

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

Grasielle Clotildes Kincheski

**CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO AVERSIVO INDUZIDO
PELA ESTIMULAÇÃO QUÍMICA DA MATÉRIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSOLATERAL DE RATOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia do Centro
de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
doutor em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua
Carobrez

Florianópolis

2011

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

K51c Kincheski, Grasielle Clotildes
Condicionamento olfatório aversivo induzido pela
estimulação química da matéria cinzenta periaquedutal
dorsolateral de ratos [tese] / Grasielle Clotildes Kincheski ;
orientador, Antônio de Pádua Carobrez. -Florianópolis,
SC, 2011.
122 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Condicionamento olfatório aversivo.
3. Substância Cinzenta Periaquedutal. 4. Serotonina. 5. Rato
como animal de laboratório. I. Carobrez, Antonio de Padua.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez pelo compromisso com o desenvolvimento do programa de pós-graduação e pela dedicação na formação dos alunos do programa. Obrigada por querer sempre o meu bem e mostrar a grandiosidade da ciência através da sua orientação, conselhos e amizade.
- A todos os professores do Departamento de Farmacologia pela acessibilidade e competência em repassar seus conhecimentos.
- Aos professores Dr. Frederico Guilherme Graeff, Dr. Víctor Alejandro Molina, Dr. Reinaldo Naoto Takahashi, Dr. André de Ávila Ramos e Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima pelas sugestões e discussões que contribuíram para o aprimoramento desta tese.
- Aos professores Dr. Newton Sabino Canteras, Dra. Sandra Regina Mota-Ortiz e Dra. Marcia Harumi Sukikara pela colaboração e por despertar em mim o desejo de conhecer melhor o mundo das conexões neuroanatômicas.
- Aos amigos: Fabrício, Eloisa, Rimenez, Juliana Kroon, Juliana Cavalli, Cristiane, Frank e Karina pela convivência harmoniosa e divertida, discussão científica e ajuda na realização das tarefas.
- As colaboradoras: Sandra, Marcia, Silvia e Eloisa pelo empenho e envolvimento na execução dos experimentos.
- Minha gratidão especial aos meus familiares e ao Pablo pelo apoio, amizade e pelo amor incondicional.
- Ao CNPQ e CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Palavras-chaves: condicionamento olfatório aversivo, matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral, NMDA, serotonina.

Pistas olfatórias associadas a estímulos aversivos são capazes de ativar estruturas neurais relacionadas ao comportamento defensivo (CD), incluindo a parte dorsolateral da matéria cinzenta periaquedutal (MCPdl). A estimulação química da MCPdl em ratos possui um caráter motivacional aversivo, relacionado com as emoções de medo/ansiedade. Desta forma, o presente estudo foi delineado para verificar a hipótese de que o estado aversivo induzido pela estimulação química da MCPdl poderia ser usado como um estímulo incondicionado (EI), em um condicionamento olfatório aversivo (COA). Além disso, a natureza aversiva deste condicionamento foi avaliada em ratos tratados com midazolam (MDZ), um benzodiazepínico, ou quando microinjetados com DPAT ou WAY na MCPdl, agonista e antagonista dos receptores 5-HT_{1A} da serotonina, respectivamente. Ainda, o bloqueio dos adrenoceptores do tipo beta no núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) e a lesão da parte ventral do núcleo anteromedial do tálamo (AMv) e do núcleo reuniens (RE) foram realizados para investigar as vias anatômicas envolvida neste COA induzido pela estimulação química da MCPdl. O presente estudo confirmou a hipótese de que a estimulação química da MCPdl com NMDA 100 pmol pode ser usado como EI biologicamente relevante, capaz de propiciar um COA. Neste COA, o tratamento com MDZ prejudicou a aquisição e a expressão dos CDs, enfatizando o potencial do modelo em prever respostas relacionadas à ansiedade. Em relação à modulação serotoninérgica na MCPdl, DPAT nas doses de 4 e 8 nmol prejudicou a aquisição do COA, enquanto que WAY 7 nmol promoveu um aumento dos CDs durante a sessão de familiarização, ou seja, uma generalização dos CDs. Além disso, DPAT na dose de 4 nmol facilitou a aquisição do COA quando uma dose maior de NMDA (200 nmol) foi administrada na MCPdl, assim como WAY 7 nmol facilitou a aquisição do COA quando uma dose menor de NMDA (50 pmol) foi microinjetada na MCPdl. Desta forma, os resultados demonstraram que os receptores 5-HT_{1A} na MCPdl podem modular o aprendizado induzido pela estimulação desta estrutura em um COA. Por fim, os resultados também destacaram uma via da MCPdl para o núcleo hipotalâmico anterior (AHN), do AHN para o PMd e, do AHN e PMd para o tálamo (AMV + RE). Esta foi a via ascendente proposta, pela qual a MCPdl pode estar interagindo com estruturas mais rostrais no cérebro durante o aprendizado. Deste modo, este trabalho forneceu uma perspectiva interessante da participação da MCPdl na circuitaria envolvida no condicionamento aversivo, sugerindo que esta

estrutura de fato é mais que uma via comum e final das reações defensivas e que pode interagir com outra área associativas, modificando o processamento das informações. Desta maneira, a MCPdl parece desempenhar um papel no desenvolvimento dos transtornos de ansiedade, uma vez que sua atividade pode modificar o processamento das informações e desencadear o aparecimento de respostas defensivas a estímulos genuinamente não ameaçadores.

ABSTRACT

Keywords: olfactory fear conditioning, dorsolateral part of the periaqueductal gray matter, NMDA, serotonin.

Aversive olfactory cues are able to activate neural structures related to defensive behavior (DB) including the dorsolateral part of the periaqueductal gray matter (dIPAG). The chemical stimulation of dIPAG in rats evokes DB as the result of internal mood alterations. The present study was outlined to verify the hypothesis that the aversive state induced by dIPAG chemical stimulation could be used as an unconditioned stimulus (US) in an olfactory aversion conditioning (OAC) paradigm. In addition, the aversive nature of the OFC was evaluated in rats treated with midazolam (MDZ), a benzodiazepine, or microinjected with DPAT or WAY into dIPAG, 5-HT_{1A} receptors agonist and antagonist, respectively. Moreover, the dorsal premammillary nucleus (PMd) beta-adrenoceptors blocking or the ventral part of anteromedial thalamic nucleus (AMv) and reuniens nucleus (RE) lesion were performed to investigate the anatomical pathway involved in this chemical stimulation-based aversion conditioning. The present study has confirmed our hypothesis that an enhanced activity of dIPAG can be used as a biologically relevant US, capable of generating an OAC. Furthermore, MDZ impaired the OAC acquisition and the DB expression, emphasizing the pharmacological validation of this model in predicting putative anxiolytic drugs. DPAT 4 and 8 nmol impaired the OAC and DPAT 4 nmol facilitated the OAC acquisition when a higher concentration of NMDA (200 nmol) was administered into the dIPAG, which previously did not promote an OAC. The group of rats microinjected with WAY 7 before the NMDA 100 pmol into the dIPAG displayed defensive behavior in the box test even without odor, suggesting a generalization response. In addition, WAY 7 nmol facilitated the OAC acquisition with a smaller dose of NMDA (50 pmol), which previously had not promoted an OAC. Apart from the role of the serotonin in modulating the expression of defensive behavior evoked by dIPAG stimulation, the study revealed that serotonin can also modulate the dIPAG NMDA-stimulation learning, supporting the OAC. Lastly, the results also highlight the pathway from the dIPAG to the AHN, and the AHN projection to the PMd and thalamus (AMv+RE) likely to carry critical information related to fear-like state related to learning and memory. Taken together, the present findings provide evidence that this brain area can also support OAC by signaling forebrain associative areas involved in fear mediation, beyond its well known participation in the expression of DB.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrado da localização e organização das subdivisões da matéria cinzenta periaquedutal ao longo do seu eixo rostro-caudal.....	21
Figura 2. Classificação dos receptores de glutamato.....	24
Figura 3. Classificação dos receptores de serotonina.....	28
Figura 4. Representação esquemática da participação do sistema defensivo hipotalâmico no suposto circuito neural que integra as informações do condicionamento olfatório de medo.....	35
Figura 5. Protocolo experimental do condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl.....	42
Figura 6. Diagrama esquemático de cortes coronais do encéfalo de rato, localizando a MCPdl (A) e o PMd (B). Fotomicrografias de um corte coronal do encéfalo de rato corado com Giemsa na região da MCPdl (C) e PMd (D), mostrando o local da microinjeção. Fotomicrografias de de um corte coronal do encéfalo de rato na região talâmica AMv+RE (E).....	50
Figura 7. Comportamento defensivo no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de diferentes doses (pmol) de NMDA na MCPdl durante a sessão de condicionamento.....	54
Figura 8. Padronização do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	56
Figura 9. Efeito da duração da sessão de condicionamento no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	58
Figura 10. Efeito da duração Vs o intervalo do tratamento da sessão de condicionamento no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	60

Figura 11. Efeito do midazolam sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	62
Figura 12. Efeito do midazolam sobre a expressão do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	64
Figura 13. Efeito da microinjeção do agonista serotoninérgico DPAT na MCPdl sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	67
Figura 14. Efeito da microinjeção do agonista serotoninérgico DPAT na MCPdl sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 200 pmol na MCPdl.....	69
Figura 15. Efeito da microinjeção do antagonista serotoninérgico WAY 7 nmol na MCPdl sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	71
Figura 16. Efeito da microinjeção do antagonista serotoninérgico WAY na MCPdl sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 50 pmol na MCPdl.....	73
Figura 17. Efeito da microinjeção do atenolol, antagonista adrenérgico do tipo beta, no PMd sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	75
Figura 18. Efeito da lesão da porção ventral do núcleo anteromedial do tálamo e do núcleo reuniens do tálamo na aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	77
Figura 19. Circuito cerebral envolvido no condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl.....	91
Figura 20. Respostas defensivas evocadas pela microinjeção de NMDA na MCPdl durante a sessão de condicionamento.....	116

Figura 21. Curva min-a-min das respostas defensivas evocadas pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl durante a sessão de condicionamento, em 20 min (n=9).....	118
Figura 22. Efeito do midazolam sobre o modelo de discriminação olfatória.....	120
Figura 23- Efeito do nadolol no aumento da frequência cardíaca induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl. Registro fisiológico (A) e variação (B) na frequência cardíaca em número de batimentos por minuto (b.p.m.) em ratos administrados com NMDA 100 pmol na MCPdl e adrenalina (1,6 e 3,3 µg/kg; i.v.) antes (controle) ou após a administração de nadolol (10 mg/Kg, i.p.,30 minutos antes).....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da microinjeção de angonistas e antagonistas dos receptores NMDA do glutamato na matéria cinzenta periaquedutal dorsal no labirinto em cruz elevado e no labirinto em T elevado.....	26
Tabela 2. Efeito da microinjeção de angonistas e antagonistas dos receptores NMDA do glutamato na matéria cinzenta periaquedutal dorsal.....	27
Tabela 3. Efeito do nadolol 10 mg/kg na aquisição do condicionamento aversivo olfatório induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	65
Tabela 4. Frequência dos animais que apresentaram os comportamentos de corrida e saltos após o tratamento de PBS ou NMDA na MCPdl.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT- serotonina
AC- córtex cingulado anterior
AHN- núcleo hipotalâmico anterior
AMPC- 3'-5'-adenosina monofosfato cíclico
AMv- porção ventral do núcleo anteromedial do tálamo
ATE-(RS)- atenolol
BMAp- parte posterior do núcleo basomedial da amígdala
BSTif- núcleo do leito da estria terminal
Ce- amígdala central
CEUA- Comitê de Ética de uso de Animais de Laboratório
DPAT- hidrobrometo de 8-hidroxi-2-dipropilaminotetralina
DSM-IV- *Diagnostic Statistic Manual* (Quarta edição do Manual Estatístico e Diagnóstico dos Transtornos Mentais)
EAAT- transportador de aminoácido excitatório
EC1- estímulo condicionado de primeira ordem
EC2- estímulo condicionado de segunda ordem
EI-estímulo incondicionado
GLU- glutamato
i.p.- injeções intraperitoneais
LA- núcleo lateral da amígdala
LCE- labirinto em cruz elevado
LTE- labirinto em T elevado
MCPdl- matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral
MDZ- midazolam
MEApv- parte posteroventral do núcleo medial da amígdala
NMDA- N-metil-D-aspartato
PBS- tampão fosfato-salina
PC- córtex perinal
PFC- córtex préfrontal
PLC- fosfolipase C
PMd- núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo
PMv-núcleo pré-mamilar ventral do hipotálamo
PVH- núcleo paraventricular do hipotálamo
Rdg- córtex retrosplenial
RE- núcleo reuniens do tálamo
SBCAL- Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório
TMv-núcleo túbero-mamilar
VMHdm- parte dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo

WAY- Diidrocloreidrato de (S)-N-terc-Butil-3-(4-(2-metoxifenil)-piperazina-1-il)-2-fenilpropanamida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Sistemas neurais de ansiedade, medo e comportamento defensivo..	17
1.2 Matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral.....	20
1.3 O sistema glutamatérgico na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral.....	23
1.4 Modulação do sistema serotoninérgico na matéria cinzenta periaquedutal dorsal.....	27
1.5 Condicionamento de medo.....	30
1.5.1 Condicionamento olfatório de medo.....	33
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1. Animais.....	39
3.2 Cirurgia Estereotáxica.....	39
3.3 Drogas e Soluções.....	40
3.4. Microinjeção Intracerebral.....	41
3.5. Lesão iontoforética do tálamo.....	41
3.6. Testes Comportamentais.....	42
3.6.1 Condicionamento olfatório aversivo.....	42
3.7 Protocolos experimentais.....	44
3.7.1 Etapa 1 - Padronização do condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação química da MCPdl.....	44
3.7.1.1 <i>Experimento 1</i> – Efeito da microinjeção de NMDA na MCPdl na aquisição do condicionamento olfatório aversivo.....	44
3.7.1.2 <i>Experimento 2</i> – Padronização do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl...45	
3.7.1.3 <i>Experimento 3</i> - Efeito da duração da sessão de condicionamento no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	45

3.7.1.4 <i>Experimento 4</i> – Análise das diferenças no intervalo para o início da sessão de condicionamento após a microinjeção na MCPdl, no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	46
3.7.2 Etapa 2 – Avaliação Farmacológica.....	46
3.7.2.1 <i>Experimento 5</i> - Avaliação do efeito do midazolam sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	46
3.7.2.2 <i>Experimento 6</i> - Avaliação do efeito do midazolam sobre a expressão do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	47
3.7.2.3 <i>Experimento 7</i> – Efeito do nadolol, um antagonista periférico dos adrenoceptores beta, sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl..	47
3.7.3 Etapa 3 – Participação dos receptores 5HT _{1A} da serotonina na MCPdl na aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	47
3.7.3.1 <i>Experimento 8</i> – Efeito da administração de DPAT na MCPdl em ratos submetidos ao condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação química da MCPdl.....	47
3.7.3.2 <i>Experimento 9</i> – Efeito da modulação do DPAT sobre a dose de NMDA 200 pmol na MCPdl no condicionamento olfatório aversivo....	48
3.7.3.3 <i>Experimento 10</i> – Efeito da administração de WAY na MCPdl em ratos submetidos ao condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl.....	48
3.7.3.4 <i>Experimento 11</i> – Efeito da modulação do WAY sobre a dose de NMDA 50 pmol na MCPdl no condicionamento olfatório aversivo.....	48

3.7.4 Etapa 4 – Estudo da circuitaria encefálica envolvida no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	49
3.7.4.1 <i>Experimento 12</i> – Envolvimento do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo na aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	49
3.7.4.2 <i>Experimento 13</i> – Efeito da lesão dos núcleos talâmicos (AMv+RE) no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	49
3.8 Perfusão e Histologia.....	50
3.9 Análise estatística.....	51
4 Resultados.....	53
4.1 Etapa 1 - Padronização do condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação química da MCPdl.....	53
4.1.1 <i>Experimento 1</i> – Efeito da microinjeção de NMDA na MCPdl na aquisição do condicionamento olfatório aversivo.....	53
4.1.2 <i>Experimento 2</i> – Padronização do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl...55	55
4.1.3 <i>Experimento 3</i> - Efeito da duração da sessão de condicionamento no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	57
4.1.4 <i>Experimento 4</i> - Diferenças no intervalo para o início da sessão de condicionamento após a microinjeção na MCPdl, no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	59
4. 2 Etapa 2 – Avaliação Farmacológica.....	61

4.2.1 <i>Experimento 5</i> - Efeito do midazolam sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	61
4.2.2 <i>Experimento 6</i> - Efeito do midazolam sobre a expressão do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	63
4.2.3 <i>Experimento 7</i> - Efeito do nadolol na aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	65
4.3 Etapa 3 - Participação dos receptores 5HT1 _A da serotonina na MCPdl na aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	65
4.3.1 <i>Experimento 8</i> - Efeito da administração de DPAT na MCPdl em ratos submetidos ao condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	65
4.3.2 <i>Experimento 9</i> - Efeito da modulação do DPAT sobre a dose de NMDA 200 pmol na MCPdl no condicionamento olfatório aversivo....	68
4.3.3 <i>Experimento 10</i> - Efeito da administração de WAY na MCPdl em ratos submetidos ao condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl.....	70
4.3.4 <i>Experimento 11</i> - Efeito da modulação do WAY sobre a dose de NMDA 50 pmol na MCPdl no condicionamento olfatório aversivo.....	72
4.4 Etapa 4 - Circuitaria encefálica envolvida no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	74

4.4.1 Experimento 14– Envolvimento do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo na aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	74
4.4.2 Experimento 15– Efeito da lesão talâmica no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	76
6. DISCUSSÃO.....	78
7. CONCLUSÕES.....	93
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
ANEXO A- Coloração dos cortes do encéfalo de ratos com Giemsa.....	115
ANEXO B- Respostas defensivas evocadas pela microinjeção de NMDA na MCPdl.....	116
ANEXO C- Efeito do midazolam sobre o modelo da discriminação olfatória.....	119
ANEXO D- Efeito do nadolol no aumento da frequência cardíaca induzida pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.....	121

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistemas neurais de ansiedade, medo e comportamento defensivo

A ansiedade e o medo, assim como outras emoções, desempenham um papel fundamental na consciência e na atividade de todos os processos mentais (Izard, 2009). Atuam principalmente como sinalizadores de perigo, ameaça ou conflito, despertando respostas defensivas apropriadas. Nesta visão, admite-se que os transtornos de ansiedade são decorrentes de emoções como medo e/ou ansiedade muito intensas e persistentes, ou ainda desencadeadas por estímulos genuinamente não ameaçadores, que resultam em comportamentos não adaptativos e prejudiciais à integridade do indivíduo. (Blanchard, 2008).

A quarta edição do Manual Estatístico e Diagnóstico dos Transtornos Mentais (DSM-IV) (American Psychiatry Association, 1994) classificou os transtornos de ansiedade em categorias independentes: transtorno de pânico, agorafobia, fobias, ansiedade social, transtorno obsessivo compulsivo, transtorno por estresse pós-traumático e transtorno de ansiedade generalizada. Esta divisão confere aos clínicos e pesquisadores um mecanismo de validação parcial, possibilitando o fornecimento de diagnósticos mais confiáveis e o relato de casos de forma mais padronizada e segura (Brandao, Zanoveli *et al.*, 2008). Apesar desta classificação, o diagnóstico baseado especialmente na similaridade e/ou correlação entre sintomas e comportamentos, negligência, muitas vezes, a etiologia, neurologia, epidemiologia, genética, assim como a resposta ao tratamento com fármacos. Estes limites relacionados com a origem, mecanismos neurais e a heterogeneidade dos transtornos de ansiedade dificultam a modelagem experimental dos mesmos (Gould e Gottesman, 2006).

Dentro de uma perspectiva evolutiva, a ansiedade e o medo têm suas raízes nas reações de defesa dos animais frente a estímulos que representam perigo ou ameaça à sobrevivência, ao bem-estar, ou à integridade física das diferentes espécies (Hetem, 1997). Na tentativa de entender os mecanismos fisiopatológicos dos diferentes transtornos de ansiedade, muitos estudos experimentais tentam correlacioná-los com as respostas defensivas dos animais frente a situações ameaçadoras (Zangrossi e Graeff, 2003). Os comportamentos defensivos dos animais, assim como as emoções de medo e ansiedade em humanos, são, na maioria das vezes, reações adaptativas com intensidade e tempo adequados e organizados para satisfazer as estratégias defensivas dos indivíduos (Blanchard, 2008).

Estudos etológicos detalhados propuseram a separação categórica das respostas defensivas entre respostas de medo e de ansiedade. Robert e Caroline Blanchard demonstraram que algumas respostas defensivas (fuga, esquiva, congelamento, ataque defensivo, avaliação de risco) possuem um padrão dependente do tipo da ameaça (presente *versus* potencial) e da situação na qual ela é experienciada (teoria da distância defensiva) (Blanchard e Blanchard, 1988; Blanchard e Blanchard, 1989). Deste modo, o estado de medo foi associado, por estes autores, com os comportamentos que ocorrem na presença do estímulo ameaçador, enquanto que ansiedade foi associada àqueles comportamentos exibidos frente a uma ameaça apenas potencial. Além disso, estes autores demonstraram que os comportamentos associados ao medo foram sensíveis a drogas antipanicogênicas, enquanto que os comportamentos associados à ansiedade foram sensíveis às drogas ansiolíticas, fornecendo uma validação farmacológica às suas fundamentações teóricas (Blanchard, Griebel *et al.*, 1997).

Posteriormente, Gray e McNaughton (2000) incorporaram o conceito de “direção defensiva” às idéias dos “Blanchards” para distinguir medo de ansiedade. Neste novo conceito, o medo conduz o indivíduo a se afastar da situação ameaçadora (esquiva ativa), enquanto que a ansiedade o conduz a se aproximar dela, para avaliar e evitar a ameaça (avaliação de risco, esquiva passiva).

Ao longo dos anos, foi postulado que estas respostas defensivas, observadas em diferentes situações, ativam sistemas cerebrais com características distintas e respondem a diferentes fármacos utilizados nos transtornos de ansiedade (Blanchard e Blanchard, 1988). Desta forma, novas abordagens foram utilizadas com o objetivo de entender o funcionamento do sistema cerebral de defesa e de determinar se alguma alteração no funcionamento de uma determinada área poderia desencadear transtornos relacionados à ansiedade em humanos.

Baseados em trabalhos anteriores (Ursin, 1965; Adams, 1979; Bandler, 1987), os “Blanchards” descreveram que estruturas como amígdala, hipotálamo e mesencéfalo foram capazes de evocar, modular e organizar os comportamentos defensivos. A amígdala participaria na análise e integração de diferentes e complexas informações sensoriais; o hipotálamo, como uma estrutura chave das emoções, atuaria na integração das informações de diferentes áreas cerebrais, além de evocar por si só as reações de defesa; enquanto que a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) atuaria como via final de defesa, sendo capaz de coordenar as respostas defensivas frente à ameaça. Já o sistema que inclui o núcleo do leito da estria terminal, área septal lateral e o núcleo

acumbente estariam envolvidos com a inibição de alguns aspectos da defesa (Blanchard e Blanchard, 1988).

De forma mais elaborada, Graeff (1994) propõe que as diferentes estratégias comportamentais de defesa correlacionam-se com sistemas neuronais próprios e interconectados, que formam um sistema de defesa cerebral organizado de forma longitudinal e hierárquica, associados com transtornos de ansiedade específicos (Brandao, Anseloni *et al.*, 1999; Graeff, 2002; 2004). Dentro desta visão, o sistema septo-hipocampal sugerido por Gray (1982) seria responsável pelos comportamentos de avaliação de risco observados quando a ameaça é potencial, sendo associado com o transtorno de ansiedade generalizada. No chamado segundo nível de defesa, onde o perigo está presente a uma distância segura, o núcleo central da amígdala e a porção ventral da MCP seriam essenciais para evocar uma resposta de congelamento associada à fobia. Já quando a ameaça está muito próxima, a porção dorsal da MCP (MCPd) parece ser a estrutura chave para desencadear os comportamentos de luta e fuga, associados ao transtorno de pânico. Desta forma, o sistema septo-hipocampal, o hipotálamo medial, a amígdala e a MCP constituiriam o “sistema cerebral aversivo”, responsável pela integração e elaboração das respostas defensivas (Graeff, 1994).

Dezoito anos depois da teoria original do sistema de inibição comportamental (Gray, 1982), Gray e McNaughton (2000) adicionaram novas informações a este sistema hierárquico de defesa, possibilitando assim a categorização comportamental e neural de outros transtornos de ansiedade. Portanto, dentro desta categorização comportamental, estruturas cerebrais distintas estariam envolvidas nos transtornos de pânico (MCP), fobia (hipotálamo/amígdala), ansiedade (amígdala/sistema septo-hipocampal) e obsessão (córtex cingulado) (Mcnaughton e Corr, 2004).

Em paralelo, grupos que trabalham com o paradigma de medo condicionado influenciaram o desenho do sistema cerebral de defesa ao agregar o processo do aprendizado nas respostas defensivas (Ledoux, 2000; Graeff, 2004). De forma relativamente simples e clara, trabalhos de vários laboratórios sugerem que a amígdala possui um papel central no aprendizado e na expressão do medo, pois este conjunto de estruturas (complexo amigdalóide) recebe e processa as diferentes informações sobre o estímulo condicionado e controla as reações comportamentais, autonômicas e endócrinas de medo através das suas conexões com outras regiões do mesencéfalo (para revisão ver Ledoux, 2000).

Atualmente, há uma tendência, assim como foi feito com os sistemas neurais responsáveis pelo aprendizado, de se estabelecer “rotas” cerebrais responsáveis pela detecção da ameaça, pelo processamento e pela execução das respostas defensivas. Esse fato é evidenciado em algumas publicações, como no *Handbook of Anxiety and Fear* (Blanchard, Blanchard *et al.*, 2008), o qual dispõe uma seção que discute os sistemas neurais de ansiedade, medo e defesa, dividida em três capítulos: um descreve os mecanismos cerebrais envolvidos no condicionamento aversivo, outro retrata os sistemas neurais ativados na resposta defensiva não condicionada e o último faz uma comparação entre os sistemas neurais envolvidos nos comportamentos defensivos não condicionados e aprendidos. De modo geral, estes sistemas neurais de defesa incorporam novos conhecimentos em relação à participação das áreas “clássicas” (córtex cingulado, hipocampo, amígdala, hipotálamo e MCP) no processamento e/ou emissão das respostas defensivas, bem como incluem a participação de outras áreas neurais, como áreas corticais e núcleos talâmicos.

1.2 Matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral

Ao longo dos anos, a MCP passou de um “sistema autossuficiente” para ser vista como uma via final que seleciona, organiza e comanda reações defensivas comportamentais e neurovegetativas apropriadas (Fanselow, 1994). A MCP é uma estrutura mesencefálica que circunda o aqueduto cerebral, sua porção mais rostral localiza-se próximo à comissura posterior e a porção mais caudal próximo ao núcleo tegmental dorsal (Behbehani, 1995). Esta região foi subdividida, com base na citoarquitetura funcional, de forma radial em quatro regiões distintas: dorsomedial (MCPdm), dorsolateral (MCPdl), lateral (MCPl) e ventrolateral (MCPvl), cada uma delas formando uma coluna ao longo do seu eixo rostrocaudal, como ilustrado na figura 1 (Bandler, Carrive *et al.*, 1991; Carrive e Bandler, 1991; Carrive, 1993).

A MCP estabelece conexões com diferentes estruturas relacionadas ao sistema motor, sensorial, límbico e autonômico (Beitz, 1982), possibilitando a sua participação na mediação de funções distintas (Beitz, 1985; Vianna e Brandao, 2003). Dados obtidos nos últimos 25 anos têm associado a MCP a cinco funções principais: (1) regulação autonômica; (2) lordose; (3) vocalização; (4) processamento e modulação da dor e (5) reações emocionais relacionadas com medo e ansiedade (Behbehani, 1995; Carobrez, Teixeira *et al.*, 2001).

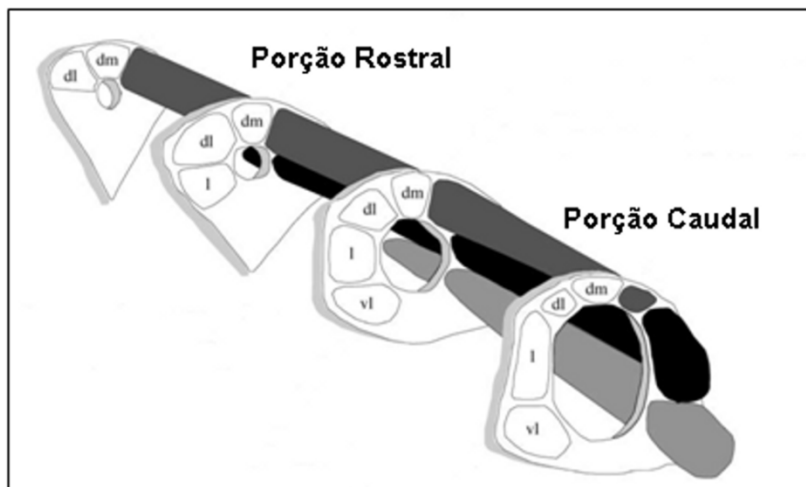


Figura 1. Esquema ilustrado da localização e organização das subdivisões da matéria cinzenta periaquedutal (dm: dorsomedial; dl: dorsolateral; l: lateral; vl: ventrolateral) ao longo do seu eixo rostro-caudal. Adaptado de Bandler e colaboradores (2000).

A estimulação elétrica da porção dorsal (dm e dl) da MCP de ratos a incluiu entre as áreas cerebrais participantes do sistema de defesa por evocar respostas comportamentais e fisiológicas aversivas (imobilidade, exoftalmia, micção e defecação, alternando para respostas de corrida e saltos com o aumento da intensidade da estimulação), semelhantes às respostas visualizadas quando os animais estão muito próximos da situação de perigo (Brandao, De Aguiar *et al.*, 1982; Brandao, Coimbra *et al.*, 1990; Coimbra e Brandao, 1997; Brandao, Anseloni *et al.*, 1999). Em geral, essas respostas são acompanhadas de analgesia (Fardin, Oliveras *et al.*, 1984; Coimbra, Tomaz *et al.*, 1992) e do aumento da pressão arterial média, da frequência cardíaca e respiratória (Schenberg, De Aguiar *et al.*, 1981; Carrive e Bandler, 1991), o que provavelmente dá suporte aos componentes motores relacionados à defesa (Abrahams, Hilton *et al.*, 1960; Abrahams e Hilton, 1964).

