> serotonergic receptors in the acquisition of an olfactory aversive conditioning, the 8-hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin hydrobromide (8-OH-DPAT) agonist and the (N-[2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexane carboxamide maleate) WAY100635 antagonist have been employed, as well as the N-Methyl-D aspartic acid (NMDA), an excitatory amino acid used to stimulate the encephalic region. The animals received 8-OH-DPAT or WAY prior to the dPAG chemical stimulation, with the NMDA in contact with the olfactory cue (100µL of amyl acetate) for 10 minutes. The day after, the animals were placed into the odor exposition box for free exploration and 24h later re-exposed to the conditioned stimulus (odor) for 10 minutes. Exploratory behavior such as, the vertical and horizontal exploration, as well as defensive behaviors like freezing, crouch-sniff and escape were scored. Animals that received NMDA (12,5; 25, 50 e 100pmol) presented an increase in the defensive responses and a reduction in the exploratory ones during the conditioning session, being the 50pmol dose capable of supporting the acquisition of an olfactory aversive conditioning. The present study confirmed the serotonergic modulation hypothesis influencing the acquisition of an olfactory conditioning, as well as producing changes in the defensive responses of the animals. The 8-OH-DPAT 4nmol related to the stimulation with NMDA 100pmol was able to decrease the defensive responses of the animals, moreover both doses (4 e 8nmol) facilitate the acquisition of the olfactory conditioning. The blocking led by WAY 0,4 e 0,8nmol prior the use of NMDA 25pmol generated an increase in the defensive responses and a decrease of the exploratory behavior of the animals, besides benefiting the olfactory aversive conditioning. Higher doses (0,8 e 2,0nmol) were also able to promote learning without the need of NMDA as an unconditioned stimulus. Therefore, the present study confirmed the hypothesis of the serotonergic modulation influencing the acquisition of the olfactory conditioning due to the chemical stimulation of the dPAG, besides promoting behavior changes in the response behavior of animals. The serotonergic receptors 5-HT<sub>1A</sub> of dPAG modulate the defensive responses during the acquisition of the aversive olfactory conditioning.

**Keywords:** Olfactory aversive conditioning. Periaqueductal gray matter. Serotonergic system. Defensive behavior.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protocolo experimental do condicionamento aversivo olfatório induzido pela estimulação química da MCPd.....	27
Figura 2. Fotomicrografia da secção coronal dos cérebros mostrando pela seta da MCPd.....	30
Figura 3. Comportamentos defensivos (A e C) e comportamentos exploratórios (B e D) durante a sessão de condicionamento na caixa de condicionamento após a estimulação química com NMDA. ....	34
Figura 4. Comportamentos analisados durante a sessão de teste exibidos por ratos durante a exposição ao estímulo condicionado olfatório.....	36
Figura 5. Comportamentos defensivos (A e C) e comportamentos exploratórios (B e D) durante a sessão de condicionamento na caixa de condicionamento após a microinjeção de 8-OH-DPAT.....	38
Figura 6. Comportamentos analisados durante a sessão de teste exibidos por ratos durante a exposição ao estímulo condicionado olfatório.....	39
Figura 7. Comportamentos defensivos (A e C) e comportamentos exploratórios (B e D) durante a sessão de condicionamento na caixa de condicionamento após a modulação com 8-OH-DPAT e NMDA. A flecha vertical indica o momento das microinjeções na MCPd.. ....	42
Figura 8. Comportamentos analisados durante a sessão de teste exibidos por ratos durante a exposição ao estímulo condicionado olfatório.....	44
Figura 9. Comportamentos defensivos (A e C) e comportamentos exploratórios (B e D) durante a sessão de condicionamento na caixa de condicionamento após a microinjeção de WAY.. ....	46
Figura 10. Comportamentos analisados durante a sessão de teste exibidos por ratos durante a exposição ao estímulo condicionado olfatório.....	48
Figura 11. Comportamentos defensivos (A e C) e comportamentos exploratórios (B e D) durante a sessão de condicionamento na caixa de condicionamento após a modulação com WAY e NMDA.....	50
Figura 12. Comportamentos analisados durante a sessão de teste exibidos por ratos durante a exposição ao estímulo condicionado olfatório.....	52
Figura 13. Comportamentos defensivos (A e C) e comportamentos exploratórios (B e D) durante a sessão de condicionamento na caixa de condicionamento após a modulação com RLZ e WAY.. ....	54
Figura 14. Comportamentos analisados durante a sessão de teste exibidos por ratos durante a exposição ao estímulo condicionado olfatório.....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comportamentos exploratórios analisados durante a sessão de familiarização na caixa de condicionamento avaliados anteriormente à estimulação com NMDA. ....	33
Tabela 2. Comportamentos defensivos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de condicionamento avaliados anteriormente à estimulação com NMDA. ....	33
Tabela 3. Comportamentos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de exposição ao odor após o condicionamento com NMDA. ....	35
Tabela 4. Comportamentos exploratórios analisados durante a sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à infusão de 8-OH-DPAT. ....	37
Tabela 5. Comportamentos defensivos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à infusão de 8-OH-DPAT. ....	37
Tabela 6. Comportamentos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de exposição ao odor após o condicionamento com 8-OH-DPAT. ....	39
Tabela 7. Comportamentos exploratórios analisados durante sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à modulação com 8-OH-DPAT e NMDA. ....	40
Tabela 8. Comportamentos defensivos analisados durante sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à modulação com 8-OH-DPAT e NMDA. ....	41
Tabela 9. Comportamentos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de exposição ao odor após o condicionamento com 8-OH-DPAT e NMDA. ....	43
Tabela 10. Comportamentos exploratórios analisados na sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à infusão de WAY. ....	45
Tabela 11. Comportamentos defensivos analisados na sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à infusão de WAY. ....	45
Tabela 12. Comportamentos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de exposição ao odor após o condicionamento com WAY. ....	47
Tabela 13. Comportamentos exploratórios analisados durante a sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à modulação com WAY e NMDA. ....	49

Tabela 14. Comportamentos defensivos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à modulação com WAY e NMDA. ....	49
Tabela 15. Comportamentos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de exposição ao odor após o condicionamento com WAY e NMDA.	51
Tabela 16. Comportamentos exploratórios analisados na sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à infusão de RLZ e WAY. ....	53
Tabela 17. Comportamentos defensivos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à infusão de RLZ e WAY. ....	53
Tabela 18. Comportamentos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de exposição ao odor após o condicionamento com RLZ e WAY. ....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAE – Aminoácido excitatório

AMPc - 3´5´-adenosina-monofosfato-cíclico

CEUA – Comitê de Ética de Uso de Animais de Laboratório

EC – estímulo condicionado

EI – estímulo incondicionado

DSM-V – Manual Estatístico e Diagnóstico dos Transtornos Mentais

DLH – Ácido D,L-hemocistéico

8-OH-DPAT – hidrobrometo de 8-hidroxi-2-dipropilaminotetralina

LCE – labirinto em cruz elevado

LTE – labirinto em T elevado

MCP – materia cinzenta periaquedutal

MCPd – materia cinzenta periaquedutal

MCPvl – matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral

NMDA – N-metil-D-aspartato

NDR – núcleo dorsal da rafe

NMR – núcleo mediano da rafe

NDRvl – porção ventrolateral do núcleo dorsal da rafe

PBS – tampão fosfato-salino (*phosphate-buffered saline*)

PMd – núcleo pré-mamilar dorsal

RLZ – riluzol (2-Amino-6-(trifluorometoxi)benzotiazol)

SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório

WAY100635 – maleato de N-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-N-2-piridinilciclohexano carboxamida

5-HT – serotonina

5-HT<sub>1A</sub> – subtipo 1A de receptores serotoninérgicos

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 ANSIEDADE, MEDO E COMPORTAMENTO DEFENSIVO .....	16
1.2 A MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL E AS RESPOSTAS DEFENSIVAS .....	18
1.3 SISTEMA SEROTONINÉRGICO .....	21
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL .....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3. METODOLOGIA .....	24
3.1 ANIMAIS .....	24
3.2 CIRURGIA ESTEROTÁXICA .....	24
3.3 DROGAS E SOLUÇÕES .....	25
3.4 MICROINJEÇÃO INTRA-MCPd.....	26
3.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	26
3.5.1 Aparatos experimentais.....	26
3.5.2 Protocolo Experimental.....	27
3.6 COMPORTAMENTOS ANALISADOS .....	28
3.7 HISTOLOGIA.....	29
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
3.9 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	31
3.9.1 Experimento 1 – Aquisição de um condicionamento olfatório aversivo utilizando NMDA como estímulo incondicionado na MCPd....	31
3.9.2 Experimento 2- Avaliação do efeito do agonista serotoninérgico do receptores 5-HT <sub>1A</sub> 8-OH-DPAT na MCPd na aquisição de um COA....	31
3.9.3 Experimento 3 – Avaliação do efeito do antagonista serotoninérgico dos receptores 5-HT <sub>1A</sub> WAY100635 na aquisição de um COA. ....	31
3.9.4 Experimento 4 – Avaliação da liberação de glutamato pré-sináptico pela estimulação de receptores 5-HT <sub>1A</sub> da MCPd. ....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO PELA ESTIMULAÇÃO QUÍMICA DA MCPd COM NMDA.....	33
4.2 EFEITO DA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES 5-HT <sub>1A</sub> NA MCPd NA AQUISIÇÃO DE UM CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO.....	36
4.3 EFEITO DA INATIVAÇÃO DOS RECEPTORES 5-HT <sub>1A</sub> DA MCPd NA AQUISIÇÃO DE UM CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO.....	44

4.4 EFEITO DA INIBIÇÃO DA LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO E INATIVAÇÃO DOS RECEPTORES 5-HT <sub>1A</sub> DA MCPd EM UM CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO. ....	53
5. DISCUSSÃO .....	57
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	64

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ANSIEDADE, MEDO E COMPORTAMENTO DEFENSIVO

O medo e a ansiedade são considerados estados emocionais normais e necessários para a conservação e perpetuação das espécies. Atuam como sinalizadores de perigo evocando respostas comportamentais que variam de simples mecanismos de defesa do organismo ameaçado até às complexas manifestações em resposta à dor, risco de morte, fracasso social, defesa da prole, etc. Medo é um termo utilizado para descrever um sentimento que surge quando enfrentamos uma ameaça iminente. Enquanto, a ansiedade é considerada uma resposta a uma ameaça potencial (BLANCHARD e BLANCHARD, 2008; LEDOUX, 2012).

Existem distinções funcionais, comportamentais e farmacológicas entre ambos. Em animais de laboratório, o medo leva o sujeito para longe do perigo e essa ação envolve comportamentos como luta, fuga e congelamento, que são resistentes à fármacos ansiolíticos (MCNAUGHTON e CORR, 2004), mas sensíveis a antidepressivos (SCHENBERG, CAPUCHO, *et al.*, 2001). Por outro lado, a ansiedade direciona o animal ao perigo, quando acontecer uma situação de conflito. Desta maneira, temos a ocorrência de comportamentos relacionados à maior avaliação de riscos, além de diminuição de respostas defensivas, que são sensíveis aos ansiolíticos (MCNAUGHTON e CORR, 2004).

Em situações corriqueiras, o medo/ansiedade podem apresentar-se em níveis que interferem na vida social e pessoal do indivíduo, passando a intensidades maiores e desencadeando-se por estímulos previamente não ameaçadores, além de tornarem-se até permanentes no cotidiano do indivíduo, constituindo um transtorno de ansiedade. O Manual Estatístico e Diagnóstico dos Transtornos Mentais, quinta edição (DSM-V), classifica como transtornos de ansiedade o transtorno de ansiedade de separação, a ansiedade social, o pânico, a ansiedade generalizada, a agorafobia, etc (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Em 1872, Darwin, já relatava que a expressão de emoções no homem e nos animais tem um padrão emocional semelhante, podendo assim haver relações entre as repostas defensivas emitidas pelos animais, quando confrontados com situações ameaçadoras, e a ansiedade exibida pelo homem (DARWIN, 1872; HETEM e GRAEFF, 2004).

Comportamentos defensivos ou respostas defensivas são um conjunto de reações comportamentais emitidas à estímulos ou situações ameaçadoras, os quais sofreram processos adaptativos conforme sua necessidade, reduzindo assim os danos ao organismo ameaçado. Tais comportamentos são altamente conservados, já que são indispensáveis para sobrevivência do animal no meio

ambiente, e podem ser rapidamente condicionados a estímulos e situações associadas ao perigo (BLANCHARD e BLANCHARD, 2008).

Dentro do arsenal defensivo dos roedores temos comportamentos de esquiva, congelamento, fuga ameaça e ataque defensivo, avaliação de risco e o ato de enterrar objetos potencialmente perigosos. Essas respostas defensivas são emitidas dependendo da distância entre o animal e o estímulo ameaçador. Quando a ameaça está a uma pequena distância e há chances de escape, as respostas são mais intensas (como ex., fuga); quando não existem chances de fuga, a resposta mais evidente é o congelamento, até que o estímulo ameaçador se afaste ou cesse. A apresentação desses comportamentos pode-se dar por um estímulo ameaçador oriundo de um predador, ataque de um co-específico ou um ambiente ameaçador, além de poder ser condicionada a um contexto ou uma pista (BLANCHARD e BLANCHARD, 2008; MCNAUGHTON e CORR, 2004).

Distintas vias neurais participam dos mecanismos de mediação da ansiedade/medo tais como os sistemas gabaérgico, serotoninérgico, adrenérgico e dopaminérgico, bem como ocorre a ativação de respostas como o aumento de atividade do sistema nervoso autônomo e a liberação de hormônios (NESSE, 1999; GRAEFF e GUIMARÃES, 2000). As participações desses sistemas tem instigado o estudo das bases neurobiológicas envolvidas nesses processos.

O uso de modelos experimentais em animais de laboratório para a elucidação dos mecanismos neurobiológicos de medo vem avançando na pesquisa básica. A partir de modelos comportamentais de condicionamento, por exemplo, é possível estudar mecanismos neurais envolvidos no processamento de eventos/experiências aversivas e investigar como o animal responde frente a esses estímulos (GRIEBEL, 1995).

Dentre os modelos amplamente utilizados temos os que utilizam respostas incondicionadas, gerando um padrão de respostas não aprendidas, ou os de condicionamento, os quais permitem visualizar alterações nas respostas aprendidas pelos animais (PANKSEPP, 2000). No modelo do condicionamento Pavloviano, o processo de aprendizagem ocorre quando um estímulo incondicionado (EI) é pareado a um estímulo neutro (EN) que passa a produzir respostas condicionadas, semelhantes ou até mais intensas àquelas exibidas frente ao EI (PAVLOV, 1927).

Em roedores, o sistema olfatório está envolvido com diversas tarefas biologicamente relevantes e assim sendo, o uso de pistas olfatórias em modelos comportamentais pode ser um método altamente eficaz para a investigação das bases neurais envolvidas com o processamento do medo (SLOTNICK e KATZ, 1974). Caso um determinado odor apresente uma valência negativa/aversiva – o qual remete à memórias aversivas – o animal passará a

exibir respostas defensivas. Assim, se o odor apresentar valência neutra – neste caso, o odor não elicia respostas de aversão ou prazer ao animal – e for associado a um estímulo aversivo, os animais passam a desencadear respostas de defesa para o estímulo que adquiriu valência aversiva. Isso acontece pois esta memória relacionada a odores é geralmente associada com experiências emocionais, inclusive em seres humanos.

Conforme relatado por Vermetten e colaboradores (2007), certos odores atuavam como fatores desencadeantes para o transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) em pacientes veteranos de guerra que exibiam essa patologia, o que não ocorria em pacientes que não apresentavam o TEPT (VERMETTEN, SCHMAHL, *et al.*, 2007).

Em protocolos de condicionamento aversivo, odores são eficientemente utilizados como apresentações neutras para tornarem-se um estímulo condicionado (EC) (KROON e CAROBREZ, 2009; CAVALLI, BERTOGLIO e CAROBREZ, 2009; PAVESI, CANTERAS e CAROBREZ, 2011; SOUZA, DAL BÓ, *et al.*, 2014). Em nosso laboratório, nos últimos anos, resultados mostram que o condicionamento aversivo olfatório envolve a participação de regiões encefálicas relacionadas ao predador, como o PMd (CANTERAS, KROON, *et al.*, 2008) além de permitir a utilização de outros EI que não o choque elétrico nas patas (CAVALLI, BERTOGLIO e CAROBREZ, 2009; PAVESI, CANTERAS e CAROBREZ, 2011; KINCHESKI, MOTA-ORTIZ, *et al.*, 2012), mostrando que o condicionamento aversivo olfatório é uma ferramenta eficiente para investigar o sistema de medo envolvido nesse tipo de paradigma.

Regiões encefálicas formam circuitos neurais envolvidos com a criação e execução de estados emocionais de aversão, como o medo aprendido (BRANDÃO, ANSELONI, *et al.*, 1999; MCNAUGHTON e CORR, 2004). A porção dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPd) envia projeções ascendentes para áreas do hipotálamo e tálamo, que por sua vez, se comunicam com o circuito córtico-hipocampal-amigdalar (para revisão Canteras, Pavesi e Carobrez; 2015) relacionados com a aprendizagem e com o medo, desta maneira, torna-se relevante a investigação do papel da matéria cinzenta periaquedutal (MCP) no condicionamento aversivo olfatório.

## 1.2 A MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL E AS RESPOSTAS DEFENSIVAS

A MCP refere-se a região do mesencéfalo que cerca o aqueduto cerebral, e possui funções de controle autonômico, sensorial e motor (BEHBEHANI, 1995). Ela é subdividida em porções, rostral e caudal (BEITZ, 1985), e ainda de forma radial em 5 regiões, sendo elas: dorsomedial, dorsolateral, lateral, ventrolateral e ventromedial, cada região formando uma

coluna longitudinal (DEPAULIS e BANDLER, 1991; BANDLER e SHIPLEY, 1994).

