

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Franklin Back

INTERFERÊNCIA DA SINALIZAÇÃO ENDOCANABINOIDE CB1
E VANILOIDE TRPV1 NA REAÇÃO DE DEFESA
INCONDICIONADA PRODUZIDA PELO N-METIL-D-
ASPARTATO APLICADO NA MATÉRIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSOLATERAL E NA CONSEQUENTE
AQUISIÇÃO DE UM CONDICIONAMENTO AVERSIVO
OLFATÓRIO

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio de
Pádua Carobrez

Florianópolis
2016

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

Back, Franklin Panato

INTERFERÊNCIA DA SINALIZAÇÃO ENDOCANABINOIDE CB1 E
VANILOIDE TRPV1 NA REAÇÃO DE DEFESA INCONDICIONADA
PRODUZIDA PELO N-METIL-D-ASPARTATO APLICADO NA MATÉRIA
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSOLATERAL E NA CONSEQUENTE
AQUISIÇÃO DE UM CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO /
Franklin Panato Back ; orientador, Antônio de Pádua
Carobrez - Florianópolis, SC, 2016.

166 p.

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

Inclui referências

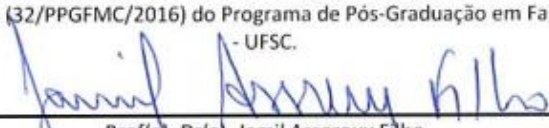
1. Farmacologia. 2. Matéria cinzenta periaquedutal. 3.
Aprendizagem. 4. Endocanabinoides. 5. Vaniloides. I.
Carobrez, Antônio de Pádua . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.
III. Título.

"Interferência da Sinalização Endocanabinoide CB1 e Vaniloide TRPV1 na Reação de Defesa Incondicionada Produzida Pelo N-Metil-D-Aspartato Aplicado na Matéria Cinzenta Periaqueductal Dorsolateral e na Consequente Aquisição de um Condicionamento Aversivo Olfatório"

Por

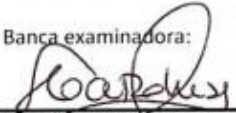
Franklin Panato Back

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (32/PPGFMC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.

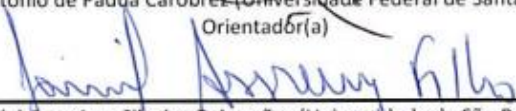


Prof(a). Dr(a). Jamil Assereuy Filho
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

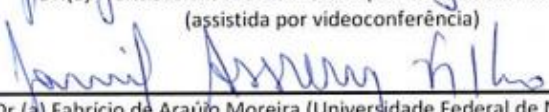
Banca examinadora:



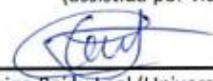
Dr.(a) Antonio de Pádua Carobrez (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr.(a) Francisco Silveira Guimarães (Universidade de São Paulo)
(assistida por videoconferência)



Dr.(a) Fabricio de Araújo Moreira (Universidade Federal de Minas Gerais)
(assistida por videoconferência)



Dr.(a) Rodrigo Baimy Leal (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) José Marino Neto (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Leandro José Bertoglio (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 02 de Dezembro de 2016.

Durante a realização do presente trabalho, o autor foi beneficiário de uma bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), contou com recursos e estrutura provenientes da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Agradecimentos

Agradeço ao professor Antônio de Pádua Carobrez, pelo incentivo ao meu crescimento como pesquisador, pela insistência em me convencer de que o mundo não é preto-no-branco e por tentar diluir meu cartesianismo.

Aos professores Francisco Guimarães, José Marino Neto, Fabrício Moreira, Leandro Bertoglio, Rodrigo Leal e Thereza Christina Monteiro de Lima, os quais considero referências para minha carreira, agradeço por aceitarem avaliar este trabalho.

Aos professores Leandro Bertoglio, Cilene Lino de Oliveira, Thereza Christina Monteiro de Lima e aos *postdocs* Ana Cristina Guerra de Souza e Daniel Rial, agradeço pelas contribuições ao trabalho e conselhos no momento da qualificação.

Agradeço aos demais professores do departamento, pelo conhecimento compartilhado nas disciplinas e pela disponibilidade de responder meus questionamentos sempre que os procurei.

Aos colegas de laboratório, que ao compartilharem suas experiências, se tornaram meus amigos. Rimenez Souza, Grazi Kincheski, Eloisa Pavesi, Ju Kroon, Ju Cavalli, Cris Mochny, Marcelo Giachero, Camila Zanella, Lucía Acuña, Ana Idalina e Fernando Melleu, obrigado por tornarem o ambiente de laboratório mais agradável e produtivo.

Aos integrantes dos seminários de neuropsicofarmacologia: Cris Stern, Lucas Gazarini, Rafael Scoz, Felipe Vanz, Fernanda Troyner, Hugo Bayer, Jaqueline Franzen e Bárbara Santos, agradeço pelo crescimento através das discussões de temas tão interessantes.

Aos demais funcionários da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), que são eficientes em suas funções e também procuraram reduzir a burocracia inerente à atividade de pós-graduação: Pedro, Scheila, Thaís, Rebeca, Sérgio e Andréia, obrigado.

Aos meus amigos de fora do meio acadêmico, apesar de muitas vezes nem fazer ideia do meu estudo, compreenderam as frustrações, a ausência e colaboraram para as vitórias: muito obrigado.

Sou grato a minha família, que me incentivava a perseguir meus sonhos e de onde tiro os maiores exemplos de honestidade e seriedade.

Ao apoio incondicional da minha parceira Daiana, por participar de tudo, compreender a ausência, ouvir e aconselhar, corrigir meu texto e montar as figuras, muito obrigado.

Todos vocês contribuíram para este trabalho.

“O universo é uma harmonia de contrários.”
Pitágoras

“Jogaram uma pedra na tranquilidade do lago. O lago comeu-a.
Sorriu ondulações. Voltou a ficar tranquilo.”
Hermógenes de Tarso

*“Whether you can observe a thing or not depends on the theory which you use.
It is the theory which decides what can be observed.”*
Albert Einstein

Resumo

A estrutura mesencefálica matéria cinzenta periaquedutal (MCP), quando estimulada, produz respostas defensivas como fuga e saltos. Estes comportamentos refletem uma valência emocional negativa, pois ratos apresentam motivação para encerrar este estímulo. Em humanos, a estimulação desta estrutura gera relatos similares a uma crise de pânico, confirmando sua translacionalidade funcional. No entanto, a MCP apresenta níveis de ativação menores, relacionados à manutenção de sistemas essenciais para a vida. Sendo assim, trata-se de uma estrutura passível de modulação, e não de uma estação de relê com respostas de tudo ou nada. Portanto, foram propostos mecanismos locais de controle, relacionados às respostas defensivas imediatas, ligadas à aprendizagem de eventos traumáticos.

Neste âmbito, os receptores CB1 e TRPV1 poderiam atuar no ajuste de respostas comportamentais adequadas à situação de ameaça. Para esta investigação utilizou-se um protocolo de condicionamento aversivo olfatório, no qual os animais receberam microinjeções do agonista glutamatérgico NMDA na MCPdl (porção dorsolateral da MCP). Em seguida, foram expostos a um odor com valência emocional neutra. Uma reexposição a este odor, 48 horas depois, desencadeou respostas de esquiva nos animais, confirmando que um caráter aversivo foi associado a esta pista olfatória.

