

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

Marina Ângela Sperandio

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE  
AGONISTA OU ANTAGONISTA MINERALOCORTICÓIDE  
SOBRE O CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO  
INDUZIDO PELA ESTIMULAÇÃO QUÍMICA DA MATÉRIA  
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSOLATERAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Pádua Carobrez

Coorientador: Dr. Rimenez Rodrigues de Souza

Florianópolis  
2016



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

Sperandio, Marina Ângela

Efeitos da administração sistêmica de agonista ou antagonista mineralocorticóide sobre o condicionamento aversivo olfatório induzido pela estimulação química da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral / Marina Ângela Sperandio ; orientador, Antonio de Pádua Carobrez ; coorientador, Rimenez Rodrigues de Souza. - Florianópolis, SC, 2016.

89 p.

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

Inclui referências

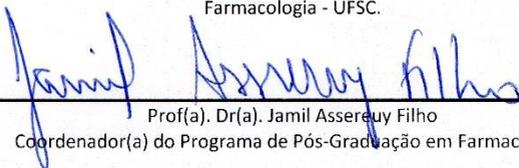
1. Farmacologia. 2. Farmacologia. 3. Condicionamento Aversivo Olfatório. 4. Mineralocorticóides. 5. Matéria Cinzenta Periaquedutal. I. Carobrez, Antonio de Pádua . II. Souza, Rimenez Rodrigues de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

**“Efeitos da administração sistêmica de agonista ou antagonista mineralocorticóide sobre o condicionamento aversivo olfatório induzido pela estimulação química da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral”**

Por

**Marina Ângela Sperandio**

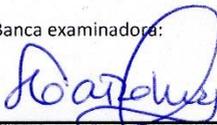
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (29/PPGFMC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



---

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

Banca examinadora:



---

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



---

Dr(a) Raquel Vecchio Fornari (Universidade Federal do ABC - videoconferência)



---

Dr(a) Thereza Christina Monteiro de Lima (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr(a) Geison de Souza Izídio (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 03 de Novembro de 2016.

Mãe, pai, Gui e Olavo: tudo o que eu fizer nesta vida sempre será dedicado a vocês. Dedico este trabalho também a todas as pessoas que acreditam que estudar é uma oportunidade de mudar a si mesmo, e dessa maneira mudar o mundo



## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao apoio da minha família, amigos, colegas e professores desde a decisão de me inscrever no processo seletivo da pós-graduação até a redação da última linha deste trabalho. Sou grata por todo apoio emocional, intelectual e físico. Agradeço também pela compreensão com as minhas dificuldades pessoais e nos meus momentos de ausência.

Agradeço a persistência e dedicação do professor Antonio de Pádua Carobrez pela confiança que me foi depositada para realização deste trabalho e por me conduzir com sua experiência. Agradeço também pela amizade durante estes dois anos de convívio e por ter contribuído para o meu crescimento científico.

Ao meu coorientador, Dr. Rimenez Rodrigues de Souza, pelo empenho e paciência e pelas inúmeras discussões que contribuíram desde o planejamento dos experimentos e discussão dos resultados até a elaboração desta dissertação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela contribuição para a minha formação acadêmica e científica.

Agradeço às professoras Raquel Vecchio Fornari e Thereza Christina Monteiro de Lima, ao professor Geison de Souza Izídio e ao Dr. Filipe Matheus Carvalho pela disposição em avaliar este trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia Comportamental, Frank, Cris, Lucia, Marcelo, Júlia e, em especial, à Caroline e à Ana Idalina por tornarem a convivência harmoniosa e a rotina mais produtiva. À Dra. Eloisa, pela dedicação e disponibilidade, muitas vezes com atividades que iam além de suas obrigações. Todos contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho

Agradeço a todos os demais colegas e os funcionários do Departamento de Farmacologia da UFSC pela cordialidade e disponibilidade.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina por proporcionar a oportunidade de continuar meus estudos e me preparar para a carreira docente.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos que me foi concedida e pelo apoio à pesquisa no país.



Quando terminamos um trabalho, é o momento no qual estamos mais bem preparados para iniciá-lo. Porém, não há tempo para refazê-lo, há sempre outros trabalhos a serem feitos. Talvez seja justamente essa a alegria dos pais e professores: poder compartilhar a experiência adquirida com quem ainda está começando a vida. É como se pudessem viver tudo outra vez com mais sabedoria.

## RESUMO

Diversos trabalhos têm confirmado o papel dos receptores mineralocorticoides (MR) na modulação dos processos atencionais e mnemônicos ligados a situações aversivas. O bloqueio ou a atividade dos MR interfere com a aquisição e a consolidação da aprendizagem em uma variedade de tarefas, tanto em humanos, quanto em animais de laboratório. O presente trabalho buscou investigar o papel do agonista fludrocortisona (FLU) e do antagonista espironolactona (SPI) sobre o receptor mineralocorticoide (MR) na aquisição e consolidação de memórias aversivas, utilizando o protocolo do Condicionamento Aversivo Olfatório (CAO) estabelecido pela ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl). Os resultados comportamentais apontaram que as respostas defensivas mais robustas foram obtidas com a utilização de NMDA 50 pmol na MCPdl, que permitiu o estabelecimento do CAO. A avaliação dos níveis séricos de corticosterona após a sessão de condicionamento com a injeção de doses crescentes de NMDA na MCPdl, não demonstrou alterações nos níveis circulantes de corticosterona quando essa foi mensurada pontualmente 30 min após a sessão de condicionamento nas condições experimentais testadas. A administração sistêmica do antagonista MR SPI 60 minutos antes da sessão de condicionamento do CAO com injeção de NMDA na MCPdl, reduziu a expressão dos comportamentos defensivos e promoveu um prejuízo na aquisição do CAO. Ainda, a consolidação foi prejudicada quando a SPI foi administrada imediatamente após a sessão de condicionamento. Quando a FLU foi administrada após injeção de NMDA 25pmol na MCPdl (demonstrado ser ineficaz em promover condicionamento) facilitou a formação de uma memória de longa duração. Já a administração de FLU 60 minutos antes da aquisição foi capaz de reduzir a expressão dos comportamentos defensivos e prejudicar a formação de uma memória aversiva decorrente do CAO. Os dados do presente trabalho reforçam o envolvimento do MR no armazenamento de memórias aversivas, modulando a aquisição e a consolidação das informações relacionadas a um CAO estabelecido pela injeção de NMDA na MCPdl, de forma dependente do tempo de administração. Além disso, o MR demonstrou estar envolvido nas respostas defensivas expressas pela estimulação da MCPdl.

**Palavras-chave:** Condicionamento olfatório, Matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral, NMDA, Mineralocorticóides.



## ABSTRACT

Several studies have been shown the role of mineralocorticoid receptor (MR) modulation in attentional and mnemonic processes of aversive situations. MR blockade or activation interferes with learning acquisition and consolidation in a variety of tasks, both in humans and animals. The aim of this study was to investigate the role of MR agonist fludrocortisone (FLU) and antagonist spironolactone (SPI) during the aversive memory acquisition and consolidation using the Olfactory Fear Conditioning (OFC) paradigm promoted by the activation of N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the periaqueductal gray matter dorsolateral (dlPAG). NMDA 50 pmol in dlPAG showed a more robust defensive response in this OFC paradigm. Serum levels of corticosterone were evaluated after conditioning session, however neither of the NMDA doses infused into dlPAG promoted corticosterone release increased when it was measured 30 min after the conditioning, under the experimental conditions. Systemic administration of the antagonist MR SPI prior (60 min) the conditioning session with NMDA 50 pmol in dlPAG, reduced the expression of defensive behaviors and impaired the fear acquisition. Furthermore, the memory consolidation was impaired when SPI was administered immediately after the conditioning session. When FLU was administered immediately after NMDA 25 pmol infusion into dlPAG (shown to be ineffective in promoting conditioning), it promoted conditioning facilitation. On the other hand, impairment of defensive responses and memory acquisition was observed when FLU was administered 60 min prior the conditioning with NMDA 50 pmol. The present data reinforce the involvement of MR during the aversive learning, modulating the acquisition and consolidation of information related to a OFC established by NMDA injection in dlPAG, with time-dependent effects of a pharmacological manipulation of MR. Also, MR has been shown to be involved during the defensive responses to the dlPAG stimulation.

**Keywords:** olfactory conditioning, dorsolateral part of the periaqueductal gray matter, NMDA, mineralocorticoids.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sinapse Glutamatérgica .....	6
Figura 2: Representação dos mecanismos envolvidos no funcionamento do Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal com as estruturas que compõem esse sistema, hormônios envolvidos e os pontos de controle do eixo ...	10
Figura 3: Receptores Corticosteroides.....	13
Figura 4: Esquema representativo dos aparatos experimentais utilizados .....	21
Figura 5: Representação esquemática do protocolo do condicionamento aversivo olfatório durante os 4 dias de experimento .....	24
Figura 6: Representação esquemática do protocolo de CAO para coleta de sangue e dosagem dos níveis séricos de corticosterona .....	25
Figura 7: Representação esquemática do experimento para avaliação dos efeitos do bloqueio sistêmico dos receptores MR sobre a aquisição das respostas defensivas exibidas a partir da estimulação da MCPdl .....	26
Figura 8: Representação esquemática do experimento para avaliação dos efeitos do bloqueio sistêmico dos receptores MR sobre a consolidação das respostas defensivas exibidas a partir da estimulação da MCPdl .....	27
Figura 9: Representação esquemática do experimento para avaliação dos efeitos da administração sistêmica de fludrocortisona sobre a consolidação de uma resposta defensiva evocada a partir da estimulação subliminar da MCPdl .....	28
Figura 10: Representação esquemática do experimento para avaliação dos efeitos da administração sistêmica de fludrocortisona sobre a aquisição das respostas defensivas exibidas a partir da estimulação da MCPdl ...	29
Figura 11: Fotomicrografia e diagramas representativos de um corte coronal de encéfalo de ratos na porção rostral da MCPdl .....	30
Figura 12: Efeito da injeção de diferentes doses (pmol) de NMDA na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de condicionamento .....	32
Figura 13: Comportamentos defensivos durante a sessão de condicionamento com injeção de NMDA50 pmol na MCPdl .....	33
Figura 14: Efeito da injeção de diferentes doses (pmol) de NMDA na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de teste.....	35

Figura 15: Dosagem de corticosterona sérica de ratos .....	36
Figura 16: Efeitos da administração de veículo (VE) ou espironolactona (SPI 5 ou 10 mg/kg) 60 min antes da injeção de NMDA50 pmol na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de condicionamento ....	38
Figura 17: Efeitos da administração de veículo (VE) ou espironolactona (SPI 5 ou 10 mg/kg) 60 min antes da injeção de NMDA50 pmol na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de teste .....	40
Figura 18: Administração de veículo (VE) ou espironolactona (SPI 5 ou 10 mg/kg) imediatamente após a injeção de NMDA50 pmol na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de condicionamento ....	42
Figura 19: Efeitos da administração de veículo (VE) ou espironolactona (SPI 5 ou 10 mg/kg) imediatamente após a injeção de NMDA50 pmol na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de teste .....	44
Figura 20: Administração de veículo (VE) ou fludrocortisona (FLU 0,3 ou 1mg/kg) imediatamente após a injeção de NMDA25 pmol na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de condicionamento ....	46
Figura 21: Efeitos da administração de veículo (VE) ou fludrocortisona (FLU 0,3 ou 1mg/kg) imediatamente após a injeção de NMDA25 pmol na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de teste.....	48
Figura 22: Efeitos da administração de veículo (VE) ou fludrocortisona (FLU 0,3 ou 1mg/kg) 60 min antes da injeção de NMDA50 pmol na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de condicionamento .....	50
Figura 23: Efeitos da administração de veículo (VE) ou fludrocortisona (FLU 0,3 ou 1mg/kg) 60 min antes da injeção de NMDA50 pmol na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de teste .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACTH** - *Hormônio adrenocorticotrófico*  
**ANOVA** - *Análise de variância*  
**BDNF** - *Fator neurotrófico derivado do cérebro*  
**CAO** - *Condicionamento aversivo olfatório*  
**CCK** - *Colescistocinina*  
**CRH** - *Hormônio liberador de corticotrofina*  
**CORT** - *Corticosterona*  
**EC** - *Estímulo condicionado*  
**EI** - *Estímulo incondicionado*  
**EPM** - *Erro padrão da média*  
**FLU** - *Fludrocortisona*  
**GABA** - *Ácido  $\gamma$ -aminobutírico*  
**GLU** - *Glutamato*  
**GR** - *Receptores glicocorticoides*  
**HPA** - *Hipotálamo-pituitária-adrenal*  
**MCP** - *Matéria cinzenta periaquetudal*  
**MR** - *Receptores mineralocorticoides*  
**NMDA** - *N-metil-D-aspartato*  
**PMd** - *Núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo*  
**PVN** - *Núcleo paraventricular do hipotálamo*  
**RD** - *Respostas defensivas*  
**SNA** - *Sistema nervoso autonômico*  
**SNC** - *Sistema nervoso central*  
**SPI** - *Espironolactona*  
**VE** - *Veículo*

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS .....	1
1.2	CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO .....	2
1.2.1	<i>Matéria Cinzenta Periaquedutal</i> .....	4
1.3	RESPOSTA AO ESTRESSE .....	7
1.3.1	<i>Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal</i> .....	9
1.3.2	<i>Receptores Corticosteroides</i> .....	11
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
3.1	ANIMAIS .....	17
3.2	DROGAS, FÁRMACOS E DILUIÇÕES .....	17
3.3	ESTÍMULO OLFATÓRIO.....	18
3.4	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	18
3.5	INFUSÃO INTRACEREBRAL .....	19
3.6	COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE E DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA .....	20
3.7	APARATOS EXPERIMENTAIS .....	20
3.7.1	<i>Caixa de Condicionamento ao Odor</i> .....	20
3.7.2	<i>Caixa de Exposição ao Odor</i> .....	20
3.8	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	21
3.8.1	<i>Parâmetros Comportamentais</i> .....	23
3.8.2	<i>Experimento 1: Avaliação da resposta defensiva exibida após a injeção de NMDA como EI na MCPdl durante a sessão de condicionamento e sessão de teste</i> .....	24
3.8.3	<i>Experimento 2: Avaliação dos níveis séricos de corticosterona 30 minutos após a sessão de condicionamento com diferentes doses de NMDA infundidos na MCPdl</i> .....	24
3.8.4	<i>Experimento 3: Efeito do bloqueio sistêmico dos receptores MR sobre a aquisição das respostas defensivas exibidas a partir da estimulação da MCPdl</i> .....	25

3.8.5	<i>Experimento 4: Efeito do bloqueio sistêmico dos receptores MR sobre a consolidação das respostas defensivas exibidas a partir da estimulação da MCPdl</i> .....	26
3.8.6	<i>Experimento 5: Efeito da administração de fludrocortisona sobre a consolidação de uma resposta defensiva decorrente da estimulação sublimiar da MCPdl</i> .....	27
3.8.7	<i>Experimento 6: Efeito da administração sistêmica de fludrocortisona sobre a aquisição das respostas defensivas exibidas a partir da estimulação da MCPdl</i> .....	28
3.9	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	29
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
4.1	EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DEFENSIVA EXIBIDA APÓS A INJEÇÃO DE NMDA COMO EI NA MCPDL DURANTE A SESSÃO DE CONDICIONAMENTO E SESSÃO DE TESTE .....	31
4.2	EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA 30 MINUTOS APÓS A SESSÃO DE CONDICIONAMENTO COM A INJEÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE NMDA NA MCPDL.....	36
4.3	EXPERIMENTO 3 - EFEITO DO BLOQUEIO SISTÊMICO DOS RECEPTORES MR SOBRE A AQUISIÇÃO DAS RESPOSTAS DEFENSIVAS EXIBIDAS A PARTIR DA ESTIMULAÇÃO DA MCPDL .....	37
4.4	EXPERIMENTO 4 - EFEITO DO BLOQUEIO SISTÊMICO DOS RECEPTORES MR SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DAS RESPOSTAS DEFENSIVAS EXIBIDAS A PARTIR DA ESTIMULAÇÃO DA MCPDL .....	41
4.5	EXPERIMENTO 5 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE FLUDROCORTISONA SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DE UMA RESPOSTA DEFENSIVA DECORRENTE DA ESTIMULAÇÃO SUBLIMIAR DA MCPDL.....	45
4.6	EXPERIMENTO 6 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE FLUDROCORTISONA SOBRE A AQUISIÇÃO DAS RESPOSTAS DEFENSIVAS EXIBIDAS A PARTIR DA ESTIMULAÇÃO DA MCPDL .....	49
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS E CONCLUSÕES</b> .....	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>69</b>
	<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>86</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Comportamentos Defensivos

Quando confrontados com estímulos e situações que envolvam ameaça ou perigo, os animais exibem um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas preparatórias, coletivamente denominadas respostas defensivas. O comportamento defensivo, por sua vez, é uma das principais vias de indução da resposta ao estresse e ativa diversos mecanismos endócrinos permitindo ao organismo lidar com a situação e promover as adaptações necessárias (DE KLOET et al., 1998; DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; KOOLHAAS et al., 2011). Estes comportamentos são altamente conservados entre mamíferos e costumam ser rapidamente exibidos frente a situações ameaçadoras. As características do estímulo ameaçador e a situação no qual este é encontrado estão relacionados com o tipo de resposta defensiva a ser exibida (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988).

A semelhança entre o comportamento humano e dos animais na expressão de emoções de natureza aversiva, assim como o estudo do comportamento de outros animais para a compreensão da emoção em humanos, foi inicialmente proposta por Charles Darwin (1872) em seu livro “A expressão das emoções no homem e nos animais” (DARWIN, 1872/2009). A abordagem evolutiva permitiu o desenvolvimento de diversas teorias sobre a funcionalidade e a importância das emoções sobre as diferentes espécies. Ainda que existam características singulares das emoções humanas, ao menos alguns dos aspectos das reações comportamentais estão relacionados à ancestralidade (LEDOUX, 2012). Neste sentido, os modelos animais são fundamentais para identificar e caracterizar os mecanismos neurobiológicos do comportamento defensivo.

As estratégias comportamentais defensivas básicas utilizadas pelos animais compreendem fuga, imobilidade, ataque defensivo, submissão, avaliação de risco e esquiva (BLANCHARD; BLANCHARD, 1990; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003).

Em uma situação que represente perigo ou ameaça, os comportamentos defensivos podem ser diferenciados em dois momentos. Inicialmente, frente ao estímulo originalmente ameaçador, são

desencadeadas as respostas inatas. Em um segundo momento, estímulos neutros que foram associados com estímulos ameaçadores inatos são capazes de eliciar as respostas defensivas, com base na informação já processada por estruturas cognitivas envolvidas com a formação de uma memória aversiva (GROSS; CANTERAS, 2012). Estas estruturas incluem os núcleos da amígdala, núcleos hipotalâmicos, córtex pré-frontal e matéria cinzenta periaquedutal (MCP), entre outros, que participam em conjunto na interpretação das informações provenientes do meio ambiente e permitem que a resposta frente à ameaça ou ao evento estressor seja adequada e adaptativa (BRANDÃO et al., 1994; CAROBREZ; TEIXEIRA; GRAEFF, 2001; LEDOUX, 2003; HERRY; JOHANSEN, 2014).

Diante de situações que eliciam os comportamentos defensivos são recrutados diversos sistemas neurais e também neuroendócrinos visando minimizar os custos ao organismo, dentre eles o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal - implicado na regulação e no controle de diversas funções, tanto comportamentais como cognitivas (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Embora tais respostas possam ser de extrema importância para uma melhor adaptação a situações de curto prazo, um desequilíbrio nestas respostas ao estresse pode contribuir para o desenvolvimento de estados patológicos e o comprometimento de funções fisiológicas e cognitivas (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000; RODRIGUES; LEDOUX; SAPOLSKY, 2009).

## **1.2 Condicionamento Aversivo Olfatório**

O condicionamento aversivo tem suas raízes no condicionamento Pavloviano clássico e é um procedimento experimental onde um estímulo emocionalmente neutro (ex.: som, luz, odor, estímulo tátil ou contextual) é pareado (ou associado) a um estímulo incondicionado aversivo (ex.: choque elétrico nas patas, estimulação elétrica ou química de determinadas estruturas cerebrais), levando a uma aprendizagem aversiva. Após um ou alguns pareamentos, o estímulo neutro adquire característica emocional relevante e, dessa forma, se torna capaz de desencadear respostas condicionadas que tipicamente ocorrem na presença do estímulo incondicionado (EI), tornando-se assim um estímulo condicionado (EC). O condicionamento aversivo permite que estímulos aprendidos ativem respostas ao perigo adquiridas evolutivamente (LEDOUX, 2000). Tais reações defensivas ocorrem tanto na presença destes estímulos aprendidos quanto na presença de ameaças

incondicionadas ou inatas como, por exemplo, a ameaça por estímulos provenientes de predadores (LEDOUX, 2000; APFELBACH et al., 2005).

A quantificação das respostas frente ao estímulo condicionado, como imobilidade, esquiva da fonte do estímulo, alterações autonômicas e endócrinas, dentre outras, confirma o estabelecimento ou não do condicionamento aversivo (LEDOUX, 2000).

As respostas evocadas pelo EC são frequentemente medidas nas sessões de aquisição e de exposição ao EC. A aquisição é o momento da aprendizagem inicial, isto é, a associação entre o EC e o EI em uma sessão denominada de treino ou condicionamento. A evocação, ou teste, é uma sessão utilizada para verificar a associação entre EC-EI, e é feita pela apresentação apenas do EC (MCGAUGH, 2000; DUDAI, 2004).

Para muitas espécies, a olfação é o sentido mais desenvolvido, utilizado tanto para detectar e reconhecer indivíduos da mesma espécie, presas e predadores, quanto para execução de comportamentos reprodutivos e alimentares. Os roedores são animais que fazem parte das espécies que se guiam fundamentalmente através do sistema olfatório, sendo nestes animais um sistema sofisticado (BRENNAN; KEVERNE, 1997; MUNGER; LEINDERS-ZUFALL; ZUFALL, 2009; TAKAHASHI, 2014). As áreas cerebrais dedicadas ao processamento dos estímulos olfatórios são maiores nos roedores do que em outras espécies, refletindo uma relevância substancial deste sentido (RESTREPO et al., 2004), sendo possível atribuir funções dominantes da olfação sobre diferentes comportamentos destes animais.

Baseados em estudos de condicionamento clássico, Otto e colaboradores (1997; 2000) demonstraram que um condicionamento aversivo utilizando odores como estímulo condicionado resulta em uma associação robusta e de longo prazo entre o estímulo olfatório condicionado e o estímulo incondicionado, neste caso o choque elétrico nas patas (OTTO; COUSENS; RAJEWSKI, 1997; OTTO; COUSENS; HERZOG, 2000). Além disso, a literatura demonstra que odores utilizados como estímulos condicionados em exposição a ratos parecem ser os únicos estímulos capazes de ativar o sistema hipotalâmico de defesa, uma rede neural ligada a respostas naturais de medo frente ao odor de predadores (CANTERAS, 2002; CANTERAS et al., 2008; CANTERAS; PAVESI; CAROBREZ, 2015).