Nesta divisão existem distinções anatômicas e fisiológicas. (BANDLER, CARRIVE e ZHANG, 1991). A MCP dorsal (MCPd) é um importante local para o processamento do medo e da ansiedade, sendo responsável pelas respostas de fuga reações de defesa (locomoção, saltos e congelamento), vocalização e alterações respiratórias e cardiovasculares (BEHBEHANI, 1995). A observação de que a estimulação da MCP medial e dorsolateral produz aversão em animais, gerando respostas comportamentais de fuga (PANKSEPP, 2000), além de medo e ansiedade em humanos (NASHOLD JR, WILSON e SLAUGHTER, 1969), indicando que esta região do encéfalo é um elo importante no circuito cerebral que processa essas emoções (BEHBEHANI, 1995).

Observa-se diferenças nas reações defensivas apresentadas pelos animais ao longo do eixo rostro-caudal da MCPd. Souza e Carobrez (2016) investigaram o bloqueio de receptores NMDA com AP5 em ratos expostos ao odor de gato. Os animais expostos ao odor de gato exibiram respostas incondicionadas e foram condicionados ao contexto em que o odor foi pareado, quando os receptores NMDA foram bloqueados com AP5 houve redução nas respostas defensivas frente ao odor de gato e prejuízo na aquisição do condicionamento contextual.

Alterações autonômicas associadas com respostas defensivas são demonstradas através da estimulação química com aminoácidos excitatórios diretamente na MCP (BANDLER, CARRIVE e ZHANG, 1991; BANDLER e DEPAULIS, 1988; CARRIVE, BANDLER e DAMPNEY, 1989; DEPAULIS e BANDLER, 1991; KINCHESKI, MOTA-ORTIZ, et al., 2012). Microinjeções de ácido glutâmico na MCP desencadearam reações de “raiva” (do inglês *rage*) em gatos (BANDLER, CARRIVE e ZHANG, 1991) além de respostas autonômicas como dilatação da pupila, aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca (CARRIVE, BANDLER e DAMPNEY, 1989).

A modulação de diversos neurotransmissores presentes na MCP tem sido evidenciada como crucial para processos envolvidos no mecanismo de medo e nas respostas defensivas dos animais de laboratório (BITTENCOURT, CAROBREZ, et al., 2004; KINCHESKI, MOTA-ORTIZ, et al., 2012; MARASCHIN, RANGE, et al., 2016). É importante ressaltar que dentre os sistemas de neurotransmissão presentes na MCP, o glutamato é o principal aminoácido excitatório do encéfalo (BEAR, CONNORS e PARADISO, 2002)

A infusão intra-MCPd de NMDA, um agonista dos receptores NMDA, aumenta a expressão de comportamentos relacionados à avaliação de risco e a latência para a esquiva inibitória no labirinto em T elevado (LTE), havendo ainda a prevenção desses efeitos ansiogênicos no com a utilização do

pré-tratamento com AP-7 (BERTOGLIO e ZANGROSSI JR, 2006). A ativação, agora, com glicina e no labirinto em cruz elevado, produz uma redução na exploração dos braços abertos e o bloqueio com HA-966, antagonista do receptor de glicina, revela efeitos opostos (TEIXEIRA e CAROBREZ, 1999), reforçando o envolvimento dos receptores glutamatérgicos da MCPd nas respostas defensivas e na ansiedade.

As respostas eliciadas pela infusão de glutamato diretamente na MCP mostram-se semelhantes às estimulações elétricas realizadas nessa estrutura (CAROBREZ, TEIXEIRA e GRAEFF, 2001) e a ativação dose-dependente de receptores NMDA da MCP desencadeiam respostas defensivas, bem como modulam a aquisição de memórias de medo, possibilitando sua utilização como um estímulo aversivo suficiente para promover um aprendizado aversivo no condicionamento aversivo olfatório (KINCHESKI, MOTA-ORTIZ, *et al.*, 2012). Além disso, trabalhos posteriores também demonstraram que a ativação dos receptores gabaérgicos da MCPd, com muscimol, foi capaz de prejudicar a aquisição de condicionamento auditivo (JOHANSEN, TARPLEY, *et al.*, 2010) ou mesmo a estimulação optogenética da MCP é capaz de induzir uma série de respostas defensivas em ratos (DENG, XIAO e WANG, 2016), confirmando a participação dessa estrutura na modulação e execução de comportamentos de defesa.

Diversos neurotransmissores podem modular os receptores NMDA, como a substância P (ZHOU, GREVÉS, *et al.*, 2000), óxido nítrico (MOREIRA, MOLCHANOV e GUIMARÃES, 2004) e serotonina (MORAES, BERTOGLIO e CAROBREZ, 2008). Dentre os acima citados, o efeito do sistema serotoninérgico na MCPd é de grande relevância por sua capacidade de modular os comportamentos condicionados, além de auxiliar na compreensão do papel da serotonina nas respostas emocionais (KINCHESKI, 2011).

Deakin e Graeff postulam uma hipótese em que há um sistema cerebral de inibição do pânico que ocorre pela ativação de populações de neurônios serotoninérgicos da porção ventrolateral do núcleo dorsal da rafe (NDRvl)/matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral (MCPvl) que se projeta para a MCPd, a qual pode ser ativada por agentes panicogênicos como CO<sub>2</sub> e lactato de sódio. Neste contexto, a serotonina exibe um papel inibitório sobre os comportamentos evocados pela estimulação da MCPd (DEAKIN e GRAEFF, 1991; LOWRY, JOHNSON, *et al.*, 2005), evidenciando a participação direta desse sistema na modulação das respostas defensivas eliciadas pela MCP.

### 1.3 SISTEMA SEROTONINÉRGICO

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), uma amina biogênica, que atua como neurotransmissor e neuromodulador. É sintetizada a partir do aminoácido essencial triptofano por reações de hidroxilação e descarboxilação pelas enzimas triptofano hidroxilase e 5-hidroxi-triptofano descarboxilase, respectivamente. Estas enzimas ficam localizadas no tronco encefálico em neurônios serotoninérgicos organizados nos núcleos da rafe (núcleo mediano da rafe, núcleo dorsal da rafe e núcleo caudal da rafe) (GREEN, 2006), os quais enviam projeções para os sistemas corticais, límbicos, mesencéfalo e rombencéfalo. A partir das inúmeras projeções enviadas, a 5-HT modula várias funções fisiológicas, como sono, alimentação, dor, regulação térmica, percepção, humor, emoções e cognição (BERGER, GRAY e ROTH, 2009; ARTIGAS, 2015).

Os efeitos da 5-HT são mediados por uma família de receptores divididos em canais iônicos e metabotrópicos, acoplados à proteína G. Os receptores do grupo 5-HT<sub>3</sub> são canais iônicos e subdividem-se em 5-HT<sub>3A</sub>, 5-HT<sub>3B</sub>, 5-HT<sub>3C</sub>, 5-HT<sub>3D</sub> e 5-HT<sub>3E</sub>. Os receptores acoplados à proteína G dividem-se em 5-HT<sub>1</sub>, – subdividindo-se em 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1e</sub>, 5-HT<sub>1f</sub>– 5-HT<sub>2</sub>, que subdivide-se em 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>; 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub> (5-HT<sub>5a</sub> e 5-HT<sub>5b</sub>), 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub> (ALEXANDER, MATHIE e PETERS, 2011).

A 5-HT e seus receptores desempenham importante papel no controle encefálico e sua desregulação tem sido implicada na patogênese de diversas doenças neuropsiquiátricas como a depressão (ROTH, 1994; ROTH e XIA, 2004). Ao passar dos anos, tem-se aumentado o interesse nos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, já que seu papel é amplamente discutido em distúrbios relacionados a ansiedade (GRAEFF, 2002) e a utilização de fármacos agonistas serotoninérgicos, como a buspirona, que interagem com a modulação da 5-HT para tratamentos dessas doenças, estimulou a investigação relacionando-os com respostas de medo (GRIEBEL, 1995; GRAEFF, VIANA e MORA, 1997; ZANGROSSI JR, VIANA, *et al.*, 2001).

Os receptores 5-HT<sub>1A</sub> estão localizados na pré e pós-sinapse. Na pré-sinapse atuam como auto receptores dispostos em corpos celulares e dendritos de neurônios serotoninérgicos, situados nos núcleos dorsal e médio da rafe e exercem sua ação controlando a liberação de 5-HT. Pós-sinapticamente, este receptor é encontrado em alta densidade no sistema límbico, acoplados a proteína G que preferencialmente inibem adenilato ciclase, reduzindo assim, os níveis de AMPc. Sempre que ativados, atuam hiperpolarizando a célula e portanto, inibem o disparo neuronal (HANNON e HOYER, 2008; GUIMARÃES, CAROBREZ e GRAEFF, 2008).

Em relação à modulação das respostas defensivas, em estruturas como amígdala e córtex pré-frontal a 5-HT, oriunda do NDR, teria ações que aumentariam o comportamento de esquiva, enquanto na MCPd este mesmo neurotransmissor teria função inibitória nas respostas de escape (GRAEFF, 1991). Em estudo utilizando o labirinto em T elevado (LTE), um aparato que permite a investigação das respostas de fuga e esquiva inibitória, foi observado que a administração do agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT no NDR produz efeitos ansiolíticos e panicogênicos no LTE (SENA, BUENO, *et al.*, 2003). Microinjeções do agonista 8-OH-DPAT realizadas no núcleo mediano da rafe (NMR), o qual inerva principalmente regiões como o hipocampo dorsal e septo, causam efeitos ansiolíticos sem, entretanto, afetar as respostas de fuga relacionadas ao pânico (VICENTE, ZANGROSSI JR., *et al.*, 2008).

Trabalhos prévios utilizando a modulação serotoninérgica associada à excitação produzida pela infusão de NMDA na MCP foram testadas no labirinto em cruz elevado (LCE) (MORAES, BERTOGLIO e CAROBREZ, 2008) e também no condicionamento olfatório aversivo (KINCHESKI, 2011). Moraes, Bertoglio e Carobrez (2008) e mostraram que o bloqueio dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> na MCP reduziu o comportamento defensivo causado pela infusão do AAE em baixas doses, enquanto que a ativação desses receptores com 8-OH-DPAT gerou aumento dos comportamentos defensivos, os quais não eram exibidos pela infusão de doses mais altas de NMDA, demonstrando que os receptores NMDA e 5-HT<sub>1A</sub> da MCP interagem para a modulação de comportamentos relacionados a ansiedade.

No paradigma de condicionamento aversivo olfatório Kincheski (2011), mostrou que em animais tratados com doses de NMDA infundidas intra-MCPd, incapazes de gerar condicionamento, a utilização de 8-OH-DPAT e WAY100135 foram capazes de promover o condicionamento desses animais. Quanto aos comportamentos defensivos exibidos durante a modulação serotoninérgica e ativação da MCPd não houve avaliação de possíveis mudanças ocasionadas nos animais, tornando-se importante tal medida.

Neste contexto, este trabalho foi delineado para verificar a hipótese de participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> da MCPd na modulação da resposta defensiva incondicionada causada pela ativação de receptores NMDA da região, e o conseqüente condicionamento aversivo olfatório.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Verificar a participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> da MCPd na aquisição de um condicionamento aversivo olfatório.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

2.2.1 Padronizar o condicionamento aversivo olfatório a partir da estimulação da MCPd com NMDA.

2.2.2 Verificar se a ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> na MCPd é capaz de promover o condicionamento aversivo olfatório em doses elevadas de NMDA.

2.2.3 Verificar se o bloqueio dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> na MCPd é capaz de potencializar o condicionamento aversivo olfatório fraco.

2.2.4 Verificar se a inibição da liberação de glutamato na MCPd junto ao bloqueio dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> é capaz de promover um condicionamento aversivo olfatório.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 ANIMAIS

Neste projeto foram utilizados ratos machos da linhagem *Long Evans Hooded*, com idade entre 12-16 semanas e peso entre 270-360g. Os ratos foram obtidos do Biotério Central Da Universidade Federal de Santa Catarina e, após desmame, foram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, no Centro de Ciências Biológicas da mesma universidade. Aproximadamente sete dias antes do procedimento cirúrgico os animais foram alocados no biotério do Laboratório de Neurobiologia Comportamental, onde foram mantidos durante sua recuperação até a finalização do protocolo experimental. Os animais foram mantidos em grupos de 3-4 ratos, em caixas de plástico brancas (50x30x15 cm) com serragem, ração e água *ad libitum*, em uma sala com fluxo de ar constante (mantido por exaustores), temperatura controlada ( $23\pm 1^\circ\text{C}$ ) e em ciclo claro-escuro 12/12h (7h claro -19h escuro).

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais de Laboratório (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número (Protocolo CEUA PP 00 849/2013) e dentro do preconizado pela Resolução Normativa 32 (CONCEA, 2016).

#### 3.2 CIRURGIA ESTEROTÁXICA

Todos os animais deste projeto foram submetidos ao procedimento de cirurgia esterotáxica 5-7 dias antes do início do protocolo comportamental, para o implante de cânulas-guia na MCPd. Os animais foram anestesiados com uma solução combinada de cloridrato de cetamina (10%; Cetamin®; Syntec, Brasil) e cloridrato de xilazina (2%; Xilanzin®; Syntec, Brasil) via intraperitoneal (3:2; 1,0 ml/kg) e posicionados no esterotáxico (Stoelting Co., EUA). Após a perda total dos reflexos procedeu-se à esterilização do local com álcool iodado a 2%, um anestésico local combinado com um vasoconstritor (1:50.000; Lidostensin®; Dentsply Pharmaceutical, Brasil) foi administrado subcutaneamente e uma incisão longitudinal foi realizada. Após a incisão, o osso do crânio foi exposto e as coordenadas utilizadas para a implantação da cânula-guia a partir do Bregma foram: AP=5,8mm; ML=2,0 e DV=4,0 em um ângulo de  $22^\circ$  (PAXINOS e WATSON, 1982).

Dois parafusos de aço inoxidável foram fixados na superfície cranial para ancorar a cânula-guia e o acrílico auto-polimerizável que mantém a cânula estável na região encefálica de interesse foi depositado. Na cânula foi inserido um mandril de aço inoxidável nº 30 (0,35 mm) para prevenção de possíveis entupimentos e infecções por deposição de matéria orgânica. Ao término da cirurgia, os animais receberam via intramuscular uma solução antibiótica (Benzilpenicilina e estreptomicina; 10 mg/kg; 60 000 IU; 0,2ml; Pentabiótico®; Fort Dodge, Brasil) e via subcutânea uma solução analgésica

(Flunixinina meglumina; 2,5mg/kg; 0,2ml; 50mg/ml; Banamine®; Schering-Ploug, Brasil), em seguida os animais foram retirados do aparelho estereotáxico alojados em uma sala aquecida até a recuperação total dos movimentos e em seguida foram alocados no biotério do laboratório.

### 3.3 DROGAS E SOLUÇÕES

A via de administração utilizada foi intra-MCPd, e as seguintes drogas:

-NMDA (ácido N-Metil-D-aspartato, Sigma, St. Louis, MO), agonista dos receptores NMDA;

-8-OH-DPAT (hidrobrometo de 8-hidroxi-2-dipropilaminotetralina, Tocris, Ellisville, EUA), agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>;

-WAY100635 (maleato de N-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-N-2-piridinilciclohexanocarboxamida, Sigma, St. Louis, MO), antagonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>;

-RLZ (riluzol, 2-Amino-6-(trifluorometoxi)benzotiazol, Sigma, St. Louis, MO), inibidor da liberação de glutamato;

-PBS [tampão fosfato-salino (do inglês *phosphate-buffered saline*), pH 7,4], veículo;

As diluições das drogas foram feitas em solução de 0,1M de tampão fosfato-salino (PBS), e para a diluição do riluzol, foi necessário o uso de 5% de Tween na solubilização com PBS.

As doses utilizadas de NMDA foram adaptadas em trabalhos e dados preliminares do laboratório (KINCHESKI, MOTA-ORTIZ, *et al.*, 2012). O uso do agonista (8-OH-DPAT 4 e 8nmol) e do antagonista (WAY100635 0,4; 0,8 e 2,0nmol) serotoninérgicos em respectivas doses, foram fundamentadas em dados da literatura (MORAES, BERTOGLIO e CAROBREZ, 2008; KINCHESKI, MOTA-ORTIZ, *et al.*, 2012; CAMPOS, SOARES, *et al.*, 2013), assim como o inibidor da liberação de glutamato, riluzol (2-Amino-6-(trifluorometoxi)benzotiazol, 4nmol) em que a dose utilizada foi baseada em experimentos anteriores do laboratório. As doses utilizadas foram adaptadas para o protocolo e para as condições experimentais obtidas em nosso laboratório.

O odor utilizado no protocolo experimental foi o acetato de amila (amylacetate, 99+%, Aldrich Chemical Co. Inc., USA) diluído em propilenoglicol (mínimo 99,5% LABSYNTH® Produtos para Laboratórios Ltda., Brasil) até a concentração de 5%. A utilização de um condicionamento com um odor como estímulo neutro tem como vantagens a alta sensibilidade dos roedores à essas moléculas e a eficiente volatilização das partículas, permitindo rápida remoção do ambiente.

### 3.4 MICROINJEÇÃO INTRA-MCPD

Para a infusão das drogas, o mandril (diâmetro em torno de 0,7mm) foi gentilmente removido, uma lima odontológica de 13mm foi utilizada para remover qualquer resíduo que estivesse no interior da cânula e uma agulha injetora (14,5mm de comprimento) foi introduzida na cânula-guia. A agulha estava conectada, por meio de um tubo de polietileno (PE-10), à uma micro-seringa (Hamilton®, 5µL). Para a administração, conectou-se uma bomba de infusão (modelo B12000, Insight® Ltda., Ribeirão Preto, Brasil) à micro-seringa, afim de que houvesse uma infusão automática do volume necessário (0,2µL). Ao final da infusão, a agulha injetora foi mantida por aproximadamente 20s no interior da cânula para evitar possível refluxo da droga.

### 3.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados durante a fase diurna e gravados com o auxílio de uma Webcam (Logitech®) localizada na sala de experimento, a qual era conectada diretamente a um microcomputador. Antes do início das sessões comportamentais, os animais permaneceram por 20-30min em uma sala de ambientação e após a sessão voltavam para uma caixa-moradia e seguidamente ao biotério, sem ter contato com os animais que esperavam para iniciar a etapa.

