

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**DISSOCIAÇÃO FUNCIONAL DORSO-VENTRAL DO
HIPOCAMPO NA MEDIAÇÃO DO COMPORTAMENTO
DEFENSIVO DE RATOS REVELADA PELO BLOQUEIO DOS
RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS SUBTIPO NMDA.**

Luciane Pereira Nascimento Häckl

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Florianópolis – SC

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**DISSOCIAÇÃO FUNCIONAL DORSO-VENTRAL DO
HIPOCAMPO NA MEDIAÇÃO DO COMPORTAMENTO
DEFENSIVO DE RATOS REVELADA PELO BLOQUEIO DOS
RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS SUBTIPO NMDA.**

Luciane Pereira Nascimento Häckl

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Florianópolis – SC

2007

*“Não basta ensinar ao homem uma especialidade
porque se tornará assim uma máquina
utilizável e não uma personalidade.
É necessário que adquira um sentimento,
um senso prático daquilo que é belo,
de que é moralmente correto”.*

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez por ter me recebido em seu laboratório, compartilhado os seus conhecimentos e contribuído para minha formação profissional.

Aos professores José Marino Neto, André de Ávila Ramos, Thereza Cristina Monteiro De Lima, Marcus Lira Brandão e Jorge Alberto Quilfeldt, pelas contribuições dirigidas a este trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia.

Ao meu esposo André, ao meu filho Luciano e aos meus pais pelo incentivo, amor e compreensão a mim dedicado, quando subtraí horas de nosso convívio familiar na elaboração deste trabalho.

Aos amigos especiais, que souberam dar sua parcela de contribuição nessa jornada, através da demonstração de carinho e amizade, de gestos e palavras construtivas, de momentos de alegria e entusiasmo, que serviram de estímulo para se manter a coragem para lutar e a perseverança para vencer.

Aos amigos do Departamento de Ciências Fisiológicas, especialmente os professores, Marino, Marta e Cristina e, aos funcionários Vilma, Carlos e Nivaldo pelos incentivos e constantes ensinamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPQ) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUÇÃO	
1.1 Comportamento defensivo.....	2
1.2 Modelos animais para estudo do comportamento defensivo.....	3
1.2.1 Labirinto em cruz elevado.....	3
1.2.2 Odor de gato.....	5
1.2.3 Esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	7
1.3 Substrato neuroanatômico do comportamento defensivo	8
1.4 Hipocampo e comportamento defensivo.....	9
1.5 Participação dos receptores glutamatérgico subtipo NMDA na mediação do comportamento defensivo.....	12
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 Animais.....	18
3.2 Cirurgia Estereotáxica.....	18
3.3 Droga e infusão.....	19
3.4 Modelos experimentais.....	20
3.4.1 Labirinto em cruz elevado.....	21
3.4.2 Odor de gato.....	22
3.4.3 Esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	24
3.5 Procedimentos e Protocolos Experimentais.....	25
3.5.1 Labirinto em cruz elevado.....	25
3.5.2 Odor de gato.....	26
3.5.3 Esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	28
3.6 Perfusão e Histologia.....	30
3.7 Análise Estatística.....	30

4. RESULTADOS	
4.1. Localização dos sítios de infusão.....	33
	34
4.2. Experimento 1. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral e dorsal sobre aspectos emocionais e cognitivos do comportamento defensivo de ratos submetidos ao LCE.....	35
4.3. Experimento 2. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral e dorsal sobre o comportamento defensivo de ratos expostos ao odor de gato.....	45
4.4. Experimento 3. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral e dorsal sobre aprendizado e memória de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	56
4.5. Experimento 4. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral sobre a consolidação da memória de ratos familiarizados com aparato da tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma	60
5. DISCUSSÃO	63
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
8. APÊNDICE	93

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	- Análise de Variância
AP5	- Ácido \pm 2-amino-5-fosfopentanóico – antagonista NMDA
AR	- Avaliação de risco
EBA	- Entradas nos braços abertos
EBF	- Entradas braços fechados
EPM	- Erro padrão da média
HPC	- Hipocampo
LCE	- Labirinto em cruz elevado
NMDA	- N-Metil-D-aspartato
SCD	- Sistema cerebral de defesa
SCP	- Substância cinzenta periaquedutal
SCPd	- Substância cinzenta periaquedutal dorsal
SDHM	- Sistema defensivo do hipotálamo medial
SEA	- Sistema encefálico aversivo
SIC	- Sistema de inibição comportamental
SSH	- Sistema septo-hipocampal
TBA	- Tempo nos braços abertos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia do aparato labirinto em cruz elevado.....	22
Figura 2	Desenho representativo da caixa odor de gato.....	24
Figura 3	Fotografia da caixa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	25
Figura 4	Protocolo experimental do teste LCE.....	26
Figura 5	Protocolo experimental do teste odor de gato.....	27
Figura 6	Protocolo experimental do teste esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	28
Figura 7	Protocolo experimental do teste esquiva inibitória do tipo descida da plataforma com familiarização ao aparato 24 h antes.....	29
Figura 8	Fotomicrografias de cortes frontais do hipocampo ventral e dorsal.....	33
Figura 9	Desenhos esquemáticos de cortes frontais do hipocampo ventral e dorsal de ratos ilustrando os locais de infusões.....	34
Figura 10	Efeito da infusão pré-teste de AP5 no hipocampo ventral sobre os parâmetros porcentagem de tempo e entradas nos braços abertos, frequência do comportamento de avaliação de risco e frequência de entradas nos braços fechados de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE.....	37
Figura 11	Efeito da infusão pós-teste de AP5 no hipocampo ventral sobre os parâmetros porcentagem de tempo e entradas nos braços abertos, frequência do comportamento de avaliação de risco e frequência de entradas nos braços fechados de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE.....	38
Figura 12	Efeito da infusão pré-reteste de AP5 no hipocampo ventral sobre parâmetros porcentagem de tempo e entradas nos braços abertos, frequência do comportamento de avaliação de risco e frequência de entradas nos braços fechados de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE.....	41
Figura 13	Efeito da infusão pré-teste de AP5 no hipocampo dorsal sobre os parâmetros porcentagem de tempo e entradas nos braços abertos, frequência do comportamento de avaliação de risco e frequência de entradas nos braços fechados de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE.....	42
Figura 14	Efeito da infusão pós-teste de AP5 no hipocampo dorsal sobre os parâmetros porcentagem de tempo e entradas nos braços abertos, frequência do comportamento de avaliação de risco e frequência de entradas nos braços fechados de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE.....	43
Figura 15	Efeito da infusão pré-reteste de AP5 no hipocampo dorsal sobre os parâmetros porcentagem de tempo e entradas nos braços abertos,	

freqüência do comportamento de avaliação de risco e freqüência de entradas nos braços fechados de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE.....	44
Figura 16 Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral, administrada antes da exposição ao odor de gato, sobre o tempo de aproximação, tempo escondido e avaliação de risco de ratos expostos por 10 minutos ao teste.	47
Figura 17 Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral, administrada antes da exposição ao odor de gato, sobre o número de aproximações e de cruzamentos, de ratos expostos por 10 minutos ao teste.....	48
Figura 18 Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral, administrada antes da exposição ao contexto, 24 horas após o condicionamento ao odor de gato, sobre o tempo de aproximação, tempo escondido e avaliação de risco de ratos expostos por 10 minutos ao teste.....	49
Figura 19 Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral, administrada antes da exposição ao contexto, 24 horas após o condicionamento ao odor de gato, sobre o número de aproximações e de cruzamentos de ratos expostos por 10 minutos ao teste.....	50
Figura 20 Efeito da infusão de AP5 no hipocampo dorsal, administrada antes da exposição ao odor de gato, sobre o tempo de aproximação, tempo escondido e avaliação de risco de ratos expostos por 10 minutos ao teste.	52
Figura 21 Efeito da infusão de AP5 no hipocampo dorsal, administrada antes da exposição ao odor de gato, sobre o número de aproximações e de cruzamentos de ratos expostos por 10 minutos ao teste	53
Figura 22 Efeito da infusão de AP5 no hipocampo dorsal, administrada antes da exposição ao contexto, 24 horas após o condicionamento ao odor de gato, sobre o tempo de aproximação, tempo escondido e avaliação de risco de ratos expostos por 10 minutos ao teste.....	54
Figura 23 Efeito da infusão de AP5 no hipocampo dorsal, administrada antes da exposição ao contexto, 24 horas após o condicionamento ao odor de gato, sobre o número de aproximações e de cruzamentos de ratos expostos por 10 minutos ao teste.....	55
Figura 24 Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral, administrada antes do treino, após o treino ou antes do teste, sobre a memória de ratos expostos à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	58
Figura 25 Efeito da infusão de AP5 no hipocampo dorsal, administrada antes do treino, após o treino ou antes do teste, sobre a memória de ratos expostos à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	59
Figura 26 Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral, administrada após o treino, sobre a memória de ratos familiarizados 24 horas antes do treino à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito da infusão pré-teste, pós-teste e pré-reteste de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE.....	apêndice
Tabela 2	Efeito da infusão pré-teste, pós-teste e pré-reteste de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo dorsal de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE.....	apêndice
Tabela 3	Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral, antes da exposição ao odor de gato, de ratos expostos por 10 minutos a este teste.....	apêndice
Tabela 4	Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral antes da exposição ao contexto de ratos expostos por 10 minutos a este teste.....	apêndice
Tabela 5	Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo dorsal antes da exposição ao odor de gato de ratos expostos por 10 minutos a este teste.....	apêndice
Tabela 6	Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo dorsal antes da exposição ao contexto de ratos expostos por 10 minutos a este teste.....	apêndice
Tabela 7	Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral, antes do treino, após o treino e antes do teste, de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	apêndice
Tabela 8	Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo dorsal, antes do treino, após o treino e antes do teste, de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	apêndice
Tabela 9	Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral após o treino, de ratos familiarizados ao aparato 24 horas antes da tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.	apêndice

RESUMO

Vários estudos têm indicado que o hipocampo (HPC) é uma região funcionalmente distinta ao longo de seu eixo dorso-ventral e desempenha um papel importante em processos associados com emoção e cognição do comportamento defensivo. O conhecimento das bases neurais envolvidas na organização das respostas de defesa tem sido decorrente principalmente de estudos comportamentais que avaliam as reações emocionais de roedores diante de estímulos aversivos, como a exposição em ambientes com espaços abertos, um choque elétrico nas patas ou na presença do odor de um predador. A participação da neurotransmissão glutamatérgica na mediação do comportamento defensivo tem sido alvo de muitos estudos e, dados experimentais em roedores têm revelado que compostos que reduzem a ativação glutamatérgica, seja através do bloqueio de seus receptores ou pela redução de sua liberação nos terminais sinápticos, provocam um perfil de ação semelhante a ansiolíticos em modelos animais de ansiedade. Com base nestes aspectos, o objetivo do presente estudo foi investigar a participação dos receptores NMDA distribuídos ao longo do eixo dorso-ventral do HPC na mediação de aspectos emocionais e cognitivos do comportamento defensivo de ratos expostos ao teste e reteste do LCE, ao odor de gato e ao contexto, 24 h após a exposição a este estímulo, e ao treino e teste da tarefa de esquiava inibitória do tipo descida da plataforma. Para este propósito foi usado o antagonista competitivo do receptor NMDA, AP5, administrado no HPC ventral ou dorsal. Os resultados mostraram que a infusão pré-teste de AP5 no HPC ventral, mas não no hipocampo dorsal, reduziu o comportamento defensivo em ratos submetidos ao teste do LCE. Além disso, a infusão de AP5 pré-teste, pós-teste ou pré-reteste no HPC ventral ou dorsal não afetou os processos de aquisição, consolidação e evocação da resposta de esquiava aos braços abertos de ratos submetidos ao LCE. No teste do odor de gato, os resultados mostraram que a infusão de AP5 no HPC ventral, antes da exposição ao estímulo aversivo, reduziu o comportamento defensivo de ratos expostos ao odor de gato, o que não foi observado com a infusão de AP5 no HPC dorsal, nestas mesmas condições experimentais. Além disso, a infusão de AP5 no

HPC ventral ou dorsal, antes da sessão contexto, sem o odor de gato, não afetou a expressão do comportamento defensivo. No teste de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma, os resultados mostraram que a infusão pré e pós-treino de AP5 no HPC dorsal, mas não no HPC ventral, prejudicou a aquisição e a consolidação da memória no teste de esquiva inibitória. Estes resultados mostraram ainda que a infusão de AP5 antes do teste no HPC ventral ou dorsal não interferiu com a evocação da memória nesta tarefa. Além disso, os resultados mostraram que infusão pós-treino de AP5 no HPC ventral, interferiu com a consolidação da memória de esquiva inibitória, quando os ratos foram familiarizados previamente ao aparato do treino. Em conclusão, os resultados sugerem uma diferenciação funcional ao longo do eixo dorso-ventral do HPC, implicando a participação de receptores NMDA do HPC ventral, mas não do HPC dorsal, na mediação dos aspectos emocionais do comportamento defensivo.

ABSTRACT

Several studies have indicated that the hippocampus (HPC) is a region functionally distinct along its dorsoventral axis and performs an important role in processes associated with emotion and cognition of the defensive behavior. The knowledge of the neural basis involved in the organization of defensive responses has been revealed by behavioral studies that assess the emotional reactions of rodents toward aversive stimulus, such as an exposition to environments with open spaces, a footshock or towards cat odor. The participation of glutamatergic neurotransmission in the mediation of defensive behavior has been focused by many studies and, experimental data in rodents has shown that compounds that reduce glutamatergic activation either by blocking its receptors or by reducing its release from terminals elicit an anxiolytic profile of action in models of anxiety. Based in these facts, the purpose of the present study was to evaluate the role of NMDA receptors, distributed along the dorsoventral axis of the HPC, in the mediation of emotional and cognitive aspects of defensive behavior of rats exposed to the test and retest of EPM, to the training and test of step-down one trial inhibitory avoidance task (SDIA) and to the cat odor stimulus and its context, 24 h after and without cat odor. For this purpose the competitive NMDA receptor antagonist, AP5, administered in ventral or dorsal HPC was used. Results showed that the pre-test infusion of AP5 into the ventral HPC, but not in the dorsal HPC, reduced the defensive behavior, in rats submitted to the EPM. Furthermore, the pre-test, post test or pre-retest infusion of AP5 into the ventral or dorsal HPC, did not interfere with the processes of acquisition, consolidation and retrieval of the avoidance response to the open arms, respectively, of rats submitted to the test and retest in the EPM. Results showed that the pre or post-training infusion of AP5 into the dorsal HPC, but not in the ventral HPC, interfered with acquisition and consolidation of the memory in test of inhibitory avoidance. These results also showed that pré-test infusion of AP5 into the ventral or dorsal HPC did not interfere with the retrieval of the memory in this task. Moreover, it was shown that the post-training infusion of AP5 into the ventral HPC affected the consolidation of the memory of inhibitory avoidance

when rats were previously familiarized to the training apparatus. In the cat odor test results showed that the infusion of AP5 into the ventral HPC, but not dorsal HPC, reduced the defensive behavior of rats exposed to this aversive stimulus, that was not detected with the AP5 infusion into the dorsal HPC, in the same experimental conditions. Furthermore, the AP5 infusion into the ventral or dorsal HPC, before of the context session without the cat odor, did not affect the expression of defensive behavior. In conclusion, the results suggest a functional differentiation along of the dorsoventral axis of the HPC, implicating the participation of NMDA receptors of ventral HPC, but not of the dorsal HPC, in the mediation of emotional aspects of the rat defensive behavior.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Comportamento Defensivo

A emoção pode ser definida como uma experiência subjetiva acompanhada de manifestações comportamentais e fisiológicas detectáveis e de sensações agradáveis ou desagradáveis. A existência dessa expressão exterior, mensurável, da experiência emocional permite que ela possa ser investigada pelos métodos experimentais (Lent, 2004).

No que diz respeito ao medo e à ansiedade e, de acordo com a perspectiva evolutiva, tais emoções apresentam claro valor adaptativo e têm suas origens nas reações de defesa que os animais exibem em resposta a situações de perigo e ameaça que podem comprometer a sua integridade física ou sobrevivência (Graeff e Guimarães, 2001). A diferença entre esses dois estados emocionais pode ser caracterizada em relação aos estímulos e/ou situações que os desencadeiam, de forma que o medo surgiria diante de situações claras e evidentes de ameaça e perigo, enquanto a ansiedade seria desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, vago e incerto (Blanchard e Blanchard, 1990).

A ansiedade e o medo são considerados estados emocionais essenciais no repertório afetivo humano, tendo como função sinalizar e preparar o organismo para situações de ameaça ou perigo. Todavia, quando essas emoções começam a perder sua função adaptativa e suas manifestações atingem intensidade e duração desproporcionais ao evento desencadeante,

passam a ser consideradas patologias do sistema de defesa humano (Pratt, 1992).

As tentativas de se correlacionar o comportamento defensivo dos animais em testes experimentais com os níveis de diferentes indicadores fisiológicos e comportamentais das reações de medo e ansiedade são cada vez mais freqüentes (Graeff e Guimarães, 2001). A utilização de animais em estudos pré-clínicos está baseada na premissa que considera que as raízes da ansiedade humana encontram analogia nas reações de defesa que os animais exibem frente a estímulos ou situações de perigo (Graeff, 1990). Assim, admitindo-se o princípio da continuidade filogenética e o isomorfismo existente entre comportamento animal e humano, dentro de um contexto da teoria evolutiva, fica mais evidente entender a importância e a contribuição dos modelos animais na compreensão da base neurobiológica do medo e da ansiedade, bem como na descoberta de novas abordagens terapêuticas (Belzung e Griebel, 2001).

1.2 Modelos para estudo do comportamento defensivo

1.2.1 Labirinto em Cruz Elevado

Os modelos animais de ansiedade têm contribuído amplamente para o estudo do comportamento defensivo e para a elucidação dos diferentes sistemas de neurotransmissão e das diferentes estruturas neurais envolvidas na mediação desse comportamento (Griebel, 1995; Teixeira e Carobrez, 1999; Carobrez e Bertoglio, 2005). Parte deste conhecimento é baseada na

observação dos comportamentos exploratórios de roedores em ambientes novos e aversivos, caracterizados por um balanço entre a busca da novidade e o comportamento de esquiva (para revisão ver Rodgers, 1997). Um modelo amplamente utilizado para se avaliar medidas de comportamento defensivo é o LCE (labirinto em cruz elevado). Este modelo é baseado no comportamento exploratório espontâneo de roedores em um ambiente com dois níveis de maior (braços abertos) ou menor (braços fechados) aversividade. Assim, as proporções das atividades (frequência de entradas e tempo) nos braços abertos do LCE são tidas como índices clássicos de ansiedade (Handley e Mithani, 1984; Pellow et al., 1985). Neste contexto, animais tratados com drogas ansiogênicas diminuem significativamente a atividade exploratória aos braços abertos, enquanto que os tratamentos com drogas ansiolíticas provocam efeito oposto (Pellow et al., 1985).

Apesar de não representar a principal utilização do LCE, o emprego da sessão teste/reteste do LCE tem sido importante para investigação das bases neurobiológicas do aprendizado e da memória emocional em roedores, uma vez que é possível de se avaliar a aquisição, consolidação e expressão da resposta de esquiva na sessão reteste (para revisão ver, Carobrez e Bertoglio, 2005). Neste sentido, dados da literatura mostram que a exposição de roedores por 5 minutos no LCE promove o desenvolvimento de estratégias de esquiva, que se tornam mais evidentes numa segunda exposição, onde se observa uma diminuição significativa da atividade exploratória nos braços abertos (Rodgers et al., 1996; Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2000). Além disso, estudo do perfil comportamental minuto-a-minuto da primeira exposição, indica que a diminuição da atividade nos braços abertos do LCE é gradual e inicia em

torno do segundo minuto (Rodgers et al., 1996; Bertoglio e Carobrez, 2000). A expressão do comportamento de esquiva que ocorre numa segunda exposição ao LCE, mostra claramente uma preferência por áreas menos aversivas, como os braços fechados do LCE e ressalta o envolvimento de mecanismos relacionados com aprendizagem e memória que ocorrem durante o teste/reteste.

1.2.2 Odor de Gato

O comportamento defensivo de roedores expostos a predadores ou ao odor deste predador tem sido proposto como modelo para análise e compreensão das bases neurobiológicas das emoções como medo e ansiedade. A relação entre presa e predador existente entre roedores e seus predadores, como o gato, provavelmente desenvolveu-se durante a evolução destas espécies e várias evidências têm ressaltado a importância do odor de predador, oriundo da urina, fezes, pele, pêlo e glândulas anais, como fonte de aversão e indutor de alterações comportamentais relacionadas a reações defensivas (para revisão ver Apfelbach et al., 2005). O modelo do odor de gato foi proposto inicialmente por Blanchard e Blanchard (1989) e consistia de um sistema de tocas, sendo posteriormente adaptado por Dielenberg e colaboradores (1999) a uma caixa com dois ambientes separados.

Uma série de estudos utilizando coleiras (para revisão ver, Dielenberg e McGregor, 2001) ou panos impregnados com o odor de gato (Zangrossi e File, 1992; Dielenberg e McGregor, 2001; Takahashi et al., 2005; Do Monte, 2006) tem revelado a expressão de respostas defensivas de ratos frente a esse

estímulo aversivo. O estímulo do odor de gato representa uma ameaça potencial (Blanchard e Blanchard, 1990; Pentkowski et al., 2006) pois provoca comportamentos defensivos similares aos verificados quando o rato é exposto diante de um gato (Blanchard et al., 1989; File et al., 1993; Dielenberg e McGregor, 2001). Este estímulo tem a propriedade de causar redução na atividade locomotora e aumento no comportamento de avaliação de risco, tempo de congelamento e esquiva da fonte aversiva (Blanchard e Blanchard, 1989; Dielenberg e McGregor, 2001; Blanchard et al., 2005). A exposição de ratos a uma coleira ou pano impregnado com odor de gato desencadeia aumento no nível de corticosterona circulante (File et al., 1993), promove aumento no estado de ansiedade verificado no modelo do LCE por até sete dias após (Cohen et al., 2000) e aumenta a pressão arterial imediatamente após a exposição de ratos ao odor de gato (Dielenberg et al., 2001a). Além dessas alterações decorrentes da exposição ao odor de gato, outros comportamentos não defensivos como, consumo de água e alimentos, bem como a atividade exploratória e sexual, estão reduzidos por algum tempo depois da exposição a este estímulo aversivo (Blanchard e Blanchard, 1989a; Dielenberg et al., 1999). Deve ser ressaltado ainda que, ratos re-expostos 24 horas após, ao mesmo aparato, porém com ausência do odor de gato, expressam aumento na resposta defensiva com sinais evidentes de medo condicionado (Dielenberg et al., 1999; Blanchard et al., 2003a; Hubbard et al., 2004; Staples et al., 2005; Do-Monte, 2006; Pentkowski et al., 2006; De-Souza, 2007).

1.2.3 Esquiva inibitória do tipo descida da plataforma

A sobrevivência dos indivíduos de todas as espécies depende da capacidade deles reagirem adequadamente às ameaças. Frequentemente esta capacidade depende da predição de eventos aversivos e coordenação de reações defensivas em face de uma ameaça iminente. Animais aprendem a antecipar o perigo por associar o estímulo ambiental com eventos aversivos. Neste sentido, a memória desempenha um papel relevante para a manutenção da integridade física do indivíduo. A memória corresponde ao processo pelo qual experiências anteriores levam a alterações comportamentais. Assim, o sistema nervoso em seu processo de interação com o ambiente reage não apenas a estímulos, mas também às contingências espaciais e temporais entre os estímulos, e também destes com suas respostas num processo de aprendizagem que leva a modificações no seu funcionamento.

Assim, dentre os modelos experimentais usados para se estudar aprendizagem e memória emocional, o teste da esquiva inibitória do tipo descida da plataforma tem sido muito usado na avaliação do efeito de drogas na aquisição, consolidação e evocação do aprendizado e memória aversiva, a partir de manipulações farmacológicas realizadas antes do treino, após o treino e antes do teste. Neste teste, a aprendizagem aversiva é adquirida imediatamente após o animal ser colocado e descer de uma plataforma para uma grade eletrificada da caixa e, pareado com apenas um único choque elétrico emitido nas patas, sendo em seguida removido deste contexto. A medida de retenção da memória é avaliada 24 horas após, através da re-exposição do animal ao contexto do condicionamento, pela avaliação do tempo

de permanência do animal na plataforma (Izquierdo et al., 1992; Izquierdo e Medina, 1997). Neste protocolo experimental, a sessão treino requer que o animal associe o contexto com o choque, onde esses dois componentes foram apresentados durante uma única sessão.