Essas respostas defensivas imediatas e robustas induzidas pela estimulação da MCPd foram correlacionadas com as reações de medo intenso, terror, vontade de fugir e sentimento de morte iminente ou perda de controle experienciados por muitos pacientes durante os ataques de pânico (Deakin e Graeff, 1991; Schenberg, Bittencourt *et al.*,

2001). Além disso, drogas que reduzem (alprazolam, clonazepam) ou precipitam (ioimbina, cafeína) o ataque de pânico em pacientes são capazes de reduzir ou aumentar, respectivamente, a aversão induzida pela estimulação da MCPd em ratos (Jenck, Broekkamp *et al.*, 1990; Deakin e Graeff, 1991). Desta forma, foi postulado que a estimulação desta estrutura em roedores poderia ser usada como modelo para ataques de pânico (Deakin e Graeff, 1991). Esta hipótese foi substanciada com relatos de fortes reações emocionais, descritas como sensações de medo e morte iminente, acompanhadas de alterações autonômicas (piloereção, sudorese, aumento da frequência cardíaca e ruborização da face e pescoço) observadas após a estimulação da MCP em humanos (Nashold, Wilson *et al.*, 1969; Young, 1989). Recentemente, o aumento do tamanho da MCP nos pacientes com pânico reforça o envolvimento desta estrutura na neurobiologia dos ataques de pânico (para revisão, ver Del-Ben e Graeff, 2009).

Nesta visão, dentro do sistema cerebral de defesa, a MCPd parece ter o papel de coordenar a expressão dos comportamentos de defesa evidentes, atuando como uma via final e comum das respostas aversivas (Bandler, 1987; Graeff, 1988). Entretanto, além de mediar os comportamentos evidentes de luta e fuga, a MCPd também participa da emissão de diferentes respostas defensivas mais sutis (avaliação de risco, sobressalto, esquiva), observadas em diferentes modelos de emocionalidade (Canteras e Goto, 1999; Teixeira e Carobrez, 1999; Fendt, 2000; Dielenberg e McGregor, 2001; Molchanov e Guimaraes, 2002; Bertoglio e Zangrossi, 2006; Kincheski e Carobrez, 2010). Desta forma, a MCPd parece estar também envolvida nas respostas emocionais de outros transtornos de ansiedade (Schenberg e Graeff, 1978; Graeff, 1981; Teixeira e Carobrez, 1999), integrando as informações relacionadas ao estresse psicológico sinalizada por outras estruturas límbicas superiores para uma eventual resposta (Floyd, Price *et al.*, 2000).

No processo do aprendizado aversivo, a MCPd parece participar da dinâmica do processamento associativo durante o condicionamento, uma vez que estímulos aversivos facilmente condicionados, tais como choque nas patas, exposição ao predador e odor de gato foram capazes de aumentar a expressão de proteína Fos nesta estrutura (Canteras e Goto, 1999; Babai, Anokhin *et al.*, 2001; Dielenberg, Hunt *et al.*, 2001), indicando a sua ativação. No entanto, estímulos que induzem respostas defensivas, mas não condicionamento (Mcgregor, Schrama *et al.*, 2002; Blanchard, Markham *et al.*, 2003), como o odor sintético de fezes da raposa (TMT- 2,5-dihidro-2,4,5-trimetiltiazolina) e as fezes de gato, não

foram capazes de alterar a expressão de Fos na MCPd (Day, Masini *et al.*, 2004). Além disso, a própria estimulação da MCPd pode ser utilizada como um estímulo incondicionado em alguns paradigmas de condicionamento de medo (Di Scala, Mana *et al.*, 1987; Jenck, Moreau *et al.*, 1995; Castilho e Brandao, 2001; Martinez, De Oliveira *et al.*, 2006).

De Oca e colaboradores (1998) sugeriram que o envolvimento da MCPd na aquisição e expressão das respostas defensivas deve-se à interferência desta estrutura no desempenho das respostas comportamentais e/ou atuando sobre outras estruturas mesencefálicas envolvidas no processamento das informações. Mais recentemente, Johansen e colaboradores (2010) demonstraram que o muscimol, agonista dos receptores gabaérgicos, na MCP prejudicou a aquisição do medo no condicionamento auditivo e, através da análise de dados eletrofisiológicos, sugeriram que a atividade da MCP estaria envolvida na transmissão da informação aversiva para a amígdala, desta forma instruindo a plasticidade neural necessária para o condicionamento. Adicionalmente, resultados recentes do nosso laboratório mostraram que o antagonista dos receptores NMDA na MCPd foi capaz de inibir a aquisição do condicionamento olfatório de medo em ratos (Pavesi, Canteras *et al.*, 2011).

Vários sistemas de neurotransmissão na MCPd parecem mediar ou modular esta variedade de respostas defensivas, dentre eles, o sistema glutamatérgico merece destaque, pois exerce um controle tônico excitatório, podendo ser usado como ferramenta farmacológica para estudar as respostas defensivas resultantes da estimulação química desta estrutura (Albin, Makowiec *et al.*, 1990; Bittencourt, Carobrez *et al.*, 2004; Lei, Yaroslavsky *et al.*, 2009).

1.3 O sistema glutamatérgico na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral

O glutamato (GLU) é o principal transmissor excitatório do sistema nervoso central de mamíferos (Collingridge e Lester, 1989). O GLU é armazenado nas vesículas sinápticas e quando liberado, ativa vários receptores que, de maneira geral, podem ser divididos em ionotrópicos (iGLU; ligados a um canal iônico) e metabotrópicos (mGLU; ligados a mecanismos intracelulares de transdução de sinal, via proteína G), ver figura 2. Os receptores ionotrópicos subdividem-se em três subgrupos: NMDA, AMPA ou cainato (Gladding, Fitzjohn *et al.*, 2009; Traynelis, Wollmuth *et al.*, 2010), enquanto que os receptores metabotrópicos subdividem-se em: tipos I, II ou III (Gladding, Fitzjohn

et al., 2009). Após a sua liberação, o GLU é recaptado através dos transportadores de aminoácidos excitatórios, principalmente os EAAT1 e EAAT2, localizados nos neurônios e nos astrócitos. Nos neurônios, o GLU recaptado é re-armazenado em vesículas. Nos astrócitos, o GLU é convertido pela glutamina sintetase em glutamina, a qual é transferida aos neurônios para a síntese de glutamato.

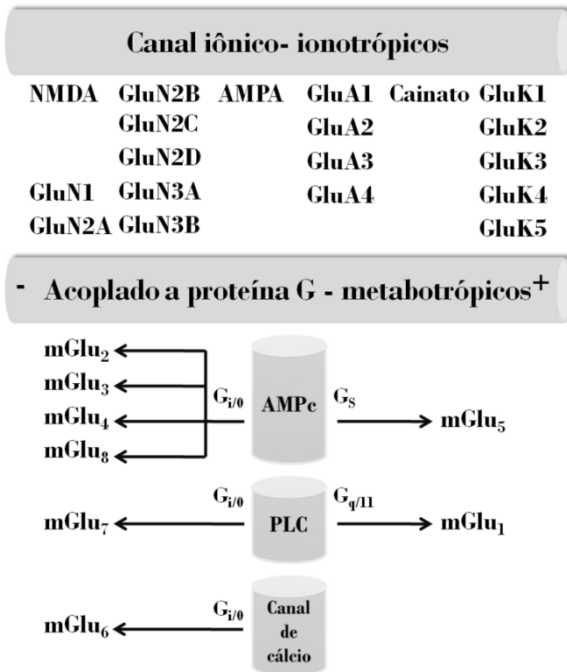


Figura 2. Classificação dos receptores de glutamato. AMPc-3'-5'-adenosina monofosfato cíclico, PLC- fosfolipase C, - inibição do AMPc, +ativação do AMPc. O receptor mGlu₅ ainda pode inibir a fosfolipase A e D através da proteína G_{i/o} (Guide to Receptors and Channels (GRAC), 4th Edition, 2009). Representação esquemática adaptada de Hoyer e colaboradores (2002).

Os receptores de glutamato mais estudados na MCPd são os receptores do tipo NMDA (Carobrez, Teixeira *et al.*, 2001). Os receptores NMDA são constituídos por cinco subunidades, que quando agrupadas, formam um poro central com condutância seletiva para Ca⁺⁺ e Na⁺. Estas subunidades são denominadas NR₁ (onde se liga a glicina), NR_{2A-D} (onde se liga o GLU) e NR_{3A-B}. As presenças de dois sítios independentes de glicina (NR₁) e de dois sítios de glutamato (NR₂) são necessárias para a construção de um receptor NMDA funcional. Outra

característica interessante é que este receptor possui diversos sítios de ligação regulatórios, tidos como alvos potenciais para ação de drogas. Além do sítio de ligação para o GLU, há um sítio de reconhecimento para o magnésio, um para o zinco, um para as poliaminas e outro sítio que reconhece concentrações submicromolares do aminoácido glicina, a qual atua como “co-agonista” deste complexo-receptor (Traynelis, Wollmuth *et al.*, 2010).

Na MCP, estudos revelaram que os receptores NMDA estão presentes de forma expressiva na coluna dorsolateral em toda a extensão rostrocaudal (Albin, Makowiec *et al.*, 1990; Lei, Yaroslavsky *et al.*, 2009). O conjunto de resultados apresentados nas tabelas 1 e 2 sumarizam os efeitos dos antagonistas e agonistas do receptor NMDA microinjetados na MCPd de ratos e avaliados em diversos modelos de emocionalidade. De maneira geral, o bloqueio dos receptores NMDA na MCPd produz efeitos antiaversivos, enquanto que a atividade destes receptores produz um efeito aversivo, em diferentes modelos.

Além disso, os efeitos dos receptores NMDA na MCPd podem ser modulados por diferentes neurotransmissores: óxido nítrico (Moreira, Molchanov *et al.*, 2004), serotonina (Moraes, Bertoglio *et al.*, 2008) e substância P (Zhou, Le Grevés *et al.*, 2000). Entre estes moduladores, o efeito do sistema serotoninérgico na MCPd merece destaque, não só por alterar as respostas comportamentais de defesa, mas também, por auxiliar na compreensão do papel da serotonina nas respostas emocionais.

Tabela 1. Efeito da microinjeção de agonistas e antagonistas dos receptores NMDA do glutamato na matéria cinzenta periaquedutal dorsal no labirinto em cruz elevado e no labirinto em T elevado.

Modelo	Droga	Mecanismo de ação	Efeito	Referência
LCE	NMDA	Agonista NMDA	Ansiogênico	(Carobrez, Teixeira <i>et al.</i> , 2001; Moraes, Bertoglio <i>et al.</i> , 2008)
	Glicina	Agonista NMDA/Glicina-B	Ansiogênico	(Schmitt, Coelho <i>et al.</i> , 1995; Teixeira e Carobrez, 1999)
	D-Serina	Agonista NMDA/Glicina-B	Ansiogênico	(Schmitt, Coelho <i>et al.</i> , 1995)
	AP7	Antagonista NMDA/Glicina-B	Ansiolítico	(Guimaraes, Carobrez <i>et al.</i> , 1991; Molchanov e Guimaraes, 2002)
	AP5	Antagonista NMDA	Ansiolítico	(Kincheski e Carobrez, 2010)
	HA-966	Antagonista NMDA/Glicina-B	Ansiolítico	(Teixeira e Carobrez, 1999)
	7-Cl-quinurênicó	Antagonista NMDA/Glicina-B	Ansiolítico	(Matheus, Nogueira <i>et al.</i> , 1994)
	Ác. Quinurênicó	Antagonista NMDA/Glicina-B	Ansiolítico	(Schmitt, Graeff <i>et al.</i> , 1990)
LTE	CNQX	Antagonista AMPA/Cainato	Ansiolítico	(Matheus e Guimaraes, 1997)
	NMDA	Agonista NMDA	Ansiogênico	(Bertoglio e Zangrossi, 2006)
	Glicina	Agonista NMDA/Glicina-B	Ansiogênico	(Santos, Bittencourt <i>et al.</i> , 2006)
	D-Serina	Agonista NMDA/Glicina-B	Ansiogênico	(Santos, Bittencourt <i>et al.</i> , 2006)

Tabela 2. Efeito da microinjeção de agonistas e antagonistas dos receptores NMDA do glutamato na matéria cinzenta periaquedutal dorsal.

Modelo	Droga	Mecanismo de ação	Efeito	Referência
COM-PMd	AP5	Antagonista NMDA	Ansiolítico	(Pavesi, Canteras <i>et al.</i> , 2011)
Teste de Vogel	LY235 959	Antagonista NMDA	Ansiolítico	(Tonetto, Terzian <i>et al.</i> , 2009)
Arena	NMDA	Agonista NMDA	Fuga, congelamento, Galope, saltos	(Bittencourt, Carobrez <i>et al.</i> , 2004; Ferreira-Netto, Genaro Borelli <i>et al.</i> , 2005; Aguiar, Moreira <i>et al.</i> , 2006)
Exposição ao gato	AP7	Antagonista NMDA	Ansiolítico	(Aguiar e Guimarães, 2009)

COM-PMd-condicionamento olfatório de medo induzido pela estimulação do PMd.

1.4 Modulação do sistema serotoninérgico na matéria cinzenta periaquedutal dorsal

A serotonina é um neurotransmissor sintetizado a partir do triptofano após reações de hidroxilação e descarboxilação, catalizadas pelas enzimas triptofano hidroxilase e 5-hidroxi-triptofano descarboxilase, respectivamente. Estas enzimas estão presentes nos grupos de neurônios serotoninérgicos localizados no mesencéfalo e nomeados de: núcleos caudal da raphe (raphe pallidus, raphe obscurus, raphe magnus, raphe pontis), núcleo dorsal da raphe e núcleo mediano da raphe (Harding, 2004; Vertes e Linley, 2007). Quando liberada, a serotonina (5-HT) exerce seus efeitos através dos receptores acoplados à proteína G (5-HT₁, 5-HT₂, 5HT₄, 5-ht₅, 5-HT₆, 5-HT₇) ou a receptores acoplados a canais iônicos (5-HT₃) (Guide to Receptors and Channels (GRAC), 4th Edition, 2009), ver figura 3. Após a recaptação, a 5-HT é degradada pela enzima monoamina oxidase (para revisão ver Green, 2006).

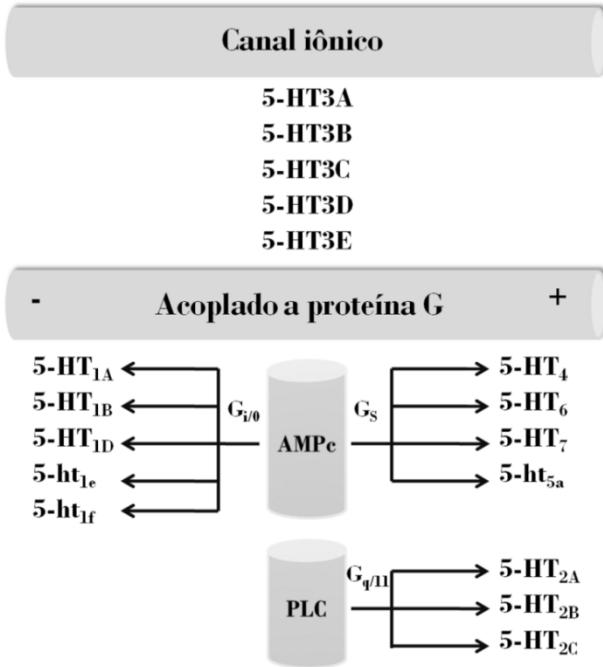


Figura 3. Classificação dos receptores de serotonina. AMPc-3'-5'-adenosina monofosfato cíclico, PLC-Fosfolipase C, - inibição do AMPc, +ativação do AMPc. (Guide to Receptors and Channels (GRAC), 4th Edition, 2009). Representação esquemática adaptada de Hoyer e colaboradores (2002).

Na MCPd, os agonistas da 5-HT tem efeito antiaversivo (para revisão ver Guimarães, 2008). Os primeiros trabalhos que administraram a 5-HT na MCPd utilizaram uma caixa com dois compartimentos, onde o animal, para desligar o estímulo aversivo representado pela estimulação elétrica da MCPd, era treinado a escapar para o compartimento oposto. Neste paradigma, as microinjeções de agonistas dos receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ inibiram o comportamento de escape. Este efeito dos agonistas serotoninérgicos foi revertido pela administração prévia dos antagonistas dos receptores 5-HT₁ e 5-HT₂, na MCPd. Entretanto, somente o bloqueio destes receptores na MCPd não foi capaz de alterar o limiar de fuga induzido pela estimulação elétrica desta estrutura (Schutz, De Aguiar *et al.*, 1985; Nogueira e Graeff, 1995). Da mesma maneira que a infusão dos antagonistas 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} na MCPd não alterou a aquisição das respostas de esquiva inibitória e de escape, observadas no labirinto em T elevado (LTE),

respostas comportamentais associadas, respectivamente, com a ansiedade generalizada e com o distúrbio de pânico em humanos (Graeff, Viana *et al.*, 1993; De Paula Soares e Zangrossi, 2004). Além disso, o bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} na MCPd não modificou as respostas defensivas observadas no labirinto em cruz elevado (LCE), um modelo clássico de ansiedade em animais (Moraes, Bertoglio *et al.*, 2008). Por outro lado, outros trabalhos revelaram que a administração da 5-HT, ou dos agonistas seletivos dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, na MCPd prejudicaram a resposta de escape, observada no LTE. A aquisição da esQUIVA inibitória no LTE foi facilitada pela infusão de 5-HT e prejudicada pela microinjeção do agonista 5-HT_{1A} na MCPd (Zangrossi, Viana *et al.*, 2001; Zanoveli, Nogueira *et al.*, 2003; De Paula Soares e Zangrossi, 2004). O conjunto destes resultados sugere que as fibras serotoninérgicas que chegam à MCPd parecem exercer uma inibição fásica, atuando somente na presença do estímulo aversivo ou de um fator estressante, modulando a atividade de outros neurotransmissores na MCPd (Deakin e Graeff, 1991; Beckett e Marsden, 1997; Graeff, 2004).

Sobre a transmissão glutamatérgica da MCPd, a microinjeção intra-MCPd do agonista seletivo dos receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, atenuou o comportamento de fuga avaliado em uma arena circular, induzido por microinjeção do aminoácido excitatório D,L-homocistéico (DLH) na MCPd, enquanto que o antagonista do receptor 5-HT_{1A}, WAY 100635, aumentou os comportamentos induzidos pelo DLH na MCPd (Beckett, Lawrence *et al.*, 1992; Beckett e Marsden, 1997). Além disso, resultados recentes do nosso laboratório mostraram que os receptores 5-HT_{1A} na MCPd desempenharam um papel modulatório no efeito ansiogênico do NMDA intra-MCPd no LCE (Moraes, Bertoglio *et al.*, 2008).

Em relação às respostas condicionadas, poucos trabalhos avaliam o papel do sistema serotoninérgico da MCPd no aprendizado (Castilho e Brandao, 2001; Oliveira, Broiz *et al.*, 2007), apesar desta estrutura também estar envolvida com a dinâmica do processamento associativo durante o condicionamento aversivo (Di Scala, Mana *et al.*, 1987; Castilho e Brandao, 2001).

1.5 Condicionamento de medo

Durante uma experiência altamente ameaçadora, como choque nas patas ou exposição ao predador, os comportamentos defensivos são facilmente e rapidamente condicionados, tanto ao contexto, como a pistas associativas (Blanchard e Blanchard, 1969; Fanselow, 1980). Vivenciar estas pistas em outro momento traz de volta reações muito parecidas com as reações experimentadas na situação ameaçadora original (Fanselow e Ponnusamy, 2008). Evolutivamente, este aprendizado das respostas defensivas frente a estímulos previamente condicionados, que remetem à ameaça, é essencial para a sobrevivência das espécies e pode ser considerado um componente do sistema comportamental defensivo de mamíferos (Fanselow, 1994).

O condicionamento de medo é um paradigma comportamental em que um estímulo previamente neutro (EN, como um estímulo visual, auditivo ou olfatório) adquire propriedades aversivas após ser devidamente pareado com um estímulo incondicionado (EI, por exemplo, choque elétrico nas patas), resultando em respostas defensivas quando o estímulo condicionado (EC; luz, som ou odor) é apresentado isoladamente no futuro. O fisiologista russo Ivan P. Pavlov (1849-1936) foi o primeiro a descrever e codificar esta forma de aprendizagem baseada no condicionamento, por este motivo, este paradigma também recebe o nome de condicionamento Pavloviano de medo (Pavlov, 1927apud ; Fanselow, 2008).

Posteriormente, ao estudar a formação de aprendizados associativos entre estímulos, Rescola e Gillan (1980) postularam que após determinados condicionamentos, não só o EI é capaz de servir de base a um condicionamento, mas também o EC, ou seja, as características aversivas do EC passam a ter um valor motivacional tão relevante que podem substituir o EI em um sucessivo condicionamento. Assim, no condicionamento de segunda ordem, um novo EN pode ser associado ao EC inicial, ou de primeira ordem (EC1), e assim passar a ser um EC de segunda ordem (EC2), induzindo respostas condicionadas quando apresentado isoladamente. Ambos os condicionamentos, EC1 e EC2, passam pelas mesmas etapas de formação da memória descritas a seguir (Gewirtz e Davis, 2000; Paschall e Davis, 2002b).

Os modelos animais de condicionamento de medo permitem avaliar aspectos neurobiológicos das diferentes etapas da formação da memória (aquisição, consolidação, evocação, reconsolidação e extinção), pois essencialmente possuem uma ou mais sessões de treino e

teste. Na sessão de treino ocorre a associação entre o EN e o EI, enquanto que a sessão de teste consiste na recordação do aprendizado. Nesta etapa, o animal é apresentado somente ao EC e uma resposta comportamental aversiva confirma o aprendizado da associação EN-EI. Os aspectos biológicos envolvidos na associação EN-EI são avaliados na etapa de aquisição do aprendizado aversivo, através de manipulações farmacológicas realizadas antes do início do condicionamento. Nos roedores, até 6 h após o condicionamento, as informações recentemente adquiridas (traço de memória ou memória de curta duração) são progressivamente estabilizadas em uma forma persistente, conhecida como memória de longa duração, durante a etapa de consolidação (Pedreira, Dimant *et al.*, 1995; Nader, 2003). Intervenções no processo de consolidação são realizadas imediatamente após a sessão de condicionamento, dentro do período estabelecido para que aconteçam os eventos moleculares descritos para a estabilização da memória. Manipulações farmacológicas antes do teste permitem avaliar a expressão das respostas condicionadas, na etapa de evocação das memórias de medo (Rodrigues, Schafe *et al.*, 2004). O processo de reconsolidação é a re-estabilização da memória após o teste de evocação, por isso, para estudar esta etapa, as manipulações farmacológicas são realizadas imediatamente após o teste (Nader, Schafe *et al.*, 2000). Por fim, a extinção da memória é a formação de uma nova memória após a apresentação sucessiva do EC, processo pelo qual este estímulo perde gradativamente a habilidade de evocar respostas condicionadas de medo. Na formação desta nova memória, os aspectos envolvidos na aquisição, consolidação e expressão da memória de extinção são estudados de maneira semelhante à formação da memória original (Sotres-Bayon, Bush *et al.*, 2004; Quirk, 2006).

A categorização da formação de memória baseada em achados comportamentais, fisiológicos, farmacológicos e moleculares auxilia a compreensão dos circuitos neuroanatômicos envolvidos na memória de medo. Estudos sobre as bases neurais do medo condicionado indicam a amígdala como uma estrutura importante no aprendizado, armazenamento e expressão do medo condicionado. Entre as regiões da amígdala, o núcleo lateral, o núcleo central e o núcleo basolateral parecem especialmente importantes em diferentes etapas da formação da memória (Cain e Ledoux, 2008). Além dos núcleos da amígdala, outros substratos neurais estão envolvidos com a aquisição e retenção do medo condicionado (Kim e Jung, 2006). Diferenças sutis, mas significativas, da participação destas áreas, podem ser decorrentes das diferenças do EI e EC utilizado no condicionamento (Otto, Cousens *et al.*, 2000).

Embora a grande maioria dos pesquisadores que trabalham com medo condicionado utilizem choque como EI, outros EI também podem dar suporte ao condicionamento aversivo, dentre eles: um som alto (Leaton e Cranney, 1990), inalação de dióxido de carbono (Mongeluzi, Rosellini *et al.*, 1996), apresentação ao predador (Dielenberg e McGregor, 2001), substâncias que causam náuseas como o cloreto de lítio (Guitton e Dudai, 2004), drogas que induzam um estado ansiogênico (Cavalli, Bertoglio *et al.*, 2009), ou mesmo a ativação de estruturas cerebrais que causam aversão (Di Scala, Mana *et al.*, 1987; Pavesi, Canteras *et al.*, 2011). Segundo Canteras (2003), o uso de estímulos aversivos mais “naturais” auxiliaria o entendimento dos mecanismos neurobiológicos de medo e aprendizado aversivo de maneira mais clara e confiável do que o choque elétrico nas patas, o qual envolve processos ligados a nocicepção.

Em relação ao EC, apesar da ampla utilização dos estímulos visuais e auditivos como EC, alguns trabalhos sugerem que os ratos podem ter um aprendizado extremamente eficiente quando pistas olfativas são utilizadas (Slotnick e Katz, 1974). Para os roedores, odores fornecem informações importantes sobre o meio ambiente, como a presença de alimentos ou do predador, orientando muitos aspectos do comportamento social, como o reconhecimento e discriminação entre os indivíduos da mesma espécie, a reprodução e o cuidado parental (Brennan e Keverne, 1997; Sam, Vora *et al.*, 2001; Restrepo, Arellano *et al.*, 2004). No condicionamento de medo, o estímulo olfatório pode servir efetivamente como um EN eficiente para se tornar EC após poucas associações com o EI (Otto, Cousens *et al.*, 2000; Paschall e Davis, 2002a; Kroon e Carobrez, 2009; Pavesi, Canteras *et al.*, 2011), além de promover condicionamento de segunda ordem (Paschall e Davis, 2002b). Em humanos, alguns odores são capazes de reavivar memórias com forte significado emocional e podem aumentar a eficácia de uma aprendizagem associativa, pois apresentam um potencial emocional muito forte (Herz, 1998; Vermetten e Bremner, 2003; Herz, Eliassen *et al.*, 2004; Vermetten, Schmahl *et al.*, 2007).

1.5.1 Condicionamento olfatório de medo

As respostas de defesa dos ratos frente a um estímulo olfatório foram observadas pela primeira vez quando estes animais foram expostos ao odor de gato (Blanchard, Blanchard *et al.*, 1990; Zangrossi e File, 1992). O odor do predador causa uma série de respostas comportamentais como aumento da avaliação de risco, fuga, redução da atividade locomotora e aumento do tempo de imobilidade. Outra importante característica do odor de gato é a formação de uma memória de medo associada ao ambiente onde este foi previamente apresentado, diferente de outros odores aversivos, como o formol ou TMT, que causam respostas aversivas sem a formação da memória aversiva ao contexto (Blanchard e Blanchard, 1989; Blanchard, Yang *et al.*, 2001; Dielenberg e Mcgregor, 2001; Mcgregor, Schrama *et al.*, 2002; Do Monte, Canteras *et al.*, 2008). Assim, o paradigma presa – odor de predador permitiu de uma forma simples e clara o estudo do repertório do comportamento defensivo dos roedores, uma vez que este odor evocou respostas defensivas evidentes, duradouras e não condicionadas, ou seja, respostas defensivas a um odor que os roedores de laboratório nunca sentiram antes, nem mesmo estiveram na presença de um gato. Além disso, o odor de gato é capaz de ativar circuitos neurais de medo relacionados ao sistema defensivo hipotalâmico medial (Blanchard, Canteras *et al.*, 2005; Canteras, N. S., Kroon, J. A. *et al.*, 2008).

O sistema defensivo hipotalâmico medial é um circuito anatômico e funcional que integra as respostas defensivas associadas ao predador natural, formado pelo núcleo hipotalâmico anterior (AHN), a porção dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo (VMHdm) e o núcleo pré- mamilar dorsal (PMd) (Canteras, Chiavegatto *et al.*, 1997; Canteras, 2002; Canteras, N. S., Kroon, J. A. *et al.*, 2008). Estes núcleos hipotalâmicos, além de estarem interconectados, apresentam conexões com diversas estruturas cerebrais envolvidas com comportamento de defesa, dentre elas, a amígdala, o núcleo do leito da estria terminal, o córtex pré-frontal, o hipocampo, o septo lateral e a MCPdl (Canteras, Simerly *et al.*, 1994; Risold, Canteras *et al.*, 1994; Canteras, 2002).

Dentre as estruturas que compõem o sistema defensivo hipotalâmico medial, o PMd merece destaque pois recebe densas projeções bilaterais do AHN e VMHdm (Canteras e Swanson, 1992). Este tipo de arranjo sináptico permite ao PMd servir como um amplificador dos sinais neurais hipotalâmicos, processando as vias relacionadas ao predador (Canteras e Swanson, 1992). Estudos com lesão química ou eletrolítica do PMd revelaram uma redução das

respostas defensivas dos ratos frente ao odor de gato, ao odor condicionado e ao contexto associado ao predador (Canteras, Chiavegatto *et al.*, 1997; Dielenberg, Hunt *et al.*, 2001; Canteras, N. S., Kroon, J. A. *et al.*, 2008; Cezario, Ribeiro-Barbosa *et al.*, 2008; Do Monte, Canteras *et al.*, 2008), sem interferir na habilidade dos roedores em detectar outras pistas olfatórias não aversivas, como a percepção de feromônios do sexo oposto, ou as respostas a odores aversivos como o TMT (Markham, Blanchard *et al.*, 2004; Staples, McGregor *et al.*, 2008). Além disso, achados anatômicos e funcionais propuseram que a aquisição destas respostas defensivas relacionadas à atividade do PMd, envolve o relé em núcleos talâmicos como o Núcleo Reuniens (RE) e a porção ventral do núcleo anteromedial (AMv) (Carvalho-Netto, Martinez *et al.*, 2010), enquanto que a expressão envolve projeções descendentes do PMd para a MCPdl (Canteras, Kroon *et al.*, 2008).

Entretanto, apesar da relevância biológica do odor de gato, e da quantidade de conhecimentos comportamentais, funcionais e neuroanatômicos gerados ao utilizar este paradigma, a impossibilidade de medir a real quantidade de odor usada para gerar medo limita a sua utilização e a reprodutibilidade entre os laboratórios. Com base nesses fatos e fundamentados na importância do sistema olfatório para os roedores, o nosso laboratório tem proposto um condicionamento olfatório de medo (COM), onde cinco choques de intensidade média são pareados a um odor neutro. Posteriormente, ao expor os ratos a este odor (EC) em outra caixa, são observadas reações defensivas muito semelhantes às respostas que os ratos apresentaram frente ao odor do predador, ou seja, respostas defensivas mais sutis do que o tempo de congelamento, um comportamento comumente avaliado nos modelos de condicionamento de medo (Kroon e Carobrez, 2009).

Nos últimos anos, nosso laboratório vem mostrando que o COM é uma ferramenta útil para estudar o sistema defensivo envolvido no condicionamento de medo, uma vez que, este modelo é capaz de mimetizar a participação de áreas cerebrais envolvidas com estímulos relacionados ao predador, como o PMd, ver figura 4 (Canteras, N. S., Kroon, J. A. *et al.*, 2008), além de possibilitar o emprego de outros estímulos incondicionados que não o choque elétrico nas patas (Cavalli, Bertoglio *et al.*, 2009; Pavesi, Canteras *et al.*, 2011).