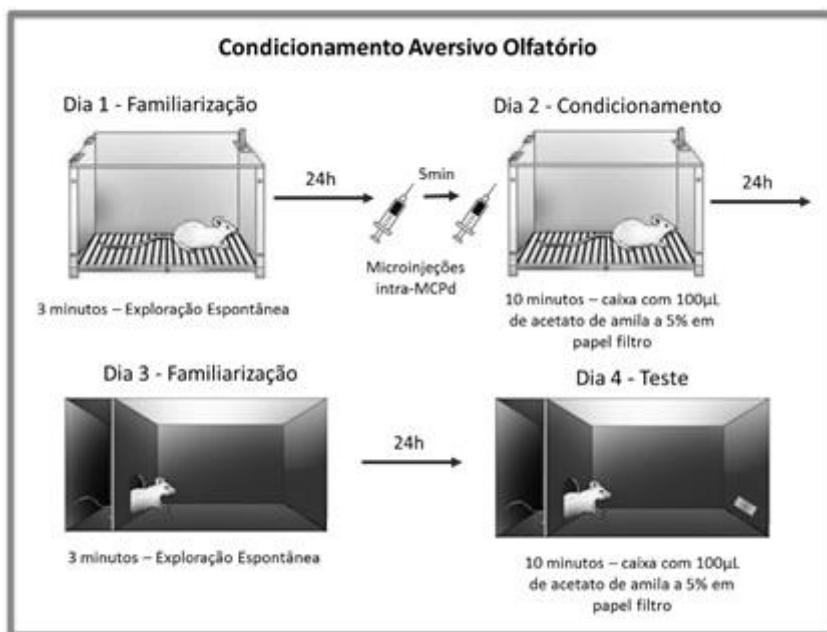
#### 3.5.1 Aparatos experimentais

Na primeira etapa experimental, os animais foram alocados em uma caixa de condicionamento de acrílico (23 cm x 23 cm x 24 cm) com paredes opacas, teto transparente e piso gradeado, compostos por barras de aço inoxidável (3mm de espessura) espaçadas por 1cm. Um compartimento em forma de gaveta permitiu a inserção de um recipiente aberto (placa de Petry) com papel filtro impregnado com acetato de amila 5%, quando necessário, além do recolhimento dos dejetos produzidos pelos animais ao longo da sessão.

Na segunda etapa, para reduzir qualquer interferência contextual e isolar o estímulo condicionado previamente foi utilizada a caixa de exposição ao odor. Esta caixa era composta de dois compartimentos, um fechado (20 x 26 x 40 cm), com cobertura representando um ambiente seguro como uma toca e um aberto (40 x 26 x 40 cm), sem cobertura. As paredes frontais eram de acrílico para permitir a visualização dos comportamentos emitidos ao longo da sessão. Para permitir a passagem dos animais de um ambiente ao outro, havia uma pequena abertura (6 x 6cm) situada na parede divisória. Na parede do lado oposto ao compartimento fechado estava localizado a fonte de odor, colocado apenas durante a sessão de teste.

### 3.5.2 Protocolo Experimental

O protocolo foi realizado em 4 dias, intervalados por 24hs entre cada sessão, como pode ser observado na figura 1. Antes do início de todas as sessões experimentais, os animais foram alocados em uma sala adjacente àquela em que eram realizados os experimentos para uma etapa de ambientação com duração de 20-30 minutos. Após a etapa de ambientação, foram expostos por 3 minutos à caixa de condicionamento (dia 1) em uma etapa chamada de familiarização. No dia do condicionamento (dia 2), procedeu-se às microinjeções dos diferentes tratamentos intervalados por 5 minutos e em seguida, os animais foram reexpostos à caixa de condicionamento na presença do odor de acetato de amila (100 $\mu$ L) a 5%, que funcionou como o estímulo condicionado (EC) por 10 minutos.



**Figura 1. Protocolo experimental do condicionamento aversivo olfatório induzido pela estimulação química da MCPd.** Nos dias 1 (familiarização) e 2 (condicionamento) foi utilizada a caixa de condicionamento, já nos dias 3 (familiarização) e 4 (teste) utilizou-se a caixa de exposição ao odor. Adaptado de Kroon e Carobrez (2009).

Posteriormente ao condicionamento, procedeu-se à sessão de familiarização (dia 3) na caixa de exposição ao odor para avaliar exploração espontânea nesse ambiente sem o EC, durante 3 minutos. No dia seguinte (dia 4), os animais voltaram à caixa de exposição ao odor para a sessão de teste onde permaneceram por 10 minutos em contato com o odor previamente condicionado (EC).

Ao término de cada sessão, os animais foram alocados em caixas-moradia com serragem limpa, em uma sala adjacente, para que não houvesse contato entre os animais que já passaram pelo procedimento experimental. Após a retirada de cada animal dos aparatos experimentais houve a higienização das caixas com solução de álcool a 10% e papel toalha. Os experimentos foram realizados em uma sala com temperatura ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ) e luminosidade, definida como 80lux para a sessão de condicionamento, ao passo que na caixa de exposição ao odor a intensidade de luz era de 40lux no compartimento aberto e 4lux no compartimento fechado, e a presença do exaustor para remover o odor do ambiente em todas as sessões. Ao término de cada etapa experimental os animais foram recolocados em suas caixas-moradia de origem e levados até o biotério do laboratório.

### 3.6 COMPORTAMENTOS ANALISADOS

Os comportamentos nos dias 1 e 2 foram analisados manualmente no software *ANY-Maze Video Tracking System (Stoelting Co®)*, enquanto os comportamentos evocados na caixa de exposição ao odor foram analisados manualmente com o auxílio de cronômetros.

A grande maioria dos trabalhos comportamentais envolvendo condicionamento aversivo analisa somente parâmetros relacionados ao tempo de imobilidade ou de congelamento, evidenciando perigo ou ameaça eminente aos animais, sem chances de fuga. Entretanto, sabe-se que a ausência desses comportamentos pode não demonstrar a ausência de perigo e que respostas mais sutis podem não ser detectadas por tais modelos comportamentais. Desta maneira, esse trabalho buscou avaliar diferentes respostas comportamentais durante as sessões de condicionamento e teste.

Na sessão de familiarização e condicionamento (dias 1 e 2) na caixa de condicionamento, os comportamentos analisados foram:

- Exploração vertical: Postura assumida pelo animal que se sustenta apenas nas duas patas traseiras, com a retirada das patas dianteiras do chão, permanecendo apoiado ou não em qualquer uma das paredes das caixas.

- Exploração horizontal: Comportamento adotado pelo animal em que se movimenta horizontalmente pelo aparato investigando o ambiente.

- Agachar-cheirar: Postura adotada pelo animal que permanece com o dorso curvado acompanhado de qualquer movimento da cabeça, investigando o ambiente.

- Congelamento: Postura adotada pelo animal em que há ausência total de movimentos, permanecendo somente o movimento respiratório despendido pelo tórax.

- (Fuga): Comportamento de defesa em que o animal pula na tentativa de escape da caixa, associado ao comportamento de “recuo defensivo” (*backward defense*), movimento em que animal se movimenta para trás.

- Comportamentos defensivos: Soma dos comportamentos de congelamento, agachar-cheirar e fuga emitidos pelos animais ao longo da sessão.

- Comportamentos exploratórios: Soma dos comportamentos de exploração vertical e horizontal eliciados pelos animais durante a sessão.

Na caixa de exposição ao odor, nas sessões de familiarização e teste (dias 3 e 4) foram analisados os comportamentos listados abaixo:

- Tempo escondido: tempo em que os ratos permaneceram com as quatro patas dentro do compartimento fechado.

- Tempo próximo à fonte de odor: tempo em que os animais permaneceram à uma distância menor que 7 cm da fonte de odor.

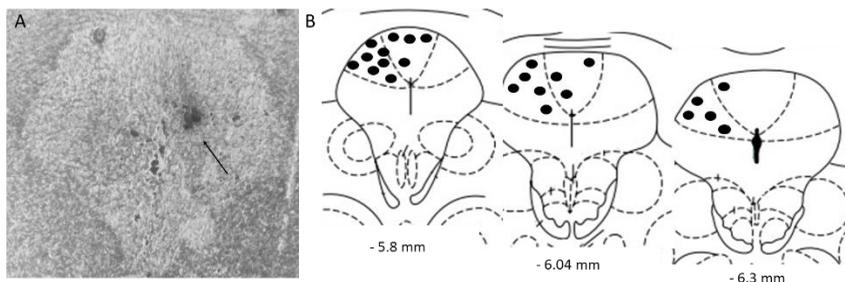
- Tempo de *head-out* (corrigido pelo tempo em que o animal permaneceu no compartimento fechado): tempo em que o animal passa dentro do espaço fechado com a cabeça no compartimento aberto direcionada para a fonte de odor.

- Frequência de cruzamentos: número de cruzamentos entre o compartimento fechado e o próximo à fonte de odor (soma das aproximações a fonte de odor às entradas no compartimento fechado).

### 3.7 HISTOLOGIA

Após o final do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados com uma dose de anestésicos intraperitonealmente, dose semelhante à dada no processo cirúrgico (cloridrato de cetamina: cloridrato de xilazina 3:2mL/kg), para perda total dos reflexos e, seguidamente outra injeção via intraperitoneal com hidrato de cloral (15%; 2,5mL) para a eutanásia. Posteriormente à perda total das respostas respiratórias e reflexivas, os animais receberam uma injeção de azul de metileno (0,5%) para marcação do local de injeção. Em seguida os encéfalos foram coletados e acondicionados em recipientes com solução de paraformaldeído a 10%, cortados (50µm) em criostato de congelamento (CM1850; Leica, Alemanha) para fixação, posterior análise histológica e armazenamento das lâminas. O local da microinjeção foi determinado pelo depósito do corante (Fig. 2). Animais cujas injeções não

atingiram a MCPd foram excluídos deste estudo, sendo estes 101 animais de um total de 230.



**Figura 2. Fotomicrografia e diagrama esquemático da secção coronal dos cérebros.** Fotomicrografia da secção coronal indicada pela seta da MCPd (A), mostrando a localização da cânula e o local da injeção. A mancha escura é o local da injeção do corante Azul de Evans. Diagrama esquemático de um corte coronal do encéfalo de rato, localizando a MCPd (B) (Paxinos e Watson, 1998). Devido à sobreposição do local da microinjeção, o número de círculos representados é menor do que o número de animais utilizados nesse protocolo experimental.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os grupos experimentais apresentados neste trabalho não foram utilizados de maneira independente na análise estatística. Os parâmetros avaliados na caixa de condicionamento (exploração vertical e horizontal, agachar-cheirar, congelamento e fuga) e na caixa de exposição ao odor (tempo escondido e próximo ao odor, tempo de *head-out*/tempo escondido) foram transformados em porcentagem de tempo (fórmula representada abaixo) e considerados como variáveis dependentes.

(1)

$$\frac{\text{Tempo escondido ou próximo ao odor (s)} \times 100}{\text{Tempo total da sessão (s)}}$$

Os dados obtidos na sessão de familiarização (em ambas caixas), condicionamento e teste foram analisados através de ANOVA de uma via (para grupos em que havia variação de droga em somente uma das microinjeções) seguida do *post-hoc* de Dunnett ou ANOVA fatorial (para grupos que apresentavam variação de droga nas duas infusões) seguida do teste de *post-hoc* de *Newman-Keuls*.

Todas análises estatísticas foram realizadas pelo programa Statistica® (versão 10.1; StatSoft®, Tulsa, EUA) e a construção dos gráficos deu-se com

o auxílio do programa Prisma 5.0 (GraphPad®, San Diego, EUA). O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ . O parâmetro de tendência foi utilizado quando  $p = 0,07$ .

### 3.9 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### **3.9.1 Experimento 1 – Aquisição de um condicionamento olfatório aversivo utilizando NMDA como estímulo incondicionado na MCPd.**

Este experimento foi realizado com o objetivo de obter-se uma curva dose-resposta de NMDA. Para este experimento os animais foram divididos em 5 grupos que receberam primeiramente uma injeção de PBS e 5 minutos após NMDA nas doses de 12,5; 25; 50 ou 100pmol.

#### **3.9.2 Experimento 2- Avaliação do efeito do agonista serotoninérgico do receptores 5-HT<sub>1A</sub> 8-OH-DPAT na MCPd na aquisição de um COA.**

Esta segunda etapa experimental teve como finalidade avaliar o efeito do agonista 8-OH-DPAT (4 e 8nmol), administrado previamente à uma alta dose (100pmol) de NMDA que *per se* não foi capaz de gerar um condicionamento. Nesta etapa foram realizadas duas microinjeções, e os animais foram divididos em seis grupos (PBS/PBS, PBS/NMDA100, 8-OH-DPAT4/PBS, 8-OH-DPAT4/NMDA100, 8-OH-DPAT8/PBS e 8-OH-DPAT8/NMDA100) que foram microinjetados com pré-tratamentos PBS ou 8-OH-DPAT4 ou 8-OH-DPAT8nmol e após 5 minutos, receberam PBS ou NMDA100pmol.

#### **3.9.3 Experimento 3 – Avaliação do efeito do antagonista serotoninérgico dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> WAY100635 na aquisição de um COA.**

A terceira etapa experimental, foi realizada a fim de avaliar o efeito o antagonista 5-HT<sub>1A</sub>, WAY100635 (0,4; 0,8 e 2nmol) administrado 5 minutos antes de uma dose sub efetiva (25pmol) de NMDA, que não era capaz de gerar um condicionamento. Primeiramente, doses (0,4; 0,8 e 2nmol) de WAY foram testadas afim de avaliar possíveis efeitos comportamentais causados somente pelo bloqueio dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Após, os animais foram divididos em seis grupos experimentais (PBS/PBS, PBS/NMDA25, WAY0,4/PBS, WAY0,4/NMDA25, WAY0,8/PBS e WAY0,8/NMDA25), os quais receberam como pré-tratamento PBS ou WAY (0,4 ou 0,8nmol), e a segunda injeção de PBS ou NMDA25pmol.

### **3.9.4 Experimento 4 – Avaliação da liberação de glutamato pré-sináptico pela estimulação de receptores 5-HT1A da MCPd.**

A quarta etapa experimental teve como propósito verificar se o efeito pró aversivo do WAY na dose de 2 nmol dependeria da liberação pré-sináptica de glutamato. Neste caso, foi utilizado o inibidor de liberação de glutamato, riluzol (4nmol) como pré-tratamento, e posteriormente (5 minutos) a administração de WAY (2nmol). Passados 2,5 minutos após a infusão do antagonista, os animais foram colocados na caixa de condicionamento em contato com o odor de acetato de amila. Para esta etapa os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (PBS/PBS, WAY2/PBS, RLZ4/WAY2 e RLZ4/PBS).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO PELA ESTIMULAÇÃO QUÍMICA DA MCPd COM NMDA.

Neste conjunto de dados o protocolo experimental foi realizado pelas injeções de PBS/PBS e PBS/NMDA (12,5; 25; 50 e 100pmol). Os dados referentes a sessão de familiarização na caixa de condicionamento estão descritos nas tabelas 1 e 2. O comportamento de exploração horizontal [F(4, 37)=2,6360] apresentou diferenças estatísticas detectadas pela ANOVA ( $p < 0,05$ ). A análise de *post-hoc* não detectou quais grupos eram diferentes estatísticas nesta sessão.

**Tabela 1. Comportamentos exploratórios analisados durante a sessão de familiarização na caixa de condicionamento avaliados anteriormente à estimulação com NMDA.**

TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS ANALISADOS	
Pré-trat	Trat	Exploração horizontal	Exploração vertical
PBS	PBS	67,222±2,561	18,715±3,011
	NMDA12,5	66,5±4,850	21,097±3,467
	NMDA25	40,629±11,861	19,024±2,127
	NMDA50	66,562±3,267	19,743±2,711
	NMDA100	44,364±11,222	19,709±1,600

Dados representados por porcentagem de tempo  $\pm$  E.P.M. Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. \* $p < 0,05$  comparado com controle PBS/PBS. ANOVA de uma via seguida de Dunnet.

**Tabela 2. Comportamentos defensivos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de condicionamento avaliados anteriormente à estimulação com NMDA.**

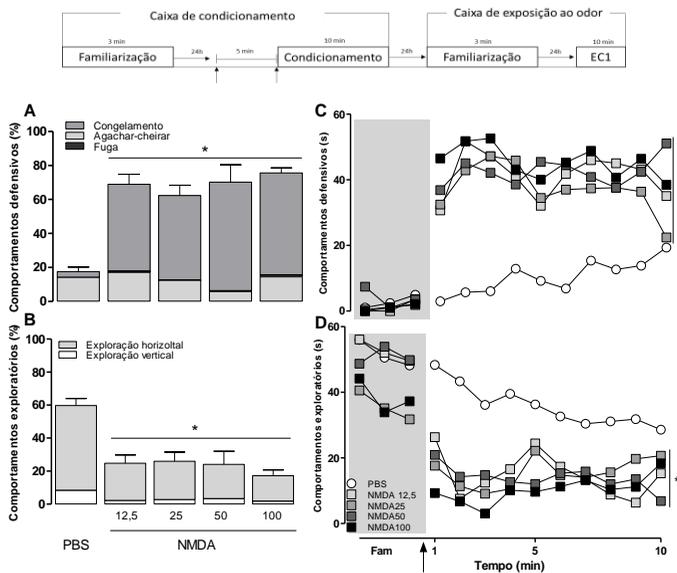
TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS ANALISADOS		
Pré-trat	Tratamento	Agachar-cheirar	Congelamento	Fuga
PBS	PBS	3,784±1,579	0,895±0,880	0,000±0,000
	NMDA12,5	2,027±1,301	0,000±0,000	0,000±0,000
	NMDA25	1,938±1,525	0,012±0,012	0,000±0,000
	NMDA50	2,361±1,193	3,437±3,374	0,000±0,000
	NMDA100	1,580±1,313	0,185±0,185	0,000±0,000

Dados representados por porcentagem de tempo  $\pm$  E.P.M. Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. ANOVA de uma via seguida de Dunnet.