1.3 Substrato Neuroanatômico do Comportamento Defensivo

Há vários indícios da existência de sistemas cerebrais responsáveis pelo processamento de informações aversivas e organização das respostas comportamentais a situações de perigo (Graeff, 1990; LeDoux, 2000). Assim, baseado em um conjunto de evidências experimentais, Graeff (1981) propôs a existência de um sistema cerebral aversivo (SCA) envolvido com a expressão de alterações comportamentais e neurovegetativas em resposta a estímulos aversivos. Este sistema teria como substrato neural o hipotálamo medial, a amígdala e a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd). Posteriormente, foram propostas as participações do colículo inferior e de camadas profundas do colículo superior neste sistema, que passou a ser identificado como sistema encefálico aversivo (SEA; Brandão et al., 1999).

Em 1997, Canteras e colaboradores, baseados na técnica de imunoreatividade para proteína Fos, propuseram a participação de sítios específicos do hipotálamo medial, que incluem o núcleo hipotalâmico anterior, núcleo ventromedial, parte dorsomedial e núcleo pré-mamilar dorsal, na integração das respostas de defesa de ratos expostos ao gato. Esse conjunto de estruturas, relacionadas com a resposta defensiva incondicionada, foi

denominado de sistema defensivo do hipotálamo medial (SDHM; para revisão ver Canteras, 2002).

Além do SEA, Gray (1982) propôs o envolvimento do sistema septo-hipocampal (SSH) na mediação do comportamento defensivo como o principal substrato neural do sistema de inibição comportamental (SIC). De acordo com esta teoria, o SSH desempenharia a função de “conferidor”, por meio de comparações entre as informações recebidas do ambiente com as previsões baseadas em memórias de experiências passadas. Havendo concordância com as previsões, o SSH manteria a função de conferidor e o comportamento do animal não seria alterado. Em caso de não haver concordância com as previsões, o SSH passaria a controlar a resposta do animal através do SIC. Desta forma, o SIC promoveria a inibição de comportamentos não defensivos e a manifestação de reações defensivas, juntamente com aumento do nível de vigilância e de atenção dirigido para a fonte de ameaça. De acordo com Gray (1982), as drogas ansiolíticas seriam capazes de diminuir a ansiedade por prejudicarem a atividade do SIC. Em 2000, Gray e McNaughton, baseados em novos conhecimentos que surgiram após a publicação da teoria em 1982, reformularam alguns conceitos e integraram o construto do SIC com o do SEA e ressaltaram que a função principal do SSH seria detectar os conflitos entre tendências de aproximação e afastamento da fonte de perigo.

1.4 Hipocampo e Comportamento defensivo

A formação hipocampal é uma estrutura cortical de aspecto alongado que se estende do núcleo septal, rostradorsalmente, para o incipiente lobo

temporal, caudoventralmente, e constituindo desta forma um longo eixo referido como septo-temporal ou dorso-ventral. (Amaral e Witter, 1995). Esta estrutura é formada por seis regiões citoarquiteticamente distintas: o giro denteado, o hipocampo (HPC) propriamente dito, que é dividido em três campos (CA1, CA2 e CA3), o córtex entorrinal, o subículo, presubículo e parasubículo, que são algumas vezes agrupados como complexo subicular (Amaral e Witter, 1989). Embora o papel da formação hipocampal na aprendizagem e memória esteja bem estabelecido nos mamíferos (O'Keefe and Nadel, 1978; Izquierdo et al., 1992; Squire, 1992; Eichenbaum et al., 1994; Squire et al., 2004), mais recentemente um grande número de evidências vem se acumulando e ressaltando o seu envolvimento em mecanismos associados com comportamento defensivo, medo e ansiedade (Gray, 1982; Gray e McNaughton, 2000; Bannerman et al., 2004). Segundo Gray e McNaughton (1982; 2000), embora a influência do HPC sobre as reações de medo possa ser uma consequência necessária de suas operações mnemônicas, é também possível que esta estrutura controle medo e ansiedade independentemente da aprendizagem. Corroborando esta hipótese, a literatura sugere que o HPC possa ser funcionalmente diferenciado ao longo de seu eixo dorso-ventral (Risold e Swanson, 1996; Moser e Moser, 1998; Bannerman et al., 2004) e, particularmente, muitas evidências têm implicado a participação do HPC ventral, mas não do HPC dorsal, na modulação das respostas defensivas a um estímulo ameaçador incondicionado. Este conhecimento tem sido estabelecido, de uma maneira geral, através de resultados obtidos com uso de técnicas de lesão em roedores submetidos a diferentes modelos de ansiedade, como o LCE, o teste de interação social, o campo aberto, o labirinto em T-elevado, a

caixa claro/escuro, o teste de hiponeofagia e o teste do odor de gato (Bannerman et al., 2002; Kjelstrup et al., 2002; Bannerman et al., 2003; McHugh et al., 2004; Trivedi e Coover, 2004; Pentkowski et al., 2006). Os resultados obtidos nos estudos acima citados, mostraram redução nas respostas similares à ansiedade, implicando o HPC ventral na mediação do comportamento defensivo incondicionado. Em concordância com esses achados, outros estudos revelaram que a infusão do agonista do receptor 5HT1A ou do antagonista do receptor 5HT2C no HPC ventral de roedores submetidos ao teste do LCE, provocou redução ou aumento do comportamento defensivo, o mesmo não ocorrendo com a infusão destes compostos no HPC dorsal (Nunes-de-Souza et al., 2002; Alves et al., 2004). Uma redução do comportamento defensivo também foi verificada com a infusão de lidocaína no HPC ventral, mas não no HPC dorsal, antes do teste, de ratos expostos ao LCE (Bertoglio et al., 2006).

Estudos das conexões neuroanatômicas do HPC ventral têm indicado que esta estrutura está estritamente interconectada com a amígdala, especialmente com os núcleos basal e lateral desta estrutura (Petrovich et al., 2001; Pitkanen et al., 2000; Swanson e Cowan, 1977). Além disso, conexões recíprocas com a amígdala e conexões diretas com o hipotálamo originam-se exclusivamente do HPC ventral (Petrovich et al., 2001). Outros dados neuroanatômicos têm mostrado projeções do HPC ventral para o septo lateral que aferenta o SDHM (Petrovich et al., 2001; Risold e Swanson, 1996). Assim, evidências neuroanatômicas mostrando a integração do HPC ventral com diversas estruturas neurais, já estabelecidas na organização da resposta de

defesa, sugerem a participação desta região na mediação do comportamento defensivo.

1.5 Participação dos receptores NMDA na modulação do comportamento defensivo

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central de mamíferos (Collingridge e Lester, 1989) e exerce suas ações em receptores específicos, classificados como ionotrópicos, ligados a um canal iônico, e metabotrópicos, ligados à proteína G (Hollmann e Heinemann, 1994). Para os receptores ionotrópicos são propostos três tipos principais: o NMDA (N-metil-D-aspartato), o AMPA (ácido α -amino-2-hidroxi-S-metil-4-isoxazolepropionic) e o cainato, classificados de acordo com suas propriedades de ligação a agonistas específicos (Leeson e Iversen, 1994).

No cérebro, os receptores NMDA estão amplamente distribuídos e são encontrados em níveis elevados na região CA1 do HPC (Monaghan et al., 1989). Além disso, tem sido relatada uma diferenciação neuroquímica quanto à densidade e composição das subunidades NR2A e NR2B do receptor NMDA ao longo do eixo dorso-ventral do HPC, com um menor nível do ligante [3 H]MK-801 e expressão de proteínas e RNAm para estas subunidades no HPC ventral em relação ao HPC dorsal, o que pode estar vinculado às distintas funções desempenhadas por esta estrutura (Pandis et al., 2006).

Os receptores NMDA têm sido alvo de muitos estudos, sendo envolvidos principalmente em muitos processos funcionais tais como memória, aprendizado, desenvolvimento neuronal e plasticidade sináptica (Morris e Davis, 1984; Bliss e Collingridge, 1993; Luján et al., 2005), excitotoxicidade neuronal decorrente de isquemia e hipoglicemia (Whetsell, 1996), epilepsia e

outras doenças neurodegenerativas (Meldrum, 1985), dependência e tolerância química (Rossetti e Carboni, 1995) e transtornos afetivos como depressão e ansiedade (para revisão ver, Carobrez, 2003; Bergink et al., 2004).

Estudos comportamentais em animais têm destacado o envolvimento da transmissão glutamatérgica na mediação das reações defensivas. Neste sentido, foi mostrado que microinjeções de glutamato na SCP evocam respostas comportamentais e neurovegetativas características da reação de defesa e, estes efeitos podem ser bloqueados seletivamente por antagonistas dos aminoácidos excitatórios (Carobrez, 1987; Graeff et al., 1988). Outros estudos também revelaram um perfil ansiolítico de antagonistas de receptores NMDA, injetados tanto por via sistêmica (Cobert e Dunn, 1991; Kehne et al., 1991; Bertoglio e Carobrez, 2003) quanto diretamente na SCP (Dunn et al., 1989; Guimarães et al., 1991; Teixeira e Carobrez, 1999; Carobrez et al., 2001; Molchanov e Guimarães, 2002) em diversos modelos animais de ansiedade.

A maior parte dos conhecimentos acerca da participação do HPC no aprendizado, memória e comportamento defensivo têm sido baseada principalmente em resultados de estudos envolvendo diferentes técnicas de lesão, realizada somente no HPC dorsal ou abrangendo ambos o HPC dorsal e ventral. Assim, muitas das funções atribuídas ao HPC são decorrentes de investigações que não consideraram a possibilidade de uma distinção funcional relacionada ao seu eixo dorso-ventral. Neste sentido, mais recentemente, uma série de estudos, envolvendo principalmente diferentes técnicas de lesão, têm começado a esclarecer e definir o papel do HPC ventral e dorsal em mecanismos relacionados particularmente com o comportamento defensivo. Entretanto, ainda não existem evidências na literatura considerando a

participação dos receptores NMDA do HPC ventral e dorsal na mediação do comportamento defensivo de ratos em resposta a diferentes estímulos aversivos, que exigem a participação, em especial, de determinadas modalidades sensoriais, como tato, visão e olfação para sua detecção.

Assim, tendo em vista as considerações mencionadas anteriormente, que sugerem uma participação funcional diferencial ao longo do eixo dorso-ventral do HPC na mediação do comportamento defensivo e as evidências implicando o envolvimento do glutamato na mediação das respostas comportamentais de defesa através de sua ação em receptores NMDA, o presente estudo propôs investigar as seguintes hipóteses:

1. Os receptores glutamatérgicos subtipo NMDA distribuídos ao longo do eixo dorso-ventral do HPC estão envolvidos na mediação de aspectos emocionais e cognitivos do comportamento defensivo.
2. Os receptores NMDA do HPC ventral e dorsal desempenham um papel funcional distinto na mediação de aspectos emocionais e cognitivos do comportamento defensivo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Para testar as hipóteses propostas, o presente estudo definiu como objetivo geral investigar o efeito da infusão do antagonista do receptor NMDA no HPC ventral e dorsal na mediação dos aspectos emocionais e cognitivos do comportamento defensivo de ratos expostos a diferentes estímulos aversivos. Para efetivar o objetivo geral proposto, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

1. Avaliar a participação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do hipocampo ventral e dorsal sobre os aspectos emocionais e cognitivos do comportamento defensivo de ratos submetidos ao teste e reteste do LCE.
2. Avaliar a participação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do hipocampo ventral e dorsal sobre os aspectos emocionais e cognitivos do comportamento defensivo de ratos expostos ao odor de gato e ao contexto da exposição ao odor de gato.
3. Avaliar o envolvimento dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do hipocampo ventral e dorsal sobre a aquisição, consolidação e evocação da memória aversiva de ratos submetidos à tarefa de esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma .

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar albinos, com 3 meses de idade, com peso entre 300 a 370 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Antes e após a cirurgia estereotáxica, os animais foram alojados em caixas plásticas (50 x 30 x 15 cm) em grupos de 3 a 4 animais, mantidos no biotério do laboratório com ciclo de claro/escuro de 12/12 horas (período escuro iniciando às 19 horas), com temperatura mantida entre 22 a 24° C e livre acesso a água e ração para roedores. Os experimentos foram realizados respeitando-se os princípios éticos de experimentação animal, postulados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 1991), e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - 23080.006118/2004-36) da UFSC.

3.2 Cirurgia Estereotáxica

Para implantação bilateral das cânulas-guia, os ratos foram anestesiados, por via intraperitoneal, com uma solução (1,5 ml/Kg) contendo xilazina (10 mg/ml; Dopaser[®], Laboratórios Calier Ltda, Brasil) e quetamina (58 mg/ml; Dopalen[®], Sespo Ind. Com. Ltda, Brasil). Em seguida, os ratos foram posicionados em um aparelho estereotáxico (Insight Ltda; Ribeirão Preto, SP, Brasil) e após assepsia com álcool iodado, uma incisão longitudinal foi

realizada no escalpo para a exposição da calota craniana, onde foram fixados próximo ao bregma dois parafusos de aço inoxidável. Com auxílio de uma broca de uso odontológico, a calota craniana foi perfurada para a introdução de duas cânulas-guia, feitas a partir de um segmento de agulha hipodérmica (13 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro), que foram posicionadas 1 mm acima do hipocampo dorsal ou 3 mm acima do hipocampo ventral conforme as seguintes coordenadas do atlas estereotáxico para ratos (Paxinos & Watson, 1986):

1. HPC dorsal planos: anteroposterior = -3.6 mm; mediolateral = 2.8 mm; dorsoventral = 2.0 mm;
2. HPC ventral planos: anteroposterior = -5.0 mm; mediolateral = 5.0 mm; dorsoventral = 5.0 mm.

Após implantação das cânulas-guia, a superfície craniana foi recoberta por uma camada de acrílico auto-polimerizante, formando uma estrutura sólida que proporcionou estabilidade e fixação das cânulas-guia. Além disso, foi introduzido um fio de aço inoxidável (n^o 30) em cada uma das cânulas implantadas para se evitar eventuais obstruções. Posteriormente a cirurgia, os ratos permaneceram por um período de sete dias em recuperação até serem submetidos aos testes comportamentais.

3.3 Droga e infusão intrahipocampal

A droga administrada em todos os protocolos experimentais foi AP5 [(±)-ácido-2-Amino-5-fosfanopentanóico; RBI, USA], antagonista competitivo do receptor NMDA, que foi dissolvido em salina em tampão fosfato (PBS; pH 7.4),

cuja solução também serviu como controle. As doses de AP5 e o volume de infusão foram escolhidos com base em experimentos piloto e de estudos anteriores (Izquierdo et al., 1992). Uma semana após a cirurgia, os animais receberam infusões bilaterais simultâneas de PBS ou de AP5 nas doses de 6,0 e 24,0 nmol no HPC ventral ou dorsal. As infusões foram efetuadas por meio de agulhas injetoras (0,3 mm de diâmetro) que excediam as medidas de comprimento das cânulas-guia em 1 mm para o HPC dorsal e 3 mm para o HPC ventral. Previamente ao procedimento de infusão, os tubos de polietileno (PE 10; Clay Adams, USA) e as microseringas Hamilton foram preenchidos com água destilada e, uma bolha, formada através da aspiração de ar, ficou entre água destilada e a droga. Dessa forma, durante a infusão, o movimento da bolha que era visível através do tubo de polietileno indicou o fluxo da droga administrada. Para se executar a infusão bilateral simultaneamente, foi utilizada uma bomba de infusão (0,5 µl/ 50s; Insight Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil), na qual estavam fixadas duas microseringas Hamilton de 5 µl, conectadas por meio de tubos de polietileno às agulhas injetoras introduzidas nas cânulas-guia. Após a infusão, as agulhas injetoras permaneceram no local por mais um minuto, para facilitar a difusão da solução.

3.4 Modelos experimentais

Todos os testes comportamentais foram realizados durante a fase diurna do ciclo claro/escuro entre 09:00 e 12:00 horas. Ao término de cada sessão experimental, o animal foi retirado e o aparelho foi limpo com uma solução de etanol a 10%.

3.4.1 Labirinto em cruz elevado

Equipamento constituído de madeira, em forma de cruz (Figura 1), elevado 50 cm do chão, composto por dois braços fechados por paredes (50 x 10 x 40 cm) e dois braços abertos (50 x 10 cm), opostos entre si, sendo os braços abertos circundados por um anteparo de acrílico, com 1 cm de altura, para evitar possíveis quedas dos animais. A área de junção dos 4 braços, chamada de plataforma central mede 10 cm x 10 cm.

No teste LCE os ratos foram submetidos a duas sessões experimentais, identificadas como teste e reteste, com uma duração de 5 minutos cada e com um intervalo entre elas de 24 horas, em um ambiente com intensidade luminosa de 44 lux. O teste comportamental foi registrado por uma câmara de vídeo acoplado a um gravador de DVD, instalado em uma sala adjacente.

As medidas comportamentais avaliadas no LCE foram:

- Frequência de entradas dos animais com as 4 patas nos braços abertos e nos braços fechados do labirinto;
- Tempo de permanência dos animais com as 4 patas nos braços abertos e nos braços fechados do labirinto;

Estas medidas tradicionais foram usadas para se calcular a porcentagem do número de entradas nos braços abertos em relação ao número total de entradas nos quatro braços (%EBA) e a porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA), durante os 5 minutos de exposição ao LCE.

- Avaliação de risco (AR), representado no LCE pela frequência de tentativas de entradas aos braços abertos, sendo consideradas tentativas o comportamento de estiramento do corpo a partir dos braços fechados ou da

plataforma central, com a colocação da cabeça e pelo menos uma, duas ou três patas em um dos braços abertos, com posterior retração à posição original. Este comportamento é realizado a partir dos braços fechados ou da plataforma central em direção aos braços abertos.

- Frequência de entradas nos braços fechados (EBF), medida que representa atividade exploratória geral.



Figura 1. Fotografia do aparato labirinto em cruz elevado

3.4.2 Odor de gato

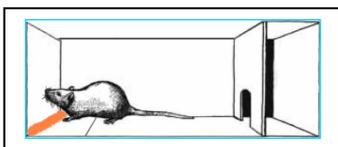
O teste do odor de gato foi realizado em um aparato que consiste em uma caixa retangular de acrílico preto (Figura 2), dividida em dois compartimentos de tamanhos diferentes, um com teto (20 x 26 x 36 cm) e outro sem teto (40 x 26 x 36 cm), interligados por uma parede com uma abertura central (6 x 6 cm). Na parede oposta do compartimento com teto está fixado um pano, impregnado ou não com odor de gato. Os comportamentos dos ratos foram registrados através de uma câmera de vídeo, posicionada diante da parede frontal e de acrílico transparente da caixa, conectada a um gravador de

DVD instalado em uma sala adjacente. Os experimentos foram realizados em uma sala com intensidade luminosa de 4 lux.

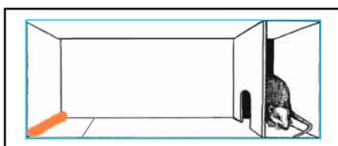
No teste do odor de gato, os animais foram expostos por três dias consecutivos, durante 10 minutos cada, a sessões experimentais identificadas por familiarização, condicionamento e contexto (descrição ver item 3.5).

Os parâmetros comportamentais avaliados neste teste foram:

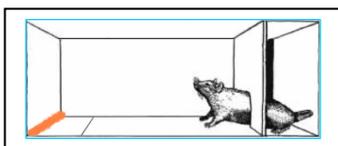
- Tempo de aproximação: tempo em que o rato aproxima-se e/ou mantém contato com o pano; este tempo é contado a partir de uma linha marcada no piso da caixa, que está distante 7 cm da parede onde está fixado o pano e o animal deve permanecer com duas ou mais patas dentro deste espaço delimitado.



- Tempo escondido: tempo em que o rato permanece no interior do compartimento fechado.



- Tempo de avaliação de risco: o comportamento de avaliação de risco está representado no modelo do odor de gato pela postura corporal chamada de “head-out”, que é a colocação da cabeça para fora da abertura do compartimento fechado, com ou sem as patas dianteiras.



- Número de cruzamentos: número de vezes que o rato aproxima-se do pano somado ao número de entradas no compartimento fechado;
- Número de aproximações: número de vezes que o animal aproxima-se do pano.

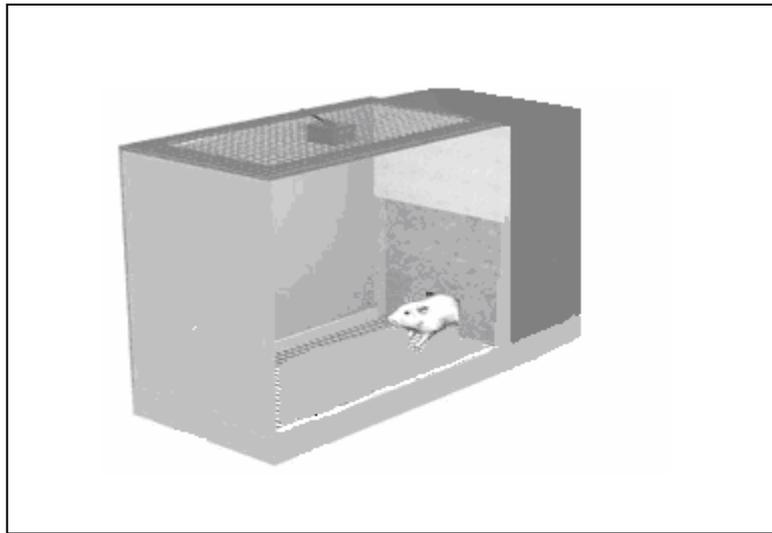


Figura 2. Desenho representativo da caixa do odor de gato.

3.4.3 Esquiva inibitória do tipo descida da plataforma

O teste da esquiva inibitória foi realizado em uma caixa acrílica (30 x 20 x 20 cm; Figura 3), com uma plataforma (20 x 8 x 1,5 cm) situada no lado direito da caixa e com um piso gradeado de aço inoxidável conectado a um sistema gerador de choques (Insight Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil), que permitiu a emissão de choques elétricos com intensidade e tempo definidos em 0,5 mA em 2 s. Este teste compreendeu uma sessão treino, na qual um choque elétrico foi liberado imediatamente após o rato descer espontaneamente da plataforma para o piso, com as quatro patas, e ser retirado logo em seguida da caixa. No dia seguinte foi realizada a sessão teste, com duração máxima de

180 segundos, onde foi medido o tempo de permanência do animal sobre a plataforma. Assim, as latências de descida da plataforma no treino e no teste, serviu como índice de retenção de memória e, foram registradas pelo experimentador presente na sala do teste. As sessões experimentais foram realizadas em um ambiente com intensidade luminosa de 90 lux.

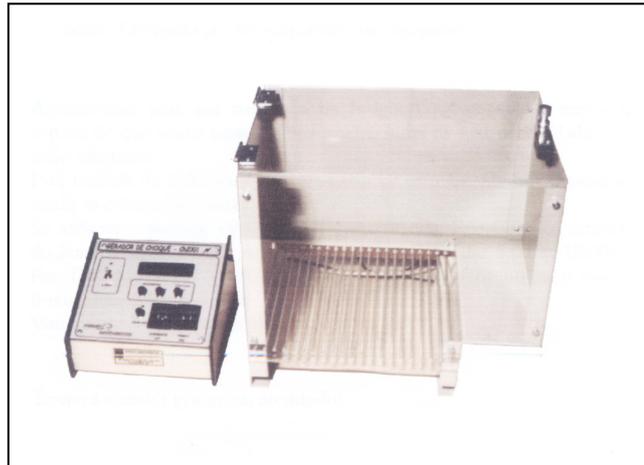


Figura 3. Fotografia da caixa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma

3.5 Procedimentos e Protocolos Experimentais

3.5.1 Experimento 1. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral e dorsal sobre o comportamento defensivo de ratos submetidos ao LCE.

Os ratos foram submetidos ao teste e reteste no LCE e diferentes grupos experimentais receberam a infusão de AP5 ou PBS no HPC ventral ou dorsal conforme descrito abaixo (Figura 4):

Grupo 1: infusão de AP5 ou PBS 10 minutos antes do teste;

Grupo 2: infusão de AP5 ou PBS imediatamente após o teste;

Grupo 3: infusão de AP5 ou PBS 10 minutos antes do reteste.

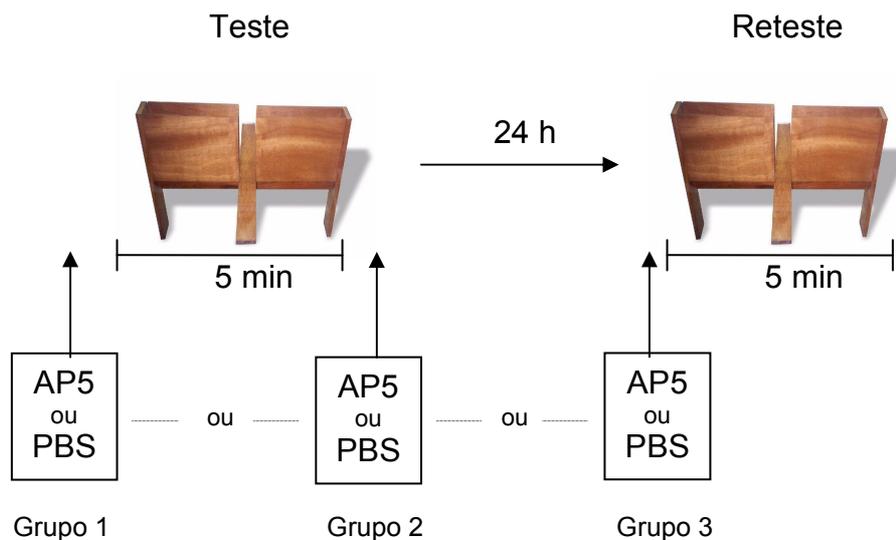


Figura 4. Protocolo experimental do teste LCE.