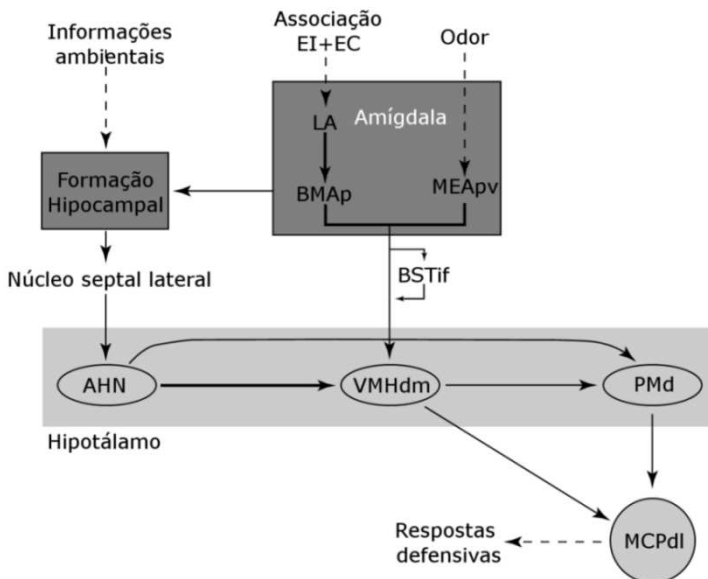


Figura 4. Representação esquemática da participação do sistema defensivo hipotalâmico no suposto circuito neural que integra as informações do condicionamento olfatório de medo. Legenda: AHN:núcleo hipotalâmico anterior; BMAp: parte posterior do núcleo basomedial da amígdala; BSTif: núcleo do leito da estria terminal; EC:estímulo condicionado, EI:estímulo incondicionado, LA: núcleo lateral da amígdala; MEApv: parte posteroventral do núcleo medial da amígdala; MCPdl matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral; PMd: núcleo pré-mamilar dorsal; VMHdm: parte dorsomedial do núcleo ventromedial. Adaptado de Canteras e Blanchard (2008) e Canteras e colaboradores (2008).

Neste contexto, o presente trabalho foi delineado para verificar a hipótese de que um estímulo aversivo, biologicamente relevante, como a estimulação química da MCPdl poderia ser usado como uma EI, em um paradigma de condicionamento olfatório aversivo. Além disso, a natureza aversiva deste condicionamento foi avaliada em ratos tratados com midazolam (MDZ), um benzodiazepínico, ou quando microinjetados com DPAT ou WAY na MCPdl, agonista e antagonista dos receptores 5-HT_{1A} da serotonina, respectivamente. Ainda, atenolol, um antagonista dos adrenoreceptores do tipo beta que não atravessa a barreira hematoencefálica, foi administrado antes da sessão de condicionamento para avaliar se o aumento da frequência cardíaca

induzido pela estimulação da MCPdl é importante para promover este aprendizado. Por fim, o bloqueio dos adrenocetores do tipo beta no núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) e a lesão da parte ventral do núcleo anteromedial do tálamo (AMv) e do núcleo reuniens (RE) foram realizados para investigar as vias anatômicas envolvida no condicionamento olfatório induzido pela estimulação química da MCPdl. Espera-se que com este conjunto de resultados seja possível sugerir como a atividade da MCPdl pode ser capaz de modificar o processamento das informações e desencadear um aprendizado aversivo.

2. OBJETIVOS

Com o propósito de testar a hipótese levantada, o objetivo geral do presente estudo foi verificar se o estado emocional aversivo promovido pela estimulação química da MCPdl poderia ser usado como um estímulo incondicionado (EI) em um paradigma de condicionamento olfatório aversivo. Além disso, avaliar a natureza aversiva deste condicionamento e verificar possíveis vias neuronais envolvidas neste processamento. Para alcançar o objetivo proposto, foram definidos os seguintes objetivos intermediários:

- Padronizar um paradigma de condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação química da MCPdl;

- Avaliar o efeito de um ansiolítico clássico na aquisição e expressão do condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação química da MCPdl;

- Verificar o efeito da administração de um antagonista periférico dos adrenoreceptores beta sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl;

- Avaliar o envolvimento dos receptores 5HT_{1A} da serotonina na MCPdl na aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl;

- Verificar o efeito do bloqueio de adrenoreceptores beta no PMd na aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl;

- Avaliar a participação do AMv e do RE na aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Considerações Éticas

O presente trabalho envolveu procedimentos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética de uso de Animais de Laboratório (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número 23080.008789/2009-46, o qual segue os princípios éticos definidos pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL).

3.1. Animais

Foram utilizados 395 ratos machos da linhagem *Wistar*, com 3–4 meses de idade, pesando entre 300 e 400 g. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e, após o desmame, transportados para o Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia. Aproximadamente 15 dias antes do início dos experimentos, os animais foram deslocados para o Biotério do Laboratório de Neurobiologia Comportamental, onde foram alojados em grupos de três animais por caixa, em gaiolas plásticas (15 x 36 x 30 cm) forradas com maravallha. Nos biotérios, os animais tiveram livre acesso à água, ração em um ambiente com temperatura (23 ± 1 °C) e ciclo de luz (12 h claro/escuro) controlado, iniciando o claro às 7 h.

3.2 Cirurgia Estereotáxica

Sete dias antes do início dos experimentos, todos os animais deste trabalho foram submetidos à cirurgia estereotáxica para o implante de cânulas-guia (13 mm) na MCPdl. Para este fim, os animais foram anestesiados com uma solução combinada (3:2; 1 ml/kg) de xilazina (10 mg/ml; Dopaser[®], São Paulo, Brasil) e quetamina (58 mg/ml; Dopalen[®], São Paulo, Brasil) e, após a perda total dos reflexos, posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, EUA). Depois da assepsia da área desejada com álcool iodado, uma solução de anestésico local (xilocaína) com adrenalina (0.1ml, 2mg/ml; Probem, Brazil) foi administrada por via subcutânea na parte superior da cabeça. Uma incisão longitudinal nesta área deixou a calota craniana exposta e permitiu visualizar o Bregma e Lambda, pontos de intersecção das suturas (Paxinos, 1998). A partir da localização do Bregma, a cânula-guia foi posicionada para a microinjeção na MCPdl, conforme as coordenadas obtidas do atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1998): AP= -7,6 mm, ML= + 1,9 mm e DL= -2 mm, a partir da superfície externa do osso craniano, em um ângulo de 22 °.

Um parafuso de aço inoxidável foi colocado logo atrás da sutura coronal. Após a fixação da cânula-guia, a superfície craniana foi

recoberta por com uma camada de acrílico auto-polimerizável (Jet, Brasil). O acrílico, ao endurecer, incorporou todas as peças em uma prótese sólida. Na cânula foi adaptado um mandril n° 30 para prevenir o seu entupimento. Após o término da cirurgia, os animais foram tratados com antibiótico veterinário (pentabiótico: benzilpenicilina e estreptomicina) intramuscular (10 mg/kg; 60 000 IU; 0,2 ml; Fort Dodge, Brasil) e solução analgésica (banamine: flunixinmeoglumina) via subcutânea (2.5mg/kg; 0,2 ml; Schering-Plough, Brasil) e permaneceram em uma sala aquecida até a recuperação da anestesia.

Para as microinjeções no PMd, além da cânula na MCPdl, uma cânula-guia (15 mm) foi colocada, seguindo as coordenadas a partir do Bregma: AP= 4,16 mm; ML= 0,8 mm e DV = 6,5 mm da superfície do osso em ângulo de 10°. Neste caso, foi utilizado um aparelho estereotáxico com duas torres (Insight®, Ribeirão Preto, Brasil).

3.3 Drogas e Soluções

Para este estudo, as seguintes drogas ou soluções foram utilizadas:

- N-metil-D-aspartato (NMDA; Sigma, St. Louis, EUA): agonista dos receptores NMDA do glutamato;
- Hidrobrometo de 8-hidroxi-2-dipropilaminotetralina (DPAT; Tocris, Ellisville, EUA): agonista dos receptores 5HT_{1A} da serotonina;
- Diidrocloridrato de (S)-N-terc-butil-3-(4-(2-metoxifenil)-piperazina-1-il)-2-fenilpropanamida (WAY 1000135 ; Tocris, EUA): antagonista dos receptores 5H_{1A} da serotonina
- (RS)-Atenolol (ATE; Tocris, Cookson, EUA): antagonista de adrenoceptores beta 1.
- Nadolol (Sigma, St. Louis, EUA): antagonista de adrenoceptores beta;
- Midazolam (MDZ; Dormium®, União Química, Brasil): agonista do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA A;
- Acetato de amila (Aldrich Chemical, EUA).

As concentrações do NMDA (25, 50, 100 e 200 pmol), DPAT (4 e 8 nmol), WAY (5 e 7 nmol) e ATE (40 nmol) foram baseadas em publicações anteriores (Moraes, Bertoglio *et al.*, 2008; Pavesi, Canteras

et al., 2011). NMDA, DPAT e ATE foram dissolvidos em tampão fosfato 0,1M (PBS; pH=7), enquanto WAY foi dissolvido em PBS com Tween 2%.

Para as injeções intraperitoniais (i.p.), nadolol e MDZ foram dissolvidos em solução salina (0,9% NaCl). As doses de nadolol (10 mg/kg) e midazolam (0,25, 0,5 e 1 mg/kg), bem como o volume injetado (1 mg/kg), foram baseadas em trabalhos anteriores do nosso laboratório (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008; Kroon e Carobrez, 2009).

Dependendo do protocolo experimental, os animais administrados com PBS, PBS com Tween ou salina constituíram os grupos controles.

3.4. Microinjeção Intracerebral

Para a administração das drogas na MCPdl, os animais foram manuseados gentilmente e, após a retirada do mandril, a cânula foi desobstruída com um lima odontológica de 12 mm de comprimento. Posteriormente, uma agulha de 16,2 mm, conectada por um tubo de polietileno (PE 10) a uma microseringa (Hamilton, 5 µl), foi introduzida pela cânula. Com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight, modelo BI 2000), cada animal foi injetado com um volume de 0,2 µl de solução, através de uma taxa de infusão de 0,60 µl/min, em 30 s. O mesmo procedimento foi realizado para microinjeção no PMd, entretanto a agulha utilizada foi de 18 mm e foi microinjetado um volume maior de solução (0,3 µl).

3.5. Lesão iontoforética do tálamo

Os animais submetidos à lesão iontoforética dos núcleos do tálamo (RE+AMv) foram anestesiados com Equitesin (3 ml/Kg; 1% tiopental, 4.25% de hidrato de cloral, 2.13% sulfato de magnésio, 42.8% propileno glicol e 3.7% etanol em água) e posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, EUA). Com o auxílio de uma pipeta de vidro (diâmetro de 20 µm) e um dispositivo de corrente constante (5 µA) (CS3 modelo; Midgard Electronics, Canton, MA), com intervalo de 7s entre pulso e interpulso, um depósito bilateral de 0,15 M da solução de NMDA foi realizado durante 20 min. As coordenadas a partir da linha interaural (AP= - 7,6 mm, ML= ± 1,9 mm e DL= + 2 mm da superfície do osso) orientaram o posicionamento dos núcleos talâmicos. Dez dias após a lesão, os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica para o implante de cânulas-guias na MCPdl, segundo o protocolo descrito previamente no item 3.2.

3.6. Testes Comportamentais

3.6.1 Condicionamento olfatório aversivo

O protocolo experimental utilizado foi baseado no condicionamento olfatório de medo (COM), previamente proposto por Kroon e Carobrez (2009). Como ilustrado na figura 5, este protocolo é composto por 5 dias consecutivos, com um intervalo de 24h entre as sessões, em dois aparatos distintos: uma caixa de condicionamento e uma caixa de odor.

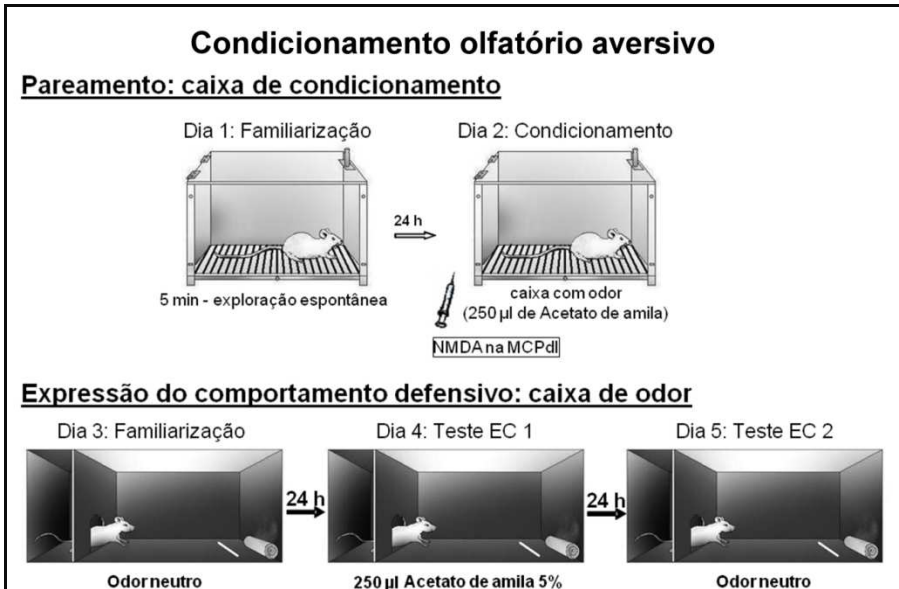


Figura 5. Protocolo experimental do condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl. Adaptado de Kroon e Carobrez (2009).

Uma semana após o implante da cânula-guia na MCPdl, os animais foram expostos à caixa de condicionamento, durante dois dias, nas sessões denominadas: familiarização e condicionamento. O aparato de condicionamento (50 x 26 x 35) consiste de uma caixa confeccionada em alumínio, com exceção da face frontal e tampa, construídas em acrílico transparente. O assoalho da caixa é composto de grades (3 mm de espessura, espaçadas a cada 1 cm). Na sessão de familiarização (dia 1), os animais exploraram livremente esta caixa durante 5 min. Na

sessão de condicionamento (dia 2), após a administração dos diferentes tratamentos na MCPdl, os animais foram re-expostos à caixa impregnada, ou não, com odor de acetato de amila. Quando utilizado, o odor de acetato de amila foi obtido através da apresentação de um papel filtro contendo 250 μ l de solução de acetato de amila a 5%, localizado abaixo do piso gradeado. A escolha do acetato de amila como fonte de odor foi baseada em publicações anteriores (Paschall e Davis, 2002a; Kilpatrick e Cahill, 2003). Houve variação na duração da sessão de condicionamento, bem como no intervalo do início da sessão após a microinjeção na MCPdl, dependendo do protocolo experimental empregado.

A avaliação do comportamento de defesa foi realizada na caixa de odor, completamente distinta da caixa de condicionamento, para reduzir interferências contextuais e isolar como único estímulo condicionado, o odor de acetato de amila. Este aparato é inteiramente construído em acrílico preto e dividido em dois compartimentos, um aberto (40 x 26 x 40 cm) e um fechado (20 x 26 x 40 cm) com cobertura. Para permitir a visualização dos animais e a gravação em DVD, as paredes frontais, tanto do compartimento aberto quanto do fechado, são construídas em acrílico transparente. Uma pequena abertura (6 x 6 cm), situada na parede divisória, permite o livre acesso do animal a ambos os compartimentos. Na parede oposta à entrada para o compartimento fechado, uma caixa pequena de acrílico transparente (6 x 9 x 1 cm) foi fixada para colocar um pedaço de papel filtro contendo ou não a solução de acetato de amila. No piso da caixa, uma linha divisória localizada a 7 cm da fonte de odor, serviu como referência para determinar a área próxima à fonte de odor.

Na caixa de odor, todos os animais foram submetidos a 3 sessões subsequentes de 10 min, espaçadas em 24 h cada, denominadas: 1) familiarização, 2) teste com o estímulo condicionado de primeira ordem (teste EC1) e 3) teste com o estímulo condicionado de segunda ordem (teste EC2). Na sessão de familiarização (dia 3), os níveis basais dos parâmetros comportamentais defensivos foram quantificados ao expor os animais a um ambiente novo sem o estímulo olfatório. Vinte quatro horas após, durante a sessão teste EC1 (Dia 4), os parâmetros comportamentais foram medidos frente à pista olfatória, ou seja, na presença do papel filtro contendo 250 μ l de acetato de amila 5%. Na sessão teste EC2 (dia 5), os animais foram recolocados no aparato na ausência da fonte de odor. Essa última sessão permitiu avaliar a existência de condicionamento de segunda ordem. Neste tipo de aprendizado a resposta condicionada é evocada na presença de um

estímulo condicionado (neste caso o contexto) previamente pareado com o outro estímulo condicionado (odor) e não com o estímulo incondicionado (EI).

Os parâmetros comportamentais analisados foram baseados em experimentos de exposição ao odor de gato (Dielenberg e McGregor, 2001; Do Monte, Canteras *et al.*, 2008), caracterizado pelos seguintes padrões comportamentais: (1) tempo de aproximação: tempo em que os ratos permaneceram a uma distância menor que 7 cm da fonte de odor; (2) tempo escondido: tempo em que os ratos permaneceram com as quatro patas no compartimento fechado da caixa; (3) *head-out*: tempo em que os ratos permaneceram no compartimento fechado da caixa, mas com a cabeça direcionada para o compartimento aberto. Este último comportamento foi interpretado como uma postura de avaliação de risco do animal.

Durante todos os cinco dias, os experimentos foram conduzidos em uma sala com som atenuado, temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e sob luz branca de 4 lux. Trinta minutos antes do início das sessões, os animais foram mantidos em uma sala adjacente para ambientação, sob luz branca de 80 lux. Após a manipulação de cada animal, os aparatos experimentais foram limpos com solução de etanol 10% e secos com papel toalha. Entre as sessões com odor (condicionamento e teste EC1), um exaustor foi ligado para evitar acúmulo do odor na sala.

3.7 Protocolos experimentais

3.7.1 Etapa 1 - Padronização do condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação química da MCPdl.

3.7.1.1 Experimento 1 – Efeito da microinjeção de NMDA na MCPdl na aquisição do condicionamento olfatório aversivo.

Após o período de ambientação, os animais foram submetidos ao condicionamento olfatório aversivo, previamente descrito no item 3.6.1. Na sessão de condicionamento, os animais foram microinjetados com as doses de 25, 50, 100 ou 200 pmol de NMDA na MCPdl e imediatamente expostos à caixa de condicionamento, impregnada com odor de acetato de amila, durante 10 min. Ratos microinjetados com PBS fizeram parte do grupo controle deste experimento. Os parâmetros comportamentais foram analisados durante os três dias consecutivos na caixa de odor, conforme protocolo descrito na seção 3.6.1.

3.7.1.2 Experimento 2 – Padronização do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

Uma vez encontrada a dose de NMDA microinjetada na MCPdl capaz de induzir um condicionamento olfatório aversivo, outros grupos experimentais foram realizados para avaliar a especificidade deste condicionamento.

Neste experimento, durante a etapa de condicionamento, além dos grupos microinjetados com PBS ou NMDA 100 pmol e expostos à caixa de condicionamento impregnada de odor, animais foram microinjetados com PBS ou NMDA e expostos à caixa de condicionamento na ausência do odor, durante 10 min. Estes grupos permitiram verificar o perfil comportamental dos animais previamente microinjetados na MCPdl e expostos, pela primeira vez, ao odor na caixa de odor. O grupo que recebeu NMDA 100 pmol na MCPdl, não associado ao odor no dia do condicionamento, foi considerado o grupo não pareado. Animais microinjetados com NMDA 100 pmol fora da MCPdl e expostos 10 min ao odor, durante o condicionamento, foram agrupados e constituíram o grupo NMDA-fora.

Como descrito previamente, os parâmetros comportamentais foram analisados durante os três dias consecutivos na caixa de odor, durante as sessões denominadas de: familiarização, teste EC1 e teste EC2.

O desenho do protocolo experimental é semelhante ao apresentado anteriormente no experimento 1, porém três grupos foram expostos ao odor (PBS/odor, NMDA/odor, NMDA-fora/odor), durante o condicionamento, enquanto que dois grupos não foram expostos ao odor (PBS/sem odor e NMDA/sem odor).

3.7.1.3 Experimento 3 - Efeito da duração da sessão de condicionamento no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

No experimento 3, 24 h após a familiarização na caixa de condicionamento, os animais foram microinjetados com NMDA 100 pmol na MCPdl e imediatamente expostos a esta mesma caixa impregnada com o odor, na sessão de condicionamento, durante 5, 10 ou 20 min. Animais microinjetados com PBS e expostos ao odor durante 10 min constituíram o grupo controle. Os parâmetros comportamentais foram avaliados nas sessões de familiarização, EC1 e EC2, na caixa de odor.

3.7.1.4 Experimento 4 – Análise das diferenças no intervalo para o início da sessão de condicionamento após a microinjeção na MCPdl, no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

Alguns trabalhos sugerem que as respostas defensivas evocadas pela estimulação da MCPd podem ter um significado emocional diferente ao longo do tempo (Brandao, Zanoveli *et al.*, 2008). Para avaliar essa possível diferença, foi adicionado um intervalo de 5 min entre a microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl e o início da sessão de condicionamento. Assim, após 24 h da sessão de familiarização na caixa de condicionamento, os animais foram microinjetados com NMDA 100 pmol na MCPdl e, após 5 minutos, foram expostos à caixa de condicionamento impregnada com odor, durante 5 ou 10 min. Estes grupos experimentais foram comparados com os grupos PBS-10 min, NMDA 100 pmol-5 min e NMDA 100 pmol-10min, realizados durante o experimento 3, os quais foram microinjetados com PBS ou NMDA 100 pmol na MCPdl e imediatamente expostos à caixa de condicionamento impregnada com odor durante 5 ou 10 min. Os parâmetros comportamentais foram avaliados nas sessões de familiarização, EC1 e EC2, na caixa de odor.

3.7.2 Etapa 2 – Avaliação Farmacológica

Esta etapa foi realizada para avaliar os efeitos de uma droga ansiolítica clássica, o midazolam, na aquisição e expressão do condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl. Além disso, foi avaliada a participação dos adrenoceptores beta periféricos, através do tratamento com nadolol, na aquisição deste condicionamento.

3.7.2.1 Experimento 5 - Avaliação do efeito do midazolam sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

Neste experimento, após a etapa inicial de familiarização, os ratos foram injetados via intraperitoneal com solução salina ou midazolam (MDZ) nas doses de 0,5 e 1,0 mg/kg e, após 30 min, submetidos ao pareamento do odor de acetato de amila + NMDA 100 pmol na MCPdl, durante 10 min. Os parâmetros comportamentais foram avaliados nas sessões de familiarização, EC1 e EC2, na caixa de odor.

3.7.2.2 Experimento 6 - Avaliação do efeito do midazolam sobre a expressão do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

Todos os animais foram submetidos ao condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl, padronizado na etapa 1. Após a etapa de familiarização na caixa de odor, os ratos foram injetados via intraperitoneal com solução salina ou midazolam (MDZ) nas doses de 0,25 e 0,5 mg/kg e, após 30 min, submetidos à sessão de teste EC1 e após 24 h, a sessão de teste EC2. Os parâmetros comportamentais foram avaliados nas sessões de familiarização, EC1 e EC2, na caixa de odor.

3.7.2.3 Experimento 7 – Efeito do nadolol, um antagonista periférico dos adrenoreceptores beta, sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

No experimento 7, transcorridos 24 h da sessão de familiarização, os ratos foram injetados pela via intraperitoneal com solução salina ou nadolol 10 mg/kg e, após 30 min, submetidos ao pareamento ao odor de acetato de amila + NMDA 100 pmol na MCPdl, durante 10 min. Os parâmetros comportamentais foram avaliados nas sessões de familiarização, EC1 e EC2, na caixa de odor.

3.7.3 Etapa 3 – Participação dos receptores 5HT_{1A} da serotonina na MCPdl na aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

3.7.3.1 Experimento 8 – Efeito da administração de DPAT na MCPdl em ratos submetidos ao condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação química da MCPdl.

O experimento 8 foi realizado para investigar se a ativação dos receptores 5-HT_{1A} da serotonina na MCPdl poderia interferir no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl. Com este objetivo, os animais foram familiarizados na caixa de condicionamento como descrito no item 3.6.1. No dia do condicionamento, os animais receberam microinjeções na MCPdl de PBS ou DPAT, nas doses de 4 e 8 nmol e, após 5 min, de PBS ou NMDA 100 pmol e imediatamente expostos a caixa de condicionamento impregnada com o odor, formando os seguintes grupos experimentais: PBS-PBS, PBS-NMDA 100, DPAT 4 -PBS, DPAT 4 – NMDA 100, DPAT 8 – PBS, DPAT 8 – NMDA 100. Os parâmetros

comportamentais foram avaliados nas sessões de familiarização, EC1 e EC2, na caixa de odor.

3.7.3.2 Experimento 9– Efeito da modulação do DPAT sobre a dose de NMDA 200 pmol na MCPdl no condicionamento olfatório aversivo.

O experimento 9 foi conduzido para avaliar se a ativação dos receptores 5-HT_{1A} da serotonina na MCPdl poderia modular a estimulação induzida pela dose de 200 pmol de NMDA na MCPdl, promovendo um condicionamento olfatório aversivo. Para tal, 24 h após a familiarização na caixa de condicionamento, os animais receberam microinjeções na MCPdl de PBS ou DPAT, nas doses de 4 e 8 nmol e, após 5 min, de PBS ou NMDA 200 pmol e imediatamente foram expostos a caixa de condicionamento impregnada com o odor, formando os seguintes grupos experimentais: PBS-PBS, PBS-NMDA 200, DPAT 4 -PBS, DPAT 4 – NMDA 200, DPAT 8 – PBS, DPAT 8 – NMDA 200. Os parâmetros comportamentais foram avaliados nas sessões de familiarização, EC1 e EC2, na caixa de odor.

3.7.3.3 Experimento 10 – Efeito da administração de WAY na MCPdl em ratos submetidos ao condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl.

O experimento 10 foi realizado para investigar se o bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} da serotonina na MCPdl poderia interferir no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl. Para isso, os animais foram familiarizados na caixa de condicionamento e, após 24 h, receberam microinjeções na MCPdl de PBS ou WAY na dose de 7 nmol e, após 5 min, de PBS ou NMDA 100 pmol e imediatamente expostos a caixa de condicionamento impregnada com o odor, formando os seguintes grupos experimentais: PBS-PBS, PBS-NMDA 100, WAY 7 – PBS e WAY 7 - NMDA 100. Os parâmetros comportamentais foram avaliados nas sessões de familiarização, EC1 e EC2, na caixa de odor.

3.7.3.4 Experimento 11– Efeito da modulação do WAY sobre a dose de NMDA 50 pmol na MCPdl no condicionamento olfatório aversivo.

O experimento 11 foi realizado para avaliar se o bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} da serotonina na MCPdl poderia modular a estimulação induzida pelo NMDA 50 pmol na MCPdl, promovendo um condicionamento olfatório aversivo. Assim, 24 h após a familiarização

na caixa de condicionamento, os animais receberam microinjeções na MCPdl de PBS ou WAY, nas doses de 5 ou 7 nmol e, após 5 min, de PBS ou NMDA 50 pmol e imediatamente foram expostos a caixa de condicionamento impregnada com o odor, formando os seguintes grupos experimentais: PBS-PBS, PBS-NMDA 50, WAY 5 – PBS, WAY 5 - NMDA 50, WAY 7 – PBS, WAY 7 - NMDA 50. Os parâmetros comportamentais foram avaliados nas sessões de familiarização, EC1 e EC2, na caixa de odor.

3.7.4 Etapa 4 – Estudo da circuitaria encefálica envolvida no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

Na etapa 4, foi avaliado a participação de estruturas diencefálicas como o núcleo pré mamilar dorsal do hipotálamo (PMd) e os núcleos talâmicos, região ventral do núcleo anteromedial (AmV) e núcleo reuniens (RE), na aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl.

3.7.4.1 *Experimento 12* – Envolvimento do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo na aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

Para avaliar a participação do PMd no condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl, os animais foram microinjetados no PMd com PBS ou ATE 40 nmol e, após 5 min, submetidos à sessão de condicionamento, ou seja, microinjetados com NMDA 100 pmol na MCPdl e imediatamente expostos a caixa de condicionamento impregnada com o odor. Os parâmetros comportamentais foram avaliados nas sessões de familiarização, EC1 e EC2, na caixa de odor.

3.7.4.2 *Experimento 13*– Efeito da lesão dos núcleos talâmicos (AMv+RE) no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

Dezessete dias após uma lesão iontoforética que envolveu os núcleos talâmicos AMv+RE, os animais foram submetidos ao condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl, durante 10 min. Animais sem lesão foram considerados como controle do experimento. Os parâmetros comportamentais foram avaliados nas sessões de familiarização, EC1 e EC2, na caixa de odor.

3.8 Perfusão e Histologia

A figura 6 ilustra os locais das microinjeções na MCPdl e no PMd, além das fotos com a marcação do corante nestas estruturas e uma foto representativa da lesão no tálamo. Somente os animais com o sítio da microinjeção localizado na MCPdl e no PMd foram incluídos na análise estatística deste estudo.

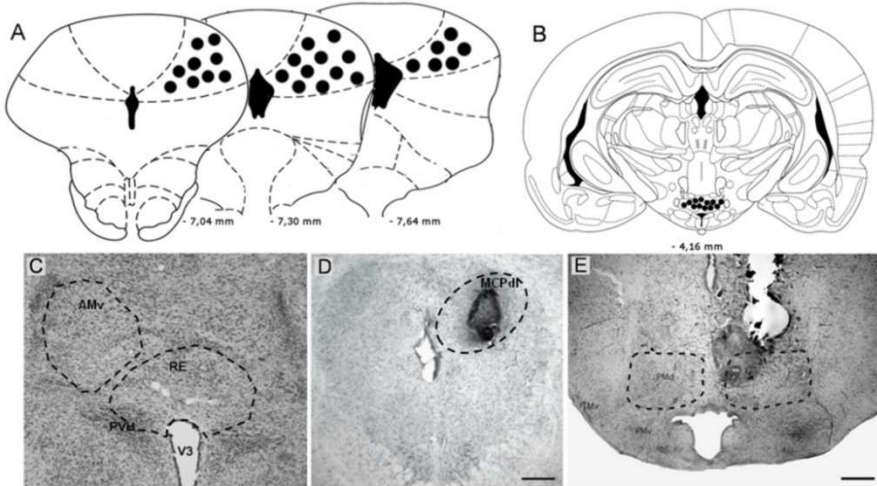


Figura 6. Diagrama esquemático de cortes coronais do encéfalo de rato, localizando a MCPdl (A) e o PMd (B). Os círculos pretos indicam o local das microinjeção, o número de círculos representados é menor do que o número de animais utilizado nos protocolos experimentais. Fotomicrografias de um corte coronal do encéfalo de rato corado com Giemsa na região da MCPdl (C) e PMd (D), mostrando o local da microinjeção. Fotomicrografias de um corte coronal do encéfalo de rato na região talâmica AMv+RE (E). Barra de escala 500 μ m. Legendas: AMv- parte ventral do núcleo talâmico anterior, RE- núcleo reuniens, PVH- núcleo paraventricular do hipotálamo, MCPdl- substância cinzenta periaquedual dorsolateral, TMv- núcleo túbero-mamilar, PMv- núcleo pré-mamilar ventral do hipotálamo, PMd- núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo.