Na etapa de condicionamento (Fig. 3A) a ANOVA detectou diferenças ( $p < 0,05$ ) na porcentagem total de tempo em que os animais expressam comportamentos defensivos [ $F(4, 37)=14,326$ ] e exploratórios [ $F(4, 37)=9,3926$ ] exibidos durante essa sessão. Uma análise temporal das repostas defensivas (Fig. 3C), a ANOVA revelou diferenças significativas ( $p < 0,006$ ) entre os tratamentos [ $F(4, 37)=13,509$ ], o tempo [ $F(12, 444)=43,726$ ] e a interação entre o tempo e o tratamento [ $F(48, 444)=2,4744$ ]. Uma análise temporal das repostas exploratórias a ANOVA revelou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos [ $F(4, 37)=8,3712$ ], o tempo [ $F(12, 444)=33,671$ ] e na interação entre o tempo e o tratamento [ $F(48, 444)=1,6315$ ].

A análise *post-hoc* revelou aumento dos comportamentos defensivos e diminuição dos comportamentos exploratórios dos grupos NMDA (12,5; 25, 50 e 100pmol) comparados com o controle, tanto da porcentagem total de tempo de expressão quanto para os dados minuto a minuto da sessão (Fig. 3).

Estes resultados evidenciam que a administração intra-MCPd de todas as doses testadas de NMDA foi capaz de eliciar respostas defensivas e diminuir as respostas exploratórias destes animais quando comparadas ao grupo infundido com PBS.



**Figura 3. Comportamentos defensivos (A e C) e comportamentos exploratórios (B e D) durante a sessão de condicionamento na caixa de condicionamento após a estimulação química com NMDA.** Acima da figura está exemplificado o protocolo experimental. As flechas verticais representam os momentos das microinjeções na

MCPd. O quadro cinza nos gráficos C e D representa a sessão de familiarização realizada no dia anterior às microinjeções. FAM= Familiarização. A= porcentagem total de comportamentos defensivos. B= porcentagem total de comportamentos exploratórios. C= representação minuto a minuto dos comportamentos defensivos. D= representação minuto a minuto dos comportamentos exploratórios. PBS (n=8), NMDA 12,5pmol (n=8), NMDA 25pmol (n=9), NMDA 50pmol (n=8) e NMDA 100pmol (n=9). \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida de Dunnet (gráficos de barras) e ANOVA de uma via com medidas repetidas (gráficos de linhas).

No dia 3, durante a etapa de familiarização na caixa de exposição ao odor os animais que receberam NMDA 50pmol no dia do condicionamento, apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de tempo escondido [ $F(4, 37)=5,2201$ ] e na frequência de cruzamentos [ $F(4, 37)=2,8883$ ] (Fig. 4). Os parâmetros de *head-out*/tempo escondido e a porcentagem de tempo próximo não demonstraram diferenças significativas. A análise *post-hoc* revelou um aumento do tempo escondido e uma diminuição na frequência de cruzamentos para os animais controle e os que receberam NMDA 50pmol. Esses dados demonstram que somente a dose de 50pmol foi capaz de gerar um estado emocional capaz de provocar aversão a este novo contexto (tabela 3).

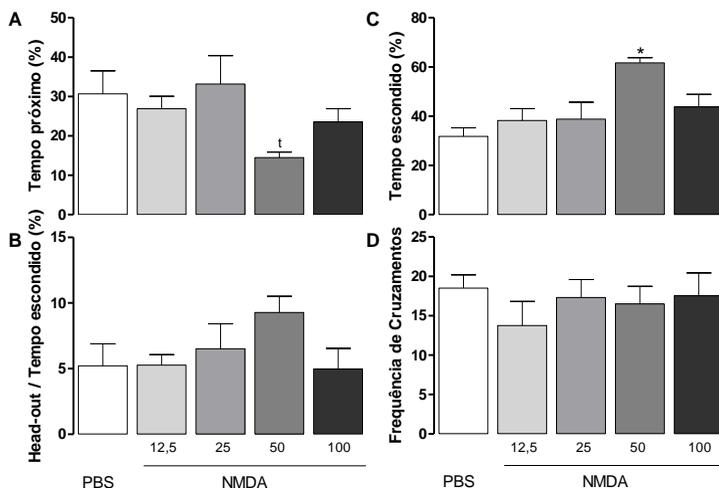
**Tabela 3. Comportamentos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de exposição ao odor após o condicionamento com NMDA. Dados representados por porcentagem de tempo  $\pm$  E.P.M.**

TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS ANALISADOS			
Pré-trat	Trat	Tempo próximo (%)	Tempo escondido (%)	Tempo de <i>head-out</i> (%)	Frequência de cruzamentos (n)
	PBS	29,791 $\pm$ 3,840	26,666 $\pm$ 3,986	13,312 $\pm$ 1,691	7,00 $\pm$ 0,755
	NMDA 12,5	23,611 $\pm$ 3,840	29,722 $\pm$ 6,666	11,663 $\pm$ 2,668	5,625 $\pm$ 0,679
PBS	NMDA 25	26,851 $\pm$ 3,232	33,086 $\pm$ 5,306	14,126 $\pm$ 2,526	7,777 $\pm$ 0,521
	NMDA 50	19,166 $\pm$ 3,603	49,861 $\pm$ 6,594*	17,729 $\pm$ 1,861	4,625 $\pm$ 0,460*
	NMDA 100	31,913 $\pm$ 4,202	28,086 $\pm$ 4,449	10,630 $\pm$ 2,764	7,333 $\pm$ 0,408

Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. ANOVA de uma via seguida de Dunnet.\*  $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS/PBS.

Na sessão de teste de exposição ao estímulo condicionado (EC), a análise estatística detectou diferenças significativas ( $p < 0,005$ ) no tempo escondido [ $F(4, 37)=5,0790$ ] e uma tendência ( $p=0,07$ ) no tempo próximo a fonte de odor [ $F(4, 37)=2,2991$ ]. Não houve diferenças entre os grupos quanto ao tempo de *head-out*/tempo escondido e à frequência de cruzamentos (Fig. 4).

O teste *post-hoc* demonstrou um aumento do tempo escondido e uma tendência na redução no tempo próximo ao odor para os animais tratados com NMDA 50pmol na sessão de teste, demonstrando que a dose de NMDA capaz de gerar um estado aversivo ao novo contexto na familiarização e também ao odor na sessão de teste gerando condicionamento é a de 50pmol.



**Figura 4. Comportamentos analisados durante a sessão de teste exibidos por ratos durante a exposição ao estímulo condicionado olfatório.** Os animais foram previamente condicionados a partir de doses crescentes de NMDA ou PBS infundidos na MCPd. PBS (n=8), NMDA 12,5pmol (n=8), NMDA 25pmol (n=9), NMDA 50pmol (n=8) e NMDA 100pmol (n=9). \* p<0,05 comparado ao grupo controle; t = tendência p=0,07. ANOVA de uma via seguida de Dunnet.

#### 4.2 EFEITO DA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> NA MCPd NA AQUISIÇÃO DE UM CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO.

No primeiro conjunto de dados o protocolo experimental foi realizado pela microinjeção de PBS/PBS e PBS/8-OH-DPAT (4 e 8nmol) seguida da exposição ao acetato de amila a 5% na caixa de condicionamento por 10 minutos. A análise estatística não detectou diferenças significativas dos comportamentos de exploração horizontal, exploração vertical, agachar-cheirar, congelamento e fuga entre os grupos experimentais durante a etapa de familiarização na caixa de condicionamento (tabelas 4 e 5).

**Tabela 4. Comportamentos exploratórios analisados durante a sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à infusão de 8-OH-DPAT.**

TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS ANALISADOS (%)	
Pré-trat	Trat	Exploração horizontal	Exploração vertical
PBS		67,222±2,561	18,715±3,011
8-OH-DPAT 4	PBS	69,865±2,731	21,873±2,308
8-OH-DPAT 8		72,687±4,585	14,083±2,469

Dados representados por porcentagem de tempo  $\pm$  E.P.M. Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. ANOVA de uma via seguida de Dunnet.

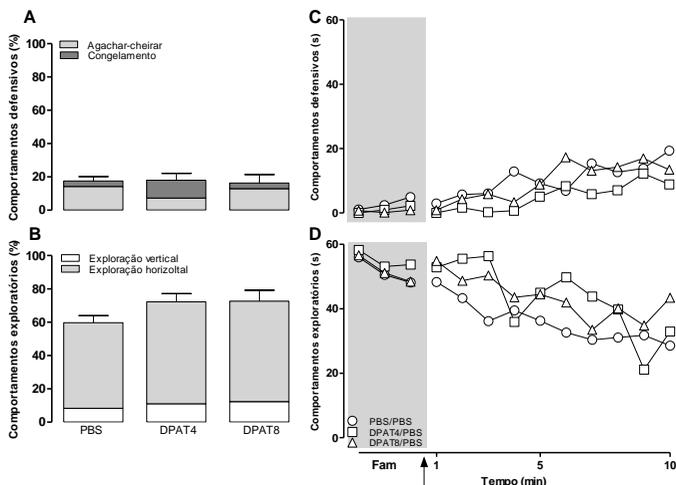
**Tabela 5. Comportamentos defensivos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à infusão de 8-OH-DPAT.**

TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS ANALISADOS (%)		
Pré-trat	Trat	Agachar-cheirar	Congelamento	Fuga
PBS		3,784±1,579	0,895±0,880	0,000±0,000
8-OH-DPAT 4	PBS	1,706±1,580	0,071±0,071	0,000±0,000
8-OH-DPAT 8		0,951±0,517	0,000±0,000	0,000±0,000

Dados representados por porcentagem de tempo  $\pm$  E.P.M. Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. ANOVA e uma via seguida de Dunnet.

A figura 5 mostra dados referentes a sessão de condicionamento. ANOVA não detectou diferenças significativas para a porcentagem total de tempo de expressão de comportamentos defensivos e exploratórios após a injeção intra-MCPd na caixa de condicionamento. Para os dados plotados minuto a minuto, a ANOVA demonstrou diferenças significativas para os comportamentos defensivos [ $F(12, 240)=5,3431, p=0,000001$ ] e exploratórios [ $F(12, 240)=9,7380, p<0,05$ ] somente para o fator tempo.

A diferença somente no fator tempo de ambos comportamentos (defensivos e exploratórios) evidencia que há uma mudança na estratégia comportamental dos animais durante estas duas sessões do protocolo experimental, independente do tratamento.



**Figura 5. Comportamentos defensivos (A e C) e comportamentos exploratórios (B e D) durante a sessão de condicionamento na caixa de condicionamento após a microinjeção de 8-OH-DPAT.** A flecha vertical indica o momento das microinjeções na MCPd. O quadro cinza nos gráficos C e D representa a sessão de familiarização realizada no dia anterior às microinjeções. FAM= Familiarização. A= porcentagem total de comportamentos defensivos. B= porcentagem total de comportamentos exploratórios. C= representação minuto a minuto dos comportamentos defensivos. D= representação minuto a minuto dos comportamentos exploratórios. PBS (n=8), 8-OH-DPAT 4nmol (n=7), 8-OH-DPAT 8nmol (n=8). ANOVA de uma via seguida de Dunnet (gráficos de barras) e ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida de *Newman-Keuls* (gráficos de linhas).

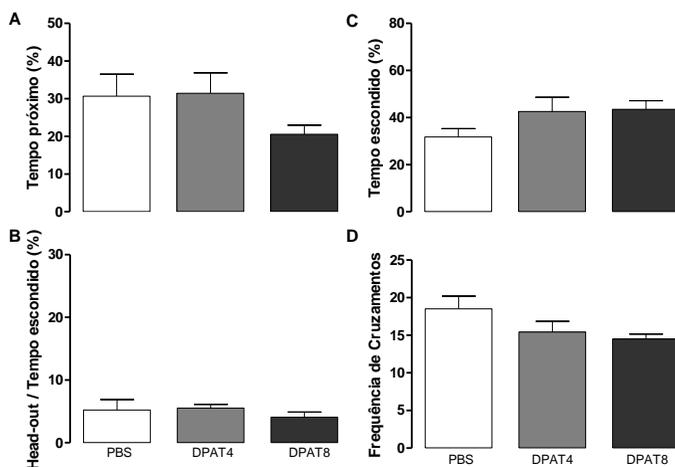
Não foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre os animais que receberam PBS ou 8-OH-DPAT (4 e 8nmol) nos parâmetros de tempo escondido [ $F(2, 20)=2,3818$ ,  $p=0,11808$ ], tempo próximo, tempo de *head-out* e frequência de cruzamentos durante a sessão de familiarização na caixa de exposição de odor (tabela 6).

**Tabela 6. Comportamentos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de exposição ao odor após o condicionamento com 8-OH-DPAT.**

TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS ANALISADOS			
Pré-trat	Trat	Tempo próximo (%)	Tempo escondido (%)	Tempo de <i>head-out</i> (%)	Frequência de cruzamentos (n)
PBS		29,791±3,840	26,666±3,986	13,312±1,691	7,000±0,755
8-OH-DPAT 4	PBS	28,015±4,435	37,777±6,496	12,550±2,424	6,285±0,644
8-OH-DPAT 8		31,041±3,849	42,083±5,286	14,320±3,542	6,125±0,811

Dados representados por porcentagem de tempo ± E.P.M.. Legenda: Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. ANOVA de uma via seguida de Dunnet.

Como pode ser observado na figura 6, a ANOVA não detectou diferenças significativas nos comportamentos analisados durante a sessão de teste na caixa de exposição ao odor, demonstrando que a infusão intra-MCPd de 8-OH-DPAT (4 e 8nmol) não apresentou efeito sobre a expressão dos comportamentos de tempo escondido, tempo próximo, *head-out*/tempo escondido e a frequência de cruzamentos.



**Figura 6. Comportamentos analisados durante a sessão de teste exibidos por ratos durante a exposição ao estímulo condicionado olfatório.** Os animais foram previamente condicionados a partir de doses crescentes de 8-OH-DPAT ou PBS infundidos na MCPd. PBS (n=8), 8-OH-DPAT 4nmol (n=7), 8-OH-DPAT 8nmol (n=8). ANOVA de uma via seguida de Dunnet.

No conjunto de dados demonstrados a seguir o protocolo experimental foi delineado para testar a hipótese de que a modulação serotoninérgica é capaz de modular o condicionamento aversivo olfatório induzido pela infusão de NMDA 100pmol como EI (dose que não foi capaz de gerar um condicionamento *per se*). Os grupos foram divididos em: PBS/PBS, PBS/NMDA100, 8-OH-DPAT4/PBS, 8-OH-DPAT4/NMDA100, 8-OH-DPAT8/PBS e 8-OH-DPAT8/NMDA100.

Os dados referentes aos comportamentos analisados na sessão de familiarização, na caixa de condicionamento, estão apresentados nas tabelas 7 e 8. A ANOVA demonstrou efeito ( $p < 0,05$ ) para o exploração horizontal [ $F(1, 40) = 4,5646$ ]. O teste *post-hoc* detectou diferenças entre o grupo controle PBS/PBS e PBS/NMDA100, PBS/NMDA100 e 8-OH-DPAT4/PBS e 8-OH-DPAT8/NMDA100. Os demais parâmetros analisados não exibiram diferenças estatísticas.

**Tabela 7. Comportamentos exploratórios analisados durante sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à modulação com 8-OH-DPAT e NMDA.**

TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS ANALISADOS (%)	
Pré-trat	Trat	Exploração horizontal	Exploração vertical
PBS	PBS	67,222±2,561	18,715±3,011
	NMDA100	44,364±11,22 <sup>#</sup>	19,709±1,600
8-OH-DPAT 4	PBS	69,865±2,731 <sup>#</sup>	21,873±2,308
	NMDA100	63,268±4,693	18,824±4,159
8-OH-DPAT 8	PBS	72,687±4,585	14,083±2,469
	NMDA100	68,409±4,110 <sup>#</sup>	18,215±2,986

Dados representados por porcentagem de tempo  $\pm$  E.P.M. Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle, #  $p < 0,05$  comparado entre os grupos demonstrados no gráfico. ANOVA fatorial seguida de *Newman-Keuls*.

**Tabela 8. Comportamentos defensivos analisados durante sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à modulação com 8-OH-DPAT e NMDA.**

TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS ANALISADOS (%)		
Pré-trat	Trat	Agachar- cheirar	Congelamento	Fuga
PBS	PBS	3,784±1,579	0,895±0,880	0,000±0,000
	NMDA100	1,580±1,313	0,185±0,185	0,000±0,000
8-OH-DPAT 4	PBS	1,706±1,580	0,071±0,071	0,000±0,000
	NMDA100	0,972±0,488	0,055±0,055	0,000±0,000
8-OH-DPAT 8	PBS	0,951±0,517	0,000±0,000	0,000±0,000
	NMDA100	0,236±0,135	0,041±0,041	0,000±0,000

Dados representados por porcentagem de tempo  $\pm$  E.P.M. Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. ANOVA fatorial seguida de *Newman-Keuls*.

A ANOVA mostrou diferenças ( $p < 0,05$ ) na totalidade de respostas defensivas (Fig. 7A) [ $F(1, 40) = 82,843$ ] e exploratórias (Fig. 7B) [ $F(1, 40) = 56,233$ ,  $p = 0,000001$ ] após a injeção de NMDA durante a sessão de condicionamento. Não houve interação entre os tratamentos (1 e 2) na expressão de comportamentos defensivos e ou exploratórios (Fig. 7).

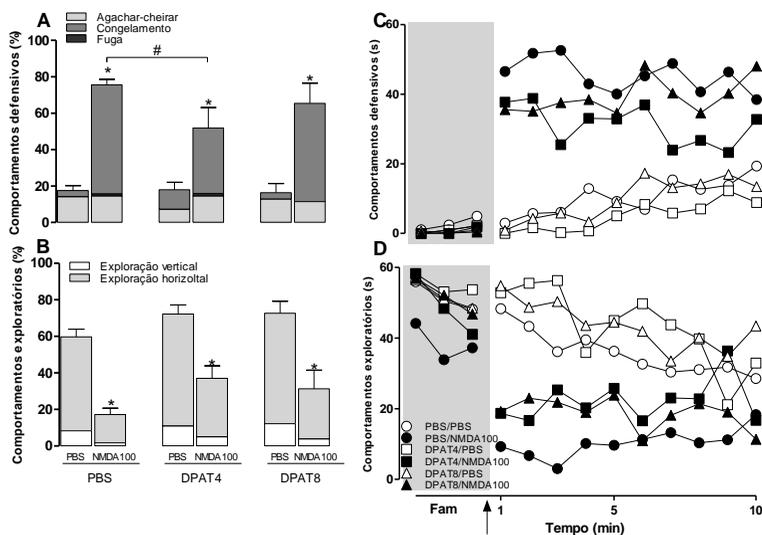
O teste *post-hoc* revelou uma diminuição dos comportamentos defensivos nos animais tratados com 8-OH-DPAT4/NMDA100 comparado ao grupo PBS/NMDA100, além do aumento das respostas defensivas e redução dos comportamentos exploratórios dos animais que receberam NMDA 100pmol comparados aos controle (PBS/PBS).