O modelo de condicionamento aversivo olfatório (CAO) vem sendo amplamente investigado por nosso laboratório nos últimos anos. Inicialmente, Kroon e Carobrez (2008) demonstraram que a apresentação de um odor neutro como EC aos animais pareado ao choque elétrico nas patas como EI, foi capaz de gerar respostas comportamentais ao odor pareado similares àquelas que são apresentadas na presença de odor de um predador natural (CANTERAS et al., 2008; KROON; CAROBREZ, 2009). A partir desses resultados, diferentes estímulos foram investigados com o intuito de serem empregados como EI. A administração sistêmica de drogas com características ansiogênicas como o pentilenotetrazol (CAVALLI; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2009) e a estimulação química, por meio de injeções de agonistas de receptores específicos em estruturas cerebrais, tais como a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) (KINCHESKI et al., 2012) e o núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo (PMd) (PAVESI; CANTERAS; CAROBREZ, 2011), também foram capazes de promover a expressão de comportamentos defensivos num CAO, quando empregadas como estímulo incondicionado.

Dessa forma, o condicionamento aversivo olfatório tem sido um modelo utilizado para o entendimento tanto das reações defensivas imediatas e incondicionadas, como aquelas baseadas em memórias aversivas, que envolvem os mecanismos cognitivos e neuronais relacionados com um contexto ou pistas associadas ao evento aversivo.

### *1.2.1 Matéria Cinzenta Periaquedutal*

A matéria cinzenta periaquedutal corresponde à região mesencefálica que circunda o aqueduto cerebral, sendo dividida anatômica e funcionalmente ao longo do eixo rostrocaudal em quatro colunas, denominadas de acordo com a posição em relação ao aqueduto: dorsomedial (MCPdm), dorsolateral (MCPdl), lateral (MCPl) e ventrolateral (MCPvl) (CARRIVE, 1993; BANDLER; SHIPLEY, 1994; BEHBEHANI, 1995).

Devido à interconectividade entre a MCP e diversas estruturas relacionadas aos sistemas motor, sensorial, límbico e autonômico esta estrutura participa da mediação de funções distintas fundamentais para a sobrevivência do organismo (BEITZ; SHEPARD, 1985; VIANNA; BRANDÃO, 2003) como: regulação autonômica, lordose, vocalização, processamento e modulação da dor e reações emocionais (BEHBEHANI, 1995; CAROBREZ; TEIXEIRA; GRAEFF, 2001).

Dentro da circuitaria encefálica envolvida com as respostas defensivas, a porção dorsal (dm e dl) da MCP constitui um importante substrato neural para a integração e execução de reações defensivas frente à ameaças (BEHBEHANI, 1995; GROSS; CANTERAS, 2012),

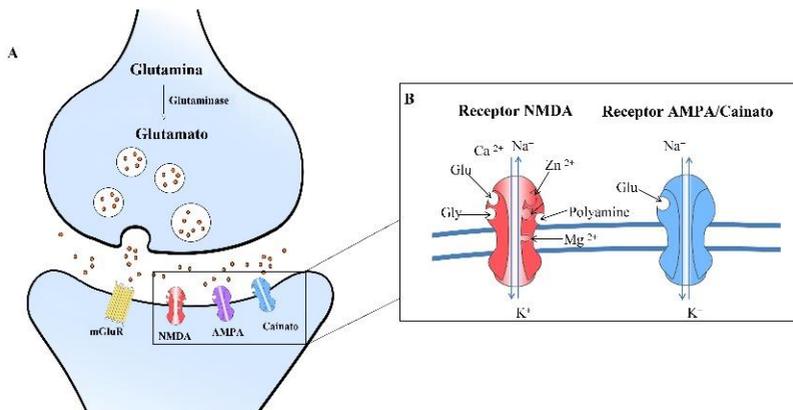
Neste sentido, trabalhos anteriores mostraram que lesões na MCPd diminuíram as respostas defensivas (imobilidade e avaliação de risco) frente às ameaças (DIELENBERG; LEMAN; CARRIVE, 2004). Além disso, estudos que utilizam a técnica de imunohistoquímica para a proteína *Fos*, uma proteína transcrita a partir do gene de expressão imediata *c-Fos* e empregada como ferramenta para mapeamento funcional de neurônios (MORGAN; CURRAN, 1989; CHAUDHURI, 1997), mostraram o aumento da expressão da proteína na MCP, especialmente na coluna dorsal da MCP em situações de perigo iminente, como, por exemplo, em ratos expostos ao predador (CANTERAS; GOTO, 1999; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2002; BEIJAMINI; GUIMARÃES, 2006). Ainda, a estimulação elétrica ou farmacológica da MCPd mostrou ser capaz de desencadear respostas defensivas em ratos, gatos e camundongos (BANDLER, 1982; BRANDÃO; DE AGUIAR; GRAEFF, 1982; SCHENBERG; DE AGUIAR; GRAEFF, 1983; BANDLER; CARRIVE, 1988; CARVALHO-NETTO et al., 2006). Recentemente, Chen e colaboradores (2015) descreveram que a ativação optogenética da MCPd também induziu comportamentos defensivos em ratos.

Diferentes sistemas de neurotransmissão presentes na MCPd parecem modular ou mediar o comportamento defensivo evocado em situações aversivas, como a serotonina, o ácido gama-aminobutírico (GABA), os canabinoides, os neuropeptídeos incluindo o hormônio liberador de corticotrofinas (CRH), a colecistocinina (CCK), e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) além do glutamato ou ácido glutâmico (GLU) (para revisão ver GRAEFF, FG, SANT'ANA, AB, VIELA-COSTA, HH, ZANGROSSI, 2015). Neste trabalho, daremos ênfase ao GLU, que além de exercer controle tônico excitatório tem sido descrito como essencial na mediação da reação defensiva.

#### *Sistema Glutamatérgico na Matéria Cinzenta Periaquedutal*

O GLU é considerado o principal aminoácido excitatório do sistema nervoso central de mamíferos e aproximadamente 60% dos neurônios utilizam esse aminoácido como neurotransmissor (COLLINGRIDGE; LESTER, 1989). Sintetizado em neurônios pré-

sinápticos a partir da conversão de glutamina em glutamato pela enzima glutaminase, o GLU é armazenado em vesículas e posteriormente liberado por exocitose dependente do influxo de cálcio. Na fenda sináptica, o glutamato exerce seus efeitos através de receptores, que de maneira geral, podem ser divididos em duas classes: metabotrópicos e ionotrópicos, conforme ilustrado na Figura 1. Os receptores metabotrópicos podem ser subdivididos em três grupos: I, II ou III, de acordo com a proteína G ao qual estão acoplados (GLADDING; FITZJOHN; MOLNAR, 2009). Já os receptores ionotrópicos, foram subdivididos em NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA ( $\alpha$  amino-3-hidroxi 5-metil 4-isoxazolepropionato) e cainato (GLADDING; FITZJOHN; MOLNAR, 2009; TRAYNELIS et al., 2010). O término das ações do glutamato ocorre quando há recaptação através dos transportadores de aminoácidos excitatórios em neurônios e astrócitos.



**Figura 1: Sinapse Glutamérgica.** A) Na pré-sinapse, a glutamina é convertida em glutamato pela enzima glutaminase e então armazenado nas vesículas sinápticas. O glutamato, liberado na fenda sináptica, interage com seus receptores de membrana: AMPA, cainato, NMDA e mGluR (receptor metabotrópico). B) Estrutura e função dos receptores NMDA e AMPA/cainato. O receptor NMDA é constituído por sete subunidades (não representadas na figura) que, quando agrupadas, formam um poro central com condutância seletiva dos íons cálcio para sódio e potássio. Este receptor possui diversos sítios de ligação regulatórios para o glutamato, glicina, magnésio, zinco e poliaminas. Os receptores cainato e AMPA interagem apenas com glutamato e a permeabilidade para íons é mais seletiva do sódio, para potássio e cálcio. Legenda: Glu: glutamato; Gly: glicina; Ca: cálcio; Na: sódio Zn: zinco; Mg: Magnésio; K: potássio. ADAPTADO DE KRITIS et al., 2015.

Dentre os receptores glutamérgicos acima descritos, a presença dos receptores NMDA está descrita em toda a extensão rostrocaudal da

coluna dorsolateral da MCP (ALBIN et al., 1990). O envolvimento do receptor do tipo NMDA na MCPdl está descrito não apenas na mediação das reações defensivas no aspecto comportamental e fisiológico (BITTENCOURT et al., 2004; BERTOGLIO; ZANGROSSI, 2006), mas também na plasticidade sináptica e formação de memórias aversivas (ADAMEC, 2001; BLUNDELL; ADAMEC, 2006).

A estimulação química da MCPdl através da administração de glutamato ou agonistas seletivos dos receptores NMDA evoca respostas comportamentais incondicionadas, como reações de escape, fuga, imobilidade e alterações autonômicas, como a elevação da pressão arterial e da frequência cardíaca, sudorese e piloereção (KRIEGER; GRAEFF, 1985; BANDLER; CARRIVE, 1988; CAROBREZ; TEIXEIRA; GRAEFF, 2001; BITTENCOURT et al., 2004; FERREIRA-NETTO; BORELLI; BRANDÃO, 2005).

Neste sentido, Kincheski e colaboradores (2012) demonstraram que a administração de agonista glutamatérgico NMDA na MCPdl induz um estado aversivo que pode ser utilizado como um estímulo incondicionado biologicamente relevante, capaz de promover um condicionamento aversivo olfatório.

### **1.3 Resposta ao estresse**

A habilidade de um organismo manter o ambiente interno dentro de limites que o permitam a sobrevivência está relacionada às condições de equilíbrio metabólico dinâmico conhecido como homeostase (MCEWEN, 2010). Esse conceito também faz referência aos processos de auto-regulação que fazem com que os sistemas de resposta retornem a um ponto de ajuste dentro de um intervalo de tempo, de acordo com a demanda de operação (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005). A alteração desse equilíbrio pode ocorrer em função de eventos “estressantes” internos ou externos, físicos ou psicológicos, que interfiram com a habilidade de um indivíduo se adaptar à situação.

O termo “estresse” costuma ser utilizado tanto para designar uma causa ou estímulo desencadeante de uma reação - mais propriamente denominado estressor - quanto para descrever seu efeito - a resposta ao estresse - o que conduz a uma relação cíclica entre as situações. (KOOLHAAS et al., 2011; MURISON, 2016).

De qualquer forma, a resposta ao estresse contribui alocando recursos energéticos e iniciando processos biológicos e comportamentais que servem para minimizar os custos ao organismo. Contudo, não ocorre apenas em resposta aos estímulos e eventos interpretados como negativos (predadores ou ameaças, por exemplo), mas também em resposta ao que normalmente seria considerado como um evento positivo, que no entanto, exige a mobilização de energia como, por exemplo, comportamentos sexuais (LEUNER; GLASPER; GOULD, 2010; KOOLHAAS et al., 2011).

O conceito de estresse tem sido extensivamente debatido no meio científico, compreendendo desde as definições iniciais propostas por Selye (1936) e Cannon (1945) até as mais refinadas, que costumam enfatizar a ambiguidade e circularidade da definição de estresse em termos de uma ameaça à homeostase em geral (LEVINE; URSIN, 1991; MCEWEN, 1998; PACAK; PALKOVITS, 2001; LEVINE, 2005; ROMERO; DICKENS; CYR, 2009).

Neste trabalho, abordaremos o estresse como sendo um conceito multidimensional, constituído essencialmente por três componentes: a entrada de um estímulo, um processo avaliativo e a elaboração de uma resposta (KOLLACK-WALKER; DAY; AKIL, 2010). A entrada do estímulo aversivo, ou estressor, faz referência a um evento que desencadeia uma resposta não seletiva (endócrina, comportamental, autonômica) que atinge diversos tecidos e órgãos em resposta ou em antecipação a uma ameaça à homeostase. A relação entre a entrada de um estímulo e a elaboração de uma resposta pressupõe a participação de um processo avaliativo de um evento sinalizado como estressante. Além do processamento de informações específicas dos estímulos, como intensidade ou frequência de ocorrência, esse processo avaliativo também inclui a comparação entre a situação presente e experiências prévias, sendo fundamental na determinação da habilidade do organismo de lidar com o estressor. Já a elaboração da resposta, ou a resposta ao estresse, diz respeito as adaptações do organismo necessárias para reestabelecer o equilíbrio, seja fisiológico ou psicológico (KOLLACK-WALKER; DAY; AKIL, 2010).

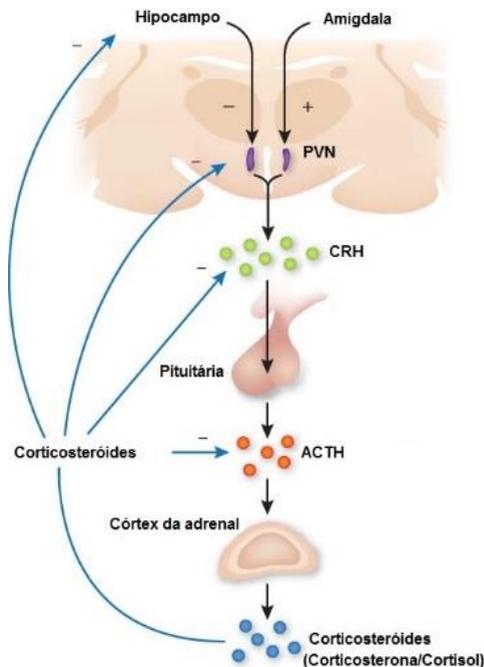
A adaptação às mudanças ambientais ou a resposta ao estresse envolve a mobilização dos sistemas autonômico, neuroendócrino e imune, que desencadeiam suas ações através dos neuroefetores, como os neurotransmissores, neuro-hormônios e hormônios (MCEWEN, 2010). Do ponto de vista fisiológico, as catecolaminas do sistema nervoso

simpático e os corticosteroides do córtex das glândulas adrenais dão início aos eventos celulares que vão promover as mudanças adaptativas no organismo, visando manter a homeostase e promover a sobrevivência do organismo, repercutindo também sobre a estratégia comportamental frente à ameaça (RODRIGUES; LEDOUX; SAPOLSKY, 2009; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

### *1.3.1 Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal*

Os corticosteroides são secretados fisiologicamente ou após uma situação aversiva pelo eixo hipotálamo pituitária adrenal (HPA) para então exercerem suas funções periféricas e centrais (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; JOËLS et al., 2009).

O funcionamento desse eixo depende do hormônio de liberação de corticotrofina (CRH) cujos corpos celulares dos neurônios que o secretam se encontram principalmente no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), o qual recebe numerosas conexões do sistema límbico. O CRH é secretado no sistema porta-hipofisário e transportado até a hipófise anterior, onde induz a secreção de corticotrofina (ACTH). Este hormônio é finalmente liberado na circulação sistêmica e estimula o córtex da adrenal a secretar hormônios esteroidais, dentre eles, os corticosteroides (ou glicocorticoides), predominantemente corticosterona em roedores e cortisol em humanos (JOËLS; BARAM, 2009), conforme representado na Figura 2.



**Figura 2: Representação dos mecanismos envolvidos no funcionamento do Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal com as estruturas que compõem esse sistema, hormônios envolvidos e os pontos de controle do eixo.** Legenda: PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; CRH: hormônio liberador de corticotrofinas; ACTH: hormônio adrenocorticotrófico. ADAPTADO DE HYMAN et al., 2009.

A liberação dos corticosteróides está sujeita a regulação por um sistema de retroalimentação negativo, que compreende uma via rápida e outra lenta. De modo geral, a secreção de CRH e ACTH é inibida por níveis elevados de corticosteróides e estimulada por baixos níveis deste hormônio (DE KLOET et al., 1998).

Em condições fisiológicas, a ativação do eixo HPA segue o ritmo circadiano, importante para o controle e manutenção de diversas funções, sendo a liberação dos corticosteróides uma das vias responsável por transmitir a informação rítmica para o todo o organismo. Dessa forma, o eixo HPA não apresenta um estado estático no organismo e além de ser ativado em situações aversivas, tem sua ação regulada de forma contínua e dinâmica pela liberação rítmica de corticosteróides. Tipicamente esse padrão de secreção dos corticosteróides apresenta uma periodicidade de 60 min (YOUNG; ABELSON; LIGHTMAN, 2004; SARABDJITSINGH et al., 2016).

Em situações de estresse, observações clínicas e experimentais apontam para a ocorrência de alterações neuroendócrinas (SCHULKIN; MORGAN; ROSEN, 2005; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Esses eventos podem ativar o eixo HPA além do ritmo circadiano, aumentando a liberação de hormônios corticosteroides. Os níveis plasmáticos de corticosteroides podem atingir uma concentração cerca de 10 vezes acima dos níveis máximos circadianos, entre 15-30 min após o evento estressor e retornando aos níveis basais cerca de 1-3 h após (para revisão, ver DE KLOET, 2014).

### *1.3.2 Receptores Corticosteroides*

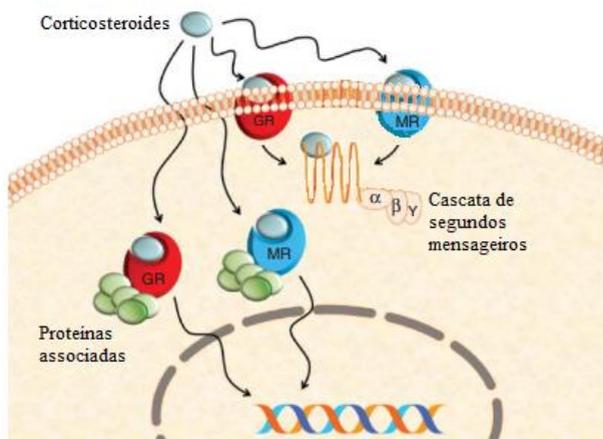
Ao cruzar a barreira hematoencefálica, os corticosteroides exercem suas ações centrais nas células que expressam um ou os dois tipos de receptores: os receptores mineralocorticóides (MR) e os glicocorticóides (GR) (REUL; DE KLOET, 1985). O nome desses receptores tem origem nos principais processos periféricos nos quais estão envolvidos: manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico (mineral) no corpo, principalmente nos rins, e gliconeogênese no fígado, MR e GR respectivamente.

Em condições basais, os receptores MR permanecem parcialmente ocupados, o que sugere uma participação destes nos processos contínuos de avaliação e atenção. Já os receptores GR parecem dar continuidade a estas respostas, armazenando memórias e facilitando a recuperação. Desta forma, os dois sistemas de receptores parecem formar uma rede de sinalização interativa que participa dos processos adaptativos (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; JOËLS et al., 2008; DE KLOET, 2014; SOUZA et al., 2014). Os receptores MR e GR apresentam diferentes afinidades pelos corticosteroides endógenos, de modo que variações nas suas concentrações no encéfalo resultam em mudanças no equilíbrio da atividade entre esses receptores. O receptor MR possui uma elevada afinidade para aldosterona, corticosterona e cortisol, enquanto a afinidade do GR para corticosterona e cortisol é aproximadamente 10 vezes inferior e ainda menor para a aldosterona (REUL; DE KLOET, 1985). Desse modo, sugere-se que a ativação dos GR é iniciada quando os MR já estão substancialmente ocupados pelos corticosteroides circulantes (DE KLOET, 2014).

Os receptores MR e GR são expressos tanto em neurônios como em células gliais, mas a distribuição no cérebro não segue um padrão

uniforme. Os receptores MR são densamente expressos em neurônios da formação hipocampal e do septo lateral e moderadamente expressos em subnúcleos do complexo amigdalóide, no PVN, no *locus coeruleus* e no córtex pré-frontal. Os receptores GR, por sua vez, são expressos em todo o cérebro, mas estão em maior densidade no hipocampo, no septo lateral e PVN (JOËLS; BARAM, 2009).

Inicialmente, estes receptores foram descritos como pertencentes apenas à família de receptores nucleares que, quando ativados, exercem os seus efeitos como fatores de transcrição no núcleo celular alterando a síntese de RNA mensageiro e de proteínas de genes específicos (MCEWEN et al., 1979). Dessa forma, os efeitos dos corticosteroides sobre a função neuronal seriam lentos e exigiriam um intervalo de tempo de pelo menos 15 min, por vezes horas, após o início da situação de estresse, podendo se estender por horas a dias. No entanto, trabalhos desenvolvidos ao longo das últimas décadas descrevem que os corticosteroides também podem alterar rapidamente a atividade neural num domínio de tempo que não corresponde as vias que envolvem a transcrição e tradução proteica (JOËLS; BARAM, 2009; GROENEWEG et al., 2011; JOELS; SARABDJITSINGH; KARST, 2012). Assim, os corticosteróides exercem também efeitos rápidos, agindo em receptores localizados na membrana celular, e não apenas nos receptores nucleares. A Figura 3 apresenta uma representação esquemática da localização dos receptores corticosteroides.



**Figura 3: Receptores Corticosteroides.** Os receptores mineralocorticoides (MR) e os receptores glicocorticoides (GR) são primariamente descritos como localizados no citoplasma e associados a proteínas, sendo classificados como pertencentes a família de receptores nucleares que quando ativados, exercem os seus efeitos como fatores de transcrição no núcleo celular. Os receptores MR e GR podem ainda estar associados a membrana celular e, quando ativados, exercem efeitos rápidos através de uma cascata de segundos mensageiros envolvendo proteína G. ADAPTADO DE TASKER; JOËLS, 2015.

A expressão de MR e GR em sítios extra nucleares da amígdala lateral, incluindo terminais pré-sinápticos, dendritos neuronais e espinhos dendríticos, foi relatada em estudos de microscopia eletrônica (JOHNSON et al., 2005; PRAGER; JOHNSON, 2009; PRAGER et al., 2010). A ocorrência de efeitos rápidos mediados tanto por MR quanto por GR sobre a excitabilidade neuronal foi observada no conjunto basolateral do complexo amigdalóide (KARST et al., 2010) no hipotálamo (EVANSON et al., 2010) e hipocampo (KARST et al., 2005; DOREY et al., 2011), além de influenciar a neurotransmissão e vias de sinalização no córtex pré-frontal (TRECCANI et al., 2014).

Os mecanismos moleculares pelos quais esses receptores interagem ou se deslocam para a membrana plasmática ainda não foram elucidados. Contudo, a existência desse fenômeno possibilita uma maior janela temporal de ação na qual esses hormônios podem alterar a atividade neural. De fato, sua influência se estende desde os minutos iniciais da resposta de estresse até horas mais tarde (JOËLS; BARAM, 2009; JOËLS; SARABDJITSINGH; KARST, 2012).

Neste contexto, trabalhos que investigam a manipulação farmacológica e os efeitos do estresse sobre receptores corticosteroides, fornecem evidências de que estes desempenham um papel importante sobre as respostas incondicionadas (MCEOWN; TREIT, 2011) e também na aquisição, consolidação e acessibilidade de memórias, de acordo com um padrão temporal, do balanço da atividade destes receptores e das estruturas nas quais estes receptores estariam localizados (ROOZENDAAL, 2002, 2012; SCHWABE et al., 2012; HARRIS et al., 2013; DE KLOET, 2014; SOUZA et al., 2014).

Ao receptor MR, de especial interesse, são atribuídos os processos avaliativos iniciais da situação aversiva, no entanto seu papel sobre as diferentes fases de uma memória, como na aquisição e consolidação, também tem sido descrito na literatura, tanto em animais de laboratório quanto em humanos (OITZL; DE KLOET, 1992; OITZL; FLUTTERT; DE KLOET, 1994; SANDI; ROSE, 1994; JOËLS et al., 2008; VOGEL et al., 2015).