Para execução destes experimentos, os ratos foram retirados do biotério do laboratório, levados para uma sala onde permaneceram por 1 hora e, após este tempo, um rato foi individualmente colocado em uma caixa e conduzido à outra sala. Nesta sala, o rato permaneceu por aproximadamente 15 minutos e foi tratado conforme protocolo mencionado acima. Posteriormente, o rato foi transferido para sala de teste, sendo retirado da caixa e colocado na plataforma central do LCE com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento foi registrado durante 5 minutos.

3.5.2 Experimento 2. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral e dorsal sobre o comportamento defensivo de ratos expostos ao estímulo aversivo odor de gato.

Os ratos foram conduzidos do biotério até a sala de execução dos experimentos, conforme mencionado acima para o teste do LCE e foram

colocados no compartimento sem teto com a cabeça voltada para o pano. Este pano, uma flanela enrolada, esteve presente em todas as sessões. Os animais foram expostos pela primeira vez ao aparato, sessão familiarização, para conhecimento das condições deste ambiente. No dia seguinte, sessão condicionamento, os animais foram expostos novamente ao mesmo aparato, porém o pano estava impregnado com o odor de gato. Este odor foi obtido através da fricção do pano contra a pele, principalmente da região lombar e torácica, de um gato adulto macho, uma hora antes do experimento. Após 24 horas, sessão de contexto, os animais retornaram ao aparato, o pano continuava presente, porém sem o odor de gato.

Os seguintes tratamentos com AP5 ou PBS foram realizados conforme os seguintes grupos experimentais (Figura 5):

Grupo 1: Infusão de AP5 ou PBS 10 minutos antes do condicionamento ao odor de gato;

Grupo 2: Infusão de AP5 ou PBS 10 minutos antes do contexto do condicionamento ao odor de gato.

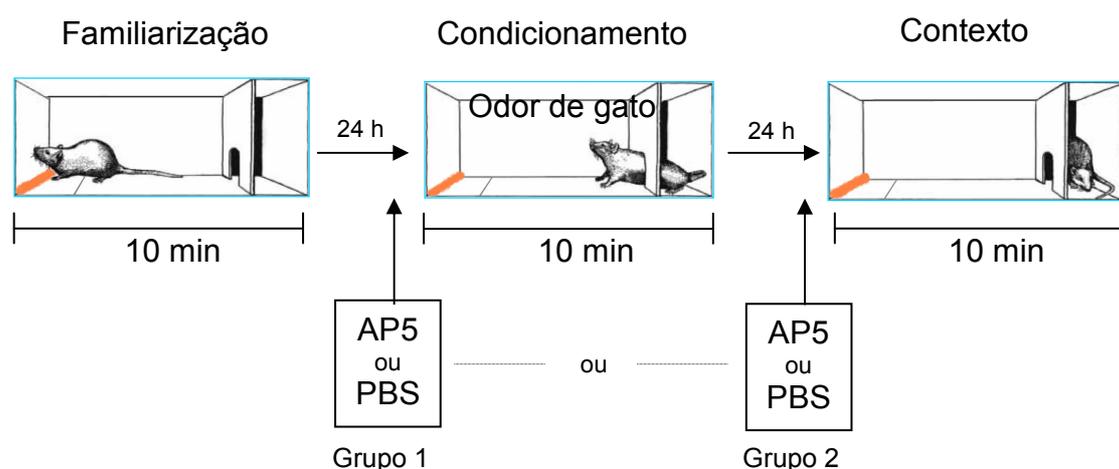


Figura 5. Protocolo experimental do teste odor de gato.

3.5.3 Experimento 3.1. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral e dorsal de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.

Para avaliar a participação dos receptores NMDA do HPC ventral e dorsal na aquisição, consolidação e evocação da memória emocional os seguintes grupos experimentais foram realizados (Figura 6):

Grupo 1: infusão de AP5 ou PBS 10 minutos antes do treino;

Grupo 2: infusão de AP5 ou PBS imediatamente após o treino;

Grupo 3: infusão de AP5 ou PBS 10 minutos antes do teste.

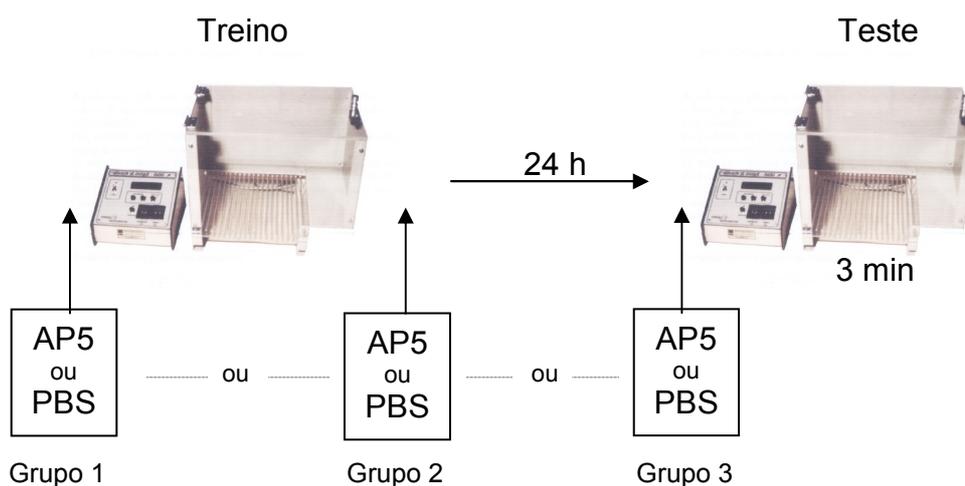


Figura 6. Protocolo experimental do teste de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.

Os procedimentos relacionados com a retirada dos animais do biotério até o momento de infusão, cujos tratamentos estão citados acima, foram idênticos àqueles efetuados para o LCE. O rato foi conduzido para a sala do experimento e colocado sobre a plataforma do aparelho. A descida espontânea

da plataforma, com as quatro patas no piso gradeado, foi seguida por um choque elétrico (2s, 0,5 mA) e a retirada imediata do animal. Na sessão teste, 24 horas após, a latência de descida da plataforma foi também registrada e nenhum choque foi aplicado.

Experimento 3.2. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral sobre consolidação da memória emocional de ratos familiarizados com o aparato da tarefa de esquiva inibitória.

Neste experimento (Figura 7), os animais foram colocados na plataforma do aparelho e deixados para explorá-lo totalmente durante 3 minutos, sem liberação de choque elétrico nas patas. Após 24 horas, os ratos foram expostos ao treino e, após a sua descida para a plataforma e liberação do choque elétrico, foram conduzidos imediatamente para receber infusão de AP5 ou PBS. No dia seguinte, foram expostos novamente ao aparelho e as latências de descida da plataforma foram registradas como medida de retenção de memória.

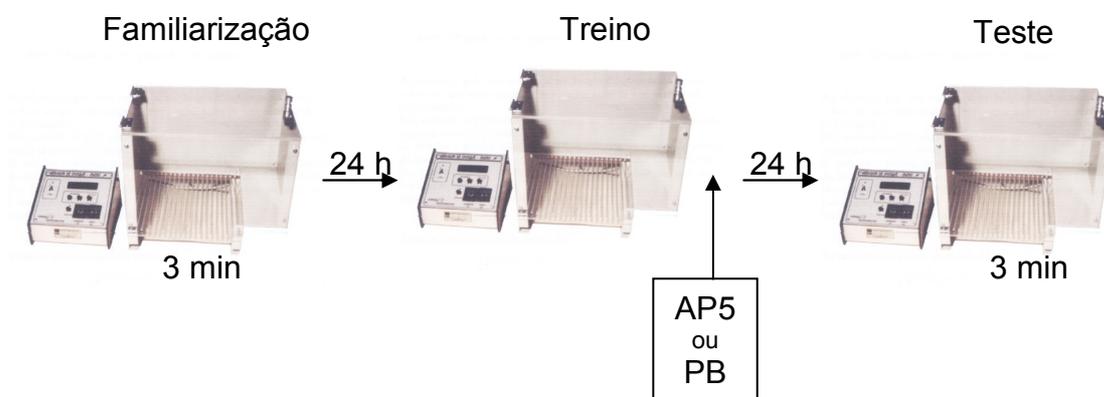


Figura 7. Protocolo experimental do teste de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma com familiarização.

3.6 Perfusão e Histologia

Completados os procedimentos experimentais, os animais foram devidamente anestesiados com uma solução a 15% de hidrato de cloral (Vetec, Brasil), administrado por via intraperitoneal (2 ml/Kg). Em seguida, receberam infusão do corante azul de Evans (0,5%; Sigma, USA), conforme realizado para infusão de AP5 ou PBS no HPC ventral e dorsal. Após, os animais foram perfundidos, via intracardíaca, com salina (0,9%) seguida por uma solução de formalina (10%). O encéfalo foi removido e pós-fixado na solução de formalina por 24 horas, sendo transferido para uma solução de sacarose (30%) e mantido sob refrigeração até sua secção. Os encéfalos foram cortados no plano transversal em um criostato (CM150; Leica, Germany) em secções de 60 µm de espessura e montados em lâminas de vidro. Posteriormente, os cortes foram imersos no corante Giemsa (Sigma-Aldrich), tratados com uma série de álcoois em concentrações crescentes, clareados em citrosolv e finalmente cobertos com lamínulas. Os cortes foram analisados para localização dos sítios de infusão através de um microscópio óptico (Nikon, Japan) e de um microscópio estereoscópio (Metrimpex, Hungria). Os dados obtidos a partir de animais com sítio de infusão fora do HPC ventral ou dorsal foram excluídos da análise estatística.

3.7 Análise Estatística

Os dados obtidos a partir dos três modelos experimentais foram inicialmente submetidos ao teste uni-variado de Bartlett, para avaliação da

homogeneidade das variâncias. Os dados obtidos no LCE foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas de dois fatores (teste/reteste x tratamento) seguidos então pelo teste post-hoc Newman-Keuls e representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Para análise estatística das latências de descida da plataforma na esQUIVA inibitória, foi considerado o valor obtido pela diferença entre o tempo de latência nas sessões de treino e teste (Δ latência = latências teste – latências treino). Os dados obtidos foram submetidos a ANOVA de um fator (tratamento), seguido pelo teste post-hoc Newman-Keuls e representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M). As latências obtidas durante a sessão de treino no teste da esQUIVA inibitória foram representadas pelo intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante esta sessão. Os dados obtidos na sessão de condicionamento e contexto do teste do odor de gato, foram submetidos a ANOVA de um fator (tratamento), seguidos pelo teste post-hoc Newman Keuls e representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Os dados obtidos para cada um dos parâmetros comportamentais avaliados na sessão de familiarização do teste do odor de gato foram representados pelo intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante esta sessão. Em todos estes métodos estatísticos o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Toda análise estatística foi executada pelo programa Statística[®] (Versão 7.1; StatSoft[®], Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Localização dos sítios de infusão

Os resultados obtidos nos testes comportamentais foram analisados estatisticamente após visualização dos cortes histológicos, que confirmaram os locais de infusões dos tratamentos. Esta análise histológica mostrou que os locais de infusão ficaram concentrados principalmente nas regiões CA1, CA2 e CA3 do HPC ventral ou dorsal (Figura 8 e 9).

A



B



Figura 8. Fotomicrografias de cortes frontais do hipocampo ventral (A) e dorsal (B), corado pela técnica de Nissl, ilustrando os sítios de infusões de AP5.

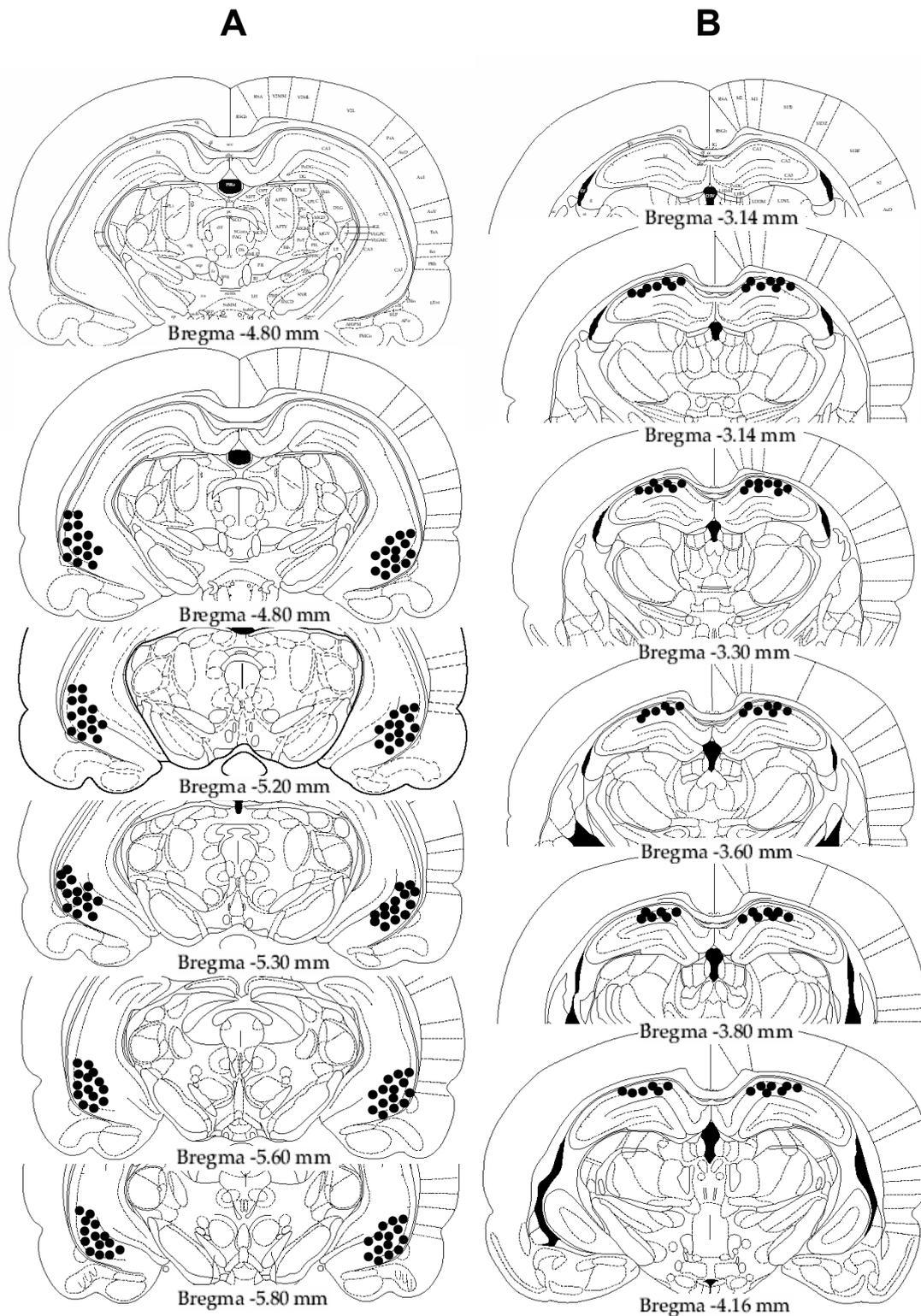


Figura 9. Desenhos esquemáticos de cortes frontais do hipocampo ventral (A) e dorsal (B) de ratos, ilustrando os locais de infusão (●). Somente uma parte dos locais de infusão está representada devido à sobreposição dos mesmos. Desenhos modificados a partir do Atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1998).

4.2. Experimento 1. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral e dorsal sobre aspectos emocionais e cognitivos do comportamento defensivo de ratos submetidos ao LCE.

Hipocampo ventral

Para avaliação do efeito da infusão de AP5 no HPC ventral, antes e após o teste e antes do reteste, um total de 103 ratos foram utilizados.

Os resultados obtidos com a infusão de AP5 no HPC ventral, antes do teste, estão representados na Figura 10. A ANOVA dos resultados obtidos na sessão teste e reteste, indicaram um efeito significativo do fator tratamento [%TBA: $F(3,41) = 6,09$; $p < 0,001$; %EBA: $F(3,41) = 8,89$; $p < 0,0001$ e AR: $F(3,41) = 7,75$; $p < 0,001$] para as medidas comportamentais %TBA, %EBA e AR, bem como do fator teste/reteste [%TBA: $F(1,41) = 82,70$; $p < 0,001$; %EBA: $F(1,41) = 67,39$; $p < 0,001$; AR: $F(1,41) = 4,68$; $p < 0,001$] e da interação entre esses dois fatores [%TBA: $F(3,41) = 6,55$; $p < 0,001$; %EBA: $F(3,41) = 2,94$; $p < 0,01$; AR: $F(3,41) = 5,20$; $p < 0,01$]. O teste post-hoc revelou que a infusão de AP5 nas doses de 6 e 24 nmol antes do teste no LCE, provocou aumento na %TBA, %EBA e redução do comportamento de AR durante esta sessão, quando comparado com o grupo controle. Estes efeitos não foram observados com a infusão de AP5 na dose de 3 nmol. Além disso, foi verificado que a infusão de AP5 nas doses de 6 e 24 nmol antes do teste, não interferiu com os parâmetros comportamentais avaliados no reteste, quando comparado com o controle. Embora tenha ocorrido redução do comportamento de AR durante a sessão teste dos grupos tratados com AP5, este efeito não alterou esta medida

comportamental na sessão reteste. Com relação à frequência de EBF, nenhum efeito foi observado nos grupos tratados com AP5 quando comparado com o controle, o que mostra que este tratamento não interferiu com a atividade locomotora dos animais em ambas as sessões experimentais. Em resumo, a infusão de AP5 nas doses de 6 e 24 nmol no HPC ventral, antes do teste, aumentou a %TBA e %EBA durante esta sessão, sugerindo um efeito ansiolítico. Além disso, embora esses resultados mostrem que a infusão de AP5 tenha interferido com o aspecto emocional do comportamento defensivo durante o teste, este tratamento não afetou a aquisição da resposta de esquiva, exibida pelo animal durante o reteste.

Os resultados obtidos com a infusão de AP5 no HPC ventral, imediatamente após o teste, estão representados na Figura 11. A ANOVA dos resultados obtidos nas sessões teste e reteste não revelaram efeito significativo do fator tratamento ou da interação entre os fatores tratamento e teste/reteste para as medidas comportamentais avaliadas. Entretanto, para o fator teste/reteste a ANOVA revelou efeito significativo somente das medidas %TBA [$F(1,24) = 72,1; p < 0,0001$] e % EBA [$F(1,24) = 50,4; p < 0,0001$]. A análise post hoc revelou uma redução na %TBA e %EBA no reteste em relação ao teste em todos os grupos tratados com AP5 e PBS. Este efeito, como mencionado anteriormente, é decorrente da aquisição da resposta de esquiva que ocorre gradualmente durante o teste e se intensifica no reteste. Assim, estes resultados sugerem que a infusão de AP5 no HPC ventral, imediatamente após o teste, não interferiu com a consolidação da resposta de esquiva exibida pelos animais durante o reteste.

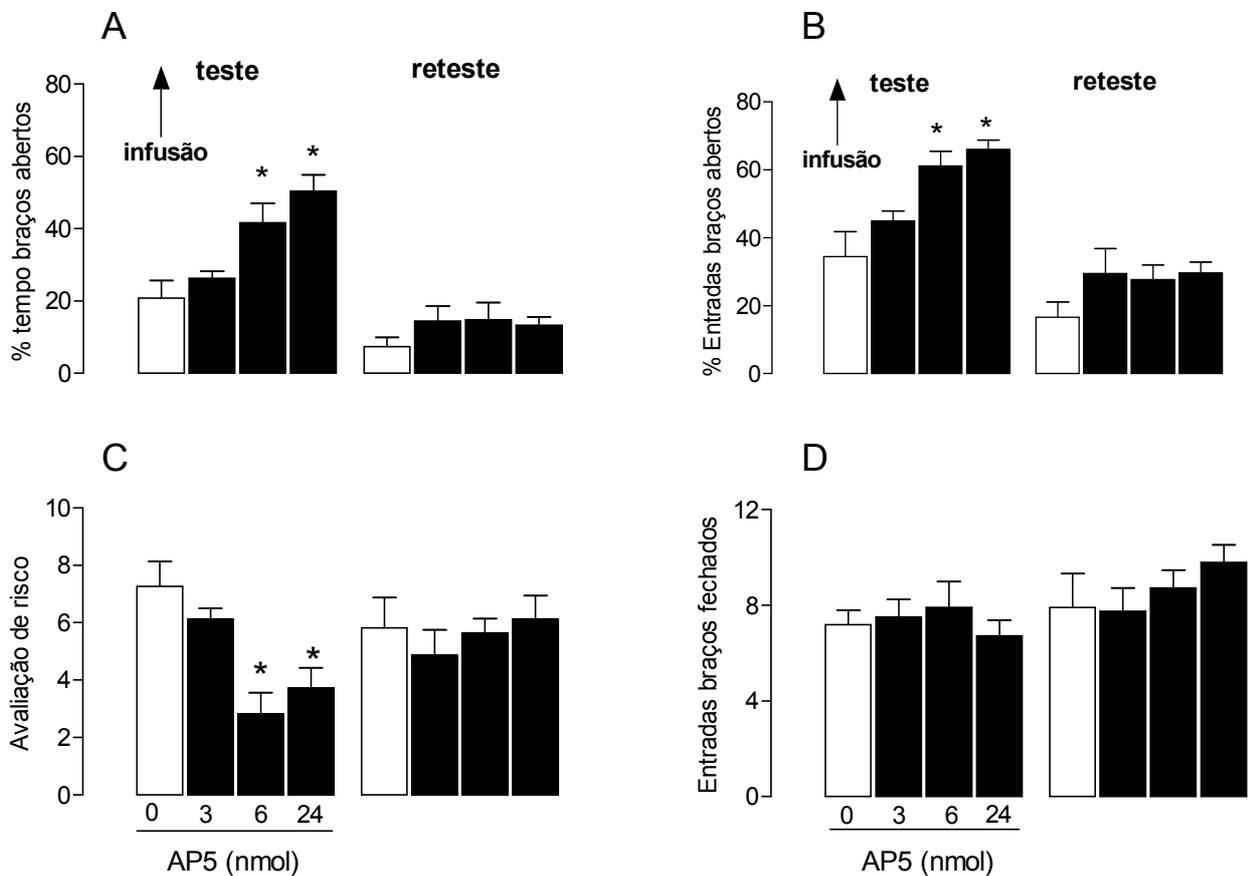


Figura 10. Efeito da infusão pré-teste de AP5 (3, 6 e 24 nmol) no hipocampo ventral sobre os parâmetros % de tempo (A) e % entradas (B) nos braços abertos, frequência do comportamento de avaliação de risco (C) e frequência de entradas nos braços fechados (D) de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE (n=10-15 por grupo). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle (PBS).