Com relação as respostas defensivas, a ANOVA detectou diferenças significativas ( $p = 0,00005$ ) nos dados minuto a minuto da sessão de condicionamento para o fator tratamento com NMDA (Fig. 7C) [ $F(1, 40) = 81,443$ ], para o fator tempo [ $F(12, 480) = 28,519$ ], para a interação entre o tempo e o tratamento com NMDA [ $F(12, 480) = 14,895$ ] e uma tendência para o pré-tratamento com 8-OH-DPAT [ $F(2, 40) = 3,0697$ ,  $p = 0,05751$ ].

A análise estatística também mostrou o efeito ( $p < 0,01$ ) sobre as respostas exploratórias (Fig. 7D) dos animais tratados com 8-OH-DPAT [ $F(2, 40) = 4,7435$ ] e com NMDA 100pmol [ $F(1, 40) = 54,557$ ], do fator tempo [ $F(12, 480) = 23,619$ ] e da interação entre o tempo e o tratamento com NMDA [ $F(12, 480) = 7,4046$ ].

O teste *post-hoc* mostrou redução nos comportamentos exploratórios do grupo controle comparado ao grupo NMDA 100pmol que demonstrou menores índices desse comportamento comparado aos grupos 8-OH-DPAT4/PBS, 8-OH-DPAT8/PBS e 8-OH-DPAT8/NMDA100.

Estes dados demonstram que a dose capaz de interferir com as respostas defensivas dos animais que recebem NMDA 100pmol, na sessão de condicionamento, é a dose de 8-OH-DPAT 4nmol. Os dados mostram ainda que o agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT (4 e 8nmol) não promoveu qualquer alteração nos comportamentos dos animais que não receberam NMDA 100pmol na MCPd.



**Figura 7. Comportamentos defensivos (A e C) e comportamentos exploratórios (B e D) durante a sessão de condicionamento na caixa de condicionamento após a modulação com 8-OH-DPAT e NMDA.** A flecha vertical indica o momento das microinjeções na MCPd. O quadro cinza nos gráficos C e D representa a sessão de familiarização realizada no dia anterior às microinjeções. FAM= Familiarização. A= porcentagem total de comportamentos defensivos. B= porcentagem total de comportamentos exploratórios. C= representação minuto a minuto dos comportamentos defensivos. D= representação minuto a minuto dos comportamentos exploratórios. PBS (n=8), 8-OH-DPAT4/PBS (n=7), 8-OH-DPAT4/NMDA100 (n=6), 8-OH-DPAT8/PBS (n=8) e 8-OH-DPAT8/NMDA100 (n=8). \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle, #  $p < 0,05$  comparado entre os grupos demonstrados no gráfico. ANOVA fatorial seguida de *Newman-Keuls* (gráficos de barras) e ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de *Newman-Keuls* (gráficos de linhas).

Os dados comportamentais da sessão de familiarização na caixa de exposição ao odor encontram-se ilustrados na Tabela 9. A ANOVA mostrou diferenças ( $p < 0,05$ ) para a porcentagem de tempo escondido para o pré-

tratamento com 8-OH-DPAT [F(2, 40)=6,5042, p=0,00358], porém não houve diferenças para o tratamento [F(1, 40)=1,1160, p=0,29712] e na interação de tratamentos [F(2, 40)=4,9287, p=0,61453]. Também não foram encontradas diferenças para os demais parâmetros analisados nessa sessão (Fig. 9).

O teste *post-hoc* mostrou um aumento no tempo escondido dos animais que receberam 8-OH-DPAT8/NMDA100, mostrando que a dose mais elevada de 8-OH-DPAT foi capaz de causar aversão a uma novidade (contexto) apresentada 24 horas após a microinjeção de NMDA 100pmol na MCPd.

**Tabela 9. Comportamentos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de exposição ao odor após o condicionamento com 8-OH-DPAT e NMDA.**

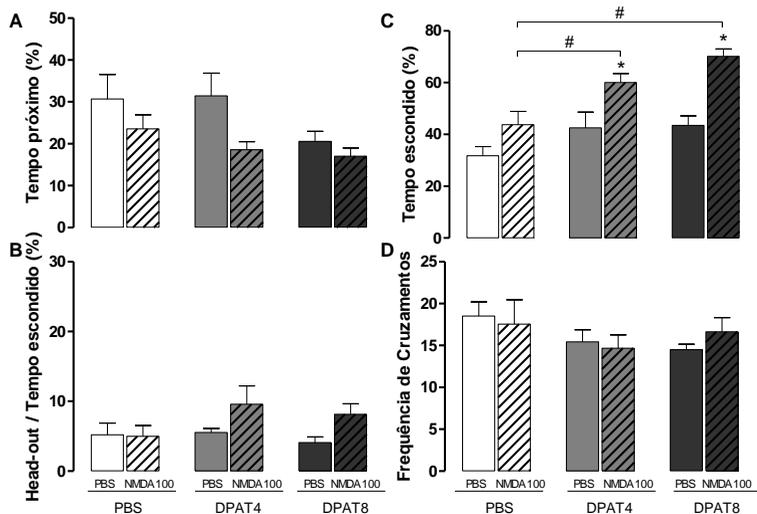
TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS ANALISADOS			
Pré-trat	Trat	Tempo próximo (%)	Tempo escondido (%)	Tempo de <i>head-out</i> (%)	Frequência de cruzamentos (n)
PBS	PBS	29,791±3,840	26,666±3,986	13,312±1,691	7,000±0,755
	NMDA100	31,913±4,202	28,086±4,449 <sup>#</sup>	10,630±2,756	7,333±0,408
8-OH-DPAT4	PBS	28,015±4,435	37,777±6,496	12,550±2,424	6,285±0,644
	NMDA100	40,00±7,483	40,000±7,483	17,428±4,564	6,000±0,894
8-OH-DPAT 8	PBS	31,041±3,849	42,083±5,286	14,320±3,542	6,125±0,811
	NMDA100	53,958±7,919	53,958±7,919 <sup>#</sup>	18,983±3,206	5,875±0,875

Dados representados por porcentagem de tempo ± E.P.M. Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. ANOVA fatorial seguida de *Newman-Keuls*. \* p<0,05 comparado ao grupo PBS/PBS. # p<0,05 comparado entre os grupos demonstrados no gráfico.

A figura 8 mostra os parâmetros comportamentais analisados na sessão de teste. ANOVA detectou diferenças (p<0,05) para a porcentagem de tempo próximo (Fig. 8A) em relação ao tratamento [F(1, 40)=6,0391, p=0,01842]. Não houve diferenças entre os grupos para os parâmetros de tempo próximo para o pré-tratamento e interação entre tratamentos. Para a porcentagem de tempo escondido (Fig. 8C), a análise estatística revelou um efeito do pré-tratamento [F(2, 40)=11,091, p=0,00015] e do tratamento [F(1, 40)=27,723, p=0,00001], não havendo diferenças para a interação entre os tratamentos. Para o comportamento de *head-out*/tempo escondido (Fig. 8B) houve efeito somente do tratamento [F(1, 40)=4,2459, p=0,04589], o pré-tratamento e interação entre tratamentos não mostraram diferenças. Não houve efeito o pré-tratamento, do tratamento e interação entre tratamentos na frequência de cruzamentos (Fig. 8D).

O teste *post-hoc* mostrou que os animais que receberam 8-OH-DPAT (4 e 8nmol) e NMDA 100pmol permaneceram uma maior parte da sessão no compartimento escondido quando comparados com o grupo que recebeu PBS e NMDA100pmol. Percebe-se que as respostas condicionadas frente ao odor,

na sessão de teste, são somente observadas com a infusão conjunta do agonista serotoninérgico e NMDA 100pmol.



**Figura 8. Comportamentos analisados durante a sessão de teste exibidos por ratos durante a exposição ao estímulo condicionado olfatório.** Os animais foram previamente condicionados a partir de doses crescentes de 8-OH-DPAT ou PBS e NMDA infundidos na MCPd. PBS (n=8), 8-OH-DPAT4/PBS (n=7), 8-OH-DPAT4/NMDA100 (n=6), 8-OH-DPAT8/PBS (n=8) e 8-OH-DPAT8/NMDA100 (n=8). \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle, #  $p < 0,05$  comparado entre os grupos demonstrados no gráfico. ANOVA fatorial seguida de *Newman-Keuls*.

### 4.3 EFEITO DA INATIVAÇÃO DOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> DA MCPd NA AQUISIÇÃO DE UM CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO.

O próximo conjunto de dados foi obtido pela infusão de WAY 0,4; 0,8; e 2 nmol, afim de verificar se o antagonismo dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> da MCPd tem influência na aquisição de um condicionamento aversivo olfatório.

As tabelas 10 e 11 trazem os comportamentos analisados na sessão de familiarização na caixa de condicionamento. ANOVA mostrou efeito no comportamento de exploração horizontal [ $F(3, 28) = 5,4226$ ,  $p = 0,00455$ ] dos animais. Não houve diferenças estatísticas para os comportamentos de exploração vertical, congelamento, agachar-cheirar e fuga.

**Tabela 10. Comportamentos exploratórios analisados na sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à infusão de WAY.**

TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS ANALISADOS (%)	
Pré-trat	Trat	Exploração horizontal	Exploração vertical
PBS	PBS	67,222±2,561	18,715±3,011
WAY0,4		67,569±2,445	19,194±2,343
WAY0,8		71,895±2,201	18,814±1,800
WAY2,0		57,404±3,159*	23,198±3,017

Dados representados por porcentagem de tempo  $\pm$  E.P.M. Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. \*  $p < 0,05$  comparado com controle. ANOVA seguida de Dunnet.

**Tabela 11. Comportamentos defensivos analisados na sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à infusão de WAY.**

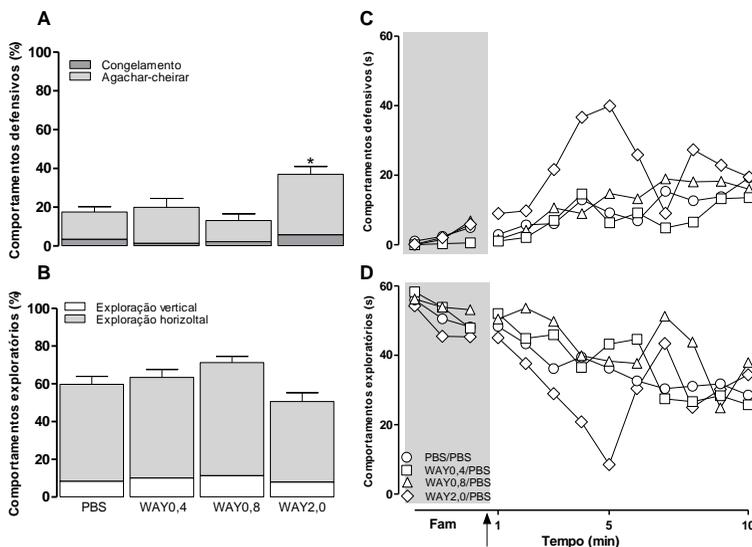
TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS ANALISADOS (%)		
Pré-trat	Trat	Agachar-cheirar	Congelamento	Fuga
PBS	PBS	3,784±1,579	0,895±0,880	0,000±0,000
WAY0,4		4,812±2,309	0,097±0,097	0,000±0,000
WAY0,8		0,487±0,407	0,000±0,000	0,000±0,000
WAY2,0		3,031±2,070	0,101±0,101	0,000±0,000

Dados representados por porcentagem de tempo  $\pm$  E.P.M. Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. ANOVA de uma via seguida de Dunnet.

Na sessão de condicionamento a análise estatística detectou diferenças ( $p < 0,01$ ) na totalidade da porcentagem de comportamentos defensivos (Fig. 9A) [F(3, 28)=7,2602] e de comportamentos exploratórios (gráfico B) [F(3, 28)=4,4043] evidenciados pelos animais. A análise temporal da expressão dos comportamentos defensivos (Fig. 9C), ANOVA mostrou efeito do tratamento [F(3, 28)=5,0331], do tempo [F(12, 336)=13,486] e da interação entre o tempo e o tratamento [F(36, 336)=1,7083] e defensivos houve efeito do tratamento [F(3, 28)=7,0965], da repetição [F(12, 336)=9,2305] e interação entre o tempo e tratamento [F(36, 336)=1,5551]. Para os comportamentos exploratórios (Fig. 9D), eliciados ao longo das sessões de familiarização e condicionamento, houve efeito do tratamento [F(3, 28)=5,0331], do tempo [F(12, 336)=13,486] e interação entre o tempo e tratamento [F(36, 336)=1,7083] (Fig 9). Não houve

diferenças estatísticas para os comportamentos exploratórios exibidos por esses animais durante a sessão de condicionamento (Fig. 9B).

O teste *post-hoc* mostrou um aumento dos comportamentos defensivos dos animais que receberam WAY na dose de 2,0 nmol, tanto na totalidade da expressão quanto nos dados em minutos ao longo da sessão. Sobre os comportamentos exploratórios, o teste não revelou em quais grupos haviam diferenças.



**Figura 9. Comportamentos defensivos (A e C) e comportamentos exploratórios (B e D) durante a sessão de condicionamento na caixa de condicionamento após a microinjeção de WAY.** A flecha vertical indica o momento das microinjeções na MCPd. FAM= Familiarização. A= porcentagem total de comportamentos defensivos. B= porcentagem total de comportamentos exploratórios. C= representação minuto a minuto dos comportamentos defensivos. D= representação minuto a minuto dos comportamentos exploratórios. PBS (n=8), WAY 0,4nmol (n=8), WAY 0,8nmol (n=9) e WAY 2,0nmol (n=7). \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. ANOVA seguida de Dunnet (gráficos de barras) e ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida de *Newman-Keuls* (gráficos de linhas).

Na etapa de familiarização a análise estatística demonstrou diferenças ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de tempo escondido [ $F(3, 28) = 5,5312$ ]. Para os parâmetros de porcentagem tempo próximo, porcentagem de tempo de *head-out*/tempo escondido e frequência de cruzamentos não houve diferenças significativas (Tabela 12).

O teste *post-hoc* mostrou um aumento do tempo escondido para os grupos de animais que receberam WAY 0,8 e 2,0 nmol quando comparados com o grupo controle.

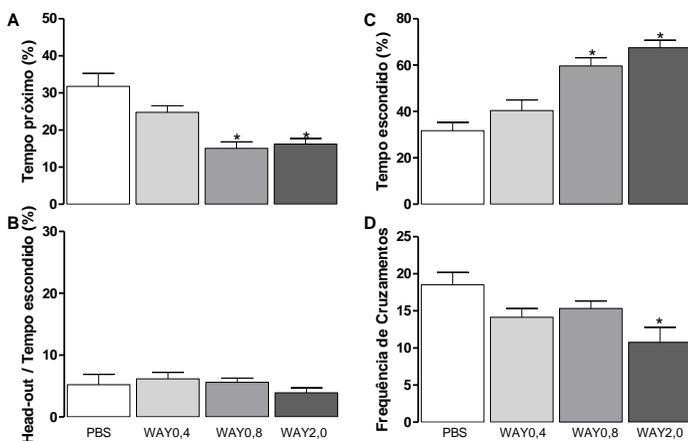
**Tabela 12. Comportamentos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de exposição ao odor após o condicionamento com WAY.**

TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS ANALISADOS			
Pré-trat	Trat	Tempo próximo (%)	Tempo escondido (%)	Tempo de <i>head-out</i> (%)	Frequência de cruzamentos (n)
PBS		29,791±3,840	26,6663,986	13,312±1,691	7,000±0,755
WAY0,4	PBS	31,319±2,693	31,319±2,693	19,420±3,789	30285,375±0,419
WAY0,8		24,938±1,755	42,037±4,057*	14,323±1,327	7,666±0,707
WAY2,0		24,761±2,941	44,285±3,521*	11,408±2,741	6,000±0,617

Dados representados por porcentagem de tempo ± E.P.M. Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. ANOVA de uma via seguida de Dunnet. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS/PBS. #  $p < 0,05$  comparado entre os grupos demonstrados no gráfico.

Em relação às repostas condicionadas ao odor na sessão de teste, a ANOVA detectou efeito do pré-tratamento na porcentagem de tempo escondido [ $F(3, 28)=23,829, p=0,000005$ ], na porcentagem de tempo próximo [ $F(3, 28)=5,1301, p=0,00593$ ] e na frequência de cruzamentos [ $F(3, 28)=3,4096, p=0,03110$ ]. Não foram detectadas diferenças para a porcentagem de *head-out*/tempo escondido (Fig. 10)

O teste *post-hoc* revelou aumento do tempo escondido e diminuição do tempo próximo a fonte de odor para os animais que receberam WAY 0,8 e 2,0 nmol comparados com o controle, assim como uma diminuição na frequência de cruzamentos dos animais do grupo WAY2,0/PBS.



**Figura 10. Comportamentos analisados durante a sessão de teste exibidos por ratos durante a exposição ao estímulo condicionado olfatório.** Os animais foram previamente condicionados a partir de doses crescentes de WAY ou PBS infundidos na MCPd. PBS (n=8), WAY 0,4nmol (n=8), WAY 0,8nmol (n=9) e WAY 2,0nmol (n=7). \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida de Dunnett.

O próximo conjunto de resultados traz dados obtidos a partir da infusão do antagonista  $5\text{-HT}_{1A}$  (0,4 e 0,8nmol) na MCPd, seguida da ativação por NMDA 25pmol.