Além disso, animais nocaute para o MR ou o bloqueio do receptor MR por antagonistas específicos, mostraram um prejuízo na avaliação e na estratégia comportamental durante uma tarefa de aprendizagem (OITZL; DE KLOET, 1992; OITZL; FLUTTERT; DE KLOET, 1994; BERGER et al., 2006; TER HORST et al., 2014). Mais recentemente, a importância do MR no processamento de informações tem sido reforçada por estudos onde a superexpressão do MR aumenta a retenção de memórias e reforça memórias já consolidadas (HARRIS et al., 2013; KANATSOU et al., 2016).

Dessa forma, estes achados apoiam a ideia de que a ativação ou o bloqueio dos receptores MR podem influenciar o estado de alerta, a aquisição de informações em situações potencialmente ameaçadoras e em última instância a expressão de comportamentos defensivos (JOËLS; BARAM, 2009; JOELS; SARABDJITSINGH; KARST, 2012).

Nesse sentido, em um trabalho anterior do nosso grupo, Souza e colaboradores (2014), demonstraram que a manipulação farmacológica do receptor MR pode afetar a estratégia comportamental e o armazenamento da informação num CAO que utilizou o choque nas patas como EI.

Assim, o presente trabalho, procurou investigar se num paradigma de CAO que utiliza a injeção de agonista glutamatérgico na MCPdl como EI, em associação ao proposto pelo trabalho anteriormente referido de

Kincheski e colaboradores (2012), a manipulação do receptor MR também poderia repercutir sobre o processamento emocional e a formação de uma memória aversiva. Além disso, em adição aos trabalhos anteriores, foram analisadas as respostas defensivas frente a estimulação da MCPdl durante a sessão de condicionamento e não apenas na sessão de teste.

Para tanto, foram delineados um conjunto de experimentos para testar as hipóteses de que (i) a ativação ou o bloqueio do receptor MR modula a aquisição e a consolidação de um CAO estabelecido pela estimulação química da MCPdl, e que (ii) esse efeito é dependente do tempo da manipulação farmacológica do receptor MR tanto sobre a expressão das respostas defensivas incondicionadas frente a estimulação da MCPdl e quanto à formação da memória do CAO.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da manipulação farmacológica do receptor mineralocorticoide (MR) sobre as etapas de aquisição e consolidação do Condicionamento Aversivo Olfatório (CAO) promovido pela estimulação química da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral com agonista glutamatérgico, caracterizando algumas propriedades temporais da ativação ou bloqueio dos receptores MR.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Padronizar o CAO utilizando a injeção de NMDA na MCPdl como EI
- Investigar os efeitos da administração de um antagonista MR antes da sessão de aquisição do CAO;
- Avaliar os efeitos da administração aguda de um antagonista MR imediatamente após a aquisição do CAO;
- Investigar os efeitos da administração aguda de um agonista MR imediatamente após a sessão de aquisição de um CAO não efetivo;
- Avaliar os efeitos da administração de agonista MR antes da sessão de aquisição do CAO.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, com 3 a 4 meses de idade, pesando entre 270 e 350 g. Os animais foram alocados em caixas de acrílico brancas (50 x 30 x 15 cm) com serragem, em um número máximo de 4 animais por caixa. Durante a permanência no biotério, os animais foram mantidos em ciclo de luz claro escuro de 12 h (início da fase clara as 7:00 h) e temperatura constante de  $22\pm 1$  °C e fluxo de ar constante mantido por exaustores, com acesso livre a água e comida. Todos os animais foram considerados inexperientes do ponto de vista experimental até o início dos testes. O trabalho foi realizado mediante aprovação pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo nº CEUA: PP00849/2013). Foram respeitadas as normas nacionais da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos - DBCA (CONCEA, 2015).

#### 3.2 Drogas, fármacos e diluições

Para a realização dos experimentos, as seguintes drogas foram utilizadas:

- Agonista do receptor glutamatérgico subtipo NMDA N-metil-D-aspartato (NMDA); (Sigma-Aldrich®, USA; 25, 50 e 100 pmol)
- Agonista do receptor mineralocorticoide Fludrocortisona (FLU); (Sigma-Aldrich®, USA; 0,3 e 1 mg/kg)
- Antagonista do receptor mineralocorticoide Espironolactona (SPI); (Tocris®, USA; 5 e 10 mg/kg)

O NMDA foi dissolvido em solução de 0,1 M de salina tampão fosfato (*phosphate-buffered saline*, PBS; pH 7,4). As doses de NMDA utilizadas foram baseadas em dados preliminares e trabalhos anteriores do laboratório (KINCHESKI et al., 2012) e foram injetadas intra-MCPdl. FLU e SPI foram administradas sistemicamente pela via intraperitoneal (i.p.) e dissolvidas em veículo composto de solução salina (NaCl 0,9%) adicionada de 2% de solvente (Tween 80), o qual também serviu como

padrão experimental (controle). As doses utilizadas foram escolhidas de acordo com dados prévios da literatura (OITZL e DE KLOET,1992; TAUBENFELD, RICEBERG et al., 2009; NINOMIYA et al., 2010, SOUZA et al., 2014) e com estudos piloto desenvolvidos em nosso laboratório. Todas as soluções foram administradas por via intraperitoneal em fração de 1 ml/kg.

### 3.3 Estímulo Olfatório

Como estímulo olfatório, uma solução contendo acetato de amila – IUPAC etanoato de pentila - (*amylacetate*, 99% AldrichChemicalCo., Inc., USA) a 5% diluída em propilenoglicol (mínimo 99,5% LABSYNTH® Produtos para Laboratórios Ltda., Brasil) foi empregada como odor neutro, ou seja, o estímulo condicionado (EC). A utilização desse odor tem vantagens como a sensibilidade dos roedores a este e alta volatilidade, o que permite a sua rápida eliminação do ambiente (CAHILL E MCGAUGH, 1990; PASCHALL E DAVIS, 2002; KILPATRICK E CAHILL, 2003). O odor foi depositado sob um papel de filtro num volume de 100 µl e acomodado em cada um dos aparatos experimentais conforme descrição.

### 3.4 Cirurgia Estereotáxica

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma solução de cloridrato de cetamina (100 mg/ml/kg; Cetamin®; Syntec, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/ml/kg; Xilanzin®; Syntec, Brasil) e, após a perda total dos reflexos e a tricotomia da região craniana, foram fixados em aparelho estereotáxico para ratos (Stoelting, EUA). Após assepsia da região craniana com uma solução de álcool iodado (2%), uma injeção subcutânea (s.c.) de uma solução de lidocaína 3 % com adrenalina 1:50.000 (Lidostesim®, Dentsply Ind. Com. Ltda, Brasil) foi aplicada visando promover anestesia local e minimizar o sangramento. Em seguida, foi realizada uma incisão longitudinal para a exposição da calota craniana e remoção do periósteo por raspagem, com intuito de visualizar as suturas lambdóide e coronal. Dois parafusos de aço inoxidável foram fixados no crânio, e então foi realizada a implantação unilateral da cânulaguia (confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas de 22 G1 e 25,0 x 7,0 mm, ajustadas para um comprimento de 13,0 mm) de acordo com as coordenadas do atlas estereotáxico para ratos (PAXINOS; WATSON,

2009) direcionada para a região dorsolateral da matéria cinzenta periaquedutal. As coordenadas empregadas para a canulação foram: ântero-posterior (AP): -5,8 mm; Médio-lateral (ML): +4,0 mm e Dorso-ventral (DV): -2,0 mm, em ângulo de 22°. Com o intuito de ancorar as peças fixadas e proteger a área exposta do crânio do animal, foi utilizadoacrílico odontológico autopolimerizável para a confecção de uma prótese sólida. Em cada uma das cânulas-guia, ainda, foi inserido um fio de aço inoxidável (mandril, nº 28, 0,30 mm) para evitar possíveis obstruções. Após a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram retirados do aparelho estereotáxico e mantidos em ambiente aquecido para evitar hipotermia causada pela anestesia. Uma injeção s.c. de solução antipirética, analgésica e antiinflamatória de flunixinameglumina (2,5 mg/kg; Banamine®; Schering-Plough, Brasil) e de uma solução antibiótica de benzilpenicilina e estreptomicina (Pentabiótico®, Fort Dodge, Brasil) por via intramuscular (i.m.) (10 mg/kg; 0,2 ml) foram aplicadas ao término do processo cirúrgico. Um período entre 7 e 10 dias foi reservado para a recuperação dos animais, sem a realização de nenhum procedimento experimental.

### **3.5 Infusão Intracerebral**

Para a infusão de drogas diretamente na MCPdl, agulhas medindo 15,1 mm (confeccionadas a partir de agulhas gengivais de 27 G) foram conectadas a um tubo de polietileno (PE10; Clay Adams, EUA) acoplado a uma microseringa (Hamilton, EUA) de 5 µl. O tubo de polietileno foi preenchido com água destilada, deixando uma bolha de ar interposta à solução a ser injetada, permitindo a visualização do deslocamento da solução durante a infusão da droga. No momento da infusão, o animal foi gentilmente imobilizado com o auxílio de uma flanela, o fio de aço removido com auxílio de um alicate e a cânula desobstruída com uma lima odontológica (K-FILE Colorinox® A012D, Dentsply Ind. Com. Ltda., Brasil) de 15,0 mm. A agulha foi introduzida na cânula-guia e, com auxílio de uma bomba de infusão (Insight®, Brasil), cada animal recebeu 0,2 µl da solução de NMDA, infundidos em uma taxa de infusão de 0,6 µl/min, durante 20 s.

### **3.6 Coleta das amostras de sangue e determinação dos níveis séricos de corticosterona**

As concentrações de corticosterona foram determinadas em amostras de sangue após a sessão de condicionamento com as diferentes doses de NMDA injetadas na MCPdl. Imediatamente após os experimentos, os animais foram transportados para uma sala adjacente e alojados em caixas onde os respectivos animais haviam sido previamente habituados, permanecendo sem serem perturbados até o momento da coleta, estabelecido em 30 min após a sessão de condicionamento. Para o procedimento de coleta, os animais foram transportados individualmente para outra sala onde foram submetidos à decapitação, com auxílio de uma guilhotina. Um volume de 2 ml de sangue foi coletado, armazenado em eppendorf e encaminhado para posterior análise dos níveis séricos de corticosterona. As análises foram realizadas através do método de eletroquimioluminescência pelo Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias – Petlabor® (Florianópolis/SC, Brasil).

### **3.7 Aparatos experimentais**

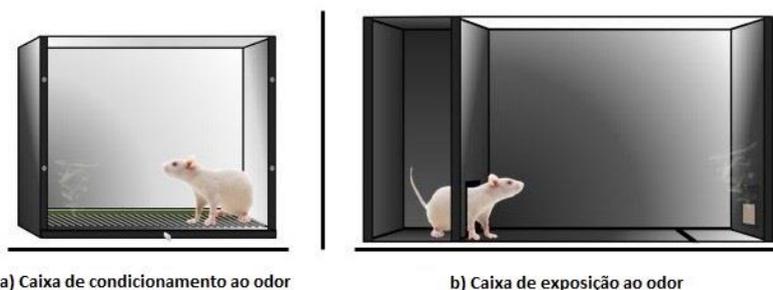
#### *3.7.1 Caixa de Condicionamento ao Odor*

O pareamento entre os estímulos condicionado (EC) e incondicionado (EI) foi realizado em uma Caixa de Condicionamento (Insight® Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) de dimensões 23 x 23 x 24cm, com paredes laterais de alumínio, parede frontal e tampa de acrílico transparente e assoalho gradeado (barras de aço inoxidável de 3 mm espaçadas a cada 1 cm). Um compartimento em forma de gaveta abaixo do piso gradeado serviu para acomodar o estímulo olfatório, quando este se fazia presente (Figura 4a).

#### *3.7.2 Caixa de Exposição ao Odor*

Para a avaliação das respostas defensivas dos animais, de forma que estas fossem apenas as respostas ligadas à memória evocada pela pista olfatória, sem influências contextuais da caixa de condicionamento, foi utilizada uma Caixa de Exposição ao Odor. Este aparato, construído em acrílico preto e uma das laterais em acrílico transparente, permitiu a observação comportamental. Em suas dimensões, o aparato era

constituído de uma área aberta (40 x 26 x 36 cm) intermediada por uma entrada (6 x 6 cm) a um compartimento fechado (20 x 26 x 36 cm), de forma que fosse possível aos animais transitar por ambos os espaços. Na parede oposta à entrada do compartimento fechado, uma pequena caixa de acrílico (5 x 5 x 1 cm) com vários furos fixada ao aparato permitiu acomodar um papel de filtro (4 x 4 cm) impregnado ou não pelo estímulo olfatório. O perímetro de aproximação era caracterizado por uma faixa preta, demarcada no assoalho da caixa à 7 cm da fonte de odor (Figura 4b).



**Figura 4: Esquema representativo dos aparatos experimentais utilizados.** Na figura, a caixa de condicionamento ao odor (a) e a caixa de exposição ao odor (b). Adaptado de Souza, 2009.

### 3.8 Protocolo Experimental

Os procedimentos experimentais com o modelo de Condicionamento Aversivo Olfatório (CAO) foram realizados com base em estudos previamente desenvolvidos em nosso laboratório (KROON e CAROBREZ, 2009; KINCHESKI, et al., 2012). O delineamento experimental consistiu de quatro sessões, intercaladas 24 h entre si, utilizando dois aparatos previamente descritos: uma caixa de condicionamento ao odor e uma caixa de exposição ao odor. Antes do início das sessões experimentais do CAO, os animais foram habituados em uma sala adjacente às salas de experimento, por no mínimo 30 min.

Os animais foram expostos à caixa de condicionamento ao odor, durante dois dias, nas sessões denominadas familiarização e condicionamento, Dia 1 e Dia 2 respectivamente. Na sessão de familiarização (Dia 1) os animais exploraram livremente a caixa durante

5 min, com o intuito de se obter o nível basal das respostas comportamentais. No dia seguinte, na sessão designada condicionamento (Dia 2), os animais foram reexpostos à caixa após a administração do tratamento na MCPdl (EI, estímulo incondicionado), desta vez com a presença do estímulo olfatório neutro (EN, acetato de amila 5%) localizado abaixo do piso gradeado sob um papel de filtro, por 10 min.

No dia seguinte ao condicionamento (Dia 2) os animais foram expostos à caixa de exposição ao odor para a livre exploração por 5 min, numa sessão denominada familiarização à caixa de exposição ao odor (Dia 3), para que fossem obtidos os níveis basais das respostas comportamentais defensivas na ausência do EC (estímulo condicionado). Os animais foram colocados na caixa de exposição ao odor pelo compartimento aberto junto à parede divisória, voltados com a cabeça para o suporte que acomodaria o odor. No dia subsequente, os animais foram novamente colocados na caixa de exposição ao odor por um período de 10 min para a sessão de teste (Dia 4), onde na presença da pista olfatória, ou seja, na presença do papel de filtro contendo o acetato de amila, os parâmetros comportamentais foram quantificados.

Durante todos os dias de experimentação os aparatos utilizados foram limpos com solução de etanol 10 % e secos com papel toalha entre a exposição de cada animal, e com álcool 70 % antes e após cada sessão. Os experimentos foram realizados num ambiente com som atenuado, temperatura controlada ( $22 \pm 1$  °C) e intensidade de luz definida como 80 lux para os dias 1 e 2 na caixa de condicionamento ao odor, enquanto que nos dias 3 e 4 na caixa de exposição ao odor a luminosidade era atenuada para 4 lux. Um exaustor posicionado logo acima dos aparatos garantia a circulação do ar, impedindo que o odor volátil ficasse acumulado no ambiente entre as sessões com odor.

Ao fim de cada sessão experimental, os animais eram alocados em caixa moradia com serragem limpa, em sala adjacente aos animais que seriam ainda sujeitos à experimentação. No final do experimento todos os animais eram recolocados em suas caixas-moradia originais e transportados ao biotério.

Os experimentos foram registrados através de um sistema de vídeo-câmera, permitindo desta forma mensurar os comportamentos exibidos durante as diferentes sessões. Os dados comportamentais da sessão de condicionamento foram registrados com auxílio do *software* Anymaze® (Wood Dale, U.S.A., Stoelting Co.) e quantificados

manualmente. Para a sessão de teste, os comportamentos expressos foram quantificados manualmente com auxílio de um cronômetro.

### 3.8.1 *Parâmetros Comportamentais*

Os parâmetros comportamentais avaliados nas diferentes sessões experimentais compreenderam:

Sessão de condicionamento ou aquisição (Dia 1), na caixa de condicionamento ao odor:

- Comportamentos defensivos (%): comportamento de imobilidade, caracterizado pela ausência total de movimentos no corpo, exceto a movimentação do tórax no processo respiratório e o comportamento de agachar - cheirar, postura investigativa que o animal assume ficando em posição agachada com o dorso curvado (*crouching*), acompanhado de qualquer movimento de cabeça, à procura de novas informações do ambiente;

- Comportamentos exploratórios (%): comportamento de investigação horizontal e o comportamento de investigação vertical, que corresponde à postura de sustentação apenas nas duas patas traseiras e com as patas dianteiras sem tocar o chão, como forma de investigação na caixa de condicionamento ao odor.

No Teste (Dia 4), na caixa de exposição ao odor os seguintes parâmetros foram quantificados:

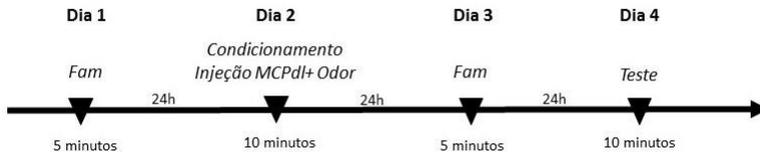
- Tempo escondido (%): tempo em que o animal permanece com as 4 patas no compartimento fechado da caixa de odor, em relação ao tempo total de teste;

- Tempo de aproximação (%): tempo em que o animal permanece com pelo menos a cabeça ou uma das patas no perímetro próximo a fonte de odor, demarcado no assoalho da caixa, em relação ao tempo total de teste;

- Tempo de *head - out* (%): tempo em que a animal permanece no compartimento fechado da caixa e com a cabeça e/ou as patas dianteiras no compartimento aberto direcionada à fonte de odor, em relação ao tempo em que o animal permanece no compartimento fechado.

### 3.8.2 *Experimento 1: Avaliação da resposta defensiva exibida após a injeção de NMDA como EI na MCPdl durante a sessão de condicionamento e sessão de teste*

Com o intuito de padronizar uma curva dose resposta do comportamento exibido por ratos após a injeção de NMDA na MCPdl e na exposição ao EC na sessão de teste do protocolo experimental (Dia 4), os animais foram separados em quatro grupos experimentais de acordo com o tratamento: veículo (VE), NMDA25pmol (NMDA25), NMDA50pmol (NMDA50) e NMDA100pmol (NMDA100). Após serem familiarizados (5 min) na Caixa de Condicionamento ao Odor na ausência de odor, os animais foram condicionados 24h após com a injeção na MCPdl de veículo, NMDA 25 pmol, NMDA50 pmol e NMDA100 pmol, na presença de odor, durante 10 min. No terceiro dia, todos os grupos foram familiarizados (5 min) na Caixa de Exposição ao Odor na ausência de estímulo olfatório. Vinte e quatro horas após, os animais foram expostos ao estímulo olfatório por 10 min na sessão de Teste.

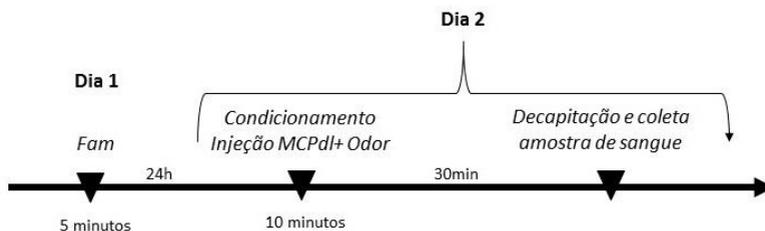


**Figura 5: Representação esquemática do protocolo do condicionamento aversivo olfatório durante os 4 dias de experimento.** Legenda: Fam –sessão de familiarização na caixa de condicionamento; MCPdl – matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral.

### 3.8.3 *Experimento 2: Avaliação dos níveis séricos de corticosterona 30 minutos após a sessão de condicionamento com diferentes doses de NMDA infundidos na MCPdl*

Para investigar o impacto dos diferentes protocolos de condicionamento utilizando a injeção de NMDA intra-MCPdl sobre o eixo HPA, este experimento foi delineado para verificar a influência do condicionamento sobre os níveis séricos de corticosterona. No dia 1, os animais foram familiarizados na caixa de condicionamento ao odor. No segundo dia, imediatamente após a sessão de condicionamento com a injeção de diferentes doses de NMDA na MCPdl, grupos independentes de animais (n=5-7) foram transportados para uma sala adjacente e

alojados em caixas onde haviam sido previamente habituados, onde permaneceram sem serem perturbados até o momento da coleta (30 min após). Os seguintes grupos experimentais foram avaliados: PBS, NMDA25, NMDA50, NMDA100, além dos grupos *home – cage*, escolhido para avaliação do nível basal de corticosterona e do grupo ESTRESSE, submetido ao estresse agudo de contenção. Estes animais, não submetidos a cirurgia ou aos tratamentos, foram colocados em cilindro de plástico PVC não transparente, com dimensões de 20 cm de comprimento e 8 cm de diâmetro, fechado em uma extremidade e encaixado na outra parte formando um tubo, que mantinha os animais contidos durante 60 min sobre superfície plana, longe de ruídos e outros fatores estressantes que pudessem interferir no estudo, constituindo o grupo de controle positivo, classicamente descrito na literatura por liberar corticosterona nesta situação (PACAK e PALKOVITS, 2001) . Os níveis séricos de corticosterona dos grupos foram avaliados conforme descrito anteriormente.



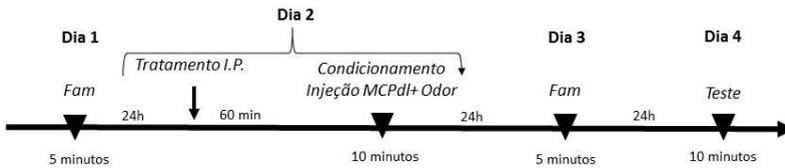
**Figura 6: Representação esquemática do protocolo de CAO para coleta de sangue e dosagem dos níveis séricos de corticosterona.** Coleta: 30 minutos após a sessão de condicionamento. Legenda: Fam – sessão de familiarização na caixa de condicionamento; MCPdl – matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral.

### 3.8.4 Experimento 3: Efeito do bloqueio sistêmico dos receptores MR sobre a aquisição das respostas defensivas exibidas a partir da estimulação da MCPdl

Este experimento foi delineado para avaliar a participação dos receptores mineralocorticoides sobre a aquisição das respostas defensivas exibidas a partir da estimulação da MCPdl.

No primeiro dia, todos os animais foram familiarizados na Caixa de Condicionamento ao Odor na ausência de estímulo olfatório. No dia do Condicionamento (Dia 2), 60 min antes da associação EC+EI (NMDA

na dose de 50 pmol na MCPdl), os animais receberam uma injeção intraperitoneal do antagonista dos receptores MR espirolactona (SPI), nas doses de 5 mg/kg ou 10 mg/kg, ou veículo como controle experimental. No terceiro dia, os animais foram regularmente familiarizados na Caixa de Exposição ao Odor na ausência do estímulo olfatório e 24h após, realizada a sessão de Teste na Caixa de Exposição ao Odor, conforme descrito anteriormente.