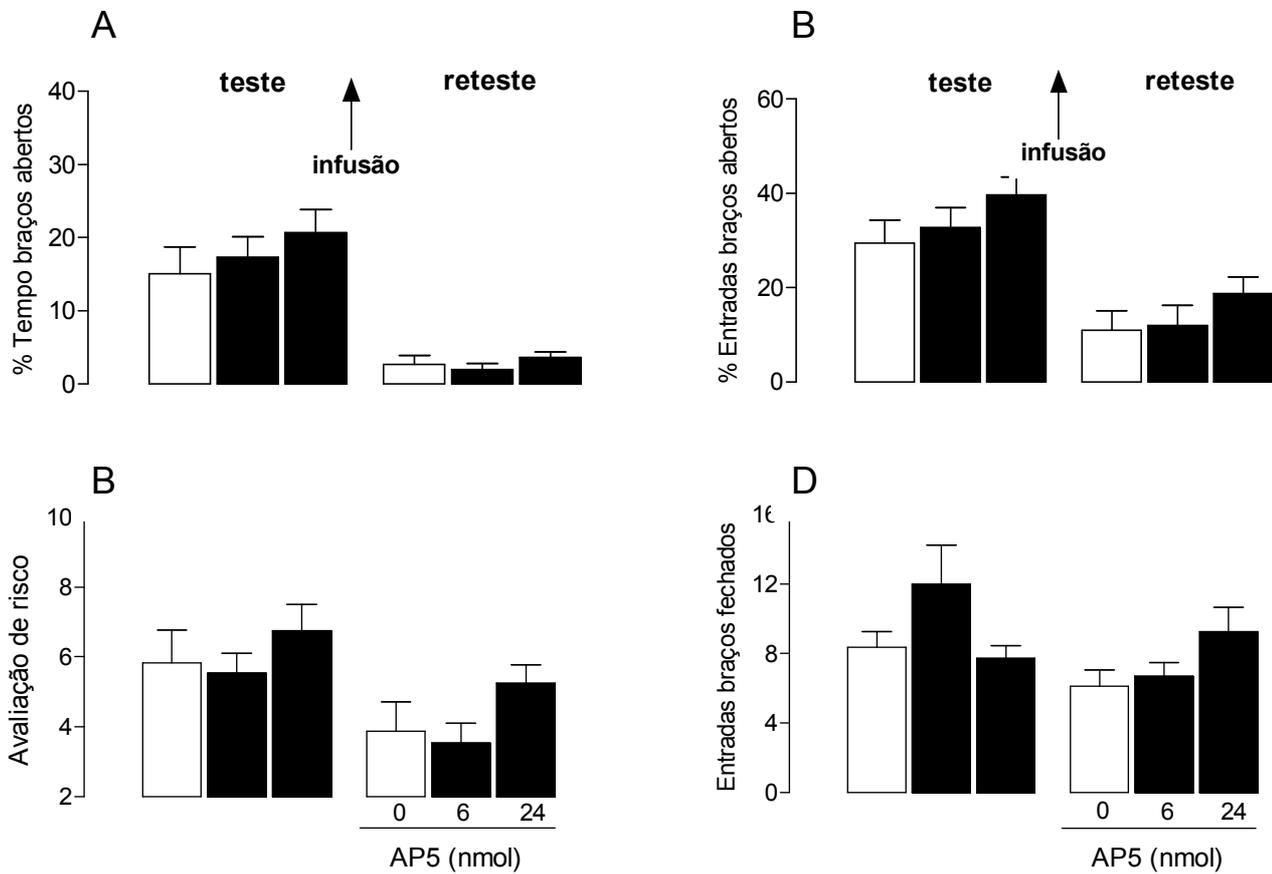


Figura 11. Efeito da infusão pós-teste de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral sobre os parâmetros % de tempo (A) e % entradas (B) nos braços abertos, freqüência do comportamento de avaliação de risco (C) e freqüência de entradas nos braços fechados (D) de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE (n=10-15 por grupo). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls.

Os resultados obtidos com a infusão de AP5 no HPC ventral, antes do reteste, estão representados na Figura 12. A ANOVA dos resultados obtidos nas sessões teste e reteste não revelaram efeito significativo sobre as medidas comportamentais avaliadas para o fator tratamento ou para a interação entre o fator tratamento e teste/reteste. Entretanto, para o fator teste/reteste a ANOVA revelou efeito significativo somente para as medidas %TBA [$F(1,28) = 22,3$; $p < 0,0001$] e % EBA [$F(1,28) = 14,6$; $p < 0,001$]. A análise post hoc revelou uma redução na %TBA e %EBA no reteste em relação ao teste em todos os grupos tratados com AP5 e PBS, conforme foi verificado também para os outros grupos experimentais anteriormente mencionados. Assim, a infusão de AP5 no HPC ventral, antes do reteste, não interferiu com a expressão da resposta de esquiva observada durante esta sessão.

Hipocampo Dorsal

Para avaliação do efeito da infusão de AP5 no HPC dorsal, antes e após o teste e antes do reteste, um total de 81 ratos foram utilizados.

Os resultados obtidos com a infusão de AP5 no HPC dorsal, antes do teste, estão representados na Figura 13. A ANOVA dos resultados obtidos nas sessões teste e reteste não revelaram efeito significativo sobre as medidas comportamentais avaliadas para o fator tratamento ou para a interação entre o fator tratamento e teste/reteste. Entretanto, a ANOVA indicou um efeito significativo das medidas comportamentais %TBA, %EBA somente para o fator teste/reteste [%TBA: $F(1,26) = 16,8$; $p < 0,0001$; e %EBA: $F(1,26) = 11,5$; $p < 0,005$].

Os resultados obtidos com a infusão de AP5 no HPC dorsal, imediatamente após o teste, estão representados na Figura 14. A ANOVA não detectou efeito significativo para os fatores tratamento e interação entre tratamento e teste/reteste, mas revelou um efeito significativo do fator teste/reteste em relação às medidas %TBA [$F(1,22) = 58,6; p < 0,0001$] e %EBA [$F(1,22) = 22,3; p < 0,0001$].

Os resultados obtidos com a infusão de AP5 no HPC dorsal, antes do reteste, estão representados na Figura 15. A ANOVA também revelou um efeito significativo somente do fator teste/reteste em relação às medidas %TBA [$F(1,24) = 54,6; p < 0,0001$] e %EBA [$F(1,24) = 22,3; p < 0,001$].

A análise post hoc, efetuada para cada um desses diferentes momentos de infusão de AP5 no HPC dorsal, revelou uma redução na %TBA e %EBA no reteste em relação ao teste em todos os grupos tratados com AP5 e PBS. Estes resultados mostraram que a infusão de AP5 no HPC dorsal, antes e após o teste e antes do reteste, não interferiu com a aquisição, consolidação e expressão, respectivamente, da resposta de esquiva observada durante a sessão reteste, quando comparada com o controle.

Em resumo, o conjunto de resultados obtidos mostra que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no HPC ventral, mas não no HPC dorsal, provocou redução do comportamento defensivo em ratos submetidos ao teste do LCE. Entretanto, o bloqueio dos receptores NMDA, realizado em ambas as regiões, não afetou os aspectos cognitivos do comportamento defensivo.

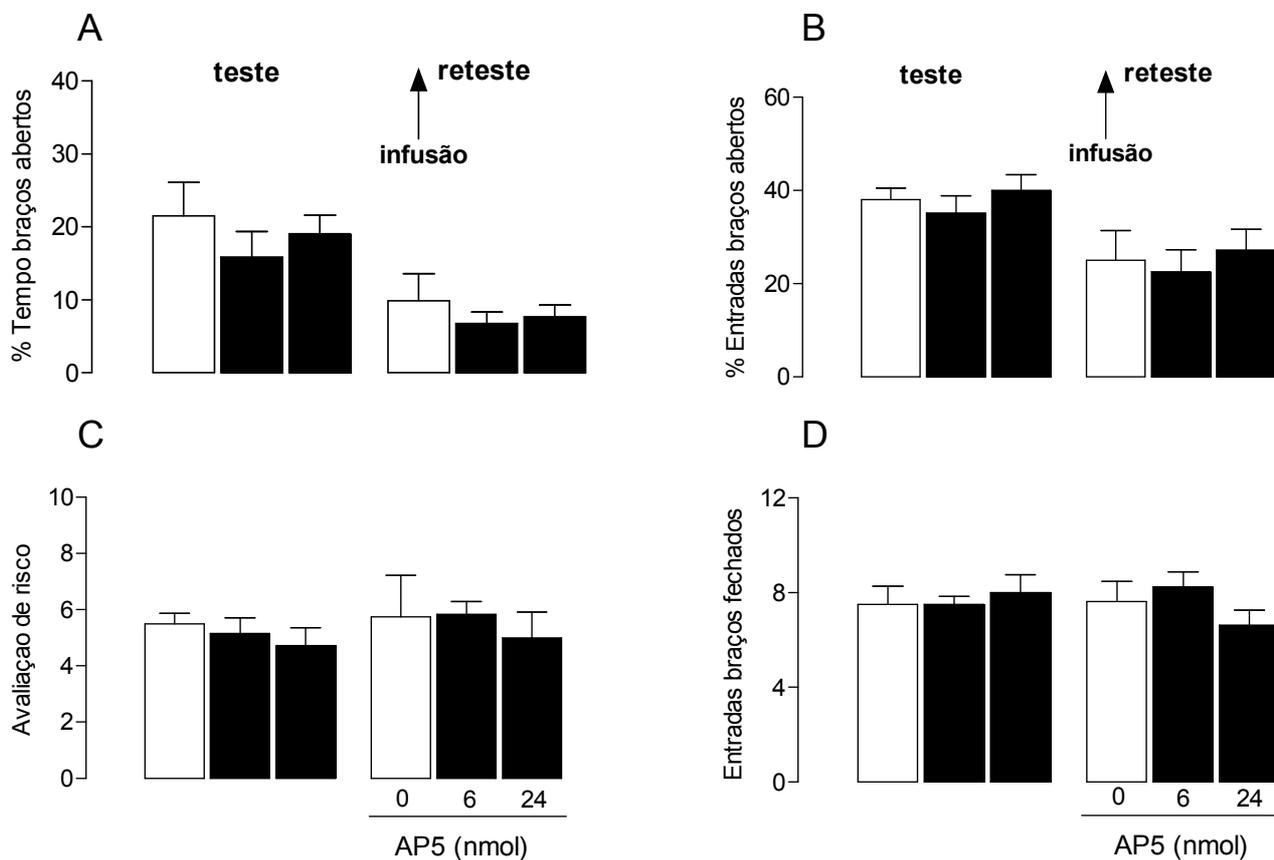


Figura 12. Efeito da infusão pré-reteste de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral sobre parâmetros % de tempo (A) e % entradas (B) nos braços abertos, freqüência do comportamento de avaliação de risco (C) e freqüência de entradas nos braços fechados (D) de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE (n=10-15 por grupo). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls.

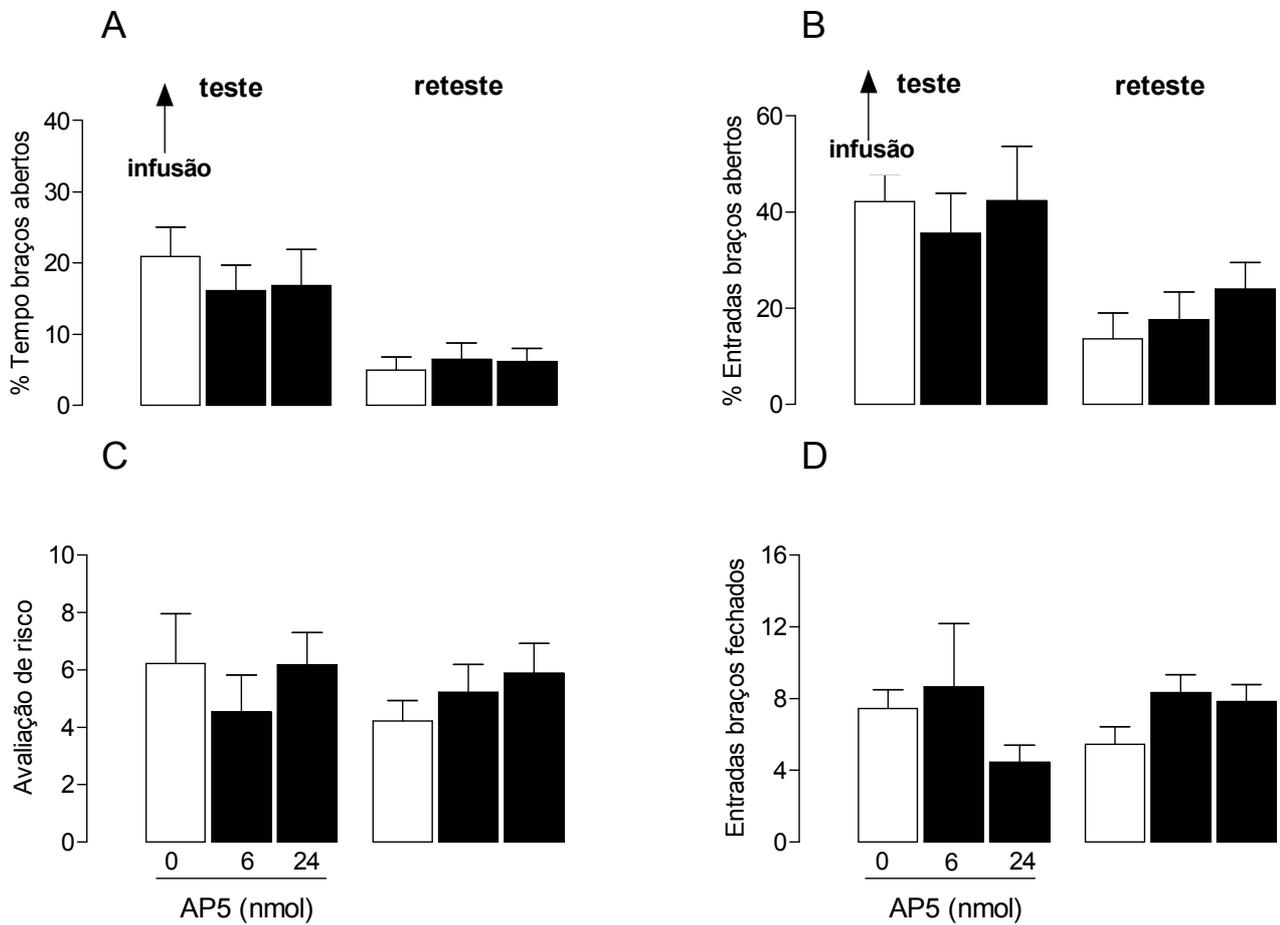


Figura 13. Efeito da infusão pré-teste de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo dorsal sobre os parâmetros % de tempo (A) e % entradas (B) nos braços abertos, freqüência do comportamento de avaliação de risco (C) e freqüência de entradas nos braços fechados (D) de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE (n= 8-11 por grupo). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls.

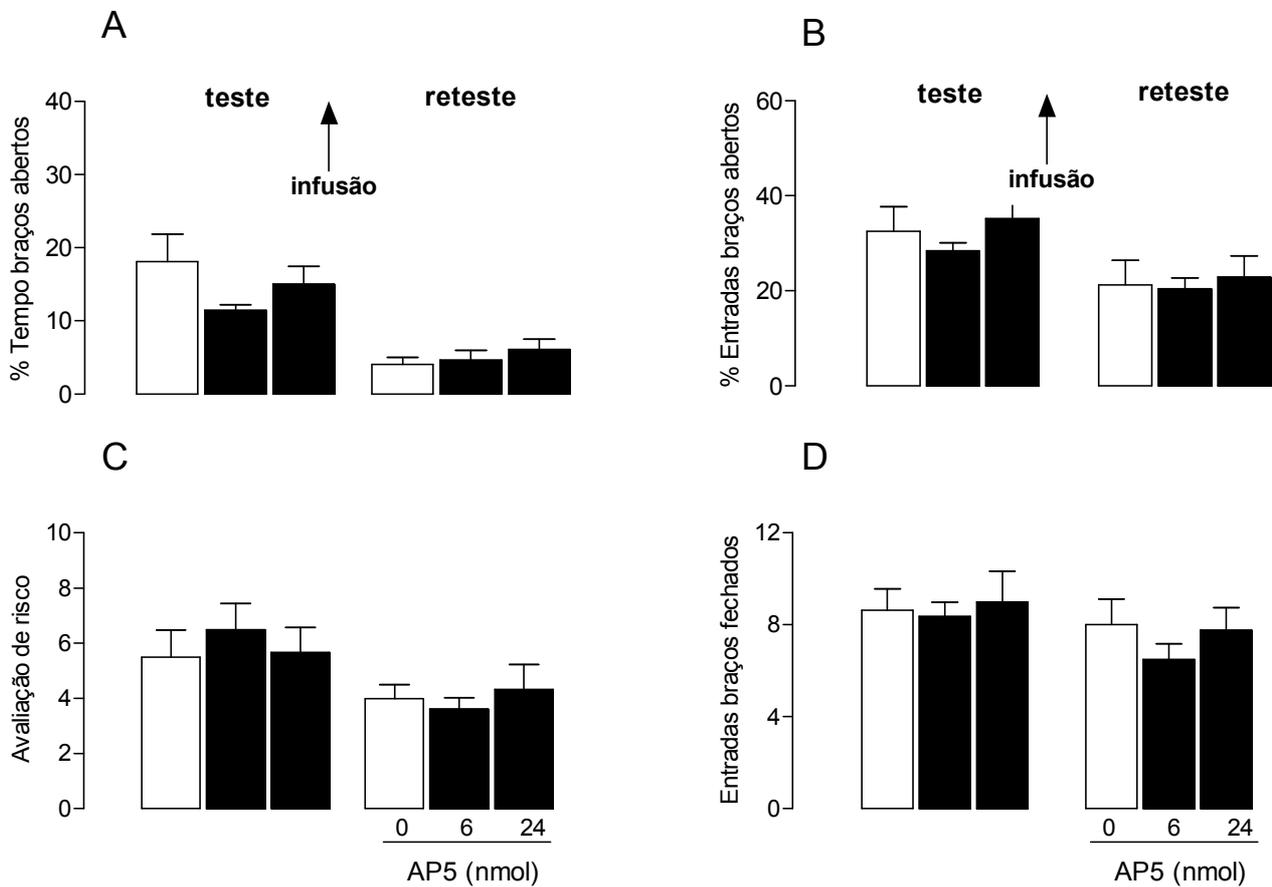


Figura 14. Efeito da infusão pós-teste de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo dorsal sobre parâmetros % de tempo (A) e % entradas (B) nos braços abertos, frequência do comportamento de avaliação de risco (C) e frequência de entradas nos braços fechados (D) de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE (n= 8-11 por grupo). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls.

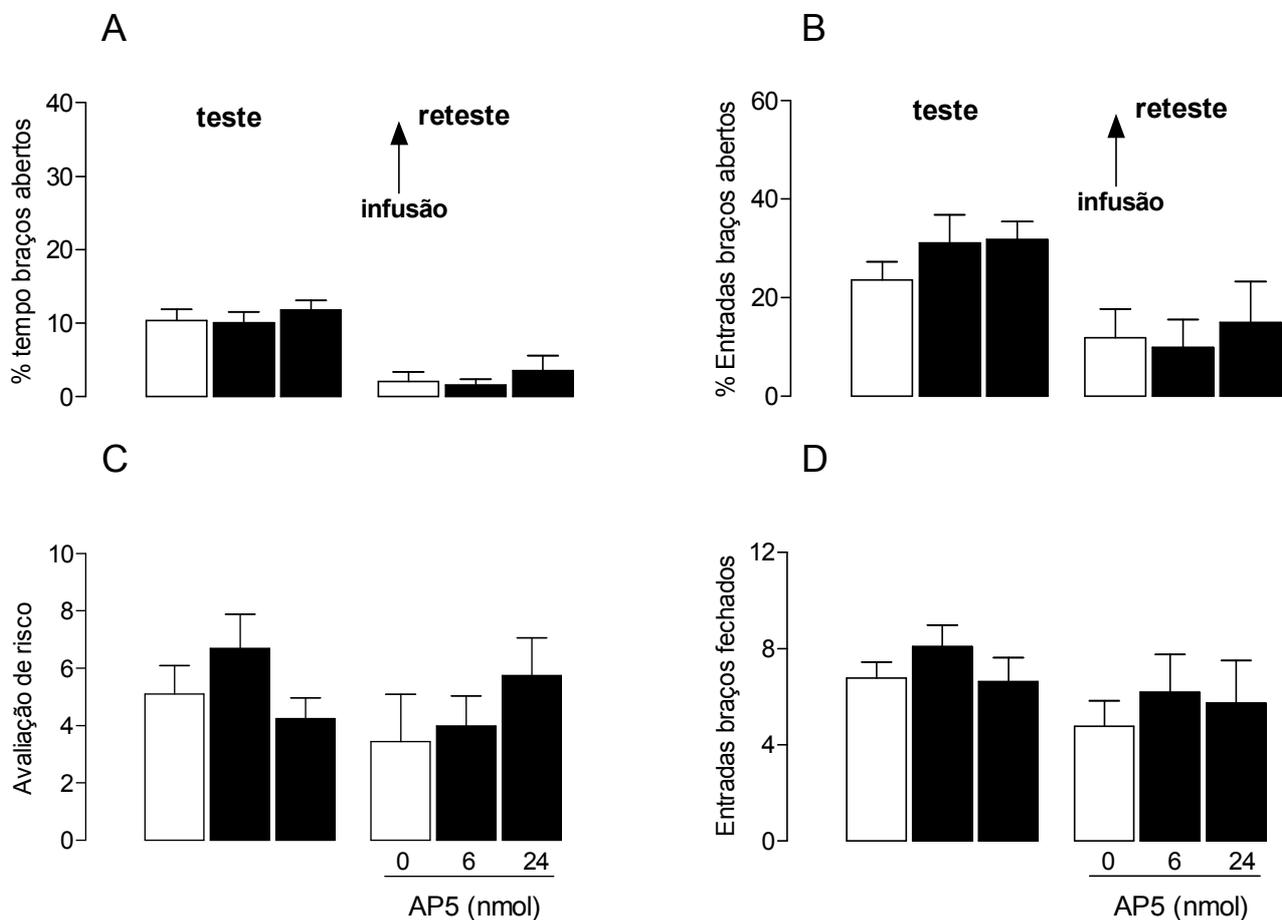


Figura 15. Efeito da infusão pré-reteste de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo dorsal sobre parâmetros % de tempo (A) e % entradas (B) nos braços abertos, freqüência do comportamento de avaliação de risco (C) e freqüência de entradas nos braços fechados (D) de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE (n= 8-11 por grupo). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls.

4.3. Experimento 2. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral e dorsal sobre o comportamento defensivo de ratos expostos ao odor de gato.

Hipocampo ventral

Para avaliação do efeito da infusão de AP5 no HPC ventral, antes da exposição ao odor de gato e ao contexto onde esse odor foi apresentado, um total de 50 ratos foram utilizados.

As Figuras 16 e 17 representam o efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no HPC ventral, antes da exposição ao odor de gato, sobre a resposta defensiva de ratos submetidos a este teste. A ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento para os parâmetros % tempo de aproximação [$F(2,25) = 5,05$; $p < 0,01$], % tempo escondido [$F(2,25) = 7,24$; $p < 0,01$], comportamento de avaliação de risco [$F(2,25) = 5,58$; $p < 0,01$], número de aproximações [$F(2,25) = 9,48$; $p < 0,0001$] e cruzamentos [$F(2,25) = 16,85$; $p < 0,0001$] durante a sessão de condicionamento ao odor de gato. A análise post hoc revelou que a infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no HPC ventral, antes do odor de gato, provocou aumento no tempo de aproximação, no número de cruzamentos e de aproximações e reduziu o tempo escondido e o comportamento de avaliação de risco em relação ao grupo controle (Figura 16 e 17).

A ANOVA efetuada com os resultados da sessão contexto revelou efeito significativo, dos grupos tratados anteriormente na sessão de condicionamento, para os parâmetros % tempo de aproximação [$F(2,25) = 9,64$; $p < 0,0001$], %

tempo escondido [$F(2,25) = 5,68; p < 0,01$], avaliação de risco [$F(2,25) = 5,48; p < 0,01$], número de aproximações [$F(2,25) = 5,38; p < 0,0001$] e cruzamentos [$F(2,25) = 3,87; p < 0,05$]. A análise post hoc revelou aumento no tempo de aproximação, no número de cruzamentos e aproximações e redução no tempo escondido e no comportamento de avaliação de risco, dos grupos tratados com AP5 (6 e 24 nmol) 24 horas antes, em relação ao grupo controle (Figura 16 e 17).

Desta forma, estes resultados mostram que a infusão de AP5 no HPC ventral, antes da exposição ao odor de gato, provocou redução do comportamento defensivo e interferiu com a resposta defensiva condicionada, verificada quando os ratos foram re-expostos ao contexto do condicionamento ao odor de gato.

Além da avaliação da participação dos receptores NMDA do HPC ventral na mediação da resposta defensiva de ratos ao odor de gato os efeitos da infusão de AP5 antes do contexto sobre a expressão da resposta defensiva condicionada estão ilustrados nas Figuras 18 e 19. A ANOVA não revelou efeito significativo do tratamento para os parâmetros % tempo de aproximação, % tempo escondido, comportamento de avaliação de risco, número de aproximações e cruzamentos de ratos re-expostos ao contexto do condicionamento ao odor de gato. Assim, a infusão de AP5 no HPC ventral, antes do contexto, não interferiu com a expressão da resposta defensiva dos animais.