As tabelas 13 e 14 trazem os dados dos comportamentos analisados na sessão de familiarização. A ANOVA detectou diferenças ( $p < 0,05$ ) no comportamento de exploração horizontal [ $F(1, 43) = 4,0674$ ,  $p = 0,04999$ ]. Para os demais comportamentos não houve diferenças significativas.

**Tabela 13. Comportamentos exploratórios analisados durante a sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à modulação com WAY e NMDA.**

TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS EXPLORATÓRIOS (%)	
Pré-trat	Trat	Exploração horizontal	Exploração vertical
PBS	PBS	67,222±2,561	18,715±3,011
	NMDA25	40,629±11,861*	19,024±2,127
WAY0,4	PBS	67,569±2,445	19,194±2,343
	NMDA25	59,682±9,589	15,436±2,626
WAY0,8	PBS	71,895±2,201	18,814±1,800
	NMDA25	73,777±1,554	18,041±1,896

Dados representados por porcentagem de tempo  $\pm$  E.P.M. Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. \* $p < 0,05$  comparados com controle. ANOVA fatorial seguida de *Newman-Keuls*.

**Tabela 14. Comportamentos defensivos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à modulação com WAY e NMDA.**

TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS (%)		
Pré-trat	Trat	Agachar-cheirar	Congelamento	Fuga
PBS	PBS	3,784±1,579	0,895±0,880	0,000±0,000
	NMDA25	1,938±1,525	0,012±0,012	0,000±0,000
WAY0,4	PBS	4,812±2,309	0,097±0,097	0,000±0,000
	NMDA25	1,936±0,862	1,730±1,730	0,000±0,000
WAY0,8	PBS	0,487±0,407	0,000±0,000	0,000±0,000
	NMDA25	0,083±0,083	0,000±0,000	0,000±0,000

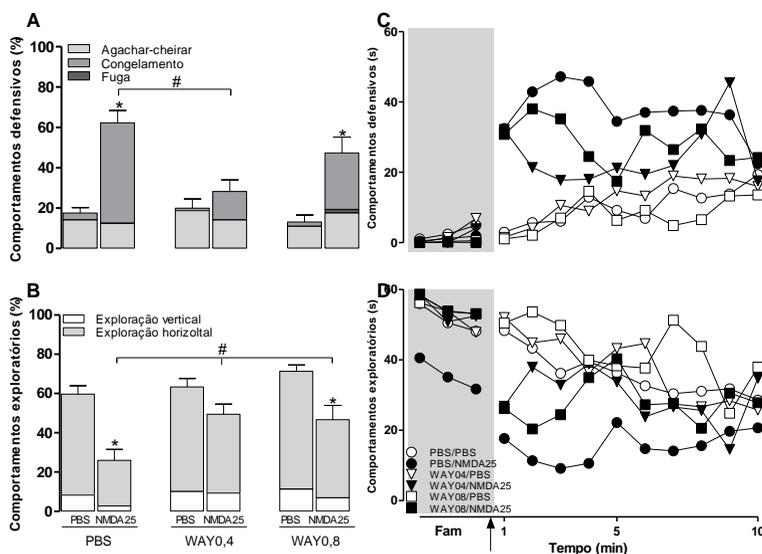
Dados representados por porcentagem de tempo  $\pm$  E.P.M. Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. ANOVA fatorial seguida de *Newman-Keuls*.

Na sessão de condicionamento a ANOVA mostrou diferenças ( $p < 0,05$ ) na porcentagem total dos comportamentos defensivos (Fig. 11A) quanto ao pré-tratamento [ $F(2, 43)=3,4356$ ], ao tratamento [ $F(1, 43)=48,629$ ] e à interação entre os tratamentos [ $F(2, 43)=4,5616$ ,  $p=0,01597$ ]. Para a porcentagem total de comportamentos exploratórios (Fig. 11B) houve efeito do pré-tratamento [ $F(2, 43)=5,9694$ ] e do tratamento [ $F(1, 43)=33,354$ ]. Não houve diferenças quanto à interação entre os tratamentos (Fig. 11).

O teste *post-hoc* mostrou um aumento nas respostas defensivas e diminuição das respostas exploratórias dos animais que receberam

PBS/NMDA25, as quais foram revertidas com a infusão de WAY 0,4nmol 5 minutos antes ao aminoácido excitatório.

No que se refere aos dados ao longo da sessão de condicionamento, a ANOVA detectou efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) nos comportamentos defensivos (Fig. 11C) eliciados pelos animais referentes ao pré-tratamento [ $F(2, 43) = 3,3404, p = 0,04482$ ], ao tratamento [ $F(1, 43) = 45,237, p = 0,000005$ ], e a interação entre os tratamentos [ $F(2, 43) = 4,2781, p = 0,02021$ ] do tempo [ $F(12, 516) = 15,712, p = 0,00005$ ] e da interação entre o tempo e o tratamento com NMDA [ $F(12, 516) = 6,8124, p = 0,000005$ ]. Para os comportamentos exploratórios (Fig. 11D) houve efeito do pré-tratamento [ $F(2, 43) = 6,9364, p = 0,00245$ ], do tratamento [ $F(1, 43) = 30,500, p = 0,000005$ ], do tempo [ $F(12, 516) = 15,680, p = 0,00005$ ] e da interação entre o tempo e o tratamento [ $F(12, 516) = 2,6658, p = 0,00175$ ] (Fig. 11).



**Figura 11. Comportamentos defensivos (A e C) e comportamentos exploratórios (B e D) durante a sessão de condicionamento na caixa de condicionamento após a modulação com WAY e NMDA.** O quadro cinza nos gráficos C e D representa a sessão de familiarização realizada no dia anterior às microinjeções. A flecha vertical indica o momento das microinjeções na MCPd. FAM= Familiarização. A= porcentagem total de comportamentos defensivos. B= porcentagem total de comportamentos exploratórios. C= representação minuto a minuto dos comportamentos defensivos. D= representação minuto a minuto dos comportamentos exploratórios. PBS (n=8), WAY 0,4/PBS (n=8), WAY 0,4/NMDA25 (n=8), WAY 0,8/PBS (n=9) e WAY 0,8/NMDA25 (n=7). \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle, #  $p < 0,05$  comparado entre os grupos demonstrados no gráfico. ANOVA fatorial seguida

de *Newman-Keuls* (gráficos de barras) e ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de *Newman-Keuls* (gráficos de linhas).

A tabela 15 mostra os parâmetros comportamentais analisados na sessão de familiarização na caixa de exposição ao odor. ANOVA detectou efeito ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de tempo próximo à fonte de odor somente do pré-tratamento [ $F(2, 43)=4,7716, p=0,01344$ ]. Para a porcentagem de tempo escondido houve efeito do pré-tratamento [ $F(2, 43)=6,4493, p=0,00355$ ] e do tratamento [ $F(1, 43)=7,0745, p=0,01094$ ]. Para frequência de cruzamentos houve efeito somente do pré-tratamento [ $F(2, 43)=4,4633, p=0,017330$ ].

O teste de *post-hoc* mostrou um aumento na porcentagem de tempo próximo para os animais que receberam WAY0,4/NMDA25 em relação aos que receberam WAY0,8/NMDA25. Também houve aumento no tempo escondido dos animais do grupo WAY0,8/NMDA25 quando comparados com os animais do grupo PBS/NMDA25. Para a frequência de cruzamentos, ANOVA mostrou diferenças significativas, mas *post-hoc* não detectou quais grupos são diferentes.

Nota-se que houve aumento nas respostas defensivas (tempo escondido) do grupo que recebeu a dose de 0,8nmol de WAY100635, podendo haver perda da seletividade nas respostas defensivas dos animais em relação a uma novidade apresentada 24h após a microinfusão na MCPd.

**Tabela 15. Comportamentos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de exposição ao odor após o condicionamento com WAY e NMDA.**

TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS ANALISADOS			
		Tempo próximo (%)	Tempo escondido (%)	Tempo de <i>head-out</i> (%)	Frequência de cruzamentos (n)
Pré-trat	Trat				
PBS	PBS	29,791±3,840	26,666±3,986	13,312±1,691	7,000±0,755
	NMDA25	26,851±3,232	33,086±5,306 <sup>#</sup>	14,126±2,526	7,777±0,521
WAY0,4	PBS	31,319±2,693	31,319±2,693	19,420±3,715	5,375±0,419
	NMDA25	39,444±7,345 <sup>#</sup>	44,365±7,819	13,153±2,280	6,000±0,577
WAY0,8	PBS	24,938±1,755	42,037±4,057	14,323±1,327	7,666±0,707
	NMDA25	22,500±2,767 <sup>#</sup>	53,750±6,051 <sup>#</sup>	9,689±1,961	6,750±0,590

Dados representados por porcentagem de tempo ± E.P.M. Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. ANOVA fatorial seguidas de *Newman-Keuls*. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS/PBS. #  $p < 0,05$  comparado entre os grupos demonstrados no gráfico.

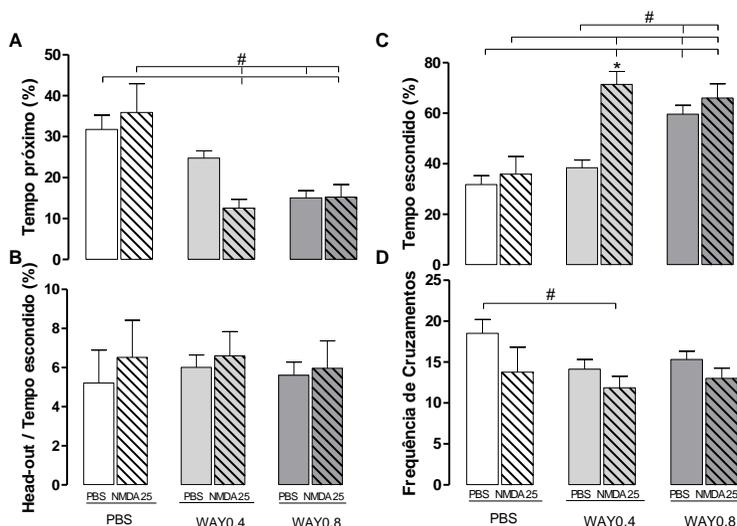
Na sessão de teste na caixa de odor, ANOVA demonstrou diferenças ( $p < 0,05$ ) para a porcentagem de tempo próximo (Fig. 12A) apenas para o pré-tratamento [ $F(2, 43)=8,3687, p=0,00085$ ]. Para a porcentagem de tempo escondido (Fig. 12C) houve efeito do pré-tratamento [ $F(2, 43)=21,789$ ,

$p=0,000005$ ], do tratamento [ $F(1, 43)=19,563, p=0,00007$ ] e da interação entre os tratamentos [ $F(2, 43)=4,5264, p=0,01644$ ].

Não houve efeito do pré-tratamento, do tratamento e da interação entre os tratamentos no parâmetro de *head-out* /tempo escondido (Fig 12B). Já para a frequência de cruzamentos, a análise estatística detectou efeito do pré-tratamento com WAY [ $F(2, 43)=5,4290, p=0,00790$ ] (Fig. 12D).

O teste post-hoc mostrou diminuição na porcentagem de tempo próximo ao odor e aumento da porcentagem de tempo escondido dos grupos WAY0,4/NMDA25, WAY0,8/PBS e WAY0,8/NMDA25. Além de uma redução na frequência de cruzamentos do grupo WAY0,4/NMDA25 quando comparado com PBS/PBS.

Esses resultados demonstram que a dose de 0,4nmol do antagonista serotoninérgico foi capaz de favorecer um condicionamento com uma dose subefetiva de NMDA. Além disso, mostram que a dose de 0,8nmol foi capaz de gerar um condicionamento aversivo sem a necessidade da infusão de NMDA na MCPd, efeito que mostrou-se estável com o uso de NMDA 25pmol microinjetado cinco minutos após.



**Figura 12. Comportamentos analisados durante a sessão de teste exibidos por ratos durante a exposição ao estímulo condicionado olfatório.** Os animais foram previamente condicionados a partir de doses crescentes de WAY ou PBS e NMDA infundidos na MCPd. PBS (n=8), WAY 0,4/PBS (n=8), WAY0,4/NMDA25 (n=8), WAY 0,8/PBS (n=9) e WAY 0,8/NMDA25 (n=7). \*  $p<0,05$  comparado ao grupo controle, #  $p<0,05$  comparado entre os grupos demonstrados no gráfico. ANOVA fatorial seguida de *Newman-Keuls*.

#### 4.4 EFEITO DA INIBIÇÃO DA LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO E INATIVAÇÃO DOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> DA MCPd EM UM CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO.

No seguinte conjunto de resultados os dados foram obtidos a partir da infusão de WAY 2,0nmol (antagonista 5-HT<sub>1A</sub>) e riluzol (inibidor da liberação de glutamato) 4,0nmol; afim de verificar se o efeito da aprendizagem eliciada pelo WAY, em doses mais robustas, acontece na pré ou na pós-sinapse.

As tabelas 16 e 17 mostram os dados obtidos na sessão de familiarização na caixa de condicionamento. ANOVA não detectou diferenças no comportamentos analisados nesta sessão.

**Tabela 16. Comportamentos exploratórios analisados na sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à infusão de RLZ e WAY.**

TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS ANALISADOS (%)	
Pré-trat	Trat	Exploração horizontal	Exploração vertical
PBS		67,222±2,561	18,715±3,011
WAY2,0	PBS	57,404±3,159	23,198±3,017
RLZ4,0		64,731±4,501	24,675±3,830
	WAY2,0	59,182±5,072	27,317±3,255

Dados representados por porcentagem de tempo ± E.P.M. Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. ANOVA de uma via seguida de Dunnet.

**Tabela 17. Comportamentos defensivos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de condicionamento anteriormente à infusão de RLZ e WAY.**

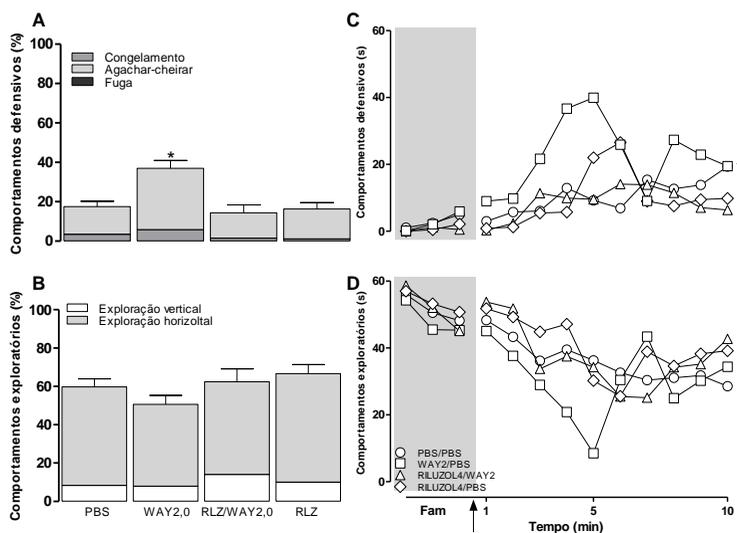
TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS ANALISADOS (%)		
Pré-trat	Trat	Agachar-cheirar	Congelamento	Fuga
PBS		3,784±1,579	0,895±0,880	0,000±0,000
WAY2,0	PBS	3,031±2,070	0,101±0,101	0,000±0,000
RLZ4,0		1,351±0,696	0,101±0,101	0,000±0,000
	WAY2,0	0,896±0,791	0,000±0,000	0,000±0,000

Dados representados por porcentagem de tempo ± E.P.M. Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. ANOVA de uma via seguida de Dunnet.

Na sessão de condicionamento, demonstrada pela figura 13, a análise estatística detectou efeito nas respostas defensivas [F(3, 24)=8,7780,  $p=0,00042$ ] (Fig. 13A) dos animais que receberam WAY2,0/PBS em comparação com o controle. No que se refere as respostas exploratórias (Fig. 13B), ANOVA não detectou diferenças significativas.

A ANOVA detectou efeito ( $p<0,005$ ) do tratamento [F(3, 24)=9,0843,  $p=0,00034$ ], do tempo [F(12, 288)=8,9985,  $p=0,000005$ ] e da interação entre o tempo e o tratamento [F(36, 288)=1,8258,  $p=0,00391$ ] nas repostas defensivas (Fig. 13C) ao longo da sessão. Para as repostas exploratórias (Fig. 13D) houve diferença apenas em relação ao tempo [F(12, 288)=13,033,  $p=0,00005$ ]; os demais fatores não demonstraram diferenças estatísticas significativas (Fig. 13).

O teste de *post-hoc* mostrou incremento nas repostas defensivas dos animais que receberam WAY2,0/PBS, sugerindo que o antagonista serotoninérgico, microinjetado na MCPd neste experimento, parece provocar um efeito pró-aversivo/ansio gênico nos animais durante a sessão de condicionamento.



**Figura 13. Comportamentos defensivos (A e C) e comportamentos exploratórios (B e D) durante a sessão de condicionamento na caixa de condicionamento após a modulação com RLZ e WAY.** O quadro cinza nos gráficos C e D representa a sessão de familiarização realizada no dia anterior às microinjeções. A flecha vertical indica o momento das microinjeções na MCPd. PBS (n=8), WAY 2,0nmol (n=7), RLZ/WAY2,0 (RLZ= riluzol 4 nmol; n=7) e RLZ (RLZ= riluzol 4nmol; n=6). \*  $p<0,05$  comparado ao grupo controle. ANOVA seguida de Dunnet (gráficos de barras)

e ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida de *Newman-Keuls* (gráficos de linhas).

Na sessão de familiarização, demonstrada na tabela 18, a ANOVA mostrou diferenças ( $p < 0,005$ ) somente no tempo escondido [ $F(3, 24) = 5,9373$ ,  $p = 0,00353$ ]. Os parâmetros de porcentagem de tempo próximo, porcentagem de *head-out*/tempo escondido e frequência de cruzamentos não demonstraram diferenças estatísticas significativas. O teste *post-hoc* detectou aumento do tempo escondido entre todos os grupos e o grupo PBS/PBS.

Com base nos dados apresentados, pode-se notar que todos os grupos perderam a seletividade nas respostas defensivas frente a um novo contexto apresentado 24hs após a microinjeção de WAY (em doses mais robustas) e riluzol.