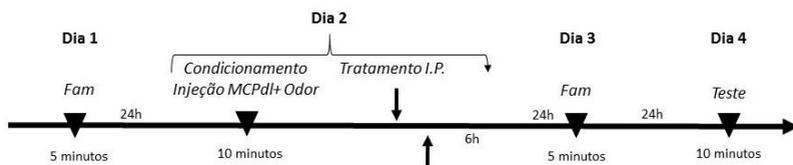
**Figura 7: Representação esquemática do experimento para avaliação dos efeitos do bloqueio sistêmico dos receptores MR sobre a aquisição das respostas defensivas exibidas a partir da estimulação da MCPdl.** Legenda: Fam – sessão de familiarização na caixa de condicionamento; MCPdl – matéria cinzenta periaquedtal; I.P: intraperitoneal.

### 3.8.5 *Experimento 4: Efeito do bloqueio sistêmico dos receptores MR sobre a consolidação das respostas defensivas exibidas a partir da estimulação da MCPdl*

A fim de avaliar a participação dos receptores mineralocorticoides sobre a consolidação das respostas defensivas exibidas a partir da estimulação da MCPdl, a espirolactona foi administrada imediatamente após o condicionamento.

No primeiro dia, todos os animais foram familiarizados na Caixa de Condicionamento ao Odor na ausência de estímulo olfatório. No dia do Condicionamento (Dia 2), os animais receberam a infusão de NMDA 50 pmol na MCPdl e imediatamente após serem retirados da caixa, foram submetidos a administração por via intraperitoneal do antagonista dos receptores MR espirolactona (SPI), nas doses de 5mg/kg ou 10mg/kg, ou veículo, como controle experimental. Para confirmar possíveis efeitos temporais da ativação dos receptores mineralocorticóides, um grupo de animais também foi tratado com espirolactona (SPI, 10mg/kg) 6h após a sessão de condicionamento. No terceiro dia, os animais foram regularmente familiarizados na Caixa de Exposição ao Odor na ausência

do estímulo olfatório e 24h após, realizada a sessão de Teste na Caixa de Exposição ao Odor, conforme descrito anteriormente.

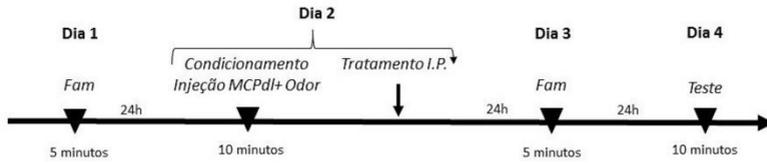


**Figura 8: Representação esquemática do experimento para avaliação dos efeitos do bloqueio sistêmico dos receptores MR sobre a consolidação das respostas defensivas exibidas a partir da estimulação da MCPdl.** Legenda: Fam – sessão de familiarização na caixa de condicionamento; I.P: intraperitoneal

### 3.8.6 Experimento 5: Efeito da administração de fludrocortisona sobre a consolidação de uma resposta defensiva decorrente da estimulação subliminar da MCPdl

Conforme anteriormente descrito, um efeito facilitatório dos corticosteroides sobre a formação de memórias tem sido sugerido. Dessa forma, foi avaliada uma possível ação facilitatória da ativação do receptor mineralocorticoide sobre a consolidação de um traço de memória fraco, através da injeção de fludrocortisona imediatamente após o condicionamento.

No Dia 1 todos os animais foram familiarizados na Caixa de Condicionamento ao Odor. No dia do Condicionamento (Dia 2), os animais foram submetidos injeção de NMDA 25 pmol na MCPdl e imediatamente após serem retirados da caixa, foram administrados por via intraperitoneal com agonista dos receptores MR fludrocortisona (FLU), nas doses de 0,3 mg/kg ou 1 mg/kg, ou veículo, como controle experimental. No terceiro dia, os animais foram regularmente familiarizados na Caixa de Exposição ao Odor na ausência do estímulo olfatório e 24h após, realizada a sessão de Teste na Caixa de Exposição ao Odor, conforme descrito anteriormente.

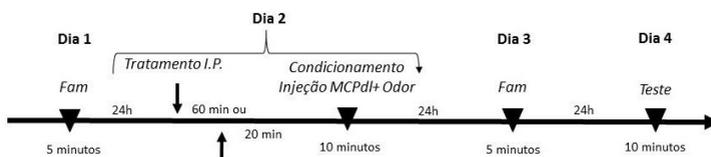


**Figura 9: Representação esquemática do experimento para avaliação dos efeitos da administração sistêmica de fludrocortisona sobre a consolidação de uma resposta defensiva evocada a partir da estimulação subliminar da MCPdl.** Legenda: Fam – sessão de familiarização na caixa de condicionamento; I.P: intraperitoneal.

### 3.8.7 Experimento 6: Efeito da administração sistêmica de fludrocortisona sobre a aquisição das respostas defensivas exibidas a partir da estimulação da MCPdl

O papel temporal da ação dos receptores MR sobre o prejuízo da aquisição de memórias aversivas foi avaliado pela administração do agonista MR fludrocortisona 60 min antes do Condicionamento Aversivo Olfatório.

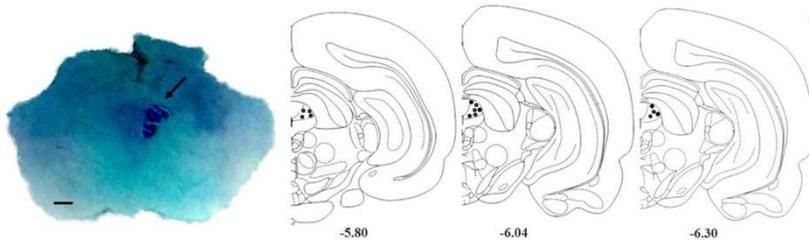
No Dia 1 todos os animais foram familiarizados na Caixa de Condicionamento ao Odor. No dia seguinte, 60 min antes do Condicionamento com NMDA 50 pmol, os animais foram tratados com o agonista mineralocorticoide fludrocortisona (FLU), nas doses de 0,3 ou 1 mg/kg, ou veículo como controle. Para confirmar possíveis efeitos temporais da ativação dos receptores mineralocorticoides, um grupo de animais também foi tratado com fludrocortisona (FLU, 0,3 mg/kg) 20 min antes do condicionamento. No Dia 3, todos os animais foram familiarizados na Caixa de Exposição ao Odor, sem a presença de estímulo olfatório condicionado. No dia seguinte (Dia 4), os animais foram submetidos à sessão de Teste na Caixa de Exposição ao Odor, na presença do estímulo condicionado.



**Figura 10: Representação esquemática do experimento para avaliação dos efeitos da administração sistêmica de fludrocortisona sobre a aquisição das respostas defensivas exibidas a partir da estimulação da MCPdl.** Legenda: Fam – sessão de familiarização na caixa de condicionamento; I.P.: intraperitoneal

### 3.9 Análise Histológica

Ao fim dos procedimentos experimentais, os animais receberam uma injeção com a mesma solução anestésica utilizada para a cirurgia estereotáxica por via i.p. e, quando na ausência total dos reflexos, uma infusão intracerebral de uma solução de azul de Evans (0,2  $\mu$ l). Ainda, após a infusão do corante, foi administrado i.p. aos animais uma sobredose (2,5ml) de uma solução de hidrato de cloral (16%), levando à eutanásia. A seguir, os encéfalos foram removidos e conservados em solução de formalina (10%) até o momento em que foram seccionados em cortes coronais (50  $\mu$ m) utilizando criostato (Leica CM 1850, Alemanha) a uma temperatura aproximada de -22° C, visando identificar o sítio de injeção da droga. Os cortes foram fixados em lâminas de vidro gelatinizadas e em seguida, corados pelo método de Giemsa. O local da injeção foi identificado com auxílio de um estereoscópio e comparação com os diagramas do encéfalo de ratos (PAXINOS, WATSON, 2009). Os animais cujas injeções não atingiram a MCPdl foram excluídos do trabalho.



**Figura 11: Fotomicrografia e diagramas representativos de um corte coronal de encéfalo de ratos na porção rostral da MCPdl (-5,8 a -6,3: distância em mm a partir da bregma), mostrando o sítio de infusão da droga indicado por uma seta e pontos no diagrama. O número de pontos nos diagramas é menor do que o número de ratos injetados.**

### 3.10 Análise estatística

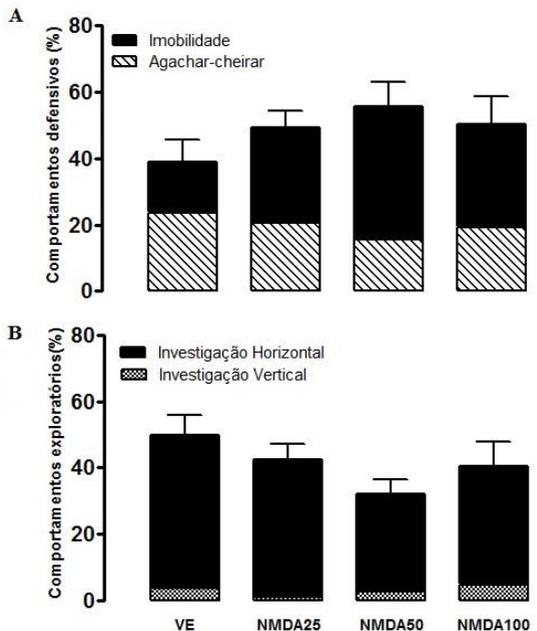
Os parâmetros comportamentais observados no Condicionamento Aversivo Olfatório foram transformados em porcentagem e expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Inicialmente, os dados obtidos pelos diferentes grupos durante as etapas de familiarização nas caixas de condicionamento ao odor e de exposição ao odor foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de uma via. Nos experimentos que não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos durante as etapas de familiarização, os valores obtidos foram agrupados e representados como média  $\pm$  95 % do intervalo de confiança. Após verificar a distribuição normal das amostras e assegurar sua normalidade através do teste de Shapiro-Wilk, os dados obtidos nas sessões de condicionamento e teste foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via. O teste *post-hoc* utilizado foi o de Newman-Keuls, sendo aceito um valor de significância estatística de  $p \leq 0,05$  para determinar as diferenças entre os grupos. Os resultados foram analisados utilizando o *software* Statistica 7® (StatSoft Inc., EUA) e foram representados em gráficos confeccionados com o *software* GraphPad Prism 5® (GraphPad Prism, EUA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EXPERIMENTO 1 – Avaliação da resposta defensiva exibida após a injeção de NMDA como EI na MCPdl durante a sessão de condicionamento e sessão de teste

A Figura 12 ilustra os parâmetros comportamentais avaliados na sessão de Condicionamento (Dia 2) para os comportamentos defensivos e comportamentos exploratórios.

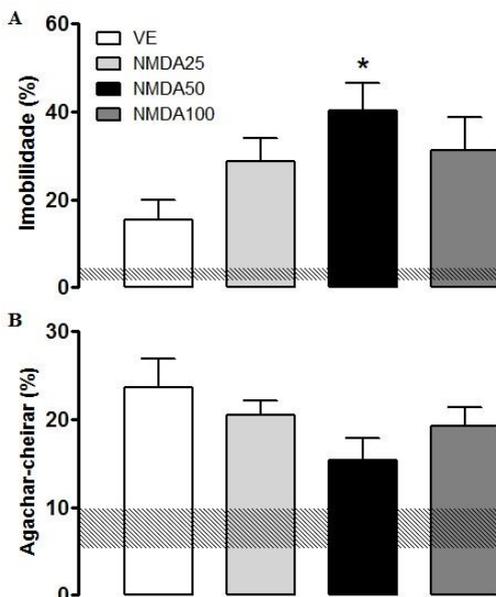
A ANOVA não detectou diferenças significativas no fator tratamento para os comportamentos defensivos ou comportamentos exploratórios entre os animais que receberam VE (n= 8) ou NMDA 25 pmol (n= 8), NMDA 50 pmol (n=8) e NMDA 100 pmol (n= 8) na MCPdl e imediatamente foram submetidos à sessão de Condicionamento, durante 10 min, mesmo quando estes foram analisados minuto a minuto (Apêndice A).



**Figura 12: Efeito da injeção de diferentes doses (pmol) de NMDA na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de condicionamento.** Avaliação das respostas defensivas na sessão de condicionamento através dos (A) comportamentos defensivos (%) e (B) comportamentos exploratórios (%). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de tempo dos comportamentos durante a sessão de condicionamento. Número de animais por grupo: VE= 8, NMDA25= 8, NMDA50= 8 e NMDA100=8.

No entanto, após separar os comportamentos defensivos em imobilidade e comportamento de agachar- cheirar (Figura 13), a ANOVA detectou diferenças no fator tratamento [ $F_{(3, 28)} = 2,91; p = 0,05$ ] para o comportamento de imobilidade, mas não para o comportamento de agachar – cheirar. A análise *post hoc* revelou que os animais tratados com NMDA 50 pmol e imediatamente expostos ao odor durante a sessão de condicionamento, apresentaram maior tempo de imobilidade nesta sessão, quando comparados ao grupo controle VE. Os animais que receberam NMDA nas doses de 25 ou 100 pmol na MCPdl durante a aquisição do CAO não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros analisados, quando comparados ao grupo controle VE. Esta segregação dos comportamentos defensivos foi baseada no fato que de a imobilidade (Figura 13A) foi o comportamento que diferiu entre os tratamentos, sendo significativamente maior no grupo que recebeu

NMDA 50 pmol, ao passo que o comportamento de agachar – cheirar (Figura 13B) não foi diferente entre os tratamentos.



**Figura 13: Comportamentos defensivos durante a sessão de condicionamento com injeção de NMDA50 pmol na MCPdl.** Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de tempo dos comportamentos durante a sessão de condicionamento. As barras hachuradas representam os comportamentos basais avaliados durante a familiarização, com o intervalo de confiança de (95%) superior e inferior. \* indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). Número de animais por grupo: VE= 8, NMDA25= 8, NMDA50= 8 e NMDA100=8.

A Figura 14 ilustra os parâmetros comportamentais avaliados nas sessões de familiarização à caixa de odor (Dia 3) e teste (Dia 4): tempo escondido, tempo de aproximação à fonte de odor e o parâmetro de avaliação de risco (*head-out*).

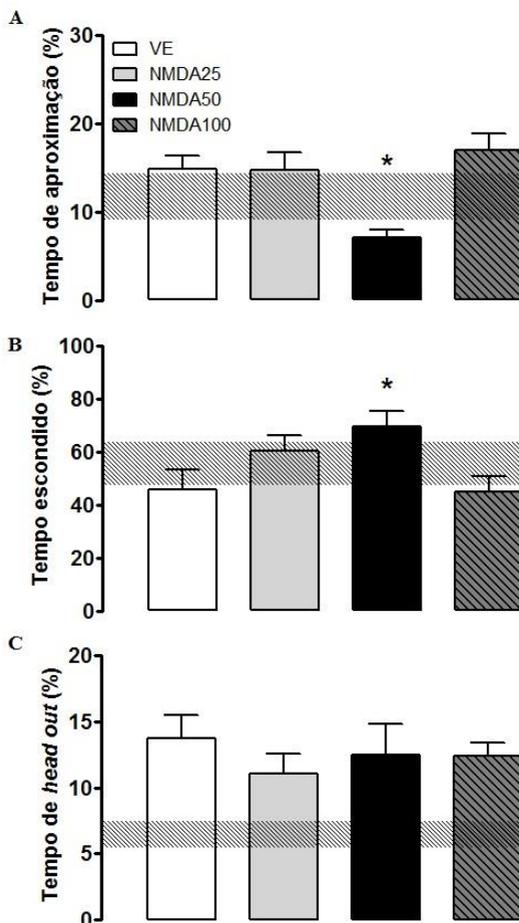
Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos nos parâmetros avaliados na etapa de familiarização à caixa de odor entre os grupos que receberam VE ou NMDA 25 pmol, NMDA 50 pmol e NMDA 100 pmol na MCPdl e foram submetidos à sessão de condicionamento do CAO. Portanto, os resultados dos parâmetros comportamentais, avaliados em todos os grupos, foram agrupados e

representados pelas barras hachuradas horizontais apresentadas nos gráficos, que expressam as médias e os limites de confiança ( $\pm 95\%$ ) da amostra.

Para cada comportamento avaliado na sessão de teste, os valores estão representados em histogramas verticais pela média  $\pm$  erro padrão da média para os diferentes tratamentos.

Na sessão de teste, a ANOVA detectou diferenças significativas no fator tratamento para o tempo de aproximação [ $F_{(3, 28)} = 6,85; p < 0,05$ ] e tempo escondido [ $F_{(3, 28)} = 3,58; p < 0,05$ ], mas não para o tempo de *head-out*.

A análise *post hoc* revelou que apenas os animais tratados com NMDA 50 pmol na MCPdl apresentaram uma redução significativa no tempo de aproximação à fonte de odor (Figura 14A) e um aumento no tempo escondido (Figura 14B) em comparação com os animais tratados com veículo. Não houve alteração no parâmetro de *head-out* para nenhum dos tratamentos utilizados.



**Figura 14: Efeito da injeção de diferentes doses (pmol) de NMDA na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de teste.** Avaliação das respostas defensivas na sessão de teste através dos parâmetros de (A) tempo de aproximação (%), (B) tempo escondido (%) e (C) tempo de head-out (%). As barras hachuradas representam os comportamentos basais avaliados durante a familiarização, com o intervalo de confiança de (95%) superior e inferior. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de tempo dos comportamentos durante a sessão de condicionamento. \* indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). Número de animais por grupo: VE= 8, NMDA25= 8, NMDA50= 8 e NMDA100=8.

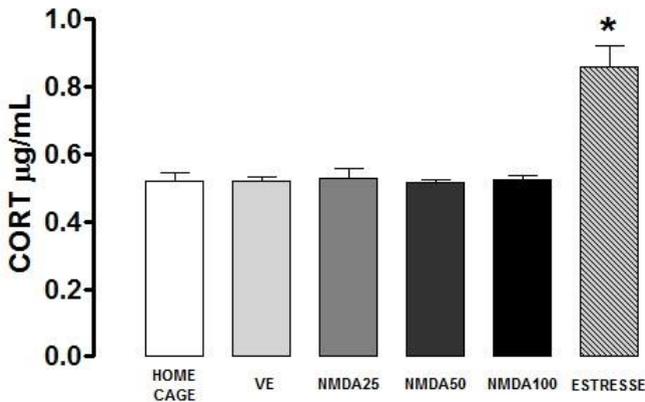
Dessa forma, corroborando com dados prévios estabelecidos pelo nosso laboratório, estes resultados demonstraram que a injeção de NMDA

50 pmol na MCPdl foi capaz de promover um Condicionamento Aversivo Olfatório, quando utilizada como EI.

#### 4.2 Experimento 2 - Avaliação dos níveis séricos de corticosterona 30 minutos após a sessão de condicionamento com a injeção de diferentes doses de NMDA na MCPdl

A Figura 15 ilustra as concentrações séricas de corticosterona dos grupos *home-cage*, ESTRESSE ou dos grupos VE, NMDA 25, 50 e 100 pmol 30 min após os animais serem expostos à caixa de condicionamento na presença de odor. A ANOVA revelou um efeito significativo para o tratamento [ $F_{(5, 35)} = 23,67$ ;  $p < 0,001$ ]. O teste *post hoc* apontou um aumento significativo na corticosterona plasmática apenas para o grupo ESTRESSE quando comparado ao grupo controle *home-cage*.

Em conjunto, os dados sugerem que nesta situação experimental e dentro da janela temporal de avaliação, apenas o estresse agudo de restrição promoveu alteração nos níveis séricos de corticosterona em relação ao grupo controle *home-cage*.



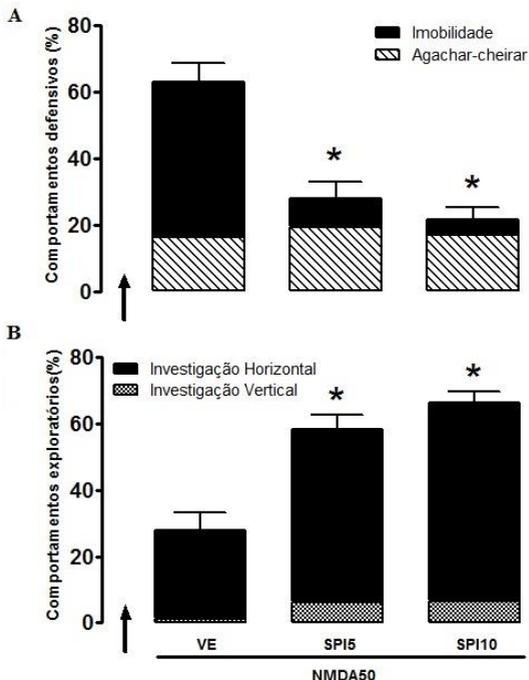
**Figura 15: Dosagem de corticosterona sérica de ratos: grupo home cage; 30 minutos após a injeção de diferentes doses (pmol) de NMDA na MCPdl; 30 minutos após estresse agudo de restrição.** Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM. \* indica uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). Número de animais por grupo: 5-7.

### **4.3 Experimento 3 - Efeito do bloqueio sistêmico dos receptores MR sobre a aquisição das respostas defensivas exibidas a partir da estimulação da MCPdl**

O papel dos receptores mineralocorticoides sobre a aquisição das respostas defensivas exibidas a partir da injeção de NMDA 50 pmol na MCPdl foi inicialmente testado pela administração de espirolactona 60 min antes da sessão de condicionamento.

A Figura 16 ilustra os parâmetros comportamentais (defensivos e exploratórios) avaliados na sessão de condicionamento (Dia 2).

A ANOVA revelou diferenças significativas para o fator tratamento nos comportamentos defensivos [ $F_{(2, 19)} = 20,64; p < 0,001$ ] e exploratórios [ $F_{(2, 19)} = 20,48; p < 0,001$ ] para os grupos que receberam VE (n= 8), SPI 5 mg/kg (n= 7) ou SPI 10mg/kg (n=7), 60 min antes da sessão de condicionamento do CAO. *A posteriori*, o teste de Newman-Keuls revelou uma redução nos comportamentos defensivos e um aumento nos comportamentos exploratórios na sessão de condicionamento, tanto nos animais tratados com SPI 5,0 mg/kg quanto nos animais tratados com SPI 10 mg/kg, em comparação ao grupo controle na respectiva sessão.

