

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**INATIVAÇÃO TEMPORÁRIA DO CÓRTEX PRÉ-
FRONTAL VENTROMEDIAL DE RATOS ATENUA A
ANSIEDADE E PREJUDICA A EVOCÇÃO DA
MEMÓRIA AVERSIVA**

CRISTINA APARECIDA JARK STERN

Dissertação 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 mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Leandro José Bertoglio

Florianópolis
2010

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

S839i Stern, Cristina Aparecida Jark

Inativação temporária do córtex pré-frontal ventromedial de ratos atenua a ansiedade e prejudica a evocação da memória aversiva [dissertação] / Cristina Aparecida Jark Stern ; orientador, Leandro José Bertoglio. - Florianópolis, SC, 2010.
66 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Ansiedade. 3. Memória. 4. Córtex pré-frontal ventromedial. 5. Cloreto de cobalto. I. Bertoglio, Leandro José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

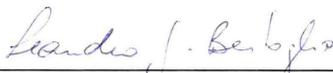
“Inativação temporária do córtex pré-frontal ventromedial atenua a ansiedade e prejudica a evocação da memória de uma experiência aversiva em ratos”

POR

CRISTINA APARECIDA JARK STERN

**Dissertação julgada e aprovada em sua
Forma final pelos membros da Banca
Examinadora, composta pelos Professores
Doutores:**

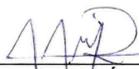
Banca Examinadora:



**Leandro José Bertoglio
Presidente – FMC/UFSC**



**Leonardo Resstel Barbosa Moraes
(USP/RP)**



**André de Ávila Ramos
(FMC/UFSC)**



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

Florianópolis, 05 de fevereiro de 2010.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Leandro José Bertoglio, pela oportunidade de realizar esse trabalho sob sua dedicada orientação e pela amizade presente durante o convívio em seu laboratório.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia que contribuíram com seus ensinamentos para a minha formação científica.

Aos professores Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes, Dr. André de Ávila Ramos e Dr. Antônio de Pádua Carobrez pela colaboração no aprimoramento deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Neuropsicofarmacologia Lucas, Rafael e Carol pelo apoio, amizade e adorável convivência e trabalho em conjunto durante estes anos.

Ao Fabrício do Monte pela colaboração na execução deste trabalho

Aos colegas do departamento Grasi, Eloisa, Ju Kroon, Cris Mochny, Thaíze, Ju Cavalli, Taiane, Fibrico, Xima, Regina, Filipe e Evelyn, pela amizade e colaboração nesse trabalho.

Às minhas amigas Jana, Vânia, Gi, Regina, Dé, Carla, Tata, Juanna, Fu, Kelly e Poli, pela grande amizade que temos.

Aos funcionários do departamento e demais colegas da pós-graduação.

Aos meus queridos pais, Carl e Carin Stern, meus amados irmãos, Cá, Ina e Carlos, pelo carinho dedicado em todos os momentos.

Ao meu amado namorado, Claudio, pelo companheirismo e apoio em todos os momentos.

À Bia, que em pensamento está sempre ao meu lado.

À minha adorada Sininho, companheira de todas as horas.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

A todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram na execução deste trabalho.

“A viagem da descoberta consiste não em achar novas paisagens, mas em ver com novos olhos”.
(Marcel Proust)

RESUMO

O córtex pré-frontal ventromedial (CPFvm) está associado com processos cognitivos e emocionais. Considerando que ansiedade e memória atuam de maneira integrada, o presente trabalho investigou os efeitos da inativação temporária do CPFvm de ratos usando como ferramenta farmacológica o cobalto, um bloqueador dos canais de cálcio, na concentração de 1 mM em dois intervalos diferentes de tempo (1 ou 10 min) entre a microinjeção e o teste ou reteste no labirinto em cruz elevado. O intervalo de tempo entre a microinjeção de cobalto e o teste/reteste foi crucial para observarmos os efeitos comportamentais da inibição do CPFvm. A inativação do CPFvm 1 min antes do teste produziu um efeito do tipo ansiolítico e 1 min antes do reteste observamos um prejuízo na expressão do aprendizado aversivo adquirido no teste. Estes resultados sugerem que o CPFvm modula a ansiedade e a memória relacionada à exploração de um ambiente potencialmente aversivo. A seguir, o papel dos receptores noradrenérgicos do tipo beta-1, colinérgicos do tipo muscarínicos e glutamatérgicos do tipo NMDA nos dois fenômenos supracitados foi estudado por meio do bloqueio com os respectivos antagonistas atenolol (10 nmol), escopolamina (10 nmol) e AP5 (6 nmol). A microinjeção de atenolol ou AP5 no CPFvm antes do teste produziu um efeito ansiolítico semelhante ao observado com a inativação pelo cobalto, sugerindo uma participação dos receptores beta-1 e NMDA no controle da ansiedade, enquanto que a microinjeção dos mesmos antagonistas antes do reteste não prejudicou a expressão da memória aversiva adquirida no teste. O bloqueio colinérgico não produziu nenhum efeito na ansiedade ou na expressão do aprendizado aversivo. Em conjunto, esses dados sugerem que o CPFvm é importante para a modulação da ansiedade, bem como dos componentes cognitivos relacionados à mesma. Além disso, sugere-se que nesta estrutura encefálica existam sistemas neuroquímicos distintos que controlam ansiedade e a evocação da memória aversiva.

Palavras-chave: Córtex pré-frontal ventromedial, cloreto de cobalto, ansiedade, memória aversiva

ABSTRACT

The ventromedial prefrontal cortex (vmPFC) has been associated with emotional and cognitive processes. Since anxiety and memory work in an articulated manner, the present work aimed to study the effects of temporary vmPFC inactivation with cobalt chloride (1.0 nM), a calcium channel blocker, at two intervals between injections and behavioral testing on the test/retest elevated plus-maze (EPM) protocol. The interval between cobalt injection and test/retest was crucial. vmPFC inactivation 1 min before test produced an anxiolytic-like effect and 1 min before retest, an impairment in the expression of the aversive memory acquired during testing. These findings suggest a vmPFC role in regulating anxiety and the aversive memory acquired during the exposure to a potentially threatening situation. After that, we investigated the noradrenergic beta-1, cholinergic muscarinic and glutamatergic NMDA receptors` role in the aforementioned phenomena, through their blockade with atenolol (10 nmol), scopolamine (10 nmol) or AP5 (6 nmol), respectively. Atenolol or AP5 microinjection into the vmPFC before EPM test produced an anxiolytic-like effect similar to that observed with cobalt inactivation, implicating beta-1 and NMDA receptors in anxiety modulation, while the same antagonists did not produce any effects on aversive memory retrieval. At the dose tested, the cholinergic antagonist did not produce any effects on anxiety and aversive memory expression. In summary, the vmPFC is a critical region regulating anxiety and anxiety-related cognitive behavior, however, the neurochemical mechanisms controlling the two processes appear to be distinct.

Key-words: ventromedial prefrontal cortex, cobalt chloride, anxiety, aversive memory

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo dos níveis de ansiedade em relação ao desempenho do organismo.....	3
Figura 2. O córtex pré-frontal em seis espécies de mamíferos.....	7
Figura 3. Corte sagital esquemático das principais projeções do vmCPF.....	8
Figura 4. Esquema do procedimento utilizado para a avaliação dos grupos tratados com PBS ou cobalto 1 ou 10 min antes do teste do LCE.....	21
Figura 5. Esquema do procedimento utilizado para a avaliação dos grupos tratados com PBS ou cobalto imediatamente após o teste do LCE.....	23
Figura 6. Esquema do procedimento utilizado para a avaliação dos grupos tratados com PBS ou cobalto 1 ou 10 min antes do reteste do LCE.....	24
Figura 7. Esquema do procedimento utilizado para a avaliação dos grupos tratados com PBS, ATE, ESC ou AP5 10 min antes do teste ou do reteste do LCE.....	25
Figura 8. Fotomicrografia dos sítios de injeção no córtex pré-frontal ventromedial.....	30
Figura 9. Avaliação do efeito da microinjeção de cloreto de cobalto no córtex pré-frontal ventromedial nos comportamentos de ansiedade.....	32
Figura 10. Avaliação do efeito da microinjeção de cloreto de cobalto no córtex pré-frontal ventromedial na evocação da memória aprendida.....	38
Figura 11. Avaliação do efeito da microinjeção de atenolol, escopolamina e AP5 no córtex pré-frontal ventro medial nos comportamentos de ansiedade e de memória incondicionadas.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores alcançados no reteste dos grupos que receberam veículo ou cloreto de cobalto antes do teste.....	34
Tabela 2. Valores alcançados no teste e no reteste dos grupos que receberam veículo ou cloreto de cobalto imediatamente após o teste.....	35
Tabela 3. Valores alcançados no reteste dos grupos que receberam veículo, atenolol, escopolamina ou AP5 antes do teste.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL – Amígdala basolateral

ATE – Atenolol

CPF – Córtex pré-frontal

CPFvm – Córtex pré-frontal ventro medial

ESC – Escopolamina

HD – Hipocampo Dorsal

HDM – Hipotálamo dorso medial

LCE – Labirinto em cruz elevado

SCP – Substância cinzenta periaquedutal

SNC – Sistema Nervoso Central

5-HT – Serotonina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O modelo do labirinto em cruz elevado como ferramenta para o estudo do componente cognitivo das emoções	3
1.2. <i>Córtex Pré-Frontal (CPF)</i>	6
1.2.1. <i>Sistema noradrenérgico e córtex pré-frontal</i>	9
1.2.2. <i>Sistema colinérgico e córtex pré-frontal</i>	11
1.2.3. <i>Sistema glutamatérgico e córtex pré-frontal</i>	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivos específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Considerações éticas	17
3.2. Animais	17
3.3. Drogas	17
3.4. Cirurgia estereotáxica	18
3.5. Microinjeção intracerebral	19
3.6. Teste Comportamental	19
3.6.1. Labirinto em cruz elevado	19
3.7. Protocolo Experimental	20
3.7.1. <i>Experimento 1: efeito da inativação temporária do CPFvm com cobalto 1 ou 10 min antes do teste do LCE</i>	20
3.7.2. <i>Experimento 2: efeito da inativação temporária do CPFvm com cobalto imediatamente após o teste do LCE</i>	22
3.7.3. <i>Experimento 3: efeito da inativação temporária do CPFvm com cobalto 1 ou 10 min antes do reteste do LCE</i>	22
3.7.4. <i>Experimento 4: Avaliação dos mecanismos neuroquímicos presentes no CPFvm envolvidos na ansiedade e memória</i>	22
3.8. Análise comportamental dos ratos submetidos ao LCE	26
3.9. Perfusão e histologia	26

3.10. Análise estatística	27
4. RESULTADOS	29
4.1. Histologia.....	29
4.2. Experimento 1: A inativação do CPFvm atenua os comportamentos relacionados à ansiedade incondicionada em ratos sem experiência prévia ao LCE.	29
4.3. Experimento 2: A inativação do CPFvm não afeta a consolidação do aprendizado aversivo adquirido no teste.....	31
4.4. Experimento 3: A inativação do CPFvm prejudica a evocação da memória aversiva em ratos com experiência prévia no LCE.....	31
4.5. Experimento 4: Mecanismos neuroquímicos distintos regulam a ansiedade e a memória no CPFvm.....	35
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

A ansiedade é uma emoção básica, essencial dentro do repertório afetivo (PEREGRINO, 1997). Os sinais da ansiedade são muito semelhantes aos do medo, embora eles sejam distintos em termos de dimensão. Em particular, o medo é caracterizado como um estado geral de apreensão a uma ameaça iminente, este estado começa de maneira rápida, requer respostas defensivas ativas e dissipa-se assim que a ameaça é retirada. Em contraste, a ansiedade é frequentemente expressa frente a estímulos menos específicos e menos previsíveis, ou por ameaças física ou psicologicamente mais distantes. A ansiedade é um estado de humor associado com maior atenção e vigilância, como resultado, pode-se definir ansiedade como um estado mais duradouro de apreensão que pode tornar-se patológico quando extremo. A divisão entre medo e ansiedade (como entidades diferentes) recebe suporte de estudos etológicos das respostas de defesa dos roedores frente a estímulos ameaçadores, os quais fornecem uma perspectiva muito útil para modelar e interpretar as respostas dos humanos às ameaças, mas em laboratório (DAVIS et al, 2009). O padrão de resposta de defesa dos roedores é determinado pela distância física entre a ameaça e o roedor (BLANCHARD et al, 1993; BOLLES & FANSELOW, 1980; FANSELOW, 1986). Quando o animal encontra-se a uma grande distância do predador, além da esquiwa, comportamentos defensivos como os de avaliação de risco são expressos. A avaliação de risco reflete um comportamento ambivalente que reflete uma tendência de aproximação/esquiwa ao ambiente ou objeto aversivo, uma resposta de conflito (GRANT & MCINTOSCH, 1963). Conforme diminui a distância, a resposta defensiva muda até os comportamentos de luta ou fuga, dessa maneira, pode-se dizer que o estado de ansiedade é possivelmente relacionado com presença mais distal ou potencial do predador, enquanto que o medo é evocado pela presença clara e iminente do predador (BLANCHARD et al, 1993). Nesse contexto, pode-se sugerir que a ansiedade possui raízes nas reações de defesa dos animais frente a estímulos ameaçadores (HETEM & GRAEFF, 1997), sendo que as mesmas são compartilhadas com os humanos, que quando expostos a situações de perigo apresentam, até certo grau, níveis protetores de ansiedade. Quando, por alguma falha na detecção da ameaça ou mesmo pela constante exposição a situações ameaçadoras, estes apresentam alterações somáticas, psicológicas e respostas

defensivas exacerbadas e/ou inapropriadas que podem prejudicar o desempenho (Fig. 1) (NESSE, 1999; GRAY & MCNAUGHTON, 2000).

Dessa maneira, sugere-se que os transtornos de ansiedade seriam causados pela resposta exagerada de defesa do organismo frente a estímulos ameaçadores. Quando a ansiedade é considerada patológica, é denominada de primária, se for a manifestação principal do quadro clínico, e de secundária se decorrer de outras enfermidades de natureza psiquiátrica ou não. Considerando que a última tende a desaparecer na medida em que a doença de origem for tratada, só se denominam de transtornos de ansiedade aqueles nos quais a ansiedade é a principal manifestação sintomatológica. Segundo a quarta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais (DSM-IV, *American Psychiatric Association*, 1994), a ansiedade patológica não é um fenômeno unitário, e sim um grupo de condições clínicas distintas, tais como o transtorno de pânico, de ansiedade generalizada, de estresse pós-traumático e fobias.

Os processos de aprendizagem e memória exercem um papel fundamental no desenvolvimento dos transtornos psiquiátricos (MILLER & MCEWEN, 2006). No caso da ansiedade, o impacto negativo da lembrança de memórias aversivas, oriundas de eventos traumáticos, na qualidade de vida, é evidente, especialmente no transtorno de estresse pós-traumático (NEMEROFF et al, 2006). As memórias aversivas relacionadas ao medo e ansiedade desenvolvem-se em estágios diferentes, que dependem de diferentes substratos neurais. A formação de uma memória aversiva duradoura depende da aquisição inicial, o primeiro estágio do aprendizado (GARAKANI et al, 2006). A consolidação ocorre em seguida e compreende a conversão da memória lábil em duradoura, um processo que depende de síntese protéica (MCGAUGH, 2000). A terceira etapa consiste na recuperação da memória aversiva, a qual envolve necessariamente a expressão de resposta comportamental (GARAKANI et al, 2006), que pode ter sido aprendida de maneira condicionada, como ocorre nos modelos de condicionamento Pavloviano, onde um estímulo neutro é associado a um estímulo biologicamente relevante e adquire a capacidade de provocar respostas defensivas, ou de maneira incondicionada, como no caso do labirinto em cruz elevado (LCE), onde a ameaça potencial (espaço aberto) não precisa de uma etapa de condicionamento para adquirir propriedades aversivas. É apropriado ressaltar que o LCE permite o estudo das etapas do aprendizado aversivo sem que seja necessária a presença de um estímulo artificial, como o choque, tão

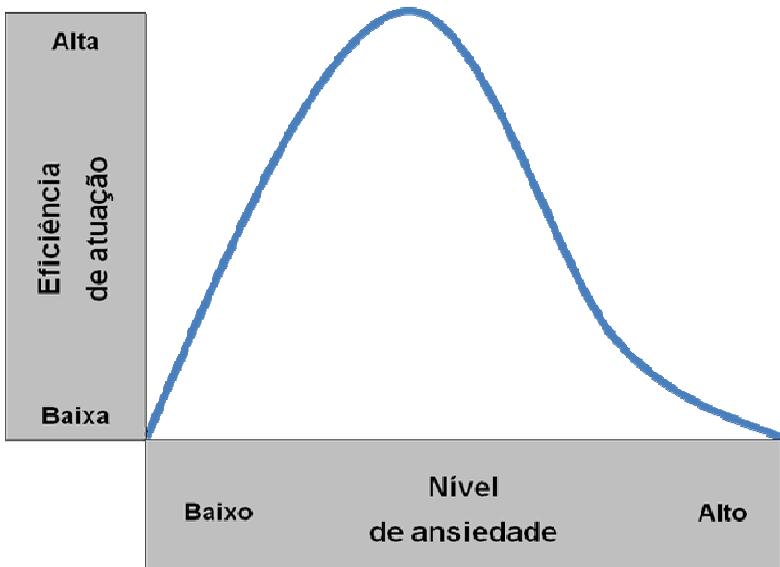


Figura 1. Curva dos níveis de ansiedade em relação ao desempenho.

comum nos modelos de condicionamento, e a avaliação dos fenômenos de ansiedade e memória no mesmo animal, embora muitos pesquisadores abordem estes processos de maneira desintegrada, ou seja, estudando o componente cognitivo ou emocional isoladamente (KALLUEFF et al, 2007).