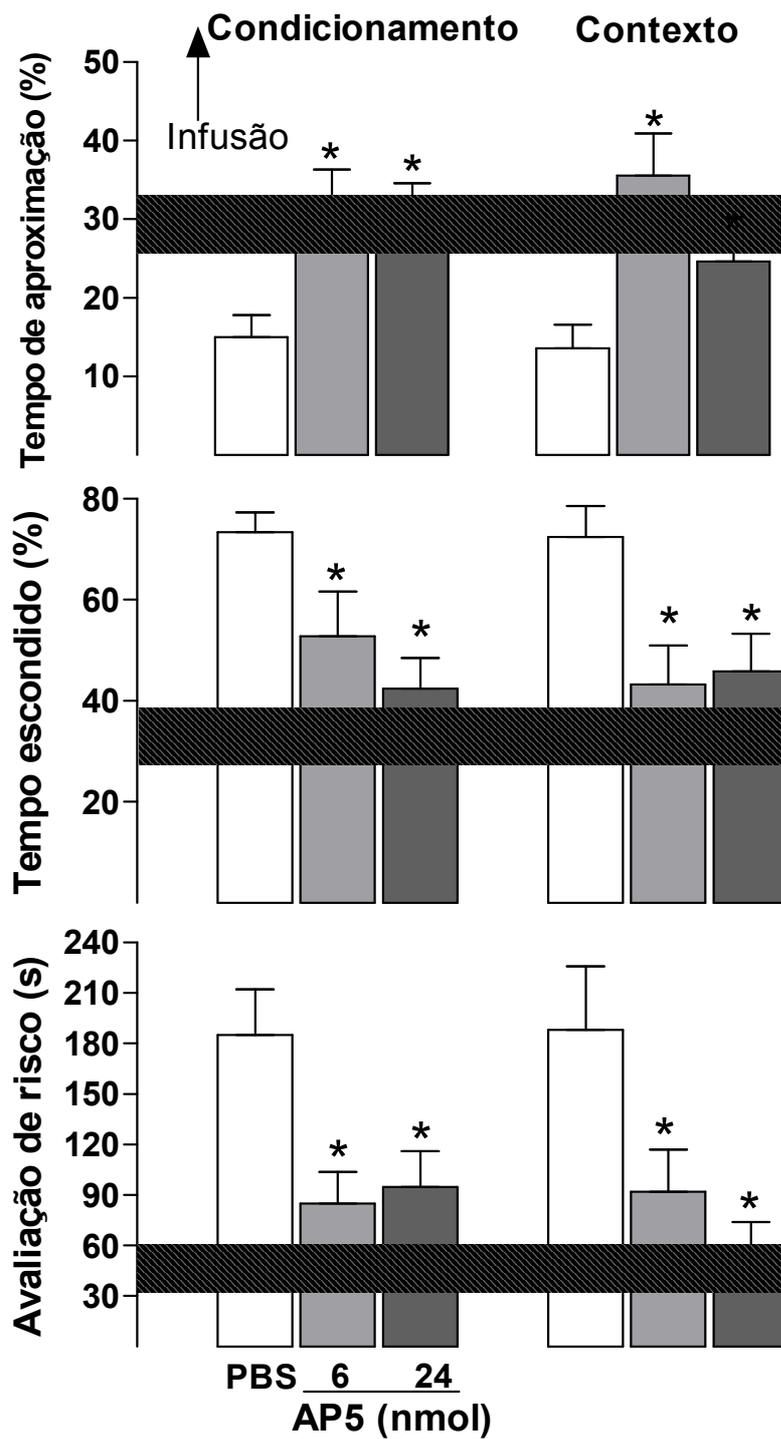


Figura 16. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral antes da exposição ao odor de gato sobre o tempo de aproximação, tempo escondido e avaliação de risco (head-out) de ratos expostos por 10 minutos ao teste do odor de gato (n= 8-11 por grupo). A barra horizontal hachurada representa o intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante a sessão familiarização. As barras verticais compreendem média \pm EPM dos dados obtidos na sessão condicionamento e contexto. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo controle.

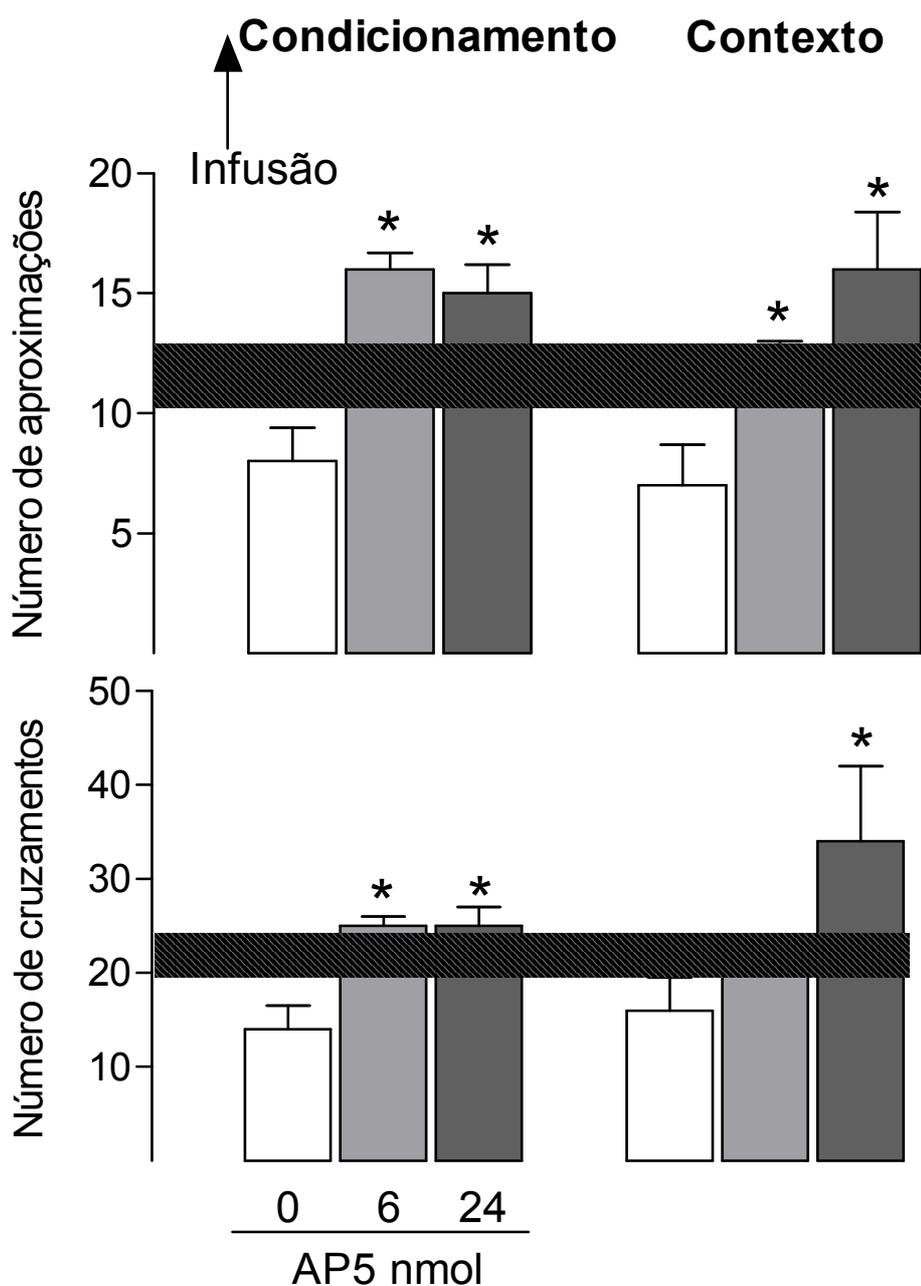


Figura 17. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral antes da exposição ao odor de gato sobre o número de aproximações e de cruzamentos de ratos expostos por 10 minutos ao teste do odor de gato (n= 8-11 por grupo) . A barra horizontal hachurada representa o intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante a sessão familiarização. As barras verticais compreendem média \pm EPM dos dados obtidos na sessão condicionamento e contexto. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo controle.

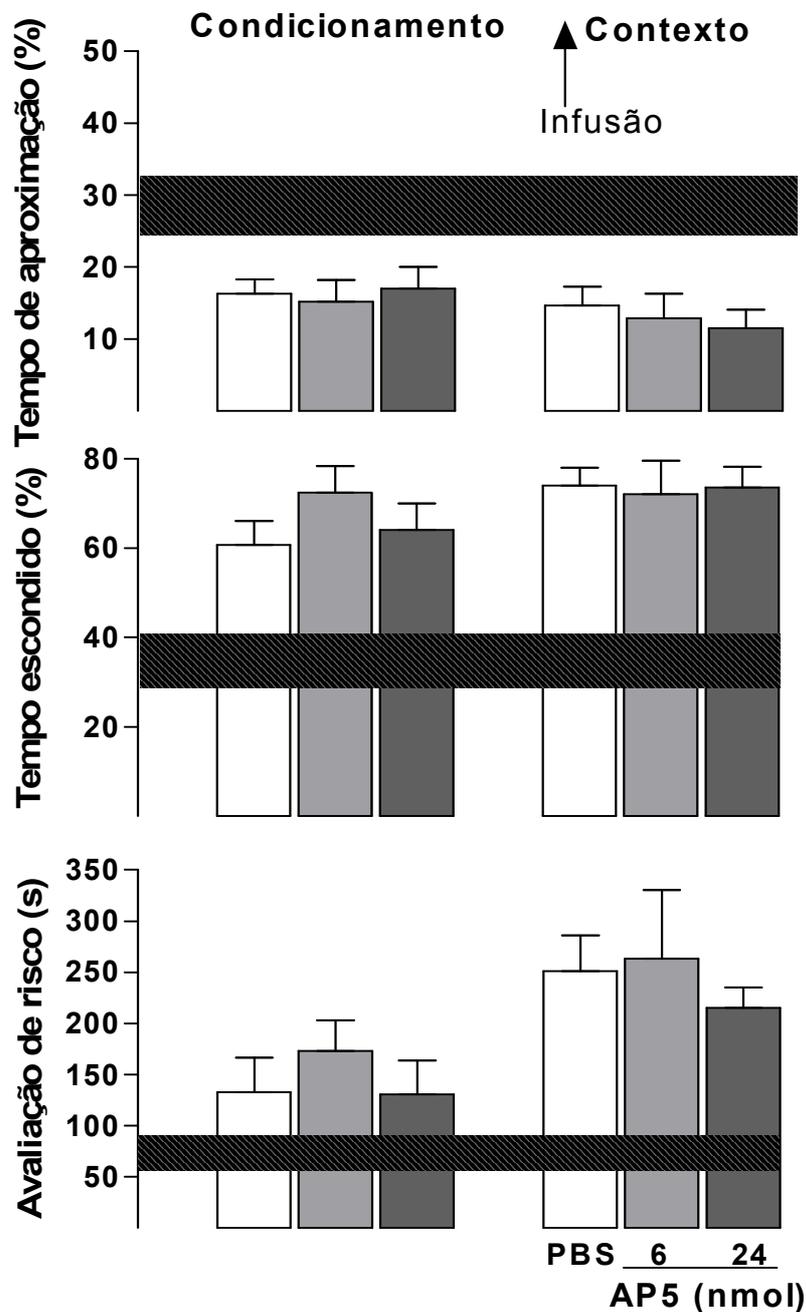


Figura 18. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral, antes da exposição ao contexto, sobre o tempo de aproximação, tempo escondido e avaliação de risco (head-out) de ratos expostos por 10 minutos ao teste do odor de gato (n= 7-8 por grupo) . A barra horizontal hachurada representa o intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante a sessão familiarização. As barras verticais compreendem média \pm EPM dos dados obtidos na sessão condicionamento e contexto. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls.

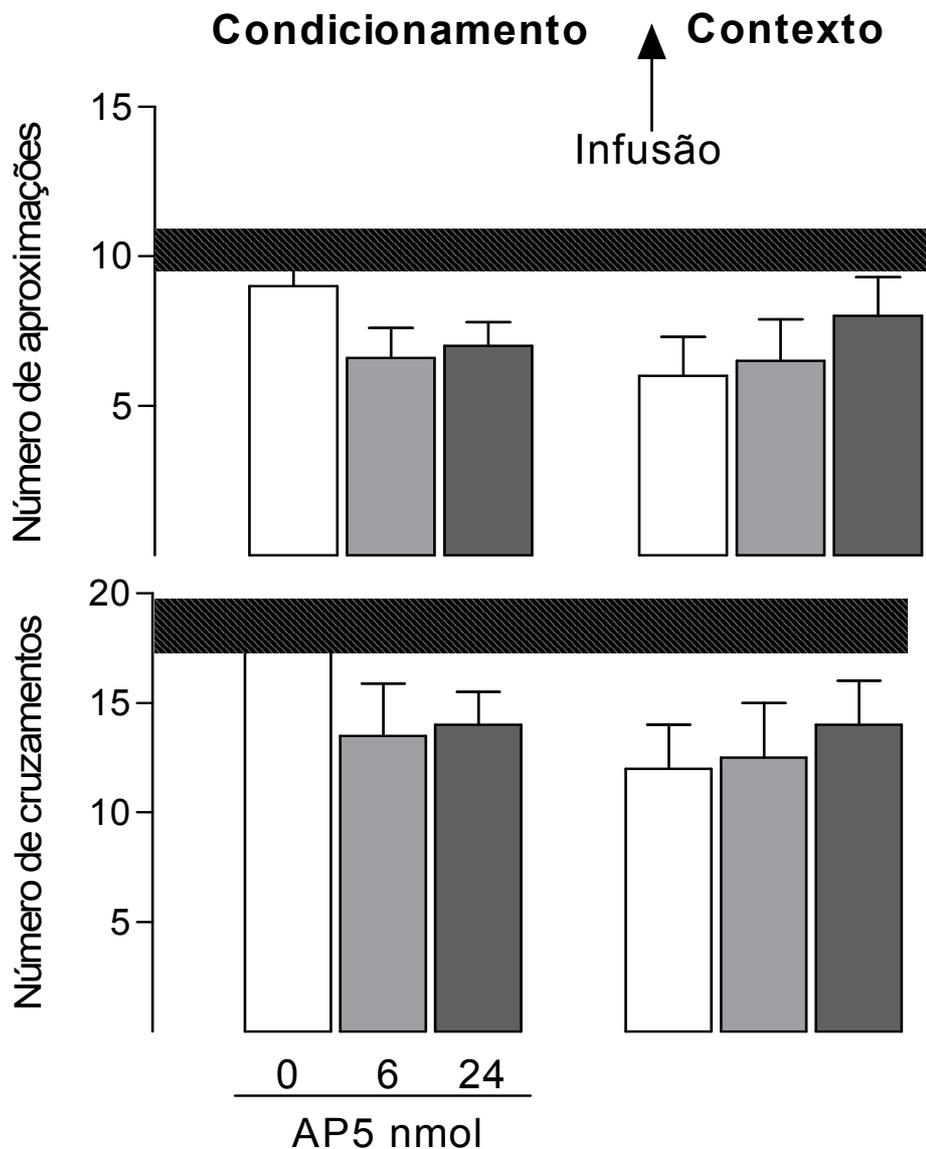


Figura 19. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral, antes da exposição ao contexto, sobre o número de aproximações e de cruzamentos de ratos expostos por 10 minutos ao teste do odor de gato ($n = 7-8$ por grupo). A barra horizontal hachurada representa o intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante a sessão familiarização. As barras verticais compreendem média \pm EPM dos dados obtidos na sessão condicionamento e contexto. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls.

Hipocampo dorsal

Para avaliação do efeito da infusão de AP5 no HPC dorsal, antes da exposição ao odor de gato e ao contexto onde esse odor foi apresentado, um total de 45 ratos foram utilizados.

As Figuras 20 e 21 representam o efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no HPC dorsal, antes da exposição ao odor de gato, sobre a resposta defensiva de ratos expostos a este teste. A ANOVA não revelou efeito significativo do tratamento para os parâmetros % tempo de aproximação, % tempo escondido, comportamento de avaliação de risco, número de aproximações e cruzamentos durante a sessão de condicionamento (Figuras 20 e 21). A infusão de AP5 no HPC dorsal antes do odor de gato também não interferiu com nenhum dos parâmetros comportamentais avaliados na sessão contexto.

Nas Figuras 22 e 23 estão ilustrados os efeitos da infusão de AP5 antes do contexto, sobre a expressão da resposta defensiva condicionada. A ANOVA não revelou efeito significativo do tratamento para os parâmetros % tempo de aproximação, % tempo escondido, comportamento de avaliação de risco, número de aproximações e cruzamentos de ratos re-expostos ao contexto do condicionamento ao odor de gato. Assim, esses resultados mostram que a infusão de AP5 no HPC dorsal, antes da exposição ao odor de gato ou ao contexto do condicionamento, não interferiu com o comportamento defensivo.

Em resumo, os resultados obtidos no teste do odor de gato indicam que o bloqueio dos receptores NMDA do HPC ventral, mas não do HPC dorsal, provocou redução do comportamento defensivo de ratos expostos ao odor de gato. No entanto, o bloqueio dos receptores NMDA em ambas as regiões,

antes da re-exposição ao contexto do condicionamento, não afetou a expressão do comportamento defensivo.

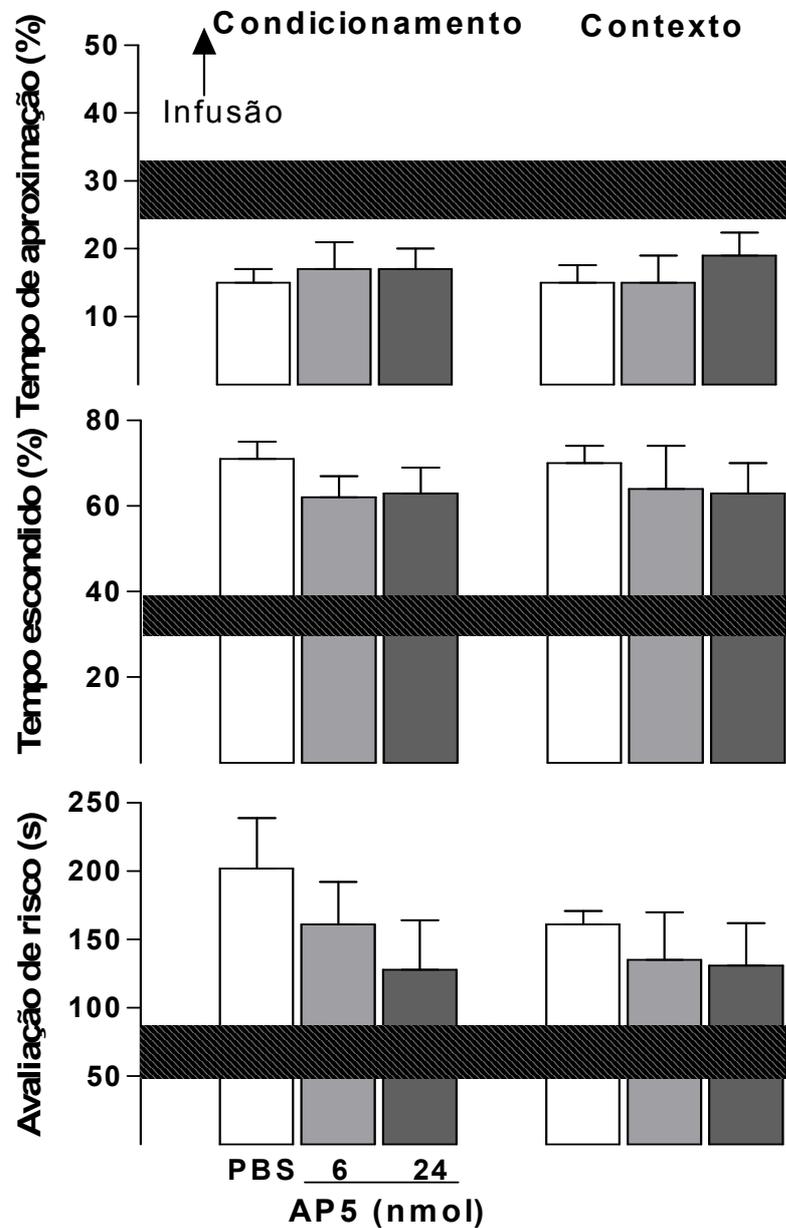


Figura 20. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo dorsal antes da exposição ao odor de gato sobre os parâmetros tempo de aproximação, tempo escondido e avaliação de risco (head-out) de ratos expostos por 10 minutos ao teste do odor de gato (n= 7-8 por grupo) . A barra horizontal hachurada representa o intervalo de confiança (95%) dos dados obtidos durante a sessão familiarização. Os dados da sessão condicionamento e contexto estão representados como média \pm EPM. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls.

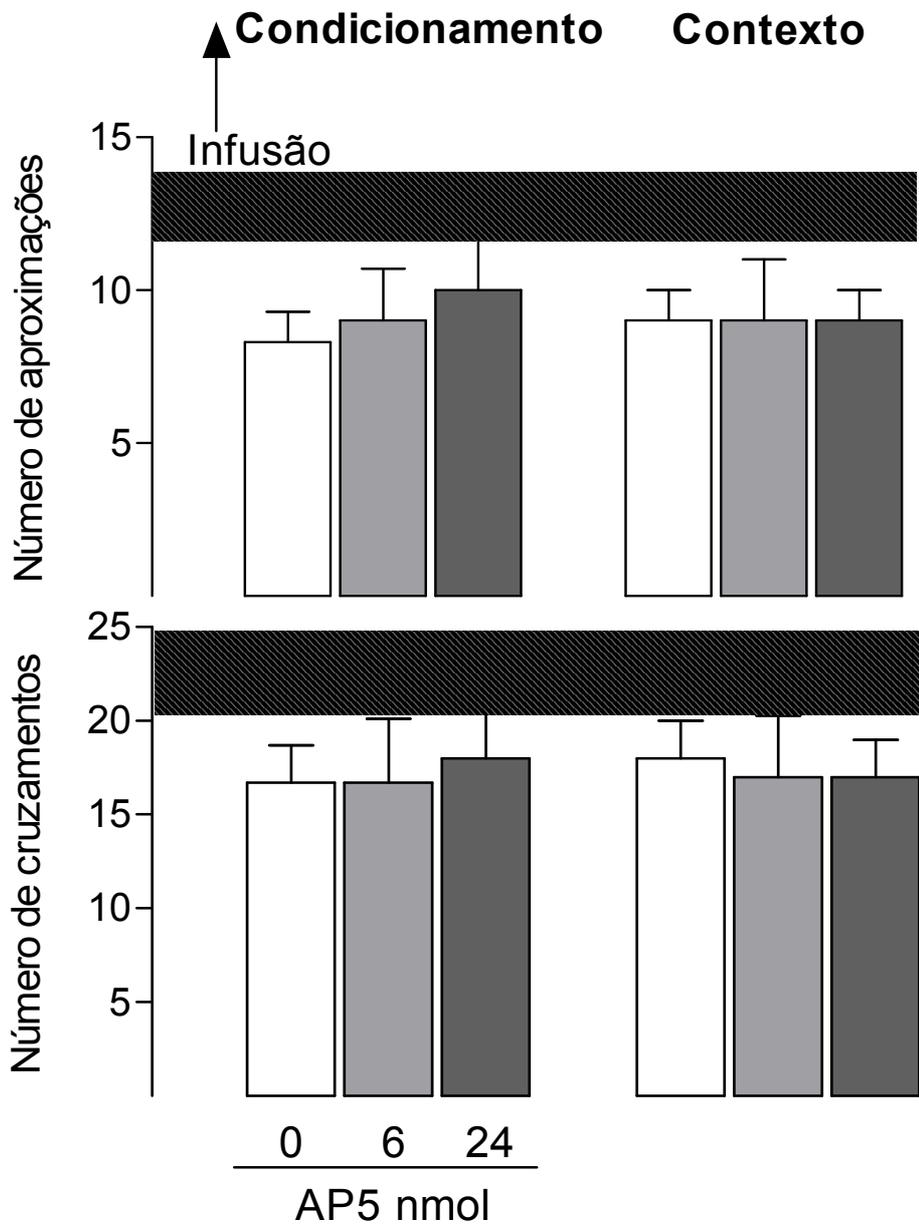


Figura 21. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo dorsal antes da exposição ao odor de gato sobre os parâmetros número de aproximações e de cruzamentos, de ratos expostos por 10 minutos ao teste odor de gato (n= 7-8 por grupo). A barra horizontal hachurada representa o intervalo de confiança 95% dos dados obtidos durante a sessão familiarização. Os dados da sessão condicionamento e contexto estão representados como média \pm EPM. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls.