Para a análise histológica, ao término dos experimentos, os animais foram anestesiados com pentobarbital (40 mg/Kg; i.p.; Cristália, Brasil) e perfundidos, via intracardíaca, durante 5 min com solução salina (NaCl 0,9 %), seguida por 5min de solução de formaldeído (10 %; Vetec, Brasil). Antes do início da perfusão, os animais foram microinjetados com o corante Azul de Evans (0,2 μ l; 0,5%; Sigma-

Aldrich, St. Louis, EUA), para determinar o sítio da microinjeção. Quando possível, a mesma agulha foi utilizada durante o experimento e a microinjeção do corante. Posteriormente, os encéfalos foram removidos e acondicionados em solução formaldeído (10 %) e solução de sacarose (30%.), por no mínimo 1 dia em cada solução.

Os encéfalos foram cortados (50 μ m) em um criostato (Leica, modelo CM 1850, Microsystems AG, Wetzlar, Alemanha) e montados sobre lâminas de vidro para microscopia, previamente gelatinizadas. Os cortes foram imediatamente observados em microscópio óptico, para identificação do sítio da microinjeção através da comparação com o diagrama do Atlas de Paxinos e Watson (1998).

Posteriormente, as lâminas devidamente secas, passaram por uma bateria de coloração com Giemsa, descrita no anexo 1. As lâminas coradas foram fotografadas em um microscópio óptico acoplado a um sistema de captura de imagem (Olympus Co. modelo BX41, Melville, NY, EUA).

3.9 Análise estatística

Os parâmetros comportamentais observados no condicionamento olfatório aversivo (tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de *head-out*) foram transformados em porcentagem e considerados como variáveis dependentes. Inicialmente, os dados obtidos pelos diferentes grupos durante a sessão de familiarização na caixa de odor foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de uma via. Nos experimentos que não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos durante a sessão de familiarização, os valores obtidos foram agrupados e representados como média \pm 95% do intervalo de confiança. Os dados obtidos nas sessões EC1 e EC2 foram analisados através da ANOVA para medidas repetidas e representados como média \pm erro padrão da média. Para os experimentos que apresentaram diferenças estatísticas na sessão de familiarização, esta etapa foi analisada junto com as sessões EC1 e EC2, através de uma ANOVA para medidas repetidas. Em todos os casos que a ANOVA indicou valores significativos, os dados foram submetidos ao teste *post hoc* de *Newman-Keuls*.

Todas as análises foram realizadas através do programa Statistica ® (versão 10.1; StatSoft®, Tulsa, EUA) e os gráficos construídos no programa Prisma 5.0 (GraphPad®, San Diego, EUA). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Etapa 1 - Padronização do condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação química da MCPdl.

4.1.1 Experimento 1 – Efeito da microinjeção de NMDA na MCPdl na aquisição do condicionamento olfatório aversivo.

A Figura 7 ilustra o efeito da microinjeção de PBS ou NMDA (25, 50, 100 ou 200 pmol) na MCPdl na aquisição do condicionamento olfatório aversivo.

Os ratos que receberam PBS ou NMDA, nas doses de 25, 50, 100 ou 200 pmol na MCPdl, oito em cada grupo, e imediatamente foram submetidos à caixa de condicionamento impregnada com odor de acetato de amila, durante 10 min, não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros analisados durante a sessão de familiarização na caixa de odor. Nas etapas de testes EC1 e EC2, a ANOVA detectou diferenças significativas no fator tratamento para o tempo de aproximação [$F(4,35)=5,13$; $p=0,002$] e para o tempo escondido [$F(4,35)=5,85$; $p=0,001$], mas não para o tempo de *head-out*. A análise *post hoc* revelou que os ratos tratados com NMDA 100 pmol na MCPdl e imediatamente expostos ao odor durante a sessão de condicionamento reduziram o tempo de aproximação à fonte de odor e aumentaram o tempo escondido no compartimento fechado, nas sessões de testes EC1 e EC2, quando comparados ao grupo controle PBS. Os ratos que receberam NMDA nas doses de 25, 50 ou 200 pmol na MCPdl durante a aquisição do condicionamento olfatório aversivo não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros analisados, quando comparados com o grupo controle PBS. Não houve efeito do fator repetição (EC1 x EC2) nem interação entre tratamento e repetição.

Portanto, estes resultados demonstraram que a microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl é capaz de promover um condicionamento olfatório aversivo.

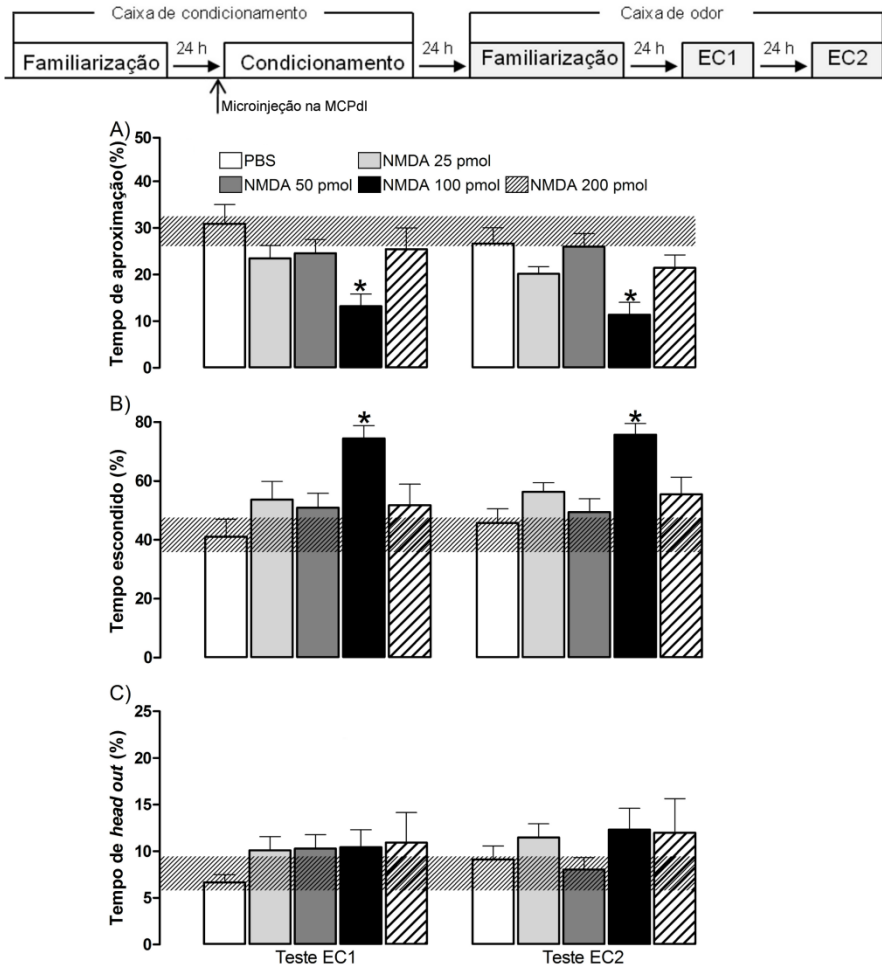


Figura 7. Comportamento defensivo no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de diferentes doses (pmol) de NMDA na MCPdl durante a sessão de condicionamento. As colunas representam a média \pm e.p.m. (n=8 por grupo) do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head out* (C), durante as sessões EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. * $p < 0.05$ comparado ao grupo PBS. ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls. O fluxograma no alto da figura representa o delineamento experimental utilizado.

4.1.2 Experimento 2– Padronização do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

No experimento 2, a dose de NMDA 100 pmol foi selecionada para verificar a seletividade da estimulação da MCPdl em promover a aquisição do condicionamento olfatório aversivo. Os grupos PBS/odor (n=8), PBS/sem odor (n=8), NMDA/sem odor (n=8), NMDA/odor (n=10) e NMDA-fora/odor (n=8) não apresentaram diferenças significativas durante a sessão de familiarização na caixa de odor. Nas etapas de testes EC1 e EC2, a ANOVA detectou diferenças significativas no fator tratamento para o tempo de aproximação [$F(4,37)=8,95$; $p=0,00004$], para o tempo escondido [$F(4,37)=28,47$; $p=0,00001$] e para o tempo de *head-out* [$F(4,37)=10,97$; $p=0,00001$]. A análise *post hoc* mostrou que ratos microinjetados com o veículo (PBS) no dia do condicionamento e apresentados pela primeira vez ao odor no dia do EC1, grupo PBS/sem odor, não são diferentes do grupo controle PBS/odor, sugerindo que a apresentação do odor pela primeira vez na caixa de odor (EC1) não possui caráter aversivo. Da mesma forma, o grupo que recebeu NMDA e não foi exposto ao odor no dia do condicionamento (NMDA/sem odor), também não apresentou diferenças nos seus parâmetros comportamentais em relação ao grupo controle (fig. 8), sugerindo que apenas uma estimulação química da MCPdl não é capaz de alterar as respostas comportamentais a estímulos novos (odor ou ambiente) quando estes não foram pareados com a estimulação.

Por fim, a análise *post hoc* revelou que somente os ratos microinjetados com NMDA 100 pmol na MCPdl na presença de odor de acetato de amila reduziram o tempo próximo à fonte de odor e aumentaram os tempos escondido e de *head out* quando comparados com os demais grupos na sessão EC1 e EC2, confirmando a capacidade e seletividade da microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl em atuar como estímulo incondicionado em um modelo de condicionamento olfatório aversivo.

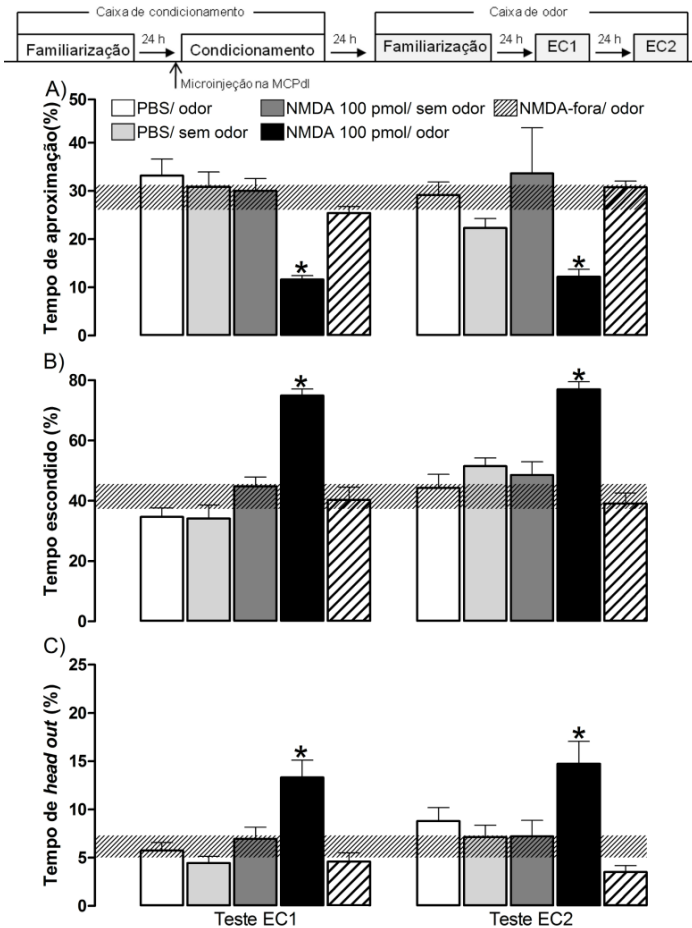


Figura 8. Padronização do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl. Os animais foram agrupados de acordo com as condições do condicionamento e a microinjeção na MCPdl: (1) PBS/ odor- infusão de PBS com apresentação de odor de acetato de amila (n = 8); (2) PBS/ sem odor- infusão de PBS sem exposição ao odor (n = 8); (3) NMDA/ sem odor- infusão de NMDA 100 pmol sem exposição ao odor (n=8); (4) NMDA/ odor- infusão de NMDA 100 pmol com apresentação do odor (n = 10) e (5) NMDA-fora- infusão de NMDA 100 pmol fora da MCPdl com exposição ao odor (n=8). As colunas representam a média \pm e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head out* (C), durante as sessões EC1 e EC2.

As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. * $p < 0.05$ comparado ao grupo PBS. ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls. O fluxograma no alto da figura representa o delineamento experimental utilizado.

4.1.3 Experimento 3 - Efeito da duração da sessão de condicionamento no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

A figura 9 representa os resultados obtidos nas sessões de teste EC1 e EC2, após o pareamento de um odor com a microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl, durante 5, 10 ou 20 min. A ANOVA não mostrou diferenças significativas durante a sessão de familiarização na caixa de odor, entre os animais tratados com NMDA 100 pmol e expostos 5 (n=9), 10 (n=8) ou 20 (n=9) min à sessão de condicionamento. Assim, como não observou diferenças na familiarização entre estes grupos e o grupo tratado com PBS (n=8) na MCPdl e expostos durante 10 min à sessão de condicionamento.

Entretanto, no dia dos testes EC1 e EC2, a ANOVA detectou diferenças significativas, entre os grupos acima mencionados, no fator tratamento para o tempo de aproximação [$F(3,30)=8,49$; $p=0,003$] e para o tempo escondido [$F(3,30)=10,98$; $p=0,0005$], mas não para o tempo de *head-out*.

A análise *post hoc* revelou que somente os ratos tratados com NMDA 100 pmol na MCPdl e imediatamente expostos ao odor durante a sessão de condicionamento de 10 min reduziram o tempo de aproximação à fonte de odor e aumentaram o tempo escondido no compartimento fechado, nas sessões de testes EC1 e EC2, quando comparados ao grupo controle PBS e aos animais tratados com NMDA, mas expostos a sessões menores (5 min) ou maiores (20 min) que 10 min.

Portanto, de acordo com os resultados ilustrados na figura 9, a associação entre o estado aversivo evocado pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl e um odor necessitou de uma sessão de condicionamento com duração de 10 min para resultar em um condicionamento olfatório aversivo.

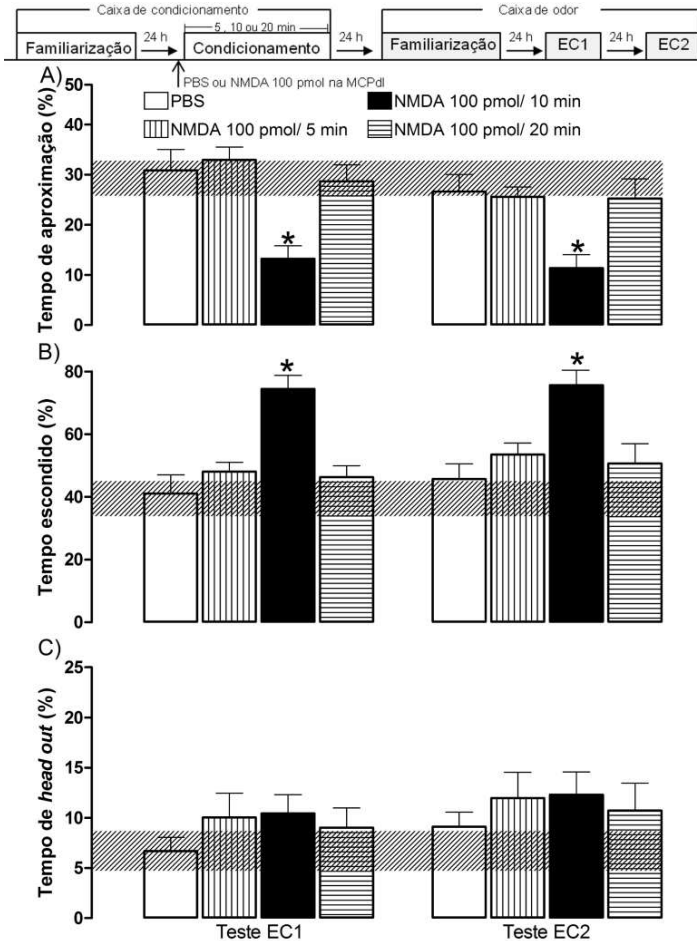


Figura 9. Efeito da duração da sessão de condicionamento no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl. Os animais foram microinjetados na MCPdl com PBS e apresentação ao odor de acetato de amila por 10 min (PBS/ 10 min; n=8) ou com NMDA 100 pmol e expostos ao odor acetato de amila durante 5 (NMDA 100 pmol/ 5 min; n=9), 10 (NMDA 100 pmol/ 10 min; n=8) ou 20 (NMDA 100 pmol/ 20 min; n=9) minutos. As colunas representam a média \pm e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head out* (C), durante as sessões EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. * $p < 0.05$ comparado ao

grupo PBS. ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls. O fluxograma no alto da figura representa o delineamento experimental utilizado.

4.1.4 Experimento 4 - Diferenças no intervalo para o início da sessão de condicionamento após a microinjeção na MCPdl, no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

Durante a sessão de familiarização na caixa de odor, a ANOVA não revelou diferenças significativas nos parâmetros analisados entre os grupos: 1) microinjetados com PBS e imediatamente expostos à sessão de condicionamento durante 10 min (n=8), 2) microinjetados com NMDA 100 pmol e imediatamente expostos à sessão de condicionamento durante 5 min (n=8), 3) microinjetados com NMDA 100 pmol e imediatamente expostos à sessão de condicionamento durante 10 min (n=8), 4) microinjetados com NMDA 100 pmol e, após 5 min, expostos à sessão de condicionamento durante 5 min (n=8) e 5) microinjetados com NMDA 100 pmol e, após 5 min, expostos à sessão de condicionamento durante 10 min (n=8).

Nas etapas de testes EC1 e EC2, a ANOVA mostrou diferenças significativas entre os grupos acima mencionados no fator tratamento para o tempo de aproximação [$F(4,38)=10,78$; $0,00001$] e para o tempo escondido [$F(4,38)=11,56$; $p=0,00001$], mas não para o tempo de *head-out*.

A análise *post hoc* revelou que os ratos tratados com NMDA 100 pmol na MCPdl e expostos ao odor durante a sessão de condicionamento de 10 min, independente do intervalo do tratamento (0 ou 5 min), reduziram o tempo de aproximação à fonte de odor e aumentaram o tempo escondido no compartimento fechado, na sessão de teste EC1, quando comparados com o grupo controle PBS. Na sessão EC2, somente os animais tratados com NMDA e expostos imediatamente a sessão de condicionamento de 10 min apresentaram uma redução no tempo de aproximação e um aumento no tempo escondido quando comparado ao grupo controle PBS.

O experimento 4 mostrou que, independente do intervalo entre o tratamento de NMDA 100 pmol na MCPdl e a sessão de condicionamento, a associação entre os estímulos (EI +EC) no condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl é realizada em 10 minutos. Entretanto, o condicionamento de segunda ordem, observado na sessão EC2, só é obtido quando a microinjeção de NMDA é realizada imediatamente antes da sessão de

condicionamento, sugerindo maior magnitude com este intervalo no condicionamento olfatório aversivo.

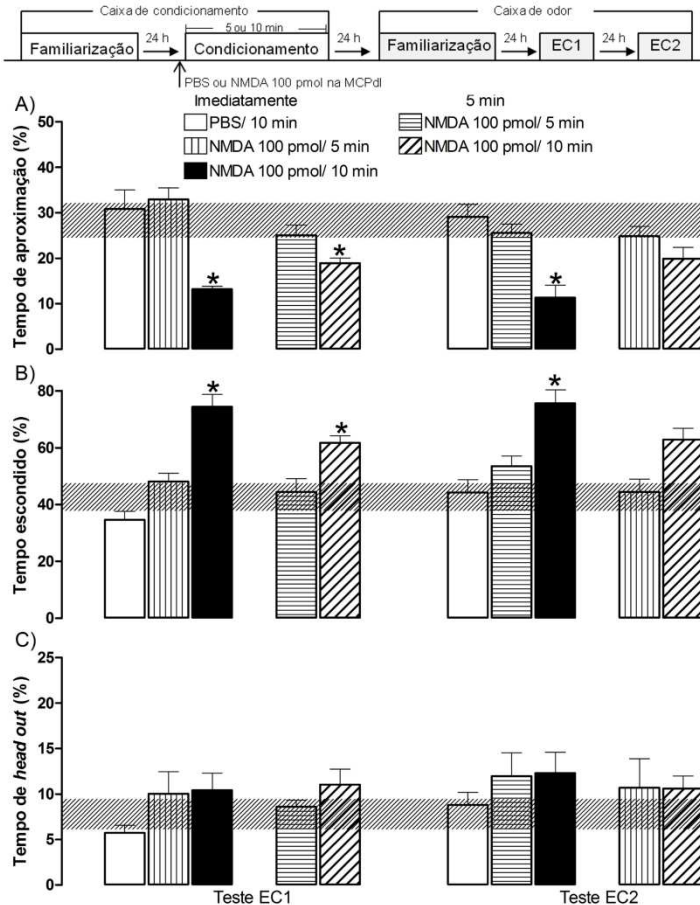


Figura 10. Efeito da duração Vs o intervalo do tratamento da sessão de condicionamento no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl. Os animais foram microinjetados na MCPdl com PBS e imediatamente apresentados ao odor de acetato de amila por 10 min (PBS/ 10 min; n=8) ou com NMDA 100 pmol e imediatamente expostos ao odor acetato de amila durante 5 (NMDA 100 pmol/ 5 min; n=9) ou 10 (NMDA 100 pmol/ 10 min; n=8), ou ainda, foram microinjetados com NMDA 100 pmol e, após 5 min, expostos ao odor acetato de amila durante 5 (NMDA 100 pmol/ 5 min; n=8) ou 10 (NMDA 100 pmol/ 10 min; n=10) minutos. As colunas representam a média \pm e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de head

out (C), durante as sessões EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. $*p < 0.05$ comparado ao grupo PBS. ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls. O fluxograma no alto da figura representa o delineamento experimental utilizado, o número, ao lado do tratamento microinjetado na MCPdl, representa o tempo total da sessão de condicionamento.

4. 2 Etapa 2 – Avaliação Farmacológica

4.2.1 Experimento 5 - Efeito do midazolam sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

Para os ratos que receberam salina (n=9) ou MDZ na doses de 0,5 (n=8) ou 1 (n=9) mg/kg, 30 min antes da sessão de condicionamento do condicionamento olfatório de medo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl, não foram encontradas diferenças significativas na etapa de familiarização na caixa de odor.

Nas sessões de teste EC1 e EC2, a ANOVA detectou diferenças significativas no fator tratamento para o tempo de aproximação [F(2, 23)=11,56; p=0,0003], para o tempo escondido [F(2, 23)=16,94; p=0,00003] e para o tempo de *head-out* [F(2, 23)=8,49; p=0,002].

Análise *post hoc* revelou aumento no tempo de aproximação e diminuição no tempo escondido nos animais tratados com MDZ 1 mg/kg 30 min antes da aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl, comparados com o grupo controle salina, nas sessões de testes EC1 e EC2. Nos parâmetros analisados, os animais tratados com MDZ 0,5 mg/kg não são diferentes dos animais tratados com salina. O teste *post hoc* mostrou uma redução no tempo de *head-out* do grupo tratado com MDZ 1 mg/kg, quando comparado com o grupo tratado com MDZ 0,5 mg/kg antes da sessão de condicionamento, nas sessões de testes EC1 e EC2.

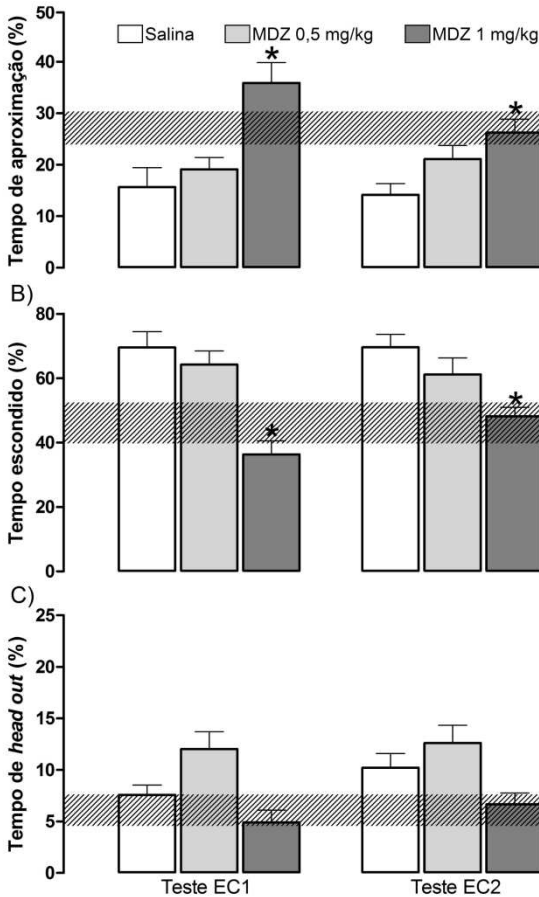


Figura 11. Efeito do midazolam sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl. Os animais foram administrado via i.p. com salina (n=9), midazolam (MDZ) 0,5 (n=8) ou 1 (n=9) Mg/kg e, após 30 min, microinjeção na MCPdl com NMDA 100 pmol e imediatamente apresentação ao odor de acetato de amila por 10 min. As colunas representam a média \pm e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head out* (C), durante as sessões EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. * $p < 0.05$ comparado ao grupo PBS. ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls.

Esses resultados demonstraram que o tratamento com a maior dose de MDZ (1 mg/kg) interfere com a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

4.2.2 Experimento 6 - Efeito do midazolam sobre a expressão do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

Na etapa de familiarização à caixa de odor, a ANOVA não encontrou diferenças significativas nos parâmetros analisados, entre os animais tratados com salina (n=7) ou MDZ na doses de 0,25 (n=8) e 0,5 (n=7) mg/kg, 30 min antes da sessão de teste EC1 do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

Nas sessões de teste EC1 e EC2, a ANOVA mostrou diferenças significativas no fator tratamento para o tempo de aproximação [$F(2,19)=6,60$; $p=0,007$] e para o tempo escondido [$F(2, 19)=6,34$; $p=0,008$]. Além de demonstrar diferenças no fator repetição para o tempo de aproximação [$F(1,19)=7,69$; $p=0,01$] e para o tempo escondido [$F(1, 19)=17, 54$; $p=0,005$].

A análise *post hoc* revelou um aumento no tempo de aproximação e diminuição no tempo escondido nos animais tratados com MDZ 0,5 mg/kg, 30 min antes da sessão EC1 do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl, comparados com o grupo controle salina, nas sessões de testes EC1 e EC2. Os animais tratados com MDZ 0,25 mg/kg não são diferentes dos animais tratados com salina, nos parâmetros avaliados.

Esses resultados demonstraram que o tratamento com MDZ na dose de 0,5mg/kg) reduziu a expressão das respostas defensivas observadas no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

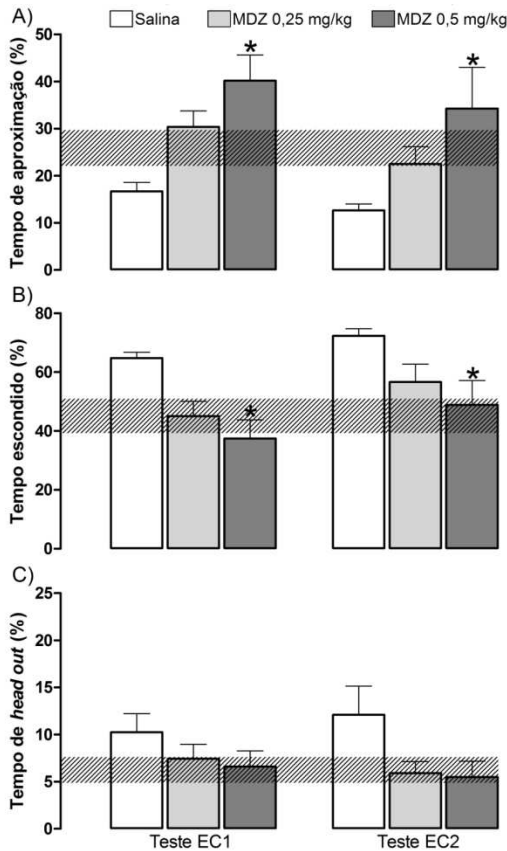


Figura 12. Efeito do midazolam sobre a expressão do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl. Todos os animais foram microinjetados na MCPdl com NMDA 100 pmol e imediatamente apresentação ao odor de acetato de amila por 10 min, na sessão de condicionamento. Antes da sessão EC1 os animais foram divididos em: salina (n=7), MDZ 0,25 mg/kg (n=8) e MDZ 0,5 mg/kg (n=7), conforme o tratamento via i.p., 30 min antes do teste EC1. As colunas representam a média \pm e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head out* (C), durante as sessões EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. * $p < 0.05$ comparado ao grupo PBS. ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls.

4.2.3 Experimento 7 – Efeito do nadolol na aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

Os ratos que receberam salina (n=7) ou nadolol 10 mg /kg (n=8), 30 min antes da sessão de condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl, não apresentaram diferenças significativas no fator tratamento para o tempo de aproximação [$F(1,13)=4,57$; $p=0,05$], o tempo escondido [$F(1,13)=4,11$; $p=0,06$] e o tempo de *head out* [$F(1,13)=0,01$; $p=0,91$].

Portanto, estes resultados demonstram que o bloqueio dos adrenoreceptores beta periféricos não interferiu na aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

Tabela 3. Efeito do nadolol 10 mg/kg na aquisição do condicionamento aversivo olfatório induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl. Os animais foram tratados com salina (n=7) ou nadolol (n=8) e, após 30 min, submetidos à sessão de condicionamento do condicionamento olfatório de medo.

Parâmetros analisados	Tratamento			
	Salina		Nadolol 10 mg/kg	
	Teste EC1	Teste EC2	Teste EC1	Teste EC2
Tempo aproximação (%)	14,5 ± 2,2	13,4 ± 2,8	19,9 ± 1,5	18,4 ± 2,1
Tempo escondido (%)	70,7 ± 4,8	71,7 ± 5,0	61,6 ± 2,7	62,7 ± 2,6
Tempo de <i>head out</i> (%)	12,2 ± 1,7	11,7 ± 3,3	13,5 ± 1,7	11,0 ± 2,1

4.3 Etapa 3 – Participação dos receptores 5HT_{1A} da serotonina na MCPdl na aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

4.3.1 Experimento 8 – Efeito da administração de DPAT na MCPdl em ratos submetidos ao condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

A Figura 13 ilustra o efeito do agonista 5 HT_{1A} (DPAT) sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

Os grupos PBS-PBS (n=8), PBS-NMDA 100 (n=8), DPAT 4-PBS (n=7), DPAT 4-NMDA 100 (n=7), DPAT 8-PBS (n=6) e DPAT 8-

NMDA 100 (n=7) não apresentaram diferenças significativas durante a etapa de familiarização na caixa de odor.