1.1. O modelo do labirinto em cruz elevado como ferramenta para o estudo do componente cognitivo das emoções

Em 1955, Montgomery observou que ambientes altos e abertos evocam tanto comportamentos de exploração como comportamentos de medo em roedores. Quase 30 anos após, Handley & Mithani (1984), com base nessas informações, descreveram um procedimento no qual foi usado um labirinto em “X” composto por dois braços abertos e dois fechados e consideraram como uma medida de ansiedade o tempo de permanência de um animal nos braços abertos em relação aos fechados. Baseado nestes estudos, o LCE é utilizado como um modelo pré-clínico útil ao estudo das bases biológicas da ansiedade (FILE, 1992;

RODGERS & COLE, 1994; RODGERS, 1997), à triagem de novas drogas com potencial terapêutico (HANDLEY & MCBLANE, 1993) e para avaliar se as modificações genéticas do tipo transgênicas, *knock-out* ou *knock-in*, influenciam os comportamentos relacionados à ansiedade (WEISS et al, 2000; BELZUNG & GRIEBEL, 2001; CLEMENT et al, 2002). Drogas ansiolíticas reduzem o conflito aproximação-esquiva e, conseqüentemente, aumentam a porcentagem de tempo (%TA) e de entradas nos braços abertos (EA) e reduzem os comportamentos de avaliação de risco, sem alterar a atividade exploratória geral, que é representada pelo número de entradas dos braços fechados (RODGERS et al, 1995). Entre as classes de fármacos que geram efeito do tipo ansiolítico encontram-se os benzodiazepínicos, bloqueadores dos receptores α e β adrenérgicos, drogas que se ligam a sítios não benzodiazepínicos do receptor GABA_A, como etanol e barbitúricos, entre outras (HANDLEY & MITHANI, 1984; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2002; STERN et al, 2008). Entretanto, se os animais são expostos aos 5 min de teste, o efeito ansiolítico desses fármacos não mais pode ser observado em exposições subsequentes. Esse fenômeno foi observado pela primeira vez com o benzodiazepínico clordiazepóxido (LISTER, 1987) e referido como tolerância à primeira exposição (*'one trial tolerance'*). Diversas hipóteses tentam explicar como e porque esse fenômeno ocorre, dentre as quais estão a habituação locomotora, a alteração no estado do sítio de ligação ou do complexo do receptor envolvido, a sensibilização ao medo e à ansiedade experimentalmente induzida e a mudança qualitativa da natureza da resposta aversiva entre os testes de uma resposta incondicionada para esquiva aprendida, na qual os ansiolíticos seriam inefetivos (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005).

Alguns estudos utilizam o LCE partindo da premissa que aprendizado, memória e ansiedade influenciam-se mutuamente. Utilizando o protocolo do teste/reteste, é possível investigar o efeito de drogas no aprendizado aversivo ou verificar o efeito de drogas sobre a evocação da memória aversiva durante o reteste, partindo do pressuposto que um aprendizado aversivo ocorreu durante a primeira exposição ao modelo (WALL & MESSIER, 2002). Carobrez & Bertoglio (2005) sugerem que a mudança no estado emocional evocado pela exposição repetida ao LCE pode envolver diferentes estruturas cerebrais, que são recrutadas preferencialmente no teste ou reteste do LCE. De fato, estudos que avaliam a expressão de genes imediatos após a exposição ao protocolo do teste/reteste do LCE verificaram uma

expressão de proteína Fos em estruturas distintas ao longo dos desses dois dias (Albrecht-Souza et al, 2008).

A re-exposição ao LCE aumenta a esquia aos braços abertos, caracterizando a ocorrência de um aprendizado aversivo. Mesmo após 18 sessões sucessivas no LCE, as linhas de base de tempo e de entradas nos braços abertos não são modificadas, refletindo uma ação do aprendizado e não de habituação locomotora (TREIT et al, 1993), pois na ocorrência desse tipo de habituação, observaríamos uma redução no número de entradas nos braços fechados, um índice de atividade exploratória geral (RODGERS et al, 1995), fato que não é observado durante a re-exposição ao LCE. No entanto, drogas que de alguma maneira prejudicam a aquisição, consolidação ou evocação dessa memória são capazes de reverter a esquia e aumentar a exploração do LCE também no reteste (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2004; STERN et al, 2008; WALL et al, 2001).

Sabe-se, através de estudos de inativação temporária de estruturas encefálicas com lidocaína, que a inibição da amígdala basolateral (ABL) após o teste, bem como do hipotálamo dorsomedial (HDM) e da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl) antes do reteste, são capazes de reverter o fenômeno de tolerância à primeira exposição, já que, nestas condições, o benzodiazepínico midazolam aumenta a exploração dos braços abertos mesmo no reteste (FILE et al, 1998; FILE et al, 1999; BERTOGLIO et al, 2005), enquanto que apenas a inibição temporária do hipocampo dorsal (HD) antes do reteste é capaz de reverter a esquia aos braços abertos do LCE (BERTOGLIO et al, 2006). Dessa maneira, sugere-se que o fenômeno de tolerância à primeira exposição depende da integridade funcional de estruturas encefálicas como a ABL, o HDM e a SCPdl, enquanto que a evocação do aprendizado aversivo seria dependente do HD. Ainda que não seja o objetivo desse trabalho, o que permanece a ser investigado é se esse dois fenômenos ocorrem de maneira independente e em estruturas diferentes. Além disso, é possível que outras regiões específicas do cérebro também modulem a ansiedade, aprendizagem e memória (MCNAUGHTON & CORR, 2004; GARAKANI et al, 2006). Neste contexto, pode-se destacar a importância do córtex pré-frontal medial (CPF), uma vez que ele atua em consonância com a amígdala e o hipocampo (LAMPREA et al, 2000; CARVALHO et al, 2005; MILLER & MCEWEN, 2006). Porém, a função dessa estrutura nos processos que envolvem ansiedade e memórias aversivas não está totalmente esclarecida.

1.2. Córtex Pré-Frontal (CPF)

O CPF tem sido associado a diversos processos emocionais, cognitivos, atencionais, entre outros (VERTES, 2006). O CPF aumenta em volume conforme o desenvolvimento filogenético se aproxima da espécie humana (Figura 2). Cálculos baseados na citoarquitetura da estrutura mostram que o CPF corresponde a 3,5 % do total do córtex em gatos, 7 % em cachorros, 11,5 % em macacos, 17 % em chimpanzés e 29 % em humanos. A grande magnitude relativa do CPF de humanos presumidamente indica que o córtex é o substrato para funções cognitivas de ordem superior (FUSTER, 2008).

Em ratos, o CPF recebe projeções de áreas corticais sensoriais, bem como motoras e límbicas (UYLINGS & VAN EDEN, 1990) e consiste de quatro divisões principais: a área medial agranular ou medial precentral, córtex cingulado, pré-límbico e infralímbico (VERTES, 2006). O CPF medial ainda pode ser dividido na porção dorsal, a qual consiste da área medial precentral, o córtex cingulado anterior e a porção dorsal do pré-límbico, a parte ventral do pré-límbico junto com o infralímbico e o córtex orbital medial constituem o córtex pré-frontal ventromedial (CPFvm) (HEIDBREder & GROENEWEGEN, 2003). Injeções de neurotraçadores retrógrados e anterógrados mostraram uma conexão direta dessa estrutura com a substância cinzenta periaqueductal (SCP) (FLOYD et al, 2000). Além disso, o complexo amigdalóide conecta-se com o CPF como um todo, no entanto existe uma predominância de conexões, que são recíprocas, com a porção ventral do CPF, (Figura 3). As interconexões do CPFvm com a formação hipocampal, no entanto, parecem ser unidirecionais, sendo que o CPFvm recebe projeções do hipocampo, principalmente da porção CA1, mas apenas poucas fibras do CPFvm chegam na formação hipocampal (HEIDBREder & GROENEWEGEN, 2003; VERTES, 2006).

As funções do CPF no processamento de memórias de trabalho ou espacial, no modelo do labirinto aquático de Morris (GOLDMAN-RAKIC, 1996; YOON et al, 2008, MÉNDEZ-LÓPEZ et al, 2009) e de procedimentos relacionados à atenção, como em modelos de reconhecimento de objeto (AKIRAV & MAROUN, 2006; BARKER & WARBURTON, 2008) e controle autônômico (BERNSTONE et al, 1998; VERTES, 2006) estão bem documentadas. No entanto, apenas nas últimas décadas tem se olhado para o CPF como uma estrutura chave também nos processamentos emocionais. Em humanos, um funcionamento anormal do PFC tem sido correlacionado com psicopatologias incluindo esquizofrenia, sociopatia, transtorno obsessivo

compulsivo, depressão, entre outros (HEIDBREder & GROENEWEGEN, 2003).

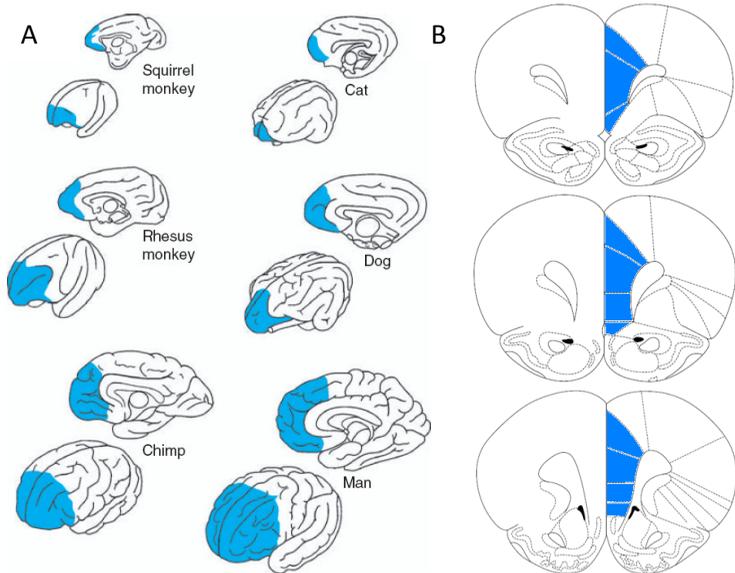


Figura 2. (A). Em azul, o córtex pré-frontal em cinco espécies de mamíferos (Adaptado de Fuster, 2008) (B). Em azul, a porção medial do córtex pré-frontal direito de ratos referentes as posições 3,7, 3,2 e 2,7 mm anteriores ao bregma (Adaptado de Paxinos & Watson, 2009)

Estudos usando lesões excitotóxicas no CPFvm de ratos mostraram um aumento na porcentagem de tempo nos braços abertos (%TA) do labirinto em cruz elevado (LCE), aumento na interação social, redução no tempo de ocultação defensiva condicionada, aumento no consumo de solução de quinino e leite no condicionamento gustatório aversivo, redução na resistência de escapar à manipulação e no tempo de esquila no labirinto em T elevado em ratos previamente estressados e não estressados e aumento na latência de fuga nos estressados (SULLIVAN & GRATTON, 2001; SHAH & TREIT, 2003; BLANCO et al, 2009). Camundongos com o mesmo tipo de lesão no CPFvm também apresentaram uma quantidade de tempo aumentada nos braços abertos do LCE (DEACON et al, 2003). Esses estudos mostram que, em diferentes paradigmas, a lesão do CPFvm atenua os comportamentos de defesa, como a esquila aos braços abertos do LCE.

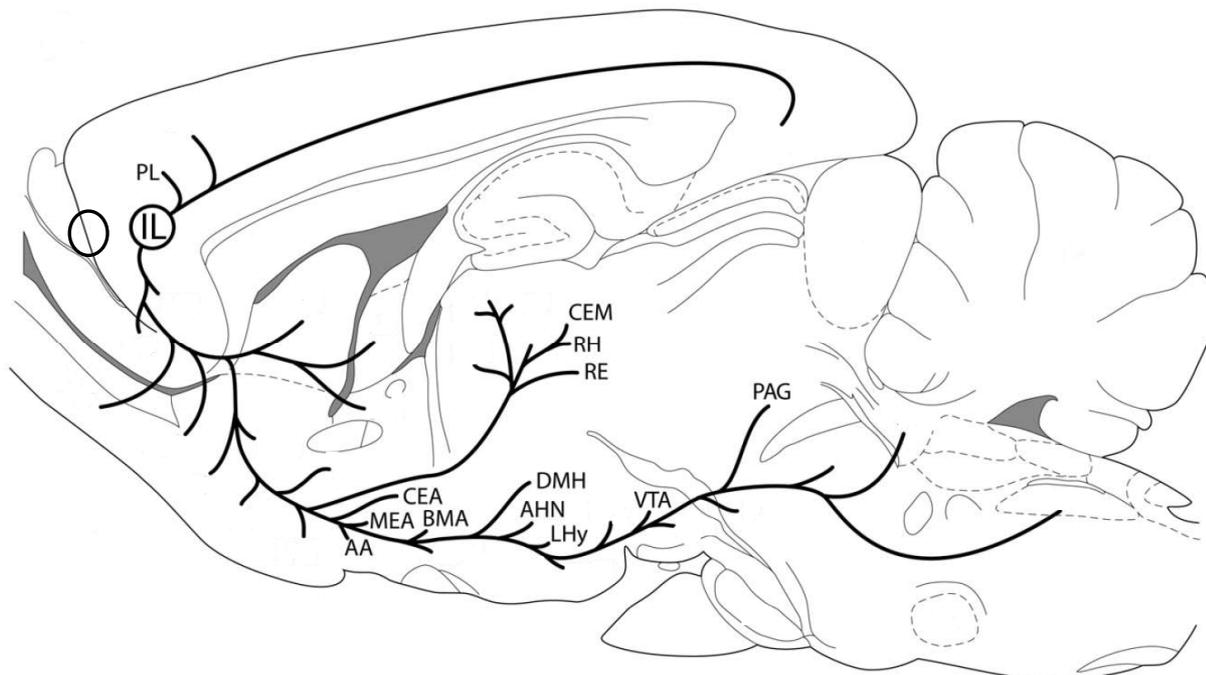


Figura 3. Corte sagital esquemático das projeções do prelímico (PL) e infralímico (IL) do CPFvm. Em destaque as projeções para estruturas límbicas como a substância cinzenta periaquedutal (PAG), área tegmental ventral (VTA), núcleos da amígdala (CEA, BMA, MEA, AA), núcleos do tálamo (RH, RE, CEM) e hipotálamo (DMH, AHN, LHy). (Adaptado de Vertes, 2006).

Para transpor os problemas causados por lesões eletrolíticas, como o bloqueio de fibras de passagem, o recrutamento de outras estruturas ou mecanismos compensatórios (SHAH & TREIT, 2004), a inativação farmacológica transitória tem sido utilizada. A microinjeção de muscimol ou midazolam, agonistas GABA_A, no CPFvm produziu um aumento na %TA no LCE e reduziu a ocultação defensiva (SHAH & TREIT, 2004; SHAH et al, 2004), enquanto que a administração de cloreto de cobalto, um bloqueador de canais de cálcio voltagem dependente, ou lidocaína, bloqueador dos canais de sódio voltagem dependente, aumentaram o número de lambidas punidas no teste de Vogel (RESSTE et al, 2006; RESSTEL et al, 2008). A inativação do CPFvm com tetrodotoxina, um bloqueador de canais de sódio, reduziu o congelamento no medo condicionado (RESSTEL et al, 2006; CORCORAN & QUIRK, 2007). Além dos achados comportamentais, estudos de imunohistoquímica mostraram que a exposição ao LCE, ao campo aberto e ao odor de gato causam um aumento na expressão de proteína Fos no CPFvm, bem como nos núcleos central e basolateral da amígdala (DUNCAN et al, 1996; ALBRECHT-SOUZA et al, 2008; STAPLES et al, 2008, TAO et al, 2009).

Grande parte dos estudos que tem por objetivo esclarecer quais as funções do CPFvm nas emoções e no componente cognitivo das mesmas utilizam como ferramenta a ablação da estrutura como um todo, seja através de inativações permanentes ou temporárias, sem refinar os resultados encontrados após esse tipo de abordagem, embora já se conheça o papel inibitório dos interneurônios GABAérgicos, algumas das funções do aminoácido excitatório glutamato nos processos cognitivos e dos neuromoduladores noradrenalina nas emoções, dopamina nos processos de dependência e neurodegeneração e acetilcolina na atenção, em diversas áreas frontais, incluindo o CPFvm.

1.2.1. Sistema noradrenérgico e córtex pré-frontal

Memórias emocionais estão associadas ao aumento da sinalização noradrenérgica via receptores do tipo beta (MCGAUGH, 2000). Evidências apontam para a participação desse sistema nos comportamentos relacionados à ansiedade. A principal via noradrenérgica para o CPF tem origem no *locus coeruleus*. As fibras noradrenérgicas *coeruleocorticais* chegam ao córtex via lobo frontal de ambos os hemisférios e formam um arco rostrocaudal dentro da matéria

cinzenta inervando outras áreas corticais (MORRISON et al, 1979; MORRISON & MAGISTRETTI, 1983; FALLON & LOUGHLIN, 1987). Rainbow e colaboradores (1984), através de estudos de autoradiografia, mostraram a presença tanto de receptores beta-1 como beta-2 no CPF medial de ratos e suas porções.