Os principais resultados indicaram que: 1) o antagonista/agonista inverso de receptores CB1 (AM251), bem como o agonista de receptores TRPV1 (capsaicina), foram capazes de potencializar os efeitos de uma estimulação sutil de NMDA na MCPdl; 2) a capsaicina produziu o condicionamento aversivo *per se* quando usada na maior dose; 3) a combinação de AM251 e capsaicina foi capaz de promover o condicionamento; 4) a redução da liberação de glutamato (por meio do riluzol) interferiu sobre as respostas defensivas e prejudicou a aprendizagem nos tratamentos anteriores; 5) resultados similares ao riluzol foram observados com o bloqueio de receptores AMPA/cainato pelo DNQX. Notavelmente, a redução na liberação de glutamato ou o bloqueio de receptores AMPA/cainato produziram uma potencialização das respostas defensivas quando associados ao NMDA.

Portanto, foram propostos mecanismos de modulação na MCPdl que dependem de NMDA-CB1/TRPV1-liberação de glutamato-AMPA/cainato. Sugere-se que os receptores NMDA têm maior peso sobre a emissão de respostas defensivas imediatas, e os AMPA/cainato sobre a aprendizagem resultante da estimulação da MCPdl. Palavras-chave: endocanabinoides, vaniloides, modulação, condicionamento.

Abstract

The mesencephalic structure periaqueductal gray matter (PAG), when stimulated, generates defensive responses as flight and jumping. These responses are related to an emotional negative valence, as rats interrupt the stimulation if given the opportunity. Studies in humans indicate that stimulation of the same structure provoked a sensation similar to a panic attack, which confirms a translational aspect. Actually, lower levels of PAG activation are related to homeostasis of life-supporting systems. Therefore, the PAG could be considered a structure submitted to a rigorous modulation, but not just as a relay station of an all-or-nothing response. In the present work, local control mechanisms are proposed, which could be expressed by the relation between instantaneous defensive responses and learning from a traumatic experience as PAG stimulation.

Based on the scientific literature, local CB1 and TRPV1 receptors could regulate behavioral responses in order to adequate them to a threatening situation. To investigate that, an olfactory conditioning aversive paradigm was tested. Thus, animals were submitted to dIPAG (dorsolateral portion of PAG) glutamatergic stimulation by NMDA receptors. Just after microinjections, rats were exposed to a neutral odor. When re-exposed to the same odor, 48 hours later, animals expressed avoidance. This finding was interpreted as an associative learning between odor and the aversive sensation.

Main results indicate that: 1) both CB1 inverse agonist and TRPV1 agonist promoted conditioning when associated with an ineffective dose of NMDA intra-dIPAG; 2) TRPV1 agonist produced aversive conditioning when a higher dose was injected; 3) CB1 inverse agonist associated with TRPV1 agonist produced aversive conditioning; 4) inhibition of glutamate release disrupted defensive responses and impaired learning; 5) AMPA/kainate blockage reproduced the results observed with the inhibition of glutamate release in all groups tested. Unexpectedly, inhibition of glutamate release or AMPA/kainate blockage potentiated defensive responses when associated to NMDA.

Thus, an intra-dIPAG modulation mechanism was proposed, consisting of NMDA-CB1/TRPV1-glutamate release-AMPA/kainate. Besides that, it is suggested that defensive responses are mainly regulated by NMDA, whereas AMPA/kainate receptors have higher importance for learning processes of the traumatic experience. **Keywords:** endocannabinoids, vanilloids, modulation, conditioning.

Lista de tabelas

Tabela 1 – Principais intervenções farmacológicas na MCPdl em testes comportamentais de respostas defensivas: sistema endocanabinoide e vaniloide.....	18
Tabela 2, apêndice C – Moduladores farmacológicos na MCPdl em testes comportamentais de respostas defensivas ou aprendizagem: sistema endocanabinoide, vaniloide, glutamatérgico, nitrérgico, serotonérgico, corticotrofina, colecistocinina e GABAérgico.....	128

Lista de figuras

1 – Matéria cinzenta periaquedutal e divisões.....	6
2 – Receptores glutamatérgicos.....	8
3 – Protocolo experimental.....	28
4 – Critérios histológicos, fotos.....	39
5 – Critérios histológicos, diagramas.....	40
6 – Resultados do experimento 1 durante o condicionamento: respostas defensivas e não defensivas logo após a microinjeção de NMDA na MCPdl.....	43
7 – Figura 6: Resultados do experimento 1 durante a reexposição ao odor: respostas de aproximação e esquiva frente ao odor condicionado nos animais que receberam NMDA no dia do condicionamento.....	44
8 – Resultados do experimento 2 durante o condicionamento: respostas defensivas e não defensivas logo após a microinjeção de AM251 e NMDA na MCPdl.....	46
9 – Resultados do experimento 2 durante a reexposição ao odor: respostas de aproximação e esquiva frente ao odor condicionado nos animais que receberam AM251 e NMDA no dia do condicionamento.....	47
10 – Resultados do experimento 3 durante o condicionamento: respostas defensivas e não defensivas logo após a microinjeção de capsaicina na MCPdl.....	49
11 – Resultados do experimento 3 durante a reexposição ao odor: respostas de aproximação e esquiva frente ao odor condicionado nos animais que receberam capsaicina no dia do condicionamento.....	50
12 – Resultados do experimento 4 durante o condicionamento: respostas defensivas e não defensivas logo após a microinjeção de AP5 e capsaicina na MCPdl.....	51
13 – Resultados do experimento 4 durante a reexposição ao odor: respostas de aproximação e esquiva frente ao odor condicionado nos animais que receberam AP5 e capsaicina no dia do condicionamento.....	53
14 – Resultados do experimento 5 durante o condicionamento: respostas defensivas e não defensivas logo após a microinjeção de capsaicina e NMDA na MCPdl.....	54
15 – Resultados do experimento 5 durante a reexposição ao odor: respostas de aproximação e esquiva frente ao odor condicionado nos animais que receberam capsaicina e NMDA no dia do condicionamento.....	55

16 – Resultados do experimento 6 durante o condicionamento: respostas defensivas e não defensivas logo após a microinjeção de AM251 e capsaicina na MCPdl.....	57
17 – Resultados do experimento 6 durante a reexposição ao odor: respostas de aproximação e esquiva frente ao odor condicionado nos animais que receberam AM251 e capsaicina no dia do condicionamento.....	58
18 – Resultados do experimento 7 durante o condicionamento: respostas defensivas e não defensivas logo após a microinjeção de AM251, capsaicina e NMDA na MCPdl.....	60
19 – Resultados do experimento 7 durante a reexposição ao odor: respostas de aproximação e esquiva frente ao odor condicionado nos animais que receberam AM251, capsaicina e NMDA no dia do condicionamento.....	61
20 – Resultados do experimento 8 durante o condicionamento: respostas defensivas e não defensivas logo após a microinjeção de riluzol, AM251 e NMDA na MCPdl.....	63
21 – Resultados do experimento 8 durante a reexposição ao odor: respostas de aproximação e esquiva frente ao odor condicionado nos animais que receberam riluzol, AM251 e NMDA no dia do condicionamento.....	65
22 – Resultados do experimento 9 durante o condicionamento: respostas defensivas e não defensivas logo após a microinjeção de DNQX, AM251 e NMDA na MCPdl.....	67
23 – Resultados do experimento 9 durante a reexposição ao odor: respostas de aproximação e esquiva frente ao odor condicionado nos animais que receberam DNQX, AM251 e NMDA no dia do condicionamento.....	69
24 – Resultados do experimento 10 durante o condicionamento: respostas defensivas e não defensivas logo após a microinjeção de riluzol e capsaicina na MCPdl.....	70
25 – Resultados do experimento 10 durante a reexposição ao odor: respostas de aproximação e esquiva frente ao odor condicionado nos animais que receberam riluzol e capsaicina no dia do condicionamento.....	72
26 – Resultados do experimento 11 durante o condicionamento: respostas defensivas e não defensivas logo após a microinjeção de DNQX e capsaicina na MCPdl.....	73
27 – Resultados do experimento 11 durante a reexposição ao odor: respostas de aproximação e esquiva frente ao odor condicionado nos	