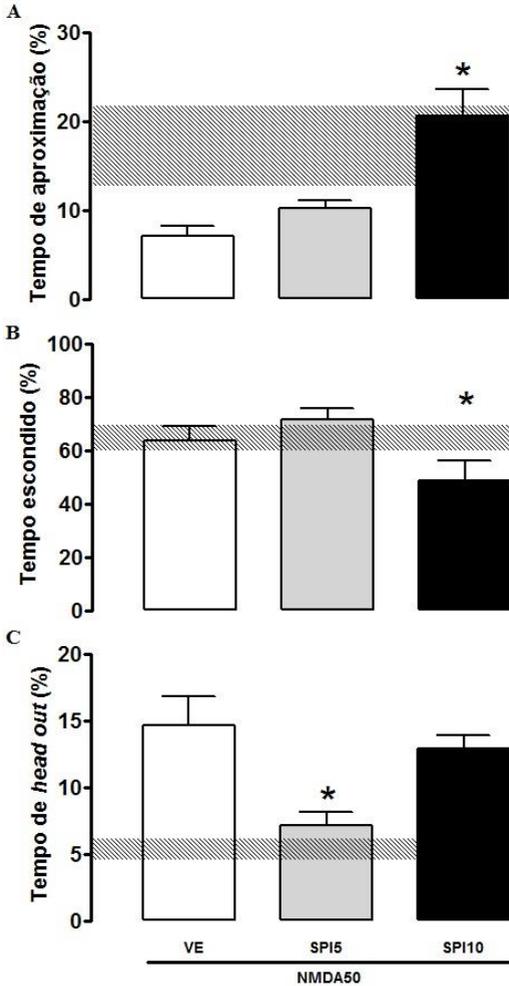


**Figura 16: Efeitos da administração de veículo (VE) ou espirolactona (SPI 5 ou 10 mg/kg) 60 min antes da injeção de NMDA50 pmol na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de condicionamento.** Avaliação das respostas defensivas na sessão de condicionamento através dos (A) comportamentos defensivos (%) e (B) comportamentos exploratórios (%). A seta indica o momento da injeção I.P. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de tempo dos comportamentos durante a sessão de condicionamento. \* indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). Número de animais por grupo: VE= 8, SPI5=7 e SPI10=7.

A Figura 17 ilustra o perfil comportamental dos animais em relação aos tempos próximo à fonte de odor, escondido e em avaliação de risco (*head-out*) obtidos durante a sessão de teste (Dia 4). Nenhuma diferença estatística foi observada nos parâmetros comportamentais avaliados durante a familiarização (Dia 3) e, portanto, os dados estão representados pelas barras hachuradas horizontais e expressam as médias e os limites de confiança ( $\pm 95\%$ ).

No dia do teste, a ANOVA revelou diferenças significativas no fator tratamento para o tempo de aproximação [ $F_{(2, 19)} = 13,92; p < 0,001$ ], para o tempo escondido [ $F_{(2, 19)} = 3,94; p < 0,05$ ] e para o tempo de *head-*

*out* [ $F_{(2, 19)} = 6,06; p < 0,05$ ]. As comparações *post hoc* revelaram um aumento no tempo de aproximação e uma redução no tempo escondido nos animais tratados com SPI 10mg/kg 60 min antes da aquisição do condicionamento aversivo olfatório pela injeção de NMDA 50 pmol na MCPdl, em relação ao respectivo controle, na sessão de teste. Nestes parâmetros analisados, os animais tratados com SPI 5 mg/kg não foram diferentes dos animais do grupo controle. O teste *post hoc* mostrou uma redução no tempo de *head-out* do grupo tratado com SPI 5mg/kg 60 min antes da aquisição do condicionamento, em relação ao grupo controle da respectiva sessão.



**Figura 17: Efeitos da administração de veículo (VE) ou espironolactona (SPI 5 ou 10 mg/kg) 60 min antes da injeção de NMDA50 pmol na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de teste.** As respostas defensivas na sessão de teste foram avaliadas através dos parâmetros de (A) tempo de aproximação (%), (B) tempo escondido (%) e (C) tempo de *head-out* (%). As barras hachuradas representam os comportamentos basais avaliados durante a habituação, com o intervalo de confiança de (95%) superior e inferior. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de tempo dos comportamentos durante a sessão de condicionamento. \* indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). Número de animais por grupo: VE= 8, SPI5=7 E SPI10=7.

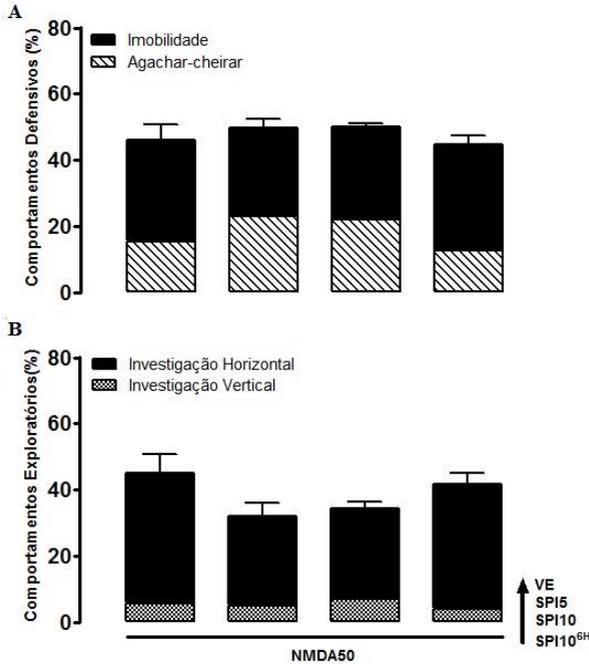
Estes resultados demonstraram que o tratamento com a maior dose de SPI (10 mg/kg) prejudica a aquisição do condicionamento aversivo olfatório induzido pela injeção de NMDA 50 pmol na MCPdl.

#### **4.4 Experimento 4 - Efeito do bloqueio sistêmico dos receptores MR sobre a consolidação das respostas defensivas exibidas a partir da estimulação da MCPdl**

Para avaliar a participação dos receptores mineralocorticoides sobre a consolidação do Condicionamento Aversivo Olfatório, a espirolactona foi injetada imediatamente ou 6h após a sessão de condicionamento para avaliar a janela temporal de consolidação.

Na Figura 18 estão ilustrados os parâmetros comportamentais avaliados na sessão de Condicionamento (Dia 2): comportamentos defensivos e comportamentos exploratórios.

Durante a sessão de condicionamento com injeção de NMDA 50 pmol na MCPdl, nenhum dos grupos mostrou diferença significativa através da ANOVA para o fator tratamento, uma vez que VE (n= 7), SPI 5mg/kg (n= 7) ou SPI 10mg/kg (n=7) foram administradas imediatamente após e SPI 10mg/kg 6h após (n=7) esta sessão.



**Figura 18: Administração de veículo (VE) ou espironolactona (SPI 5 ou 10 mg/kg) imediatamente após a injeção de NMDA50 pmol na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de condicionamento.** Avaliação das respostas defensivas na sessão de condicionamento através dos (A) comportamentos defensivos (%) e (B) comportamentos exploratórios (%). A seta indica o momento da injeção I.P. Um grupo adicional foi administrado com espironolactona 6h após a sessão de condicionamento (SPI10<sup>6H</sup>). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de tempo dos comportamentos durante a sessão de condicionamento. Número de animais por grupo: VE= 8, SPI5=7, SPI10=7 e SPI10<sup>6H</sup>=7).

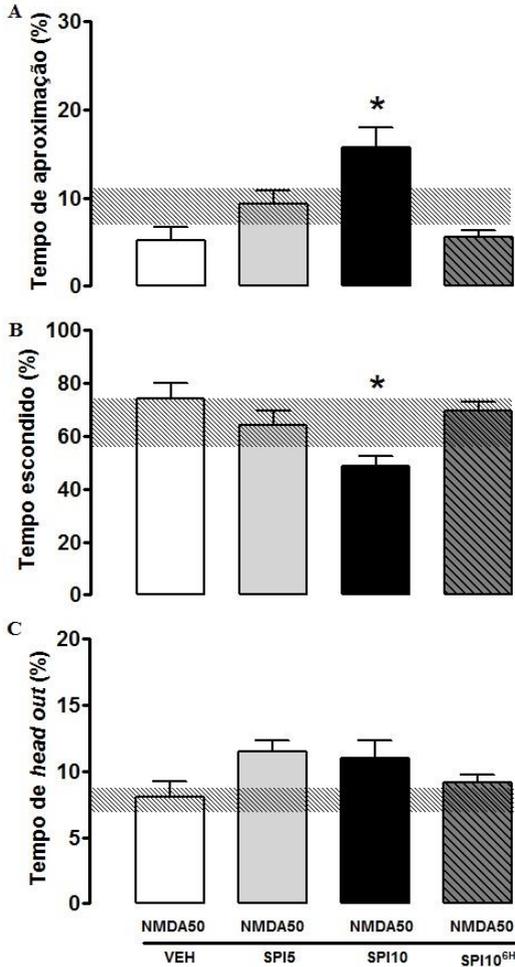
O perfil comportamental dos animais em relação aos tempos próximo à fonte de odor, escondido e em avaliação de risco (*head-out*) durante a sessão de teste (Dia 4), está ilustrado na Figura 19. Nenhuma diferença estatística foi observada nos parâmetros comportamentais avaliados durante a familiarização (Dia 3) e, portanto, os dados estão representados pelas barras hachuradas horizontais e expressam as médias e os limites de confiança ( $\pm 95\%$ ).

Na sessão de teste, a ANOVA detectou diferenças significativas no fator tratamento para o tempo de aproximação [ $F_{(3, 24)} = 9,12; p < 0,005$ ]

e para o tempo escondido [ $F_{(3, 24)} = 5,50$ ;  $p = 0,005$ ), mas não para o tempo de *head-out* [ $F_{(3, 24)} = 2,36$ ;  $p > 0,05$ ].

A análise *post hoc* revelou que os animais tratados com SPI 10mg/kg imediatamente após a sessão de condicionamento apresentaram um aumento significativo no tempo de aproximação à fonte de odor e uma redução no tempo escondido em comparação com os animais tratados com veículo, quando submetidos à sessão de teste.

Nos animais tratados com SPI 10mg/kg 6h após a sessão de condicionamento do CAO, os parâmetros de tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de *head-out* não sofreram alterações, sugerindo um papel temporal da atividade dos receptores mineralocorticoides restrito ao período de consolidação de uma memória aversiva.



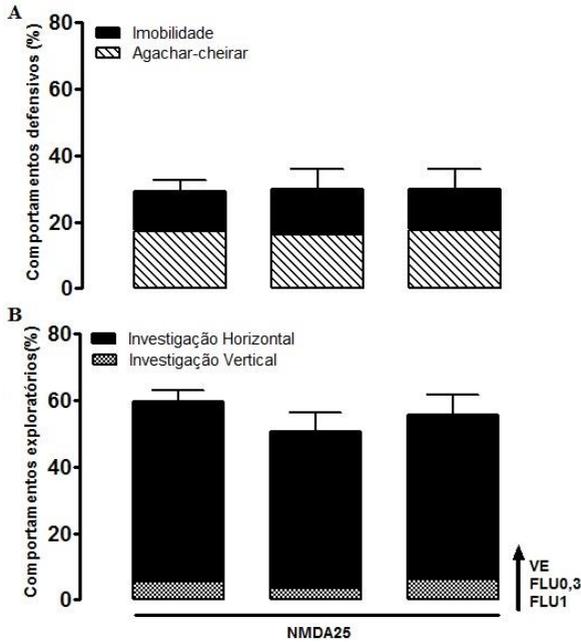
**Figura 19: Efeitos da administração de veículo (VE) ou espironolactona (SPI 5 ou 10 mg/kg) imediatamente após a injeção de NMDA50 pmol na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de teste.** Avaliação das respostas defensivas na sessão de teste através dos parâmetros de (A) tempo de aproximação (%), (B) tempo escondido (%) e (C) tempo de *head-out* (%). Um grupo adicional foi administrado com espironolactona 6h após a sessão de condicionamento (SPI10<sup>6h</sup>). As barras hachuradas representam os comportamentos basais avaliados durante a habituação, com o intervalo de confiança de (95%) superior e inferior. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de tempo dos comportamentos durante a sessão de condicionamento. \* indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). Número de animais por grupo: VE= 8, SPI5=7, SPI10=7 e SPI10<sup>6h</sup>=7).

#### **4.5 Experimento 5 - Efeito da administração de fludrocortisona sobre a consolidação de uma resposta defensiva decorrente da estimulação sublimiar da MCPdl**

Para identificar uma possível facilitação pela atividade MR sobre a consolidação do CAO, os animais foram tratados com uma única administração sistêmica de fludrocortisona (0,3 ou 1,0 mg/kg), ou veículo, imediatamente após a sessão de condicionamento com a injeção de NMDA 25 pmol na MCPdl, anteriormente demonstrado (experimento 1) como não ser capaz de promover o CAO.

Na Figura 20 estão ilustrados os parâmetros comportamentais avaliados na sessão de Condicionamento (Dia 2): comportamentos defensivos e comportamentos exploratórios.

Conforme esperado, a ANOVA não detectou diferenças significativas no fator tratamento para os comportamentos defensivos ou exploratórios entre os grupos que receberam VE (n= 7), FLU 0,3 mg/kg (n= 7) ou FLU 1,0 mg/kg (n=7), imediatamente após a sessão de condicionamento do CAO com injeção de NMDA 25 pmol na MCPdl.

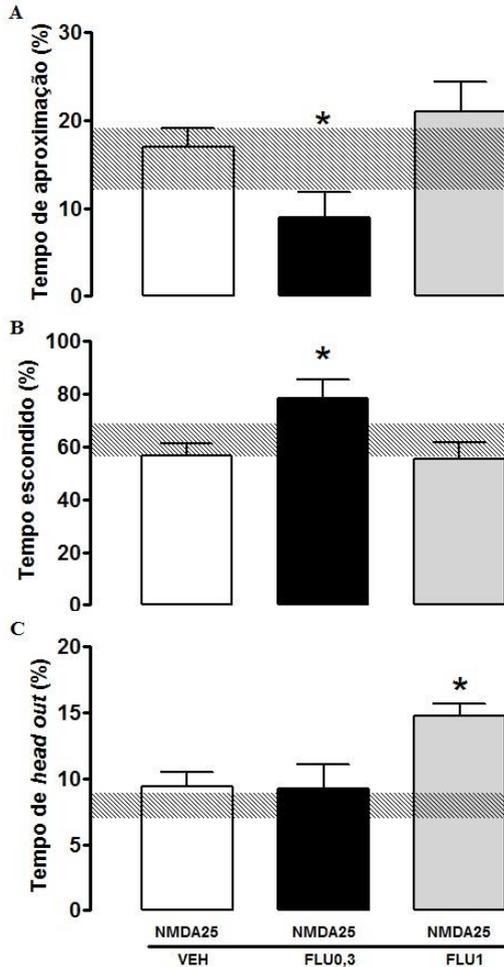


**Figura 20: Administração de veículo (VE) ou fludrocortisona (FLU 0,3 ou 1mg/kg) imediatamente após a injeção de NMDA25 pmol na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de condicionamento.** Avaliação das respostas defensivas na sessão de condicionamento através dos (A) comportamentos defensivos (%) e (B) comportamentos exploratórios (%). A seta indica o momento da administração I.P. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de tempo dos comportamentos durante a sessão de condicionamento. Número de animais por grupo: VE= 8, FLU0,3= 7, FLU1= 7.

A Figura 21 ilustra o perfil comportamental dos animais em relação aos tempos próximo à fonte de odor, escondido e em avaliação de risco (*head-out*) durante a sessão de teste (Dia 4). Nenhuma diferença estatística foi observada nos parâmetros comportamentais avaliados durante a familiarização (Dia 3) e, portanto, os dados estão representados pelas barras hachuradas horizontais e expressam as médias e os limites de confiança ( $\pm 95\%$ ).

A ANOVA revelou diferenças significativas no fator tratamento para o tempo de aproximação [ $F_{(2,24)} = 4,93; p < 0,05$ ], para o tempo escondido [ $F_{(2,24)} = 4,45; p < 0,05$ ] e para o tempo de *head-out* [ $F_{(2,24)} = 5,05; p < 0,05$ ]. As comparações *post hoc* revelaram uma redução no tempo de aproximação e um aumento no tempo escondido nos animais

tratados com FLU 0,3 mg/kg imediatamente após a sessão de condicionamento com NMDA 25 pmol na MCPdl, em relação ao controle. Nestes parâmetros analisados, os animais tratados com FLU 1 mg/kg não foram diferentes dos animais do grupo controle. O teste *post hoc* mostrou um aumento no tempo de *head out* do grupo tratado com FLU 1 mg/kg imediatamente após a sessão de condicionamento, em relação ao grupo controle da respectiva sessão.



**Figura 21:** Efeitos da administração de veículo (VE) ou fludrocortisona (FLU 0,3 ou 1mg/kg) imediatamente após a injeção de NMDA25 pmol na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de teste. Avaliação das respostas defensivas na sessão de teste através dos parâmetros de (A) tempo de aproximação (%), (B) tempo escondido (%) e (C) tempo de *head-out* (%). As barras hachuradas representam os comportamentos basais avaliados durante a habituação, com o intervalo de confiança de (95%) superior e inferior. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de tempo dos comportamentos durante a sessão de condicionamento. \* indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). Número de animais por grupo: VE= 8, FLU0,3= 7, FLU1= 7.

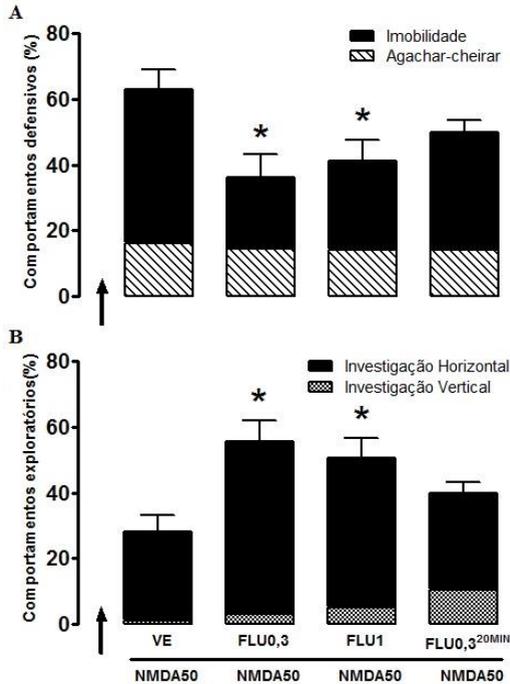
Os resultados deste experimento sugerem um processo de facilitação induzido pela ativação dos receptores mineralocorticoides durante a fase de consolidação. Além disso, estes dados estão de acordo com a redução das respostas defensivas obtidas na sessão de teste (Figura 19A e 19B) a partir do antagonismo dos receptores MR pela espirolactona na fase de consolidação de uma memória aversiva.

#### **4.6 Experimento 6 - Efeito da administração sistêmica de fludrocortisona sobre a aquisição das respostas defensivas exibidas a partir da estimulação da MCPdl**

Dados da literatura têm sugerido que o estresse ou uma grande ativação dos receptores corticosteroides ocorrendo em determinado tempo *antes* de uma tarefa de aprendizagem, poderia prejudicar a formação de memórias. Assim, para avaliar o papel temporal da ativação dos receptores mineralocorticoides sobre a aquisição do CAO, os animais foram tratados fludrocortisona (0,3 ou 1,0 mg/kg) ou VE, 60 ou 20 min antes do condicionamento com NMDA 50 pmol injetado na MCPdl, o qual demonstramos no experimento 1 ser um protocolo capaz de estabelecer o CAO.

A Figura 22 ilustra os parâmetros comportamentais avaliados na sessão de Condicionamento (Dia 2): comportamentos defensivos e comportamentos exploratórios.

A ANOVA revelou diferenças significativas para o fator tratamento sobre os comportamentos defensivos [ $F_{(3, 28)} = 3,72; p < 0,05$ ] e sobre os comportamentos exploratórios [ $F_{(3, 28)} = 5,29; p < 0,05$ ] entre os grupos que receberam VE (n= 8), FLU 0,3 mg/kg (n= 8) ou FLU 1 mg/kg (n=8) 60 min antes da sessão de condicionamento do CAO. *A posteriori*, o teste de Newman-Keuls revelou um aumento nos comportamentos exploratórios e uma redução nos comportamentos defensivos na sessão de condicionamento tanto nos animais tratados 60 min antes com FLU 0,3 mg/kg quanto nos animais tratados com FLU 1 mg/kg, em comparação ao grupo controle. A administração de FLU 0,3 mg/kg 20 min antes (n=8) da sessão de condicionamento não promoveu alterações comportamentais na respectiva sessão.

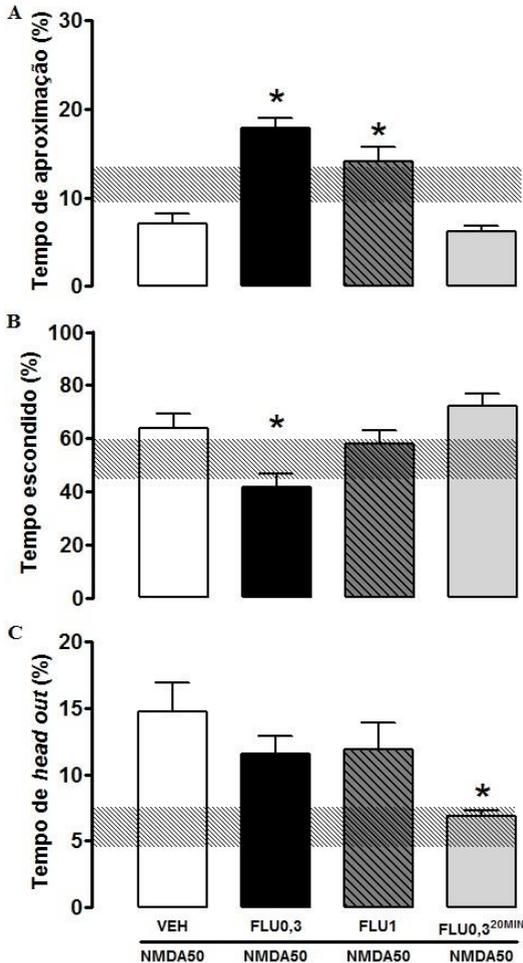


**Figura 22: Efeitos da administração de veículo (VE) ou fludrocortisona (FLU 0,3 ou 1mg/kg) 60 min antes da injeção de NMDA50 pmol na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de condicionamento.** Avaliação das respostas defensivas na sessão de condicionamento através dos (A) comportamentos defensivos (%) e (B) comportamentos exploratórios (%). A seta indica o momento da administração I.P. Um grupo adicional foi administrado com fludrocortisona 20 min antes do condicionamento (FLU0,3<sup>20MIN</sup>). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de tempo dos comportamentos durante a sessão de condicionamento. \* indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). Número de animais por grupo: VE= 8, FLU0,3=8, FLU1=8 e FLU0,3<sup>20MIN</sup>=8.

A Figura 23 ilustra o perfil comportamental dos animais em relação aos tempos próximo à fonte de odor, escondido e em avaliação de risco (*head-out*) durante a sessão de teste (Dia 4). Nenhuma diferença estatística foi observada nos parâmetros comportamentais avaliados durante a familiarização (Dia 3) e, portanto, os dados estão representados pelas barras hachuradas horizontais e expressam as médias e os limites de confiança ( $\pm 95\%$ ).

A ANOVA revelou diferenças significativas no fator tratamento para o tempo de aproximação [ $F_{(3, 28)} = 21,54; p < 0,001$ ], tempo escondido [ $F_{(3, 28)} = 6,60; p = 0,001$ ] e para o tempo de *head-out* [ $F_{(3, 28)} = 3,92; p < 0,05$ ].