Os três tipos de receptores beta, β_1 , β_2 e β_3 , ativam a proteína G_s levando a dissociação das subunidades α e $\beta\gamma$, e a subsequente ativação da enzima adenilato ciclase, a qual leva ao aumento do segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclico (AMPC) (ORDWAY et al, 2007). O AMPC inicia uma cadeia de eventos intracelulares que promovem a amplificação do sinal e a geração da resposta celular (DE BLASI, 1990). Além de interagirem com proteína G, essa classe de receptores interage com outras proteínas e vias sinalizadoras, como as que envolvem tirosina quinases (ORDWAY et al, 2007).

Há evidências mostrando o papel da noradrenalina (NOR) na modulação das emoções. A administração de propranolol, um antagonista não-seletivo dos receptores beta, via intraperitoneal (*i.p.*) elevou a %TA em ratos expostos ao LCE e preveniu o aparecimento do fenômeno de tolerância à primeira exposição dos benzodiazepínicos, causando possivelmente um efeito amnésico. Este antagonista ainda reduziu o medo no paradigma do odor de gato e atenuou a aquisição, a consolidação e expressão do medo condicionado (DO-MONTE et al 2008; KROON & CAROBREZ, 2008; STERN et al, 2008). Rodriguez-Romaguera et al (2009) viram que a administração via *i.p.* desse antagonista reduziu a taxa de disparo de neurônios do CPF, sugerindo o CPF como um possível alvo central de ação dessa droga.

Em humanos, a administração de propranolol prejudicou a memória associada a eventos emocionais traumáticos sem interferir na memória relacionada a eventos neutros (CAHILL et al, 1994). Tópico de interesse entre pesquisadores e clínicos para o tratamento do transtorno do estresse pós-traumático nos últimos anos, a utilização dos bloqueadores beta-adrenérgicos tem sido discutida como possível intervenção terapêutica para a remissão dos sintomas deste transtorno (VAN STEGEREN, 2008).

Outros estudos mostraram que lesões nas fibras noradrenérgicas ascendentes causam déficits cognitivos, principalmente em condições que exigem atenção. Em primatas, níveis adequados de NOR no CPF são necessários para a execução de tarefas que exigem atenção seletiva ou de memória de trabalho (SARA, 2009).

O que pode ser dito, é que as funções da NOR, bem como de outros neuromoduladores, obedecem a uma curva em “U”, onde concentrações elevadas ou demasiadamente baixas são prejudiciais às funções cognitivas corticais (FUSTER, 2008).

1.2.2. Sistema colinérgico e córtex pré-frontal

Os aferentes colinérgicos para o CPFvm são, em grande parte, projeções provenientes do núcleo basal (GAYKEMA et al, 1991) e exercem papel fundamental na atenção, memória, motivação e induzem processos de ansiedade (BENINGER et al, 1992; DESOUZA et al, 1994; HASSELMO 1995; BERNSTON et al, 1998). A atividade das vias colinérgicas está aumentada frente a estímulos estressantes, e sugere-se que a hiperatividade das aferências colinérgicas para o CPF pode contribuir para os estados de ansiedade (ACQUAS et al, 1996; GIOVANINNI et al, 2001; MILLAN, 2003).

O sistema colinérgico possui duas classes de receptores: os nicotínicos, os quais medeiam respostas excitatórias rápidas e uma segunda classe, composta pelos receptores muscarínicos, que participam de respostas mais lentas, tanto excitatórias como inibitórias (FUSTER, 2008).

Os receptores muscarínicos são classificados em cinco tipos, todos acoplados à proteína G. Dentre os que exercem atividade excitatória sobre a atividade neuronal, via ativação da fosfolipase C, estão os tipos M1, M3 e M5, enquanto que M2 e M4 são inibitórios, sendo o M2, no SNC, pré-sináptico (MCKINNEY, 1993; WESS, 1996).

O sistema colinérgico é ativado em resposta a estímulos externos quando novos, mas não quando o estímulo é repetido, levando à habituação. Além disso, parece que esse sistema torna-se ativado quando tarefas que necessitam de análise de pistas que representam perigo ou oferecem recompensa é requerida (GIOVANINNI et al, 2005). Enquanto o papel da acetilcolina em muitas formas de aprendizado está bem elucidado, a função deste neuromodulador no que tange as memórias emocionais não é bem estabelecida. Bertoglio & Carobrez (2004), mostraram um aumento da exploração dos braços abertos no LCE em ratos que receberam escopolamina (*i.p.*), um antagonista dos receptores muscarínicos, acompanhado de um bloqueio da tolerância à primeira exposição no segundo dia de teste, sugerindo um efeito amnésico desse fármaco sobre a memória emocional. Em

modelos de medo condicionado, esse antagonista, quando administrado por via *i.p.*, prejudicou a aquisição do medo (KROON & CAROBREZ, 2008). A microinjeção deste mesmo antagonista, em doses altas, na porção infralímbica do CPF de camundongos, produziu um efeito do tipo ansiogênico sem prejudicar o aprendizado aversivo observado no reteste (WALL et al, 2001). Quando um antagonista M1 seletivo foi injetado no vmCPF em baixas doses, então um efeito do tipo ansiolítico foi observado no LCE, sugerindo a participação dos receptores M1 do vmCPF no controle da ansiedade (WALL et al, 2001; WALL & MESSIER, 2002).

1.2.3. Sistema glutamatérgico e córtex pré-frontal

O glutamato é o principal aminoácido excitatório do sistema nervoso central (SNC), encontrado em grandes quantidades por todo o encéfalo, principalmente na região pré-frontal, e parece ter um papel fundamental na conectividade recíproca entre hipocampo e o CPF. Há relatos mostrando níveis elevados desse neurotransmissor no CPF de ratos após estresse intenso (MOGHADDAM, 1993; FUSTER, 2008).

Existem dois grupos de receptores para o glutamato, sendo um deles composto por três tipos de receptores ionotrópicos - NMDA, AMPA e Cainato - e o outro grupo composto por cinco tipos de receptores metabotrópicos. Dentre esses, é dada grande atenção ao receptor NMDA pela série de funções que o mesmo exerce no SNC (FUSTER, 2008).

O papel desse receptor no desenvolvimento neural, plasticidade sináptica, aprendizado, memória, epilepsia, doenças neurodegenerativas, entre outros, é bastante abordado na literatura (DINGLEDINE, 1983; COTMAN & IVERSEN, 1987; COTMAN & MONAGHAN, 1988; MELDRUM, 1985; 2000). O bloqueio dos receptores NMDA afeta vários aspectos relacionados à emocionalidade, entre eles, o medo, ansiedade e depressão (BARKUS et al, 2010). Em modelos de ansiedade incondicionada, ácido 3-(2-carboxipiperazina-4il)-propil-1-fosfônico (CPP), 2-amino-5-fosfonoheptanoato (AP5) e 2-amino-7-fosfonoheptanoato (AP7), antagonistas competitivos administrados via *i.p.*, elevaram a %TA no LCE e a interação social em ratos, da mesma maneira, o antagonista não-competitivo dizocilpina (MK-801) elevou a %TA, a interação social e reduziu o conflito em testes de punição (BARKUS et al, 2010). Apesar dos resultados contraditórios em roedores, a administração de baixas doses de quetamina em humanos

reduziu a ansiedade em voluntários saudáveis (KRYSTAL et al, 1994). Refinando os estudos que envolvem a administração sistêmica de bloqueadores glutamatérgicos, muitos pesquisadores têm se dedicado a avaliar quais as bases neurobiológicas dos efeitos supracitados. A infusão de AP5 no hipocampo ventral, mas não no hipocampo dorsal, de ratos produziu uma elevação na %TA no LCE, embora a injeção de AP7 tenha elevado a %TA no LCE em ratos previamente estressados (PADOVAN et al, 2000; NASCIMENTO-HÄCKL & CAROBREZ, 2007), já na PAG dorsal, a infusão de AP5 elevou a %TA tanto em ratos com ou sem pré-exposição ao LCE (KINCHESKI & CAROBREZ, 2010).

No modelo de esquiva passiva, animais que receberam infusão de AP5 na amígdala ou no CPF medial apresentaram prejuízo na evocação dessa memória aversiva, sendo a amígdala responsável pela evocação da memória recente enquanto que o CPF medial evocaria a memória remota (LIANG et al, 1996; MELLO & SOUZA, 2000), enquanto que no CPFvm ou no CPF dorsolateral o mesmo efeito não foi observado (IZQUIERDO et al, 2007).

Conforme relatado, o CPFvm é uma região de grande relevância para os processos emocionais e cognitivos, no entanto, poucos trabalhos abordam esses dois processos de maneira integrada e, além disso, poucos pesquisadores abordam a importância do CPFvm no componente cognitivo dos comportamentos de ansiedade incondicionada, como os evocados no modelo do LCE. Baseado nas informações já descritas, esse trabalho foi delineado no intuito de investigar se a inibição temporária do CPFvm afetaria os comportamentos evocados pelos animais submetidos ao teste e reteste do LCE. A inibição temporária pela microinjeção com cobalto foi escolhida porque a maioria dos trabalhos faz uso da lesão permanente e também, para evitarmos possíveis efeitos de bloqueio de fibras de passagem e/ou mecanismos compensatórios de estruturas adjacentes. Muitos trabalhos adotam 10 min como intervalo de tempo entre a microinjeção de cobalto e a execução do teste comportamental (RESSTEL et al, 2008), no entanto, Kretz (1984) verificou que o bloqueio dos canais de cálcio por essa droga não mais existe após 9 min. Por essa razão, escolhemos dois tempos de intervalo entre a microinjeção de cobalto e o teste comportamental, 1 e 10 min. A seguir, procuramos investigar a influência do bloqueio farmacológico de alguns receptores do CPFvm sobre os comportamentos de ansiedade incondicionada e memória.

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da inibição temporária do córtex pré-frontal ventromedial, com o uso de um bloqueador de canais de cálcio, no protocolo do teste/reteste do labirinto em cruz elevado.

2.1. Objetivos específicos

- Comparar os efeitos da microinjeção de cloreto de cobalto no córtex pré-frontal ventromedial de ratos submetidos ao protocolo do teste/reteste do labirinto em cruz elevado, com intervalos de tempo entre a microinjeção e o teste comportamental de 1 ou 10 min;
- Investigar os mecanismos neuroquímicos relacionados à ansiedade e memória observados com a inativação temporária do córtex pré-frontal ventromedial no modelo do teste/reteste do labirinto em cruz elevado através da verificação do papel dos sistemas noradrenérgico, colinérgico e glutamatérgico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Considerações éticas

O presente trabalho foi realizado sob aprovação do comitê de ética para o uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (04521/2008 – 7). O número da amostra utilizado foi o mínimo suficiente para a obtenção de análises estatísticas fidedignas.

3.2. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 3-4 meses de idade e peso entre 270 e 350 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina. Durante o período de permanência no biotério, os animais foram alojados em gaiolas plásticas (15 x 36 x 30 cm), cada uma contendo de três a quatro ratos. Nesse período os animais tiveram livre acesso à água e comida. A temperatura ambiente manteve-se controlada em 23 ± 1 °C e ciclo de luz claro/escuro de 12 h, com início às 7:00 h.

3.3. Drogas

As doses utilizadas foram baseadas em trabalhos prévios da literatura (GIOVANNINI et al, 2005; DO-MONTE et al, 2008; NASCIMENTO-HÄCKL & CAROBREZ, 2007; KRETZ, 1984; RESSTEL et al, 2004) ou de estudos prévios deste laboratório.

- Ácido (\pm)-2-amino-5-fosfonopentanóico (DL-AP5, TOCRIS, UK), 6,0 nmol;
- Cloreto de cobalto(II) hexahidratado (CoCl_2), 98% (Sigma-Aldrich, EUA), 1,0 mM;
- Hidrobrometo de (-)-escopolamina (RBI, EUA), 10,0 nmol;
- (RS) - atenolol (TOCRIS, UK), 10,0 nmol;
- PBS (tampão fosfato-salina), usado como veículo para dissolver o cloreto de cobalto, atenolol, escopolamina e AP5.

3.4. Cirurgia estereotáxica

Após uma semana de habituação no biotério, cada animal recebeu injeção intraperitoneal (*i.p.*) de quetamina (Sespo Ind. Com. Ltda., Brasil) 100 mg/ml/kg e xilazina (Laboratorios Calier Ltda, Brasil) 10 mg/ml/kg. Após a perda total dos reflexos o animal foi adaptado ao aparelho estereotáxico (Stoelting, EUA) para posterior assepsia da parte superior da cabeça com uma solução de álcool iodado.

Feita a assepsia, foi injetado por via subcutânea, uma solução de lidocaína 3,0 % com adrenalina 1:50.000 (Dentsply Pharmaceutical, Brasil). A lidocaína promove uma anestesia local, enquanto que a adrenalina, através da ação vasoconstritora, evita o sangramento. A injeção da solução acima descrita forma uma pápula, a qual orienta na retirada de uma pequena área da pele acima do crânio do animal. Em seguida foi feita a raspagem do periósteo para a visualização do crânio e das suturas lambdóide e coronária.

A cabeça foi fixada nas barras auriculares do aparelho estereotáxico de maneira que a posição do crânio permanecesse na horizontal. Com uma broca odontológica perfurou-se o crânio e dois parafusos de aço inoxidável foram fixados.

Com auxílio do atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (2009), foram retiradas as coordenadas referentes ao córtex pré-frontal ventromedial (CPFvm) (interaural - IA: + 11,8 mm, lateral L: \pm 0,6 mm e dorso-ventral - DV: - 1,8mm). As cânulas-guia foram confeccionadas a partir de agulhas (25,0 x 7,0 mm). Com auxílio de um paquímetro (Mitutoyo - Brasil), todas as agulhas foram cortadas e as cânulas ajustadas para um tamanho de 11,0 mm, a fim de possibilitar o implante bilateral das mesmas e a microinjeção no CPFvm. Após o implante, as cânulas permaneceram 2.8 mm acima do CPFvm.

Em seguida, a área aberta recebeu uma camada de acrílico odontológico auto-polimerizável, o qual integra todas as peças em uma prótese sólida. Em cada cânula foi inserido um mandril (nº30) para evitar o entupimento das mesmas. Após a secagem da prótese, o animal foi retirado do aparelho. Ao término da cirurgia, cada animal recebeu uma injeção subcutânea de flunixin meglumina 2,5 mg/kg (Schering-Plough, Brasil), um composto com propriedades analgésicas, antipiréticas e antiinflamatórias. Para evitar possíveis infecções, os animais também receberam por via intramuscular, uma associação de benzilpenicilina e estreptomicina 1,0 ml/kg (Fort Dodge, Brazil).

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em sala aquecida aproximadamente entre 25 a 27 °C para evitar hipotermia causada pela

anestesia geral. Em seguida, foram levados ao biotério em caixas moradias, onde permaneceram entre 5-7 dias para recuperação e posterior experimentação.

3.5. Microinjeção intracerebral

A microinjeção bilateral no CPFvm foi realizada com o auxílio de agulhas medindo 14,0 mm confeccionadas a partir de agulhas odontológicas e auxílio de um paquímetro. As agulhas foram introduzidas em um tubo de polietileno conectado a uma microseringa Hamilton (10 µl). A microseringa foi preenchida com água destilada e uma bolha de ar separava a água da solução a ser injetada. A bolha de ar é necessária para a visualização da infusão da droga, já que a mesma se desloca após a microinjeção, assim podemos ter certeza de que a droga foi realmente injetada.

No momento da microinjeção o animal foi imobilizado, o mandril retirado e cânula foi limpa com o uso de uma lima odontológica de 11,0 mm. Após a limpeza das cânulas, as duas agulhas injetoras foram introduzidas, uma em cada cânula, e com auxílio de uma bomba de infusão (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) cada animal recebeu 0,2 µl de solução da droga por lado. A taxa de infusão foi de 0,2 µl/min. Em seguida cada animal voltou para a caixa até o momento de ser exposto ao modelo.

3.6. Teste Comportamental

3.6.1. Labirinto em cruz elevado

O modelo utilizado consiste de um labirinto com uma plataforma central e quatro braços, sendo dois abertos (50 x 10 cm) e dois fechados por paredes (50 x 10 x 40 cm), dispostos de maneira oposta. Cada braço aberto é circundado por um anteparo de acrílico (1 cm de altura), sendo o material do aparato MDF de cor branco gelo.

A sala onde o LCE está localizado é iluminada com uma lâmpada incandescente cuja intensidade era ajustada para 40 lux. Em cada experimento essa intensidade foi verificada através do uso de um luxímetro digital, bem como a temperatura do ambiente, a qual foi

mantida entre 22 e 24 °C. A ante-sala onde os animais eram ambientados também possuía baixa luminosidade e temperatura controlada na mesma faixa. No dia do experimento os animais permaneciam em suas caixas moradias na ante-sala durante 40 min para ambientação.

Os animais foram submetidos ao teste por 5 min e, após 24 h, foram submetidos ao reteste, novamente por 5 min. O ambiente experimental constitui-se de duas salas, uma sala contendo o LCE e acima do mesmo, uma câmera de vídeo acoplada a um monitor presente na ante-sala. Esses equipamentos permitiam a gravação dos experimentos em DVD, para possibilitar uma leitura posterior e mais precisa dos comportamentos realizados pelo animal. O experimentador permanecia na ante-sala, acompanhando o comportamento do animal através de visualização pelo monitor.

Todos os animais foram colocados na plataforma central do LCE voltados para um dos braços fechados. Entre cada teste/reteste, o LCE foi limpo com solução de etanol 10 %. Após a exposição ao LCE, cada animal era levado para uma terceira sala, separado dos animais não expostos. Após 24 h todos os animais foram submetidos ao reteste por 5 min.