animais que receberam DNQX e capsaicina no dia do condicionamento.....	75
28 – Resultados do experimento 12 durante o condicionamento: respostas defensivas e não defensivas logo após a microinjeção de riluzol e NMDA na MCPdl.....	77
29 – Resultados do experimento 12 durante a reexposição ao odor: respostas de aproximação e esquiva frente ao odor condicionado nos animais que receberam riluzol e NMDA no dia do condicionamento.....	78
30 – Resultados do experimento 13 durante o condicionamento: respostas defensivas e não defensivas logo após a microinjeção de DNQX e NMDA na MCPdl.....	80
31 – Resultados do experimento 13 durante a reexposição ao odor: respostas de aproximação e esquiva frente ao odor condicionado nos animais que receberam DNQX e NMDA no dia do condicionamento.....	81
32 – Dinâmica proposta para a sinalização intra MCPdl no grupo riluzol 2 nmol + AM251200 pmol + NMDA 25 pmol.....	95
33 - Dinâmica proposta para a sinalização intra MCPdl no grupo riluzol 2 nmol + NMDA 50 pmol. A diferença da situação anterior pode revelar a influência de receptores CB1 sobre a aprendizagem.....	96
34 – Resumo da sinalização na MCPdl, em detalhe.....	101
35 – Resumo da sinalização na MCPdl com outras sinapses.....	102
36 – Apêndice A: curva temporal durante os 10 minutos de condicionamento nos animais que receberam NMDA.....	124
37 – Apêndice B: curva temporal durante os 10 minutos de condicionamento nos animais que demonstraram aprendizagem.....	127

Lista de abreviaturas e siglas

2-AG – 2-araquidonoilglicerol

5-HT_{1A} – receptores serotoninérgicos do subtipo 1A

5-HT_{2A} – receptores serotoninérgicos do subtipo 2A

Δ^9 -THC – Δ^9 -tetrahydrocannabinol

AEA – anandamida

AHM – núcleo anterior do hipotálamo

AM251 – agonista inverso de receptores canabinoides do tipo 1

AMPC – adenosina monofosfato cíclico

AMPA – ácido propiônico alfa-amino-3-hidroxi-metil-4-isoxazol, agonista de receptores AMPA

AMv – núcleo talâmico anteromedial ventral

ANOVA – análise de variância

AP – anteroposterior

AP5 – ácido 2R-amino-5-fosfonoaléxico, antagonista de receptores NMDA

Ca⁺² – cátions de cálcio

CAP – capsaicina

CB1 – receptores endocanabinoides do tipo 1

CB2 – receptores endocanabinoides do tipo 2

CNQX – 6-ciano-7-nitroquixalina-2-3-diona, antagonista AMPA/cainato

CI-AMPA – receptor AMPA impermeável ao cátion Ca⁺²

CP-AMPA – receptor AMPA permeável ao cátion Ca⁺²

CPZ – capsazepina

CR – número de cruzamentos na caixa de odor

DAG – diacilglicerol

DGL – diacilglicerol lipase

DNQX – 6,7-dinitroquinoxalina-2-3-diona, antagonista de receptores AMPA/cainato

DV – dorsoventral

EAAT1-2 – transportador de glutamato, subtipos 1 e 2

EC – estímulo condicionado

eCB – endocanabinoide

EI – estímulo incondicionado

EN – estímulo neutro

FAAH – hidrolase de ácidos graxos

GABA – ácido gama-aminobutírico

GCs – guanilato ciclase solúvel

G_i – proteína G inibitória

GLAST – transportador de glutamato em roedores, análogo ao EAAT1

GLT-1 – transportador de glutamato em roedores, análogo ao EAAT2
GluA1-4 – subunidades de receptores AMPA, de 1 a 4. Também podem ser chamados de GluR1-4
GluK1-5 – subunidades de receptores de cainato, de 1 a 5
GluR – receptores glutamatérgicos metabotrópicos, subtipos 1-8
GluN1-3 – subunidades de receptores NMDA, de 1 a 3
G_q – proteína G estimulatória
GR – receptores glicocorticoides
G_s – proteína G estimulatória
IP₃ – trifosfato de inositol
K⁺ – cátions de potássio
LTD – depressão de longo prazo
LTP – potenciação de longo prazo
μl – microlitros, 10⁻⁶
MCP – matéria cinzenta periaquedutal
MCPd – matéria cinzenta periaquedutal, porção dorsal
MCPdl – matéria cinzenta periaquedutal, porção dorsolateral
MCPl – matéria cinzenta periaquedutal, porção lateral
MCPvl – matéria cinzenta periaquedutal, porção ventrolateral
Mg⁺ – cátion de magnésio
MGL – monoacilglicerol lipase
ML – mediodorsal
MR – receptores mineralocorticoides
NMDA – N-metil-D-aspartato, agonista de receptores NMDA
nmol – nanomol, 10⁻⁹
Na⁺ – cátions de sódio
NO – óxido nítrico
NOSn – óxido nítrico sintetase neuronal
pmol – picomol, 10⁻¹²
PBS – solução salina com tampão fosfato
PKA – proteína cinase A
PLD – fosfolipase D
PMd – núcleo hipotalâmico pré-mamilar dorsal
RE – núcleo hipotalâmico reuniens
TRPV1 – receptor de potencial transitório do tipo vaniloide, subtipo 1
VMHdm – núcleo hipotalâmico ventromedial, porção dorsomedial
Zn⁺² – cátion de zinco

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Bases neurais das emoções	1
1.2. Teorias anatômicas sobre a expressão comportamental	2
1.3. MCP e a reação afetiva de defesa	2
1.4. Aspectos funcionais e neuroanatômicos da MCP	3
1.5. Moduladores da atividade na MCP	6
1.5.1. Glutamato	7
1.5.1.1. Receptores NMDA	8
1.5.1.2. Receptores AMPA/cainato	10
1.5.1.3. Receptores metabotrópicos	11
1.5.2. Endocanabinoides	12
1.5.3. Receptores vaniloides TRPV1	16
1.5.4. Outros moduladores	17
1.6. Condicionamento clássico	19
1.7. MCP e aprendizagem	20
1.8. Condicionamento aversivo olfatório	21
2. Justificativa	23
3. Hipótese	23
4. Objetivo geral	23
4.1. Objetivos específicos	23
5. Material e métodos	24
5.1. Animais	24
5.2. Considerações éticas	24
5.3. Cirurgia estereotáxica	25
5.4. Fármacos e soluções utilizados nos experimentos	26
5.5. Microinjeção cerebral	27
5.6. Teste comportamental	27
5.7. Protocolo experimental	31
5.7.1. Experimento 1: a estimulação glutamatérgica NMDA da MCPdl e as consequências sobre respostas defensivas incondicionadas e aprendizagem	31
5.7.2. Experimento 2: a modulação pelo agonista inverso de receptores CB1 sobre a estimulação com NMDA na MCPdl e a potencialização das respostas defensivas incondicionadas e aprendizagem	32
5.7.3. Experimento 3: a estimulação de receptores TRPV1 na MCPdl e as consequências sobre respostas defensivas incondicionadas e aprendizagem	32