A análise *post hoc* revelou que os animais tratados com FLU 0,3mg/kg e FLU 1mg/kg aumentaram o tempo de aproximação à fonte de odor e reduziram o tempo escondido no compartimento fechado, na sessão de teste, quando comparados ao grupo controle VE. Ainda, o teste *post hoc* mostrou uma redução no tempo de *head-out* do grupo tratado com FLU 0,3mg/kg 20 min antes da sessão de condicionamento do CAO, quando comparado com o grupo VE na respectiva sessão.



**Figura 23: Efeitos da administração de veículo (VE) ou fludrocortisona (FLU 0,3 ou 1mg/kg) 60 min antes da injeção de NMDA50 pmol na MCPdl sobre os comportamentos avaliados na sessão de teste.** Avaliação das respostas defensivas na sessão de teste através dos parâmetros de (A) tempo de aproximação (%), (B) tempo escondido (%) e (C) tempo de *head-out* (%). Um grupo adicional foi administrado com fludrocortisona 20 min antes do condicionamento (FLU0,3<sup>20MIN</sup>). As barras hachuradas representam os comportamentos basais avaliados durante a habituação, com o intervalo de confiança de (95%) superior e inferior. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de tempo dos comportamentos durante a sessão de condicionamento. \* indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). Número de animais por grupo: VE= 8, FLU0,3=8, FLU1=8 e FLU0,3<sup>20MIN</sup>=8.

Estes resultados sugerem um prejuízo dependente do tempo exercido pelo agonista MR sobre a aprendizagem, uma vez que a administração 60 min antes da tarefa, mas não 20 min antes, reduziu a resposta defensiva a ser expressa na sessão de teste.

## 5 DISCUSSÃO

A principal proposta do presente trabalho foi identificar algumas das propriedades temporais da administração de agonista e antagonista dos receptores mineralocorticoides (MR) sobre a resposta defensiva incondicionada e a subsequente formação de uma memória aversiva em um CAO promovido pela estimulação química da MCPdl. Para tanto as respostas comportamentais dos animais foram avaliadas no momento da aquisição da memória aversiva e durante a expressão de respostas comportamentais defensivas evocadas frente ao estímulo condicionado (EC).

Os resultados encontrados demonstram que a ativação dos receptores MR durante a etapa de aquisição e consolidação do CAO foram necessárias para promover um condicionamento efetivo pela estimulação química da MCPdl. Além disso, a ativação dos receptores MR modificou as respostas defensivas evocadas pelo agonista glutamatérgico NMDA frente a estimulação química da MCPdl. Apesar da ativação dos receptores MR pela fludrocortisona antes do condicionamento prejudicar a aprendizagem aversiva, a ativação MR após uma estimulação subliminar da MCPdl foi capaz de potencializar as respostas defensivas exibidas frente ao EC.

*Condicionamento aversivo olfatório (CAO) utilizando a injeção de NMDA na MCPdl como EI*

Com o objetivo primário de estabelecer um condicionamento aversivo olfatório eficiente utilizando a injeção de agonista glutamatérgico NMDA como EI, utilizamos uma tarefa de condicionamento olfatório aversivo (CAO), inicialmente descrita em nosso laboratório por Kincheski e colaboradores (2012). O modelo permitiu a investigação de alguns componentes específicos de memórias ligadas a uma situação aversiva baseada em uma pista olfatória.

A partir do conhecimento estabelecido de que estruturas neurais tais como a MCPdl, bem como o núcleo pré – mamilar dorsal (PMd), desempenham papel chave na instrução de circuitos ascendentes que promovem a aprendizagem aversiva e tendo sido demonstrado que estas estruturas são sensíveis ao odor de predador (GROSS; CANTERAS, 2012; TAKAHASHI, 2014), a estimulação destes locais seria capaz de reproduzir as mudanças interoceptivas relacionadas com ameaças predatórias e servir como um estímulo incondicionado num CAO que possibilita a aprendizagem associativa (DO-MONTE et al., 2008;

PAVESI; CANTERAS; CAROBREZ, 2011; KINCHESKI et al., 2012). Com base nesta assertiva, estímulos neutros, como um odor neutro, pareados com a estimulação química da MCPdl, poderiam adquirir características aversivas à semelhança de um odor de predador natural nas respostas defensivas inatas e decorrentes de uma aprendizagem (GROSS; CANTERAS, 2012; KINCHESKI et al., 2012; CANTERAS; PAVESI; CAROBREZ, 2015).

As etapas de formação da memória no condicionamento olfatório aversivo são a aquisição e a consolidação, onde na aquisição, há convergência das informações relacionadas ao odor e a estimulação da MCPdl e na consolidação, o armazenamento da memória olfatória aversiva recém adquirida, sendo a este evento atribuído como dependente de síntese proteica para sua expressão a longo prazo (MCGAUGH, 2000).

A MCPdl pode influenciar circuitos neuronais relacionados a aprendizagem aversiva através de conexões com estruturas ascendentes, como por exemplo, o núcleo hipotalâmico anterior, que integra a rede neural ligada a respostas inatas aversivas frente ao odor de predador, designada como sistema hipotalâmico de defesa (CANTERAS et al., 2008). Ainda, a MCPdl pode influenciar áreas límbicas através de projeções para núcleos intralaminares que, por sua vez, se projetam para córtex cingulado anterior. A MCPdl também estabelece conexões com demais núcleos talâmicos, como *reuniens*, dorsolateral, supragenicolado, além de outras estruturas da circuitaria límbica envolvidos na aprendizagem aversiva (GROSS; CANTERAS, 2012; CANTERAS; PAVESI; CAROBREZ, 2015).

O presente estudo caracterizou dois momentos no condicionamento aversivo olfatório: a aquisição de uma memória aversiva e a expressão de respostas de defesa ao EC. A análise da sessão de aquisição permitiu avaliar comportamentos defensivos e exploratórios frente à estimulação da MCPdl, ao passo que a análise da sessão de teste permitiu avaliar respostas defensivas aprendidas e a estratégia comportamental frente ao EC.

Dessa forma, durante a sessão de condicionamento, apesar dos comportamentos exploratórios e defensivos não apresentarem diferenças entre os tratamentos, mesmo quando analisados minuto a minuto (Apêndice A), ao separar os comportamentos defensivos, isto é, a imobilidade e o comportamento de agachar – cheirar, fica evidente uma maior expressão do comportamento de imobilidade em decorrência da

estimulação química da MCPdl para os animais que receberam NMDA na dose de 50 pmol, fato que corrobora com os achados na literatura que demonstram que a estimulação da MCP, tanto elétrica quanto química, tem efeito importante sobre o comportamento de imobilidade (BRANDÃO; DE AGUIAR; GRAEFF, 1982; BANDLER; DEPAULIS; VERGNES, 1985; KRIEGER; GRAEFF, 1985; COIMBRA; BRANDÃO, 1993; KINCHESKI et al., 2012).

A imobilidade é uma resposta de defesa comum em roedores. Os animais apresentam este comportamento com a finalidade de impedir a identificação por um possível predador, sendo este um comportamento complexo e coordenado. Caracterizado por um alto nível de alerta, considerável tonicidade muscular e classicamente definido por uma ausência de todos os movimentos corporais, exceto os respiratórios (BOLLES, 1970), a magnitude da resposta de imobilidade obedece geralmente uma relação com estado aversivo apresentado pelo indivíduo, de modo que um estímulo aversivo mais intenso durante a fase de aquisição tende a gerar uma resposta condicionada de maior magnitude (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988).

Apesar de Bittencourt e colaboradores (2004) mostrarem uma linearidade entre a intensidade das respostas defensivas evocadas e doses crescentes de NMDA injetadas na MCPdl, neste estudo, apenas os animais que receberam NMDA 50 pmol apresentaram aumento no tempo de imobilidade na sessão de condicionamento quando comparado ao grupo controle. Essa relação não linear da aquisição de um condicionamento de acordo com a dose de NMDA administrada na MCPdl já foi descrita na literatura por diversos estudos em modelos de labirinto em cruz elevado (MORAES; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2008) e protocolos utilizando lesão eletrolítica e choque nas patas (WALKER; DAVIS, 1997; KLASSEN et al., 2002), onde a atividade da MCPdl demonstrou envolvimento no aumento da excitação emocional, responsável pelo prejuízo do processamento de uma memória.

Em concordância com trabalhos prévios de nosso laboratório, estes resultados sugerem que a injeção do agonista glutamatérgico NMDA, funciona como um EI capaz de induzir a aprendizagem. O trabalho anterior de Kincheski e colaboradores (2012), estabeleceu o CAO com NMDA na dose de 100 pmol, injetado na porção caudal da MCPdl. Essa diferença, em relação ao presente trabalho no qual o NMDA na dose de 50 pmol foi injetado na porção rostral da MCPdl, pode ser explicada pelo fato de já terem sido identificadas diferenças ao longo do eixo rostro

caudal da porção dorsolateral da MCP, que refletem a expressão heterogênea de sistemas de neurotransmissão bem como na conectividade neuronal com vias envolvidas no processamento da informação, sugerindo que as contribuições distintas sobre a modulação de diferentes tipos de respostas defensivas possa ser atribuída a diferenças rostro caudais (CAROBREZ; TEIXEIRA; GRAEFF, 2001; SOUZA; CAROBREZ, 2016).

Durante a reexposição ao EC, já na sessão de teste, os animais que receberam NMDA 50 pmol como EI, demonstram esquivar a fonte de odor e aumento significativo no tempo escondido em relação ao grupo controle, ao passo que o parâmetro de *head-out* não foi alterado entre os tratamentos.

O comportamento de *head-out*, interpretado como uma postura de avaliação de risco foi primeiramente identificado nos modelos que utilizam exposição ao predador ou seus odores (DIELENBERG; MCGREGOR, 2001; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003; CANTERAS, 2008; DO-MONTE et al., 2008). Entretanto, costuma ser evidente nos animais expostos a uma pista olfatória previamente pareada com choque nas patas (KROON, 2012; SOUZA, 2014) e no condicionamento aversivo olfatório promovido pela estimulação do núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) (PAVESI; CANTERAS; CAROBREZ, 2011). Apesar do parâmetro de *head-out* não ter se revelado diferente entre as doses de NMDA utilizadas como EI, o aumento dos demais parâmetros comportamentais avaliados imediatamente após a injeção do agonista glutamatérgico na sessão de condicionamento ou na sessão de teste, fundamentam o papel da MCPdl nas respostas defensivas.

Em adição, os resultados obtidos mostram que NMDA 25 pmol não parece ser suficiente para promover as respostas comportamentais defensivas enquanto que a dose de NMDA 100 pmol parece colocar em funcionamento sistemas envolvidos com outros tipos de respostas defensivas evidentes, tais como fuga e saltos (BITTENCOURT et al., 2004), promovendo uma estimulação da MCPdl acima da apropriada para estabelecer um condicionamento olfatório aversivo, em conformidade com o anteriormente exposto a respeito da variação não linear da aquisição de um condicionamento dependendo da dose administrada na MCPdl (WALKER; DAVIS, 1997; KLASSEN et al., 2002; MORAES; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2008; KINCHESKI et al., 2012).

Os resultados nos permitiram confirmar, então, que o estado emocional aversivo evocado pela estimulação da MCPdl utilizando NMDA 50 pmol como EI permite o estabelecimento de um CAO.

*Avaliação dos níveis séricos de corticosterona 30 minutos após a sessão de condicionamento com diferentes doses de NMDA infundidos na MCPdl*

Em função deste estado aversivo evocado pela estimulação da MCPdl utilizando NMDA, o presente estudo procurou investigar se poderiam ser caracterizadas mudanças neuroendócrinas nas condições experimentais testadas, ou seja, 30 min após a estimulação química da MCPdl com diferentes doses de NMDA. A literatura descreve que a secreção de corticosteroides ocorre minutos após a exposição a um estressor, ou mesmo à novidade, auxiliando nos processos de adaptação do organismo e de formação de memória (DE KLOET et al., 1998; PACAK; PALKOVITS, 2001; JOËLS et al., 2006).

Para tanto, foram avaliados os níveis séricos de CORT 30 min após a sessão de condicionamento com doses crescentes de NMDA injetados na MCPdl. Como grupo controle positivo, o grupo ESTRESSE foi submetido ao estresse de restrição aguda, classicamente descrito por ativar o eixo HPA e proporcionar níveis de CORT elevados (PACAK; PALKOVITS, 2001; GADEK-MICHALSKA et al., 2013; MALISCH et al., 2013; CHATTARJI et al., 2015) ao passo que o grupo *home – cage* foi considerado o controle negativo. Após a sessão de condicionamento com doses crescentes de NMDA injetados na MCPdl, os níveis séricos de CORT avaliados 30 min após a injeção, não foram alterados em relação ao grupo *home-cage*.

A literatura descreve alguns dados controversos com relação a ativação do eixo HPA e a liberação de CORT em decorrência da estimulação da MCP. A concentração circulante de CORT em ratos permaneceu inalterada mesmo após um período longo e contínuo de estimulação elétrica MCPd que leva a uma resposta de fuga (SCHENBERG et al., 2008). Ainda, a exposição de ratos a estímulos ultrassônicos na frequência da vocalização de alarme desta espécie (22-kHz) ativa a MCPd e induz comportamentos de fuga acompanhados de taquicardia e aumento da temperatura corporal, sem alteração, no entanto, dos níveis de CORT (KLEIN et al., 2010). De fato, estudos posteriores de Lim e colaboradores (2010) mostraram que ratos com níveis basais reduzidos de CORT apresentam aumentos significativos dos níveis

circulantes de CORT 30 min após a estimulação elétrica da MCPdl que produziu comportamentos de fuga. Não obstante, a elevação dos níveis de CORT destes estudos foi sugerida por outro grupo como sendo devida ao exercício muscular, e não aos efeitos emocionais da estimulação da MCPd (DE SOUZA ARMINI et al., 2015)

Com relação a conectividade anatômica da MCP com estruturas relacionadas à atividade do eixo HPA, um estudo de Floyd e colaboradores (1996) identificou através de marcação retrógrada de neurônios com Amina Dextrana Bioetnilada (BDA), a existência de projeções da coluna ventrolateral da MCP para a subdivisão endócrina do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH). Além disso, um estudo utilizando eletrofisiologia com estimulação antidrômica também demonstrou a ligação da MCP com o PVH, uma vez que a estimulação antidrômica da MCP sinalizou um pequeno número de células no PVH (PITTMAN; BLUME; RENAUD, 1981). Estes resultados indicam que existe uma via MCP-PVH para a integração entre a regulação endócrina e a reação emocional decorrente da estimulação da MCP, quer seja elétrica, química ou ultrassônica. No entanto, até o momento a fisiologia destas conexões não foi elucidada quanto à atividade inibitória ou excitatória sobre o eixo HPA. Apesar disto, alguns estudos mostram que o eixo HPA de animais cronicamente estressados é inibido por projeções colecistonérgicas da MCP para o núcleo paraventricular posterior do tálamo (BHATNAGAR et al., 2000).

Ao resgatar através da hipótese de Selye (1936,1976) da não-especificidade da resposta do estresse, embora criticada desde o início, o conceito da inespecificidade testado posteriormente por Pacak e colaboradores (1998), demonstra que diferentes estressores originam padrões específicos de respostas neuroendócrinas. Além disto, os hormônios (CORT e adrenalina) e transmissores (noradrenalina) não respondem na mesma proporção para a mesma alteração na intensidade do estresse (PACAK; PALKOVITS, 2001).

Essa condição, no entanto, não descarta a participação dos receptores mineralocorticoides na expressão das respostas defensivas durante a sessão de condicionamento e nem na sessão subsequente de teste que permitiu avaliar a formação de uma memória aversiva num CAO, uma vez que os hormônios corticosteroides são liberados no organismo em intervalos de pulso de 60 min ao longo do ciclo circadiano e atuam nos receptores corticosteroides, especialmente o receptor MR que permanece ocupado mesmo em condições basais (DE KLOET, 2014).

Dessa forma, existem níveis de CORT circulante, condição que difere da ausência de CORT circulante, como em animais adrenalectomizados. Mais recentemente, inclusive, a influência de modificações no ciclo circadiano também tem sido objeto de diversos estudos que relacionam memória e aprendizagem (GERSTNER; YIN, 2010; LISTON et al., 2013; SMARR et al., 2014; MOU, 2016)

Assim, o conjunto de dados nos permitiu verificar que a estimulação química da MCPdl com diferentes doses de NMDA, não alterou os níveis circulantes de CORT nas condições experimentais utilizadas, quando essa foi mensurada pontualmente, num período de 30 min após a sessão de condicionamento. Contudo, não podem ser descartadas alterações nos níveis de CORT em função da estimulação química da MCPdl com agonista glutamatérgico NMDA, caso venham a ser avaliados em diferentes intervalos de tempo ou condições experimentais, informação ainda não descrita na literatura.

#### *Efeitos da administração do antagonista MR espirolactona antes da sessão de aquisição do CAO*

Motivados por dados da literatura e trabalhos anteriores do nosso grupo, que sugerem a importância da ação complementar dos receptores corticosteroides MR e GR no armazenamento de memórias (HARRIS et al., 2013; DE KLOET, 2014; SOUZA et al., 2014), os dados iniciais do presente trabalho nos levaram a questionar se o bloqueio dos receptores mineralocorticoides por antagonista específico poderia interferir na aquisição e consolidação de memórias aversivas decorrentes de um protocolo de CAO utilizando a injeção de NMDA como EI.

A espirolactona, um antagonista específico do receptor MR, apresenta também atividade anti-androgênica, progestogênica e estrogênica (DELYANI, 2000; MÉNARD, 2004), contudo não age em GR. É rapidamente metabolizada, com um tempo de meia vida de 5 min após uma única administração intravenosa de 2mg em ratos e suas ações poderiam também ser atribuídas aos metabólitos, como canrenona e 7-alfa-tiometil-espirolactona, que por sua vez apresentam respectivamente tempos de meia vida de 1-2h e aproximadamente 30 min (SADÉE et al., 1974).

Quando o antagonista MR espirolactona foi administrado 60 min antes da injeção de NMDA 50 pmol na MCPdl, os comportamentos defensivos reduziram ao passo que os exploratórios aumentaram para ambas as doses de espirolactona administradas, quando avaliados ao

longo da sessão de condicionamento. Dados da literatura mostram que os receptores MR parecem modular a atividade comportamental em curso durante as tarefas de aprendizagem (SANDI; ROSE, 1994; DE KLOET et al., 1998; BRINKS et al., 2009).

Na sessão de teste, os animais que receberam SPI antes da sessão de condicionamento aumentaram o tempo próximo à fonte de odor e diminuíram o tempo no compartimento escondido, além da avaliação de risco também estar reduzida. Estes dados corroboram a importância do receptor mineralocorticoide nos processos iniciais de resposta ao estresse e a relevância funcional deste na aquisição de uma memória e na estratégia de enfrentamento frente a novidade ou a um estressor (JOËLS, 2008; BRINKS et al., 2009; SOUZA et al., 2014).

Nesse experimento, confirmamos dados de outros estudos em que a utilização de antagonistas dos receptores MR é capaz de influenciar na aquisição de uma memória aversiva, demonstrada pela diminuição dos comportamentos defensivos nos animais que foram sujeitos a essa intervenção farmacológica em comparação aos controles.

#### *Efeitos da administração aguda do antagonista MR espirolactona imediatamente após a aquisição do CAO*

Em um segundo grupo de experimentos, foram analisados os efeitos do antagonista espirolactona nas doses de 5 e 10 mg/kg administrados imediatamente após a sessão de condicionamento do protocolo de CAO com o intuito de verificar se a manipulação dos receptores MR após a aquisição poderia interferir com a consolidação da memória. Conforme esperado, não houve diferenças entre os comportamentos defensivos e exploratórios avaliados durante a sessão de condicionamento nos grupos analisados, corroborando com os resultados anteriores da efetividade da aquisição da aprendizagem aversiva, uma vez que a intervenção farmacológica só foi realizada após essa sessão de condicionamento.

A análise do comportamento 48 h após, durante a sessão de teste, verificou que o antagonista MR, apenas na maior dose foi capaz de interferir na consolidação do CAO, de acordo com descrições na literatura em que os receptores MR apresentam papel importante no processo de consolidação de uma memória de diferentes tarefas (ADAMEC et al., 2007; FERGUSON; SAPOLSKY, 2007; RIMMELE et al., 2013).

Quando a manipulação farmacológica do receptor MR foi realizada na fase tardia à aprendizagem, ou seja, 6 h após a sessão de condicionamento, o efeito do antagonista MR sobre a consolidação da memória aversiva decorrente do CAO não foi observado. Neste ponto, a natureza da convergência temporal entre a tarefa aprendida e o bloqueio do receptor MR parece ser determinante para a influência sobre a consolidação da memória aversiva (JOËLS; BARAM, 2009).

Sendo assim, dentro do protocolo experimental de estimulação química da MCPdl com NMDA 50 pmol, a participação dos receptores MR durante a sessão de aprendizagem é importante para a aquisição dessa memória (OITZL; DE KLOET, 1992; BRINKS et al., 2009; OITZL et al., 2010), mas também para o processo de consolidação, que apesar de incluir outros sistemas que envolvam o mecanismo de ação lento e genômico como a síntese proteica, quando o receptor MR é bloqueado pelo antagonista SPI poderia implicar numa ativação mais robusta do receptor GR pela CORT circulante, fato que presumivelmente resulta numa alteração na proporção de ativação MR:GR. (CORNELISSE; JOËLS; SMEETS, 2011; DE KLOET, 2014; SOUZA et al., 2014)

As ações mediadas pelos receptores MR e GR são complementares (DE KLOET et al., 1998; OITZL et al., 2010; GOMEZ-SANCHEZ, 2014; SOUZA et al., 2014) e influenciam os comportamentos relacionados à ansiedade e à memória emocional aversiva (DE KLOET et al., 1998; BRINKS et al., 2009; HARRIS et al., 2013). Esses comportamentos estão relacionados principalmente ao sistema límbico e fazem parte do repertório comportamental testado em modelos animais de aprendizagem e condicionamento aversivo (DE KLOET et al., 1998). O desequilíbrio na expressão ou a ação não coordenada destes dois receptores resulta em um comprometimento sobre processos atencionais e mnemônicos, conforme descrito em trabalhos anteriores (HARRIS et al., 2013; DE KLOET, 2014; GOMEZ-SANCHEZ, 2014; SOUZA et al., 2014). Sabendo que os receptores MR são os responsáveis pelos processos avaliativos iniciais frente ao desafio e apresentam relevância funcional na aquisição de uma memória e na estratégia de enfrentamento de uma ameaça (JOËLS, 2008; VOGEL et al., 2015) demonstramos que as ações mediadas por MR e GR de forma ordenada são essenciais para a formação da memória aversiva decorrente do CAO que tem como EI a injeção de um agonista glutamatérgico na MCPdl.

Considerando que o receptor GR é expresso em todo o cérebro, o receptor MR é predominantemente expresso em áreas límbicas

relacionadas com o processamento de memórias como o hipocampo e amígdala (REUL; DE KLOET, 1985; SECKL; FINK, 1992; LI; HAN; SHI, 2011; MCEOWN; TREIT, 2011). Por sua vez, estas áreas se conectam simultaneamente e também de forma independente com o sistema hipotalâmico medial de defesa, anteriormente referido como parte do que atribui característica aversiva ao odor previamente neutro, além de estarem intimamente relacionadas com o processamento de memórias e caracterizadas por estarem envolvidas com o condicionamento aversivo (GROSS; CANTERAS, 2012; CANTERAS; PAVESI; CAROBREZ, 2015).