Tanto os grupos controle como os tratados foram corridos em todos os experimentos. Os experimentos ocorreram entre as 13:00 e 17:00 h.

3.7. Protocolo Experimental

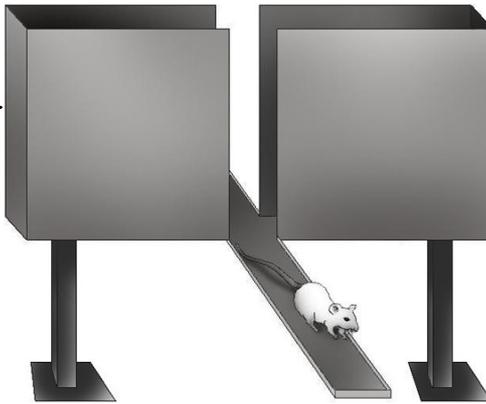
3.7.1. Experimento 1: efeito da inativação temporária do CPFvm com cobalto 1 ou 10 min antes do teste do LCE

Para determinar se o CPFvm possui algum papel na ansiedade incondicionada, 38 ratos sem experiência prévia no LCE foram aleatoriamente alocados em 4 grupos (n=8-11/grupo) de acordo com o tratamento (veículo ou cobalto 1,0 mM) e o intervalo (1 ou 10 min) entre o término da infusão da droga e o início do teste comportamental. O experimento 1 foi realizado conforme o protocolo experimental demonstrado na figura 4.

**Microinjeção
de PBS ou
cobalto**



1 ou 10
min



24 h

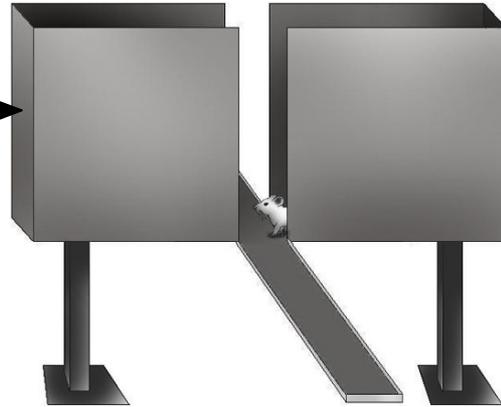


Figura 4. Esquema do procedimento utilizado para a avaliação dos grupos tratados com PBS ou cobalto 1 ou 10 min antes do teste do LCE.

3.7.2. Experimento 2: efeito da inativação temporária do CPFvm com cobalto imediatamente após o teste do LCE

Para verificar se a atividade do CPFvm contribui para a consolidação do aprendizado aversivo adquirido durante a experiência inicial no LCE, 17 ratos foram aleatoriamente alocados em 2 grupos (n=8-9/grupo) baseados no tratamento (veículo ou cobalto 1,0 mM), com microinjeção no CPFvm imediatamente após o teste. Vinte e quatro horas após, os animais foram expostos ao LCE durante 5 min. O experimento 2 foi realizado conforme o protocolo experimental demonstrado na figura 5.

3.7.3. Experimento 3: efeito da inativação temporária do CPFvm com cobalto 1 ou 10 min antes do reteste do LCE

Para investigar se a atividade do CPFvm é requerida na evocação da memória aversiva associada com a experiência prévia no LCE, 35 ratos com experiência prévia foram aleatoriamente alocados em 4 grupos (n=7-10/grupo) de acordo com o tratamento (veículo ou cobalto 1,0 mM) e o intervalo (1 ou 10 min) entre o término da infusão da droga no CPFvm e o início do reteste no LCE. O experimento 3 foi realizado segundo o protocolo experimental demonstrado na figura 6.

3.7.4. Experimento 4: Avaliação dos mecanismos neuroquímicos presentes no CPFvm envolvidos na ansiedade e memória

Para esclarecer se os mecanismos neuroquímicos que medeiam respostas de ansiedade e memória avaliadas no LCE são equivalentes, 67 ratos foram alocados em 8 grupos (n=7-10/grupo) baseados no tratamento intra CPFvm (veículo, atenolol 10,0 nmol; escopolamina 10,0 nmol ou AP5 6,0 nmol) infundidos 10 min antes do teste ou 10 min antes do reteste do LCE. O experimento 4 foi realizado segundo o protocolo experimental demonstrado na figura 7.

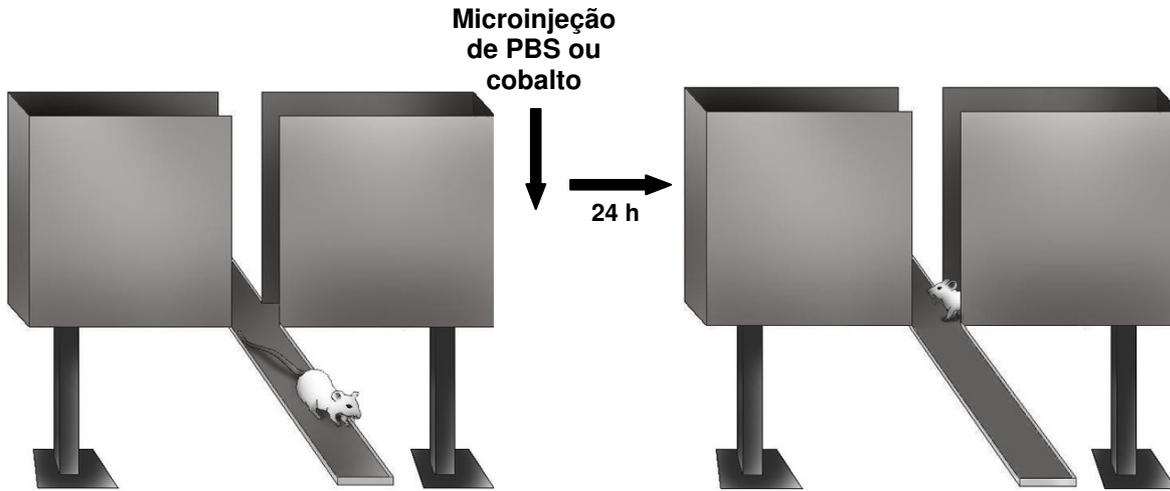


Figura 5. Esquema do procedimento utilizado para a avaliação dos grupos tratados com PBS ou cobalto imediatamente após o teste do LCE.

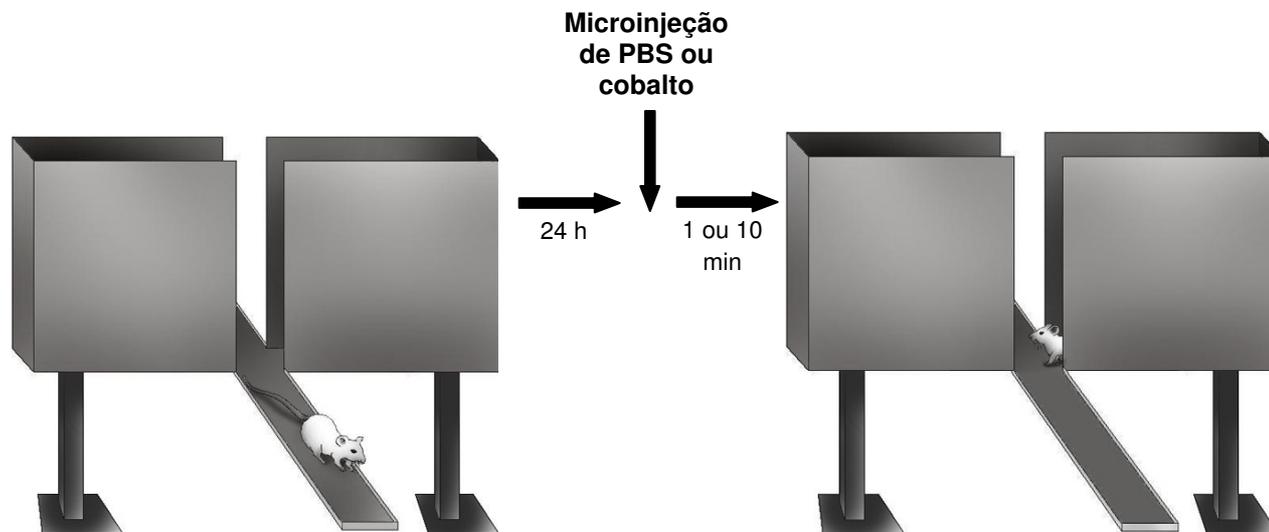


Figura 6. Esquema do procedimento utilizado para a avaliação dos grupos tratados com PBS ou cobalto 1 ou 10 min antes do reteste do LCE.

**Microinjeção
de PBS, ATE,
ESC ou AP5**

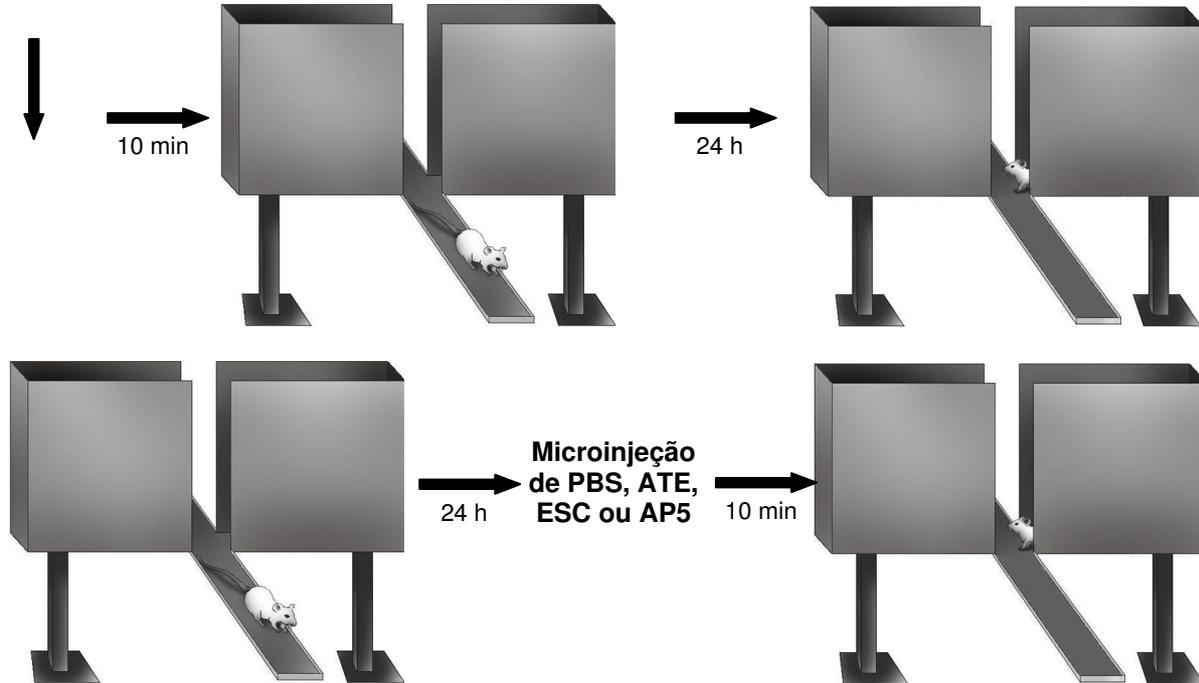


Figura 7. Esquema do procedimento utilizado para a avaliação dos grupos tratados com PBS, ATE, ESC ou AP5 10 min antes do teste ou do reteste do LCE.

3.8. Análise comportamental dos ratos submetidos ao LCE

Os parâmetros comportamentais analisados foram agrupados em blocos de 5 minutos durante o teste e/ou reteste foram os seguintes:

- Número de entradas nos braços abertos do LCE (EA). A EA é contada apenas quando o animal coloca as quatro patas no braço aberto;
- Número de entradas nos braços fechados do LCE (EF). A EF é contada apenas quando o animal coloca as quatro patas no braço fechado;
- Tempo de permanência nos braços abertos do LCE. Após o animal entrar no braço aberto, o tempo de permanência no mesmo é contado até que uma das patas é colocada em outra parte do LCE;
- Tempo de permanência nos braços fechados do LCE. Após o animal entrar no braço fechado, o tempo de permanência no mesmo é contado até que uma das patas é colocada em outra parte do LCE;
- Frequência de posturas de estiramento (PAR), a qual consiste no ato de colocar pelo menos uma pata em um dos braços abertos e em seguida voltar à posição original (centro ou braço fechado). Segundo Bertoglio & Carobrez (2000), esse comportamento parece estar relacionado à avaliação de risco.

Após a coleta desses dados, foram calculadas – porcentagem de tempo nos braços abertos {%TA; [(tempo nos braços abertos/300) × 100]}, porcentagem de tempo no centro {%TC; [tempo na plataforma central/300] × 100]} e porcentagem de tempo nos braços fechados {%TF; [(tempo nos braços fechados/300) × 100]} – durante os 5 min de exposição ao LCE.

3.9. Perfusão e histologia

Ao término do experimento comportamental, os animais receberam anestesia geral [cloral hidratado a 15 % (2,3 mg/ml) e xilazina 10 mg/ml] via *i.p.*, microinjeção de Azul de Evans (0,2 µl/lado) e em seguida foi realizada a perfusão intracardíaca com solução salina (NaCl 0,9 %), seguida de solução de formalina (10 %).

Posteriormente, os encéfalos foram retirados e conservados individualmente em recipientes contendo solução de formalina 10 %. Pelo menos 24 h antes da análise histológica para verificação do sítio de injeção da droga, os encéfalos foram transferidos para recipientes contendo solução de sacarose 30 %.

Cortes coronais (50 μm) foram obtidos utilizando um criostato (*Leyca*, modelo CM 1850, Microsystems AG, Wetzlar, Alemanha) a uma faixa de temperatura de -18 a -20 °C. Os cortes foram fixados em lâminas de vidro para microscopia, previamente gelatinizadas. Os sítios de microinjeção foram imediatamente observados com auxílio de uma lupa e comparados com os diagramas correspondentes do Atlas Paxinos e Watson (2009). Apenas os animais com histologia bilateral para o CPFvm foram incluídos na análise estatística. Para obter as fotomicrografias, as lâminas com os cortes já fixados, permaneceram secando por um período mínimo de uma semana e em seguida foram coradas. A primeira etapa consistiu da hidratação das lâminas durante 2 min em cuba contendo água destilada. Procedimento realizado duas vezes. Na sequência, as lâminas foram imersas em corante Giemsa (Sigma-Aldrich, EUA) durante 6 min e lavadas com águas destilada. Em seguida, durante 2 min, as lâminas foram mergulhadas em soluções alcoólicas 70 %, 90 % e 100 %, após essa etapa colocadas duas vezes, durante 5 min, em CitroSolv. Finalmente, as lâminas foram cobertas com lamínulas e seladas com resina sintética.

As lâminas foram fotografadas em uma lupa acoplada a uma câmera (Motic Moticam 2000; 2.0 MP *Live Resolution*) e um programa de imagens (Motic Image Plus 2.0) e comparadas com os diagramas do atlas de neuroanatomia (Paxinos & Watson, 2009).

3.10. Análise estatística

Os resultados foram analisados pela análise de variância (ANOVA). Enquanto os fatores independentes para os experimentos 1 e 3 foram o tratamento e o intervalo entre a infusão da droga e a exposição ao LCE, para os experimentos 2 e 4 foram o tratamento e a experiência prévia ao LCE. Após as análises, foi realizado o teste *post-hoc* Newman-Keuls. O valor de significância estatística adotado foi $p < 0,05$.

Os resultados foram analisados pelo programa estatístico Statistica® (StatSoft Inc., EUA) e representado em gráficos confeccionados através do programa Prisma 4 (GraphPad Prism, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Histologia

A porção ventromedial do CPF consiste da parte ventral da região medial do pré-límbico e a porção medial infra-límbica (VERTES, 2006). As microinjeções foram realizadas no CPFvm entre 3,7 e 2,7 mm em relação ao Bregma. Ratos que receberam a injeção fora dessas coordenadas foram excluídos da análise.

4.2. Experimento 1: A inativação do CPFvm atenua os comportamentos relacionados à ansiedade incondicionada em ratos sem experiência prévia ao LCE.

A ANOVA de duas vias demonstrou uma interação significativa entre o tratamento e o intervalo de microinjeção de cobalto e o teste comportamental para os parâmetros de %TA ($F_{1,34} = 6,55$; $P < 0,01$; Fig. 9A) e %TF ($F_{1,34} = 5,62$; $P < 0,05$; Fig. 9C). Nenhum efeito significativo da ANOVA foi encontrado para os parâmetros de PAR ($F_{1,34} = 0,29$; $P = 0,59$), EF ($F_{1,34} = 0,38$; $P = 0,54$), EA ($F_{1,34} = 0,85$; $P = 0,36$), and %TC ($F_{1,34} = 0,01$; $P = 0,98$). O teste de *post-hoc* Newman-Keuls mostrou um aumento na %TA e uma redução nas EF dos grupos tratados com cobalto 1 min antes do teste em relação ao respectivo controle. Assim, a inativação do CPFvm atenuou o comportamento relacionado à ansiedade. A ausência de aumento na exploração dos braços abertos quando o intervalo de tempo entre a infusão de cobalto e o teste comportamental foi 10 min confirma um efeito de curto-prazo do cobalto. Estes resultados foram observados na ausência de mudanças nas EF (Fig. 9F), um índice de atividade exploratória geral (RODGERS et al, 1995).