5.7.4. Experimento 4: o bloqueio de receptores NMDA seguido da estimulação de receptores TRPV1 e as consequências sobre respostas defensivas incondicionadas e aprendizagem.....	33
5.7.5. Experimento 5: modulação pelo agonista de receptores TRPV1 sobre a estimulação com NMDA na MCPdl e a potencialização das respostas defensivas incondicionadas e aprendizagem.....	33
5.7.6. Experimento 6: modulação simultânea de receptores CB1 e TRPV1 na MCPdl e potencialização das respostas defensivas incondicionadas e aprendizagem.....	34
5.7.7. Experimento 7: modulação simultânea de receptores CB1 e TRPV1 sobre a estimulação com NMDA na MCPdl e a potencialização das respostas defensivas incondicionadas e aprendizagem.....	34
5.7.8. Experimento 8: inibição da liberação de glutamato seguida do agonista inverso de receptores CB1 e estimulação com NMDA: interferência sobre as respostas defensivas incondicionadas e aprendizagem.....	35
5.7.9. Experimento 9: bloqueio de receptores AMPA/cainato seguida do agonista inverso de receptores CB1 e estimulação com NMDA: interferência sobre as respostas defensivas incondicionadas e aprendizagem.....	35
5.7.10. Experimento 10: inibição da liberação de glutamato seguida do agonista de receptores TRPV1: interferência sobre as respostas defensivas incondicionadas e aprendizagem.....	36
5.7.11. Experimento 11: bloqueio de receptores AMPA/cainato seguida da estimulação pelo agonista de receptores TRPV1: interferência sobre as respostas defensivas incondicionadas e aprendizagem.....	36
5.7.12. Experimento 12: inibição da liberação de glutamato seguida da estimulação com NMDA: interferência sobre as respostas defensivas incondicionadas e aprendizagem.....	37
5.7.13. Experimento 13: bloqueio de receptores AMPA/cainato seguida da estimulação com NMDA: interferência sobre as respostas defensivas incondicionadas e aprendizagem.....	37
5.8. Verificação do sítio de microinjeção.....	38
5.9. Análise estatística.....	41
6. Resultados.....	42
6.1. Experimento 1: o agonista glutamatérgico NMDA produz respostas defensivas e aprendizagem.....	42
6.2. Experimento 2: a estimulação subefetiva por NMDA pode ser potencializada pelo agonista inverso de receptores CB1.....	45

6.3. Experimento 3: o agonista TRPV1 produz respostas defensivas e aprendizagem.....	48
6.4. Experimento 4: o bloqueio de receptores NMDA não impede os efeitos do agonista de receptores TRPV1.....	51
6.5. Experimento 5: a estimulação subefetiva por NMDA pode ser potencializada pelo agonista de receptores TRPV1.....	53
6.6. Experimento 6: o agonista inverso de receptores CB1 somado ao agonista de receptores TRPV1 promovem respostas defensivas e aprendizagem.....	56
6.7. Experimento 7: o agonista inverso de receptores CB1 somado ao agonista de receptores TRPV1 induzem um aumento nas respostas defensivas desencadeadas por NMDA, com um prejuízo sobre a aprendizagem.....	59
6.8. Experimento 8: os efeitos da potencialização da subdose de NMDA pelo agonista inverso de receptores CB1 sofrem influência da liberação de glutamato.....	62
6.9. Experimento 9: os efeitos da potencialização da subdose de NMDA pelo agonista inverso de receptores CB1 dependem dos receptores AMPA/cainato.....	66
6.10. Experimento 10: a aprendizagem resultante da ativação dos receptores TRPV1 depende da liberação de glutamato.....	70
6.11. Experimento 11: a aprendizagem resultante da ativação dos receptores TRPV1 depende da ativação dos receptores AMPA/cainato.....	73
6.12. Experimento 12: os efeitos da ativação dos receptores NMDA sofrem influência da liberação de glutamato.....	76
6.13. Experimento 13: os efeitos da ativação dos receptores NMDA dependem dos receptores AMPA/cainato.....	79
7. Discussão	83
8. Conclusões	106
9. Referências	107
10. Apêndice A	124
11. Apêndice B	127
12. Apêndice C	128

1. Introdução

1.1. Bases neurais das emoções

O despertar da autoconsciência emocional gera uma curiosidade intrínseca: como as emoções são produzidas? Pesquisadores têm dedicado suas vidas para responder esta pergunta, acumulando uma série de evidências. Os primeiros estudos em animais utilizavam técnicas rudimentares de retirada de fragmentos cerebrais, associando-a a perda de função. Embora drástica, esta preparação produziu resultados surpreendentes. Em cães, a retirada de toda a região cerebral cortical gerou animais que respondiam abruptamente a quaisquer estímulos do ambiente (Goltz, 1892; Cannon, Britton *et al.*, 1927). As respostas caracterizavam-se pela retração das orelhas, contração de músculos da face, piloereção, rosnado, fuga e ameaças de ataque. Curiosamente, apesar da grande perda de tecido cerebral, as funções básicas para a manutenção da vida foram conservadas.

Portanto, a partir destes relatos, os pesquisadores concluíram que as regiões corticais seriam responsáveis por regular, através de uma força inibitória, a emissão de respostas emocionais, adequando-as às situações. Outra conclusão importante se dá pela manutenção desta resposta defensiva mesmo em animais com tamanha lesão. De forma sucinta, as regiões corticais proporcionariam um controle de regiões diencefálicas e mesencefálicas, e estas duas últimas seriam responsáveis pela expressão abrupta de respostas emocionais (Cannon, Britton *et al.*, 1927).

Com o passar dos anos, as técnicas de retirada de material encefálico deram lugar à estimulação elétrica para o estudo da relação emoções/anatomia. Foi em 1928 que Walter Hess e colaboradores publicaram um artigo mostrando que a estimulação do hipotálamo de gatos produzia respostas muito similares às que foram relatadas em cães decorticados, trinta e seis anos antes (Hess, 1928). Uma tradução do termo que os pesquisadores utilizaram para descrever este conjunto de respostas foi “reação afetiva de defesa”, do original, *affektive Abwehrreaktion* (Hess, 1928; Schenberg, 1984; Bittencourt, 2003). O desenvolvimento desta técnica foi reconhecido com o prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina, no ano de 1949 (Hess, 1949).

Na continuidade desta exploração, Hunsperger confirmou os achados de Hess e identificou outra área que apresentava um limiar baixo para o desencadeamento da reação afetiva de defesa (Hunsperger, 1956). Esta área era a matéria cinzenta periaquedutal (MCP).

1.2. Teorias anatômicas sobre a expressão comportamental

Jeffrey Gray propôs que um sistema que incluía o hipocampo e o septo seria responsável pela resolução de conflitos de necessidade *versus* perigo (Gray, 1982; Gray e McNaughton, 2000). Portanto, o comportamento observado (aproximação ou afastamento, por exemplo) seria a resultante do conflito entre fome, sede, reprodução, medo e outras necessidades vitais. Esta ideia foi estendida por Frederico Graeff (Graeff, 1994), que incluiu outras estruturas cerebrais, relacionando-as com as diferentes estratégias defensivas e a percepção da ameaça. O sistema ficou conhecido, portanto, como sistema cerebral de defesa. Tal seria a relação entre diferentes regiões cerebrais e estratégias defensivas, que alguns transtornos de ansiedade poderiam ser categorizados de acordo com as regiões envolvidas, segundo o autor.

Assim, o sistema septo-hipocampal sugerido por Gray apresenta características de conflito e avaliação de risco pela incerteza de ameaça, podendo ser relacionado com o transtorno de ansiedade generalizada. Segundo Graeff (Graeff, 1994), quando uma ameaça se encontra presente, mas a uma distância considerável, ocorre a ativação cerebral de estruturas como o núcleo central da amígdala e a porção ventral da MCP. Neste caso, a resposta defensiva predominante seria o congelamento e o transtorno relacionado seriam as fobias (Graeff, 1994). Por outro lado, com a ameaça presente a uma distância pequena, a porção dorsal da MCP estaria ativa, promovendo respostas de fuga ou luta, relacionadas às crises de pânico (Graeff, 1994). A esta teoria, Gray e McNaughton incorporaram o conceito de distância defensiva, publicado em 2004 e comentado nos próximos itens (Mcnaughton e Corr, 2004).