Nas etapas de testes EC1 e EC2, a ANOVA detectou diferenças significativas no fator tratamento para o tempo de aproximação [F(5,37)=8,85; p=0,00001], para o tempo escondido [F(5,37)=11,28; p=0,00001], e para o tempo de *head-out* [F(5,37)=3,57; p=0,01]. A ANOVA também detectou diferenças significativas no fator repetição para o tempo de aproximação [F(1,37)=15,79; p=0,0003], para o tempo escondido [F(1,37)=10,66; p=0,002] e para o tempo de *head-out* [F(1,37)=5,35; p=0,02].

A análise *post hoc* revelou que não houve diferenças entre os grupos PBS-PBS, DPAT 4-PBS e DPAT 8-PBS. O grupo DPAT 4-PBS apresentou uma redução do tempo de aproximação no teste EC2, quando comparado com o seu desempenho no teste EC1.

O teste *post hoc* também mostrou que o grupo PBS-NMDA 100 reduziu o tempo de aproximação à fonte de odor e aumentou o tempo escondido no compartimento fechado, nas sessões de testes EC1 e EC2, quando comparado ao grupo controle PBS-PBS. Os ratos do grupo DPAT 4-NMDA 100 também reduziram a porcentagem de tempo de aproximação e aumentaram a porcentagem de tempo escondido, quando comparados ao grupo DPAT 4-PBS, somente na sessão de teste EC1.

Por fim, o teste *post hoc* relevou que a microinjeção de DPAT 8 nmol antes do NMDA 100 pmol (grupo DPAT 8-NMDA 100) promoveu o aumento do tempo de aproximação e redução do tempo escondido nas sessões de teste EC1 e EC2 deste grupo, quando comparado ao grupo PBS-NMDA 100. O grupo DPAT 4-NMDA 100 também reduziu o tempo escondido durante as duas sessões de testes, quando comparado ao grupo PBS-NMDA 100.

Apesar da diferença significativa no fator tratamento do tempo de *head-out*, o teste *post hoc* não observou diferenças relevantes entre os grupos.

Portanto, os resultados do experimento 8 demonstram que o tratamento com DPAT 8 nmol na MCPdl impede a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl. Os animais tratados com DPAT 4 nmol e NMDA 100 pmol na MCPdl exibiram uma resposta aversiva ao odor condicionado, porém, pouco robusta quando comparada com as respostas observadas nos animais que receberam somente NMDA 100 pmol. Corroborando esta hipótese, o tratamento com DPAT 4nmol-NMDA 100 pmol na MCPdl não foi capaz de induzir um condicionamento de segunda ordem.

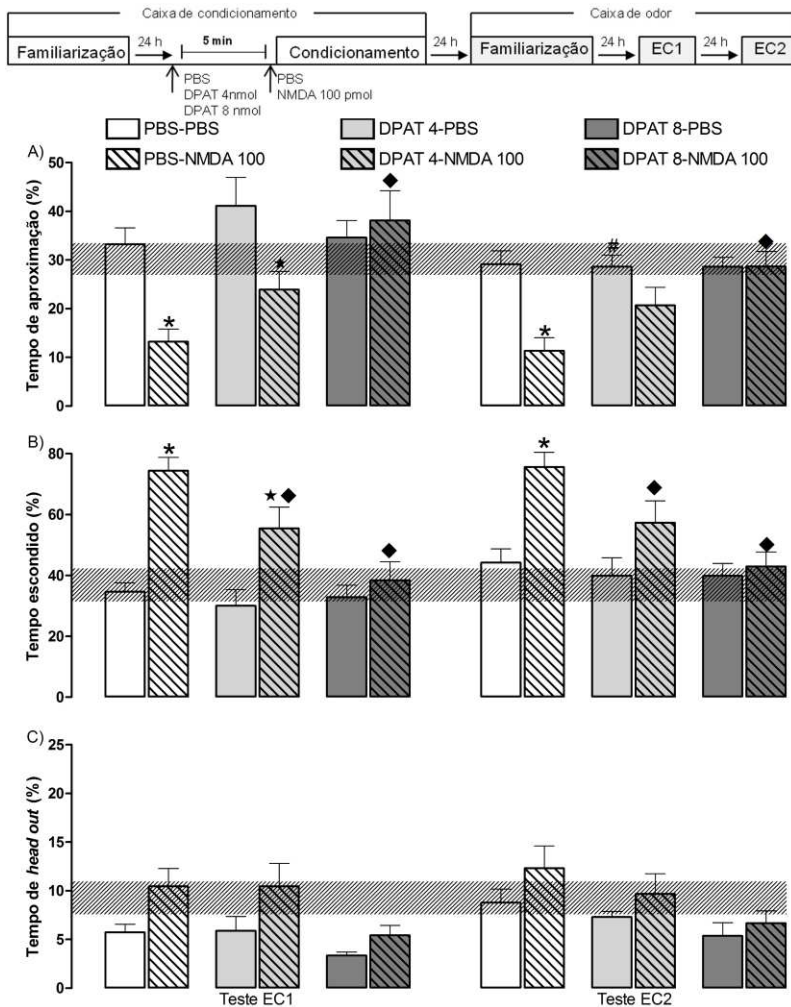


Figura 13. Efeito da microinjeção do agonista serotoninérgico DPAT na MCPdl sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl. Os animais foram microinjeção na MCPdl com PBS, DPAT 4 nmol ou DPAT 8 nmol e, após 5 min com PBS ou NMDA 100 pmol e imediatamente apresentação ao odor de acetato de amila por 10 min, na sessão de condicionamento. Estes animais formaram os seguintes grupos: PBS-PBS (n=8), PBS-NMDA 100 (n=8), DPAT 4-PBS (n=7), DPAT 4-NMDA 100 (n=7), DPAT 8-PBS (n=6) e DPAT 8-NMDA 100 (n=7). As colunas representam a média \pm e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head out*

(C), durante as sessões EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. * $p < 0.05$ comparado ao grupo PBS-PBS. # $p < 0.05$ comparado ao desempenho do respectivo grupo no teste EC1. ★ $p < 0.05$ comparado ao grupo DPAT 4-PBS. ♦ $p < 0.05$ comparado ao grupo PBS-NMDA 100. ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls. O fluxograma no alto da figura representa o delineamento experimental utilizado.

4.3.2 Experimento 9– Efeito da modulação do DPAT sobre a dose de NMDA 200 pmol na MCPdl no condicionamento olfatório aversivo.

A Figura 14 ilustra o efeito do agonista 5 HT_{1A} (DPAT) sobre a estimulação da MCPdl com NMDA 200 pmol na aquisição do condicionamento olfatório aversivo. Os Grupos PBS-PBS (n=8), PBS-NMDA 200 (n=8), DPAT 4-PBS (n=7), DPAT 4-NMDA 200 (n=10), DPAT 8-PBS (n=6) e DPAT 8-NMDA 200 (n=8) não apresentaram diferenças significativas durante a etapa de familiarização na caixa de odor. Nas etapas de testes EC1 e EC2, ANOVA detectou diferenças significativas ($p < 0,05$) no fator tratamento e no fator repetição para o tempo de aproximação [$F(5,41)=7,27$, $p=0,00006$; $F(1,41)=13,94$, $p=0,0006$] e para o tempo escondido [$F(5,41)=9,24$, $p=0,00001$; $F(1,41)=12,8$, $p=0,0009$]. A análise *post hoc* revelou que não houve diferenças entre os grupos PBS-PBS, DPAT 4-PBS e DPAT 8-PBS. O grupo DPAT 4-PBS apresentou uma redução do tempo de aproximação no teste EC2, quando comparado com o seu desempenho no teste EC1. O teste *post hoc* também mostrou que o grupo DPAT 4-NMDA 200 reduziu o tempo de aproximação à fonte de odor na sessão de teste EC1 e aumentou o tempo escondido no compartimento fechado, nas sessões de testes EC1 e EC2, quando comparado ao grupo controle PBS-PBS e ao grupo DPAT 4-PBS.

Portanto, os resultados do experimento 9 demonstraram que a administração prévia de DPAT 4 nmol permitiu que a dose de NMDA 200 pmol na MCPdl promovesse um condicionamento olfatório aversivo.

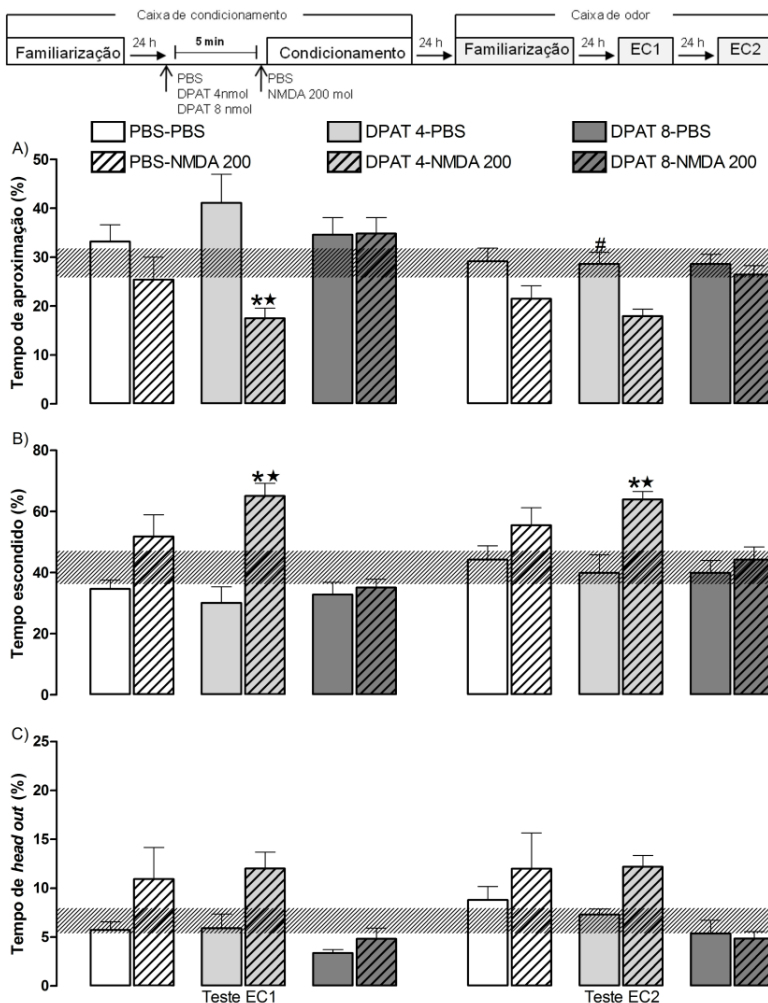


Figura 14. Efeito da microinjeção do agonista serotoninérgico DPAT na MCPdl sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 200 pmol na MCPdl. Os animais foram microinjeção na MCPdl com PBS ou DPAT, nas doses de 4 ou 8 nmol e, após 5 min com PBS ou NMDA 200 pmol e imediatamente apresentação ao odor de acetato de amila por 10 min, na sessão de condicionamento. Estes animais formaram os seguintes grupos: PBS-PBS (n=8), PBS-NMDA 200 (n=8), DPAT 4-PBS (n=7), DPAT 4-NMDA 200 (n=10), DPAT 8-PBS (n=6) e DPAT 8-NMDA 200 (n=8). As colunas representam a média \pm

e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head out* (C), durante as sessões EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. * $p < 0.05$ comparado ao grupo PBS-PBS. # $p < 0.05$ comparado ao desempenho do respectivo grupo no teste EC1. ★ $p < 0.05$ comparado ao grupo DPAT 4-PBS. ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls. O fluxograma no alto da figura representa o delineamento experimental utilizado.

4.3.3 Experimento 10 – Efeito da administração de WAY na MCPdl em ratos submetidos ao condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl.

No experimento 10, a ANOVA detectou diferenças significativas já na etapa de familiarização na caixa de odor para os grupos microinjetados com PBS ou WAY 7 nmol e, após 5 min, com PBS ou NMDA 100 pmol na MCPdl (PBS-PBS, PBS-NMDA 100, WAY 7-PBS e WAY 7-NMDA 100), antes da sessão de condicionamento. Portanto, a estatística realizada neste experimento foi diferente das demais, uma vez que incluiu os dados da familiarização na análise estatística. Sendo assim, a ANOVA mostrou diferenças significativas no fator tratamento e no fator repetição para o tempo de aproximação [$F(3,30)=8,85$, $p=0,0003$; $F(2,60)=7,84$, $p=0,001$], para o tempo escondido [$F(3,30)=14,49$, $p=0,00001$; $F(2,60)=20,15$, $p=0,000001$] e para o tempo de *head-out* [$F(3,30)=5,41$, $p=0,004$; $F(2,60)=6,02$, $p=0,004$], além de detectar uma interação entre o fator tratamento e o fator repetição para o tempo de aproximação [$F(6,60)=2,77$, $p=0,02$] e para o tempo escondido [$F(6,60)=3,93$, $p=0,002$].

O teste *post hoc* revelou que durante a etapa de familiarização na caixa de odor o grupo WAY 7-NMDA 100 reduziu o tempo de aproximação em relação ao grupo WAY 7-PBS e aumentou o tempo escondido em relação aos seus controles PBS-PBS e WAY 7-PBS.

Nas etapas dos testes EC1 e EC2, o grupo PBS-NMDA 100 apresentou uma redução do tempo de aproximação e um aumento do tempo escondido, quando comparado com o seu controle PBS-PBS e com o seu desempenho realizado na etapa de familiarização.

O teste *post hoc* demonstrou ainda que o grupo WAY 7-NMDA 100 reduziu o tempo de aproximação e aumentou o tempo escondido, quando comparado com os grupos controles PBS-PBS e WAY 7-PBS, nas sessões de testes EC1 e EC2. O grupo WAY7-NMDA 100 não apresentou diferenças no tempo de aproximação e no tempo escondido

entre as sessões. Entretanto, este grupo apresentou um aumento do tempo de *head-out* na sessão EC2, quando comparado ao seu grupo controle WAY 7-PBS e ao seu desempenho no dia da familiarização.

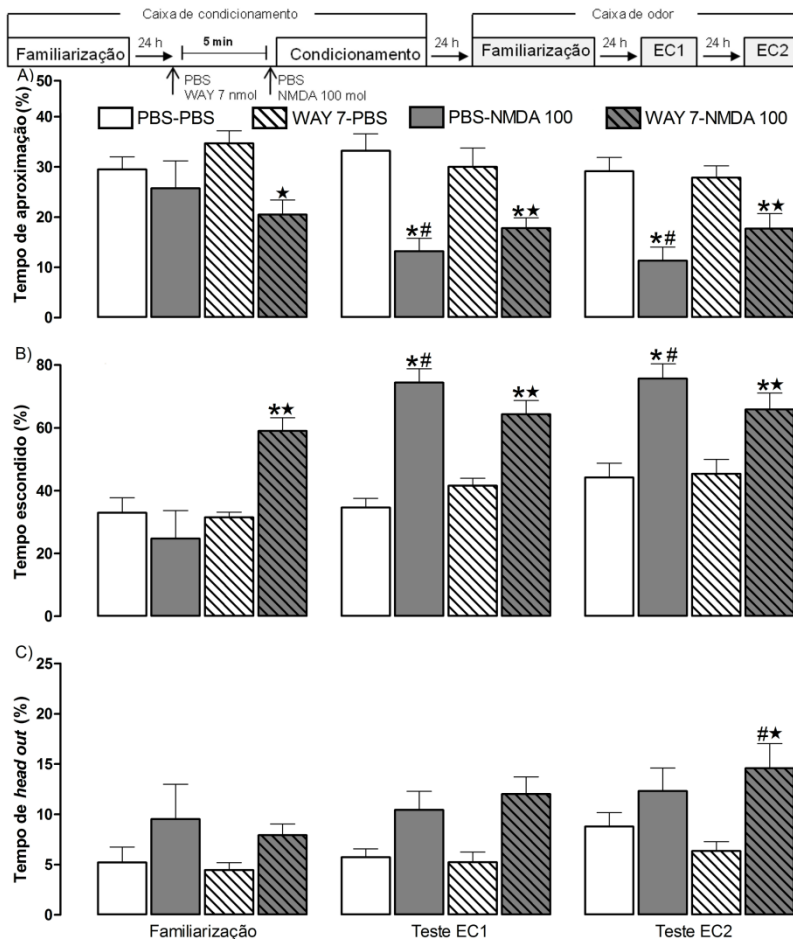


Figura 15. Efeito da microinjeção do antagonista serotoninérgico WAY 7 nmol na MCPdl sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl. Os animais foram microinjetados na MCPdl com PBS ou WAY 7 nmol e, após 5 min com PBS ou NMDA 100 pmol e imediatamente apresentados ao odor de acetato de amila por 10 min, na sessão de condicionamento. Estes animais formaram os seguintes grupos: PBS-PBS (n=8), PBS-NMDA 100 (n=8), WAY 7-PBS (n=8) e WAY 7-NMDA 100 (n=10). As colunas representam

a média \pm e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head out* (C), durante as sessões EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. * $p < 0.05$ comparado ao grupo PBS-PBS. # $p < 0.05$ comparado ao desempenho do respectivo grupo na familiarização. ★ $p < 0.05$ comparado ao grupo WAY 7-PBS. ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls. O fluxograma no alto da figura representa o delineamento experimental utilizado.

Portanto, os resultados do experimento 10 confirmaram que a dose de NMDA 100 pmol é eficiente em promover um condicionamento olfatório aversivo e que, WAY 7 nmol, quando microinjetado na MCPdl 5 min antes da sessão deste condicionamento, pode prejudicar a seletividade das respostas de medo, resultando no aumento das respostas defensivas na etapa de familiarização.

4.3.4 Experimento 11– Efeito da modulação do WAY sobre a dose de NMDA 50 pmol na MCPdl no condicionamento olfatório aversivo.

No experimento 11, na sessão de condicionamento, os animais foram microinjetados com PBS ou WAY nas doses de 7 ou 5 nmol e, após 5 min, com PBS ou NMDA 50 pmol na MCPdl e imediatamente colocados na caixa de condicionamento impregnada com odor de acetato de amila, durante 10 min. Estes animais constituíram os grupos: PBS-PBS (n=8), PBS-NMDA 50 (n=8), WAY 5-PBS (n=7), WAY 5-NMDA 50 (n=7), WAY 7-PBS (n=8), WAY 7-NMDA 50 (n=8). Na etapa de familiarização, estes grupos não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros analisados.

Nas sessões de testes EC1 e EC2, a ANOVA revelou diferenças significativas ($p < 0,05$) no fator tratamento e no fator repetição para o tempo de aproximação [$F(5, 40)=5,12, p=0,001$; $F(1, 40)=4,13, p=0,04$] e para o tempo escondido [$F(5, 40)=9,30, p=0,00001$; $F(1, 40)=7,17, p=0,01$], e para o fator tratamento no tempo de *head-out* [$F(5, 40)=7,65, p=0,00004$].

O teste *post hoc* revelou que o grupo WAY 7-NMDA 50 reduziu o tempo de aproximação e aumentou os tempos escondido e de *head-out* em relação aos seus controles PBS-PBS e WAY 7-PBS, nas sessões de testes EC1 e EC2.

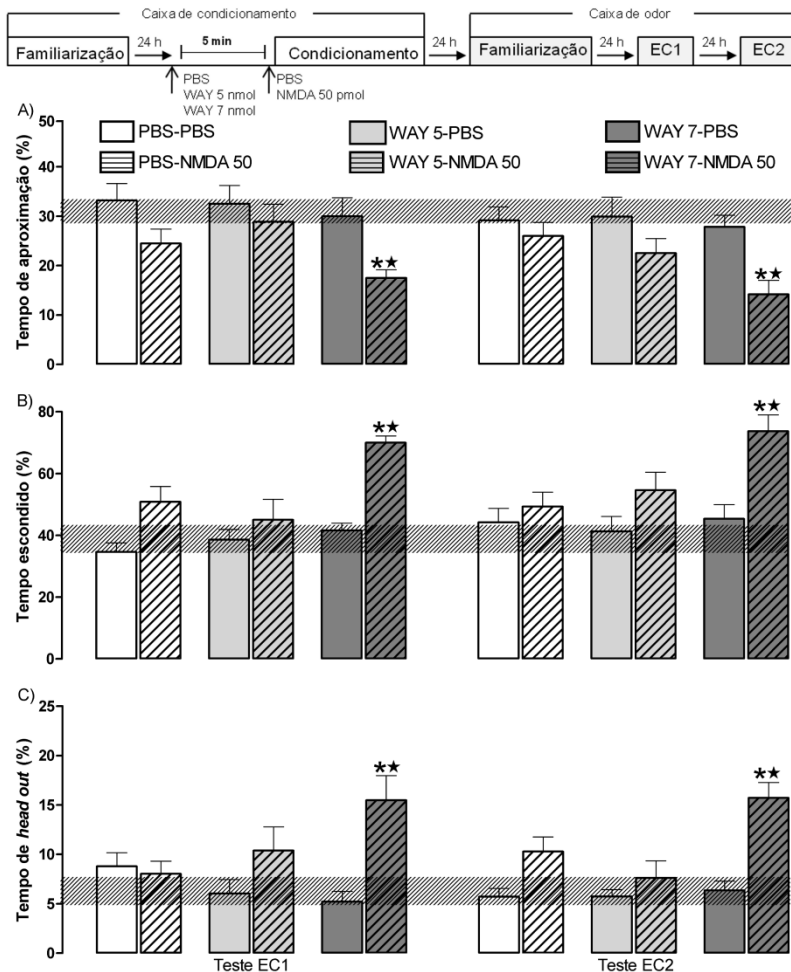


Figura 16. Efeito da microinjeção do antagonista serotoninérgico WAY na MCPdl sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 50 pmol na MCPdl. Os animais foram microinjetados na MCPdl com PBS ou WAY nas doses de 5 ou 7 nmol e, após 5 min com PBS ou NMDA 50 pmol e imediatamente apresentados ao odor de acetato de amila por 10 min, na sessão de condicionamento. Estes animais formaram os seguintes grupos: PBS-PBS (n=8), PBS-NMDA 50 (n=8), WAY 5-PBS (n=7), WAY 5-NMDA 50 (n=7), WAY 7-PBS (n=8) e WAY 7-NMDA 50 (n=8). As colunas representam a média \pm e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head out* (C), durante as sessões EC1 e EC2. As barras horizontais representam o

intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. * $p < 0.05$ comparado ao grupo PBS-PBS. ★ $p < 0.05$ comparado ao grupo WAY 7-PBS. ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls. O fluxograma no alto da figura representa o delineamento experimental utilizado.

Portanto, estes resultados demonstraram que antes do condicionamento, a dose de NMDA 50 pmol na MCPdl precedida por WAY 7 nmol, é capaz de promover o condicionamento olfatório aversivo.

4.4 Etapa 4 – Estudo da circuitaria encefálica envolvida no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

4.4.1 Experimento 14– Envolvimento do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo na aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

Neste protocolo experimental, não houve diferenças significativas entre os grupos no dia da familiarização na caixa de odor. Nas sessões de testes EC1 e EC2, a ANOVA detectou diferenças significativas no fator tratamento para o tempo de aproximação [$F(1,10)=17,1$; $p=0,002$] e para o tempo escondido [$F(1,10)=18,82$; $p=0,001$].

A análise *post hoc* indicou que os ratos microinjetados com ATE 40 nmol no PMd ($n=6$), seguido por NMDA 100 pmol na MCPdl durante o condicionamento, apresentaram diminuição do tempo de aproximação e aumento no tempo escondido, durante os testes EC1 e EC2, quando comparados aos ratos do grupo controle, ou seja, ratos microinjetados com PBS no PMd e NMDA 100 pmol na MCPdl ($n=6$).

Portanto, estes resultados demonstraram que o bloqueio adrenoceptores beta com ATE 40 nmol no PMd impediu a aquisição do condicionamento aversivo promovido pela estimulação da MCPdl.

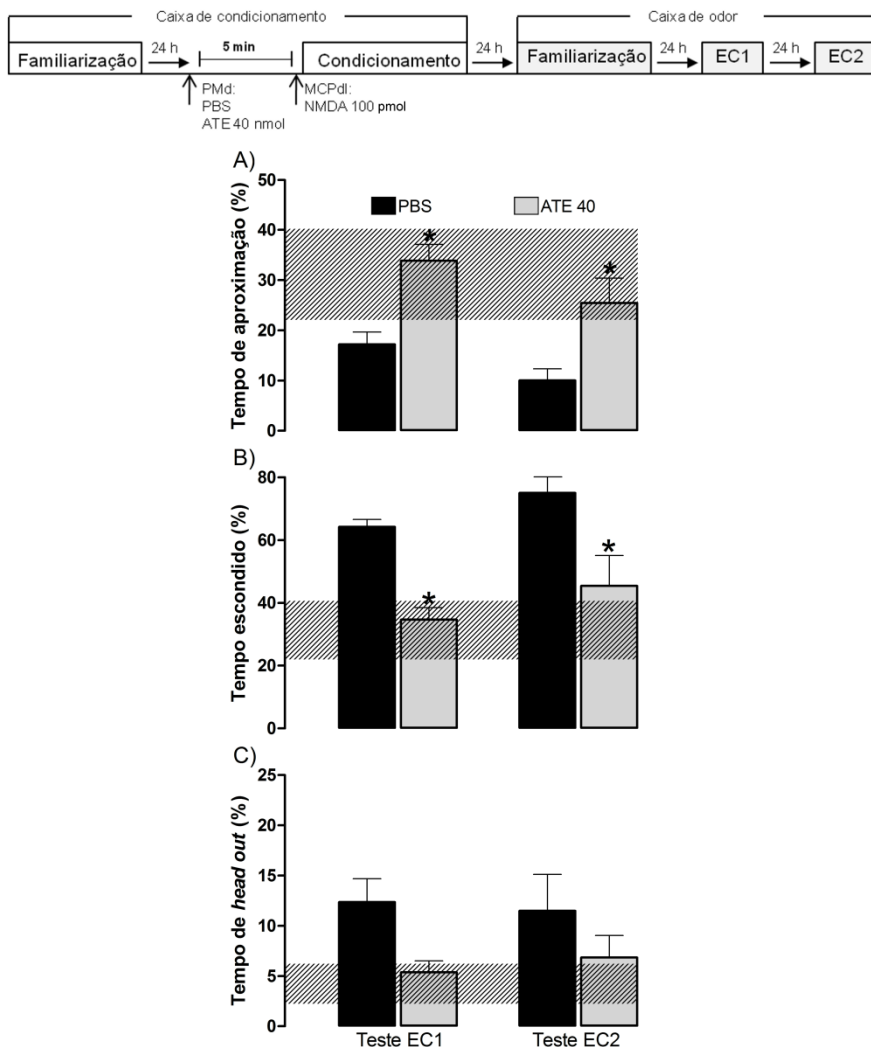


Figura 17. Efeito da microinjeção do atenolol, antagonista adrenérgico do tipo beta, no PMd sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl. Os animais foram microinjetados no PMd com PBS (n=6) ou ATE 40 nmol (n=6) e, após 5 min, submetidos à sessão de condicionamento, que consiste em microinjetar NMDA 100 pmol na MCPdl dos animais e imediatamente apresentá-los ao odor de acetato de amila por 10 min. As colunas representam a média \pm e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head out* (C), durante as sessões EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e

inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. $*p < 0.05$ comparado ao grupo PBS. ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls. O fluxograma no alto da figura representa o delineamento experimental utilizado.

4.4.2 Experimento 15– Efeito da lesão talâmica no condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

Neste protocolo experimental, não houve diferenças significativas entre os grupos no dia da familiarização na caixa de odor. Nas sessões de testes EC1 e EC2, a ANOVA detectou diferenças significativas no fator tratamento para o tempo de aproximação [$F(1,12)=7,81$; $p=0,02$], o tempo escondido [$F(1,12)=21,95$; $p=0,0005$] e para o tempo de *head out* [$F(1,10)=15,75$, $p=0,002$]. A análise *post hoc* indicou que os ratos com lesão nos núcleo AMv+RE ($n=6$) e submetidos ao condicionamento olfatório de medo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl apresentaram diminuição do tempo de aproximação e aumento nos tempos escondido e de *head out*, nas sessões de testes EC1 e EC2, quando comparados aos ratos do grupo controle ($n=8$), ou seja, sem lesão.

Portanto, este resultado mostrou que a lesão do AMv+RE prejudicou a aquisição do condicionamento aversivo promovido pela estimulação da MCPdl.

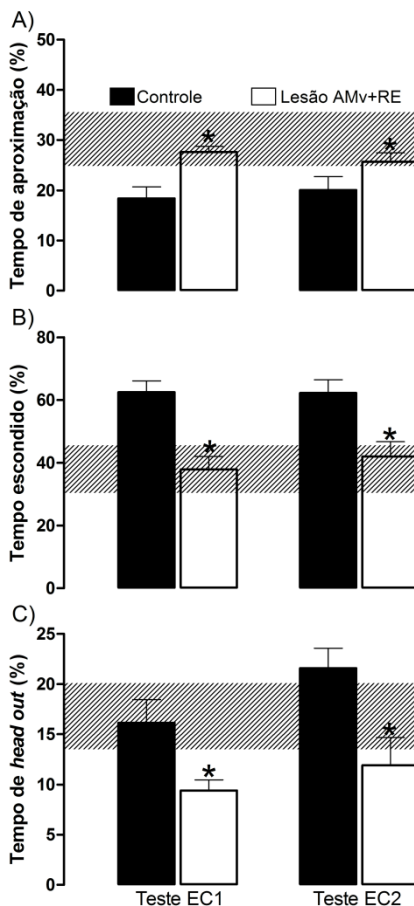


Figura 18. Efeito da lesão da porção ventral do núcleo anteromedial do tálamo e do núcleo reuniens do tálamo na aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl. Os animais sofreram lesão nos núcleos talâmicos AMv+RE (n=6) e, após 17 dias foram submetidos ao condicionamento olfatório de medo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl. O grupo controle (n=8) não sofreu lesão e foi submetido ao mesmo condicionamento. As colunas representam a média \pm e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head out* (C), durante as sessões EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle. ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls.

6. DISCUSSÃO

A MCPdl tem sido relacionada com as respostas defensivas desde os experimentos pioneiros de Hunsperger (1956), que demonstrou o aparecimento de padrões de comportamento defensivo espécie-específico ao estimular uma região mesencefálica envolvendo a MCP (Hunsperger, 1956; Fernandez De Molina e Hunsperger, 1959; 1962; Skultety, 1963; Edwards e Flynn, 1972). Posteriormente, as evidências de que os animais mostram rápida aquisição e manutenção de comportamentos operantes (por exemplo, pressionar a alavanca ou escapar para outro compartimento da caixa) para interromper a estimulação elétrica da MCPd, propuseram que a estimulação desta estrutura possui um caráter motivacional aversivo (Delgado, Roberts *et al.*, 1954; Martin, 1976; Schmitt, Sandner *et al.*, 1981). Além disso, a redução destes comportamentos após administração de clordiazepóxido, diazepam ou lorazepam, sugeriu que a estimulação da MCPd pode envolver aspectos relacionados com as emoções, tais como o medo/ansiedade (Schenberg e Graeff, 1978; Graeff, 1981; 1990).