Para investigar se a atividade do CPFvm é necessária para a aquisição do aprendizado aversivo, os grupos que receberam veículo ou cobalto antes do teste foram re-expostos ao LCE após 24 h, sem tratamento farmacológico. Como pode ser visto na tabela 1, todos os grupos reduziram a %TA ($F_{3,68} = 7,54$; $P < 0,001$) e elevaram a %TF ($F_{3,68} = 5,82$; $P < 0,01$) quando comparados aos respectivos valores no teste. A expressão da esquivia aos braços abertos durante o reteste é

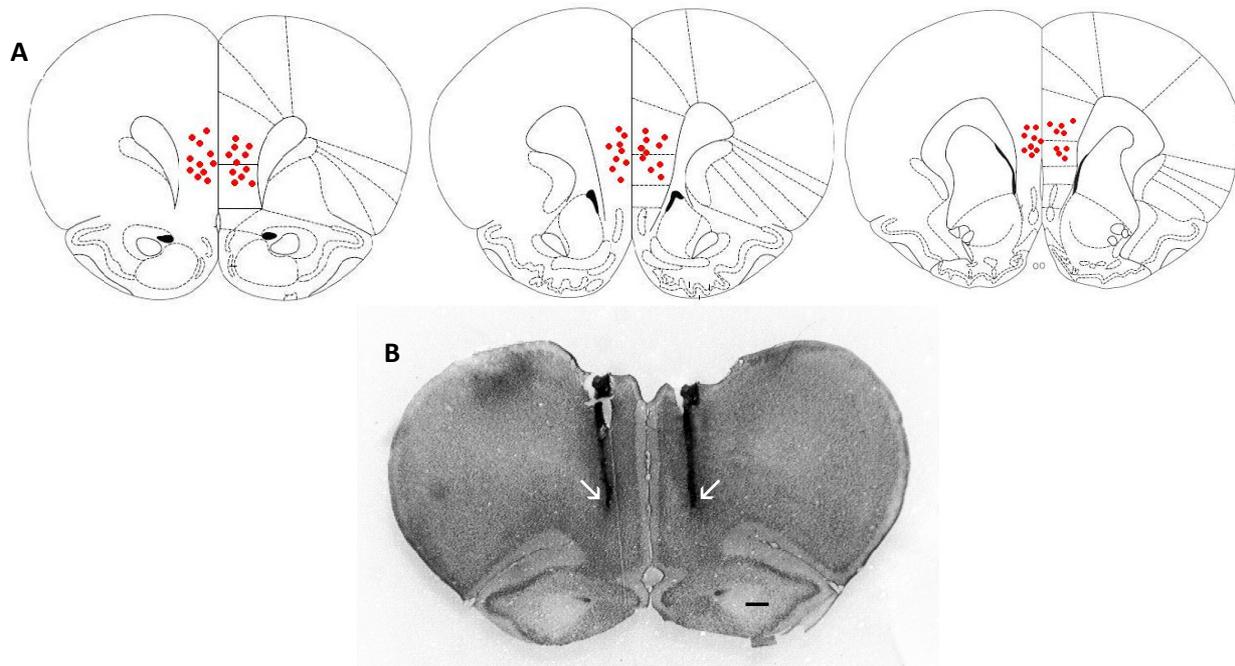


Figura 8. **A.** Cortes coronais do cérebro de ratos mostrando os sítios de injeção (círculos vermelhos) no CPFvm. **B.** Fotomicrografia (escala = 500 μ m) dos sítios de injeção (indicados pelas setas) no CPFvm (aproximadamente 3,7 mm anterior ao Bregma). Todos os animais utilizados nesse trabalho tiveram a injeção da droga em uma dessas três coordenadas, sendo que a maioria alcançou a posição 2,7 mm.

interpretada por alguns autores como a evocação de uma memória aversiva adquirida na primeira experiência no LCE (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000; 2004). Como os ratos tratados com veículo ou cobalto comportaram-se de maneira similar, a inativação do CPFvm não prejudicou a aquisição.

4.3. Experimento 2: A inativação do CPFvm não afeta a consolidação do aprendizado aversivo adquirido no teste

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou um efeito da repetição, mas não do tratamento e nem da interação entre os dois fatores para os parâmetros de %TA ($F_{1,15} = 15,3$; $P < 0,001$), %TF ($F_{1,15} = 30,0$; $P < 0,0001$) e PAR ($F_{1,15} = 26,3$; $P < 0,0001$). O teste de *post-hoc* mostrou uma redução significativa na %TA e PAR de todos os grupos no reteste em relação aos seus respectivos controles no teste, esse efeito foi acompanhado de um aumento significativo na %TF. Esses resultados confirmam a expressão de uma esquiva adicional aos braços abertos no reteste, e sugerem que a inativação do CPFvm induzida pelo cobalto não produziu efeitos na consolidação do aprendizado aversivo. Além disso, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou que nem a experiência prévia, nem a inativação do CPFvm interferiram com a %TC ($F_{1,15} = 1,3$; $P = 0,28$), EA ($F_{1,15} = 0,06$; $P = 0,81$) e EF ($F_{1,15} = 0,32$; $P = 0,58$) no reteste (tabela 2).

4.4. Experimento 3: A inativação do CPFvm prejudica a evocação da memória aversiva em ratos com experiência prévia no LCE

Os grupos tratados com veículo no reteste demonstraram maior esquiva aos braços abertos, caracterizada pela redução da %TA ($F_{4,65} = 7,94$; $P < 0,0001$; Fig. 10A), %TC ($F_{4,65} = 6,77$; $P < 0,001$; Fig. 10B) e EA ($F_{4,65} = 9,08$; $P < 0,0001$; Fig. 10D), bem como um aumento na %TF ($F_{4,65} = 13,3$; $P < 0,00001$; Fig. 10C) em comparação aos respectivos valores obtidos no teste. Entretanto, o grupo que teve o CPFvm inativado pelo cobalto 1 min, mas não 10 min, antes do reteste comportou-se de maneira diferente: a ANOVA de duas vias revelou uma interação significativa entre o tratamento e o intervalo de microinjeção e o teste comportamental para a %TA ($F_{1,31} = 6,19$; $P < 0,01$; Fig. 10A) e um efeito do tratamento para os parâmetros de %TC

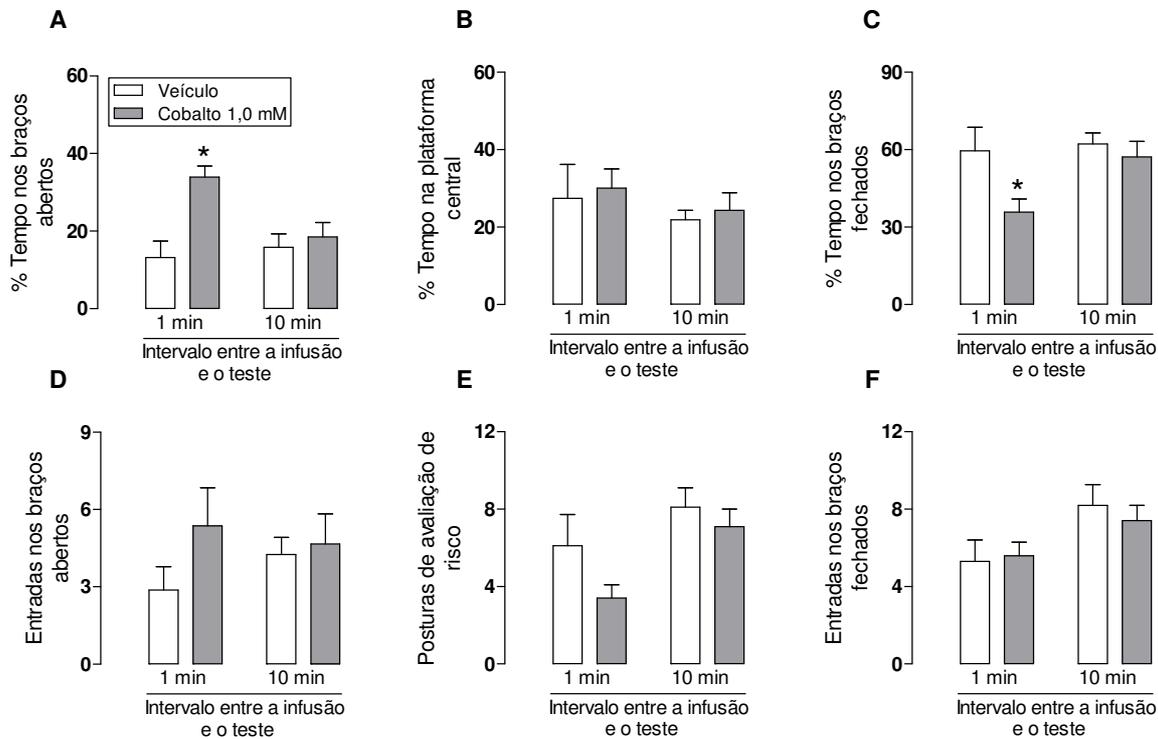


Figura 9. Efeito da inativação temporária do CPFvm com cobalto 1 ou 10 min antes do teste do LCE. A inativação do córtex pré-frontal ventromedial antes do teste no LCE atenuou os comportamentos relacionados à ansiedade. Ratos expostos ao LCE 1 min após a infusão de cobalto permaneceram mais tempo explorando os braços abertos em relação aos respectivos controles (A, C). A inativação do CPFvm pelo cobalto foi temporária, já que os ratos testados 10 min após a infusão de cobalto comportaram-se de maneira semelhante aos grupos que receberam veículo. Esses resultados foram observados na ausência de mudanças no número de entradas nos braços fechados, um índice de atividade exploratória geral. As barras verticais representam a média + E.P.M. Os asteriscos indicam uma diferença significativa ($p < 0.05$) em relação aos respectivos controles (ANOVA de duas vias, seguida do teste de post-hoc Newman Keuls).

Tabela 1. Valores das médias obtidas no reteste dos grupos tratados com cobalto 1 ou 10 min antes do teste do LCE. A inativação do córtex pré-frontal ventromedial com cobalto antes do teste no labirinto em cruz elevado não interferiu com a expressão da esQUIVA dos braços abertos no reteste, que foi realizado após 24 h sem tratamento farmacológico.

	Veículo 1min (n=8)		Cobalto 1 min (n= 11)		Veículo 10 min (n= 10)		Cobalto 10 min (n= 9)	
	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste
%TA	13,2 ± 4,2	1,3 ± 1,0*	33,9 ± 3,9	1,2 ± 0,6*	15,8 ± 3,4	1,6 ± 1,2*	18,5 ± 3,7	6,0 ± 3,0*
%TC	27,4 ± 8,8	21,5 ± 4,3	30,1 ± 4,9	19,4 ± 3,0	21,9 ± 2,5	24,7 ± 4,2	24,3 ± 4,6	28,5 ± 5,0
%TF	59,5 ± 9,2	77,2 ± 4,5*	35,9 ± 5,0	79,4 ± 3,3*	62,3 ± 4,2	73,7 ± 4,9*	57,2 ± 6,0	65,5 ± 5,0*
EA	2,87 ± 0,9	0,5 ± 0,4	5,36 ± 1,5	0,5 ± 0,3	4,3 ± 0,7	0,6 ± 0,4	4,7 ± 1,2	2,1 ± 1,0
PAR	6,12 ± 1,6	7,0 ± 1,4	3,4 ± 0,7	5,7 ± 1,1	8,1 ± 1,0	8,7 ± 1,4	7,1 ± 0,9	8,3 ± 1,4
EF	5,3 ± 1,1	4,8 ± 1,0	5,6 ± 0,7	4,3 ± 0,7	8,2 ± 1,1	7,8 ± 1,4	7,4 ± 0,8	7,6 ± 0,8

Legenda: %TA = porcentagem de tempo nos braços abertos; %TC = porcentagem de tempo na plataforma central; %TF = porcentagem de tempo nos braços fechados; EA = entradas nos braços abertos; PAR = postura de avaliação de risco; EF = entradas nos braços fechados; Os resultados estão representados como média ± E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle no teste (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do teste de *post-hoc* Newman Keuls).

Tabela 2. Efeito da inativação do CPFvm imediatamente após o teste do LCE. A inativação do córtex pré-frontal ventromedial com cobalto imediatamente após o teste no LCE não interferiu com a expressão da esQUIVA aos braços abertos no reteste, que foi realizado 24 h após sem tratamento farmacológico.

	Veículo (n = 8)		Cobalto (n = 9)	
	<i>Teste</i>	<i>Reteste</i>	<i>Teste</i>	<i>Reteste</i>
%TA	12,9 ± 3,7	4,3 ± 2,5*	15,6 ± 3,4	5,0 ± 1,8*
%TC	37,1 ± 2,3	25,6 ± 4,2	34,4 ± 2,2	29,7 ± 4,8
%TF	50,0 ± 4,7	70,1 ± 6,2*	50,0 ± 4,9	65,3 ± 6,1*
EA	3,6 ± 0,9	1,7 ± 1,0	4,1 ± 0,9	1,9 ± 0,6
PAR	10,5 ± 1,0	5,9 ± 0,8*	12,3 ± 1,1	6,2 ± 1,1*
EF	7,4 ± 0,9	8,1 ± 1,3	9,9 ± 0,9	9,4 ± 1,3

Legenda: %TA = porcentagem de tempo nos braços abertos; %TC = porcentagem de tempo na plataforma central; %TF = porcentagem de tempo nos braços fechados; EA = entradas nos braços abertos; PAR = postura de avaliação de risco; EF = entradas nos braços fechados; Os resultados estão representados com média ± E.P.M.* $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle no teste (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do teste de *post-hoc* Newman Keuls).

($F_{1,31} = 4,76$; $P < 0,05$; Fig. 10B), EA ($F_{1,31} = 8,34$; $P < 0,01$; Fig. 10D) e %TF ($F_{1,31} = 15,7$; $P < 0,01$; Fig. 10C). O teste de *post-hoc* revelou um aumento na %TA em relação ao respectivo controle para o grupo tratado com cobalto 1 min antes do reteste. Como resultado, a inativação temporária do CPFvm induzida pelo cobalto foi suficiente para prejudicar a evocação da memória aversiva. A redução da PAR ($F_{4,65} = 14,2$; $P < 0,00001$; Fig. 10E) observada no reteste não foi alterada pela infusão de cobalto. Nem a experiência prévia no LCE nem a inibição do CPFvm antes do reteste interferiram com as EF (Fig. 10F).

4.5. Experimento 4: Mecanismos neuroquímicos distintos regulam a ansiedade e a memória no CPFvm

A ANOVA de duas vias revelou uma interação entre os fatores tratamento e experiência prévia no LCE para os parâmetros de %TA

($F_{3,59} = 4,18$; $P < 0,01$; Fig. 11A) e %TF ($F_{3,59} = 3,71$; $P < 0,05$; Fig. 11C) e um efeito do tratamento para as EA ($F_{3,59} = 3,31$; $P < 0,05$; Fig. 11D). O teste de *post-hoc* de Newman-Keuls revelou um aumento na %TA para os grupos de animais sem experiência prévia no LCE e que receberam atenolol ou AP5 10 min antes do teste, esse efeito foi acompanhado por uma redução na %TF. O tratamento com atenolol antes do teste também elevou as EA. Dessa maneira, sugere-se um papel para esses dois receptores presentes no CPFvm em regular os comportamentos relacionados à ansiedade. Todos os grupos acima descritos adquiriram esquia aos braços abertos quando re-expostos ao LCE após 24 h (Tabela 3), e conseqüentemente, o bloqueio dos receptores beta-1 adrenérgicos ou NMDA glutamatérgicos do CPFvm não afetou a aquisição do aprendizado aversivo.

Em contraste com os resultados encontrados após a inibição completa do CPFvm, a infusão de atenolol ou AP5 não produziu nenhum efeito no reteste, considerando que todos os grupos com experiência prévia, após o tratamento com os antagonistas beta-1, NMDA e muscarínico, apresentaram aversão aos braços abertos semelhante ao respectivo controle, caracterizada pela redução na %TA ($F_{4,63} = 7,74$; $P < 0,0001$; Fig. 11A), %TC ($F_{4,63} = 10,7$; $P < 0,00001$; Fig. 11B) e EA ($F_{4,63} = 10,1$; $P < 0,00001$; Fig. 11D), bem como, um aumento na %TF ($F_{4,63} = 22,2$; $P < 0,00001$; Fig. 11C).

Esse padrão de resultados difere daqueles encontrados com cobalto, sugerindo que outros receptores são recrutados para evocarem esse tipo de memória aversiva incondicionada adquirida no teste. Nem a experiência prévia no LCE, nem a inativação do CPFvm interferiram com a %TC, PAR e EF.

Tabela 3. A infusão de atenolol, escopolamina ou AP5 no córtex pré-frontal ventromedial antes do teste no LCE não prejudicou a expressão da esquivia aos braços abertos no reteste, que foi realizado 24 h após sem tratamento farmacológico.