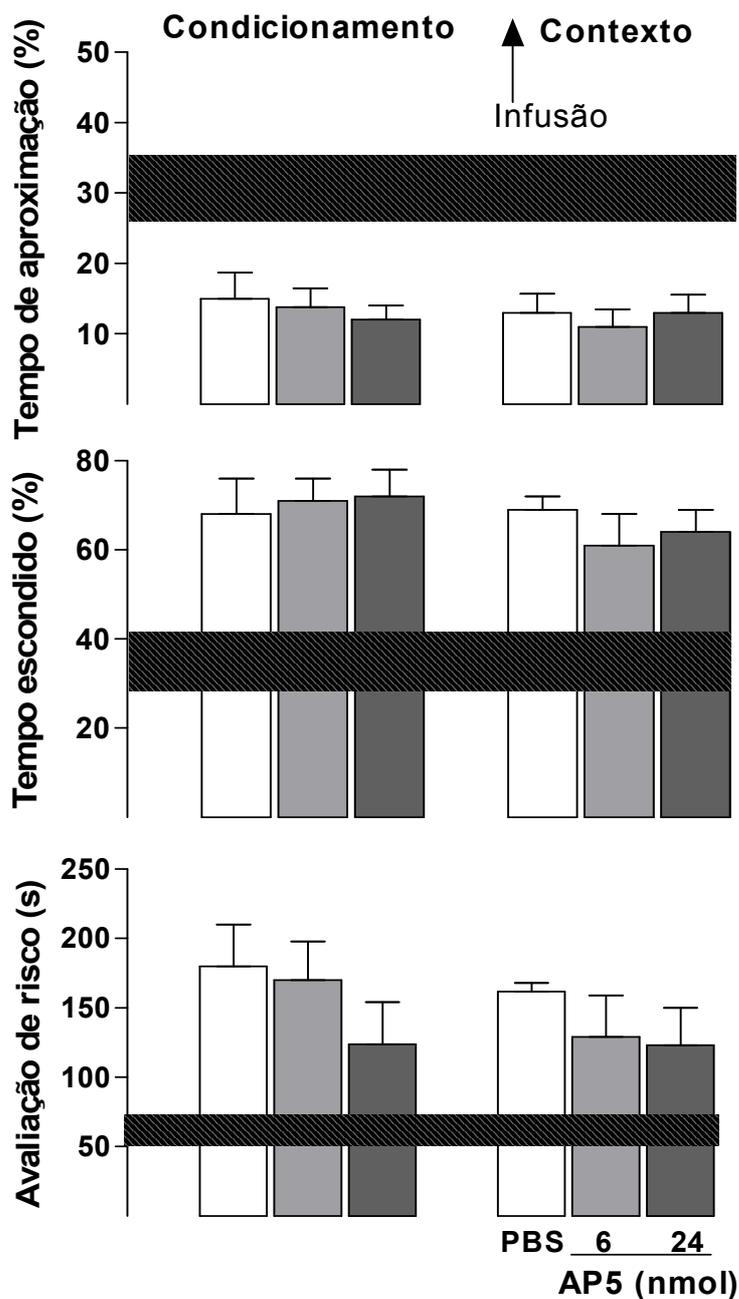


Figura 22. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo dorsal antes da exposição ao contexto sobre os parâmetros tempo de aproximação, tempo escondido e avaliação de risco (head-out) de ratos expostos por 10 minutos ao teste do odor de gato (n= 7-9 por grupo) . A barra horizontal hachurada representa o intervalo de confiança (95%) dos dados obtidos durante a sessão familiarização. Os dados da sessão condicionamento e contexto estão representados como média \pm EPM. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls.

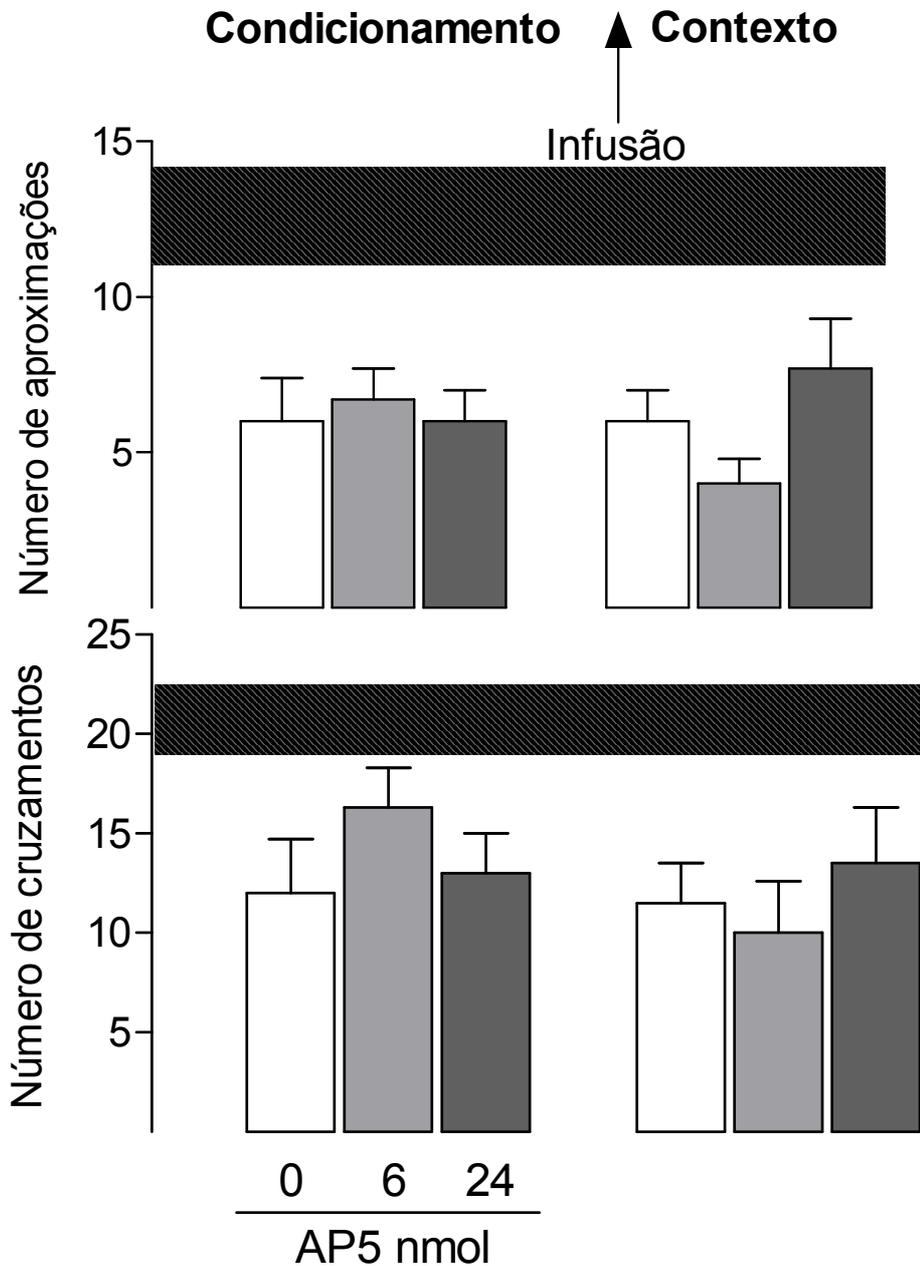


Figura 23. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo dorsal antes da exposição ao contexto sobre os parâmetros número de aproximações e de cruzamentos de ratos expostos por 10 minutos ao teste odor de gato (n= 7-9 por grupo). A barra horizontal hachurada representa o intervalo de confiança (95%) dos dados obtidos durante a sessão familiarização. Os dados da sessão condicionamento e contexto estão representados como média \pm EPM. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls.

4.4. Experimento 3.1. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral e dorsal sobre aprendizado e memória de ratos submetidos à tarefa de esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma.

Hipocampo ventral

Para avaliação do efeito da infusão de AP5 no HPC ventral, antes e após o treino e antes do teste, na tarefa de esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma, um total de 91 ratos foram utilizados.

A Figura 24 representa o efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no HPC ventral, antes do treino, após o treino e antes do teste sobre aquisição, consolidação e evocação, respectivamente, da memória aversiva da tarefa de esQUIVA inibitória. A ANOVA não revelou efeito significativo entre os animais que receberam a infusão de AP5 ou PBS, antes e após o treino ou antes do teste, na latência de descida da plataforma avaliada na sessão teste. Em resumo, estes resultados mostram que a infusão de AP5 no HPC ventral não afetou a aquisição, consolidação e evocação da memória da tarefa de esQUIVA inibitória.

Hipocampo dorsal

Para avaliação do efeito da infusão de AP5 no HPC dorsal, antes e após o treino e antes do teste, na tarefa de esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma, um total de 84 ratos foram utilizados.

A Figura 25 representa o efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no HPC dorsal, antes do treino, após o treino e antes do teste sobre a aquisição, consolidação e evocação, respectivamente, da memória aversiva da tarefa de esQUIVA inibitória. A ANOVA revelou efeito significativo entre os animais que receberam a infusão de AP5 ou PBS antes do treino, na latência de descida da plataforma avaliada na sessão teste. A análise post hoc revelou que a infusão de AP5 somente na dose de 24 nmol no HPC dorsal, antes do treino, provocou uma redução da latência [$F(2,24) = 22,37; p < 0,00001$] de descida da plataforma durante a sessão teste quando comparada com o controle. Estes resultados indicam que a infusão de AP5 na dose de 24 nmol interferiu com a aquisição da memória aversiva.

A ANOVA revelou efeito significativo entre os animais que receberam a infusão de AP5 ou PBS, após o treino, na latência de descida da plataforma avaliada na sessão teste. A análise post hoc revelou que a infusão de AP5 somente na dose de 24 nmol no HPC dorsal, após o treino, provocou uma redução da latência [$F(2,24) = 18,02; p < 0,00001$] de descida da plataforma durante a sessão teste quando comparada com o controle. Estes resultados indicam que a infusão de AP5 na dose de 24 nmol interferiu com a consolidação da memória aversiva.

A ANOVA não revelou efeito significativo entre os animais que receberam a infusão de AP5 ou PBS, antes do teste, na latência de descida da plataforma avaliada na sessão teste. Desta forma, os resultados obtidos indicam que a infusão de AP5 no HPC dorsal não afetou a evocação da memória aversiva.

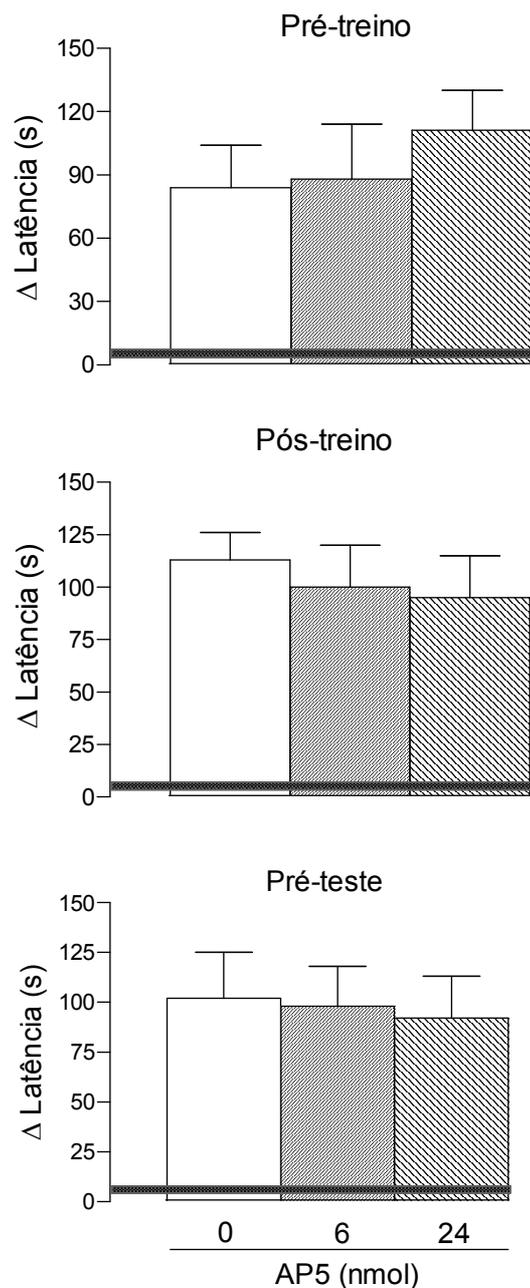


Figura 24. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral, antes do treino (painel superior), após o treino (painel intermediário) e antes do teste (painel inferior) de ratos submetidos à tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA (n= 8-12 por grupo). A barra horizontal hachurada representa o intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante a sessão de treino (latência). As barras verticais compreendem média \pm EPM da diferença do tempo de latência de descida da plataforma entre o teste e o treino (Δ latência). ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls.

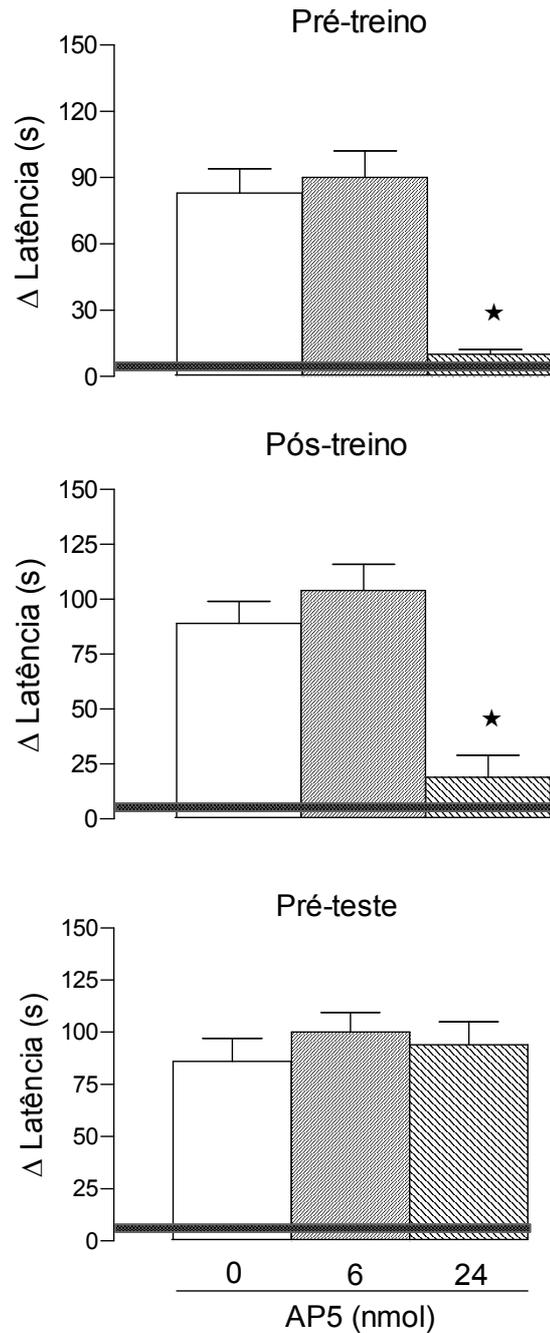


Figura 25. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo dorsal, antes do treino (painel superior), após o treino (painel intermediário) e antes do teste (painel inferior) de ratos expostos à tarefa de esquila inibitória (n= 8-11 por grupo). A barra horizontal hachurada representa o intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante a sessão de treino (latência). As barras verticais compreendem média \pm EPM da diferença do tempo de latência de descida da plataforma entre o teste e o treino (Δ latência). ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo controle.

4.5. Experimento 3.2. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral sobre consolidação da memória de ratos familiarizados com o aparato da tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.

Para a avaliação do efeito da infusão de AP5 no HPC ventral, após o treino, de ratos pré-expostos ao aparato da tarefa de esquiva inibitória, um total de 23 ratos foi utilizado. A Figura 26 representa o efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no HPC ventral nestas condições.

A ANOVA revelou efeito significativo entre os animais que receberam a infusão de AP5 ou PBS após o treino, na latência de descida da plataforma avaliada na sessão teste, em ratos familiarizados com o aparato da tarefa antes da sessão treino. A análise post hoc revelou que a infusão de AP5 somente na dose de 24 nmol no HPC ventral, após o treino, provocou uma redução da latência [$F(2,20) = 8,29$; $p < 0,01$] de descida da plataforma durante a sessão teste quando comparada com o controle. Estes resultados indicam que a infusão de AP5 no HPC ventral na dose de 24 nmol interferiu com a consolidação da memória aversiva de ratos familiarizados com o aparato da tarefa.

Em resumo, os resultados obtidos na tarefa de esquiva inibitória do tipo step down mostram que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no HPC dorsal, mas não no HPC ventral, antes e após o treino, afetou a aquisição e consolidação da memória aversiva, respectivamente. Entretanto, este bloqueio no HPC ventral ou dorsal, antes do teste, não interferiu com a evocação da memória de esquiva inibitória. Além disso, a infusão de AP5 no

HPC ventral, após o treino, interferiu com a consolidação da memória aversiva de ratos familiarizados com o aparato da tarefa de esQUIVA inibitória.

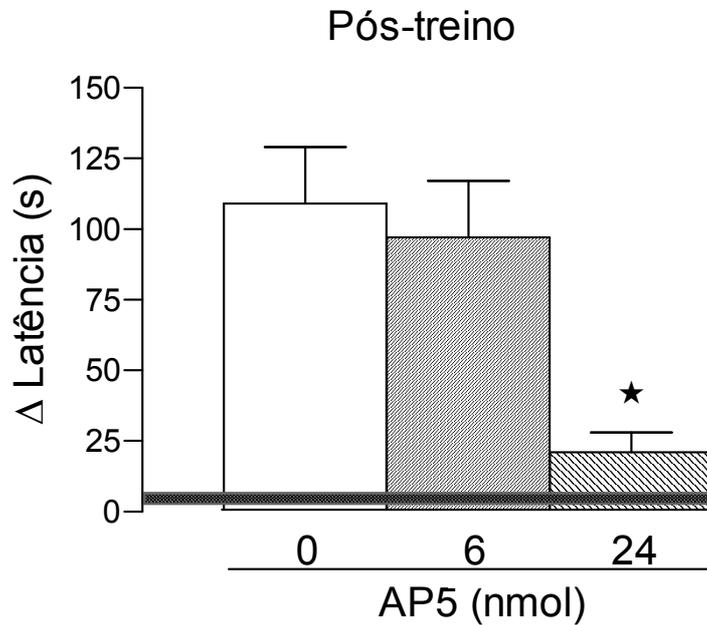


Figura 26. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral, após o treino, sobre consolidação da memória de ratos familiarizados 24 horas antes do treino com a tarefa de esQUIVA inibitória (n= 7-8 por grupo). A barra horizontal hachurada representa o intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante a sessão de treino (latência). As barras verticais compreendem média \pm EPM da diferença do tempo de latência de descida da plataforma entre o teste e o treino (Δ latência). ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo controle.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo confirmaram a primeira hipótese formulada evidenciando a participação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA ao longo do eixo dorso-ventral do HPC na mediação de aspectos emocionais e cognitivos do comportamento defensivo. Estes resultados também sustentam a segunda hipótese formulada, pois foi mostrado que os receptores NMDA do HPC ventral e dorsal desempenham um papel funcional distinto na mediação de aspectos emocionais e cognitivos do comportamento defensivo.

Neste sentido, as evidências que sustentam estas hipóteses são decorrentes dos efeitos obtidos com a infusão de AP5 no HPC ventral, cujo resultado mostrou a participação dos receptores NMDA desta região sobre os aspectos emocionais, mas não cognitivos, do comportamento defensivo de ratos expostos ao LCE. Por outro lado, a infusão de AP5 no HPC dorsal, não interferiu com estes aspectos, quando os ratos foram submetidos às mesmas condições experimentais. Em concordância com as hipóteses estão as evidências obtidas no teste do odor de gato, cuja infusão de AP5 no HPC ventral, antes da exposição a este estímulo, provocou redução da resposta defensiva e prejudicou a aquisição do medo condicionado contextual. Por outro lado, a infusão de AP5 no HPC ventral, antes do contexto, 24 horas após a exposição ao odor de gato, não interferiu com a expressão da resposta defensiva exibida pelo rato. Além disso, infusão de AP5 no HPC dorsal, antes do odor de gato ou antes do contexto, não interferiu com o comportamento defensivo. Também de acordo com as hipóteses propostas, estão as

evidências obtidas no teste da esQUIVA inibitória, cuja infusão de AP5 no HPC dorsal, antes e após o treino, prejudicou a aquisição e consolidação da resposta de esQUIVA, porém não interferiu com a expressão desta resposta quando foi administrado antes do teste. Além disso, a infusão de AP5 no HPC ventral, antes e após o treino e antes do teste, não interferiu com a aquisição, consolidação e evocação da resposta de esQUIVA, mas interferiu com o processo de consolidação quando os ratos foram familiarizados previamente ao treino.

Os resultados obtidos no LCE mostraram que o bloqueio dos receptores NMDA do HPC ventral, após a infusão de AP5 nas doses de 6 e 24 nmol, antes do teste, interferiu com os aspectos emocionais do comportamento defensivo. Entretanto, a infusão de AP5 no HPC ventral, antes do teste, imediatamente após o teste ou antes do reteste, não interferiu com a aquisição, consolidação e evocação, respectivamente, da resposta de esQUIVA exibida pelos ratos durante o reteste. Quanto aos resultados obtidos com a infusão de AP5 no HPC dorsal, foi verificado que o bloqueio dos receptores NMDA nesta região não interferiu com aspectos emocionais e cognitivos do comportamento defensivo. Desta forma, estes resultados permitem identificar o hipocampo ventral como um substrato neural envolvido com a resposta defensiva e estão em acordo com os resultados obtidos em estudos usando técnicas de lesão e avaliados em diferentes modelos de ansiedade (Bannerman et al., 2002; Kjelstrup et al., 2002; Bannerman et al., 2003; Degroot e Treit, 2004; McHugh et al., 2004; Trivedi e Coover, 2004; Petkowski et al., 2006) e com os resultados obtidos com a infusão de lidocaína ou do agonista do receptor 5HT1A em roedores

submetidos ao teste do LCE (Bertoglio et al, 2006; Nunes-de-Souza et al., 2002).

Apesar de não representar a principal utilização do LCE, alguns estudos têm usado este aparato como modelo de aprendizagem e memória, com base na observação de que uma primeira exposição ao aparato gera uma resposta de esquiva aumentada aos braços abertos do LCE (para revisão ver Carobrez e Bertoglio, 2005). Assim, no presente estudo, o perfil comportamental exibido pelos animais dos grupos controles do HPC ventral e dorsal na sessão reteste estão de acordo com os relatos da literatura, que mostraram que a experiência prévia no LCE promove uma redução gradual da atividade exploratória nos braços abertos, que se inicia durante o teste e se intensifica no reteste, caracterizando a aquisição da resposta de esquiva aos braços abertos do LCE (Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2000). Esta resposta de esquiva, adotada pelo animal ao longo dos cinco minutos de exploração no teste e expressada mais intensamente na sessão reteste, não é acompanhada por alterações no número de entradas nos braços fechados, que se mantêm constante nas duas sessões e representa um índice da atividade locomotora dos animais e uma evidência contra uma possível habituação locomotora (Cruz et al., 1994; Rodgers e Johnson, 1995).

Assim, embora no presente estudo tenha ficado evidente a participação dos receptores NMDA do HPC ventral na mediação do aspecto emocional do comportamento defensivo, outros estudos envolvendo esta mesma tarefa têm implicado a participação de outras estruturas neurais relacionadas com o aspecto cognitivo da resposta defensiva. Assim, tem sido relatado que experimentos usando inativação reversível, com lidocaína, da amígdala

basolateral após o teste (File et al., 1998) e da SCPd e do hipotálamo dorsomedial antes do reteste (File et al., 1999; Bertoglio et al., 2005) restabelece o efeito ansiolítico de benzodiazepínicos administrados sistemicamente, sugerindo assim o envolvimento da amígdala basolateral na consolidação e da SCPd e hipotálamo dorsomedial na evocação da resposta defensiva. Por outro lado, a inativação com lidocaína do HPC dorsal, mas não do HPC ventral, antes do reteste, interferiu com a expressão da resposta de esquiva no LCE (Bertoglio et al., 2006). Desta forma, embora os resultados do presente estudo não tenham implicado a participação dos receptores NMDA do hipocampo dorsal na expressão da resposta de esquiva no reteste do LCE, não pode ser excluído o envolvimento do HPC dorsal nesse processo, uma vez que a infusão de lidocaína reduziu a resposta de esquiva (Bertoglio et al., 2006). Neste sentido, é possível que outro tipo de receptor glutamatérgico, sistema de neurotransmissão ou fibras de passagem possam mediar este efeito. Além disso, estas evidências sugerem que diferentes estruturas neurais estejam envolvidas com os aspectos emocionais e cognitivos do comportamento defensivo de ratos submetidos ao teste e reteste do LCE.

Embora evidências tenham destacado o papel do hipocampo ventral e da amígdala no comportamento defensivo relacionado com ansiedade e medo, comparações entre os efeitos de manipulações farmacológicas realizadas nestas duas estruturas têm revelado efeitos diferentes no teste do LCE. Assim, tem sido proposto que a amígdala não é crucial para o desempenho do animal durante este teste, visto que nenhum dos parâmetros tradicionais de ansiedade foi alterado em consequência da infusão pré-teste de compostos benzodiazepínicos ou lesões realizadas nesta estrutura (Treit e Rotzinger,

1993; Gonzalez et al., 1996; McHugh et al., 2004). Por outro lado, a participação da amígdala basolateral na tarefa do LCE foi verificada através da inativação temporária desta estrutura, imediatamente após o teste, que interferiu com a consolidação da resposta de esquiva não exibida pelo animal durante o reteste (File et al, 1998). Neste sentido, é possível sugerir que o efeito obtido com a infusão de AP5 no HPC ventral sobre a resposta defensiva de ratos expostos a sessão teste do LCE, não seja resultado da interferência da amígdala sobre esta região.