Em comparação com o receptor GR, os corticosteroides apresentam uma afinidade pelos receptores MR 10 vezes maior (JOËLS et al., 2008). Estas características de alta afinidade resultam numa elevada taxa de ocupação do receptor MR, mesmo sob condições basais, a fim de manter os níveis basais de corticosteroides através de *feedback* negativo (REUL; DE KLOET, 1985; DE KLOET; REUL, 1987). A ocupação do receptor GR só é alcançada quando as concentrações de CORT apresentam um pico, como no início da fase ativa do ciclo circadiano ou em decorrência de estresse (WANG et al., 2012; DE KLOET, 2014).

O receptor MR exerce efeitos rápidos na neurotransmissão e plasticidade sináptica no hipocampo e da amígdala, principalmente, mas não apenas, em circunstâncias estressantes (KARST et al., 2005, 2010). Estes efeitos rápidos e não genômicos de CORT parecem ser mediados pelos MR localizados na membrana plasmática (KARST et al., 2005; DOREY et al., 2011; GROENEWEG et al., 2011, 2012; TASKER; JOËLS, 2015)

Evidências apontam que o receptor MR afeta diretamente a atividade basal do eixo HPA e aquela induzida por estresse, além dos processos avaliativos relacionados com o estresse e aprendizagem em animais e seres humanos (REUL et al., 2000; JOËLS et al., 2008; BERARDELLI et al., 2010). Em condições basais, o bloqueio do receptor MR inibe o controle tônico do eixo HPA mediado por MR e desta forma, o bloqueio do receptor MR não só minimizaria a contribuição deste receptor, mas também permitiria uma contribuição relativamente maior de ações da CORT endógena mediadas pelo receptor GR (SOUZA et al., 2014).

*Efeitos da administração aguda de um agonista MR imediatamente após a sessão de aquisição de um CAO não efetivo*

A ativação dos receptores MR e GR parece ter efeito facilitatório sobre diferentes tarefas de aprendizagem, tais como condicionamentos gustatórios e apetitivos (ZORAWSKI; KILLCROSS, 2002; MIRANDA et al., 2008), esQUIVA inibitória (ROOZENDAAL; MCGAUGH, 1997; MEDINA et al., 2007), memória espacial (SANDI; LOSCERTALES; GUAZA, 1997), reconhecimento de objetos (OKUDA; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2004) e no condicionamento aversivo olfatório utilizando choque nas patas como EI (SOUZA et al., 2014).

Estando o receptor MR envolvido com o aumento da atividade neuronal em regiões límbicas e o desempenho de funções cognitivas, indagamos se este também poderia estar implicado com a formação de memórias aversivas num protocolo de CAO, utilizando como EI a estimulação química da MCPdl.

Assim, nossos achados demonstraram que o agonista MR administrado imediatamente após a injeção de NMDA 25 pmol na MCPdl (anteriormente demonstrado ser ineficaz em promover condicionamento), facilitou a formação de uma memória de longa duração.

A fludrocortisona é caracterizada como um potente agonista MR, no entanto, apresenta afinidade também pelo GR (HEEGDE, 2015). O tempo de meia vida compreende um período de 3-6h (RIBOT et al., 2012). Assim, a FLU apresenta também afinidade pelo receptor GR, fato este que permite supor que os efeitos decorrentes da administração deste agonista MR imediatamente após a sessão de condicionamento, possam ser também devidos as ações da droga no GR. Esta informação está em concordância com estudos que demonstraram que administração sistêmica de corticosterona pós-treino ou agonistas GR podem melhorar a consolidação da memória (SANDI; ROSE, 1994; ROOZENDAAL, 2000; ABRARI et al., 2008). Assim, a ativação do MR seria responsável pela avaliação das informações sensoriais e estímulos ambientais, ao passo que os GR são importantes para a consolidação da informação, novamente ressaltando a atividade complementar dos receptores corticosteroides.

Joels e colaboradores (2006 e 2009) sugerem que o recrutamento de áreas cerebrais límbicas, como hipocampo e amígdala, coincidente com a ativação do receptor MR nestas áreas promove o fortalecimento de memórias ligadas a estímulos emocionalmente relevantes. A ativação dos MR de membrana leva a mudanças rápidas sobre transmissão sináptica e excitabilidade neuronal. Evidências sugerem que, no hipocampo, a

ativação destes receptores de membrana possa influenciar tanto a excitabilidade pré-sináptica quanto pós-sináptica (PRAGER; JOHNSON, 2009). Pelo aumento do influxo de cálcio na pré-sinapse e consequentemente da excitabilidade, os MR de membrana aumentam a liberação de glutamato. Na pós-sinapse, uma menor condutância do potássio reduz a hiperpolarização neuronal. Ainda, a atividade tardia dos MR intracelulares, leva a transcrição de genes alvo que mantém a transmissão glutamatérgica (POPOLI et al., 2012; YAU; SECKL, 2012).

Os mecanismos rápidos atribuídos ao receptor GR, uma vez que estes também estão associados a membrana plasmática, assim como os receptores MR (KARST et al., 2005; JOËLS et al., 2008; GROENEWEG et al., 2011, 2012; YAU; SECKL, 2012), compreendem a diminuição da excitabilidade neuronal pela redução da corrente dos canais de cálcio dependentes de voltagem e inibição da atividade dos receptores NMDA, além de maior condutância do receptor GABA<sub>A</sub>, promovendo assim um efeito inibitório sobre a transmissão sináptica (PRAGER; JOHNSON, 2009; YAU; SECKL, 2012).

#### *Efeitos da administração de agonista MR antes da sessão de aquisição do CAO*

Embora a ativação dos MR e GR tenha mostrado um efeito facilitatório quando presentes junto do período de aprendizagem, estes parecem ter efeitos opostos quando ativados em um tempo considerável antes da tarefa a ser aprendida. Kirshbaum e colaboradores (1996) demonstraram que a aquisição de uma memória declarativa é prejudicada em humanos expostos ao estresse ou altos níveis de cortisol, quando a administração ou exposição acontece até uma hora antes da tarefa a ser aprendida (KIRSCHBAUM, WOLF *et al.*, 1996). Ainda, quando o agonista MR FLU foi administrado à ratos, 60 min antes da sessão aquisição de um CAO que utilizou choque nas patas como EI, diminuiu a expressão de comportamentos defensivos na sessão de teste, especialmente o parâmetro de avaliação de risco (SOUZA et al., 2014).

Estes achados, ressaltam um princípio importante sobre a atividade dos receptores MR e GR: a ativação ordenada destes no contexto da aprendizagem parece ser fundamental para a formação de memórias aversivas, ao passo que esta atividade muito tempo fora do contexto parece prejudicá-las (para revisão, ver DE KLOET, 2014).

De maneira simplista, isso se daria por um processo operacional, onde a ativação dos receptores corticosteroides antes da tarefa a ser

aprendida faria com que a maquinaria celular estivesse ainda processando algo anterior ao que deve ser registrado. Ou seja, não há a convergência entre a atividade da maquinaria celular e a entrada do estímulo sensorial, ou seja, o estímulo a ser processado (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; JOËLS et al., 2006).

Nossos resultados estão de acordo com o pressuposto de que se a ativação dos receptores MR acontece antes e durante a tarefa a ser aprendida – e, possivelmente ativação dos receptores GR, sem, no entanto, conhecer a proporção em que isso acontece - a maquinaria celular esteja ocupada trabalhando em uma informação anterior ao evento a ser processado.

A administração do agonista MR em um tempo considerável antes (60 min) da aquisição do condicionamento com a injeção de NMDA 50pmol na MCPdl prejudica a aquisição do CAO visualizado pela redução dos comportamentos defensivos e aumento nos comportamentos exploratórios avaliados durante a sessão de condicionamento. Ainda, a menor dose de FLU interfere com a expressão dos comportamentos defensivos frente ao EC na sessão de teste, onde aumentou o tempo de aproximação a fonte de odor e diminui o tempo dispendido no compartimento escondido, sem interferir com o parâmetro de avaliação de risco. Uma das características da ação coordenada para MR:GR é a relação de ocupação e dose-resposta com formato de curva em sino (BALDI; BUCHERELLI, 2005; JOËLS, 2006; RIMMELE et al., 2013), mediando nessa razão a excitabilidade neuronal e o desempenho cognitivo, fato que poderia explicar os achados com a menor dose do agonista MR.

Por sua vez, a administração de fludrocortisona 20 min antes, não interferiu com as respostas comportamentais durante a sessão de condicionamento, mas aumentou o comportamento de avaliação de risco durante a sessão de teste, contudo, sem interferir com os demais parâmetros de proximidade a fonte de odor ou permanência no compartimento fechado. O papel dos MR na resposta comportamental à novidade, a avaliação de informações e a seleção de resposta frente ao desafio já está bem estabelecido na literatura (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; KRUGERS; HOOGENRAAD; GROG, 2010) e parece permitir que através da estratégia de aprendizagem selecionada em decorrência da apreciação da situação seja determinada a formação de uma memória, que garantiria uma resposta comportamental adaptativa quando novamente confrontado com a situação (HEEGDE, 2015).

Ao resgatar os mecanismos rápidos atribuídos ao MR, se vistos comportamentalmente, estes estão envolvidos com processos de vigilância, alerta e atenção. Assim, ao administrar a FLU 20 min antes da sessão de condicionamento, ainda não foram recrutados os mecanismos lentos atribuídos ao receptor MR e para tanto são os mecanismos avaliativos iniciais que irão influenciar o processamento da informação, mantendo este estilo de enfrentamento quando o animal é novamente confrontado com o EC (OITZL; DE KLOET, 1992; KARST et al., 2005; BRINKS et al., 2009).

Coletivamente, nossos dados demonstram o envolvimento do MR no processo de aquisição e manutenção da informação aversiva, participando da formação de memórias de longa duração, mas também em algumas situações, prejudicando o fluxo de informações necessárias para a aquisição de novas memórias, quando a ativação do MR é precedente ao evento.

Finalmente, confirmamos os resultados apresentados por Souza e colaboradores (2014) a respeito das propriedades de ativação temporal do MR em um CAO, que permitiu avaliar as etapas de aquisição, consolidação e expressão da memória aversiva sob influência da atividade do receptor MR, bem como componentes específicos da reação defensiva. Nossos resultados também estão de acordo com os resultados anteriores, tanto em humanos quanto em roedores, que demonstram que ações complementares mediadas pelos receptores MR e GR são indispensáveis para a formação e processamento de uma memória aversiva (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; DE KLOET; DERIJK; MEIJER, 2007; OITZL et al., 2010; HARRIS et al., 2013; DE KLOET, 2014).

No entanto, mais estudos são necessários para compreender especificamente em qual região neural essa atividade sobre o MR acontece, uma vez que a abordagem empregada foi a administração sistêmica e partimos do pressuposto que ao abordar as vias envolvidas no CAO e a coincidente expressão do MR nestas áreas, essa interação aconteceria nestas regiões neurais que estariam relacionadas à mediação das respostas defensivas.

## 6 CONSIDERAÇÕES GERAIS E CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho reforçam o condicionamento aversivo olfatório como uma ferramenta útil para o entendimento das bases biológicas do armazenamento de memórias aversivas. Ainda, demonstram o envolvimento do receptor MR sobre a resposta defensiva incondicionada, assim como o envolvimento destes receptores no armazenamento de memórias aversivas, modulando a aquisição e a consolidação das informações relacionadas aos estímulos aversivos, de acordo com o momento em que a manipulação farmacológica deste receptor acontece.

De maneira específica, os dados obtidos permitem inferir que:

- A injeção de agonista glutamatérgico NMDA 50 pmol na MCPdl, utilizada como estímulo incondicionado, estabelece um Condicionamento Olfatório Aversivo;

- A administração de antagonista MR antes da sessão de aquisição do condicionamento aversivo olfatório prejudicou as respostas defensivas incondicionadas frente à estimulação química da MCPdl e frente ao EC, sugerindo interferência na aquisição do CAO;

- A administração do antagonista do receptor MR espirolactona imediatamente após a sessão de condicionamento do CAO prejudicou a consolidação de uma memória aversiva, demonstrada pela redução das respostas defensivas frente ao EC;

- A administração do agonista do receptor MR fludrocortisona imediatamente após um estímulo com dose subefetiva de NMDA, potencializou as respostas defensivas frente ao EC na sessão de teste, fortalecendo a consolidação de uma memória aversiva;

- Por sua vez, a administração do agonista MR fludrocortisona 60 minutos antes da sessão de condicionamento, reduziu as respostas defensivas frente a estimulação química da MCPdl e prejudicou a evocação da resposta defensiva resultante da associação EC-EI, sugerindo uma interferência na aquisição do CAO.

Além disso, os dados obtidos reforçam o envolvimento do receptor MR não apenas na aquisição e consolidação das informações relacionadas a um CAO estabelecido pela injeção de NMDA na MCPdl, mas também nas respostas defensivas decorrentes da estimulação química da MCPdl.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRARI, K.; RASHIDY-POUR, A.; SEMNANIAN, S.; FATHOLLAHI, Y. Administration of corticosterone after memory reactivation disrupts subsequent retrieval of a contextual conditioned fear memory: Dependence upon training intensity. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, n. 2, p. 178–184, 2008.

ADAMEC, R. Does long term potentiation in periaqueductal gray (PAG) mediate lasting changes in rodent anxiety-like behavior (ALB) produced by predator stress? **Behavioural Brain Research**, v. 120, n. 2, p. 111–135, 2001.

ADAMEC, R.; MUIR, C.; GRIMES, M.; PEARCEY, K. Involvement of noradrenergic and corticoid receptors in the consolidation of the lasting anxiogenic effects of predator stress. **Behavioural Brain Research**, v. 179, n. 2, p. 192–207, 2007.

ALBIN, R. L.; MAKOWIEC, R. L.; HOLLINGSWORTH, Z.; DURE, L. S.; PENNEY, J. B.; YOUNG, a B. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. **Neuroscience letters**, v. 118, n. 1, p. 112–5, 1990.

APFELBACH, R.; BLANCHARD, C. D.; BLANCHARD, R. J.; HAYES, R. A.; MCGREGOR, I. S. The effects of predator odors in mammalian prey species: A review of field and laboratory studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 8, 2005.

BALDI, E.; BUCHERELLI, C. The inverted “u-shaped” dose-effect relationships in learning and memory: modulation of arousal and consolidation. **Nonlinearity in biology, toxicology, medicine**, v. 3, n. 1, p. 9–21, 2005.

BANDLER, R. Induction of “pag” following microinjections of glutamate into midbrain but not hypothalamus of cats. **Neuroscience Letters**, v. 30, n. 2, p. 183–188, 1982.

BANDLER, R.; CARRIVE, P. Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. **Brain Research**, v. 439, n. 1-2, p. 95–106, 1988.

BANDLER, R.; DEPAULIS, A.; VERGNES, M. Identification of midbrain

neurones mediating defensive behaviour in the rat by microinjections of excitatory amino acids. **Behavioural Brain Research**, v. 15, n. 2, p. 107–119, 1985.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M. T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends in Neurosciences**, 1994.

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Progress in Neurobiology**, 1995.

BEIJAMINI, V.; GUIMARÃES, F. S. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. **Behavioural Brain Research**, v. 170, n. 1, p. 52–61, 2006.

BEITZ, A. J.; SHEPARD, R. D. The midbrain periaqueductal gray in the rat. II. A Golgi analysis. **J Comp Neurol**, v. 237, n. 4, p. 460–475, 1985.

BERARDELLI, R.; KARAMOUZIS, I.; MARINAZZO, E.; PRATS, E.; PICU, A.; GIORDANO, R.; GHIGO, E.; ARVAT, E. Effect of acute and prolonged mineralocorticoid receptor blockade on spontaneous and stimulated hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. **European Journal of Endocrinology**, v. 162, n. 6, p. 1067–1074, 2010.

BERGER, S.; WOLFER, D. P.; SELBACH, O.; ALTER, H.; ERDMANN, G.; REICHARDT, H. M.; CHEPKOVA, A. N.; WELZL, H.; HAAS, H. L.; LIPP, H.-P.; SCHUTZ, G. Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioral plasticity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 1, p. 195–200, 2006.

BERTOGLIO, L. J.; ZANGROSSI, H. Involvement of dorsolateral periaqueductal gray N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors in the regulation of risk assessment and inhibitory avoidance behaviors in the rat elevated T-maze. **Behavioural pharmacology**, v. 17, n. 7, p. 589–96, 2006.

BHATNAGAR, S.; VIAU, V.; CHU, A.; SORIANO, L.; MEIJER, O. C.; DALLMAN, M. F. A cholecystokinin-mediated pathway to the paraventricular thalamus is recruited in chronically stressed rats and regulates hypothalamic-pituitary-adrenal function. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 14, p. 5564–5573, 2000.

BITTENCOURT, A. S.; CAROBREZ, A. P.; ZAMPROGNO, L. P.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L. C. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: Role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. **Neuroscience**, v. 125, n. 1, p. 71–89, 2004.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual review of psychology**, 1988.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Behavioral correlates of chronic dominance-subordination relationships of male rats in a seminatural situation. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 14, n. 18, p. 455–462, 1990.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. The Mouse Defense Test Battery: Pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 97–116, 28 fev. 2003.

BLUNDELL, J.; ADAMEC, R. Elevated pCREB in the PAG after exposure to the elevated plus maze in rats previously exposed to a cat. **Behavioural Brain Research**, v. 175, n. 2, p. 285–295, 2006.

BOLLES, R. C. Species-specific defence reactions and avoidance learning. **Psychological Review**, v. vol. 77, n. 1, p. 32–48, 1970.

BRANDÃO, M. L.; CARDOSO, S. H.; MELO, L. L.; MOTTA, V.; COIMBRA, N. C. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 18, n. 3, p. 339–346, 1994.

BRANDÃO, M. L.; DE AGUIAR, J. C.; GRAEFF, F. G. GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 16, n. 3, p. 397–402, 1982.

BRENNAN, P. A.; KEVERNE, E. B. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. **Progress in Neurobiology**, 1997.

BRINKS, V.; BERGER, S.; GASS, P.; DE KLOET, E. R.; OITZL, M. S. Mineralocorticoid receptors in control of emotional arousal and fear memory. **Hormones and Behavior**, v. 56, n. 2, p. 232–238, 2009.

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.

CANTERAS, N. S. Chapter 3.2 Neural systems activated in response to predators and partial predator stimulus. **Handbook of Behavioral Neuroscience**, 2008.

CANTERAS, N. S.; GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. **Neuroreport**, v. 10, n. 2, p. 413–418, 1999.

CANTERAS, N. S.; KROON, J. A. V.; DO-MONTE, F. H. M.; PAVESI, E.; CAROBREZ, A. P. Sensing danger through the olfactory system: The role of the hypothalamic dorsal preammillary nucleus. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2008.

CANTERAS, N. S.; PAVESI, E.; CAROBREZ, A. P. Olfactory instruction for fear: neural system analysis. **Frontiers in neuroscience**, v. 9, n. August, p. 276, 2015.

CAROBREZ, A. P.; TEIXEIRA, K. V.; GRAEFF, F. G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7-8, p. 697–709, 2001.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: Functional representation and neuronal organization. **Behavioural Brain Research**, v. 58, n. 1-2, p. 27–47, 1993.

CARVALHO-NETTO, E. F.; MARKHAM, C.; BLANCHARD, D. C.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; BLANCHARD, R. J. Physical environment modulates the behavioral responses induced by chemical stimulation of dorsal periaqueductal gray in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 85, n. 1, p. 140–147, 2006.

CAVALLI, J.; BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 92, n. 4, p. 512–518, 2009.

CHATTARJI, S.; TOMAR, A.; SUVRATHAN, A.; GHOSH, S.; RAHMAN, M. M. Neighborhood matters: divergent patterns of stress-induced plasticity

across the brain. **Nature Publishing Group**, v. 18, n. 10, p. 1364–1375, 2015.

COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. **Behavioural Brain Research**, v. 59, n. 1-2, p. 131–139, 1993.

COLLINGRIDGE, G. L.; LESTER, R. a. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. **Pharmacological reviews**, v. 41, n. 2, p. 143–210, 1989.

CORNELISSE, S.; JOËLS, M.; SMEETS, T. A randomized trial on mineralocorticoid receptor blockade in men: Effects on stress responses, selective attention, and memory. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, p. 2720–2728, 2011.

DARWIN, C.; A expressão das emoções no homem e nos animais. São Paulo: **Companhia das Letras**. (Trabalho original publicado em 1872), 2009.

DE KLOET, E. R. From receptor balance to rational glucocorticoid therapy. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 2754–2769, 2014.

DE KLOET, E. R.; DERIJK, R. H.; MEIJER, O. C. Therapy Insight: is there an imbalanced response of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in depression? **Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism**, v. 3, n. 2, p. 168–179, 2007.

DE KLOET, E. R.; REUL, J. M. H. M. Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: A concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. **Psychoneuroendocrinology**, v. 12, n. 2, p. 83–105, 1987.

DE KLOET, E. R.; VREUGDENHIL, E.; OITZL, M. S.; PHARMACOLOGY, M.; AMSTERDAM, L. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. **Endocrine Reviews**, v. 19, n. September, p. 269–301, 1998.

DE KLOET; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463–75, jun. 2005.

DE SOUZA ARMINI, R.; BERNABÉ, C. S.; ROSA, C. A.; SILLER, C. A.; SCHIMITEL, F. G.; TUFIK, S.; KLEIN, D. F.; SCHENBERG, L. C. In a rat model of panic, corticotropin responses to dorsal periaqueductal gray stimulation depend on physical exertion. **Psychoneuroendocrinology**, v. 53, n. January 2015, p. 136–147, 2015.

DELYANI, J. A. Mineralocorticoid receptor antagonists: the evolution of utility and pharmacology. **Kidney international**, v. 57, n. 4, p. 1408–11, abr. 2000.

DIELENBERG, R. A.; HUNT, G. E.; MCGREGOR, I. S. “When a rat smells a cat”: The distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. **Neuroscience**, v. 104, n. 4, p. 1085–1097, 2001.

DIELENBERG, R. A.; LEMAN, S.; CARRIVE, P. Effect of dorsal periaqueductal gray lesions on cardiovascular and behavioral responses to cat odor exposure in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 153, n. 2, p. 487–496, 2004.

DIELENBERG, R. A.; MCGREGOR, I. S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: A review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7-8, p. 597–609, 2001.

DO-MONTE, F. H. M.; CANTERAS, N. S.; FERNANDES, D.; ASSREUY, J.; CAROBREZ, A. P. New perspectives on beta-adrenergic mediation of innate and learned fear responses to predator odor. **The journal of neuroscience**, v. 28, n. 49, p. 13296–13302, 2008.

DOREY, R.; PIÉRARD, C.; SHINKARUK, S.; TRONCHE, C.; CHAUVEAU, F.; BAUDONNAT, M.; BÉRACOCHEA, D. Membrane mineralocorticoid but not glucocorticoid receptors of the dorsal hippocampus mediate the rapid effects of corticosterone on memory retrieval. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 13, p. 2639–49, 2011.

DUDAI, Y. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? **Annual Review of Psychology**, v. 55, n. 1, p. 51–86, 2004.

EVANSON, N. K.; TASKER, J. G.; HILL, M. N.; HILLARD, C. J.; HERMAN, J. P. Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. **Endocrinology**, v. 151, n. 10, p. 4811–4819, 2010.