	Veículo (n=10)		Atenolol 10 nMol (n= 8)		Escopolamina 10 nMol (n= 9)		AP5 6 nMol (n= 7)	
	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste
%TA	15,8 ± 3,4	1,6 ± 1,2*	36,6 ± 6,0	1,3 ± 0,6*	17,7 ± 4,1	5,3 ± 3,1*	28,2 ± 4,6	1,9 ± 1,0*
%TC	21,9 ± 2,5	24,8 ± 4,2	22,7 ± 2,9	29,3 ± 5,7	19,3 ± 2,3	21,9 ± 2,9	25,1 ± 2,2	18,1 ± 3,5
%TF	62,3 ± 4,2	73,6 ± 4,9*	40,8 ± 5,5	69,4 ± 5,9*	63,0 ± 5,5	72,8 ± 5,4*	46,7 ± 5,9	80,0 ± 3,6*
EA	4,4 ± 0,9	0,6 ± 0,4*	9,3 ± 1,4	0,6 ± 0,3*	4,7 ± 1,0	1,9 ± 1,1*	5,6 ± 1,2	0,6 ± 0,4*
PAR	8,5 ± 1,4	8,7 ± 1,4	5,4 ± 1,5	9,7 ± 0,9	4,4 ± 0,8	8,1 ± 1,0	7,6 ± 1,2	5,1 ± 1,3
EF	8,2 ± 1,1	7,8 ± 1,4	6,3 ± 1,1	9,0 ± 1,1	8,9 ± 1,5	9,4 ± 1,5	7,9 ± 1,1	5,0 ± 0,8

Legenda: %TA = porcentagem de tempo nos braços abertos; %TC = porcentagem de tempo na plataforma central; %TF = porcentagem de tempo nos braços fechados; EA = entradas nos braços abertos; PAR = postura de avaliação de risco; EF = entradas nos braços fechados; Os dados estão representados como média ± E.P.M.* p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle no teste (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do teste de *post-hoc* Newman Keuls).

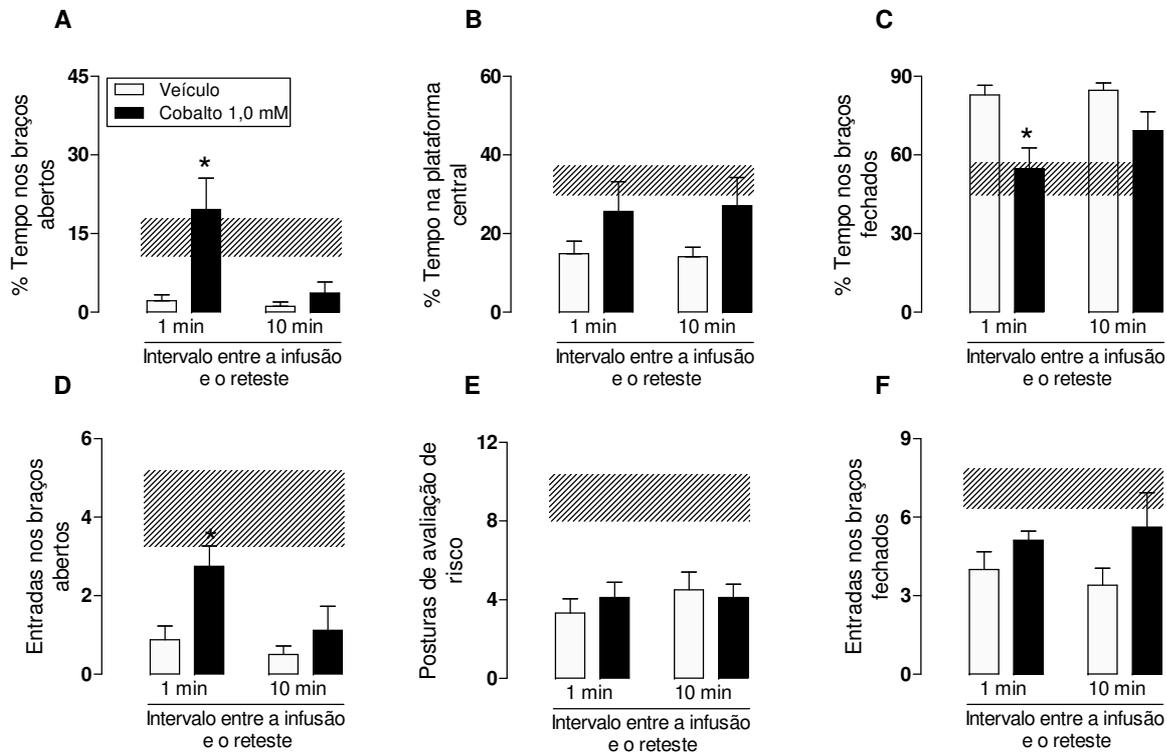


Figura 10. Efeito da inativação temporária do CPFvm com cobalto 1 ou 10 min antes do reteste do LCE. A inativação temporária do córtex pré-frontal ventromedial antes do reteste no LCE prejudicou a evocação da memora aversiva adquirida no teste. Os grupos com experiência prévia tratados com veículo exibiram maior esquia aos braços abertos em relação ao teste (A, C, D). A infusão de cobalto 1 min, mas não 10 min, antes do reteste do LCE alterou completamente esse padrão de resposta, sem alterar a atividade exploratória geral (F). As barras verticais representam a média + E.P.M. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) de todos os grupos no dia do teste do LCE. Os resultados foram representados dessa maneira porque todos os grupos comportaram-se de maneira semelhante no teste ($F_{3,31} \leq 1,17$; $P \geq 0,33$). * $p < 0,05$ em relação aos respectivos controles (ANOVA de duas vias, seguida do teste de *post-hoc* Newman Keuls).

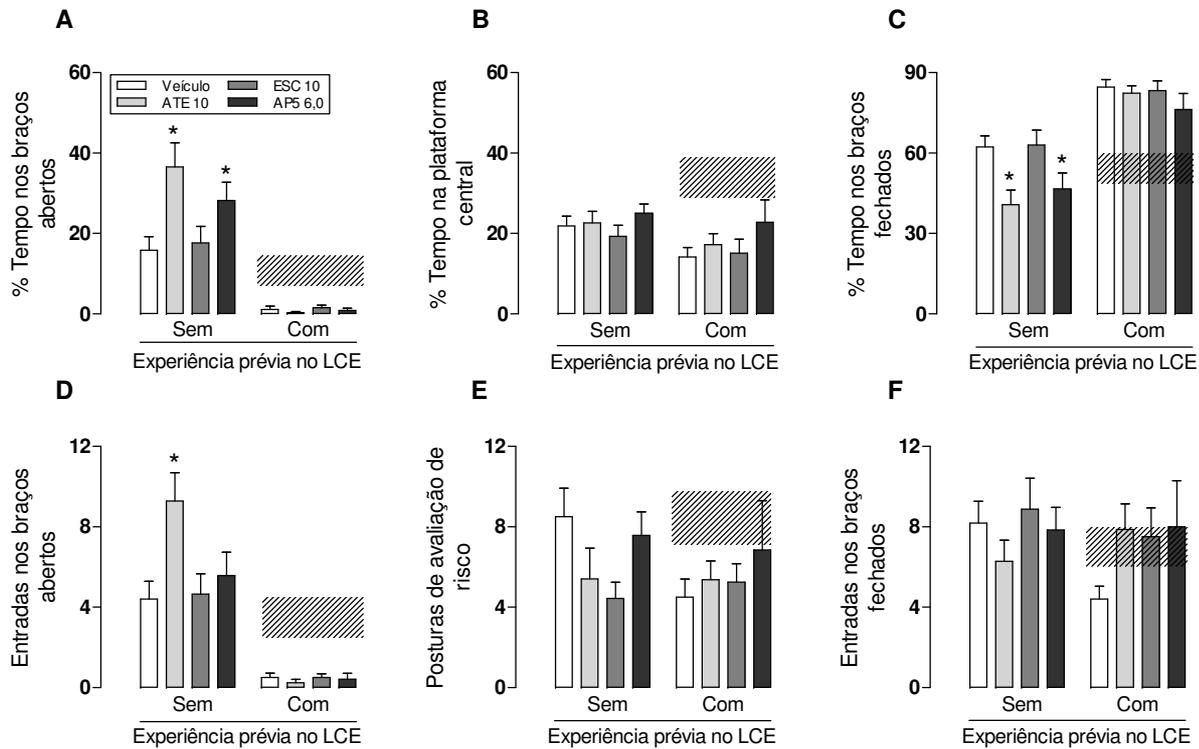


Figura 11. Efeito da microinjeção de atenolol 10 nmol, escopolamina 10 nmol ou AP5 6 nmol 10 min antes do teste ou 10 min antes do reteste do LCE. O córtex pré-frontal ventromedial recruta receptores distintos para regular ansiedade e memória. A infusão de atenolol 10,0 nmol (ATE 10) ou de AP5 6,0 nmol (AP5 6,0) atenuou os comportamentos relacionados à ansiedade no teste do LCE em ratos sem experiência prévia em relação aos respectivos controles (A, C, D). O mesmo tratamento, entretanto, não afetou a esquia aos braços abertos no reteste do LCE (A, C, D) nos grupos com pré-exposição no LCE. Esses resultados foram observados na ausência de mudanças nos índices de atividade exploratória geral (F). Tanto a expressão da ansiedade como a expressão da memória aversiva não foi modificada após a infusão de escopolamina 10,0 nmol (ESC 10). As barras horizontais representam intervalo de confiança (95%) de todos os grupos no dia do teste do LCE. Os resultados foram representados dessa maneira pois todos os grupos comportaram-se de maneira semelhante no teste ($F_{3,30} \leq 1,09$; $P \geq 0,36$). * $p < 0.05$ em relação aos respectivos controles (ANOVA de duas vias, seguida do teste de *post-hoc* Newman Keuls).

5. DISCUSSÃO

Os principais achados desse trabalho foram: (i) a inativação do CPFvm antes do teste do LCE reduz a expressão da ansiedade, sem prejudicar a aquisição do aprendizado aversivo; (ii) a inativação do CPFvm imediatamente após o teste do LCE não afetou a consolidação da memória aversiva adquirida no teste; (iii) a inativação do CPFvm antes do reteste do LCE prejudicou a evocação da memória aversiva adquirida no teste e; (iv) o antagonismo farmacológico tanto dos receptores beta-1 adrenérgicos como dos receptores do tipo NMDA de glutamato, antes do teste, reduziu a expressão dos comportamentos de ansiedade de maneira similar à inativação com cobalto. No entanto, o mesmo tratamento não interferiu com a evocação da memória aversiva em ratos com experiência prévia. Na dose testada, o bloqueio dos receptores muscarínicos não modificou nenhum parâmetro avaliado no LCE no dia do teste e nem no reteste. Dessa maneira, o CPFvm possui um importante papel no controle da ansiedade e da memória, mas os mecanismos neuroquímicos envolvidos em ambos os processos parecem ser distintos.

Até o momento, existe uma vasta literatura descrevendo o papel do CPFvm no componente cognitivo das emoções, utilizando principalmente modelos de condicionamento. Entretanto, poucos autores têm abordado o papel dessa estrutura, tanto no âmbito cognitivo como no emocional, em modelos de ansiedade incondicionada.

Trabalhos que verificaram a expressão de genes imediatos como *c-fos* mostraram uma expressão aumentada da respectiva proteína no CPFvm de ratos expostos a modelos de ansiedade incondicionada como o LCE, o campo aberto ou o odor de gato (DUNCAN et al, 1996; NAGAHARA & HANDA, 1997; DIELEMBERG et al, 2001; DIELEMBERG & MCGREGOR, 2001). Esses dados tem como suporte estudos comportamentais que mostram que a lesão do CPFvm é capaz de reduzir os comportamentos de ansiedade incondicionada (BLANCO et al, 2009; DEACON et al, 2003; SHAH & TREIT, 2003; 2004). Apesar da exposição ao gato, um modelo utilizado para avaliar comportamentos de medo incondicionado, também ser capaz de elevar os níveis de proteína Fos no CPFvm, a expressão do comportamento de congelamento não é abolida pela inativação do CPFvm com tetrodotoxina (CORCORAN & QUIRK, 2007). De fato, segundo McNaughton & Corr (2004), os comportamentos de defesa dos animais

seriam controlados por estruturas distintas conforme a complexidade do comportamento, e nesse contexto, comportamentos relacionados à ansiedade seriam preferencialmente controlados pelo córtex pré-frontal, enquanto que os comportamentos de medo seriam funções de outras estruturas.

No presente trabalho, a inibição temporária da neurotransmissão no CPFvm com cobalto confirmou a participação desta região no controle da ansiedade incondicionada (Fig. 9A e C), embora esse bloqueio não tenha sido capaz de reduzir os comportamentos de avaliação de risco (Fig. 9E). Grant & Mackintosh (1963) introduziram o termo avaliação de risco como um comportamento ambivalente refletindo uma tendência de aproximação/esquiva ao ambiente ou objeto aversivo, uma resposta de conflito, ou ainda, uma resposta que levaria a um aprendizado mais detalhado sobre o ambiente (KAESERMANN, 1986; MOLEWIJK et al, 1995). Sabe-se também que esse comportamento é sensível a ação de algumas classes de drogas. Benzodiazepínicos, agonistas dos receptores 5-HT1A e inibidores da recaptação de serotonina são capazes de reduzirem a avaliação de risco, enquanto que algumas drogas ansiogênicas, como a ioimbina, não alteram tal comportamento, embora o pentilenotetrazol seja capaz de provocar um aumento (MOLEWIJK et al, 1995). De acordo com McNaughton & Corr (2004), o hipotálamo medial seria a estrutura chave no controle de comportamentos de avaliação de risco. De maneira bastante interessante, a porção dorsomedial do hipotálamo apresenta uma expressão aumentada de proteína Fos tanto no teste como no reteste do LCE (ALBRECHT-SOUZA et al, 2008), confirmando a importância dessa região para os comportamentos de avaliação de risco emitidos no LCE. Assim, sugere-se que, mesmo mantendo conexões com o hipotálamo, a inativação do CPFvm não seria suficiente para modificar esse comportamento (VERTES, 2006).

Na tentativa de reduzir os problemas causados por lesões permanentes, como as eletrolíticas ou citotóxicas, tem sido utilizado o bloqueio farmacológico. O uso do cloreto de cobalto, um bloqueador dos canais de cálcio voltagem dependente, no CPFvm foi capaz de reduzir os comportamentos punidos no teste de conflito de Vogel e repostas autonômicas quando administrado 10 min antes dos testes (FERNANDES et al, 2007; RESSTEL et al, 2004; 2008). No entanto, Kretz (1984) mostrou em um ensaio *in vivo* que a administração de cobalto em tecido cortical de roedores tem a propriedade de bloquear a pós-sinapse por não mais do que 9 min, sendo o bloqueio da pós-sinapse uma consequência da inibição da liberação pré-sináptica de

neurotransmissores na fenda sináptica. Confirmando esse estudo, a infusão de cobalto 1,0 mM no CPFvm 10 min antes do teste LCE não produziu quaisquer efeitos nos comportamentos dos animais (Fig. 9A e C), enquanto que o mesmo procedimento, mas com um intervalo entre a infusão e o teste comportamental de 1 min, foi capaz de reduzir a ansiedade basal dos animais (Fig. 9A e C).

A inativação temporária e reversível de funções corticais possui vantagens distintas em relação a outros métodos, como por exemplo, os de ablação total da estrutura. O comportamento após a ablação geralmente é passível de alterações atribuídas a um rearranjo ocorrido no encéfalo como um todo. Uma das manifestações do reajuste é a recuperação do animal de alguns déficits comportamentais ocorridos após a lesão, fato que parece ocorrer pela reorganização de outras estruturas que passam a exercer a função perdida. A inibição temporária, ao contrário, não permite que ocorram mecanismos compensatórios, além de permitir o uso do mesmo animal como o seu próprio controle (FUSTER, 2008).

Como citado na introdução, Carobrez & Bertoglio (2005) sugerem que a mudança no estado emocional evocado pela exposição subsequente ao LCE pode envolver diferentes estruturas cerebrais no teste e reteste do LCE. Até o momento, sabe-se que estruturas encefálicas como a amígdala basolateral participa dos processos de consolidação, enquanto que para a evocação da experiência aversiva do LCE estão envolvidos o HD, a SCP e o HDM. No entanto, os trabalhos de lesão permanente no CPFvm que utilizaram paradigmas de ansiedade incondicionada não permitem saber quais etapas do aprendizado são afetadas. Nesse estudo, a inativação temporária do CPFvm antes da primeira exposição não foi capaz de prejudicar a aquisição da experiência aversiva (Tabela 1), resultado que corrobora trabalhos que utilizaram modelos de medo condicionado, cujos resultados mostraram que o CPFvm não é recrutado na aquisição dessas memórias (SIERRA-MERCADO et al, 2006; CORCORAN & QUIRK, 2007).

Os comportamentos evocados pelos animais durante o reteste no LCE não foram prejudicados pela inibição do CPFvm antes do teste, demonstrando que a atividade do CPFvm não é essencial para aquisição do aprendizado aversivo, assim como a administração de benzodiazepínicos clássicos antes do teste também não impede o aprendizado aversivo. Assim, podemos sugerir que estruturas importantes para o aprendizado aversivo como amígdala, hipocampo e substância cinzenta periaquedutal, entre outras, interpretam e adquirem

a experiência aversiva. Como a inibição do CPFvm com cobalto dura apenas poucos minutos, não ocorre um impedimento para que essa memória seja armazenada.

De maneira semelhante à aquisição, o bloqueio do CPFvm após a primeira exposição ao LCE não prejudicou a consolidação do aprendizado adquirido, o que nos permite concluir que este bloqueio não teria prevenido a ocorrência da tolerância à primeira exposição aos benzodiazepínicos. File e colaboradores (1998) mostraram que a inibição da amígdala basolateral imediatamente após o teste do LCE preveniu o aparecimento da tolerância aos benzodiazepínicos após uma sessão de teste, sugerindo a participação dessa estrutura na consolidação desse evento aversivo e também a importância da atividade da mesma para a ocorrência da tolerância. No entanto, o bloqueio do hipocampo dorsal após o reteste não produziu o mesmo efeito (BERTOGLIO et al, 2006, NASCIMENTO-HÄCKL & CAROBREZ, 2007). Alguns estudos mostram que o complexo basolateral da amígdala e o CPFvm interagem influenciando a performance em tarefas afetivamente motivadas, sugerindo um papel na consolidação para a amígdala. No entanto, vale lembrar que dentro da sessão de teste de 5 min, os animais parecem adquirir as informações, principalmente nos 2 primeiros min. Portanto, para interferir no processo de consolidação da resposta emocional adotada pelo animal no LCE, talvez a manipulação farmacológica deva ser feita depois dos primeiros minutos de sessão, antes do animal expressar a esquiva aos braços abertos.