1.3. MCP e a reação afetiva de defesa

Neurônios da MCP disparam em sincronia com ritmos respiratórios e cardíacos, indicando que esta estrutura participa na manutenção destes ritmos também em condições basais. Como estes disparos são encontrados em diversas subpopulações, é possível que a MCP atue sobre os ritmos respiratório e cardíaco, mas que também atue como detectora de alterações nestes ciclos (Carobrez, Schenberg *et al.*, 1983; Bandler, Carrive *et al.*, 1991). Um aumento na pressão sanguínea pode ser observado instantes após a estimulação da MCP, ocorrendo também alterações específicas na redistribuição do fluxo sanguíneo, com vasodilatação no leito muscular e vasoconstrição na pele e nas vísceras (Bandler, Carrive *et al.*, 1991).

A MCP, quando estimulada por pulsos elétricos, produz vocalizações em porcos-da-Índia, morcegos, macacos, chimpanzés e ratos (Bandler, Carrive *et al.*, 1991). As respostas vocais foram caracterizadas como uivos, miados e choro. Estas vocalizações também foram emitidas quando os eletrodos alcançavam os colículos superiores e inferiores, portanto, não se restringiam somente à MCP (Bandler, Carrive *et al.*, 1991). Os estudos com a microinjeção de agonistas glutamatérgicos confirmaram que estas respostas dependem da ativação de terminais nervosos na MCP, descartando a hipótese da ativação de fibras de passagem (Bandler, Carrive *et al.*, 1991).

Durante a vocalização, a MCP também influencia a frequência e a profundidade da respiração, geralmente aumentando a frequência e reduzindo a profundidade. Embora não possua projeções diretas para motoneurônios da respiração, sua influência se dá pelas projeções aos centros medulares de modulação da respiração. Sendo assim, a MCP possui a função de coordenar a respiração durante a ativação emocional (Bandler, Carrive *et al.*, 1991).

A estimulação elétrica da MCP produz analgesia em gatos, macacos e ratos. Esta intervenção foi inclusive proposta para o tratamento de dor severa em pacientes humanos (Bandler, Carrive *et al.*, 1991). No entanto, a ocorrência simultânea de “emoções desagradáveis e intensas” desqualificou este tratamento. De fato, somente algumas sub-regiões da MCP (na porção ventral) possuem características puramente analgésicas, ou seja, desvinculadas das respostas afetivas de defesa (Bandler, Carrive *et al.*, 1991).

Portanto, a MCP integra o controle de ritmo cardíaco, fluxo sanguíneo periférico, vocalizações, respiração e analgesia. Estas são as principais alterações que compõem a reação afetiva de defesa.

1.4. Aspectos funcionais e neuroanatômicos da MCP

As reações defensivas permitem a preservação da integridade do animal e aumentam consideravelmente a possibilidade de reprodução. Em laboratório, a exposição controlada ao predador (gato), eliciou respostas comportamentais características de defesa em ratos, e similares às encontradas com a estimulação elétrica. Inicialmente, os comportamentos de exploração, de alimentação e de reprodução são inibidos. Ao mesmo passo, aumentam as respostas defensivas geralmente caracterizadas por fuga e congelamento. Uma vez que o predador seja retirado do ambiente, as respostas defensivas são aos poucos substituídas por comportamentos de avaliação de risco,

culminando com a retomada gradual dos comportamentos observados inicialmente (Blanchard e Blanchard, 1969; 1989).

As respostas comportamentais frente ao predador podem variar de acordo com a proximidade da presa em relação à fonte de perigo. Enquanto uma distância grande separa o predador e a presa, respostas brandas de esquiva são observadas. Com a diminuição da distância, respostas de fuga se tornam evidentes. A uma curta distância, a fuga explosiva pode ser observada. Por outro lado, se não houver possibilidade de fuga, a presa tende a emitir um comportamento de congelamento, que se intensifica com a aproximação ao predador. Nos dois casos, quando a distância se torna mínima, ocorre o ataque defensivo (Mcnaughton e Corr, 2004). Este conceito de distância defensiva tem como base as teorias do sistema septo-hipocampal (Gray, 1982) e o sistema cerebral de defesa (Graeff, 1994), já comentados.

Em ratos, a exposição ao odor de gatos produz intensa atividade de estruturas encefálicas como amígdala, hipotálamo e MCP (Dielenberg, Hunt *et al.*, 2001). Esta última, quando estimulada eletricamente (Schenberg e Graeff, 1978; Carobrez, Schenberg *et al.*, 1983; Kim, Horovitz *et al.*, 2013), quimicamente (Bittencourt, Carobrez *et al.*, 2004; Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012), ou por optogenética (Deng, Xiao *et al.*, 2016; Tovote, Esposito *et al.*, 2016) produz respostas comportamentais como congelamento e fuga. Além disso, estas estimulações também geram alterações na frequência cardíaca e respiratória, decorrentes de ativação simpática.

O componente emocional negativo da ativação da MCP foi avaliado em paradigmas de esquiva inibitória. Toda vez que o animal cruzava o ambiente, a estimulação elétrica na MCP era interrompida. Um aumento no número de cruzamentos indicou, portanto, uma motivação para interromper esta estimulação, que foi considerada como aversiva (Schenberg e Graeff, 1978).

Resultados semelhantes foram relatados em humanos que, ao receber a estimulação elétrica, verbalizaram uma necessidade de sair do ambiente, de que estavam sendo perseguidos e que corriam risco de morte (Nashold, William *et al.*, 1969). Somado a isso, pacientes com diagnóstico de transtorno de estresse pós-traumático apresentam aumento da atividade da MCP quando expostos a pistas do trauma, em comparação com voluntários saudáveis (Pissioti, Frans *et al.*, 2002). Assim sendo, a estimulação da MCP gera um conjunto de respostas emocionais característico de uma valência negativa, tanto em animais de laboratório quanto em humanos.

A MCP localiza-se em torno do aqueduto cerebral (figura 1). Ao longo do eixo rostro-caudal, tem sua forma determinada pelo alargamento do aqueduto. Neste eixo, a MCP foi dividida em colunas de acordo com aspectos funcionais e anatômicos, tomando como referência o aqueduto. Compõem a MCP, portanto, uma porção dorsomedial (MCPdm), duas porções dorsolaterais (MCPdl), duas porções laterais (MCPl) e duas porções ventrolaterais (MCPvl) (Bandler, Keay *et al.*, 2000). Embora esta divisão auxilie no escrutínio das funções da MCP, existem diversos neurônios que transmitem informações entre as colunas (Beitz, 1982).

A coluna dorsomedial (figura 1) mantém seu volume relativamente semelhante em todo o eixo rostro-caudal. Apresenta intensa projeção axonal para o tronco cerebral caudal, embora pouco se saiba sobre o papel específico destas fibras (Bandler, Keay *et al.*, 2000). Tanto a coluna dorsomedial quanto a dorsolateral recebem projeções consideráveis de estruturas corticais e subcorticais. Em boa parte dos estudos, a coluna dorsomedial é agrupada com a coluna dorsolateral, sendo denominada apenas de dorsal (MCPd) (Bandler, Carrive *et al.*, 1991; Bandler, Keay *et al.*, 2000; Keay e Bandler, 2001).