FERGUSON, D.; SAPOLSKY, R. Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. **The Journal of neuroscience**, v. 27, n. 30, p. 8046–8052, 2007.

FERREIRA-NETTO, C.; BORELLI, K. G.; BRANDÃO, M. L. 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. 151–63, 21 jan. 2005.

GADEK-MICHALSKA, A.; SPYRKA, J.; RACHWALSKA, P.; TADEUSZ, J.; BUGAJSKI, J. Influence of chronic stress on brain corticosteroid receptors and HPA axis activity. **Pharmacological reports : PR**, v. 65, p. 1163–75, 2013.

GERSTNER, J. R.; YIN, J. C. Circadian rhythms and memory formation. **Nat.Rev.Neurosci.**, v. 11, n. 1471-0048 (Electronic), p. 577–588, 2010.

GLADDING, C. M.; FITZJOHN, S. M.; MOLNAR, E. Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Long- Term Depression: Molecular Mechanisms. **Pharmacological reviews**, v. 61, n. 4, p. 395–412, 2009.

GOMEZ-SANCHEZ, E. The Multifaceted Mineralocorticoid Receptor. **Compr Physiol**. 2014 July; 4(3): 965–994, v. 73, n. 4, p. 389–400, 2014.

GRAEFF, FG, SANT'ANA, AB, VIELA-COSTA, HH, ZANGROSSI, H. New findings on the neurotransmitter modulation of defense in the dorsal periaqueductal gray. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 14, n. 8, p. 988–95, 2015.

GROENEWEG, F. L.; KARST, H.; DE KLOET, E. R.; JOËLS, M. Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. **Journal of Endocrinology**, v. 209, n. 2, p. 153–167, 2011.

GROENEWEG, F. L.; KARST, H.; DE KLOET, E. R.; JOËLS, M. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 350, n. 2, p. 299–309, 2012.

GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nature Reviews**

**Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 651–658, 2012.

HARRIS, A. P.; HOLMES, M. C.; DE KLOET, E. R.; CHAPMAN, K. E.; SECKL, J. R. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in control of HPA axis and behaviour. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 5, p. 648–658, 2013.

HEEGDE. The brain mineralocorticoid receptor and stress resilience. **Psychoneuroendocrinology**, v. 52, p. 92–110, 2015.

HERRY, C.; JOHANSEN, J. P. Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. **Nature neuroscience**, v. 17, n. 12, p. 1644–1654, 2014.

JOËLS, M. Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 5, p. 244–250, 2006.

JOËLS, M. Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. **European Journal of Pharmacology**, v. 583, n. 2-3, p. 312–321, 2008.

JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 459–66, 2009.

JOËLS, M.; KARST, H.; DERIJK, R.; DE KLOET, E. R. The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. **Trends in Neurosciences**, v. 31, n. 1, p. 1–7, 2008.

JOËLS, M.; KRUGERS, H. J.; LUCASSEN, P. J.; KARST, H. **Corticosteroid effects on cellular physiology of limbic cells** *Brain Research*, 2009.

JOËLS, M.; PU, Z.; WIEGERT, O.; OITZL, M. S.; KRUGERS, H. J. Learning under stress: how does it work? **Trends in Cognitive Sciences**, v. 10, n. 4, p. 152–158, 2006.

JOELS, M.; SARABDJITSINGH, R. A.; KARST, H. Unraveling the Time Domains of Corticosteroid Hormone Influences on Brain Activity: Rapid, Slow, and Chronic Modes. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 4, p. 901–938, 2012.

JOHNSON, L. R.; FARB, C.; MORRISON, J. H.; MCEWEN, B. S.; LEDOUX, J. E. Localization of glucocorticoid receptors at postsynaptic

membranes in the lateral amygdala. **Neuroscience**, v. 136, n. 1, p. 289–299, 2005.

KANATSOU, S.; HORST, J. P. Ter; HARRIS, A. P.; SECKL, J. R.; KRUGERS, H. J.; JOËLS, M.; WOLF, O. T. Effects of Mineralocorticoid Receptor Overexpression on Anxiety and Memory after Early Life Stress in Female Mice. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 9, n. January, p. 1–10, 2016.

KARST, H.; BERGER, S.; ERDMANN, G.; SCHÜTZ, G.; JOËLS, M. Metaplasticity of amygdalar responses to the stress hormone corticosterone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 32, p. 14449–54, 2010.

KARST, H.; BERGER, S.; TURIAULT, M.; TRONCHE, F.; SCHÜTZ, G.; JOËLS, M. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 52, p. 19204–19207, 2005.

KINCHESKI, G. C.; MOTA-ORTIZ, S. R.; PAVESI, E.; CANTERAS, N. S.; CAROBREZ, A. P. The dorsolateral periaqueductal gray and its role in mediating fear learning to life threatening events. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e50361, jan. 2012.

KLASSEN, J. J.; WILLIAMS, D. A.; BOLSTER, B.; TAIT, R. W. Influence of dorsolateral periaqueductal grey (dIPAG) lesions on contextual conditioning with massed and distributed shock. **Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B: Comparative and Physiological Psychology**, v. 55, n. 1, p. 27–42, 2002.

KLEIN, S.; NICOLAS, L. B.; LOPEZ-LOPEZ, C.; JACOBSON, L. H.; MCARTHUR, S. G.; GRUNDSCHÖBER, C.; PRINSSSEN, E. P. Examining face and construct validity of a noninvasive model of panic disorder in Lister-hooded rats. **Psychopharmacology**, v. 211, n. 2, p. 198–208, 2010.

KOLLACK-WALKER, S.; DAY, H. E. W.; AKIL, H. Central Stress Neurocircuits. **Encyclopedia of Stress**. [s.l: s.n.]p. 424–432.

KOOLHAAS, J. M.; BARTOLOMUCCI, A.; BUWALDA, B.; DE BOER, S. F.; FLÜGGE, G.; KORTE, S. M.; MEERLO, P.; MURISON, R.; OLIVIER, B.; PALANZA, P.; RICHTER-LEVIN, G.; SGOIFO, A.;

STEIMER, T.; STIEDL, O.; VAN DIJK, G.; WÖHR, M.; FUCHS, E. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2011.

KRIEGER, J. E.; GRAEFF, F. G. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 18, n. 1, p. 61–67, 1985.

KRITIS, A. A.; STAMOULA, E. G.; PANISKAKI, K. A.; VAVILIS, T. D. Researching glutamate - induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 9, p. 91, 2015.

KROON, J. a V; CAROBREZ, A. P. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, propranolol or scopolamine. **Neurobiology of learning and memory**, v. 91, n. 1, p. 32–40, jan. 2009.

KRUGERS, H. J.; HOOGENRAAD, C. C.; GROG, L. Stress hormones and AMPA receptor trafficking in synaptic plasticity and memory. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 675–681, 2010.

LEDOUX, J. The emotional brain, fear, and the amygdala. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2003.

LEDOUX, J. E. Emotion Circuits in the Brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 155–184, 2000.

LEDOUX, J. E. Evolution of human emotion. A view through fear. **Progress in Brain Research**, v. 195, p. 431–442, 2012.

LEUNER, B.; GLASPER, E. R.; GOULD, E. Sexual experience promotes adult neurogenesis in the hippocampus despite an initial elevation in stress hormones. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, 2010.

LEVINE, S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. **Psychoneuroendocrinology**, 2005.

LEVINE, S.; URSIN, H. What is stress? **Stress - Neurobiology and Neuroendocrinology**. [s.l: s.n.]p. 3–21.

LI, M.; HAN, F.; SHI, Y. Expression of locus coeruleus mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in rats under single-prolonged stress.

**Neurological Sciences**, v. 32, n. 4, p. 625–631, 2011.

LISTON, C.; CICHON, J. M.; JEANNETEAU, F.; JIA, Z.; CHAO, M. V.; GAN, W.-B. Circadian glucocorticoid oscillations promote learning-dependent synapse formation and maintenance. **Nature neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 698–705, 2013.

MALISCH, J. L.; SALTZMAN, W.; GOMES, F. R.; REZENDE, E. L.; JESKE, D. R.; GARLAND, T. Baseline and stress-induced plasma corticosterone concentrations of mice selectively bred for high voluntary wheel running. **Physiological and biochemical zoology : PBZ**, v. 80, n. 1, p. 146–56, 2013.

MCEOWN, K.; TREIT, D. Mineralocorticoid receptors in the medial prefrontal cortex and hippocampus mediate rats' unconditioned fear behaviour. **Hormones and Behavior**, v. 60, n. 5, p. 581–588, 2011.

MCEWEN, B. S. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, p. 33–44, 1998.

MCEWEN, B. S. Stress: Homeostasis, rheostasis, allostasis and allostatic load. In: **Encyclopedia of Neuroscience**. [s.l: s.n.]p. 557–561.

MCGAUGH, J. L. Memory—a Century of Consolidation. **Science**, v. 287, n. 248, p. 248–251, 2000.

MCGREGOR, I. S.; SCHRAMA, L.; AMBERMOON, P.; DIELENBERG, R. A. Not all “predator odours” are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 129, n. 1-2, p. 1–16, 2002.

MEDINA, A. C.; CHARLES, J. R.; ESPINOZA-GONZÁLEZ, V.; SÁNCHEZ-RESENDIS, O.; PRADO-ALCALÁ, R. a; ROOZENDAAL, B.; QUIRARTE, G. L. Glucocorticoid administration into the dorsal striatum facilitates memory consolidation of inhibitory avoidance training but not of the context or footshock components. **Learning & memory**, v. 14, n. 10, p. 673–677, 2007.

MÉNARD, J. The 45-year story of the development of an anti-aldosterone more specific than spironolactone. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 217, n. 1-2, p. 45–52, 31 mar. 2004.

MIRANDA, M. I.; QUIRARTE, G. L.; RODRIGUEZ-GARCIA, G.; MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Glucocorticoids enhance taste aversion memory via actions in the insular cortex and basolateral amygdala. **Learning & memory**, v. 15, n. 7, p. 468–76, 2008.

MORAES, C. L. K.; BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Interplay between glutamate and serotonin within the dorsal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior of rats exposed to the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 194, n. 2, p. 181–186, 2008.

MOU, X. What Role do Circadian Rhythms Play in Learning and Memory? **Journal of Neurology & Neurophysiology**, v. 07, n. 02, p. 2–5, 2016.

MUNGER, S. D.; LEINDERS-ZUFALL, T.; ZUFALL, F. Subsystem organization of the mammalian sense of smell. **Annual review of physiology**, v. 71, p. 115–140, 2009.

MURISON, R. The Neurobiology of Stress. In: **The Neuroscience of Pain, Stress, and Emotion: Psychological and Clinical Implications**. [s.l.: s.n.].p. 29–49.

OITZL, M. S.; CHAMPAGNE, D. L.; VAN DER VEEN, R.; DE KLOET, E. R. Brain development under stress: Hypotheses of glucocorticoid actions revisited. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 6, p. 853–866, 2010.

OITZL, M. S.; DE KLOET, E. R. Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. **Behavioral neuroscience**, v. 106, n. 1, p. 62–71, 1992.

OITZL, M. S.; FLUTTERT, M.; DE KLOET, E. R. The effect of corticosterone on reactivity to spatial novelty is mediated by central mineralocorticosteroid receptors. **European Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 7, p. 1072–1079, 1994.

OKUDA, S.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 3, p. 853–858, 2004.

OTTO, T.; COUSENS, G.; HERZOG, C. Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. **Behavioural Brain Research**, 1-

2, 2000.

OTTO, T.; COUSENS, G.; RAJEWSKI, K. Odor-guided fear conditioning in rats: 1. Acquisition, retention, and latent inhibition. **Behavioral neuroscience**, v. 111, n. 6, p. 1257–1264, 1997.

PACAK; PALKOVITS. Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses : Implications for Stress-Related Disorders. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. July, p. 502–548, 2001.

PAVESI, E.; CANTERAS, N. S.; CAROBREZ, A. P. Acquisition of Pavlovian fear conditioning using  $\beta$ -adrenoceptor activation of the dorsal premammillary nucleus as an unconditioned stimulus to mimic live predator-threat exposure. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 5, p. 926–39, 2011.

PITTMAN, Q. J.; BLUME, H. W.; RENAUD, L. P. Connections of the hypothalamic paraventricular nucleus with the neurohypophysis, median eminence, amygdala, lateral septum and midbrain periaqueductal gray: An electrophysiological study in the rat. **Brain Research**, v. 215, n. 1-2, p. 15–28, 1981.

POPOLI, M.; YAN, Z.; MCEWEN, B. S.; SANACORA, G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 22–37, 2012.

PRAGER, E. M.; BRIELMAIER, J.; BERGSTROM, H. C.; MCGUIRE, J.; JOHNSON, L. R. Localization of mineralocorticoid receptors at mammalian synapses. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, 2010.

PRAGER, E. M.; JOHNSON, L. R. **Stress at the synapse: signal transduction mechanisms of adrenal steroids at neuronal membranes.** *Science signaling*, 2009.

RESTREPO, D.; ARELLANO, J.; OLIVA, A. M.; SCHAEFER, M. L.; LIN, W. **Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice** *Hormones and Behavior*, 2004.

REUL, J. M. H. M.; DE KLOET, E. R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. **Endocrinology**, v. 117, n. 6, p. 2505–2511, 1985.

REUL, J. M. H. M.; GESING, A.; DROSTE, S.; STEC, I. S. M.; WEBER, A.; BACHMANN, C.; BILANG-BLEUEL, A.; HOLSBOER, F.; LINTHORST, A. C. E. The brain mineralocorticoid receptor: Greedy for ligand, mysterious in function. **European Journal of Pharmacology**, 1-3, 2000.

RIBOT, M.; POLITO, A.; GRASSIN-DELYLE, S.; ANNANE, D.; ALVAREZ, J. C. Human plasma quantification of fludrocortisone using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry after low-dosage administration. **Clin Chim Acta**, v. 420, p. 109–113, 2012.

RIMMELE, U.; BESEDOVSKY, L.; LANGE, T.; BORN, J. Blocking mineralocorticoid receptors impairs, blocking glucocorticoid receptors enhances memory retrieval in humans. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 5, p. 884–94, 2013.

RODRIGUES, S. M.; LEDOUX, J. E.; SAPOLSKY, R. M. The influence of stress hormones on fear circuitry. **Annual review of neuroscience**, v. 32, p. 289–313, 2009.

ROMERO, L. M.; DICKENS, M. J.; CYR, N. E. The reactive scope model - A new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. **Hormones and Behavior**, 2009.

ROOZENDAAL, B. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. **Psychoneuroendocrinology**, 2000.

ROOZENDAAL, B. Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. **Neurobiology of learning and memory**, v. 78, n. 3, p. 578–595, 2002.

ROOZENDAAL, B. and M. J. L. NIH Public Access. **Behavioral Neuroscience**, v. 125, n. 6, p. 797–824, 2012.

ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Basolateral amygdala lesions block the memory enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 76–83, 1997.

SADÉE, W.; ABSHAGEN, U.; FINN, C.; RIETBROCK, N. Conversion of spironolactone to canrenone and disposition kinetics of spironolactone and

canrenoate-SADÉE, W. et al. Conversion of spironolactone to canrenone and disposition kinetics of spironolactone and canrenoate-potassium in rats. Naunyn-schmiedeberg. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 283, n. 3, p. 303–318, 1974.

SANDI, C.; LOSCERTALES, M.; GUAZA, C. Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. **The European journal of neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 637–642, 1997.

SANDI, C.; ROSE, S. P. R. Corticosteroid receptor antagonists are amnesic for passive avoidance learning in day-old chicks. **European Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 8, p. 1292–1297, 1994.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, 2000.

SARABDJITSINGH, R. A.; PASRICHA, N.; SMEETS, J. A. S.; KERKHOFS, A.; MIKASOVA, L.; KARST, H.; GROG, L.; JOËLS, M. Hippocampal Fast Glutamatergic Transmission Is Transiently Regulated by Corticosterone Pulsatility. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0145858, 7 jan. 2016.

SCHENBERG, L. C.; DE AGUIAR, J. C.; GRAEFF, F. G. GABA modulation of the defense reaction induced by brain electrical stimulation. **Physiology and Behavior**, v. 31, n. 4, p. 429–437, 1983.

SCHENBERG, L. C.; DOS REIS, A. M.; FERREIRA PÓVOA, R. M.; TUFIK, S.; SILVA, S. R. A panic attack-like unusual stress reaction. **Hormones and Behavior**, v. 54, n. 5, p. 584–591, 2008.

SCHULKIN, J.; MORGAN, M. A.; ROSEN, J. B. **A neuroendocrine mechanism for sustaining fear** *Trends in Neurosciences*, 2005.

SCHWABE, L.; JOELS, M.; ROOZENDAAL, B.; WOLF, O. T.; OITZL, M. S. Stress effects on memory: An update and integration. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 7, p. 1740–1749, 2012.

SECKL, J. R.; FINK, G. Antidepressants increase glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat hippocampus in vivo. **Neuroendocrinology**, v. 55, n. 6, p. 621–626, 1992.

SMARR, B. L.; JENNINGS, K. J.; DRISCOLL, J. R.; KRIEGSFELD, L. J.

A time to remember: The role of circadian clocks in learning and memory. **Behavioral neuroscience**, v. 128, n. 3, p. 283–303, 2014.

SOUZA, R. R.; CAROBREZ, A. P. Acquisition and expression of fear memories are distinctly modulated along the dorsolateral periaqueductal gray axis of rats exposed to predator odor. **Behavioural Brain Research**, v. 315, p. 160–167, 2016.

SOUZA, R. R.; DAL BÓ, S.; DE KLOET, E. R.; OITZL, M. S.; CAROBREZ, A. P. Paradoxical mineralocorticoid receptor-mediated effect in fear memory encoding and expression of rats submitted to an olfactory fear conditioning task. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 201–211, 2014.

TAKAHASHI, L. K. Olfactory systems and neural circuits that modulate predator odor fear. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, p. 72, 2014.

TASKER, J. G.; JOËLS, M. The Synaptic Physiology of the Central Nervous System Response to Stress. **Neuroendocrinology of Stress**, p. 43–70, 2015.

TER HORST, J. P.; VAN DER MARK, M.; KENTROP, J.; ARP, M.; VAN DER VEEN, R.; DE KLOET, E. R.; OITZL, M. S. Deletion of the forebrain mineralocorticoid receptor impairs social discrimination and decision-making in male, but not in female mice. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, n. February, p. 26, 2014.

TRAYNELIS, S. F.; WOLLMUTH, L. P.; MCBAIN, C. J.; MENNITI, F. S.; VANCE, K. M.; OGDEN, K. K.; HANSEN, K. B.; YUAN, H.; MYERS, S. J.; DINGLELINE, R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. **Pharmacological reviews**, v. 62, n. 3, p. 405–96, 2010.

TRECCANI, G.; MUSAZZI, L.; PEREGO, C.; MILANESE, M.; NAVA, N.; BONIFACINO, T.; LAMANNA, J.; MALGAROLI, A.; DRAGO, F.; RACAGNI, G.; NYENGAARD, J. R.; WEGENER, G.; BONANNO, G.; POPOLI, M. Stress and corticosterone increase the readily releasable pool of glutamate vesicles in synaptic terminals of prefrontal and frontal cortex. **Molecular Psychiatry**, v. 19, n. 4, p. 433–443, 2014.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397–409, 2009.

VIANNA, D. M. L.; BRANDÃO, M. L. Anatomical connections of the

periaqueductal gray: Specific neural substrates for different kinds of fear. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2003.

VOGEL, S.; FERNÁNDEZ, G.; JOËLS, M.; SCHWABE, L. Cognitive Adaptation under Stress : A Case for the Mineralocorticoid Receptor. **Trends in Cognitive Sciences**, v. xx, p. 1–12, 2015.

WALKER, D. L.; DAVIS, M. Involvement of the dorsal periaqueductal gray in the loss of fear-potentiated startle accompanying high footshock training. **Behavioral neuroscience**, v. 111, n. 4, p. 692–702, 1997.

WANG, M.; HILL, M. N.; ZHANG, L.; GORZALKA, B. B.; HILLARD, C. J.; ALGER, B. E. Acute restraint stress enhances hippocampal endocannabinoid function via glucocorticoid receptor activation. **Journal of psychopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 56–70, 2012.

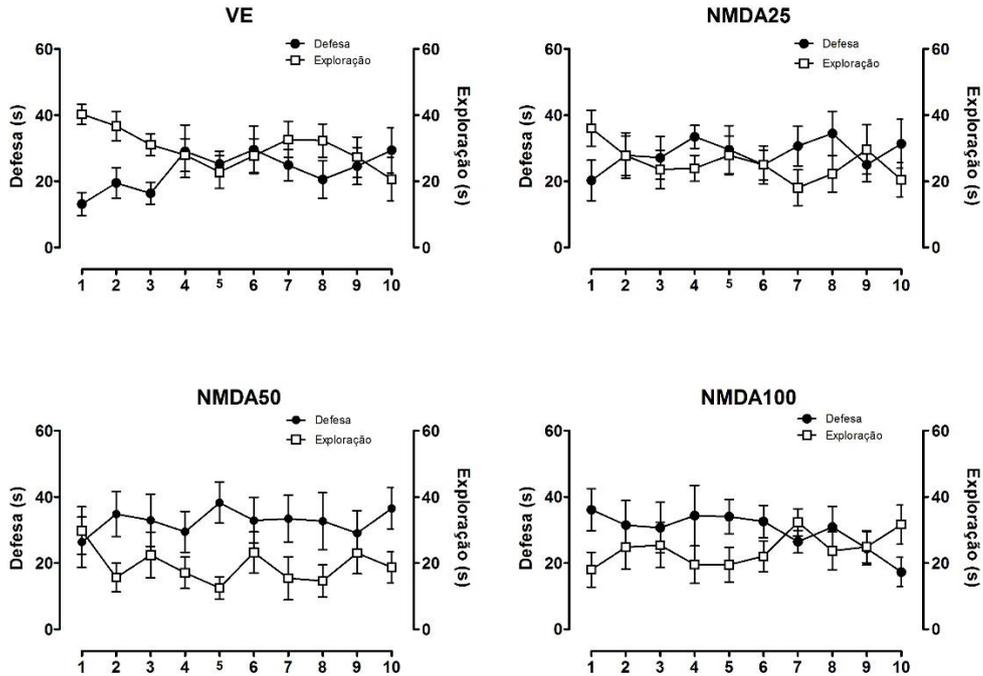
YAU, J. L. W.; SECKL, J. R. Local amplification of glucocorticoids in the aging brain and impaired spatial memory. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 4, n. August, p. 24, jan. 2012.

YOUNG, E. A.; ABELSON, J.; LIGHTMAN, S. L. Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 2004.

ZORAWSKI, M.; KILLCROSS, S. Posttraining glucocorticoid receptor agonist enhances memory in appetitive and aversive Pavlovian discrete-cue conditioning paradigms. **Neurobiology of learning and memory**, v. 78, p. 458–464, 2002.

**APÊNDICE A**

**Comportamentos avaliados na sessão de condicionamento do Condicionamento Olfatório Aversivo utilizando a injeção de NMDA na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral como estímulo incondicionado.**



**Figura 1 – Representação minuto a minuto dos comportamentos defensivos e exploratórios durante os 10 minutos da sessão de condicionamento com NMDA como EI no CAO. Os pontos representam a média  $\pm$  e.p.m. Número de animais por grupo: VE= 8, NMDA25= 8, NMDA50= 8 e NMDA100=8.**