Com relação à evocação dessa memória, sabe-se que a inativação do HD com lidocaína antes do reteste foi capaz de prejudicar a expressão do aprendizado no LCE (BERTOGLIO et al, 2006). Considerando que o fenômeno de tolerância à primeira exposição é resultado de um aprendizado aversivo, podemos dizer que de maneira mais sutil, a inativação da SCP e do HDM também atenua a expressão da memória aversiva, já que ambas preveniram o aparecimento da tolerância à primeira exposição em ratos tratados com benzodiazepínicos (BERTOGLIO et al, 2005; FILE et al, 1999). Os núcleos da amígdala recebem informações convergentes sobre estímulos condicionados e incondicionados e armazenam memórias associativas a esses estímulos (LEDOUX, 2000). Lesões na amígdala após o condicionamento de medo inibem a expressão do medo previamente aprendido (ANGLADA-FIGUEROA & QUIRK, 2005), bem como as respostas frente ao predador (BLANCHARD & BLANCHARD, 1972). Assim, a amígdala também parece ser necessária para a evocação de respostas de medo. Em acordo com o resultado encontrado no presente

estudo no modelo de ansiedade incondicionada (Fig. 10A, C e D), a atividade do CPFvm tem sido largamente implicada na expressão de memórias aversivas condicionadas (LIANG et al, 1996; BLUM et al, 2006; RESSTEL et al, 2006; SIERRA-MERCADO et al, 2006; CORCORAN & QUIRK, 2007). Considerando a importância do CPFvm na tomada de decisão, uma visão um tanto simplista postularia que se no reteste do LCE ocorre mudança no estado emocional do animal e o mesmo opta por permanecer nos braços fechados, a inibição da estrutura responsável pela tomada de decisão, levaria o animal a explorar novamente o ambiente, prejudicando dessa maneira, a evocação do aprendizado adquirido durante o teste. Além disso, a existência de uma expressão aumentada de proteína Fos no CPFvm de ratos expostos ao reteste do LCE concorda com o resultado encontrado, mostrando que existe um recrutamento dessa região na segunda exposição ao LCE (ALBRECHT-SOUZA et al, 2008), e quando a mesma está inativada o animal comporta-se como no primeiro dia de teste. Os resultados obtidos no experimento 3 demonstram que para a tarefa executada no reteste do LCE a atividade do CPFvm também é importante, já que o bloqueio dessa região 1 min antes do reteste permitiu que o animal apresentasse um perfil comportamental semelhante a um animal sem experiência-prévia no LCE.

Em vista dos resultados obtidos com o bloqueio temporário do CPFvm, procuramos investigar quais os possíveis receptores envolvidos naquelas respostas.

Devido ao fato das memórias emocionais estarem associadas a uma sinalização noradrenérgica aumentada, via receptores do tipo beta, muito se tem investigado sobre a participação dos mesmos nos processos de consolidação e extinção de memórias condicionadas (RODRIGUEZ-ROMAGUERA et al, 2009). A infusão de atenolol, um antagonista dos receptores noradrenérgicos do tipo beta-1, no CPFvm produziu um efeito do tipo ansiolítico no LCE sem prejudicar a aquisição ou a evocação da experiência aversiva do teste (Fig. 11A, C e D). Estudos farmacológicos mostraram que os receptores beta-adrenérgicos são importantes em estágios tardios da formação da memória: ratos que receberam infusão intracerebral de um antagonista beta-adrenérgico após a sessão de aprendizado apresentaram um prejuízo na memória após 48 h (SARA, 2009). Apesar do papel fundamental do CPFvm para a evocação da memória incondicionada, os receptores do tipo beta-1 adrenérgicos presentes nessa área parecem não

apresentar a mesma função nesse modelo, demonstrando que no paradigma do LCE, receptores distintos controlam memória e ansiedade.

Em ratos testados em modelos de ansiedade incondicionada, o propranolol, um antagonista dos receptores beta com ação central, administrado via *i.p.* reduz a ansiedade no LCE e evita o aparecimento da tolerância dos benzodiazepínicos à primeira exposição e reduz a ansiedade no campo aberto (ANGRINI et al, 1998; STERN et al, 2008), além disso, reduz o medo incondicionado no modelo do odor de gato (DO-MONTE et al, 2008). Em modelos de medo condicionado, o propranolol é capaz de reduzir o congelamento na primeira exposição ao contexto sem alterar a extinção do mesmo, e atenua a aquisição, consolidação e expressão do medo no modelo de condicionamento olfatório de medo (KROON & CAROBREZ, 2009; RODRIGUEZ-ROMAGUERA et al, 2009). Além dos achados comportamentais, foi visto que a administração via *i.p.* do mesmo antagonista foi capaz de reduzir a atividade dos neurônios da região pré-límbica do CPF (RODRIGUEZ-ROMAGUERA et al, 2009). Em humanos, o propranolol reduz estágios agudos de alarme, testes de ansiedade e medo condicionado (BRANTIGAN et al, 1982; GRILLON et al, 2004) e tem sido prescrito para reduzir os sintomas somáticos (aumento da pressão sanguínea, angina peitoral, ritmo cardíaco irregular) e psicológicos (ansiedade social) presentes no transtorno do estresse pós-traumático (TOLLENAAR et al, 2009). Apesar das evidências demonstrando a participação desses receptores tanto nos processos emocionais como nos cognitivos, nossos resultados substanciam a importância dos receptores beta-1 apenas no controle emocional. Talvez o controle cognitivo feito por esses receptores seja mediado por outras estruturas, como a amígdala, a qual também possui uma atividade neuronal reduzida após a injeção de propranolol.

A escopolamina é uma droga que classicamente prejudica o aprendizado e a memória. No entanto, a dose escolhida desse antagonista muscarínico, quando injetada no CPFvm, não foi capaz de alterar nenhum comportamento avaliado no LCE (Fig. 11A, C e D). Tanto os comportamentos relacionados à ansiedade, como os índices que indicam algum prejuízo de aprendizado ou memória não foram afetados. No entanto, quando administrada via *i.p.*, essa droga reduz os comportamentos relacionados à ansiedade e previne a expressão da tolerância à primeira exposição (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2004). Os resultados obtidos confirmam em parte estudos de Wall et al (2001), no qual a microinjeção de escopolamina 10,0 nmol no CPFvm de camundongos não produziu nenhum efeito comportamental no LCE,

enquanto que a dose de 20,0 nmol resultou em um efeito ansiogênico acompanhado de aumento na atividade locomotora. Essa dose de escopolamina, no entanto, impediu o aparecimento da tolerância à primeira exposição. Quando um antagonista M1 seletivo foi injetado no CPFvm, no entanto, baixas doses produziram um efeito ansiolítico, sugerindo a participação dos receptores M1 do CPFvm de camundongos na modulação da ansiedade (WALL et al, 2001; WALL & MESSIER, 2002).

Em modelos de medo condicionado, a microinjeção de escopolamina no CPFvm de ratos foi capaz de prejudicar a expressão da esQUIVA adquirida no treino da esQUIVA passiva (GIOVANNINI et al, 2005). O bloqueio dos receptores muscarínicos também prejudicou o aprendizado e a memória no labirinto aquático, labirinto radial e no labirinto em T elevado (MCNAUGHTON & MORRIS, 1987; BOLHUIS et al, 1988; DE-MELLO & CAROBREZ, 2002).

Os receptores de glutamato do tipo NMDA possuem um papel central nos mecanismos neurobiológicos da ansiedade, do aprendizado e memória (BARKUS et al, 2010). O resultado do bloqueio dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no CPFvm (Fig. 11A e C) reforça dados da literatura que mostram a importância desse sistema nas respostas emocionais. Estruturas encefálicas no lobo temporal medial como o hipocampo e amígdala constituiriam a interface entre emoção e cognição e são prováveis estruturas onde os receptores NMDA podem exercer os efeitos na emocionalidade (BARKUS et al, 2010). De fato, a infusão de AP5 na porção ventral do hipocampo aumenta a exploração dos braços abertos do LCE (NASCIMENTO-HÄCKL & CAROBREZ, 2007), efeito também observado após a infusão de AP5 na SCP dorsal (KINCHESKI & CAROBREZ, 2010). Os resultados encontrados nessa etapa do trabalho mostram que, no CPFvm, esse tipo de receptor também é importante para a expressão do comportamento emocional, enquanto que nos processos relacionados ao aprendizado e expressão da memória aversiva de respostas incondicionadas, pelo menos na dose utilizada, a participação não parece ser tão relevante, enquanto que na expressão de respostas condicionadas de medo, os receptores do tipo NMDA presentes no CPFvm são requeridos (SANTINI et al, 2001; RESSTEL et al, 2008). A injeção do mesmo antagonista na SCP dorsal, antes do reteste do LCE, bloqueou a expressão do aprendizado aversivo (KINCHESKI & CAROBREZ, 2010) e ratos que receberam injeção via *i.p.* de midazolam antes do reteste e que estavam sob efeito da inibição

da SCP dorsal com lidocaína, não apresentaram o fenômeno de tolerância à primeira exposição (BERTOGLIO et al, 2005).

Entre as hipóteses que tentam elucidar o porquê da perda do efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos durante o reteste do LCE está a ocorrência da aquisição de uma resposta de medo aos braços abertos. A hipótese acima e os resultados descritos concordam com a teoria de McNaughton & Corr (2004), a qual relata que diferentes estruturas encefálicas controlam medo e ansiedade, e que, embora a ansiedade tenha uma grande representação neural rostral, como estruturas corticais incluindo o CPF, a SCP e o hipotálamo, estes seriam os componentes de menor hierarquia desse sistema, controlando comportamentos de medo. Assim, no reteste e com a atividade do CPFvm íntegra, após uma contextualização inicial da tarefa, essa duas regiões determinariam a melhor resposta comportamental, caracterizando um controle ascendente do comportamento defensivo (BERTOGLIO et al, 2005).

Dados da literatura mostram que a inativação do hipocampo dorsal com lidocaína antes do reteste foi capaz de aumentar a exploração dos braços abertos nesse momento (BERTOGLIO et al, 2006). No entanto, a administração de AP5, tanto em baixas como em altas doses, nessa mesma porção do hipocampo não foi capaz de mimetizar os efeitos da inativação temporária (NASCIMENTO-HÄCKL & CAROBREZ, 2007). Curiosamente, intervenções específicas nem sempre reproduzem os efeitos causados pela completa inativação da estrutura. Uma vez que o recrutamento de áreas corticais no LCE é conhecido, já que a expressão de proteína Fos no CPFvm no reteste é mais pronunciado do que no teste (ALBRECHT-SOUZA et al, 2008), é possível criar a hipótese de que, quando uma estrutura é totalmente inativada, os efeitos sobre a expressão de alguns comportamentos podem ser observados, no entanto, o bloqueio de alguns receptores específicos pode não ser o suficiente para a obtenção do mesmo efeito, sendo pelo não envolvimento daquele receptor na resposta esperada, ou pela necessidade de ação sinérgica de mais de uma sistema de neurotransmissão ou mesmo, por mecanismos compensatórios.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o envolvimento do CPFvm é importante nas respostas de ansiedade incondicionada e também na expressão da memória emocional relacionada ao evento aversivo, e que sistemas de neurotransmissão diferentes são requeridos nas respostas puramente emocionais e nas respostas cognitivo-emocionais.

Também foi possível confirmar que o protocolo do teste/reteste do LCE é uma importante ferramenta para o estudo da ansiedade incondicionada. Não apenas o componente emocional, como também o componente cognitivo relacionado ao evento aversivo no mesmo animal, o qual seria um dos substratos para o desenvolvimento de doenças psiquiátricas. Dessa maneira, alguns componentes dos distúrbios de ansiedade podem ser avaliados nesse modelo.

Por fim, esse trabalho contribui para o entendimento do funcionamento do CPFvm nas emoções geradas frente à ambientes ameaçadores e também qual a contribuição desta estrutura para a lembrança de um evento aversivo. Como o CPFvm é altamente implicado no desenvolvimento do transtorno do estresse pós-traumático em humanos, é de grande valia esclarecermos qual a real importância dessa área na ansiedade e nos transtornos causados por essa emoção.

7. REFERÊNCIAS

ACQUAS, E.; WILSON C.; FIBIGER, H.C. Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear. *Journal of Neuroscience*, v. 16, p. 3089-96, 1996.

AKIRAV, I.; MAROUN, M. Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cerebral Cortex*, v. 16, p. 1759-65, 2006.

ALBRECHET-SOUZA, L.; BORELLI, K. G.; BRANDÃO, M. L. Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 169 p. 109-18, 2008.

ANGLADA-FIGUEROA, D.; QUIRK, G. J. Lesions of the basal amygdala block expression of conditioned fear but not extinction. *Journal of Neuroscience*, v. 25, p. 9680-5, 2005.

ANGRINI, M.; LESLIE, J. C.; SHEPHARD, R. A. Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 59, p. 387-97, 1998.

ARNSTEN, A. F. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nature Review Neuroscience*, v. 10, p. 410-22, 2009.

BARKER, G. R.; WARBURTON, E. C. NMDA receptor plasticity in the perirhinal and prefrontal cortices is crucial for the acquisition of long-term object-in-place associative memory. *Journal of Neuroscience*, v. 28, p. 2837-44, 2008.

BARKUS, C.; MCHUGH, S. B.; SPRENGEL, R.; SEEBURG, P. H.; RAWLINS, J. N.; BANNERMAN, D. M. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. *European Journal of Pharmacology*, v. 626, p. 49-56, 2010.

BENINGER, R. J.; INGLES, J. L.; MACKENZIE, P. J.; JHAMANDAS, K.; BOEGMAN, R. Muscimol injections into the nucleus basalis magnocellularis of rats: selective impairment of working memory in the double Y-maze. *Brain Research*, v. 597, p. 66-73, 1992.

BERNSTON, G. G.; SARTER, M.; CACIOPPO, J. T. Anxiety and cardiovascular reactivity: the basal forebrain cholinergic link. *Behavior Brain Research*, v. 94, p. 225-48, 1998.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, v. 73, p. 963-9, 2002.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2. *Behavioral Pharmacology*, v. 15, p. 45-54, 2004.

BERTOGLIO, L. J.; ANZINI, C.; LINO-DE-OLIVEIRA, C., CAROBREZ, A. P. Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteracts the anxiolytic response to midazolam on the elevated plus-maze Trial 2 in rats. *Behavior Brain Research*, v. 162, p. 99-107, 2002.

BERTOGLIO, L. J.; JOCA, S. R.; GUIMARÃES, F. S. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behavior Brain Research*, v. 175, p. 183-8, 2006.

BELZUNG, C., GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavior Brain Research*. v. 125, p. 141-149, 2001.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, v. 81, p. 281-90, 1972.

BLANCHARD RJ, YUDKO EB, RODGERS RJ, BLANCHARD DC. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavior Brain Research*. v. 58, p 155-165, 1993.

BLANCO, E.; CASTILLA-ORTEGA, E.; MIRANDA, R.; BEGEGA,

- A.; AGUIRRE, J. A.; ARIAS, J. L.; SANTÍN, L. J. Effects of medial prefrontal cortex lesions on anxiety-like behaviour in restrained and non-restrained rats. *Behavior Brain Research*, v. 201, p. 338-42, 2009.
- BLUM, S.; HEBERT, A. E.; DASH, P. K. A role for the prefrontal cortex in recall of recent and remote memories. *NeuroReport*, v. 17, p. 341-4, 2006.
- BOLHUIS, J. J.; STRIJKSTRA, A. M.; KRAMERS, R. J. Effects of scopolamine on performance of rats in a delayed-response radial maze task. *Physiology Behavior*, v. 43, 403-9, 1988.
- BOLLES RC, FANSELOW MS (). A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behavioral Brain Science*. v. 3, p. 281-323, 1980.
- BRANTIGAN, C. O.; BRANTIGAN, T. A.; JOSEPH, N. Effect of beta blockade and beta stimulation on stage fright. *American Journal of Medicine*, v. 72, p. 88-94, 1982.
- CAHILL, L.; PRINS, B.; WEBER, M.; MCGAUGH, J. L. Beta-adrenergic activation and memory for emotional events. *Nature*, v. 371, p. 702-704, 1994.
- CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, v. 29; p. 1193-205, 2005.
- CARVALHO, M. C.; ALBRECHET-SOUZA, L.; MASSON, S.; BRANDÃO, M. L. Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. *Brazilian Journal of Medical and Biological research*, v.38, p. 1857-66, 2005.
- CLEMENT, Y.; CALATAYUD, F.; BELZUNG, C. Genetic basis of anxiety-like behaviour: a critical review. *Brain Research Bulletin*. v. 57, p. 57-71, 2002.

CORCORAN, K. A.; QUIRK, G. J. Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *Journal of Neuroscience*, v. 27, p. 840-4, 2007.

COTMAN, C. W.; MONAGHAN, D. T. Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, v. 11, p. 61-80, 1998.

DAVIS, M.; WALKER, D. L.; MILES, L.; GRILLON, C. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology*. v. 35, p. 105-35, 2010.

DEACON, R. M.; PENNY, C.; RAWLINS, J. N. Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. *Behavior Brain Research*, v. 139, p. 139-55, 2003.