As colunas dorsolaterais (figura 1) apresentam maior volume nos dois terços rostrais, diminuindo conforme o aqueduto se alarga mais caudalmente. Esta região recebe projeções excitatórias do circuito hipotalâmico medial de defesa (composto pelos núcleos pré-mamilar dorsal (PMd), ventromedial (VMH) e anterior (AHN) (Cezario, Ribeiro-Barbosa *et al.*, 2008; Gross e Canteras, 2012; Canteras, Pavesi *et al.*, 2015). Isto leva a crer que os resultados encontrados por Hess e Hunsperger devem-se à ativação de regiões muito próximas do circuito hipotalâmico medial e da MCPdl, respectivamente. A MCPdl também recebe projeções do colículo superior, mas são poucas as projeções para o tronco cerebral (Bandler, Keay *et al.*, 2000). Portanto, esta coluna deve se comunicar com estruturas mais caudais através das outras colunas da MCP. Esta coluna apresenta os menores limiares para o desencadeamento de respostas como saltos e fuga pela estimulação elétrica ou química (Bandler, Carrive *et al.*, 1991; Bandler, Keay *et al.*, 2000; Keay e Bandler, 2001; Bittencourt, Carobrez *et al.*, 2004).

As colunas laterais da MCPl (figura 1) apresentam maior volume na porção caudal. Porém, a porção rostral recebe projeções dos núcleos espinhais do trigêmeo, núcleos hipotalâmicos anteriores, preópticos mediais, núcleos centrais da amígdala e dos giros cingulados anteriores. As projeções da MCPl direcionam seus axônios para a medula, bulbo e o núcleo do trato solitário. A estimulação química

destas colunas também produz aumento do tônus simpático e comportamento defensivo (Bandler, Carrive *et al.*, 1991; Bandler, Keay *et al.*, 2000; Keay e Bandler, 2001).

Por fim, as colunas ventrolaterais (figura 1) apresentam maior volume na porção caudal da MCP. As conexões da MCPvl são similares às da MCPl. Porém, a estimulação química destas colunas produz respostas contrárias às observadas pela MCPl. São detectadas, portanto, a redução do tônus simpático e respostas comportamentais defensivas do tipo passivo, como o congelamento. Outra diferença marcante ocorre na analgesia desencadeada pela estimulação desta coluna. Enquanto este fenômeno depende da sinalização de opioides, nas outras colunas a analgesia depende de outros mecanismos (Bandler, Carrive *et al.*, 1991; Bandler, Keay *et al.*, 2000; Keay e Bandler, 2001).

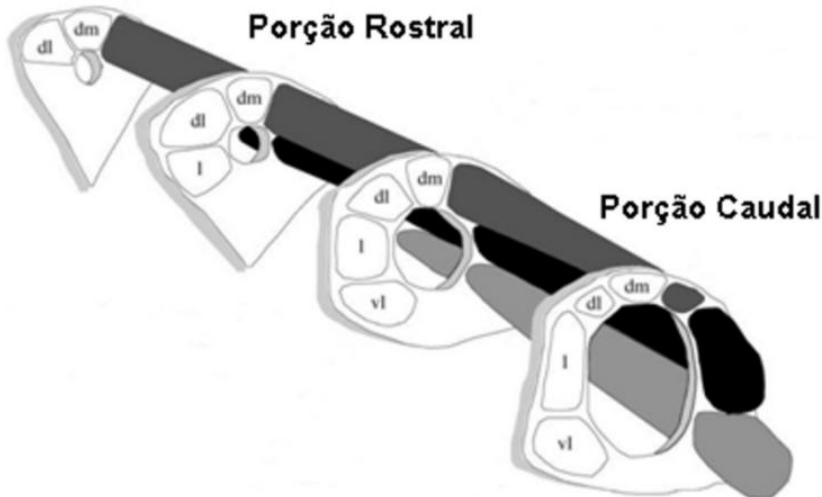


Figura 1: matéria cinzenta periaquedutal. Divisão anatômica e funcional das colunas no eixo rostro-caudal. O espaço central representa o aqueduto cerebral. dm=dorsomedial, dl=dorsolateral, l=lateral, vl=ventrolateral. Adaptado de (Bandler, Keay *et al.*, 2000).

1.5. Moduladores da atividade na MCP

A atividade da MCP pode ser controlada por drogas que atuam nos sistemas glutamatérgico, endocanabinoide, vaniloide, nitrérgico, serotonérgico, além de outros. Isto revela a complexidade regulatória no ajuste fino da atividade de neurônios localizados nesta área. Dentre os citados, os sistemas endocanabinoide e vaniloide têm recebido maior

atenção de pesquisadores por sua ação rápida, local e por vezes contraditória, trazendo consequências sobre a expressão de respostas defensivas. Para melhor compreender como estes sistemas influenciam nas respostas comportamentais, vale ressaltar as características de cada sistema/neurotransmissor/neuromodulador.

1.5.1. Glutamato

O sistema glutamatérgico é composto pelo neurotransmissor glutamato e receptores, além de transportadores, enzimas de síntese e degradação, que regulam a disponibilidade do neurotransmissor aos receptores. O glutamato apresenta-se como o principal neurotransmissor excitatório em mamíferos, apesar de acionar alguns poucos mecanismos inibitórios (Collingridge e Lester, 1989).

O glutamato, armazenado em vesículas, é liberado em terminais axonais após a despolarização. O glutamato então fica disponível para atuar nos seus alvos. Em seguida, é recaptado por transportadores de aminoácidos excitatórios. Dentre os recaptadores destacam-se os EAAT1 e EAAT2 (ou em roedores, GLAST e GLT-1), tanto em neurônios quanto em astrócitos. Nos primeiros, o glutamato volta a compor as vesículas; nos últimos, convertido para glutamina pela enzima glutamina sintetase. Por sua vez, a glutamina é transportada para o neurônio para nova síntese de glutamato (Collingridge e Lester, 1989; Traynelis, Wollmuth *et al.*, 2010).

Os receptores glutamatérgicos são divididos em ionotrópicos e metabotrópicos, de acordo com sua estrutura e função (figura 2). Modificações estruturais causadas por agonistas glutamatérgicos fazem com que os receptores ionotrópicos permitam a passagem de cátions, enquanto os receptores metabotrópicos alteram a conformação de proteínas G acopladas, liberando subunidades que acarretarão em modificações no estado de fosforilação de proteínas.

Os receptores ionotrópicos, por sua vez, são divididos em NMDA, AMPA e cainato, de acordo com a afinidade por agonistas. De fato, a nomenclatura deriva dos agonistas seletivos para cada tipo de receptor.