**Tabela 18. Comportamentos analisados durante a sessão de familiarização na caixa de exposição ao odor após o condicionamento com RLZ e WAY.**

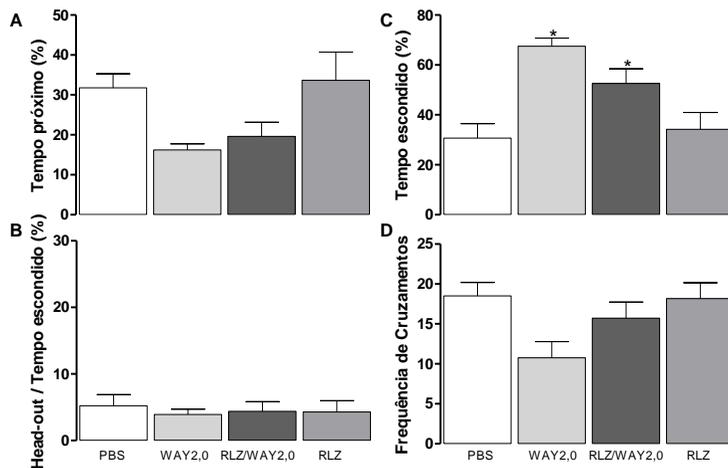
TRATAMENTOS		COMPORTAMENTOS ANALISADOS			
		Tempo próximo (%)	Tempo escondido (%)	Tempo de <i>head-out</i> (%)	Frequência de cruzamentos (n)
Pré-trat	Trat				
BS		29,791±3,840	26,666±3,986	13,312±1,691	7,000±0,755
WAY2,0	PBS	24,761±2,941	44,285±3,521*	11,408±2,741	6,000±0,617
		28,148±3,725	41,203±2,110*	13,192±2,281	7,142±0,633
	WAY2,0	30,634±3,217	40,000±2,780*	10,897±3,646	6,666±0,666

Dados representados por porcentagem de tempo ± E.P.M. Legenda: Pré-trat = pré-tratamento. Trat = tratamento. ANOVA de uma via seguida de Dunnet. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS/PBS.

A figura 14 demonstra os dados referentes à reexposição ao odor condicionado, onde a ANOVA detectou efeito ( $p = 0,00005$ ) no tempo escondido (Fig. 14C) [ $F(3, 24) = 12,042$ ], porém não houve diferenças para os comportamentos de tempo próximo (Fig. 14A), *head-out*/tempo escondido (Fig. 14B) e frequência de cruzamentos (Fig. 14D). O teste *post-hoc* revelou aumento na porcentagem de tempo escondido para os animais que receberam WAY2,0/PBS e RLZ4,0/WAY2,0 quando comparados com o grupo PBS/PBS (Fig. 19).

Esses dados mostram que o efeito do WAY na MCPd sobre a aprendizagem dos animais parece não ser modificado pela diminuição dos níveis de glutamato, entretanto a possível diminuição da excitabilidade da região pode ser uma possível explicação para a diminuição das respostas

defensivas do ratos que receberam riluzol e WAY na sessão de condicionamento.



**Figura 14. Comportamentos analisados durante a sessão de teste exibidos por ratos durante a exposição ao estímulo condicionado olfatório.** PBS (n=8), WAY 2,0nmol (n=7), RLZ/WAY2,0 (RLZ= riluzol 4 nmol; n=7) e RLZ (RLZ= riluzol 4nmol; n=6). \* p<0,05 comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida de Dunnett.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os receptores 5-HT<sub>1A</sub> da MCPd participam da modulação de respostas defensivas e no aprendizado do condicionamento aversivo olfatório promovido pela estimulação de receptores NMDA. Ao passo que o agonista 5HT<sub>1A</sub> 8-OH-DPAT foi capaz de reduzir as respostas de defesa promovida pela dose elevada de NMDA na MCPd (100pmol) e promover o aprendizado aversivo, o antagonista 5HT<sub>1A</sub> WAY foi capaz de, per se, promover respostas de defesa e também potencializar o aprendizado aversivo com baixas doses de NMDA. Esses resultados confirmam que o sistema serotoninérgico concomitante ao glutamato, dentro da MCPd, promove um balanço nas respostas de defesa para modular as reações de luta e fuga e posteriormente a formação de memória.

*O condicionamento aversivo olfatório pode ser promovido pela estimulação química da MCPd com NMDA.*

A primeira etapa experimental deste trabalho foi realizada através da padronização de um protocolo de condicionamento aversivo olfatório induzido pela estimulação da MCPd com NMDA. Em estudos anteriores do laboratório, Kincheski e colaboradores (2012) verificaram que a estimulação química da MCPd caudal poderia ser utilizada como EI nesse paradigma comportamental. Foi demonstrado que a aplicação de 100 pmol de NMDA na MCPd gera um caráter aversivo capaz de promover durante um período de 10 minutos a associação com um estímulo olfatório.

A diferença entre as doses utilizadas no protocolo de condicionamento aversivo olfatório pode ser explicada pelas diferentes linhagens de animais utilizados e a localização do local da microinjeção de NMDA para promover o condicionamento. No trabalho realizado por Kincheski *et al.*, (2012), a porção caudal do eixo rostro-caudal foi escolhida para o implante de cânulas-guia na MCPd, enquanto no presente estudo a região que recebeu a estimulação química na foi a MCPd rostral.

A diferenciação entre a modulação comportamental evocada pela estimulação da MCP é relatada por Souza e Carobrez (2016), os quais mostraram que após o bloqueio dos receptores NMDA com AP5 na porção rostral houve redução da expressão de respostas defensivas ao odor de gato além de prejudicar a aquisição, porém não a consolidação do medo contextual, diferentemente do observado nos animais implantados na região caudal, nos quais houve redução dos comportamentos defensivos evocados pelo contexto (SOUZA e CAROBREZ, 2016), mostrando que há distinção no eixo rostro-caudal da MCP na modulação comportamental.

Os resultados encontrados neste trabalho evidenciam um aumento das respostas defensivas dos animais que receberam NMDA, em todas as doses testadas na sessão de condicionamento, as quais não se diferenciavam anteriormente à microinjeção (sessão de familiarização na caixa de condicionamento) (tabelas 1 e 2). Resultados semelhantes também foram demonstrados por outros estudos que envolveram estimulação química (KINCHESKI, MOTA-ORTIZ, *et al.*, 2012) ou elétrica (DI SCALA, MANA, *et al.*, 1987; CASTILHO e BRANDÃO, 2001) da MCP.

Dentre as doses utilizadas, a única dose capaz de produzir um condicionamento aversivo olfatório efetivo foi a de 50pmol (Fig. 5), pois diferente dos outros grupos, os animais que receberam NMDA 50 apresentaram no dia do teste um aumento do tempo escondido e uma redução do tempo próximo a fonte de odor, caracterizado um aprendizado aversivo. Entretanto, é importante observar que na sessão de familiarização ocorreu aumento no tempo escondido e redução no número de cruzamentos, sugerindo que a estimulação química da MCP nessa dose pode provocar excitação capaz de gerar aversão a novos contextos.

No mesmo modelo utilizado, Kincheski (2011) observou condicionamento com doses maiores de NMDA (100pmol), porém há diferenças a nível estrutural das cirurgias realizadas quando comparadas à este trabalho. Em 2011, Kincheski realizou a canulação da região caudal da MCPd, a qual demonstrou um padrão distinto para o condicionamento dos animais, o qual incluiu a curva dose-resposta. Já em relação aos comportamentos analisados na sessão de familiarização e condicionamento na caixa de condicionamento (dias 1 e 2) a autora não realizou. Esse fato abriu novas possibilidades de entendimento das bases neurais do medo aprendido e assim sendo realizou-se a citada análise.

Neste tipo de modelo comportamental, a magnitude das respostas condicionadas está diretamente relacionado com a intensidade do EI (ANNAU e KAMIN, 1961; SACCHETTI, AMBROGI LORENZINI, *et al.*, 1999). Porém, a relação não-linear demonstrada pela curva em “sino” ou em “U invertido” vem sendo relatada em diversos paradigmas de aprendizado podendo sofrer modulação pelo nível de excitação emocional gerado pelo estímulo (BALDI e BUCHERELLI, 2005). Sendo assim, as doses acima ou abaixo de 50pmol, não atingiram ou ultrapassaram o limiar de excitação emocional necessário para gerar um condicionamento aversivo olfatório, porém promoveram comportamentos defensivo em intensidades semelhantes.

Os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA quando ativados permitem o influxo de cálcio para neurônios pós-sinápticos, fato essencial para a mediação da LTP (*long-term potentiation* – potenciação de longa duração). Essa entrada faz com que cascatas de transdução de sinal sejam ativadas, como

a cascata da proteína cinase. Especialmente no processo de LTP duas proteínas-cinase são ativadas: a proteína cinase cálcio dependente/Calmodulina (CaMKII) e a proteína-cinase C (PKC) fato que auxilia no aumento da sensibilidade das células pós-sinápticas ao glutamato, ocorrido pela inserção de receptores AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico) na membrana ou também pela redução em sua internalização, mantendo-os ativados por maior tempo, induzindo plasticidade (BÄR, WIEGANT, *et al.*, 1984; MALENKA, KAUER, *et al.*, 1988). Essas informações corroboram com os achados deste trabalho, que mostrou que a ativação dos receptores NMDA foi capaz de dar suporte a um aprendizado associativo.

Com esses resultados, a dose de 50pmol foi utilizada como limiar de aprendizado ótimo para promover um aprendizado efetivo.

*A modulação promovida pela ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> da MCPd promove a aquisição de um condicionamento aversivo olfatório.*

Com base nos resultados encontrados na primeira etapa experimental, este estudo buscou verificar se as respostas de defesa e o aprendizado aversivo com a estimulação de NMDA na MCPd seria passível da modulação serotoninérgica através dos receptores 5HT<sub>1A</sub> presentes nessa região.

Inicialmente foi verificada a atividade do agonista 8-OH-DPAT nas doses de 4 e 8nmol nesse paradigma. Os resultados demonstraram que somente o uso do agonista não influenciou as respostas defensivas dos animais, assim como não é capaz de promover um aprendizado associativo.

A ativação desses receptores promove inibição de adenilato ciclase e diminuição dos níveis de AMPc, fatores necessários para a uma das fases da LTP, além de não promover a ativação de receptores NMDA e portanto, não ocorrendo a influxo de Ca<sup>+2</sup>, mudanças essas essenciais quando nos referimos à processos mnemônicos (KANDEL, SCHWARTZ e JESSEL, 2000).

O passo seguinte foi verificar se a modulação serotoninérgica com 8-OH-DPAT (4 e 8nmol) anterior à estimulação química com NMDA na MCPd na dose de 100pmol, dose que não foi capaz de gerar condicionamento, poderia auxiliar na aquisição de um condicionamento aversivo olfatório.

Os resultados aqui encontrados mostram que a infusão do agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT (4nmol) gera uma diminuição significativa nas respostas de defesa dos animais que receberam NMDA 100pmol quando comparados com aqueles que não sofreram a modulação serotoninérgica na MCPd.

Achados anteriores mostraram que a ativação do receptor 5-HT<sub>1A</sub> reduz a expressão de respostas de escape. A utilização do pré-tratamento com

8-OH-DPAT anterior a infusão do aminoácido excitatório D,L-hemocistéico (DLH) na MCP atenuou os comportamentos defensivos induzidos pela estimulação da MCP (BECKETT, LAWRENCE, *et al.*, 1992; BECKETT e MARSDEN, 1997), evidenciando que a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> medeia as repostas defensivas provocadas pela estimulação química dessa estrutura.

A MCPd recebe fibras serotoninérgicas oriundas do NDR, sugerindo que a ativação desse núcleo resultaria na facilitação das estratégias de defesa contra uma potencial ameaça (DEAKIN e GRAEFF, 1991) e que as fibras serotoninérgicas que inervam a MCPd podem regular fisiologicamente comportamentos aversivos (GRAEFF e ZANGROSSI JR, 2010).

Behrani e colaboradores observaram que o agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT tem grande influência sobre neurônios da MCP, mas principalmente os localizados na MCPd (BEHBEHANI, LIU, *et al.*, 1993), e o aumento da atividade serotoninérgica na MCPd tem demonstrado um efeito anti-aversivo, enquanto que o decréscimo desse neurotransmissor facilita respostas de escape oriundas da estimulação elétrica dessa região (GRAEFF e ZANGROSSI JR, 2010).

A administração de 8-OH-DPAT na MCPd prejudicou a esquia inibitória de animais submetidos ao labirinto em T elevado, enquanto que a administração de serotonina facilitou esse comportamento, e a utilização de um inibidor da síntese de serotonina, PCPA (para-clorofenilalanina), administrado sistemicamente, aumentou marcadamente a resposta de escape (KISER, LEBOVITZ e GERMAN, 1978). O uso desse agonista associado à dose de 100pmol de NMDA no LCE provocou um aumento nos comportamentos ansiogênicos dos animais, os quais eram ausentes quando utilizava-se somente o aminoácido excitatório (MORAES, BERTOGLIO e CAROBREZ, 2008) reforçando a interação dos receptores glutamatérgicos e serotoninérgicos dessa região.

O fato da maior dose do agonista testada não ocasionar uma diminuição significativa nas repostas defensivas dos animais pode ser explicada pela afinidade da mesma, que além de interagir com os receptores 5-HT<sub>1A</sub> também ativa receptores 5-HT<sub>7</sub>, que resulta na ativação de adenilato ciclase aumentando os níveis de AMPc (BARD, ZGOMBICK, *et al.*, 1993), efeito contrário aos da ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>.

No terceiro dia, durante a etapa de familiarização houve aumento no tempo escondido dos ratos que receberam 8-OH-DPAT 8nmol e NMDA 100pmol. O nível de excitação neural dessa região encefálica está diretamente relacionado com o aumento nos níveis de medo dos animais (BRANDÃO, DE AGUIAR e GRAEFF, 1982). Estudos ressaltam que uma mudança ou novidade podem ter significados distintos dependendo da história prévia do

indivíduo. O evento pode ser considerado novo frente a todo histórico de vida ou novo somente sobre uma experiência anterior, esta última pode causar surpresa, medo ou até fuga, ao invés de curiosidade. Um fator importante na evocação do comportamento de esquiva ou evitação é, evidentemente, um contraste entre o que é esperado e o que é observado no contexto pelo animal (BERLYNE, 1951).

Os animais que receberam 8-OH-DPAT 4 e 8nmol seguido de NMDA 100pmol apresentaram respostas defensivas frente ao odor anteriormente condicionado na sessão de teste, demonstrado pelo aumento do tempo escondido, sugerindo que a modulação serotoninérgica realizada na MCPd resultou em uma facilitação do condicionamento aversivo ao odor, além da dose de 4nmol reduzir as respostas defensivas produzidas pela estimulação da MCPd propiciando suporte necessário para o condicionamento.

*A inativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> da MCPd promove a aquisição de um condicionamento aversivo olfatório.*

Com o propósito de verificar se a inativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> poderiam auxiliar na promoção de um condicionamento aversivo olfatório, ratos receberam uma estimulação da MCPd usando uma menor dose de NMDA, subefetiva para gerar o condicionamento, após a aplicação do antagonista dos receptores 5HT<sub>1A</sub>, WAY.

Após a infusão do antagonista, na sessão de condicionamento, houve aumento das respostas defensivas dos ratos que receberam a dose de 2,0nmol, sugerindo que o antagonista apresenta um efeito pró-aversivo, *per se*, na maior dose utilizada.

Tais dados corroboram estudos anteriores que evidenciam o efeito pró-aversivo da infusão de WAY na MCPd (BROIZ, OLIVEIRA e BRANDÃO, 2008). Beckett e Marsden (1997) avaliaram as respostas defensivas de animais que sofreram bloqueio dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> com WAY seguida da estimulação com DLH. Após o antagonismo houve aumento das respostas defensivas emitidas pelos animais após a estimulação da região.

No LCE, o bloqueio dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> reverteu a esquiva inibitória produzida pela infusão de NMDA na MCPd, reafirmando uma possível interação entre receptores glutamatérgicos e serotoninérgicos na modulação destes comportamentos (MORAES, BERTOGLIO e CAROBREZ, 2008).

O antagonismo dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> da MCP parece aumentar o nível de excitabilidade dessa estrutura. Desta forma, houve aumento das respostas defensivas nas doses mais altas do WAY já na sessão de familiarização na caixa de odor, evidenciado pelo aumento do tempo

escondido, antes mesmo da exposição ao EC, ou seja, a um novo contexto. Durante a sessão de teste, os ratos tratados com WAY continuaram exibindo as mesmas respostas defensivas frente ao EC. Os mesmos animais não apresentaram qualquer resistência em explorar a caixa de condicionamento no primeiro dia de protocolo experimental (sessão de familiarização na caixa de condicionamento). Sugere-se que este dado compartilhe da mesma explicação dada ao fato ocorrido com o grupo NMDA 50pmol, na sessão de familiarização (Fig. 4), percebe-se que ambas injeções parecem aumentar a excitação da região incrementando os níveis de medo destes animais a longo prazo, produzindo aversão a apresentação de um novo ambiente.

Outros achados mostram que a microinjeção de WAY na MCPd foi capaz de reduzir o limiar das respostas defensivas evocadas pela estimulação elétrica ou química da MCPd, além de aumentar o tempo de congelamento frente a um contexto previamente pareado com a estimulação elétrica dessa estrutura (BROIZ, OLIVEIRA e BRANDÃO, 2008).

Portanto, os resultados aqui encontrados mostram que a capacidade da MCPd dar suporte ao estabelecimento de um condicionamento aversivo olfatório está relacionada à intensidade do estímulo ou ao nível de excitação produzido por tal estímulo e que essa intensidade pode ser modulada pelos receptores 5-HT<sub>1A</sub> presentes nessa região.

*A inibição da liberação de glutamato não impede a aquisição do condicionamento aversivo olfatório pelo bloqueio dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>.*

Com a intenção de investigar se o condicionamento induzido pelas maiores doses do antagonista WAY, poderia se dar a partir da liberação pré-sináptica de glutamato, nesta etapa foi utilizado um fármaco inibidor da liberação de glutamato, o riluzol, em uma dose já estabelecida por outros experimentos realizados no laboratório.