Com base nesses fatos, este trabalho procurou avaliar se este caráter aversivo motivacional evocado pela estimulação da MCPdl poderia dar suporte a um condicionamento olfatório aversivo. Como observado na figura 7, uma única sessão de pareamento entre um odor neutro (acetato de amila) e uma microinjeção de NMDA na MCPdl resultou em respostas defensivas frente ao odor condicionado, confirmando que o estado aversivo induzido pela estimulação química da MCPdl pode ser utilizado como um estímulo incondicionado, em um condicionamento aversivo. Durante a sessão EC1, os animais apresentaram comportamentos defensivos frente ao odor, evidenciados pela redução do tempo de aproximação da fonte de odor e pelo aumento do tempo escondido no compartimento fechado, somente quando este odor foi previamente pareado com uma microinjeção de 100 pmol de NMDA em 0,2 µl na MCPdl. Além disso, este grupo de animais também demonstrou redução no tempo de aproximação e aumento no tempo escondido durante a sessão EC2. Na sessão EC2, o odor condicionado não estava mais presente no contexto, entretanto, é típico dos roedores exibirem respostas defensivas ao contexto em que os mesmos foram previamente apresentados a um estímulo ameaçador (Blanchard e Blanchard, 1969; Blanchard, Yang *et al.*, 2001; Kroon e Carobrez, 2009). Este tipo de fenômeno durante o processo de aprendizagem evidencia a relevância biológica e um poder associativo do primeiro estímulo condicionado (odor) em produzir um pareamento com outros

estímulos neutros (Gewirtz e Davis, 2000; Cavalli, Bertoglio *et al.*, 2009; Kroon e Carobrez, 2009). Estes resultados corroboram resultados anteriores que demonstraram que a estimulação elétrica da MCPd é capaz de induzir um condicionamento aversivo através de uma associação do tipo Pavloviana (Di Scala, Mana *et al.*, 1987; Castilho e Brandao, 2001). Di Scala e colaboradores (1987) observaram que esta associação era fraca quando a luz era pareada com a estimulação da MCPd, e robusta com o pareamento de um som, após 6 treinos consecutivos. Apesar da necessidade de procedimentos mais elaborados, como a cirurgia estereotáxica, a estimulação da MCPd como estímulo incondicionado induz um aprendizado a partir de um estado aversivo interoceptivo (Delgado, Roberts *et al.*, 1954; Graeff e Rawlins, 1980; Morato De Carvalho, De Aguiar *et al.*, 1981), que parece envolver mais uma alteração do estado emocional do que o choque nas patas, o estímulo incondicionado usualmente utilizado nos experimentos que envolvem o condicionamento. Além da estimulação elétrica, o bloqueio da síntese do GABA, bem como a administração de aminoácidos excitatórios e neuropeptídeos na MCPd, também foram usados como estímulos incondicionados para induzir uma resposta condicionada de aversão ao lugar (Aguiar e Brandao, 1994; Sante, Nobre *et al.*, 2000), obtida após no mínimo três treinos entre a estimulação química da MCPd e o contexto. Este protocolo permitiu o estudo do condicionamento de medo induzido pela estimulação química da MCPd, porém ele ainda parece não ser o mais apropriado, uma vez que envolve múltiplas microinjeções na estrutura e faz uma análise muito simplificada do comportamento defensivo ao analisar somente o tempo que o animal permanece no quadrante previamente pareado com a estimulação da MCPd. Neste contexto, o uso de um condicionamento olfatório surge como uma proposta de reduzir a quantidade de treinos e aumentar a diversidade dos comportamentos defensivos avaliados.

Das doses de NMDA utilizadas neste trabalho (25, 50 100 e 200 pmol), somente a dose de 100 pmol foi capaz de induzir um condicionamento olfatório aversivo, sugerindo uma curva de aprendizado em forma de “sino”. Nos modelos de condicionamento aversivo, a magnitude das respostas aprendidas está diretamente relacionada com a intensidade do estímulo incondicionado (Annau e Kamin, 1961; Sacchetti, Ambrogi Lorenzini *et al.*, 1999; Misanin, Goodhart *et al.*, 2002; Baldi, Lorenzini *et al.*, 2004). Entretanto, a relação não-linear do aprendizado, observada sobre a forma de uma curva em “sino”, tem sido relatada em vários paradigmas de aprendizagem, sobre o efeito de vários compostos ativos (epinefrina,

ACTH, glicocorticóide), sugerindo uma modulação dos processos de memória a partir do nível de excitação emocional (para revisão ver Baldi e Bucherelli, 2005).

Bittencourt e colaboradores (2004) demonstraram que o aumento das doses de NMDA na MCPdl aumentou a probabilidade dos animais exibirem respostas defensivas como salto, galope, corrida e imobilidade, sugerindo que a resposta evocada depende da intensidade da estimulação desta estrutura. Como as doses utilizadas no trabalho citado acima são muito maiores do que as doses administradas neste trabalho, os comportamentos exibidos durante a etapa de condicionamento foram avaliados após a microinjeção das diferentes doses de NMDA na MCPdl. Estes resultados estão presentes no anexo B, uma vez que somente os animais do experimento 1 foram avaliados. Como observado na figura 20 do anexo B, os animais microinjetados com NMDA nas doses de 25, 50, 100 e 200 pmol na MCPdl apresentaram aumento no tempo de congelamento, quando comparados com os animais PBS. Além disso, 25% dos ratos microinjetados com NMDA 25 pmol correram e não apresentaram nenhum salto, 37,5% dos ratos microinjetados com NMDA 50 pmol correram e 12,5% saltaram e 62,5% dos ratos microinjetados com NMDA 100 ou 200 pmol correram e 25% saltaram. Esta variação da resposta, dependendo da dose de NMDA na MCPdl, também foi observada no modelo do labirinto em cruz elevado, onde a dose de 25 pmol teve efeito ansiogênico e a dose de 100 pmol não teve este efeito, neste caso, os autores sugeriram que a dose de 100 pmol parece evocar comportamentos limítrofes, entre a esquivar e a fuga/congelamento, não detectados no modelo do labirinto em cruz elevado (Moraes, Bertoglio *et al.*, 2008). Além disso, dois trabalhos sugerem que a atividade desta estrutura pode mediar o aumento da excitação emocional, responsável pelo prejuízo do processo de memória. Walker e Davis (1997) mostraram que a atividade da MCPdl está envolvida na perda da potencialização do sobressalto acústico decorrente da aplicação de um choque elétrico de intensidade alta nas patas dos ratos. Klassen e colaboradores (2002) relataram que uma lesão eletrolítica na MCPdl revertia o prejuízo encontrado no aprendizado com múltiplos choques sem um intervalo adequado. Desta forma, os resultados aqui apresentados estão de acordo com a literatura ao mostrar uma variação não linear da aquisição de um condicionamento dependendo da dose administrada na MCPdl. Esses dados sugerem ainda que a dose de 200 pmol pode estar promovendo uma estimulação da MCPdl acima da apropriada para estabelecer um condicionamento olfatório aversivo.

Considerando que a microinjeção de 100 pmol de NMDA na MCPdl é capaz de induzir resposta de fuga (Aguiar, Moreira *et al.*, 2006), congelamento, saltos, corrida e aumento da frequência cardíaca (Carrive, Dampney *et al.*, 1987; Schoenfeld e Cleland, 2005), ver anexo B e C, alguns grupos experimentais tiveram que ser realizados para descartar a possibilidade da microinjeção por si só induzir aversão a estímulos novos que não foram pareados, como o odor e uma caixa diferente, ou ainda avaliar se o odor usado neste protocolo poderia ter algum caráter aversivo.

A figura 8 mostra que ratos microinjetados com o veículo (PBS) no dia do condicionamento e, pareados (PBS/odor) ou não (PBS/sem odor) ao odor, exibiram comportamentos nas sessões EC1 e EC2 muito semelhantes aos obtidos durante a sessão de familiarização, sugerindo que a manipulação usada para a microinjeção, bem como o odor, não possuem caráter aversivo capaz de induzir um condicionamento. Da mesma forma, o grupo que recebeu NMDA e não foi exposto ao odor no dia do condicionamento (NMDA/sem odor) também não teve seus parâmetros comportamentais alterados, durante as sessões de testes EC1 e EC2. Por fim, os resultados representados na figura 8 demonstraram que somente os ratos microinjetados com 100 pmol de NMDA na MCPdl na presença de odor de acetato de amila reduziram o tempo de permanência próximo à fonte de odor, aumentaram o tempo escondido e o tempo de *head out* quando comparados com os demais grupos na sessão EC1 e EC2, confirmando a capacidade e seletividade da microinjeção de NMDA na MCPdl em atuar como estímulo incondicionado em um modelo de condicionamento olfatório aversivo. O comportamento de *head-out* foi interpretado como uma postura de avaliação de risco. Portanto, o aumento do tempo de *head-out* no grupo NMDA/odor sugere um aumento de vigilância dos animais frente ao odor previamente pareado com a microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl. O comportamento de avaliação de risco é bem característico nos ratos expostos ao predador natural (Mcgregor, Schrama *et al.*, 2002), ou ao odor do predador (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008), e a uma pista olfatória previamente pareada com choques nas patas (Kroon e Carobrez, 2009).

Os resultados obtidos neste estudo mostraram também que a associação entre um odor e o estado aversivo evocado pela microinjeção de 100 pmol de NMDA na MCPdl é dependente da duração da sessão de treino (fig. 9). Algumas variáveis como a duração, intensidade e quantidade de treinamento, têm sido descritos como determinantes da aprendizagem (Tronson e Taylor, 2007). Não só a redução (5 min), mas

também o aumento (20 min) do tempo da sessão de treino, prejudicou a associação entre o estado aversivo induzido pela estimulação da MCPdl (EI) e o odor (EC), sugerindo que em 5 min não houve tempo suficiente para a associação e 20 min foi um tempo de exposição excessiva.

Além disso, os resultados ilustrados na figura 10, revelaram que, independente do intervalo entre a estimulação química e a sessão de condicionamento (0 ou 5 min), todos os sujeitos microinjetados com 100 pmol de NMDA na MCPdl e expostos ao odor durante 10 min no dia do treino, exibiram comportamento defensivo frente ao odor, na sessão EC1. No entanto, quando o intervalo entre a estimulação da MCPdl e o início da sessão de condicionamento foi de 5 min, os animais não apresentaram respostas defensivas condicionadas durante a sessão EC2, sugerindo que a estimulação imediata da MCPdl foi importante para o estabelecimento de um condicionamento forte o suficiente para induzir um condicionamento de segunda ordem. Em uma revisão extensa dos trabalhos com o modelo de condicionamento de lugar, são descritos vários exemplos de resultados modificados, ou mesmo opostos, devido a mudanças na duração da sessão de condicionamento ou no intervalo entre a injeção da droga e o início do condicionamento, sugerindo que a duração e o início de ação da droga são fatores importantes neste tipo de pareamento (Tzschentke, 2007).

A curva minuto a minuto do tempo de congelamento dos animais microinjetados com NMDA 100 pmol e expostos ao odor de acetato de amila durante 20 min, figura 21 do anexo B, indicou que as respostas defensivas como o tempo de congelamento, no dia do condicionamento, aumentam imediatamente após a estimulação da MCPdl e reduzem a partir do sexto minuto. Enquanto que a atividade exploratória, indicada pelo comportamento de levantar, não foi alterada ao longo da sessão. Além disso, o comportamento de corrida e saltos, quando existiu, sempre foi observado no início das sessões. Estas evidências sugerem que o estado aversivo experienciado pelo animal parece ser mais intenso e de natureza diferente no começo de cada sessão do que aquele exibido ao longo do tempo, o que pode, de fato, influenciar o condicionamento proposto nesse trabalho.

Brandão e colaboradores (2008) postularam que o estado emocional observado após as respostas defensivas evidentes, induzidas pela estimulação da MCPd, poderia dar suporte ao processo cognitivo do aprendizado aversivo. Desta maneira, na tentativa de separar temporalmente, o momento das respostas defensivas evidentes e o momento depois destas respostas, um grupo de ratos recebeu NMDA 100 pmol na MCPdl e somente após 5 min foi exposto na caixa de

condicionamento impregnada como o odor de acetato de amila, durante 5 min. Como observado na figura 10, este grupo de animais não exibiu respostas aversivas condicionadas durante a sessão de EC1 e EC2. Assim, os dados obtidos reforçaram a hipótese de que o tempo de contato com o estímulo a ser condicionado deve ser de 10 minutos e que, o componente aversivo exigido para estabelecer um condicionamento olfatório aversivo biologicamente relevante, capaz de induzir um condicionamento de segunda ordem, está presente imediatamente após a estimulação da MCPdl.

Mesmo sem conseguir determinar qual o momento dentro da sessão de 10 min é o mais revelante para o aprendizado, ou mesmo se há esta separação dentro do evento, este resultado não permite descartar a teoria proposta por Brandão e colaboradores (2008), pois foram avaliados poucos intervalos entre a microinjeção e o início da sessão. Além disso, a estimulação química, ao contrário da estimulação elétrica estudada por Brandão, não permite interromper a ação do agonista microinjetado. Por outro lado, as respostas de fuga (trote, galope e salto) induzidas pela estimulação da MCPdl são absolutamente coordenadas, demonstrando uma boa avaliação sensorial do ambiente (Bittencourt, Carobrez *et al.*, 2004). Mesmo neste trabalho, foi possível observar que alguns animais microinjetados na MCPdl com NMDA tentaram fugir da caixa de condicionamento pulando e batendo com a cabeça para tentar abrir a tampa, que impedia a sua fuga. Desta forma, parece improvável que o processo cognitivo, responsável pela associação do odor neutro com o estado aversivo da MCPdl, ocorra somente após o animal finalizar as reações defensivas.

Posteriormente, seguindo o modo tradicional de validação de modelos animais (Willner, 1991), foi administrado midazolam (agonista do sítio benzodiazepínico do receptor GABA A), uma droga com perfil ansiolítico (Cruz, Frei *et al.*, 1994), 30 minutos antes da sessão de condicionamento ou da sessão EC1.

Os dados apresentados na figura 11 mostraram que a administração da maior dose (1 mg/Kg) de midazolam, antes da sessão de condicionamento, reduziu as respostas aversivas observadas nas sessões EC1 e EC2. Este achado é consistente com o relato prévio que mostrou o prejuízo induzido pelo midazolam na aquisição do aprendizado do condicionamento olfatório de medo associado aos choques nas patas (Kroon e Carobrez, 2009). Assim, o prejuízo no aprendizado observado com a administração de midazolam pode ser resultante dos efeitos mnemônicos atribuídos a esta droga (O'boyle, 1988; Westbrook, Greeley *et al.*, 1991; Pain, Angst *et al.*, 2002), bem

como dos seus efeitos sobre a redução das respostas defensivas produzidas pela estimulação da MCPdl (Schenberg e Graeff, 1978).

O midazolam também foi capaz de inibir as respostas defensivas quando administrado antes da sessão EC1 (ver figura 12). Apesar deste efeito não ter sido observado no condicionamento olfatório induzido por choques (Kroon e Carobrez, 2009), o prejuízo na expressão das respostas defensivas após administração de benzodiazepínicos tem sido relatado em outros condicionamentos (Davis, 1979; Fanselow e Helmstetter, 1988; Fendt e Fanselow, 1999).

Portanto, os efeitos antiaversivos do midazolam observados nas figuras 11 e 12 reforçam a importância do estado aversivo induzido pela MCPdl no estabelecimento de um condicionamento e sugerem que as respostas evocadas pelo estímulos condicionados envolveram comportamentos defensivos associados ao medo e à ansiedade.

Para descartar um possível efeito das doses de 0,5 e 1 mg/Kg de MDZ na detecção do odor, animais foram expostos, após 30 min da administração destas doses de MDZ ou salina, a um modelo de discriminação olfatória. Como observado no anexo C, todos os grupos permaneceram mais tempo no ambiente familiar do que no ambiente não familiar, sugerindo que as doses de MDZ utilizadas neste trabalho não prejudicaram a discriminação olfatória.

Além do estado emocional aversivo evocado pela estimulação da MCPdl, o presente estudo procurou investigar se mudanças nas reações autonômicas, como o aumento da frequência cardíaca, são importantes para o estabelecimento do aprendizado aversivo. Para isso, um antagonista dos adrenoreceptores beta que não atravessa a barreira hematoencefálica, o nadolol na dose de 10 mg/Kg, foi administrado 30 min antes da sessão de condicionamento. Esta dose de nadolol impediu o aumento da frequência cardíaca induzido pela administração de dopamina (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008) e, como observado no anexo D, impediu o aumento da frequência cardíaca induzida pela microinjeção da dose de 100 pmol de NMDA na MCPdl. Como observado na tabela 3, não foram encontradas diferenças estatísticas nas sessões EC1 e EC2 entre os animais que receberam nadolol ou salina, 30 minutos antes da estimulação da MCPdl com NMDA 100 pmol. Portanto, o nadolol não foi capaz de prejudicar o condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl, corroborando outros estudos que mostraram que esta droga não prejudicou o aprendizado associado a diferentes estímulos aversivos (Van Stegeren, Everaerd *et al.*, 1998; Do Monte, Canteras *et al.*, 2008).

É importante ressaltar que estes resultados não permitem descartar o papel do sistema neurovegetativo, mediado por diferentes sistemas de neurotransmissores, ou ainda da consciência destas respostas, no processamento emocional e cognitivo (Damasio, 1996). Entretanto, este resultado fortalece as evidências que indicam uma dissociação entre os diferentes componentes (frequência cardíaca, resposta de fuga, analgesia) da resposta defensiva evocada pela estimulação da MCPd (Morgan, Depaulis *et al.*, 1987; Depaulis, Pechnick *et al.*, 1988; Lovick, 1990).

No que se refere à participação dos receptores 5-HT_{1A} na MCPdl, a atividade destes receptores inibiu ou reduziu as respostas defensivas, como fuga e esquiva, evocadas pela estimulação da MCPdl (Nogueira e Graeff, 1995; Graeff, 2004). Estudos de eletrofisiologia “*in vivo*” confirmaram este achado funcional ao demonstrar que o efeito inibitório produzido pela serotonina nos neurônios da MCP é mediado principalmente pelos receptores 5-HT_{1A} (Behbehani, Liu *et al.*, 1993; Lovick, 1994), a ativação destes receptores causa hiperpolarização nos neurônios na MCPd, via canais de potássio acoplados à proteína G (Jeong, Han *et al.*, 2001).

Resultados obtidos neste estudo mostraram que a microinjeção de DPAT 4 nmol na MCPdl, agonista 5-HT_{1A}, antes da sessão de condicionamento (NMDA 100 pmol na MCPdl + odor), não prejudicou a aquisição do condicionamento olfatório induzido pela estimulação da MCPdl, observado na sessão EC1. Contudo, na sessão EC2, o grupo DPAT 4 nmol-NMDA 100 pmol não apresentou respostas defensivas ao contexto anteriormente pareado com o EC1, não exibindo condicionamento de segunda ordem. Este resultado indica que esta dose de DPAT pode ter prejudicado a força da associação entre o EI-EC. De forma mais consistente, a dose de 8 nmol de DPAT foi capaz de prejudicar a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl, pois os animais administrados 5 min antes da sessão de condicionamento, não apresentaram respostas defensivas nas sessões de testes EC1 e EC2. Estes resultados sugerem que o efeito antiaversivo do DPAT, observado em vários trabalhos (Beckett, Lawrence *et al.*, 1992; Nogueira e Graeff, 1995; Beckett e Marsden, 1997), pode ser devido a uma redução da excitabilidade da MCPdl, o que prejudicaria a associação entre o EI-EC. Nas respostas defensivas aprendidas, a microinjeção de DPAT 8 nmol na MCPd diminuiu o tempo de congelamento no modelo de condicionamento contextual induzido por choques nas patas, quando administrado antes do teste (Broiz, Oliveira *et al.*, 2008) e reduziu a

latência da esquiva inibitória no LTE (De Paula Soares e Zangrossi, 2004), resultados esses relacionados com o efeito antiaversivo do tratamento. Neste sentido, resultados prévios do nosso laboratório mostraram que a microinjeção de DPAT 8 nmol na MCPd reverteu o prejuízo da aquisição do aprendizado, no modelo da esquiva inibitória, induzido pela administração de NMDA 100 pmol nesta estrutura (Moraes, 2008). O autor sugeriu que a estimulação da MCPd com aminoácido excitatório é biologicamente mais relevante do que o choque nas patas e, portanto, após a estimulação com NMDA o rato perde a capacidade de discriminar a tarefa, desta forma, quando o DPAT foi administrado na MCPd antes do treino, ocorreu uma redução na excitabilidade desta estrutura e o animal conseguiu aprender a tarefa.

Baseados no fato de que o agonista $5HT_{1A}$ parece reduzir a excitabilidade da MCPdl, avaliamos a seguir se a administração de DPAT nesta estrutura poderia prevenir o prejuízo no aprendizado encontrado com a dose de 200 pmol de NMDA no condicionamento olfatório aversivo. Como observado na figura 14, a dose de 4nmol de DPAT quando administrada 5 min antes da microinjeção de NMDA 200 pmol é capaz de facilitar a associação entre o odor e a estimulação da MCPdl, induzindo um condicionamento. Portanto, os animais do grupo DPAT 4-NMDA 200 pmol apresentaram aumento das respostas defensivas nas sessões de teste EC1 e EC2 quando comparados com os grupos PBS-PBS e DPAT4-PBS, pois reduziram o tempo de aproximação e aumentaram o tempo escondido durante estas sessões.

Por outro lado, o antagonista dos receptores $5-HT_{1A}$, WAY, parece aumentar o nível de excitabilidade desta estrutura. Esta sugestão baseia-se nos resultados ilustrados na figura 15, os quais revelaram que os animais do grupo WAY 7-NMDA 100 pmol apresentaram respostas defensivas, como redução do tempo de aproximação e aumento do tempo escondido, na etapa de familiarização à caixa de odor, mesmo antes da apresentação do EC, ou seja, a um ambiente novo. Além de continuar exibindo o aumento das respostas defensivas nas sessões de testes EC1 e EC2. Segundo Hughes (2007), a neofobia a um estímulo pode ser gerada pelo grau aumento da novidade deste estímulo ou pelos altos níveis de medo dos indivíduos. Como a maioria dos animais observados neste estudo não apresentou resistência em explorar a caixa de condicionamento no dia da familiarização, ou seja, esta caixa não representar uma ameaça por si só, sugere-se que o tratamento com WAY 7 nmol-NMDA 100 pmol na MCPdl aumentou os níveis de medo destes animais a longo prazo, o que inibiu a atividade exploratória dos mesmo em um ambiente novo, após 24 horas do tratamento.

Tais dados corroboram estudos prévios da literatura que apontam o efeito pró-aversivo da microinjeção de WAY na MCPd (Beckett e Marsden, 1997; Broiz, Oliveira *et al.*, 2008). Este trabalhos mostraram que a microinjeção de WAY na MCPd reduziu o limiar das respostas defensivas de fuga e congelamento, evocadas pela estimulação química ou elétrica da MCPd. Além disso, WAY, quando administrado na MCPd, foi capaz de aumentar o tempo de congelamento frente ao contexto previamente pareado com a estimulação elétrica da MCPd (Broiz, Oliveira *et al.*, 2008).

Além disso, os resultados da figura 16 também indicaram que a microinjeção de WAY na MCPdl aumentou a excitabilidade desta estrutura. Neste gráfico, é possível observar que o tratamento prévio com WAY 7 nmol na MCPdl favoreceu o condicionamento olfatório aversivo promovido pela microinjeção de 50 pmol de NMDA nesta estrutura. Como demonstrado na figura 7, a dose de 50 pmol de NMDA não foi capaz de induzir um condicionamento olfatório aversivo, provavelmente por não atingir uma estimulação da MCPdl ótima para induzir um aprendizado. Entretanto, no dia do condicionamento, quando os receptores 5-HT_{1A} na MCPdl foram bloqueados com WAY 7 nmol, antes da microinjeção de 50 pmol de NMDA, os animais apresentaram um aumento das respostas defensivas nas sessões de testes EC1 e EC2.

Portanto, os resultados deste trabalho sugerem que a capacidade da estimulação da MCPdl em dar suporte a um condicionamento olfatório aversivo está diretamente relacionada a intensidade da estimulação desta estrutura e que, a intensidade deste estímulo, pode ser modulada pelos receptores 5HT_{1A} na MCPdl. Assim, o condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl surge como uma ferramenta útil para estudar a participação da serotonina no estado emocional aversivo envolvido no processamento das informações responsáveis por favorecer as associações entre um estímulo genuinamente não ameaçador com um estímulo aversivo.

As evidências revisadas sobre a modulação da serotonina na MCPdl levaram Graeff (2003) à seguinte conclusão: *“as principais implicações clínicas são as de que um déficit de 5-HT na MCP possa participar da fisiopatogenia do transtorno de pânico e de que a intensificação da ação da 5-HT na mesma região medieie a ação antipânico dos medicamentos antidepressivos”*. Na tentativa de especular as implicações clínicas dos resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que, possivelmente, além do sistema serotoninérgico na MCPdl modular as respostas emocionais observadas no transtorno de pânico, esta estrutura pode participar dos processos associativos a

estímulos ambientais, comumente observado neste transtorno, ou ainda, em outros transtornos de ansiedade que apresentam manifestações resultantes de um condicionamento.

Por fim, este trabalho sugere que o aprendizado aversivo induzido pela estimulação da MCPdl pode ser resultante da sinalização de perigo que esta estrutura faz às vias neurais ascendentes, que através de um processo associativo, estabeleceria o aprendizado aversivo.

A principal projeção ascendente da MCPdl é para o núcleo anterior do hipotálamo (AHN) (Cameron, Khan *et al.*, 1995). O AHN projeta-se para o núcleo septal lateral, a região perifornical da área hipotalâmica lateral, o núcleo pré-mamilar dosal do hipotálamo (PMd), a parte dorsomedial do núcleo hipotalâmico ventromedial (VMHdm), o leito da estria terminal, a área préóptica medial e o núcleo reuniens (Risold, Canteras *et al.*, 1994; Risold, Thompson *et al.*, 1997; Canteras, 2002). O AHN participa do sistema hipotalâmico de defesa integrando as informações contextuais para a elaboração de comportamentos defensivos apropriados através das suas conexões recíprocas com o núcleo septal lateral (Canteras, 2002). Dentro do sistema hipotalâmico de defesa, o AHN envia e recebe densas projeções para o PMd, estrutura hipotalâmica, que como mencionado na introdução, parece funcionar como um amplificador dos sinais neurais hipotalâmicos envolvidos com as respostas de defesa ao predador (Canteras e Swanson, 1992) e, elucidado mais recentemente, com as respostas aprendidas no modelo de condicionamento olfatório de medo (Canteras, N. S., Kroon, J. A. *et al.*, 2008; Pavesi, Canteras *et al.*, 2011).

Tem sido demonstrado que os adrenoceptores do tipo beta 1 no PMd são importantes na etapa de aquisição do condicionamento ao contexto associado à exposição ao odor de gato (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008) e, do condicionamento olfatório de medo produzido através de 5 choques elétricos nas patas (Pavesi, 2010). Além disso, a ativação de adrenoceptores beta no PMd, com isoproterenol, pode funcionar como um EI aversivo, dando suporte ao condicionamento olfatório de medo (Pavesi, Canteras *et al.*, 2011). Em conjunto, estes resultados indicam que o sistema noradrenérgico no PMd está envolvido no processo de aprendizado associativo para pistas olfatórias. Além disso, a estimulação elétrica ou química da MCPd foi associada a um aumento de expressão de Fos no PMd (Vianna, Borelli *et al.*, 2003).

Desta forma, o presente trabalho procurou investigar a participação do PMd na etapa de aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação química da MCPdl. A microinjeção de atenolol no PMd para avaliar a participação desta

estrutura no condicionamento foi uma estratégia baseada nos trabalhos que mostraram o prejuízo do aprendizado associativo após a microinjeção desta droga no PMd (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008; Pavesi, 2010). Assim, o bloqueio de adrenocetores do tipo beta 1 com atenolol no PMd, antes da estimulação de receptores NMDA na MCPdl, impediu a aquisição do condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl. Conseqüentemente, os animais não expressaram as respostas defensivas ao odor, nem ao contexto associado como o odor, nas sessões de testes EC1 e EC2, respectivamente. Os animais estimulados na MCPdl com NMDA e pré tratados com ATE 40 nmol no PMd, não exibiram respostas defensivas quando expostos ao odor, apresentando aumento no tempo de aproximação e redução no tempo escondido nas sessões de testes EC1 e EC2, quando comparado com o grupo que recebeu PBS no PMd antes do condicionamento. Além disso, o processo cirúrgico envolvendo dupla canulação não interferiu na aquisição do condicionamento, uma vez que ratos microinjetados com PBS no PMd e NMDA na MCPdl apresentaram um aumento das respostas defensivas ao odor e ao contexto associado ao mesmo, nas sessões de testes EC1 e EC2, quando comparado com o seu desempenho na etapa de familiarização

Carvalho-Neto e colaboradores (2010) sugerem que o aprendizado relacionado com a participação do sistema hipotalâmico de defesa é mediado pelas suas projeções talâmicas. Os principais núcleos talâmicos que mediarão as informações do sistema hipotalâmico defensivo seriam o núcleo reuniens (RE) e a região ventral do núcleo anteromedial (AMv), que recebem projeções diretas do ANH e do PMd (Canteras e Swanson, 1992; Risold, Canteras *et al.*, 1994; Risold, Thompson *et al.*, 1997).

O RE é o núcleo talâmico que mais se projeta para algumas áreas da formação hipocampal (região CA1 do hipocampo, subiculum, présubiculum e córtex entorinal), além de projetar-se também para outras áreas corticais (pré-frontal, cíngulo anterior e peririnal) (Herkenham, 1978; Vertes, Hoover *et al.*, 2006). Esta estrutura recebe projeções de diversas regiões corticais e subcorticais e tem como principal função transmitir as informações (emocionais e cognitivas) para a formação hipocampal (Mckenna e Vertes, 2004), estrutura chave nos processos de aprendizagem e memória (Izquierdo e Medina, 1997; Eichenbaum, 2004) e emocionalidade (Gray, 1982; Bannerman, Grubb *et al.*, 2003; Pentkowski, Blanchard *et al.*, 2006). Além disso, o RE faz parte do chamado *looping hipocampal*, levando as informações do

córtex pré-frontal para as regiões CA1 e subiculum do hipocampo (Vertes, 2002).