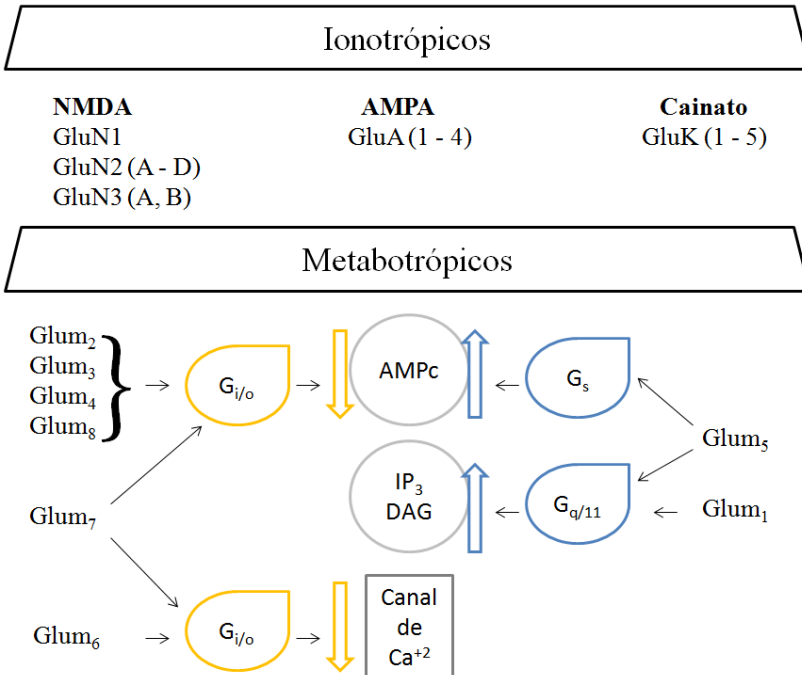


Figura 2: Classificação dos receptores glutamatergicos. NMDA, AMPA e cainato pertencem à categoria dos receptores acoplados a canais, permitindo o influxo de cátions. Logo abaixo de cada receptor encontram-se as subunidades já descritas. Por outro lado, os receptores metabotrópicos atuam por cascatas de ampliação de sinal. AMPc = adenosina monofosfato cíclico; IP₃ = trifosfato de inositol; DAG = diacilglicerol; Glum = receptor glutamatergico metabotrópico (Alexander, Davenport *et al.*, 2015; Alexander, Peters *et al.*, 2015). Adaptado de (Kincheski, 2011).

1.5.1.1. Receptores NMDA

Estes receptores são compostos por quatro subunidades, organizadas em heterotetrâmeros de duas subunidades GluN1 (na qual se liga a glicina), e duas subunidades GluN2, na qual se liga o glutamato. Este arranjo de quatro subunidades forma um poro, através do qual cátions podem atravessar a membrana plasmática, dadas as devidas circunstâncias. As subunidades GluN1 e GluN2 compartilham uma homologia significativa na sequência de aminoácidos, compartilhada inclusive com outras subunidades de receptores glutamatergicos ionotrópicos. Isto garante uma estrutura bem

conservada dos sítios de ativação entre os diversos alvos em receptores glutamatérgicos (Van Dogen, 2009; Traynelis, Wollmuth *et al.*, 2010).

Tetrâmeros que apresentam em sua composição apenas GluN1 são considerados receptores de glicina. São em grande maioria excitatórios, mas a presença de uma subunidade GluN3 pode conferir caráter inibitório (Van Dogen, 2009).

Em estado de repouso, o poro do receptor NMDA está ocupado por um íon Mg^+ . A ligação de glutamato ou do agonista exógeno NMDA na subunidade GluN2, somada ao aumento no potencial de membrana por outros receptores faz com que o Mg^+ seja deslocado, permitindo a abertura do poro. Um mecanismo similar ocorre com o íon Zn^+ , mas em outro sítio ligante. A ligação de glicina no sítio das subunidades GluN1 facilita este processo. Assim, a abertura do poro associado ao gradiente de concentração de Ca^{+2} faz com que este cátion atravesse a membrana plasmática (Van Dogen, 2009; Traynelis, Wollmuth *et al.*, 2010).

O Ca^{+2} que entra através do receptor interage com proteínas quinases e fosfatases, promovendo mudanças persistentes na configuração individual da sinapse. Somado a essa ação local sináptica, a ativação de receptores NMDA pode sinalizar cascatas de transcrição gênica, embora estes mecanismos ainda não estejam completamente elucidados (Van Dogen, 2009; Traynelis, Wollmuth *et al.*, 2010).

A alta afinidade de receptores NMDA por glutamato, somada à cinética relativamente lenta de ativação e desativação caracteriza este receptor como decodificador de padrões de ativação por longos períodos. A dependência de voltagem faz com que o influxo de Ca^{+2} ocorra apenas quando há uma despolarização de membrana relevante, coincidindo com a liberação de glutamato. Por estas razões, esses receptores são considerados detectores de coincidência (Van Dogen, 2009; Traynelis, Wollmuth *et al.*, 2010).

Os receptores NMDA localizam-se na pré e pós-sinapse em conexões corticais e hipocâmpais. Porém, em estruturas diencefálicas e mesencefálicas não foram encontrados receptores NMDA pré-sinápticos (Banerjee, Larsen *et al.*, 2016). Isto indica que o controle de ativação em estruturas como o hipotálamo e a MCP pode depender de outros mecanismos. Portanto, considera-se que os receptores NMDA na MCP (Albin, Makowiec *et al.*, 1990), são, em sua grande maioria, pós-sinápticos.

1.5.1.2. Receptores AMPA/cainato

Dentre os alvos para o glutamato liberado na fenda sináptica estão os receptores ionotrópicos AMPA e cainato, chamados de “não NMDA”. Como a distinção farmacológica entre AMPA e cainato requer ferramentas mais sofisticadas, eles são comumente apresentados como AMPA/cainato. Os receptores AMPA também são heterotetrâmeros, mas compostos pelas subunidades GluA1, GluA2, GluA3 e GluA4 (ou GluR1-4, dependendo da nomenclatura utilizada) (Traynelis, Wollmuth *et al.*, 2010; Henley e Wilkinson, 2016). Assim como os receptores NMDA, a organização em tetrâmeros ocorre em pares de duas subunidades iguais, em sua maioria. Estes receptores são os mais frequentes em todo o sistema nervoso central. Por sua característica de alta afinidade por glutamato associada a uma rápida cinética, os receptores AMPA são responsáveis pela condução rápida neuronal (Traynelis, Wollmuth *et al.*, 2010).

As subunidades GluA1, GluA2 e GluA3 são as mais abundantes, sendo que a GluA4 está presente em sinapses glutamatérgicas durante as fases de desenvolvimento neuronal, e é rara no cérebro adulto, embora seja expressa em interneurônios inibitórios (Henley e Wilkinson, 2016). Dependendo da configuração das subunidades, os receptores AMPA podem permitir a passagem de Na^+ ou Ca^{+2} (Henley e Wilkinson, 2016).

Os receptores AMPA são reconhecidos pela sua participação em fenômenos de aprendizagem como a depressão e potenciação de longo prazo (LTD e LTP, respectivamente). A redução da amplitude e frequência de minicorrentes excitatórias pós-sinápticas pode ser diretamente relacionada à redução da disponibilidade de receptores AMPA na pós-sinapse (Carroll, Lissin *et al.*, 1999). Da mesma forma, aumentos na amplitude e frequência de minicorrentes excitatórias são relacionados ao aumento da disponibilidade de receptores AMPA na superfície da membrana pós-sináptica (Henley e Wilkinson, 2016). A LTD e LTP estão descritas, em sua maioria, para neurônios hipocâmpais, mas podem ocorrer a partir da estimulação da MCP (Horowitz e Richter-Levin, 2015). De fato, a indução de LTD na MCP de ratos foi capaz de reduzir o impacto da exposição ao predador (Adamec, 2001).

Esta capacidade de alterar as minicorrentes excitatórias pós-sinápticas deve-se à rápida endocitose, exocitose e difusão lateral de receptores AMPA. Em conjunto, essa dinâmica é considerada um dos mecanismos da plasticidade sináptica, chamada de tráfego [*trafficking*, para revisão, (Kessels e Malinow, 2009; Sweatt, 2016)]. O tráfego de

receptores AMPA na superfície sináptica depende da atividade de receptores NMDA e dos próprios AMPA. Além disso, diferenças na composição dos receptores AMPA inseridos/retirados da dupla camada lipídica contribuem para a atividade da sinapse.

Receptores AMPA que contêm ao menos uma subunidade GluA2 (ou GluR2, dependendo da nomenclatura utilizada) estão disponíveis na sinapse em níveis de atividade basal. Estes receptores são permeáveis a íons Na^+ , mas impermeáveis a íons Ca^{+2} . Quando ocorre liberação de glutamato, receptores AMPA que não contêm a subunidade GluA2 (mas apenas a combinação das subunidades GluA1, GluA3 e ou GluA4) são fosforilados, inseridos na membrana e difundem-se para a sinapse. Devido à ausência da subunidade GluA2, os canais de AMPA são permeáveis à Ca^{+2} e aumentam momentaneamente o influxo de Ca^{+2} em sinapses específicas (Kessels e Malinow, 2009; Sweatt, 2016).