O modelo do LCE baseia-se na premissa de que um ambiente novo pode gerar tanto curiosidade quanto medo, criando portanto, um típico conflito de aproximação e esquiva (Handley e Mithani, 1984; Pellow et al., 1985). Em concordância com os resultados obtidos no presente estudo, através do modelo do LCE, estão os pressupostos da teoria do SIC (Gray, 1982; Gray e McNaughton, 2000). De acordo com esta teoria, o sistema septo-hipocampal desempenha um papel importante na detecção e avaliação dos estímulos sensoriais, conferindo a sua natureza e estabelecendo o grau de conflito quando as informações são concorrentes. A função deste sistema consiste em resolver eventuais conflitos gerados nessas condições, o que requer uma tomada de decisão, dado seu valor adaptativo na relação do indivíduo com o seu ambiente. Assim, o sistema septo-hipocampal detectaria os conflitos entre tendências de aproximação e afastamento da fonte de perigo e passaria a controlar a resposta do animal por meio do SIC, acompanhado por aumento da atenção e vigilância, o que caracterizaria a ansiedade. De acordo com Gray (1982), as drogas ansiolíticas seriam capazes de diminuir a ansiedade por prejudicarem a atividade do SIC. Desta forma, os resultados obtidos com a

infusão de AP5 no HPC ventral, que provocou redução dos parâmetros tradicionais de ansiedade em ratos submetidos ao teste do LCE, estão de acordo com este pressuposto teórico.

O sistema olfatório representa uma interface entre o ambiente e o sistema nervoso central. Como resultado, o sistema olfatório de mamíferos regula múltiplas e integradas funções, tais como respostas emocionais, funções reprodutivas e comportamentos sociais (Lledo et al., 2005). Em roedores estas variedades de funções olfativas são controladas por dois sistemas sensoriais anatômica e funcionalmente distintos: o sistema olfatório principal, que permite a discriminação entre uma variedade de odores voláteis, e o sistema olfatório acessório, associado principalmente com a detecção de odores não voláteis, responsáveis pela comunicação intra ou interespecífica dos animais e denominados, respectivamente, de feromônios ou alomônios (Lledo, 2005). Os odores são detectados no epitélio olfatório principal da cavidade nasal onde sinais são gerados nos neurônios sensoriais olfatórios e transmitidos através do bulbo olfatório principal para o córtex olfatório primário que inclui o núcleo olfatório anterior, córtex piriforme, tubérculo olfatório, a região lateral da amígdala e o córtex entorrinal (Lledo et al., 2005). Além disso, a maioria dos mamíferos tem um segundo órgão sensorial olfatório chamado de vômeronasal que apresenta uma forma tubular localizada no septo nasal e contém neurônios sensoriais que mandam projeções para o bulbo olfatório acessório a partir do qual sinais são transmitidos para regiões da amígdala e hipotálamo (para revisão ver Lledo et al., 2005). A partir destas considerações fica evidente a importância das conexões neuroanatômicas do córtex entorrinal, um componente da formação hipocampal que recebe projeções do bulbo olfatório e

mantêm conexões com o giro denteado do eixo dorso-ventral do hipocampo (para revisão ver Insausti et al., 2002) e as conexões recíprocas que o HPC ventral mantém com a amígdala, uma estrutura que faz parte do sistema olfatório e também participa da modulação do comportamento defensivo (Petrovich et al., 2001).

A respeito dos resultados obtidos no modelo do odor de gato, foi verificado que a infusão de AP5 no HPC ventral, antes da exposição ao estímulo aversivo, provocou uma redução da resposta defensiva. Além disso, os animais tratados com AP5, antes da exposição ao odor de gato, não desenvolveram medo condicionado ao contexto no qual o estímulo aversivo havia sido apresentado anteriormente. Entretanto, quando a infusão de AP5 foi realizada no HPC ventral, antes do contexto, 24 horas após a exposição ao odor de gato, esta não interferiu com a expressão da resposta defensiva. O presente estudo também mostrou que a infusão de AP5 no HPC dorsal, antes da exposição ao odor de gato ou antes da exposição ao contexto, não interferiu com resposta defensiva adotada pelo rato após apresentação do estímulo aversivo. Em concordância com estes achados estão os resultados de Pentkowski e colaboradores (2006), que representam a única evidência encontrada na literatura implicando a participação do HPC ventral, mas não do HPC dorsal, na mediação da resposta defensiva de ratos expostos ao odor de gato. Assim, de acordo com este estudo, lesão prévia do HPC ventral, com ácido ibotênico, provoca redução do comportamento defensivo de ratos expostos ao odor de gato e ao contexto do condicionamento. Por outro lado, nenhuma alteração do comportamento defensivo foi detectada nos animais com lesão no HPC dorsal quando expostos às mesmas condições

experimentais. Além disso, segundo esses investigadores, a ausência de efeito nos animais com lesão no HPC ventral e expostos na presença do gato pode indicar que outros sistemas neurais estejam implicados na mediação da resposta defensiva relacionada com a presença do predador, enquanto que o HPC ventral modularia reações defensivas diante de estímulos potenciais, como o odor de gato. Desta forma, foi sugerido que o HPC ventral modularia comportamentos semelhantes à ansiedade e essa atribuição seria corroborada por estudos que mostraram que lesão no HPC ventral provoca redução do comportamento defensivo de ratos submetidos a diversos modelos de ansiedade como o LCE, a caixa claro-escuro, o teste da interação social, o campo aberto e o teste de hiponeofagia (Kjelstrup et al., 2002; Bannerman et al., 2003; McHugh et al., 2004; Trivedi e Coover, 2004).

No presente estudo, foi verificado que os grupos tratados com AP5 no HPC ventral, antes da exposição ao odor de gato, apresentaram uma resposta defensiva reduzida ao contexto do condicionamento. Este mesmo efeito foi observado em animais que receberam midazolam por via sistêmica (Dielenberg et al., 1999; Do Monte, 2006), infusão de atenolol no núcleo pré-mamilar dorsal (Do-Monte, 2006), infusão de AP5 na SCPdl rostral (De-Souza, 2007) e lesão no HPC ventral (Pentkowski et al., 2006). A redução da resposta defensiva condicionada tem sido atribuída a alguma interferência no processamento cognitivo da situação aversiva, devido possivelmente às propriedades ansiolíticas da droga, o que poderia prejudicar a aquisição ou a interpretação do evento como sendo aversivo.

O presente estudo também mostrou que o bloqueio dos receptores NMDA do HPC ventral e dorsal, antes dos animais serem expostos ao

contexto, 24 horas após o condicionamento ao odor de gato, não interferiu com a expressão da resposta defensiva condicionada. Estes resultados confirmam evidências prévias, que mostraram que ratos expostos ao odor de gato exibem respostas defensivas ao contexto onde o estímulo foi apresentado anteriormente (Blanchard et al., 1990; Dielenberg et al., 1999; Dielenberg e McGregor, 2001; Hubbard et al., 2004; Blanchard et al., 2005; Staples et al., 2005; Do-Monte, 2006; De-Souza, 2007).

Embora os resultados da sessão contexto tenham mostrado que o bloqueio dos receptores NMDA do hipocampo ventral e dorsal não interferiu com a expressão da resposta defensiva condicionada outras investigações empregando o condicionamento Pavloviano clássico e diferentes técnicas de lesões têm destacado a participação do HPC ventral e dorsal no medo condicionado contextual (Fanselow, 2000; Maren et al., 1997; Maren, 1998; Matus-Amat et al., 2004; Rudy e Matus-Amat, 2005).

Com relação aos experimentos realizados no teste de esquiva inibitória, os resultados mostraram que a infusão de AP5, somente na dose de 24 nmol e no HPC dorsal, antes ou após o treino, provocou um prejuízo na aquisição e na consolidação da resposta de esquiva. Por outro lado, a infusão de AP5 no HPC dorsal, antes do teste, não interferiu com a evocação da resposta de esquiva. Além disso, os resultados obtidos com a infusão de AP5 no HPC ventral, antes do treino, após o treino e antes do teste, revelaram que o bloqueio dos receptores NMDA desta região não interferem com a aquisição, a consolidação e a evocação do comportamento de esquiva. Considerando os efeitos obtidos com a infusão de AP5 no HPC dorsal, foi verificado que estes resultados reproduziram estudos prévios que tinham identificado a participação dos

receptores NMDA desta região na aquisição e consolidação (Izquierdo et al., 1992; 1997; Quevedo et al., 1997; Roesler et al., 1998; 2003; 2005) mas, não na expressão (Barros et al., 2000; Izquierdo et al., 2000), da memória de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória. Por outro lado, até o momento não existem evidências na literatura de estudos que tenham investigado a participação do HPC ventral na mediação da memória no teste de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.

O modelo de esquiva inibitória é um teste clássico de aprendizagem e memória cuja premissa está baseada na associação que o rato faz do contexto com o choque imediato nas patas em apenas uma sessão de treino (Izquierdo et al., 1992; Izquierdo e Medina, 1997). Todavia, tem sido mostrado que a familiarização ao aparato do treino, um dia antes da experiência com o contexto e com o choque imediato, permite o rato aprender sobre o contexto, independente da associação deste com o choque (Fanselow, 1999; Rudy e O'Reilly, 1999; Rudy et al., 2002; Malin e McGaugh, 2005). Consistente com esta visão, estudos empregando o modelo da esquiva inibitória do tipo descida da plataforma revelaram que a infusão de AP5 no HPC dorsal, imediatamente após o treino, não afetou a formação da memória de esquiva inibitória quando os ratos foram familiarizados ao aparato anteriormente (Roesler et al., 1998; 2003; 2005). Além disso, foi mostrado que a infusão de AP5 no HPC dorsal, imediatamente após a familiarização e a sessão de treino, prejudicou a consolidação da memória no teste de esquiva inibitória. Assim, de acordo com esses resultados, foi sugerido que os receptores NMDA do HPC dorsal estariam envolvidos na formação de uma representação contextual do aparato para o teste da esquiva inibitória.

A partir destas evidências, propusemos então avaliar a participação dos receptores NMDA do HPC ventral na consolidação da memória para esquiva inibitória de ratos familiarizados ao aparato do treino. Os resultados obtidos nestas condições revelaram que a infusão de AP5 no HPC ventral, imediatamente após o treino, interferiu com o processo de consolidação da memória para a tarefa de esquiva inibitória. Estes resultados são consistentes com estudos que têm sugerido que a pré-exposição ao aparato do condicionamento, antes da experiência contexto-choque imediato, é capaz de dissociar ambos os componentes aversivo e contextual que ocorrem durante uma única sessão de treino e permite identificar as estruturas neurais envolvidas no processamento destes componentes (Maren et al., 1997; Rudy e O'Reilly, 1999; Rudy et al., 2002; Malin e McGaugh, 2005; Roesler et al., 1998; 2003; 2005). Neste sentido, foi também mostrado que a infusão de AP5 no núcleo basolateral da amígdala afetou a consolidação da memória de ratos familiarizados ou não ao aparato, sugerindo que receptores do tipo NMDA presentes nesta estrutura estejam também envolvidos no processamento do componente emocional desta tarefa (Roesler et al., 2003). Assim, embora o HPC ventral e a amígdala basolateral estejam envolvidos na consolidação do componente aversivo da memória do teste de esquiva inibitória, é possível sugerir que o HPC ventral participe somente quando os componentes contextual e aversivo estiverem dissociados, enquanto que o núcleo basolateral da amígdala estaria envolvido independentemente desta dissociação.

Como mencionado anteriormente, a infusão de AP5 no HPC dorsal interferiu com a formação da resposta de esquiva de ratos submetidos ao teste de esquiva inibitória, mas não interferiu com aquisição, consolidação e

evocação desta resposta quando os ratos foram testados no LCE. Estes resultados permitem sugerir que a formação e expressão da memória aversiva de ratos expostos ao modelo do LCE, possivelmente envolvem outro tipo de receptor glutamatérgico ou outro sistema de neurotransmissão, visto que a infusão de lidocaína no HPC dorsal, administrada antes dos ratos serem submetidos ao reteste no LCE, interferiu com a evocação da resposta de esquiva (Bertoglio et al., 2006). Os resultados obtidos com o bloqueio dos receptores NMDA do HPC dorsal nos dois modelos, podem também indicar uma mediação funcional distinta desempenhada por estes receptores, possivelmente relacionada ao tipo de estímulo aversivo empregado, choque nas patas ou aversão a espaços abertos, ou ainda a aspectos específicos relacionados ao próprio modelo e protocolo experimental. Em concordância com os resultados obtidos no teste do LCE, estão os efeitos verificados no teste do odor de gato, onde foi visto que a infusão de AP5 no HPC ventral e dorsal, administrado antes do contexto, 24 horas após a exposição ao odor de gato, não interferiu com a resposta defensiva adotada pelo rato. Por outro lado, foi também mostrado que a infusão de AP5 antes dos ratos serem expostos ao odor de gato, provocou redução da resposta defensiva, verificada quando estes animais foram re-expostos ao contexto do condicionamento. Este efeito sobre a resposta defensiva condicionada pode sugerir que a droga ou o estado emocional do rato tenha prejudicado a aquisição ou interpretação do evento como aversivo e que ao ser exposto novamente ao mesmo contexto, porém sem a fonte aversiva, o animal não necessitou expressar uma resposta defensiva a esta nova situação.

Diante dos resultados obtidos com a infusão de AP5 no HPC ventral, onde foi mostrado que o bloqueio dos receptores NMDA afetou a resposta defensiva de ratos submetidos ao LCE, ao odor de gato e a esquiva inibitória com familiarização prévia, é possível sugerir que esta região esteja envolvida com a mediação dos aspectos emocionais do comportamento defensivo, independente do tipo de estímulo aversivo empregado cuja detecção pelo rato envolveu a participação de diferentes modalidades sensoriais. Várias teorias da função hipocampal consideraram esta estrutura como um todo, sem levar em conta as diferentes funções desempenhadas por este substrato neural ao longo do seu eixo dorso-ventral em mecanismos associados com o comportamento defensivo. Contudo, mais recentemente estão se acumulando evidências que permitem distinguir os papéis do hipocampo ventral e dorsal na mediação dos aspectos emocionais e cognitivos do comportamento defensivo.

Em conclusão, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que os receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do HPC ventral, mas não do HPC dorsal, estão envolvidos na mediação de aspectos emocionais do comportamento defensivo de ratos submetidos ao teste do LCE, ao odor de gato e a tarefa de esquiva inibitória com familiarização prévia ao aparato da tarefa. Os resultados sugerem também que os receptores NMDA distribuídos ao longo do eixo dorso-ventral do HPC não estão envolvidos com a mediação dos aspectos cognitivos do comportamento defensivo de ratos submetidos ao teste/reteste do LCE e ao contexto, onde odor de gato havia sido apresentado anteriormente. Os resultados sugerem ainda a participação dos receptores NMDA do HPC dorsal, mas não do HPC ventral, na mediação da memória no teste de esquiva inibitória do tipo step down. Assim, é possível sugerir uma

dissociação funcional ao longo do eixo dorso-ventral do hipocampo, implicando a participação de receptores NMDA do hipocampo ventral, mas não do hipocampo dorsal, no processamento emocional do comportamento defensivo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente trabalho permitem destacar as seguintes evidências:

- O bloqueio dos receptores NMDA do hipocampo ventral, mas não do hipocampo dorsal, reduziu o comportamento defensivo em ratos submetidos ao teste do LCE.
- O bloqueio dos receptores NMDA do hipocampo ventral e dorsal não afetou os processos de aquisição, consolidação e evocação da resposta de esquiva aos braços abertos de ratos submetidos ao teste e reteste do LCE.
- O bloqueio dos receptores NMDA do hipocampo ventral, mas não do hipocampo dorsal, reduziu o comportamento defensivo de ratos expostos ao odor de gato.
- O bloqueio dos receptores NMDA do hipocampo ventral e dorsal não afetou a expressão do medo condicionado ao contexto no qual os animais foram previamente expostos ao odor de gato.
- O bloqueio dos receptores NMDA do hipocampo dorsal, mas não do hipocampo ventral, prejudicou a aquisição e consolidação da memória no teste de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma. Este bloqueio no HPC ventral e dorsal não afetou a evocação desta memória.
- O bloqueio dos receptores NMDA do hipocampo ventral afetou a consolidação da memória no teste de esquiva inibitória em ratos familiarizados previamente ao aparato do treino.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.H., PINHEIRO, G., MOTTA, V. LANDEIRA-FERNANDEZ, J. CRUZ, A.P.M. (2004) Anxiogenic effects in the rat elevated plus-maze of 5-HT_{2c} agonists into ventral but not dorsal hippocampus. *Behavioural Pharmacology*, 15: 37-43.
- AMARAL, D.G., E, WITTER, M.P. (1995) Hippocampal formation. In: Paxinos, G. editor. *The rat nervous system*. San Diego, Academic Press.
- APFELBACH, R., BLANCHARD, C.D., BLANCHARD, R.J. (2005) The effects of predator odors in mammalian prey species: A review of field and laboratory studies. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 29: 1123-1144.
- BANNERMAN, D.M., DEACON, R.M., OFFEN, S., FRISWELL, J., GRUBB, M., RAWLINS, J.N. (2002) Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. *Behavioral Neuroscience*, 116: 884-901.
- BANNERMAN, D.M., GRUBB, M., DEACON, R.M.J., YEE, B.K., FELDON, J., RAWLINS, J.N.P. (2003) Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behavioral Brain Research*, 139: 197-213.
- BANNERMAN, D.M., RAWLINS, J.N., MCHUGH, S.B., DEACON, R.M., YEE, B.K., BAST, T., ZHANG, W.N., POTHUIZEN, H.H., FELDON, J. (2004) Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28: 273-283.

- BARROS, D.M., IZQUIERDO, L.A., MELLO E SOUZA, T., ARDENGHI, P.G., PEREIRA, P., MEDINA, J.H. & IZQUIERDO, I. (2000) Molecular signalling pathways in the cerebral are required for retrieval o one-trial avoidance learning in rats. *Behavioural Brain Research*, 114: 183-192.
- BELZUNG, C., GRIEBEL, G. (2001) Measuring normal and pathological anxiety-like behavior in mice: a review. *Behavioural Brain Research*. 125(1-2): 141-9.
- BERGINK, V., & VAN MEGEN , H.J.G.M, WESTENBERG, G.M. (2004) Glutamate and anxiety. *European Neuropsychopharmacology*, 14: 175-183.
- BERTOGLIO L.J., CAROBREZ, A.P. (2003) Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze Trial 2 in rats. *Psychopharmacology*, 170(4): 335-342.
- BERTOGLIO, L.J., CAROBREZ, A.P. (2000) Previous maze experience required to increase open arm avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behavioural Brain Review*, 108: 197-203.
- BERTOGLIO, L.J., JOCA, S.R.L., GUIMARÃES, F.S. (2006). Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 175: 183-188.
- BLANCHARD, D.C., CANTERAS, N.S., MARKHAM, C.M., PENTKOWSK, N.S., BLANCHARD, R.J. (2005) Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: Effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29: 1243–53.

- BLANCHARD, D.C., GRIEBEL, G., BLANCHARD, R.J. (2003) Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. *Progress in Neuropsychopharmacology* 27: 1177-85.
- BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C. (1989) Antipredator defense behaviors in a visible burrow system. *Journal Comparative Psychology*, 103:70-82.
- BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C. (1989a) Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Progress in Neurology Psychopharmacology Biological Psychiatry* 13:S3-S14.
- BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C. (1990) An ethoexperimental analysis of defense, fear and anxiety. In McNaughton, N. & Andrews, G. (Eds), *Anxiety*. Otago University Press, Dunedin, pp. 124-133.
- BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C., RODGERS, J. WEISS, S.M. (1989) The characterization and modeling of antipredator defense behavior. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 14:463-72.
- BLISS, T.V.P., COLLINGRIDGE, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-39.
- BRANDÃO, M.L., ANSELONI, V.Z., PANDOSSIO, J.E., DE ARAUJO, J.E., CASTILHO., V.M. (1999) Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 23: 863-875.
- CANTERAS, N.N., RIBEIRO-BARBOSA, E.R., COMOLI, E. (2001) Tracing from the dorsal premammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear response. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 25: 661-669.

- CANTERAS, N.S. (2002) The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 71:481– 491.
- CANTERAS, N.S., CHIAVEGATTO,S., RIBEIRO DO VALLE, L.E., SWANSON, L.W. (1997) Reduction of Rat Defensive Behavior to a Predator by Discrete Hypothalamic Chemical Lesions. *Brain Research Bulletin*, 44(3):297–305.
- CAROBREZ, A.P. (1987) Excitatory amino acid mediation of the defense reaction. In: Brandão ML (Ed) *Neuroscience and Behavior*. Vitória: UFES, 21-29.
- CAROBREZ, A.P. (2003) Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 25(2):52-58.
- CAROBREZ, A.P., BERTOGLIO, L.J. (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 29(8):193-205.
- CAROBREZ, A.P., TEIXEIRA, K.V., GRAEFF, F.G. (2001) Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25: 697-709.
- COHEN, H., BENJAMIN, J., KAPLAN, Z., KOTLER, M. (2000) Administration of high-dose ketoconazole, an inhibitor of steroid synthesis, prevents posttraumatic anxiety in an animal model. *European Neuropsychopharmacology*, 10: 429-435.
- COLLINGRIDGE, G.L. & LESTER, R.A.J. (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacology Review*, 40: 143-210.

- CORBETT R., DUNN, R.W. (1991) Effects of HA-966 on conflict, social interaction, and plus maze behaviors. *Drug Development Research*, 24: 201-205.
- CRUZ, A.P.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. (1994) Ethopharmacology analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 49(1): 171-176.
- DE-SOUZA, R.R. (2007) Dupla dissociação da função dos receptores NMDA da substância cinzenta periaquedutal rostral e caudal no medo inato e condicionado ao odor de gato. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- DIELENBERG, R.A. & MC GREGOR, I.S. (2001) Defensive behaviour in rats towards predatory odors: a review; *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25: 597-609.
- DIELENBERG, R.A., ARNOLD, J.C., MCGREGOR, I.S. (1999) Low-dose midazolam attenuates predatory odor avoidance in rats. *Pharmacology Biochemistry Behavioral*, 62:197-201.
- DIELENBERG, R.A., CARRIVE, P., MCGREGOR, I.S. (2001a) The cardiovascular and behavioral response to cat odor in rats: unconditioned and conditioned effects. *Brain Research*, 897 (1-2):228-37.
- DO-MONTE, F.H.M. (2006) Participação do receptor beta-adrenérgico na modulação do comportamento defensivo de ratos expostos ao odor de gato. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- DUNN, R.W., CORBETT, R., FIELDING, S. (1989) Effects of 5-HT_{1a} receptor and NMDA receptor antagonists in the social interaction test and the elevated plus-maze. *European Journal Pharmacology*, 169: 1-10.
- EICHENBAUM, H., OTTO, T., COHEN, N.J. (1994) Two functional components of the hippocampal memory system. *Behavioral and Brain Sciences*, 17: 449-517.
- FANSELOW, M.S. (1999) Learning theory and neuropsychology: Configuring their disparate elements in the hippocampus. *Journal of Experimental Psychology Animal Behavior Processes*, 25: 275-283
- FANSELOW, M.S. (2000) Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 110: 73-81
- FILE, S.E., GONZALEZ, L.E., GALLANT R (1998). Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology*, 19: 397-405
- FILE, S.E., GONZALEZ, L.E., GALLANT, R. (1999) Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. *Neuropsychopharmacology*, 21: 312-320.
- FILE, S.E., ZANGROSSI JR., H., SANDERS, F.L., MABBUTT, P.S. (1993) Dissociation between behavioral and corticosterone responses on repeated exposures to cat odor. *Physiology Behavioral*, 54:1109–11.
- GONZALEZ, L.E.; ANDREWS, N.; & FILE, S.E. (1996) 5HT_{1A} and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. *Brain Research*, 732: 145-153.

- GRAEFF, F.G. (1981) Minor tranquilizers and brain defense system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 14: 239-265.
- GRAEFF, F.G. (1990) Brain defense systems and anxiety. In: Roth, M.; Burrows, G.D.; Noyes, R. (eds) *Handbook of anxiety*, Vol. 3, Elsevier Science Publishes, Amsterdam, pp. 307-354.
- GRAEFF, F.G., CAROBREZ, A.P., SILVEIRA, M.C.L. (1988) Excitatory amino acids and the brain aversive system. In: Cavalleiro EA, Lehmann J, Turski, L (eds). *Neurology and Neurobiology*, vol 46. *Frontiers in excitatory amino acids research*. New York: Liss, p. 325-332.
- GRAEFF, F.G., GUIMARÃES, F.S. (2001) *Fundamentos de Psicofarmacologia*. Atheneu: São Paulo.
- GRAY, J.A. (1982) *The neuropsychology of anxiety: an inquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. Oxford University Press, Oxford.
- GRAY, J.A., MCNAUGHTON, N. (2000) *The Neuropsychology of Anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system* (2nd ed.) New York: Oxford University Press.
- GUIMARAES, F.S., CAROBREZ, A.P., DE AGUIAR, J.C., GRAEFF, F.G. (1991) Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology*, 103, 91-94.
- HANDLEY, S.L., MITHANI, S. (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacology.*, 327, 1-5.