DE BLASI, A. Beta-adrenergic receptors: structure, function and regulation. *Drugs Experimental Clinical Research*, v. 16, p. 107-12, 1990.

DELGADO, M. R.; NEARING, K. I.; LEDOUX, J. E. & PHELPS, E. A. Neural Circuitry Underlying the Regulation of Conditioned Fear and Its Relation to Extinction. *Neuron*, v. 59, p. 829-838, 2008.

DE-MELLO, N.; CAROBREZ, A. P. Elevated T-maze as an animal model of memory: effects of scopolamine. *Behavioral Pharmacology*, v. 13, p. 139-48, 2002.

DESOUSA, N. J.; BENINGER, R. J.; JHAMANDAS, K.; BOEGMAN, R. J. Stimulation of GABAB receptors in the basal forebrain selectively impairs working memory of rats in the double Y-maze. *Brain Research*, v. 641, p. 29-38, 1994.

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

DIELENBERG, R. A.; MCGREGOR, I. S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, v. 25, p. 597-609, 2001

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

DUNCAN, G. E.; KNAPP, D. J.; BREESE, G. R. Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Research*, v. 713, p. 79-91, 1996.

FALLON, J. H.; LOUGHLIN, S. E. Monoamine innervation of cerebral cortex and a theory of the role of monoamines in cerebral cortex and basal ganglia.

JONES & A. PETERS, *Cerebral Cortex*, v. 6, Nova Iorque, NY: Plenum, p. 41 – 127, 1987.

FANSELOW M. S. Associative vs topographical accounts of the immediateshock-freezing deficit in rats: Implication for the response selection rules governing species-specific defensive reactions. *Learning Motivation*. v. 17, p. 16–39, 1986.

FERNANDES, K. B.; TAVARES, R. F.; PELOSI, G. G.; CORRÊA, F. M. The paraventricular nucleus of hypothalamus mediates the pressor response to noradrenergic stimulation of the medial prefrontal cortex in unanesthetized rats. *Neuroscience Letters*, v. 426, p. 101-5, 2007.

FILE, S. E. Behavioral detection of anxiolytic action. In: Elliott, J.M., Heal, D.J., Marsden, C.A. (Eds.) *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. Wiley: New York, pp. 25–44, 1992.

FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E.; GALLANT, R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology*, v. 19, p. 397-405, 1998.

FILE S. E.; GONZALEZ L. E.; GALLANT R. Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. *Neuropsychopharmacology*. v. 21, p. 312-20, 1999.

FLOYD N. S.; PRICE J. L.; FERRY A. T.; KEAY K. A.; BANDLER

R. Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. v. 422, p. 556-78, 2000.

FUSTER J. M. *The Prefrontal Cortex*. Amsterdam: Elsevier. 2008.

GARAKANI A.; MATHEW S. J.; CHARNEY D. S. Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. *Mont Sinai Journal of Medicine*. v. 73, p. 941-92, 2006.

GAYKEMA R. P.; GAÁL G.; TRABER J.; HERSH L. B.; LUITEN P. G. The basal forebrain cholinergic system: efferent and afferent connectivity and long-term effects of lesions. *Acta Psychiatrica Scandinavica Supplementum*. v. 366, p.14-26, 1991.

GIOVANNINI M. G.; RAKOVSKA A.; BENTON R. S.; PAZZAGLI M.; BIANCHI L.; PEPEU G. Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA, and glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. *Neuroscience*. v. 106, p. 43-53, 2001.

GIOVANNINI M. G.; PAZZAGLI M.; MALMBERG-AIELLO P.; DELLA CORTE L.; RAKOVSKA A. D.; CERBAI F.; CASAMENTI F.; PEPEU G. Inhibition of acetylcholine-induced activation of extracellular regulated protein kinase prevents the encoding of an inhibitory avoidance response in the rat. *Neuroscience*. v. 136, p. 15-32, 2005.

GOLDMAN-RAKIC P. S. Regional and cellular fractionation of working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 93, p. 13473-80, 1996.

GRAEFF, F. G. Ansiedade. In: Graeff FG, Brandão ML (Eds.). *Neurobiologia das doenças mentais*, 5º ed. São Paulo, Lemos, p. 135 – 178, 1999.

GRANT E. C.; MACKINTOSH J. H. A comparison of the social postures of some common laboratory rodents. *Behaviour*. v. 21, p. 246-259, 1963.

GRAY, JA, MCNAUGHTON N. *The neuropsychology of Anxiety*.

Oxford: Oxford University Press, p.1- 424, 2000.

GRILLON C.; CORDOVA J.; MORGAN C. A.; CHARNEY D. S.; DAVIS M. Effects of the beta-blocker propranolol on cued and contextual fear conditioning in humans. *Psychopharmacology*. v. 175, p. 342–352, 2004.

HANDLEY S. L.; MITHANI S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*. v. 327, p. 1-5, 1984.

HASSELMO M. E. Neuromodulation and cortical function: modeling the physiological basis of behavior. *Behavior Brain Research*. v. 67, p. 1-27, 1995.

HEIDBREDER C. A.; GROENEWEGEN H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and Biobehavioral Review*. v. 27, p. 555-79, 2003

HETEM, L. A. B.; GRAEFF, FG. *Ansiedade e Transtornos de Ansiedade*. Editora Científica Nacional, Rio de Janeiro, 1997.

IZQUIERDO A.; MURRAY E. A. Opposing effects of amygdala and orbital prefrontal cortex lesions on the extinction of instrumental responding in macaque monkeys. *European Journal of Neuroscience*. v. 22, p. 2341 – 2346, 2005.

IZQUIERDO L. A.; BARROS D. M.; DA COSTA J. C.; FURINI C.; ZINN C.; CAMMAROTA M.; BEVILAQUA L. R.; IZQUIERDO I. A link between role of two prefrontal areas in immediate memory and in long-term memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*. v. 88, p. 160-6, 2007.

JINKS A. L.; MCGREGOR I. S. Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Research*. v. 772, p.181-90,1997.

KAESERMANN H. P. Stretched attend posture, a non-social form of

ambivalence, is sensitive to a conflict-reducing drug action. *Psychopharmacology* (Berl). v. 89, p. 31-7, 1986.

KALUEFF A. V.; WHEATON M.; MURPHY D. L. What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. *Behavior Brain Research*. v. 179, p. 1-18, 2007.

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

KRETZ R. Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. *Journal of Neuroscience Methods*. v. 11, p, 129-35, 1984.

KROON J. A.; CAROBREZ A. P. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, propranolol or scopolamine. *Neurobiology of Learning and Memory*. v. 91, p. 32-40, 2009.

KRYSTAL J. H.; KARPER L. P.; SEIBYL J. P.; FREEMAN G. K.; DELANEY R.; BREMNER J. D.; HENINGER G. R.; BOWERS JR M. B.; CHARNEY D. S. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Archives of General Psychiatry*. v. 51, p. 199-214, 1994.

KOENIGS M.; GRAFMAN J. Posttraumatic Stress Disorder: The role of medial Prefrontal Cortex and Amygdala. *Neuroscientist*. v. 15, p. 540-8, 2009.

LAMPREA M. R.; CARDENAS F. P.; SILVEIRA R.; MORATO S.; WALSH T. J. Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. *Behavior Brain Research*. v. 117, p. 97-105, 2000.

LEDOUX J. E. Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*. v. p. 155-84, 2000.

LIANG K. C.; HU S. J.; CHANG S. C. Formation and retrieval of inhibitory avoidance memory: differential roles of glutamate receptors

in the amygdala and medial prefrontal cortex. *Chinese Journal of Physiology*.v. 39, p.155-66, 1996.

LISTER R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*.v. 92, p. 180-5, 1987.

MCGAUGH, J. L. Memory – a century of consolidation. *Science*. V. 287, p. 248 – 251, 2000.

MCKINNEY M. Muscarinic receptor subtype-specific coupling to second messengers in neuronal systems. *Progress in Brain Research*. v. 98, p. 333-340, 1993.

MCNAUGHTON N.; MORRIS R. G. Chlordiazepoxide, an anxiolytic benzodiazepine, impairs place navigation in rats. *Behavior Brain Research*. v. 24, p. 39-46, 1987.

MCNAUGHTON N.; CORR P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Review*. v. 28, p. 285-305, 2004.

MELDRUM B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition*. v. 130, p. 1007S-15S, 2000.

MELDRUM B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *Journal Nutr*. v. 130, p. 1007S-15S, 2000.

MELLO E SOUZA T.; VIANNA M. R.; RODRIGUES C.; QUEVEDO J.; MOLETA B. A.; IZQUIERDO I. Involvement of the medial precentral prefrontal cortex in memory consolidation for inhibitory avoidance learning in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. v. 66, p. 615-22, 2000.

MÉNDEZ-LÓPEZ M.; MÉNDEZ M.; LÓPEZ L.; ARIAS J. L. Spatial working memory in Wistar rats: brain sex differences in metabolic activity. *Brain Research Bulletin*. v. 79, p. 187-92, 2009.

MILAD, M. R.; RAUCH, S. L.; PITMAN, R. K.; QUIRK, G. J. Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety

disorders. *Biology Psychology*. v. 73, p. 61-71, 2006.

MILLAN M. J. The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology*. v. 70, p. 83-244, 2003.

MILLER M. M.; MCEWEN B. S. Establishing an agenda for translational research on PTSD. *Annual New York Academy of Science*. v. 1071, p. 294-312, 2006.

MOGHADDAM B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *Journal of Neurochemistry*. v. 60, p. 1650–1657, 1993.

MOLEWIJK H. E.; VAN DER POEL A. M.; OLIVIER B. The ambivalent behaviour "stretched approach posture" in the rat as a paradigm to characterize anxiolytic drugs. *Psychopharmacology (Berl)*. v. 121, p. 81-90, 1995.

MONTGOMERY K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. The *Journal of Comparative and physiological psychology*. v. 48, p. 254-260, 1955.

MORGAN M. A.; ROMANSKI L. M.; LEDOUX J. E. Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. *Neuroscience Letters*. v. 163, p. 109–113, 1993.

MORGAN M. A.; LEDOUX J. E. Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Behavior Neuroscience*. v. 109, p. 681 –688, 1995.

MORGAN M. A.; LEDOUX J. E. Contribution of ventrolateral prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*. v. 72, p. 244 – 251, 1999.

MORRISON J. H.; MAGISTRETTI P. J. Monoamines and peptides in cerebral cortex. Contrasting principles of cortical organization. *Trends in Neuroscience*. v. 6, p. 146 – 151, 1983.

MORRISON J. H.; MOLLIVER M. E.; GRZANNA R. Noradrenergic

innervation of cerebral cortex: widespread effects of local cortical lesions. *Science*. v. 205, p. 313 – 316, 1979.

MUIGG P.; HETZENAUER A.; HAUER G.; HAUSCHILD M.; GABURRO S.; FRANK E.; LANDGRAF R.; SINGEWALD N. Impaired extinction of learned fear in rats selectively bred for high anxiety--evidence of altered neuronal processing in prefrontal-amygdala pathways. *European Journal of Neuroscience*. v. 28, p. 2299-309, 2008.

NASCIMENTO-HÄCKL, L. P.; CAROBREZ, A. P. Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*. v. 88, p. 177-85, 2007.

NAGAHARA A. H.; HANDA R. J. Fetal alcohol exposure alters the induction of immediate early gene mRNA in the rat prefrontal cortex after an alternation task. *Alcohol Clinical Experimental Research*. v. 19, p. 1389-97, 1995.

NEMEROFF C. B.; BREMNER J. D.; FOA E. B.; MAYBERG H. S.; NORTH C. S.; STEIN M. B. Posttraumatic stress disorder: a state-of-the-science review. *Journal of Psychiatric Research*. v. 40, p. 1-21, 2006.

NESSE R. M. Proximate and evolutionary studies of anxiety, stress and depression: synergy at the interface. *Neuroscience and Biobehavioral review*. v. 23, p. 895-903, 1999.

ORDWAY G. A. *Brain Norepinephrine: Neurobiology and Therapeutics*. Cambridge University Press: 2007.

PADOVAN C. M.; GUIMARÃES F. S. Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. v. 77, p. 15-9, 2004.

PAXINOS G.; WATSON C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego: 2009.

PEREGRINO A. Ansiedade normal e patológica. In: Hetem LAB, Graeff FG (Eds.). *Ansiedade e transtornos de ansiedade*. Rio de Janeiro:

Editora Científica Nacional, p 3-1, 1997.

QUIRK G. J.; RUSSO G. K.; BARRON J. L.; LEBRON K. The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. *Journal of Neuroscience*. v. 20, p. 6225–6231, 2000.

RAINBOW T. C.; PARSONS B.; WOLFE B. B. Quantitative autoradiography of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 81, p. 1585-9, 1984.

RESSTEL L. B.; FERNANDES K. B.; CORRÊA F. M. Medial prefrontal cortex modulation of the baroreflex parasympathetic component in the rat. *Brain Research*. v. 1015, p. 136-44, 2004.

RESSTEL, L. B.; JOCA, S. R.; GUIMARÃES, F. G.; CORRÊA, F. M. Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience*. v. 143, p. 377-85, 2006.

RESSTEL L. B.; SOUZA R. F.; GUIMARÃES F. S. Anxiolytic-like effects induced by medial prefrontal cortex inhibition in rats submitted to the Vogel conflict test. *Physiology Behavior*. v. 93, p. 200-5, 2008.

RESSTEL, L. B.; CORRÊA, F. M.; GUIMARÃES, F. S. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*. V. 18, p. 2027-35, 2008.

RODGERS R. J. Animal models of 'anxiety': where next? *Behavioral Pharmacology*. V. 8, p. 477–496, 1997.

RODGERS R. J.; COLE J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S.J., Hendrie, C.A. (Eds.), *Ethology and Psychopharmacology*. Wiley: Chichester, pp. 9–44, 1994.

RODRIGUEZ-ROMAGUERA J.; SOTRES-BAYON F.; MUELLER D.; QUIRK G. J. Systemic propranolol acts centrally to reduce conditioned fear in rats without impairing extinction. *Biology Psychiatry*. v. 65, p. 887-92, 2009.

SANTINI, E.; MULLER, R. U.; QUIRK, G. J. Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *Journal of Neuroscience*. v. 21, p. 9009-17, 2001.

SARA S. J. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nature Review Neuroscience*. v. 10, p. 211-23, 2009.

SHAH A. A.; TREIT D. Excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex attenuate fear responses in the elevated-plus maze, social interaction and shock probe burying tests. *Brain Research*. v. 18, p. 183-94, 2003.

SHAH A. A.; TREIT D. Infusions of midazolam into the medial prefrontal cortex produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze and shock-probe burying tests. *Brain Research*. v. 996, p. 31-40, 2004.

SHAH A. A.; SJOVOLD T.; TREIT D. Inactivation of the medial prefrontal cortex with the GABAA receptor agonist muscimol increases open-arm activity in the elevated plus-maze and attenuates shock-probe burying in rats. *Brain Research*. v. 1028, p. 112-5, 2004.

SHIN L. M.; RAUCH S. L.; PITMAN R. K. Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. *Annual New York Academy Science*. v. 1071, p. 67-79, 2006.

SIERRA-MERCADO D. JR.; CORCORAN K. A.; LEBRÓN-MILAD K.; QUIRK G. J. Inactivation of the ventromedial prefrontal cortex reduces expression of conditioned fear and impairs subsequent recall of extinction. *European Journal of Neuroscience*. v. 24, p. 1751-8, 2006.

SULLIVAN R. M.; GRATTON A. Behavioral effects of excitotoxic lesions of ventral medial prefrontal cortex in the rat are hemisphere-dependent. *Brain Research*. v. 927, p. 69-79, 2002.

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

TOLLENAAR M. S.; ELZINGA B. M.; SPINHOVEN P.; EVERAERD W. Psychophysiological responding to emotional memories in healthy young men after cortisol and propranolol administration.

Psychopharmacology. v. 203, p. 793–803, 2009.

UYLINGS H. B. M.; VAN EDEN C. G. Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. In: HBM Uylings, CG Van Eden, JPC De Bruin, MA Corner, MGP Feenstra, *The Prefrontal Cortex: Its Structure, Function and Pathology*. Amsterdam: Elsevier, pp. 31 – 62. 1990.

VAN STEGEREN A. H. The role of the noradrenergic system in emotional memory. *Acta Psychologica*. v. 127, p. 532-41, 2008.

VERTES R. P. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience*. v. 142, p. 1-20, 2006.

WALL P. M.; FLINN J.; MESSIER C. Infralimbic muscarinic M1 receptors modulate anxiety-like behaviour and spontaneous working memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. v. 155, p. 58-68, 2001.

WALL P. M.; MESSIER C. Infralimbic kappa opioid and muscarinic M1 receptor interactions in the concurrent modulation of anxiety and memory. *Psychopharmacology (Berl)*. v. 160, p. 233-44, 2002.

WANG H. T.; HAN F.; GAO J. L.; SHI Y. X. Increased Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase in the Medial Prefrontal Cortex of the Single-Prolonged Stress Rats. *Cell Molecular Neurobiology*. 2009 Oct 9.

WESS J. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit. Review Neurobiology*. V. 10, p. 69-99, 1996.

WEISS S. M.; LIGHTOWLER S.; STANHOPE K. J.; KENNETT G. A.; DOURISH C. T. Measurement of anxiety in transgenic mice. *Review of Neuroscience*. v. 11, p. 59–74, 2000.

YOON T.; OKADA J.; JUNG M. W.; KIM J. J. Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. *Learning and Memory*. v. 15, p. 97-105, 2008.