O AMv projeta-se para quase toda a extensão rostrocaudal do córtex límbico, que inclui principalmente o córtex orbitofrontal, pré-límbico, infralímbico, cingulado anterior, retrosplenial agranular, entorinal e peririnal, além de projetar-se para o subiculum e présubiculum, áreas que fazem parte da formação hipocampal, e para os núcleos da amígdala lateral e basolateral (Shibata, 1993; Van Groen, Kadish *et al.*, 1999). Estas projeções refletem o papel do tálamo anteromedial na formação da memória (Aggleton, Poirier *et al.*, 2009; Garden, Massey *et al.*, 2009), como um centro de medição das informações subcorticais para uma vasta área de córtex límbico (Van Groen, Kadish *et al.*, 1999), bem como para áreas responsáveis pela integração do processo associativo, como os núcleos da amígdala (Ledoux, 2000; Maren, 2001).

Desta forma, ao estudar a participação destes dois núcleos talâmicos (RE e AMv) no condicionamento olfatório aversivo proposto neste trabalho, pode-se sugerir uma circuitaria encefálica envolvida no processamento e armazenamento do aprendizado associativo induzido pelo estado aversivo evocado pela estimulação da MCPdl. Assim, como observado na figura 18, a lesão eletrolítica bilateral destes dois núcleos talâmicos (RE + AMv) prejudicou a aquisição do condicionamento aversivo induzido pela estimulação química da MCPdl. Ratos com lesão eletrolítica estendida aos núcleos talâmicos RE + AMv, feita com NMDA (0,25 M) 17 dias antes da sessão de condicionamento, apresentaram um aumento no tempo de aproximação e uma redução do tempo escondido e na avaliação de risco na presença da pista olfatória (sessão EC1) e, subsequentemente, ao ambiente onde esta pista foi apresentada (sessão EC2), mostrando que este tipo de condicionamento envolve a atividade de estruturas mais rostrais responsáveis pelo processamento cognitivo.

Lesões individuais destes dois núcleos talâmicos, antes da apresentação ao predador, sugeriram que o AMv parece ser a estrutura talâmica crítica no processamento da memória contextual, e que, embora as lesões restritas ao RE não foram suficientes para alterar as respostas de medo ao contexto, este núcleo talâmico certamente deve contribuir para o processamento do condicionamento contextual, uma vez que lesões ampliadas a estes dois núcleos RE+AMv bloquearam de forma mais eficiente as respostas de medo ao contexto (Carvalho-Netto, Martinez *et al.*, 2010). Além disso, lesões que englobam além do AMv, os núcleos anteroventral e anterodorsal do tálamo, acarretaram no prejuízo completo das respostas aprendidas no labirinto aquático de Morris (Van Groen, Kadish *et al.*, 2002).

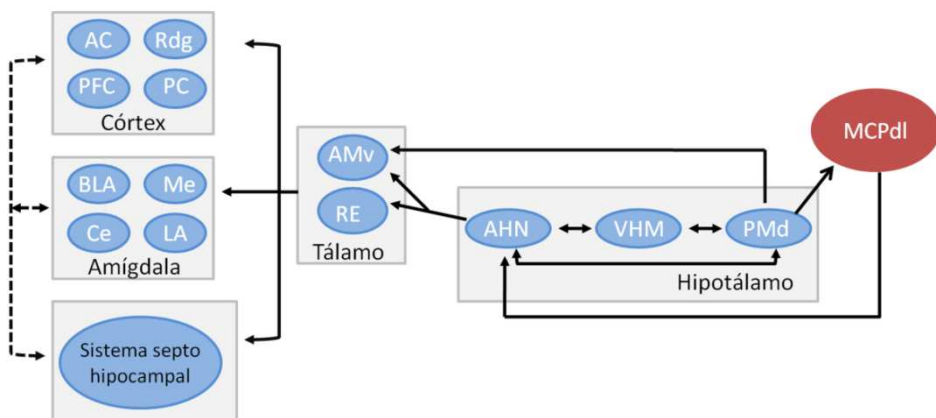


Figura 19. Circuito cerebral envolvido no condicionamento olfatório de medo induzido pela estimulação da MCPdl. Abreviaturas: AC- córtex cingulado anterior, Rdg- córtex retrosplenial, PFC- córtex préfrontal, PC- córtex perinal, BLA: amígdala basolateral, Me- amígdala medial, Ce- amígdala central, LA- amígdala lateral, AMv- parte ventral do núcleo talâmico anterior, RE- núcleo reuniens, AHN- núcleo anterior do hipotálamo, VMH- núcleo hipotalâmico ventromedial, PMd- núcleo pré-mamilar dosal do hipotálamo, MCPdl- substância cinzenta periaqueductal dorsolateral.

Considerando os dados da literatura e os resultados encontrados neste trabalho, o condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl parece ativar uma circuitaria encefálica que envolve o sistema hipotalâmico de defesa, bem como os núcleos talâmicos responsáveis pelo processamento emocional e cognitivo deste

sistema. Assim, como proposto pela figura 19, através da sua conexões ascendente para o AHN, as informações resultantes da estimulação da MCPdl chegam ao PMd e, via os núcleos talâmicos RE+AMv, atingem as regiões corticais, sistema hipocampal e amígdala, envolvidos com os processos de aprendizagem, memória e emocionalidade nos modelos de condicionamento aversivo (Ledoux, 2000; Maren, 2001; Cain e Ledoux, 2008; Canteras e Blanchard, 2008). Ainda, as densas projeções que o PMd envia para a MCPdl podem contribuir para a reverberação das informações aversivas, reafirmando o papel de amplificador dos processos neurais, exercido pelo PMd. A integridade desses dois núcleos parece importante no processamento cognitivo requerido nos condicionamentos aversivos que utilizam pistas olfatórias (Pavesi, Canteras *et al.*, 2011).

Portanto, a similaridade entre a circuitaria acima proposta com a circuitaria envolvida na ameaça predatória (Canteras, 2008), bem como, a similaridade dos comportamentos avaliados neste trabalho com as respostas dos roedores frente à pista do predador (Dielenberg e McGregor, 2001; Canteras, N. S., Kroon, J. A. *et al.*, 2008), reforçam a relevância do EI utilizado neste condicionamento e sugerem que o modelo de condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação da MCPdl pode ser uma boa alternativa para o estudo das respostas emocionais aprendidas. Além disso, o envolvimento da serotonina no processo cognitivo mediado pela MCPdl reforça a possível contribuição que este modelo pode oferecer para a compreensão da neurobiologia dos transtornos de ansiedade, uma vez que inúmeros trabalhos sugerem que a serotonina na MCPdl participa da fisiopatogenia destes transtornos.

Deste modo, este trabalho fornece uma perspectiva da participação da MCPdl na circuitaria envolvida no condicionamento aversivo, sugerindo que esta estrutura de fato é mais que uma via comum e final das reações defensivas e que pode interagir com outras áreas associativas, modificando o processamento das informações. Desta maneira, a MCPdl parece desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento ou agravamento dos transtornos de ansiedade, uma vez que sua atividade pode modificar o processamento das informações e desencadear o aparecimento de respostas defensivas a estímulos genuinamente não ameaçadores.

7. CONCLUSÕES

Em resumo, os resultados obtidos levam a concluir que:

- O estado aversivo induzido pela estimulação química da MCPdl pode ser utilizado como um estímulo incondicionado biologicamente relevante, capaz de induzir um condicionamento.
- As respostas defensivas aprendidas durante este condicionamento, e observadas frente ao EC, parecem estar relacionadas com emoções associadas ao medo e à ansiedade.
- O condicionamento olfatório aversivo promovido pela microinjeção de NMDA na MCPdl é independente da atividade dos adrenoceptores beta sistêmicos.
- O estado emocional induzido pela estimulação da MCPdl pode ser modulado pelos receptores 5-HT_{1A} da serotonina, comumente relacionados aos transtornos de ansiedade.
- Além disso, foi sugerida uma via ascendente pela qual a MCPdl pode estar interagindo com estruturas mais rostrais no cérebro durante o aprendizado. Assim, através das suas conexões ascendentes para o AHN, as informações resultantes da estimulação da MCPdl mobilizam o PMd e os núcleos talâmicos RE+AMv para mediar o aprendizado olfatório aversivo.

Em conjunto, os dados deste trabalho sugerem que a MCPdl pode interagir com outras áreas associativas, modificando o processamento das informações, para promover o condicionamento olfatório aversivo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahams, V. C. e S. M. Hilton. The Role of Active Muscle Vasodilatation in the Alerting Stage of the Defence Reaction. J Physiol, v.171, Jun, p.189-202. 1964.
- Abrahams, V. C., S. M. Hilton, *et al.* Active muscle vasodilatation produced by stimulation of the brain stem: its significance in the defence reaction. J Physiol, v.154, Dec, p.491-513. 1960.
- Adams, D. B. Brain mechanisms for offense, defense, and submission. Behavioral Brain Science, v.2, p.201-241. 1979.
- Aggleton, J. P., G. L. Poirier, *et al.* Lesions of the fornix and anterior thalamic nuclei dissociate different aspects of hippocampal-dependent spatial learning: implications for the neural basis of scene learning. Behav Neurosci, v.123, n.3, Jun, p.504-19. 2009.
- Aguiar, D. C. e F. S. Guimarães. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. Journal of Neuroscience Research, v.87, n.11, p.2418-2429. 2009.
- Aguiar, D. C., F. A. Moreira, *et al.* Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-d-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.83, n.2, p.296-301. 2006.
- Aguiar, M. S. e M. L. Brandao. Conditioned place aversion produced by microinjections of substance P into the periaqueductal gray of rats. Behav Pharmacol, v.5, n.3, Jun, p.369-373. 1994.
- Albin, R. L., R. L. Makowiec, *et al.* Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. Neurosci Lett, v.118, n.1, Oct 2, p.112-5. 1990.
- Annau, Z. e L. J. Kamin. The conditioned emotional response as a function of intensity of the US. J Comp Physiol Psychol, v.54, Aug, p.428-32. 1961.
- Association, A. P. Diagnostic and statistical manual of mental disorders- DMS-IV. Washington, DC: APA Press. 4th 1994.
- Babai, P., K. V. Anokhin, *et al.* Characteristics of c-fos gene expression in the brains of rats with different investigative and defensive behaviors. Neurosci Behav Physiol, v.31, n.6, Nov-Dec, p.583-8. 2001.

Baldi, E. e C. Bucherelli. The inverted "u-shaped" dose-effect relationships in learning and memory: modulation of arousal and consolidation. Nonlinearity Biol Toxicol Med, v.3, n.1, Jan, p.9-21. 2005.

Baldi, E., C. A. Lorenzini, *et al.* Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. Neurobiology of Learning and Memory, v.81, n.3, p.162-166. 2004.

Bandler, R. Brain mechanisms of aggression as revealed by electrical and chemical stimulation: suggestion of a central role for the midbrain periaqueductal grey region. . New York: Academic. 1987 (In Progress in Psychobiology and Physiological Psychology)

Bandler, R., P. Carrive, *et al.* Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatotopic and functional organization. Prog Brain Res, v.87, p.269-305. 1991.

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

Bannerman, D. M., M. Grubb, *et al.* Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. Behav Brain Res, v.139, n.1-2, Feb 17, p.197-213. 2003.

Beckett, S. e C. A. Marsden. The effect of central and systemic injection of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OHDPAT and the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 on periaqueductal grey-induced defence behaviour. J Psychopharmacol, v.11, n.1, p.35-40. 1997.

Beckett, S. R., A. J. Lawrence, *et al.* Attenuation of chemically induced defence response by 5-HT₁ receptor agonists administered into the periaqueductal gray. Psychopharmacology (Berl), v.108, n.1-2, p.110-4. 1992.

Behbehani, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. Prog Neurobiol, v.46, n.6, Aug, p.575-605. 1995.

Behbehani, M. M., H. Liu, *et al.* Activation of serotonin_{1A} receptors inhibits midbrain periaqueductal gray neurons of the rat. Brain Research, v.612, n.1-2, p.56-60. 1993.

Beitz, A. J. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. Neuroscience, v.7, n.1, Jan, p.133-59. 1982.

_____. The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. J Comp Neurol, v.237, n.4, Jul 22, p.445-59. 1985.

Bertoglio, L. J. e H. Zangrossi, Jr. Involvement of dorsolateral periaqueductal gray N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors in the regulation of risk assessment and inhibitory avoidance behaviors in the rat elevated T-maze. Behav Pharmacol, v.17, n.7, Nov, p.589-96. 2006.

Bittencourt, A. S., A. P. Carobrez, *et al.* Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-METHYL--aspartic acid glutamate receptors. Neuroscience, v.125, n.1, p.71-89. 2004.

Blanchard, D. C. e R. J. Blanchard. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. Annu Rev Psychol, v.39, p.43-68. 1988.

Blanchard, D. C., N. S. Canteras, *et al.* Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. Neurosci Biobehav Rev, v.29, n.8, p.1243-53. 2005.

Blanchard, D. C., C. Markham, *et al.* Failure to produce conditioning with low-dose trimethylthiazoline or cat feces as unconditioned stimuli. Behav Neurosci, v.117, n.2, Apr, p.360-8. 2003.

Blanchard, R. J., C. D. Blanchard, *et al.* Handbook of Anxiety and Fear. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, v.17. 2008

Blanchard, R. J. e D. C. Blanchard. Crouching as an index of fear. J Comp Physiol Psychol, v.67, n.3, Mar, p.370-5. 1969.

_____. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. J Comp Psychol, v.103, n.1, Mar, p.70-82. 1989.

Blanchard, R. J., D. C. Blanchard, *et al.* The effects of ethanol and diazepam on reactions to predatory odors. Pharmacol Biochem Behav, v.35, n.4, Apr, p.775-80. 1990.

Blanchard, R. J., Blanchard, D.C., Griebel, G., Nutt, D. Introduction to the handbook on fear and anxiety. In: J. P. Huston (Ed.). Handbook of Anxiety and Fear. Dusseldorf: Academic Press, v.17, 2008. Introduction to the handbook on fear and anxiety, p.3-7

Blanchard, R. J., G. Griebel, *et al.* Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. Neurosci Biobehav Rev, v.21, n.6, Nov, p.783-9. 1997.

Blanchard, R. J., M. Yang, *et al.* Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. Neurosci Biobehav Rev, v.25, n.7-8, Dec, p.587-95. 2001.

Brandao, M. L., V. Z. Anseloni, *et al.* Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. Neurosci Biobehav Rev, v.23, n.6, p.863-75. 1999.

Brandao, M. L., N. C. Coimbra, *et al.* Effects of morphine and midazolam on reactivity to peripheral noxious and central aversive stimuli. Neurosci Biobehav Rev, v.14, n.4, Winter, p.495-9. 1990.

Brandao, M. L., J. C. De Aguiar, *et al.* GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. Pharmacol Biochem Behav, v.16, n.3, Mar, p.397-402. 1982.

Brandao, M. L., J. M. Zanoveli, *et al.* Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. Behav Brain Res, v.188, n.1, Mar 17, p.1-13. 2008.

Brennan, P. A. e E. B. Keverne. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. Prog Neurobiol, v.51, n.4, Mar, p.457-81. 1997.

Broiz, A. C., L. C. Oliveira, *et al.* Regulation of conditioned and unconditioned fear in rats by 5-HT1A receptors in the dorsal periaqueductal gray. Pharmacol Biochem Behav, v.89, n.1, Mar, p.76-84. 2008.

Cain, C. K. e J. E. Ledoux. Brain mechanisms of Pavlovian and instrumental aversive conditioning. In: J. P. Huston (Ed.). Handbook of Anxiety and Fear. Dusseldorf: Academic Press, v.17, 2008. Brain mechanisms of Pavlovian and instrumental aversive conditioning, p.103-124

Cameron, A. A., I. A. Khan, *et al.* The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. I. Ascending projections. J Comp Neurol, v.351, n.4, Jan 23, p.568-84. 1995.

Canteras, Kroon, *et al.* Sensing danger through the olfactory system: The role of the hypothalamic dorsal preammillary nucleus. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.32, n.7, p.1228-1235. 2008.

Canteras, N. S. The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.71, n.3, p.481-491. 2002.

_____. [Critical analysis of the neural systems organizing innate fear responses]. Rev Bras Psiquiatr, v.25 Suppl 2, Dec, p.21-4. 2003.

_____. Neural systems activated in response to predators and partial predator stimuli. In: J. P. Huston (Ed.). Handbook of Anxiety and Fear. Dusseldorf: Academic Press, v.17, 2008. Neural systems activated in response to predators and partial predator stimuli, p.125-140

Canteras, N. S. e D. C. Blanchard. A behavioral and neural systems comparison of unconditioned and conditioned defensive behavior. In: J. P. Huston (Ed.). Handbook of Anxiety and Fear. Dusseldorf: Academic Press, v.17, 2008. A behavioral and neural systems comparison of unconditioned and conditioned defensive behavior, p.141-153

Canteras, N. S., S. Chiavegatto, *et al.* Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. Brain Res Bull, v.44, n.3, p.297-305. 1997.

Canteras, N. S. e M. Goto. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. Neuroreport, v.10, n.2, Feb 5, p.413-8. 1999.

Canteras, N. S., J. A. Kroon, *et al.* Sensing danger through the olfactory system: the role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. Neurosci Biobehav Rev, v.32, n.7, Sep, p.1228-35. 2008.

Canteras, N. S., R. B. Simerly, *et al.* Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. J Comp Neurol, v.348, n.1, Oct 1, p.41-79. 1994.

Canteras, N. S. e L. W. Swanson. The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.21, Nov 1, p.10089-93. 1992.

Carobrez, A. P., K. V. Teixeira, *et al.* Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. Neurosci Biobehav Rev, v.25, n.7-8, Dec, p.697-709. 2001.

Carr, W. J., L. Yee, *et al.* Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. J Comp Physiol Psychol, v.90, n.9, Sep, p.821-8. 1976.

Carrive, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. Behav Brain Res, v.58, n.1-2, Dec 20, p.27-47. 1993.

Carrive, P. e R. Bandler. Viscerotopic organization of neurons subserving hypotensive reactions within the midbrain periaqueductal grey: a correlative functional and anatomical study. Brain Res, v.541, n.2, Feb 15, p.206-15. 1991.

Carrive, P., R. A. L. Dampney, *et al.* Excitation of neurones in a restricted portion of the midbrain periaqueductal grey elicits both behavioural and cardiovascular components of the defence reaction in the unanaesthetised decerebrate cat. Neuroscience Letters, v.81, n.3, p.273-278. 1987.

Carvalho-Netto, E. F., R. C. Martinez, *et al.* Evidence for the thalamic targets of the medial hypothalamic defensive system mediating emotional memory to predatory threats. Neurobiol Learn Mem, v.93, n.4, May, p.479-86. 2010.

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

Cavalli, J., L. J. Bertoglio, *et al.* Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. Neurobiol Learn Mem, v.92, n.4, Nov, p.512-8. 2009.

Cezario, A. F., E. R. Ribeiro-Barbosa, *et al.* Hypothalamic sites responding to predator threats--the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. Eur J Neurosci, v.28, n.5, Sep, p.1003-15. 2008.

Coimbra, N. C. e M. L. Brandao. Effects of 5-HT₂ receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. Behav Brain Res, v.87, n.1, Aug, p.97-103. 1997.

Coimbra, N. C., C. Tomaz, *et al.* Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum. Behav Brain Res, v.50, n.1-2, Sep 28, p.77-83. 1992.

Collingridge, G. L. e R. A. Lester. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. Pharmacol Rev, v.41, n.2, Jun, p.143-210. 1989.

- Cruz, A. P. M., F. Frei, *et al.* Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.49, n.1, p.171-176. 1994.
- Damasio, A. R. The somatic marker hypothesis and the possible functions of the prefrontal cortex. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, v.351, n.1346, Oct 29, p.1413-20. 1996.
- Davis, M. Diazepam and flurazepam: effects on conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. Psychopharmacology (Berl), v.62, n.1, Mar 29, p.1-7. 1979.
- Day, H. E., C. V. Masini, *et al.* The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. Brain Res, v.1025, n.1-2, Oct 29, p.139-51. 2004.
- De Oca, B. M., J. P. Decola, *et al.* Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. J Neurosci, v.18, n.9, May 1, p.3426-32. 1998.
- De Paula Soares, V. e H. Zangrossi, Jr. Involvement of 5-HT1A and 5-HT2 receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. Brain Res Bull, v.64, n.2, Aug 30, p.181-8. 2004.
- Deakin, J. F. W. e F. G. Graeff. 5-HT and mechanisms of defence. J Psychopharmacol v.5, p.305-315. 1991.
- Del-Ben, C. M. e F. G. Graeff. Panic disorder: is the PAG involved? Neural Plast, v.2009, p.108135. 2009.
- Delgado, J. M., W. W. Roberts, *et al.* Learning motivated by electrical stimulation of the brain. Am J Physiol, v.179, n.3, Dec, p.587-93. 1954.
- Depaulis, A., R. N. Pechnick, *et al.* Relationship between analgesia and cardiovascular changes induced by electrical stimulation of the mesencephalic periaqueductal gray matter in the rat. Brain Research, v.451, n.1-2, p.326-332. 1988.
- Di Scala, G., M. J. Mana, *et al.* Evidence of Pavlovian conditioned fear following electrical stimulation of the periaqueductal grey in the rat. Physiol Behav, v.40, n.1, p.55-63. 1987.

Dielenberg, R. A., G. E. Hunt, *et al.* "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. Neuroscience, 104: 1085-97 p. 2001.

Dielenberg, R. A. e I. S. McGregor. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. Neurosci Biobehav Rev, v.25, n.7-8, Dec, p.597-609. 2001.

Do Monte, F. H., N. S. Canteras, *et al.* New perspectives on beta-adrenergic mediation of innate and learned fear responses to predator odor. J Neurosci, v.28, n.49, Dec 3, p.13296-302. 2008.

Edwards, S. B. e J. P. Flynn. Corticospinal control of striking in centrally elicited attack behavior. Brain Res, v.41, n.1, Jun 8, p.51-65. 1972.

Eichenbaum, H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. Neuron, v.44, n.1, Sep 30, p.109-20. 2004.

Fanselow, M. S. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. Pavlov J Biol Sci, v.15, n.4, Oct-Dec, p.177-82. 1980.

_____. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. Psychonomic Bulletin & Review, v.1, n.4, p.429-438. 1994.

Fanselow, M. S. e F. J. Helmstetter. Conditional analgesia, defensive freezing, and benzodiazepines. Behav Neurosci, v.102, n.2, Apr, p.233-43. 1988.

Fanselow, M. S. e R. Ponnusamy. The use of conditioning tasks to model fear and anxiety. In: J. P. Huston (Ed.). Handbook of Anxiety and Fear. Dusseldorf: Academic Press, v.17, 2008. The use of conditioning tasks to model fear and anxiety, p.29-48

Fanselow, M. S. E. P., R. The use of conditioning tasks to model fear and anxiety. In: J. P. Huston (Ed.). Handbook of Anxiety and Fear. Dusseldorf:: Academic Press, v.17, 2008. The use of conditioning tasks to model fear and anxiety, p.29-48

Fardin, V., J. L. Oliveras, *et al.* A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. I. The production of behavioral side effects together with analgesia. Brain Res, v.306, n.1-2, Jul 23, p.105-23. 1984.

Fendt, M. Expression and conditioned inhibition of fear-potentiated startle after stimulation and blockade of AMPA/Kainate and GABAA receptors in the dorsal periaqueductal gray. Brain Research, v.880, n.1-2, p.1-10. 2000.

Fendt, M. e M. S. Fanselow. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. Neurosci Biobehav Rev, v.23, n.5, May, p.743-60. 1999.

Fernandez De Molina, A. e R. W. Hunsperger. Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis, and adjacent structures. J Physiol, v.145, n.2, Mar 3, p.251-65. 1959.

_____. Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat. J Physiol, v.160, Feb, p.200-13. 1962.

Ferreira-Netto, C., K. Genaro Borelli, *et al.* Neural segregation of Fos-protein distribution in the brain following freezing and escape behaviors induced by injections of either glutamate or NMDA into the dorsal periaqueductal gray of rats. Brain Research, v.1031, n.2, p.151-163. 2005.

Floyd, N. S., J. L. Price, *et al.* Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. J Comp Neurol, v.422, n.4, Jul 10, p.556-78. 2000.

Garden, D. L., P. V. Massey, *et al.* Anterior thalamic lesions stop synaptic plasticity in retrosplenial cortex slices: expanding the pathology of diencephalic amnesia. Brain, v.132, n.Pt 7, Jul, p.1847-57. 2009.

Gewirtz, J. C. e M. Davis. Using pavlovian higher-order conditioning paradigms to investigate the neural substrates of emotional learning and memory. Learn Mem, v.7, n.5, Sep-Oct, p.257-66. 2000.

Gladding, C. M., S. M. Fitzjohn, *et al.* Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Long-Term Depression: Molecular Mechanisms. Pharmacological Reviews, v.61, n.4, December 1, 2009, p.395-412. 2009.

Gould, T. D. e Gottesman, Ii. Psychiatric endophenotypes and the development of valid animal models. Genes Brain Behav, v.5, n.2, Mar, p.113-9. 2006.

Graeff, F. G. Minor tranquilizers and brain defense systems. Braz J Med Biol Res, v.14, n.4-5, Oct, p.239-65. 1981.

_____. Brain defense systems and anxiety. In: B. G. Roth M, Noyes R (Ed.). Handbook of anxiety. Amsterdam: Elsevier, v.3, 1990. Brain defense systems and anxiety., p.307-354

_____. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. Braz J Med Biol Res, v.27, n.4, Apr, p.811-29. 1994.

_____. On serotonin and experimental anxiety. Psychopharmacology (Berl), v.163, n.3-4, Oct, p.467-76. 2002.

_____. [Serotonin, periaqueductal gray matter and panic disorder]. Rev Bras Psiquiatr, v.25 Suppl 2, Dec, p.42-5. 2003.

_____. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. Neurosci Biobehav Rev, v.28, n.3, May, p.239-59. 2004.

Graeff, F. G., Carobrez, A.P., Silveira, M.C.L. . Excitatory amino acids and the brain aversive system. In: E. A. Cavalheiro, Lehmann, J., Turski, L. (Ed.). Neurology and neurobiology. New York:Liss: Frontiers in excitatory amino acids research. , v.46, 1988. Excitatory amino acids and the brain aversive system.

Graeff, F. G. e J. N. Rawlins. Dorsal periaqueductal gray punishment, septal lesions and the mode of action of minor tranquilizers. Pharmacol Biochem Behav, v.12, n.1, Jan, p.41-5. 1980.

Graeff, F. G., M. B. Viana, *et al.* The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. Braz J Med Biol Res, v.26, n.1, p.67-70. 1993.

Gray, J. A. The Neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. Oxford: Oxford University Press. 1982

Gray, J. A., Mcnaughton, N. The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System, Second Edition. Oxford: OXford University Press. 2000

Green, A. R. Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine. Br J Pharmacol, v.147 Suppl 1, Jan, p.S145-52. 2006.

Guide to Receptors and Channels (GRAC), 4th Edition. Br J Pharmacol, v.158 Suppl 1, Nov, p.S1-254. 2009.

Guimaraes, F. S., A. P. Carobrez, *et al.* Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. Psychopharmacology (Berl), v.103, n.1, p.91-4. 1991.

- Guimarães, F. S., Carobrez, A.P., Graeff, F.G. Modulation of anxiety behaviors by 5-HT-interacting drugs. In: J. P. Huston (Ed.). Handbook of Anxiety and Fear. Dusseldorf: Academic Press, v.17, 2008. Modulation of anxiety behaviors by 5-HT-interacting drugs, p.241-268
- Guitton, M. J. e Y. Dudai. Anxiety-like state associates with taste to produce conditioned taste aversion. Biol Psychiatry, v.56, n.11, Dec 1, p.901-4. 2004.
- Harding, A., Paxinos, G., Halliday, G. . The serotonin and tachykinin systems. In: E. A. Paxinos (Ed.). The Rat Nervous System. New York: Paxinos, G., 2004. The serotonin and tachykinin systems, p.1205–1256
- Herkenham, M. The connections of the nucleus reuniens thalami: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. J Comp Neurol, v.177, n.4, Feb 15, p.589-610. 1978.
- Herz, R. S. Are odors the best cues to memory? A cross-modal comparison of associative memory stimuli. Ann N Y Acad Sci, v.855, Nov 30, p.670-4. 1998.
- Herz, R. S., J. Eliassen, *et al.* Neuroimaging evidence for the emotional potency of odor-evoked memory. Neuropsychologia, v.42, n.3, p.371-8. 2004.
- Hetem, L. A. B. E. G., F.G. Ansiedade e Transtornos de Ansiedade. Rio de Janeiro: Editora Científica Nacional. 1997
- Hoyer, D., J. P. Hannon, *et al.* Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.71, n.4, p.533-554. 2002.
- Hughes, R. N. Neotic preferences in laboratory rodents: issues, assessment and substrates. Neurosci Biobehav Rev, v.31, n.3, p.441-64. 2007.
- Hunsperger, R. W. [Affective reaction from electric stimulation of brain stem in cats]. Helv Physiol Pharmacol Acta, v.14, n.1, p.70-92. 1956.
- Izard, C. E. Emotion theory and research: highlights, unanswered questions, and emerging issues. Annu Rev Psychol, v.60, p.1-25. 2009.
- Izquierdo, I. e J. H. Medina. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. Neurobiol Learn Mem, v.68, n.3, Nov, p.285-316. 1997.
- Jenck, F., C. L. Broekkamp, *et al.* The effect of antidepressants on aversive periaqueductal gray stimulation in rats. Eur J Pharmacol, v.177, n.3, Feb 27, p.201-4. 1990.

Jenck, F., J. L. Moreau, *et al.* Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. Psychiatry Res, v.57, n.2, Jul 28, p.181-91. 1995.

Jeong, H. J., S. H. Han, *et al.* 5-HT_{1A} receptor-mediated activation of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ current in rat periaqueductal gray neurons. Neuropharmacology, v.41, n.2, Aug, p.175-85. 2001.

Johansen, J. P., J. W. Tarpley, *et al.* Neural substrates for expectation-modulated fear learning in the amygdala and periaqueductal gray. Nat Neurosci, v.13, n.8, Aug, p.979-86. 2010.

Kilpatrick, L. e L. Cahill. Modulation of memory consolidation for olfactory learning by reversible inactivation of the basolateral amygdala. Behav Neurosci, v.117, n.1, Feb, p.184-8. 2003.

Kim, J. J. e M. W. Jung. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.30, n.2, p.188-202. 2006.

Kincheski, G. C. e A. P. Carobrez. The dorsal periaqueductal gray modulates the increased fear-like behavior exhibited by experienced rats in the elevated plus-maze. Behav Brain Res, v.206, n.1, Jan 5, p.120-6. 2010.

Klassen, J. J., D. A. Williams, *et al.* Influence of dorsolateral periaqueductal grey (dlPAG) lesions on contextual conditioning with massed and distributed shock. Q J Exp Psychol B, v.55, n.1, Jan, p.27-42. 2002.

Kroon, J. A. e A. P. Carobrez. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, propranolol or scopolamine. Neurobiol Learn Mem, v.91, n.1, Jan, p.32-40. 2009.