- HOLLMANN, M. & HEINEMANN, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annual Review Neuroscience*, 17: 31-108.
- HOLMES, A., RODGERS, R.J. (1998) Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for qualitative shift in emotional state? *Pharmacology Biochemistry Behavioral*, 60: 473-488.
- HUBBARD, D.; BLANCHARD, D.C.; YANG, M.; MARKHAM, C.M.; GERVACIO, A.; CHUN-I, L.; BLANCHARD, R.J. (2004) Development of defensive behavior and conditioning to cat odor in the rat. *Physiology Behavioral*, 80 (4): 525-30.
- IZQUIERDO, I., & MEDINA, J.H. (1997) Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning Memory*, 68: 285-316.
- IZQUIERDO, I., DA CUNHA, C., ROSAT, R., JERUSALINSKY, D., FERREIRA, M.B.C., & MEDINA, J.H. (1992) Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdale, medial septum and hippocampus of the rat. *Behavioral and Neural Biology*, 58: 16-26.
- IZQUIERDO, L.A., BARROS, D.M., ARDENGHI, P.G., PEREIRA, P., RODRIGUES, C. CHOI, H., MEDINA, J.H., & IZQUIERDO, I. (2000) Different hippocampal molecular requirements for short- and long-term retrieval of one-trial avoidance learning. *Behavioural Brain Research*, 111: 93-98.
- KEHNE, J.H., MCCLOSKEY, T.C., BARON, B.M., CHI, E.M., HARRISON, B.L., WHITTEN, J.P., PALFREYMAN, M.G. (1991) NMDA receptor complex antagonists have potential anxiolytic effects as measured with separation-induced ultrasonic vocalizations. *European Journal Pharmacology Science*,

14: 20-25.

KJELSTRUP, K.G., TUVNES, F.A., STEFFENACH, H.A., MURISON, R., MOSER, E.I., MOSER, M.B. (2002) Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 10825-10830.

LEDOUX, J.E. (2000) Emotion circuits in the brain. *Annual Review Neuroscience*, 23: 155-184.

LEESON, P.D., & IVERSEN, L.L. (1994) The glycine site on the NMDA receptors: structure activity relationships and therapeutic potencial. *Journal Medical Chemistry*, 37: 4053-4067.

LENT, ROBERTO. ((2004) Cem bilhões de neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência. São Paulo. Atheneu.

LLEDO, P.M., GHEUSI, GILLES., VINCENT, J.D. (2005) Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiology Review*, 85:281-317.

LUJÁN, R., SHIGEMOTO, R., LÓPEZ-BENDITO, G. (2005) Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience*, 130: 567-580.

MALIN, E.L., & MCGAUGH, J.L. (2005) Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 1959-1963.

- MAREN, S. (1998) Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal hippocampus, or entorhinal cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 67: 142-149.
- MAREN, S., AHARONOV, G., FANSELOW, M.S. (1997) Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning. *Behavioural Brain Research*, 88: 261-274.
- MATUS-AMAT, P; HIGGINS, E.A.; BARRIENTOS, R.M., & RUDY, J.W. (2004) The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. *Journal of Neuroscience*, 24: 2431-2439.
- MCHUGH, S.B., DEACON, R.M.J., RAWLINS, J.N.P., BANNERMAN, D.M. (2004) Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behavioral Neuroscience*, 118: 63-78.
- MELDRUM, B.S. (1985) Possible therapeutic applications of antagonists of excitatory amino acid neurotransmitters. *Clinical Science*, 68: 113-122.
- MOLCHONOV, M.L. & GUIMARÃES, F.S. (2002) Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 160 (1): 30-38.
- MONAGHAN, D.T., BRIDGES, R.J., COTMAN, C.W. (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annual Review Pharmacology Toxicology*, 29: 365-402.
- MORRIS, R.G.M., DAVIS, M. (1994) The role of NMDA receptors in learning and memory. In: G.L. Collingridge & J.C. Watkins (Eds.), *The NMDA receptor*, pp 340-375. Oxford: Oxford University Press.

- MOSER, M.B., MOSER, E.I. (1998) Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8: 608-619.
- NUNES-DE-SOUZA, L.R., CANTO-DE-SOUZA, A., RODGERS, R.J. (2002) Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice influence of site of injection and prior test experience. *Brain Research*, 927: 87-96.
- O'KEEFE, J., NADEL, L. (1978) *The hippocampus as cognitive map*. Oxford, University Press, Oxford.
- PANDIS, C., SOTIRIOU, E, KOUVARAS, E., ASPRODINI, E., PAPANATHANAKIS, C., & ANGELATOU, F. (2006) Differential expression of NMDA and AMPA receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus. *Neuroscience*, 140: 163-175.
- PAXINOS G., & WATSON, C. (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates* (4th ed.). New York: Academic Press.
- PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S.E., BRILEY, M. (1985) Validation of open:close arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14:149-167.
- PENTKOWSKI, N.S., BLANCHARD, D.C., LEVER, COLIN., BLANCHARD, R.J. (2006) Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *European Journal of Neuroscience*, 23: 2185-2196.
- PETROVICH, G.D., CANTERAS, N.S., SWANSON L.W. (2001) Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains hypothalamic behavior systems. *Brain Research Review*, 38: 247-289.

- PITKANEN, A. PIKKARAINEN, M., NURMINEN, N., YLINEN, A. (2000) Reciprocal connections between the amygdale and the hippocampal formation, perirhinal cortex and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann NY Acad. Sci.*, 911: 369-391.
- PRATT, J.A. (1992) The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacological therapeutics*, 55: 149-181.
- QUEVEDO, J., VIANNA, M., ZANATTA, M.S., ROESLER, R., IZQUIERDO, I., JERUSALINSKY, D., & QUILLFELDT, J.A. (1997) Involvement of mechanisms dependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the hippocampus but not in the caudate nucleus in memory. *Behavioural Pharmacology*, 8: 713-717.
- RISOLD, PY., SWANSON, L.W. (1996) Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. *Science*, 272: 1484-1486.
- RODGERS, R.J., DAVI, A. (1997) Anxiety, defense and the elevated plus-maze. *Neuroscience Biobehavioral Review*, 21: 801-810.
- RODGERS, R.J., JOHNSON, N.J.T., COLE, J.C., DEWAR, C.V., KIDD, G.R., KIMPSON, P.H. (1996) Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. *Pharmacology Biochemistry Behavioral*, 54: 41-50.
- RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J.T. (2003) Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology Biochemistry Behavioral*, 52(2): 297-303.
- ROESLER, R., REOLON, G.K., LUFT, T., MARTINS., M.R., SCHRÖDER, N., VIANNA, M.R.M., & QUEVEDO, J. (2005) NMDA receptors mediate

consolidation of contextual memory in the hippocampus after context preexposure. *Neurochemical Research*, 30: 1407-1411.

ROESLER, R., SCHRÖDER, N., VIANNA, M.R.M., QUEVEDO, J., BROMBERG, E., KAPEZINSKI, F., & FERREIRA, M.B.C. (2003) Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Research*, 975: 207-213.

ROESLER, R., VIANNA, M., SCHRÖDER, N.; FERREIRA, M.B.C.; & QUEVEDO, J. (2006) Aversive learning under different training conditions: effects of NMDA receptor blockade in area CA1 of the hippocampus. *Neurochemistry Research*, 31: 679-683.

ROESLER, R., VIANNA, M., SANT'ANNA, M.K., KUYVEN, C.R., KRUEL, A.V.C., QUEVEDO, J., & FERREIRA, M.B.C (1998) Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: protection from impairment by pre-training or pre-exposure to the task apparatus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 69: 87-91.

ROSSETTI, Z.L., CARBONI, S. (1995) Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum. *European Journal Pharmacology*, 283: 177-183.

RUDY, J.W. & MATUS-AMAT, P. (2005) The ventral hippocampus supports a memory representation of context and contextual fear conditioning: implications for a unitary function of the hippocampus. *Behavioral Neuroscience*, 119: 154-163.

- RUDY, J.W., & O'REILLY, R.C. (1999) Contextual fear conditioning conjunctive representations, pattern completion, and the hippocampus. *Behavioral Neuroscience*, 113: 867-880.
- RUDY, J.W., BARRIENTOS, R.M., & O'REILLY, R.C. (2002) Hippocampal formation supports conditioning to memory of a context. *Behavioral Neuroscience*, 116: 530-538.
- SQUIRE, L.R. (1992) Memory and the hippocampus: A synthesis of findings with rats, monkeys and humans. *Psychological Reviews*, 99: 195-231.
- SQUIRE, L.R.; STARK, C.E.L.; CLARK, R.E. (2004) The medial temporal lobe. *Annual Review Neuroscience*, 27: 279-306.
- STAPLES, L.G., HUNT, G.E., CORNNISG, J.L., MCGREGOR, I.S. (2005) Neural activation during cat odor-induced conditioned fear and trial 2 in rats. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 29: 1265-1277.
- SWANSON, L.W., COWAN, W.M. (1977) An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Journal Comparative Neurology*, 172: 49-84.
- TAKAHASHI, L. K., NAKASHIMA, B.R., HONG, H., WATANABE, K. (2005) The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neuroscience Biobehavioral Review*, 29(8):1157-67.
- TEIXEIRA, K.V., CAROBREZ, A.P. (1999) Effects of glycine or (\pm)-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*, 113: 196-203.

TRIVEDI, M.A., COOVER, G.D. (2004) Lesions of the ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze. *Neurobiology of Learning and Memory*, 81: 172-184.

WETSELL, W.O. (1996) Current concepts of excitotoxicity. *Journal Neuropathology Experimental Neurology*, 55(1): 1-13.

ZANGROSSI, H.Jr., FILE, S.E. (1992) Chlordiazepoxide reduces the generalised anxiety, but not the direct responses, of rats exposed to cat odor. *Pharmacology Biochemistry Behavioral*, 43:1195-1200.

8. APÊNDICE

Tabela 1. Efeito da infusão pré-teste, pós-teste e pré-reteste de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral sobre os parâmetros % de tempo e % entradas nos braços abertos, frequência do comportamento de avaliação de risco e frequência de entradas nos braços fechados de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE (n= 10-15 por grupo). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls. * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle (PBS).

	PBS		AP5 6 nmol		AP5 24 nmol	
	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste
Infusão Pré- teste						
Entradas braços abertos	34,5 \pm 7,2	16,6 \pm 4,5	61,1 \pm 4,3*	32,8 \pm 5,0	66,0 \pm 2,7*	30,0 \pm 3,3
Tempo braços abertos	20,7 \pm 4,8	7,3 \pm 2,5	42,0 \pm 5,3*	14,8 \pm 4,8	50,4 \pm 4,5*	13,2 \pm 2,4
Avaliação de risco	7.3 \pm 0.9	5.8 \pm 1.0	2.8 \pm 0.7*	5.6 \pm 0.5	3.7 \pm 0.7*	6.1 \pm 0.8
Entradas braços fechados	7.2 \pm 0.6	7.9 \pm 1.4	7.9 \pm 1.1	8.7 \pm 0.8	6.7 \pm 0.6	9.8 \pm 0.7
Infusão Após-teste						
Entradas braços abertos	30,0 \pm 4,9	11,0 \pm 4,1	33,0 \pm 4,2	12,0 \pm 4,3	39,7 \pm 3,8	18,7 \pm 3,6
Tempo braços abertos	15,0 \pm 3,6	2,7 \pm 1,2	17,3 \pm 3,0	2,0 \pm 0,8	20,7 \pm 3,1	3,6 \pm 0,7
Avaliação de risco	4.1 \pm 0.9	3.9 \pm 0.9	5.5 \pm 0.6	3.5 \pm 0.6	5.8 \pm 0.5	5.3 \pm 0.5
Entradas braços fechados	8.4 \pm 0.9	6.1 \pm 1.0	12.0 \pm 2.3	6.7 \pm 0.8	7.8 \pm 0.7	9.3 \pm 1.4
Infusão Pré-reteste						
Entradas braços abertos	38,0 \pm 4,4	25,0 \pm 6,3	35,1 \pm 3,7	23,0 \pm 4,8	40,0 \pm 3,4	27,2 \pm 4,5
Tempo braços abertos	21,5 \pm 5,0	10,0 \pm 3,7	15,8 \pm 3,6	6,8 \pm 1,6	19,0 \pm 2,6	7,7 \pm 1,6
Avaliação de risco	5.5 \pm 0.4	5.8 \pm 1.5	5.1 \pm 0.6	5.8 \pm 0.5	4.7 \pm 0.6	5.0 \pm 0.9
Entradas braços fechados	7.5 \pm 0.8	7.6 \pm 0.8	7.5 \pm 0.3	8.3 \pm 0.6	8.0 \pm 0.8	6.6 \pm 0.6

Tabela 2. Efeito da infusão pré-teste, pós-teste e pré-reteste de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo dorsal sobre os parâmetros % de tempo e % entradas nos braços abertos, frequência do comportamento de avaliação de risco e frequência de entradas nos braços fechados de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE (n= 8-11 por grupo). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls.

	PBS		AP5 6 nmol		AP5 24 nmol	
	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste
Infusão Pré- teste						
Entradas braços abertos	42,1 \pm 5,7	13,7 \pm 5,3	35,6 \pm 8,3	17,7 \pm 5,7	42,4 \pm 11,3	24,0 \pm 5,5
Tempo braços abertos	20,9 \pm 4,2	5,0 \pm 1,8	16,1 \pm 3,6	6,5 \pm 2,3	16,8 \pm 5,1	6,1 \pm 1,9
Avaliação de risco	6.2 \pm 1.7	4.2 \pm 0.7	4.6 \pm 1.3	5.2 \pm 0.9	6.2 \pm 1.0	6.0 \pm 1.0
Entradas braços fechados	7.4 \pm 1.1	5.4 \pm 1.0	8.7 \pm 3.5	8.3 \pm 1.0	4.5 \pm 0.9	7.8 \pm 0.9
Infusão Pós-teste						
Entradas braços abertos	32,6 \pm 5,1	21,2 \pm 5,1	28,4 \pm 1,6	20,4 \pm 2,4	35,2 \pm 3,1	23,0 \pm 4,4
Tempo braços abertos	18,0 \pm 3,8	4,0 \pm 1,0	11,5 \pm 0,7	4,7 \pm 1,3	15,0 \pm 2,4	5,4 \pm 1,2
Avaliação de risco	5.5 \pm 0.9	4.0 \pm 0.5	6.5 \pm 0.9	3.5 \pm 0.6	5.7 \pm 0.9	4.3 \pm 0.9
Entradas braços fechados	8.6 \pm 0.9	8.0 \pm 1.1	8.4 \pm 0.6	6.5 \pm 0.7	9.0 \pm 1.3	7.8 \pm 0.9
Infusão Pré-reteste						
Entradas braços abertos	23,6 \pm 3,6	12,0 \pm 5,9	31,1 \pm 5,6	9,9 \pm 5,7	31,8 \pm 3,7	15,0 \pm 8,2
Tempo braços abertos	10,4 \pm 1,6	2,0 \pm 1,3	9,4 \pm 1,9	1,6 \pm 0,9	12,3 \pm 1,4	3,5 \pm 2,0
Avaliação de risco	5.1 \pm 0.9	3.4 \pm 1.5	6.7 \pm 1.2	4.0 \pm 1.0	4.3 \pm 0.6	5.8 \pm 1.3
Entradas braços fechados	6.8 \pm 0.7	4.8 \pm 1.0	8.1 \pm 0.0	6.2 \pm 1.6	6.6 \pm 1.0	5.8 \pm 1.8

Tabela 3. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral antes da exposição ao odor de gato sobre o tempo de aproximação, tempo escondido, avaliação de risco, número de aproximações e de cruzamentos de ratos expostos por 10 minutos ao teste do odor de gato. Os dados obtidos na sessão familiarização estão representados como intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante esta sessão. Os dados obtidos durante as sessões condicionamento ao odor de gato e contexto estão representados como média ± EPM. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls * p ≤ 0.05 quando comparado ao grupo controle.

PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS	FAMILIARIZAÇÃO	CONDICIONAMENTO AO ODOR DE GATO			CONTEXTO		
		TRATAMENTOS			TRATAMENTOS		
		PBS	AP5 6	AP5 24	PBS	AP5 6	AP5 24
Tempo escondido (%)	-28,0 +38,5	73,4±3,8	52,8±8,8*	42,4±6,8*	72,4±6,1	43,2±7,7*	45,8±7,5*
Tempo aproximação (%)	-25,9 +33,2	15,2±2,8	30,8±5,5*	30,3±4,3*	13,6±3,1	35,6±5,3*	24,6±2,0*
Avaliação de risco (s)	-37,5 +61,3	185±27	84,9±19*	95,3±21*	188±38	92,5±25*	57,7±16*
Número aproximações	-11,4 +13,5	7,5±1,4	16,3±0,6*	15,1±1,2*	7,2±1,7	12,0±1,0*	15,5±2,4*
Número de cruzamentos	-20,2 +24,1	14,0±2,6	25,4±0,9*	25,0±2,1*	15,8±3,7	19,6±1,3	34,4±7,7*

Tabela 4. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral antes da exposição ao contexto sobre o tempo de aproximação, tempo escondido, avaliação de risco, número de aproximações e de cruzamentos de ratos expostos por 10 minutos ao teste do odor de gato. Os dados obtidos na sessão familiarização estão representados como intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante esta sessão. Os dados obtidos durante as sessões condicionamento ao odor de gato e contexto estão representados como média ± EPM. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls.

PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS	FAMILIARIZAÇÃO	CONDICIONAMENTO AO ODOR DE GATO			CONTEXTO		
		TRATAMENTOS			TRATAMENTOS		
		PBS	AP5 6	AP5 24	PBS	AP5 6	AP5 24
Tempo escondido (%)	-29,2 +41,0	60,7±5,5	72,4±6,1	64,2±6,0	74,0±4,1	72,2±7,6	73,6±4,6
Tempo aproximação (%)	-24,4 +31,9	16,3±2,2	15,2±3,2	17,1±3,2	15,0±2,6	13,0±3,5	11,5±2,6
Avaliação de risco (s)	-58,4 +90,3	132±33	173±30	130±33	251±35	263±67	215±21
Número aproximações	-9,48 +11,4	9,3±0,9	6,6±1,2	7,4±0,8	6,4±1,3	6,5±1,4	8,2±1,3
Número de cruzamentos	-17,0 +20,0	17,6±1,4	13,5±2,4	14,0±1,5	11,6±2,1	12,5±2,6	14,0±1,9

Tabela 5. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo dorsal antes da exposição ao odor de gato sobre o tempo de aproximação, tempo escondido, avaliação de risco, número de aproximações e de cruzamentos de ratos expostos por 10 minutos ao teste do odor de gato. Os dados obtidos na sessão familiarização estão representados como intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante esta sessão. Os dados obtidos durante as sessões condicionamento ao odor de gato e contexto estão representados como média \pm EPM. ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls.

PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS	FAMILIARIZAÇÃO	CONDICIONAMENTO AO ODOR DE GATO			CONTEXTO		
		TRATAMENTOS			TRATAMENTOS		
		PBS	AP5 6	AP5 24	PBS	AP5 6	AP5 24
Tempo escondido (%)	-30,0+40,0	69,6 \pm 4,0	62,1 \pm 5,1	62,4 \pm 6,4	70,4 \pm 4,6	64,1 \pm 9,7	63 \pm 7,3
Tempo aproximação (%)	-25,0+33,0	15,0 \pm 2,4	17,2 \pm 4,0	17,0 \pm 3,4	15,3 \pm 2,6	14,6 \pm 4,3	19,3 \pm 3,4
Avaliação de risco (s)	-48,0+86,0	201 \pm 37	161 \pm 31	128 \pm 36	161 \pm 10,3	135 \pm 35	131 \pm 31
Número aproximações	-11,8+14,6	8,2 \pm 1,0	8,9 \pm 1,7	10,1 \pm 1,9	9,0 \pm 1,0	9,0 \pm 2,0	9,1 \pm 1,2
Número de cruzamentos	-20,0+25,0	16,6 \pm 2,1	16,7 \pm 3,4	18,0 \pm 2,7	18,0 \pm 2,0	16,7 \pm 3,3	17,0 \pm 1,9

Tabela 6. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo dorsal antes da exposição ao contexto sobre o tempo de aproximação, tempo escondido, avaliação de risco, número de aproximações e de cruzamentos de ratos expostos por 10 minutos ao teste do odor de gato. Os dados obtidos na sessão familiarização estão representados como intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante esta sessão. Os dados obtidos durante as sessões condicionamento ao odor de gato e contexto estão representados como média \pm EPM. ANOVA seguida pelo teste Newman.

PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS	FAMILIARIZAÇÃO	CONDICIONAMENTO AO ODOR DE GATO			CONTEXTO		
		TRATAMENTOS			TRATAMENTOS		
		PBS	AP5 6	AP5 24	PBS	AP5 6	AP5 24
Tempo escondido (%)	-29,0+42,0	68,4 \pm 7,6	70,8 \pm 5,0	72,4 \pm 6,1	74,5 \pm 5,1	76,9 \pm 5,0	66,1 \pm 8,8
Tempo aproximação (%)	-26,0+35,0	14,9 \pm 3,7	13,8 \pm 2,6	12,0 \pm 2,1	13,0 \pm 2,7	10,7 \pm 2,4	13,0 \pm 2,6
Avaliação de risco (s)	-40,0+80,0	184 \pm 39	183 \pm 34	211 \pm 20	175 \pm 35	179 \pm 32	116,0 \pm 33
Número aproximações	-11,0+14,0	6,1 \pm 1,4	6,7 \pm 1,0	6,1 \pm 1,0	6,0 \pm 1,2	4,1 \pm 0,8	7,7 \pm 1,6
Número de cruzamentos	-19,0+23,0	12,0 \pm 2,7	16,3 \pm 1,9	13,1 \pm 1,9	11,4 \pm 2,2	10,0 \pm 2,6	13,6 \pm 2,8

Tabela 7. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral, antes do treino, após o treino e antes do teste, de ratos submetidos à tarefa de esquiwa inibitória do tipo descida da plataforma. Os dados obtidos durante a sessão de treino estão representados como o intervalo de confiança (95%) em torno da média das latências obtidas nesta sessão. Os dados obtidos durante o teste estão representados como média \pm EPM e compreendem a diferença do tempo de latência de descida da plataforma entre o teste e o treino (Δ latência). ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls.

MEDIDA/ SESSÃO	INFUSÃO PRÉ-TREINO			INFUSÃO PÓS-TREINO			INFUSÃO PRÉ-TESTE		
	TRATAMENTOS								
	PBS	AP5 6	AP5 24	PBS	AP5 6	AP5 24	PBS	AP5 6	AP5 24
Latência treino	-8 +11			-10 +13			-9 +14		
Δ Latência Teste	84 \pm 20	88 \pm 26	111 \pm 19	113 \pm 13	111 \pm 20	95 \pm 20	102 \pm 23	98 \pm 20	92 \pm 21

Tabela 8. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo dorsal, antes do treino, após o treino e antes do teste, de ratos submetidos à tarefa de esquiwa inibitória do tipo descida da plataforma. Os dados obtidos durante a sessão de treino estão representados como o intervalo de confiança (95%) em torno da média das latências obtidas nesta sessão. Os dados obtidos durante o teste estão representados como média \pm EPM e compreendem a diferença do tempo de latência de descida da plataforma entre o teste e o treino (Δ latência). ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls. * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle (PBS)

MEDIDA/ SESSÃO	INFUSÃO PRÉ-TREINO			INFUSÃO PÓS-TREINO			INFUSÃO PRÉ-TESTE		
	TRATAMENTOS								
	PBS	AP5 6	AP5 24	PBS	AP5 6	AP5 24	PBS	AP5 6	AP5 24
Latência treino	-7 +12			-7 +9			-8 +9		
Δ Latência Teste	83 \pm 11	90 \pm 13	10 \pm 2*	90 \pm 10	104 \pm 12	19 \pm 11*	86 \pm 11	100 \pm 10	94 \pm 11

Tabela 9. Efeito da infusão de AP5 (6 e 24 nmol) no hipocampo ventral, após o treino, de ratos submetidos à tarefa de esquiwa inibitória do tipo descida da plataforma e familiarizados ao aparato 24 horas antes do treino. Os dados obtidos durante a sessão de treino estão representados como o intervalo de confiança (95%) em torno da média das latências obtidas nesta sessão. Os dados obtidos durante o teste estão representados como média \pm EPM e compreendem a diferença do tempo de latência de descida da plataforma entre o teste e o treino (Δ latência). ANOVA seguida pelo teste Newman-Keuls. * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle (PBS).

MEDIDA/ SESSÃO	INFUSÃO PÓS-TREINO		
	PBS	AP5 6	AP5 24
Latência treino	-10 +14		
Δ Latência Teste	109 \pm 20	97 \pm 21	22 \pm 6,0*