Os resultados demonstraram que a infusão de riluzol anteriormente ao bloqueio dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> foi capaz de diminuir as respostas defensivas eliciadas pelos ratos após a microinjeção, na sessão de condicionamento. Entretanto, não foi capaz de alterar a resposta condicionada dos animais ao odor, na sessão de teste. Os dados demonstrados pela infusão do riluzol não podem ser considerados conclusivos, já que somente uma dose foi utilizada. De modo a suportar maiores conclusões acerca do efeito do riluzol, poderia ser utilizada uma dose maior do que as testadas no presente trabalho.

Dentre as ações “anti-glutamatérgicas” propostas para o riluzol, temos a inibição da liberação de glutamato e o aumento da atividade do transportador de glutamato nas células gliais, reduzindo assim os níveis de glutamato da região (FUMAGALLI, FUNICELLO, *et al.*, 2008) suportando a evidencia dos

efeitos comportamentais observados serem explicados pela redução na excitabilidade da região reduzindo as respostas defensivas dos animais.

A administração sistêmica de riluzol foi capaz de melhorar o índice de discriminação de objetos e facilitar a extinção de uma memória de medo (SUGIYAMA, SAITOH, *et al.*, 2015), além de apresentar ações antidepressivas quando administrado cronicamente em animais (GOURLEY, ESPITIA, *et al.*, 2013).

Esses achados demonstram que o condicionamento provocado pela administração de riluzol seguida pela inativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> parece modificar as respostas defensivas durante a sessão de condicionamento, mas não afeta o aprendizado aversivo.

Deste modo, o trabalho sugere uma interação entre os receptores glutamatérgicos e serotonérgicos da MCPd no controle das respostas defensivas e no aprendizado associativo induzido pela estimulação química dessa região. Maiores informações acerca deste papel modulatório dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> na MCP deverão ser investigados.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, os resultados obtidos levam a concluir que:

- O estado aversivo evocado pela estimulação química da MCPd é capaz de promover um condicionamento aversivo olfatório e a intensidade da estimulação está relacionada com aprendizagem;
- A ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> reduz a excitabilidade provocada pela dose de 100pmol de NMDA e é capaz de modular as respostas defensivas eliciadas pela estimulação química da MCPd e facilitar o condicionamento;
- O antagonismo dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> aumenta a excitabilidade da região potencializando a estimulação química da MCPd com uma dose subefetiva de NMDA, provocando o condicionamento aversivo olfatório, além de aumentar as respostas de defesa;
- A infusão de riluzol provocou a diminuição das respostas defensivas e não alterou o condicionamento provocado pelo antagonista 5-HT<sub>1A</sub> em doses altas.

A partir dos dados descritos neste trabalho, pode-se sugerir que os receptores 5-HT<sub>1A</sub> MCPd influenciam nas respostas defensivas induzidas pela estimulação química dessa estrutura, as quais podem ser elevadas ou reduzidas, além de facilitar na aquisição de um condicionamento aversivo de natureza olfatória.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC). **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 5th, November 2011.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 4. ed. Washington DC: Author, 2000.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental**. 5. ed. [S.l.]: [s.n.], 2013.
- ANNAU, Z.; KAMIN, L. J. The conditioned emotional response as a function of intensity of the US. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 54, p. 428-432., August 1961.
- ARTIGAS, F. Developments in the field of antidepressants, where do we go now? **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, p. 657–670, May 2015.
- BALDI, E.; BUCHERELLI, C. The inverted "u-shaped" dose-effect relationships in learning and memory: modulation of arousal and consolidation. **Nonlinearity in Biology, Toxicology, Medicine**, v. 3, p. 9–21, January 2005.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P.; ZHANG, S. P. Integration of somatic and autonomic reaction within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatopic and functional organization. **Progress in Brain Research**, v. 87, p. 269-305, 1991.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P.; ZHANG, S. P. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: Viscerotopic, somatotopic and functional organization. **Progress in Brain Research**, v. 87, p. 269-305, 1991.
- BANDLER, R.; DEPAULIS, A. Elicitation of intraspecific defense reactions in the rat from midbrain periaqueductal grey by microinjection of kainic acid, without neurotoxic effects. **Neuroscience Letters**, v. 88, p. 291-196, 1988.
- BANDLER, R.; SHIPLEY, M. T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends in Neurosciences**, v. 17, n. 9, p. 379-389, September 1994.
- BÄR, P. R. et al. Tetanic stimulation affects the metabolism of phosphoinositides in hippocampal slices. **Brain Research**, v. 321, p. 381-385, 1984.
- BARD, J. A. et al. Cloning of a Novel Human Serotonin Receptor (5-HT7) Positively Linked to Adenylate Cyclase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 31, p. 23422-23426, November 1993.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso**. 2ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

- BECKETT, S. R. et al. Attenuation of chemically induced defence response by 5-HT<sub>1</sub> receptor agonists administered into the periaqueductal gray. **Psychopharmacology**, v. 108, p. 110-114, 1992.
- BECKETT, S.; MARSDEN, C. A. The effect of central and systemic injection of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OHDPAT and the 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist WAY100635 on periaqueductal grey-induced defence behaviour. **Journal of Psychopharmacology**, v. 11, p. 35-40, 1997.
- BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain. **Progress in Neurobiology**, v. 46, p. 575-605, Janeiro 1995.
- BEHBEHANI, M. M. et al. Activation of serotonin 1A receptors inhibits midbrain periaqueductal gray neurons of the rat. **Brain Research**, v. 612, p. 56-60, 1993.
- BEITZ, A. J. The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. **Journal of Comparative Neurology**, v. 237, p. 455-459, 1985.
- BERGER, M.; GRAY, J. A.; ROTH, B. L. The Expanded Biology of Serotonin. **Annual review of medicine**, v. 60, p. 355-366, February 2009.
- BERLYNE, D. E. Attention to change. **British Journal of Psychology**, v. 42, p. 269-278, August 1951.
- BERTOGLIO, L. J.; ZANGROSSI JR, H. Involvement of dorsolateral periaqueductal gray N-methyl-D-aspartic D-aspartic acid glutamate receptors in the regulation of risk assessment and inhibitory avoidance behaviors in the rat elevated T-maze. **Behavioural Pharmacology**, v. 17, p. 589-596, 2006.
- BITTENCOURT, A. S. et al. 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, p. 71-89, 2004.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Defensive behaviors, fear, and anxiety. In: BLANCHARD, D. C., et al. **Handbook of anxiety and fear**. London: Academic Press, v. 17, 2008. Cap. 2.4, p. 62-79.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Defensive behaviors, fear, and anxiety. In: BLANCHARD, R. J., et al. **Handbook of anxiety and fear**. [S.l.]: [s.n.], v. 17, 2008. Cap. 2.4, p. 63-79.
- BRANDÃO, M. L. et al. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 863-875, 1999.
- BRANDÃO, M. L.; DE AGUIAR, J. C.; GRAEFF, F. G. GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 16, p. 397-402, March 1982.
- BROIZ, A. C.; OLIVEIRA, L. C.; BRANDÃO, M. L. Regulation of conditioned and unconditioned fear in rats by 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the dorsal

- periaqueductal gray. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 89, p. 76-84, 2008.
- CAMPOS, A. C. et al. Involvement of serotonin-mediated neurotransmission in the dorsal periaqueductal gray matter on cannabidiol chronic effects in panic-like responses in rats. **Psychopharmacology**, v. 226, p. 13-24, Setembro 2013.
- CANTERAS, N. S. et al. Sensing danger through the olfactory system: the role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, p. 1228–1235, September 2008.
- CANTERAS, N. S.; PAVESI, E.; CAROBREZ, A. D. P. Olfactory instruction for fear: neural system analysis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, p. 1-10, August 2015.
- CAROBREZ, A. D. P.; TEIXEIRA, K. V.; GRAEFF, F. G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 697-709, 2001.
- CARRIVE, P.; BANDLER, R.; DAMPNEY, R. A. L. Somatic and autonomic integration in the midbrain of the unanesthetized decerebrate cat: a distinctive pattern evoked by excitation of neurons in the subtentorial portion of the midbrain periaqueductal grey. **Brain Research**, v. 483, p. 251-258, 1989.
- CASTILHO, V. M.; BRANDÃO, M. L. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT<sub>2A</sub> receptors in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 155, n. 2, p. 154-162, May 2001.
- CAVALLI, J.; BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 92, p. 512–518, 2009.
- DARWIN, C. **The expression of the emotions in man and animals**. London: Albemarle Street, 1872.
- DARWIN, C. **The descent of man and selection in relation to sex**. 2. ed. London: [s.n.], 1874.
- DE SOUZA, R. R. **Dupla dissociação da função dos receptores NMDA da substância cinzenta periaqueductal dorsolateral rostral e caudal no medo inato e condicionado ao odor de gato**. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Farmacologia. Florianópolis. 2007.
- DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of Psychopharmacology**, Jan 1991.
- DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. Response. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 339-41, January 1991.

DENG, H.; XIAO, X.; WANG, Z. Periaqueductal Gray Neuronal Activities Underlie Different Aspects of Defensive Behaviors. **The Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 29, p. 7580–7588, July 2016.

DEPAULIS, A.; BANDLER, R. **The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical, and neurochemical organization**. New York: Plenum Press, v. 213, 1991.

DI SCALA, G. et al. Evidence of Pavlovian conditioned fear following electrical stimulation of the periaqueductal grey in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 40, p. 55-63, 1987.

FUMAGALLI, E. et al. Riluzole enhances the activity of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1. **European Journal of Pharmacology**, v. 578, p. 171-176, January 2008.

GILMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E.; HARDMAN, J. Agonistas e antagonistas dos receptores de 5-hidroxitriptamina (serotonina). In: GILMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E.; HARDMAN, J. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10ª. ed. Rio de Janeiro: McGrnw-Hill, 2005. Cap. Seção II.

GOLAN, D. E. et al. **Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOURLEY, S. L. et al. Antidepressant-like properties of oral riluzole and utility of incentive disengagement models of depression in mice. **Psychopharmacology**, v. 219, p. 805–814, June 2013.

GRAEFF, F. G. Neurotransmitters in the Dorsal Periaqueductal Grey and Animal Models of Panic Anxiety. In: BRILEY, M.; FILE, S. E. **New Concepts in Anxiety**. London: Macmillan, 1991. p. 288-312.

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

GRAEFF, F. G. et al. New Findings on the Neurotransmitter Modulation of Defense in the Dorsal Periaqueductal Gray. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 14, p. 988-995, 2015.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de**. São Paulo: Atheneu, v. 240, 2000.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; MORA, P. O. Dual Role of 5-HT in Defense and Anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, p. 791-799, 1997.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI JR, H. The Dual Role of Serotonin in Defense and the Mode of Action of Antidepressants on Generalized Anxiety and Panic Disorders. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 207-217, September 2010.

GREEN, A. R. Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 145–152, 2006.

- GRIEBEL, G. 5-Hydroxytryptamine interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. **Pharmac. Ther.**, v. 65, p. 319-195, 1995.
- GUIMARÃES, F. S.; CAROBREZ, A. P.; GRAEFF, F. G. Modulation of anxiety behaviors by 5-HT-interacting drugs. In: BLANCHARD, R. J., et al. **HANDBOOK OF ANXIETY AND FEAR**. [S.l.]: Academic Press, v. 17, 2008.
- HANNON, J.; HOYER, D. Molecular biology of 5-HT receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 195, p. 198–213, March 2008.
- HETEM, L. A. B.; GRAEFF, F. G. **Ansiedade e transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004.
- HIGGINS, G. A. et al. Evidence that the amygdala is involved in the disinhibitory effects of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists. **Psychopharmacology**, v. 104, p. 545-551, 1991.
- HUGHES, R. N. Neotic preferences in laboratory rodents: Issues, assessment and substrates. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, p. 441–464, 2007.
- JOHANSEN, J. P. et al. Neural substrates for expectation-modulated fear learning in the amygdala and periaqueductal gray. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 8, p. 979–986, August 2010.
- KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of neural science**. 4 ed. ed. [S.l.]: McGraw-Hill Companies, 2000.
- KINCHESKI, G. C. **Condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação química da matéria cinzenta periaqueductal dorsolateral de ratos**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 122. 2011.
- KINCHESKI, G. C. et al. The Dorsolateral Periaqueductal Gray and Its Role in Mediating Fear Learning to Life Threatening Events. **Plos One**, v. 7, p. 1-14, Outubro 2012.
- KISER, R. S.; LBOVITZ, R. M.; GERMAN, D. C. Anatomic and pharmacologic differences between two types of aversive midbrain stimulation. **Brain Research**, v. 155, n. 2, p. 331-342., October 1978.
- KROON, J. A. V.; CAROBREZ, A. P. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: Effects of midazolam, propranolol or scopolamine. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 91, p. 32-40, January 2009.
- LEDOUX, J. Rethinking the emotional brain. **Neuron**, v. 73, p. 653-676, Fevereiro 2012.
- LEDOUX, J. E. Emotions Circuits in the Brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 23, p. 155–184, 2000.
- LEDOUX, J. E. The Emotional Brain, Fear, and the Amygdala. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 23, p. 727-738, October 2003.

- LOWRY, C. A. et al. Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. **Stress: The International Journal on the Biology of Stress**, v. 8, p. 233-246, Nov 2005.
- MALENKA, R. C. et al. Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. **Science**, v. 242, p. 81-84, October 1988.
- MARASCHIN, J. C. et al. Opiorphin causes a panicolytic-like effect in rat panic models mediated by  $\mu$ -opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray. **Neuropharmacology**, v. 101, p. 264–270, February 2016.
- MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense:fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, p. 285-305, Maio 2004.
- MORAES, C. L. K.; BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. D. P. Interplay between glutamate and serotonin within the dorsal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior of rats exposed to the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 194, p. 181-186, Julho 2008.
- MOREIRA, F. A.; MOLCHANOV, M. L.; GUIMARÃES, F. S. onotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**, v. 171, n. 2, p. 199-203, 2004.
- NASHOLD JR, B. S.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. Sensations Evoked by Stimulation in the Midbrain of Man. **Journal of Neurosurgery**, v. 30, p. 14-24, January 1969.
- NESSE, R. M. Proximate and evolutionary studies of anxiety, stress and depression: synergy at the interface. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 895–903, 1999.
- PANKSEPP. Fear and anxiety: mechanisms of the brain. In: BITTAR, E. E.; BITTAR, N. **Biological Psychiatry**. Stamford: Jai Press, 2000.
- PAUL, E. D. et al. The Deakin/Graeff hypothesis: Focus on serotonergic inhibition of panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 46, p. 379-396, October 2014.
- PAVESI, E.; CANTERAS, N. S.; CAROBREZ, A. D. P. 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, April 2011.
- PAVESI, E.; CANTERAS, N. S.; CAROBREZ, A. P. 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., April 2011.
- PAVLOV, I. P. Conditioned reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex. **Oxford University Press**, 1927.

- PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Academic Press**, 1982.
- RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 7<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ROTH, B. L. Multiple serotonin receptors: clinical and experimental aspects. **Annals of Clinical Psychiatry**, v. 6, p. 67-78, July 1994.
- ROTH, B. L.; XIA, Z. Molecular and Cellular Mechanisms for the Polarized Sorting of Serotonin Receptors: Relevance for Genesis and Treatment of Psychosis. **Critical Reviews in Neurobiology**, v. 16, p. 229-236, 2004.
- SACCHETTI, B. et al. Memorization of contextual and CS conditioned fear response (freezing) in a one-trial acquisition paradigm.. **Archives Italiennes de Biologie**, v. 137, n. 4, p. 235-248, August 1999.
- SCHENBERG, L. C. et al. Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. **Psychopharmacology**, v. 159, p. 138-144, September 2001.
- SENA, L. M. et al. The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 142, p. 125-133, 2003.
- SLOTNICK, B. M.; KATZ, H. M. Olfactory Learning-Set Formation in Rats. **Science**, v. 185, p. 796-798, August 1974.
- SOARES, V. D. P.; ZANGROSSI JR., H. Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. **Brain Research Bulletin**, v. 64, p. 181-188, 2004.
- SOUZA, R. R. et al. 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, April 2014.
- SOUZA, R. R.; CAROBREZ, A. P. Acquisition and expression of fear memories are distinctly modulated along the dorsolateral periaqueductal gray axis of rats exposed to predator odor. **Behavioural Brain Research**, v. 315, p. 160-167, August 2016.
- SUGIYAMA, A. et al. Systemic administration of riluzole enhances recognition memory and facilitates extinction of fear memory in rats. **Neuropharmacology**, p. 1-7, June 2015.
- TEIXEIRA, K. V.; CAROBREZ, A. P. 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 plus-maze task. **Behavioral Neuroscience**, v. 111, n. 1, p. 196-203, February 1999.
- THIÉBOT, M. H. et al. Evidence against the involvement of serotonergic neurons in the anti-punishment activity of diazepam in the rat. **Psychopharmacology**, v. 82, p. 355-359, 1984.

VERMETTEN, E. et al. A Positron Tomographic Emission Study of Olfactory Induced Emotional Recall in Veterans with and without Combat-related Posttraumatic Stress Disorder. **Psychopharmacology Bulletin**, v. 40, p. 30, 2007.

VICENTE, M. A. et al. Involvement of median raphe nucleus 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the regulation of generalized anxiety-related defensive behaviours in rats. **Neuroscience Letters**, v. 445, p. 204–208, November 2008.

YUDOFISKY, S. C.; HALES, R. E. **The American Psychiatric Publishing Textbook of Neuropsychiatry and behavioral neurosciences**. 5. ed. [S.l.]: American Psychiatric Publishing, 2008.

ZANGROSSI JR, H. et al. Serotonergic regulations of inhibitory avoidance and one-way escape in the elevated T-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 637-645, 2001.

ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI JR, H. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. **European Journal of Pharmacology**, v. 473, p. 153-161, 2003.

ZHOU, Q. et al. Intracerebroventricular injection of the N-terminal substance P fragment SP1-7 regulates the expression of the N-methyl-aspartate receptor NR1, NR2A and NR2B subunit mRNAs in the rat brain. **Neuroscience Letters**, v. 291, p. 109-112, August 2000.