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

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

Lei, Y., I. Yaroslavsky, *et al.* Strain differences in the distribution of N-methyl-d-aspartate and gamma ([gamma])-aminobutyric acid-A receptors in rat brain. Life Sciences, v.85, n.23-26, p.794-799. 2009.

Lovick, T. A. Selective modulation of the cardiovascular response but not the antinociception evoked from the dorsal PAG, by 5-HT in the ventrolateral medulla. Pflugers Arch, v.416, n.1-2, Apr, p.222-4. 1990.

_____. Influence of the dorsal and median raphe nuclei on neurons in the periaqueductal gray matter: role of 5-hydroxytryptamine. Neuroscience, v.59, n.4, Apr, p.993-1000. 1994.

Maren, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. Annu Rev Neurosci, v.24, p.897-931. 2001.

Markham, C. M., D. C. Blanchard, *et al.* Modulation of predatory odor processing following lesions to the dorsal premammillary nucleus. Neurosci Lett, v.372, n.1-2, Nov 30, p.22-6. 2004.

Martin, J. R. Motivated behaviors elicited from hypothalamus, midbrain, and pons of the guinea pig (*Cavia porcellus*). J Comp Physiol Psychol, v.90, n.11, Nov, p.1011-34. 1976.

Martinez, R. C., A. R. De Oliveira, *et al.* Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. Neurobiol Learn Mem, v.85, n.1, Jan, p.58-65. 2006.

Matheus, M. G. e F. S. Guimaraes. Antagonism of non-NMDA receptors in the dorsal periaqueductal grey induces anxiolytic effect in the elevated plus maze. Psychopharmacology (Berl), v.132, n.1, Jul, p.14-8. 1997.

Matheus, M. G., R. L. Nogueira, *et al.* Anxiolytic effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal grey. Psychopharmacology (Berl), v.113, n.3-4, Jan, p.565-9. 1994.

Mcgregor, I. S., L. Schrama, *et al.* Not all 'predator odours' are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats. Behav Brain Res, v.129, n.1-2, Feb 1, p.1-16. 2002.

Mckenna, J. T. e R. P. Vertes. Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. J Comp Neurol, v.480, n.2, Dec 6, p.115-42. 2004.

Mcnaughton, N. e P. J. Corr. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. Neurosci Biobehav Rev, v.28, n.3, May, p.285-305. 2004.

Misanin, J. R., M. G. Goodhart, *et al.* The interaction of age and unconditioned stimulus intensity on long-trace conditioned flavor aversion in rats. Dev Psychobiol, v.40, n.2, Mar, p.131-7. 2002.

Molchanov, M. L. e F. S. Guimaraes. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. Psychopharmacology (Berl), v.160, n.1, Feb, p.30-8. 2002.

Mongeluzi, D. L., R. A. Rosellini, *et al.* Pavlovian aversive context conditioning using carbon dioxide as the unconditional stimulus. J Exp Psychol Anim Behav Process, v.22, n.3, Jul, p.244-57. 1996.

Moraes, C. L. Modulação das funções do sistema glutamatérgico pelo receptor serotoninérgico 5-HT1A da substância cinzenta periaquedutal dorsal no comportamento defensivo de ratos. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC 108 p. 2008.

Moraes, C. L., L. J. Bertoglio, *et al.* Interplay between glutamate and serotonin within the dorsal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior of rats exposed to the elevated plus-maze. Behav Brain Res, v.194, n.2, Dec 12, p.181-6. 2008.

Morato De Carvalho, S., J. C. De Aguiar, *et al.* Effect of minor tranquilizers, tryptamine antagonists and amphetamine on behavior punished by brain stimulation. Pharmacol Biochem Behav, v.15, n.3, Sep, p.351-6. 1981.

Moreira, F., M. Molchanov, *et al.* Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. Psychopharmacology, v.171, n.2, p.199-203. 2004.

Morgan, M. M., A. Depaulis, *et al.* Diazepam dissociates the analgesic and aversive effects of periaqueductal gray stimulation in the rat. Brain Research, v.423, n.1-2, p.395-398. 1987.

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

Nader, K., G. E. Schafe, *et al.* Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. Nature, v.406, n.6797, Aug 17, p.722-6. 2000.

Nashold, B. S., Jr., W. P. Wilson, *et al.* Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. J Neurosurg, v.30, n.1, Jan, p.14-24. 1969.

- Nogueira, R. L. e F. G. Graeff. Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.52, n.1, p.1-6. 1995.
- O'boyle, C. A. Benzodiazepine-induced amnesia and anaesthetic practice: a review. Psychopharmacol Ser, v.6, p.146-65. 1988.
- Oliveira, L. C., A. C. Broiz, *et al.* 5-HT₂ receptor mechanisms of the dorsal periaqueductal gray in the conditioned and unconditioned fear in rats. Psychopharmacology (Berl), v.191, n.2, Apr, p.253-62. 2007.
- Otto, T., G. Cousins, *et al.* Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. Behavioural Brain Research, v.110, n.1-2, p.119-128. 2000.
- Pain, L., M.-J. E. Angst, *et al.* Effect of a Nonsedative Dose of Propofol on Memory for Aversively Loaded Information in Rats. Anesthesiology, v.97, n.2, p.447-453. 2002.
- Paschall, G. Y. e M. Davis. Olfactory-mediated fear-potentiated startle. Behav Neurosci, v.116, n.1, Feb, p.4-12. 2002a.
- _____. Second-order olfactory-mediated fear-potentiated startle. Learn Mem, v.9, n.6, Nov-Dec, p.395-401. 2002b.
- Pavesi, E. Participação de adrenoceptores beta no núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo avaliada no condicionamento de medo. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC: 113 p. 2010.
- Pavesi, E., N. S. Canteras, *et al.* Acquisition of Pavlovian Fear Conditioning Using beta-Adrenoceptor Activation of the Dorsal Premammillary Nucleus as an Unconditioned Stimulus to Mimic Live Predator-Threat Exposure. Neuropsychopharmacology, Jan 5. 2011.
- Pavlov, I. P. Conditioned Reflexes. New York: Dover. 1927
- Paxinos, G., Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press. 1998
- Pedreira, M. E., B. Dimant, *et al.* Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. Pharmacol Biochem Behav, v.52, n.2, Oct, p.385-95. 1995.

Pentkowski, N. S., D. C. Blanchard, *et al.* Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. Eur J Neurosci, v.23, n.8, Apr, p.2185-96. 2006.

Prediger, R. D., L. C. Batista, *et al.* Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. Neurobiol Aging, v.26, n.6, Jun, p.957-64. 2005.

Quirk, G. J. Extinction: new excitement for an old phenomenon. Biol Psychiatry, v.60, n.4, Aug 15, p.317-8. 2006.

Rescorla, R. A. e D. J. Gillan. An analysis of the facilitative effect of similarity on second-order conditioning. J Exp Psychol Anim Behav Process, v.6, n.4, Oct, p.339-51. 1980.

Restrepo, D., J. Arellano, *et al.* Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. Horm Behav, v.46, n.3, Sep, p.247-56. 2004.

Risold, P. Y., N. S. Canteras, *et al.* Organization of projections from the anterior hypothalamic nucleus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. J Comp Neurol, v.348, n.1, Oct 1, p.1-40. 1994.

Risold, P. Y., R. H. Thompson, *et al.* The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. Brain Res Brain Res Rev, v.24, n.2-3, Sep 19, p.197-254. 1997.

Rodrigues, S. M., G. E. Schafe, *et al.* Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. Neuron, v.44, n.1, Sep 30, p.75-91. 2004.

Sacchetti, B., C. Ambrogi Lorenzini, *et al.* Memorization of contextual and CS conditioned fear response (freezing) in a one-trial acquisition paradigm. Arch Ital Biol, v.137, n.4, Aug, p.235-48. 1999.

Sam, M., S. Vora, *et al.* Neuropharmacology. Odorants may arouse instinctive behaviours. Nature, v.412, n.6843, Jul 12, p.142. 2001.

Sante, A. B., M. J. Nobre, *et al.* Place aversion induced by blockade of mu or activation of kappa opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray matter. Behav Pharmacol, v.11, n.7-8, Nov, p.583-9. 2000.

Santos, P., A. S. Bittencourt, *et al.* Elevated T-maze evaluation of anxiety and memory effects of NMDA/glycine-B site ligands injected into the dorsal

- periaqueductal gray matter and the superior colliculus of rats. Neuropharmacology, v.51, n.2, p.203-212. 2006.
- Schenberg, L. C., A. S. Bittencourt, *et al.* Modeling panic attacks. Neurosci Biobehav Rev, v.25, n.7-8, Dec, p.647-59. 2001.
- Schenberg, L. C., J. C. De Aguiar, *et al.* Depressant action of chlordiazepoxide on cardiovascular and respiratory changes induced by aversive electrical stimulation of the brain. Braz J Med Biol Res, v.14, n.1, Apr, p.69-72. 1981.
- Schenberg, L. C. e F. G. Graeff. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. Pharmacol Biochem Behav, v.9, n.3, Sep, p.287-95. 1978.
- Schmitt, M. L., W. Coelho, *et al.* Anxiogenic-like effect of glycine and D-serine microinjected into dorsal periaqueductal gray matter of rats. Neurosci Lett, v.189, n.2, Apr 14, p.93-6. 1995.
- Schmitt, M. L., F. G. Graeff, *et al.* Anxiolytic effect of kynurenic acid microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter of rats placed in the elevated plus-maze test. Braz J Med Biol Res, v.23, n.8, p.677-9. 1990.
- Schmitt, P., G. Sandner, *et al.* Escape and approach induced by brain stimulation: a parametric analysis. Behav Brain Res, v.2, n.1, Jan, p.49-79. 1981.
- Schoenfeld, T. A. e T. A. Cleland. The anatomical logic of smell. Trends Neurosci, v.28, n.11, Nov, p.620-7. 2005.
- Schutz, M. T., J. C. De Aguiar, *et al.* Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. Psychopharmacology (Berl), v.85, n.3, p.340-5. 1985.
- Shibata, H. Efferent projections from the anterior thalamic nuclei to the cingulate cortex in the rat. J Comp Neurol, v.330, n.4, Apr 22, p.533-42. 1993.
- Skultety, F. M. Stimulation of Periaqueductal Gray and Hypothalamus. Arch Neurol, v.9, Jun, p.608-20. 1963.
- Slotnick, B. M. e H. M. Katz. Olfactory learning-set formation in rats. Science, v.185, n.153, Aug 30, p.796-8. 1974.
- Soffié, M. e Y. Lamberty. Scopolamine effects on juvenile conspecific recognition in rats: Possible interaction with olfactory sensitivity. Behavioural Processes, v.17, n.3, p.181-190. 1988.

Sotres-Bayon, F., D. E. Bush, *et al.* Emotional perseveration: an update on prefrontal-amygdala interactions in fear extinction. Learn Mem, v.11, n.5, Sep-Oct, p.525-35. 2004.

Staples, L. G., I. S. McGregor, *et al.* Cat odor, but not trimethylthiazoline (fox odor), activates accessory olfactory and defense-related brain regions in rats. Neuroscience, v.151, n.4, Feb 19, p.937-47. 2008.

Teixeira, K. V. e A. P. Carobrez. Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plus-maze task. Behav Neurosci, v.113, n.1, Feb, p.196-203. 1999.

Tonetto, L. L., A. L. Terzian, *et al.* Inhibition of the NMDA receptor/Nitric Oxide pathway in the dorsolateral periaqueductal gray causes anxiolytic-like effects in rats submitted to the Vogel conflict test. Behav Brain Funct, v.5, p.40. 2009.

Traynelis, S. F., L. P. Wollmuth, *et al.* Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. Pharmacological Reviews, v.62, n.3, September 1, 2010, p.405-496. 2010.

Tronson, N. C. e J. R. Taylor. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. Nat Rev Neurosci, v.8, n.4, p.262-275. 2007.

Tzschentke, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. Addict Biol, v.12, n.3-4, Sep, p.227-462. 2007.

Ursin, H. The Effect of Amygdaloid Lesions on Flight and Defense Behavior in Cats. Exp Neurol, v.11, Jan, p.61-79. 1965.

Van Groen, T., I. Kadish, *et al.* Role of the anterodorsal and anteroventral nuclei of the thalamus in spatial memory in the rat. Behav Brain Res, v.132, n.1, Apr 15, p.19-28. 2002.

_____. Efferent connections of the anteromedial nucleus of the thalamus of the rat. Brain Res Brain Res Rev, v.30, n.1, Jul, p.1-26. 1999.

Van Stegeren, A. H., W. Everaerd, *et al.* Memory for emotional events: differential effects of centrally versus peripherally acting beta-blocking agents. Psychopharmacology (Berl), v.138, n.3-4, Aug, p.305-10. 1998.

- Vermetten, E. e J. D. Bremner. Olfaction as a traumatic reminder in posttraumatic stress disorder: case reports and review. J Clin Psychiatry, v.64, n.2, Feb, p.202-7. 2003.
- Vermetten, E., C. Schmahl, *et al.* Positron tomographic emission study of olfactory induced emotional recall in veterans with and without combat-related posttraumatic stress disorder. Psychopharmacol Bull, v.40, n.1, p.8-30. 2007.
- Vertes, R. P. Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. J Comp Neurol, v.442, n.2, Jan 7, p.163-87. 2002.
- Vertes, R. P., W. B. Hoover, *et al.* Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. J Comp Neurol, v.499, n.5, Dec 10, p.768-96. 2006.
- Vertes, R. P. e S. B. Linley. Comparison of projections of the dorsal and median raphe nuclei, with some functional considerations. International Congress Series, v.1304, p.98-120. 2007.
- Vianna, D. M., K. G. Borelli, *et al.* Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. Brain Res Bull, v.62, n.3, Dec 30, p.179-89. 2003.
- Vianna, D. M. e M. L. Brandao. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. Braz J Med Biol Res, v.36, n.5, May, p.557-66. 2003.
- Walker, D. L. e M. Davis. Involvement of the dorsal periaqueductal gray in the loss of fear-potentiated startle accompanying high footshock training. Behav Neurosci, v.111, n.4, Aug, p.692-702. 1997.
- Westbrook, R. F., J. D. Greeley, *et al.* Aversive conditioning in the rat: Effects of a benzodiazepine and of an opioid agonist and antagonist on conditioned hypoalgesia and fear. Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes, v.17, n.3, p.219-230. 1991.
- Willner, P. Animal models as simulations of depression. Trends Pharmacol Sci, v.12, n.4, Apr, p.131-6. 1991.
- Young, R. F. Brain and spinal stimulation: how and to whom! Clin Neurosurg, v.35, p.429-47. 1989.

Zangrossi, H., Jr. e S. E. File. Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. Brain Res Bull, v.29, n.3-4, Sep-Oct, p.381-8. 1992.

Zangrossi, H., Jr. e F. G. Graeff. Modelos Animais. In: (Ed.). Transtornos de Ansiedade: ATHENEU, 2003. Modelos Animais, p.55-73

Zangrossi, H., Jr., M. B. Viana, *et al.* Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. Neurosci Biobehav Rev, v.25, n.7-8, Dec, p.637-45. 2001.

Zanoveli, J. M., R. L. Nogueira, *et al.* Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. Eur J Pharmacol, v.473, n.2-3, Jul 25, p.153-61. 2003.

Zhou, Q., P. Le Grevés, *et al.* Intracerebroventricular injection of the N-terminal substance P fragment SP1-7 regulates the expression of the N-methyl--aspartate receptor NR1, NR2A and NR2B subunit mRNAs in the rat brain. Neuroscience Letters, v.291, n.2, p.109-112. 2000.

ANEXO A- Coloração dos cortes do encéfalo de ratos com Giemsa

Primeiro, as lâminas foram lavadas e hidratadas duas vezes em uma cuba contendo água destilada, durante 2 min. Em seguida, foram imersas em corante de Giemsa (Sigma-Aldrich) por 6 min e lavadas com água destilada. Depois, as lâminas foram passadas nos álcoois 70%, 90%, 100%, 100%, 2 min em cada, e fixadas em CitroSolv, duas vezes de 5 min cada. Por fim, as lâminas foram cobertas com lamínulas e seladas com DPX (resina sintética).

ANEXO B- Respostas defensivas evocadas pela microinjeção de NMDA na MCPdl.

No experimento 1, foi analisado o tempo de congelamento, o número de levantadas e a presença do comportamento de corrido e saltos durante a sessão de condicionamento com PBS e NMDA nas doses de 25, 50, 100 e 200 pmol na MCPdl, durante 10 min.

O tempo de congelamento foi transformado em porcentagem e, assim como o número de levantadas, foram representados como média \pm erro padrão da média. Como os dados não possuem uma distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk), os mesmos foram analisados pelo teste não paramétricos de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Mann-Whitney. O teste de Chi^2 foi usado para analisar a frequência dos animais que apresentaram os comportamentos de corrida e saltos após o tratamento de PBS ou NMDA na MCPdl.

O teste de Kruskal-Wallis detectou diferenças significativas no fator tratamento para o tempo de congelamento [$H(4, N=40)=22,69; p=0,002$]. Segundo o teste de Mann-Whitney, todas as doses de NMDA aumentaram o tempo de congelamento quando comparado ao grupo PBS. Não foi observado diferença no número de levantadas para o fator tratamento.

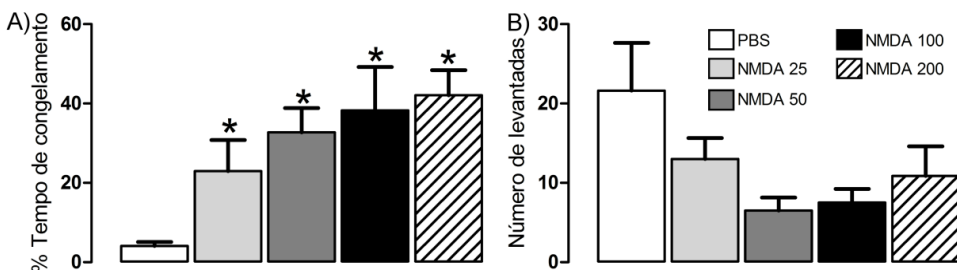


Figura 20. Respostas defensivas evocadas pela microinjeção de NMDA na MCPdl durante a sessão de condicionamento. Os animais foram tratados com PBS, NMDA 25, 50, 100 e 200 pmol na MCPdl, ($n=8$ por grupo). As colunas representam a média \pm e.p.m. do tempo de congelamento (A) e da frequência de levantar (B) na caixa de condicionamento. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle PBS. Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Mann-Whitney.

Para o comportamento de correr, o teste do Chi^2 relevou um aumento significativo na frequência de correr dos animais que receberam NMDA 100 ou 200 pmol na MCPdl ($\chi^2 = 7.27$, $p=0,007$), comparado ao grupo PBS.

Tabela 4. Frequência dos animais que apresentaram os comportamentos de corrida e saltos após o tratamento de PBS ou NMDA na MCPdl.

Corrida	Tratamentos (pmol)				
	PBS	NMDA 25	NMDA 50	NMDA 100	NMDA 200
Presença (%)	0 (0)	2 (25)	3 (37,5)	5* (62,5)	5* (62,5)
Ausência (%)	8 (100)	6 (75)	5 (62,5)	3 (37,5)	3 (37,5)
Saltos					
Presença (%)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	2 (25)	2 (25)
Ausência (%)	8 (100)	8 (100)	7 (85,5)	6 (75)	6 (75)

* $p < 0.05$ comparado ao grupo controle PBS, teste de Chi^2 .

A figura 21 ilustra a curva min-a-min da porcentagem de tempo de congelamento e da frequência de levantar dos animais microinjetados com NMDA 100 pmol na MCPdl e expostos ao odor na sessão de condicionamento, durante 20 min, grupos do experimento 3. Estes dados foram representados como média \pm erro padrão da média.

O teste-t para uma amostra simples, comparado a uma média de referência constante, revelou um aumento significativo ($p < 0.05$) na porcentagem de tempo de congelamento, entre o primeiro até o quinto minuto, para o grupo microinjetado com NMDA 100 pmol na MCPdl quando comparado com a média do grupo PBS, na sessão de condicionamento. Em adição, este teste estatístico mostrou uma redução significativa na frequência de levantar do grupo NMDA 100 pmol, quando comparado com o grupo PBS, durante toda a sessão de condicionamento.

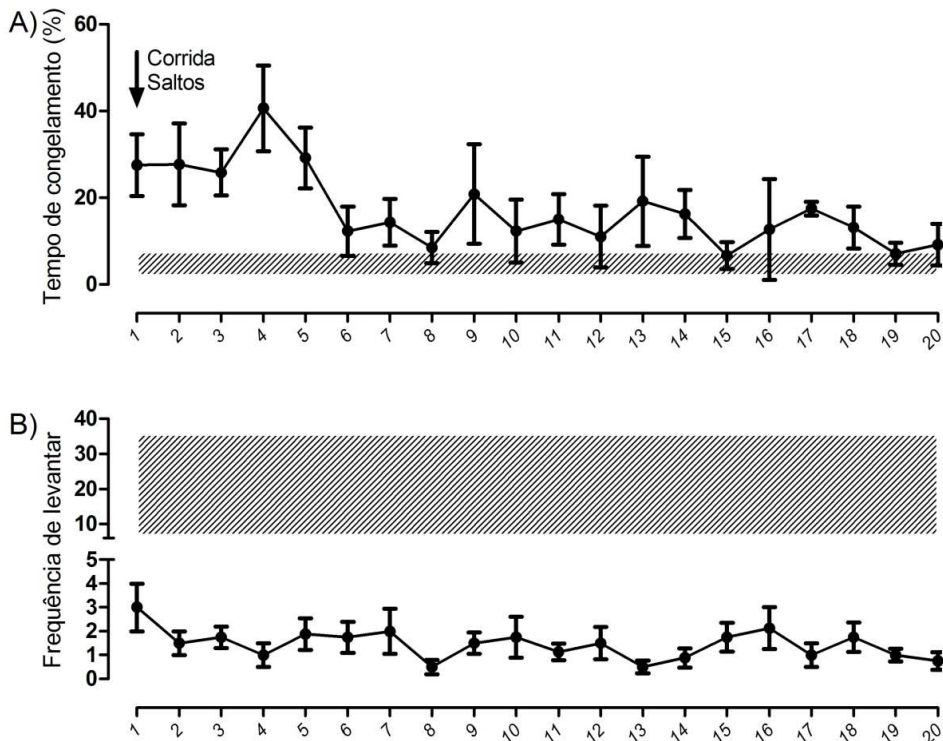


Figura 21. Curva min-a-min das respostas defensivas evocadas pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl durante a sessão de condicionamento, em 20 min. Os pontos representam a média \pm e.p.m. ($n=9$) do tempo de congelamento (A) e da frequência de levantar (B). As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média do grupo microinjetado com PBS na MCPdl durante a sessão de condicionamento. A flecha horizontal sinaliza que a corrida e os saltos ocorreram no início da sessão.

ANEXO C- Efeito do midazolam sobre o modelo da discriminação olfatória.

O teste de discriminação olfatória foi realizado em uma caixa com dois compartimentos idênticos (30 x 30 x 20 cm), separados por uma porta aberta, que permitiu o trânsito livre dos animais entre os compartimentos. O chão de um dos compartimentos foi forrado com a maravalha da caixa moradia do animal testado, caracterizando o compartimento familiar. É importante ressaltar que os animais foram isolados em caixas moradias diferentes, 48h antes do teste. O chão do outro compartimento foi forrado com a maravalha limpa e inodora, caracterizando o compartimento não familiar. O teste avaliou o tempo que o animal permaneceu dentro de cada compartimento, durante uma sessão de 5 min. A discriminação olfatória é observada quando o animal prefere ficar no compartimento impregnado com o seu cheiro (compartimento familiar) em relação ao compartimento inodoro (não-familiar) (Carr, Yee *et al.*, 1976; Soffié e Lamberty, 1988; Prediger, Batista *et al.*, 2005).

Para verificar se as doses de midazolam capazes de impedir a aquisição (1,0 mg/kg) e a expressão (0,50 mg/kg) do condicionamento olfatório de medo poderiam prejudicar a discriminação de odores, os animais receberam salina ou MDZ (0,5 e 1 mg/kg) e, 30 min depois, foram submetidos ao protocolo de discriminação olfatória.

O tempo que o animal permaneceu dentro de cada compartimento foi transformado em porcentagem e representado como média \pm erro padrão da média. A porcentagem de tempo no compartimento familiar e a porcentagem de tempo no compartimento não familiar foram consideradas variáveis dependentes, enquanto que o tratamento foi considerado variável independente. Os valores obtidos foram analisados pela ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* de *Newman-Keuls*.

A figura 22 ilustra o tempo que os animais permaneceram no compartimento familiar e não familiar, após o tratamento via i.p. de salina (n=17), MDZ 0,5 mg/kg (n=10) ou MDZ 1 mg/kg (n=7), no modelo de discriminação olfatória.

A ANOVA detectou diferenças significativas no fator repetição [F(1,32)=35,52; p=0,0001], mas não observou diferenças no fator tratamento e na interação dos fatores tratamento versus repetição. O teste *post hoc* demonstrou que todos os grupos permanecem mais tempo no ambiente familiar que no ambiente não familiar, sugerindo que as

doses de MDZ utilizadas neste trabalho não prejudicam a discriminação olfatória.

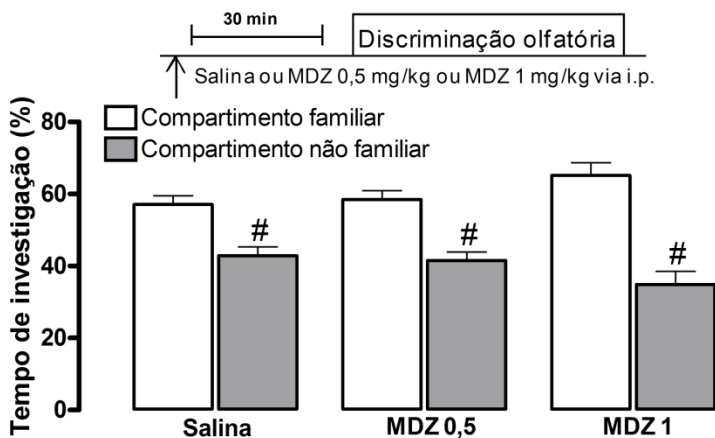


Figura 22. Efeito do midazolam sobre o modelo de discriminação olfatória. Os animais foram tratados com salina (n=18), MDZ 0,5 mg/kg (n=10) ou MDZ 1 mg/kg (n=7) e, após 30 min, submetidos ao modelo de discriminação olfatória. As colunas representam a média \pm e.p.m. do tempo de investigação no compartimento familiar e não familiar. # $p < 0.05$ comparado ao tempo de investigação no compartimento familiar do respectivo grupo. ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls. O fluxograma no alto da figura representa o delineamento experimental utilizado.

ANEXO D- Efeito do nadolol no aumento da frequência cardíaca induzida pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl.

Os animais foram inicialmente anestesiados com uma solução de equitesin, previamente descrita no item 3.5, e posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida (temperatura em torno de 35° C). Em seguida, a veia femoral esquerda foi localizada e uma agulha foi inserida para a administração de heparina (30 UI), diluída em PBS, a fim de prevenir a formação de coágulos.

A artéria carótida esquerda foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. Com o auxílio de uma linha de sutura, o fluxo sanguíneo deste vaso foi interrompido na altura da extremidade distal, enquanto o fluxo em sua extremidade proximal foi temporariamente suprimido pela compressão com uma pinça curva. Uma pequena incisão na região medial da artéria carótida clampeada, serviu como via para inserção de um cateter de polietileno (angiocath®, número 19), heparinizado, o qual foi firmemente amarrado à artéria e conectado a um transdutor de pressão interligado a um equipamento de análise de pressão arterial PowerLab 8/30 (AD instruments® Pty Ltd, Castle Hill, Australia). Os valores da frequência cardíaca (em batimentos por minuto; BPM.) e pressão arterial (PAM; mmHg) foram registrados em um computador (sistema operacional Windows XP®, Microsoft Corporation, EUA) por um software de integração (Chart 5®) do fabricante.

Após a manipulação cirúrgica, e um período de estabilização de 15 min, os efeitos sobre a frequência cardíaca, antes ou após a administração das drogas testadas (microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl e, após 20 min, administração na veia femoral de adrenalina 1,6 e 3,2 µg/kg), foram registrados (n=7). Quinze minutos depois da última administração de adrenalina, nadolol 10 mg/kg foi administrado via intraperitoneal, e após 30 min, a sequência de administração das drogas foi repetida, ou seja, NMDA na MCPdl e duas doses de adrenalina via i.v.

Como representado na figura 23, o teste “t” de Student pareado revelou que nadolol 10 mg/kg, injetado 30 min antes, foi capaz de prevenir significativamente ($p < 0,05$) a taquicardia induzida pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl [$t = 5,28$] e pelas injeções de 1,6 µg/kg [$t = 3,22$] e 3,3 µg/kg de adrenalina [$t = 3,23$], sem alterar a linha de base da frequência cardíaca. Desta forma, este experimento demonstrou que a dose de nadolol (10 mg/kg), utilizada no experimento comportamental no presente trabalho, parece não interferir com o

aprendizado aversivo, mas é efetiva em bloquear a taquicardia, resposta resultante da estimulação da MCPdl com NMDA 100 pmol.

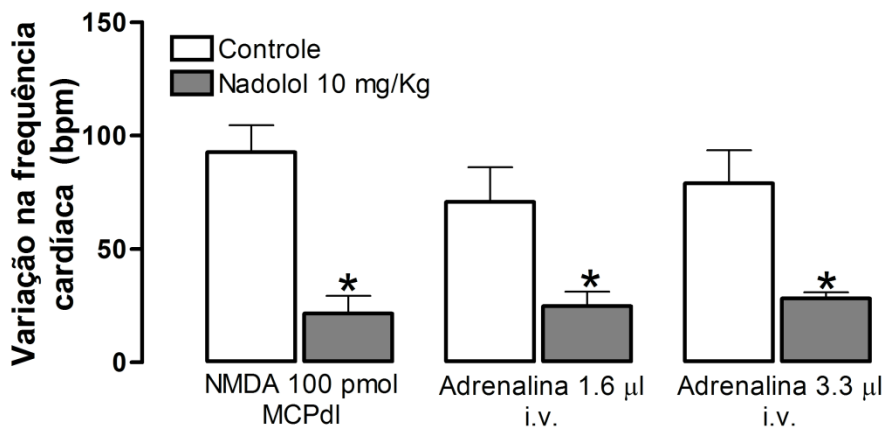


Figura 23. Efeito do nadolol no aumento da frequência cardíaca induzido pela microinjeção de NMDA 100 pmol na MCPdl. Registro fisiológico (A) e variação (B) na frequência cardíaca em número de batimentos por minuto (b.p.m.) em ratos administrados com NMDA 100 pmol na MCPdl e adrenalina (1,6 e 3,3 µg/kg; i.v.) antes (controle) ou após a administração de nadolol (10 mg/Kg, i.p., 30 minutos antes). Teste “t” student pareado - valores expressos em média ± e.p.m.; * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; $n = 7$.