Instantes após o estímulo, os receptores AMPA sem a subunidade GluA2, chamados de CP-AMPA (*calcium permeable*) são endocitados, dando lugar aos CI-AMPA (*calcium impermeable*) em uma nova configuração, diferente da inicial. Na LTD ocorre a desfosforilação de CP-AMPA, bloqueando sua exocitose e tráfego para a sinapse, além de endocitose de CI-AMPA (Carroll, Lissin *et al.*, 1999; Henley e Wilkinson, 2016). Este é um dos mecanismos sinápticos que relaciona LTP, LTD e expressão comportamental de aprendizagem (Passafaro, Piëch *et al.*, 2001; Henley e Wilkinson, 2016).

Os receptores kainato são compostos por quatro subunidades, dentre as cinco descritas, GluK1-5. Eles foram menos estudados que os receptores NMDA e AMPA, por possuírem menor influência sobre a ativação sináptica. Porém, podem apresentar um papel importante em fenômenos de plasticidade. Têm uma taxa de ativação menor que os AMPA e são permeáveis à Na^+ e K^+ . Podem estar presentes na pós-sinapse excitatória, mas também em terminais inibitórios (Traynelis, Wollmuth *et al.*, 2010).

1.5.1.3. Receptores metabotrópicos

Os receptores metabotrópicos são complexos proteicos com sete domínios transmembranares, acoplados, por sua vez, a proteínas regulatórias e propagadoras de sinal. Dentre as proteínas acopladas ao receptor, encontram-se as proteínas G, determinantes para o desencadeamento das ações da ativação do receptor. Ao contrário de canais iônicos, que permitem a passagem de íons, os receptores acoplados à proteína G transmitem informações através da ativação de cascatas de sinalização. Essas cascatas consistem em alterações no

estado de conformação de proteínas e enzimas através do acréscimo ou retirada de fosfatos, gerando uma amplificação de sinal (Gladding, Fitzjohn *et al.*, 2009; Alexander, Davenport *et al.*, 2015).

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos são classificados de acordo com a proteína G acoplada. Uma representação geral da classificação dos receptores glutamatérgicos pode ser visualizada na figura 2. A proteína G é composta por três subunidades, que se desvinculam quando ativadas, gerando dois fragmentos funcionais: α e $\beta\delta$. A classificação se dá pelas consequências funcionais da subunidade α , que pode ser estimulatória (s ou q/11) ou inibitória/outra (i/o). Por conta disso, os receptores glutamatérgicos metabotrópicos também foram divididos em três grupos: I – Glum₁ e ₅, ligados às proteínas G_{as} e/ou G_{aq/11}, II – Glum₂ e ₃, ligados à proteína G_{ai/o} e III – Glum₄, ₆, ₇ e ₈, ligados à proteínas G_{ai/o}. O grupo I apresenta localização pós-sináptica, enquanto os grupos II e III apresentam-se, em sua maioria, na pré-sinapse (Gladding, Fitzjohn *et al.*, 2009; Alexander, Davenport *et al.*, 2015).

O fragmento α da proteína G pode alterar os níveis de fosforilação da fosfolipase C (PLC), que produz trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG) quando ativada. Também ocorre a ativação (ou desativação, dependendo da proteína G) de adenilato ciclase (AC), alterando os níveis locais de adenosina monofosfato cíclico (AMPc, figura 2). Os efeitos destas cascatas costumam ser observados em um tempo de minutos a horas, pois dependem de sequências de fosforilações e de transcrição gênica. No entanto, existem alterações diretas da taxa de abertura de canais iônicos, na escala de tempo de segundos. Em vista disso, as consequências da cascata de ativação iniciadas pelos receptores glutamatérgicos metabotrópicos influenciam a regulação de canais iônicos, fenômenos de plasticidade sináptica e atingem a transcrição gênica (Gladding, Fitzjohn *et al.*, 2009).

1.5.2. Endocanabinoides

A principal substância responsável pelos efeitos de extratos das plantas do gênero *Cannabis* foi identificada como Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) em 1964 [Gaoni e Mechoulam, 1964 *apud* (Zuardi, 2006)]. Foi somente em 1990 que um dos receptores órfãos, por apresentar sítio específico para Δ^9 -THC, recebeu a denominação de receptor canabinoide do tipo 1 (CB1) (Matsuda, Lolait *et al.*, 1990). Em seguida, foi possível clonar outro receptor, que ficou conhecido como CB2 (Munro, Thomas *et al.*, 1993). Tais descobertas

pavimentaram o caminho para intervenções farmacológicas nestes receptores, que se apresentaram como promissores para o estudo de transtornos do humor, dentre diversas outras possibilidades (Wotjak, 2005; Moreira e Wotjak, 2009; Moreira, Aguiar, Terzian *et al.*, 2012).

A busca por ligantes endógenos gerou frutos rapidamente. Em 1992, o grupo liderado por Raphael Mechoulam apresentou um derivado de ácido araquidônico, a araquidonoiletanolamida, como ativador de receptores CB1 (Devane, Hanus *et al.*, 1992). A substância foi nomeada anandamida (AEA – em sânscrito, *ananda* significa “portador de paz e felicidade interna”). Um pouco mais tarde, o mesmo grupo identificou um segundo agonista, 2-araquidonoil glicerol (2-AG) (Mechoulam, Ben-Shabat *et al.*, 1995). Na sequência, outros ligantes endógenos foram revelados; agonistas, agonistas inversos e antagonistas foram desenvolvidos e enzimas de síntese e degradação foram descobertas (Wotjak, 2005; Pertwee, 2010; Mechoulam, Hanus *et al.*, 2014). Refere-se, portanto, a esse conjunto de receptores, ligantes, enzimas e transportadores, como sistema endocanabinoide.

A dinâmica da sinalização endocanabinoide (eCB) difere dos sistemas de neurotransmissores clássicos, pois os eCB não são armazenados em vesículas e sua ação se dá por via retrógrada, sendo, portanto, melhor caracterizados como neuromoduladores. AEA e 2-AG são produzidos como consequência da despolarização de membrana pela atividade das enzimas fosfolipase D (PLD) e diacilglicerol lipase – α (DGL), respectivamente, a partir de lipídios de membrana no neurônio pós-sináptico. Por serem lipossolúveis, os eCB atravessam facilmente a membrana pós-sináptica, disponibilizando-se para ativar receptores CB1 pré-sinápticos, caracterizando assim, uma sinalização retrógrada (Wotjak, 2005; Pertwee, 2010; Mechoulam, Hanus *et al.*, 2014).

Esses receptores transmembranares são acoplados à proteína G inibitória que, quando deslocada, diminui a atividade da adenilato ciclase, reduzindo os níveis de AMP (adenosina monofosfato) cíclico e a ativação de proteína cinase A (PKA) que, por sua vez, altera os níveis de fosforilação de diversas proteínas. Além disso, a ativação de CB1 potencializa a saída de K^+ e dificulta a entrada de Ca^{+2} através de modificações nos canais iônicos, contribuindo para a hiperpolarização do neurônio pré-sináptico (Wotjak, 2005; Pertwee, 2010; Mechoulam, Hanus *et al.*, 2014).

Portanto, a ativação de CB1 reduz a fusão entre vesículas sinápticas e a membrana, reduzindo a taxa de liberação de neurotransmissores na pré-sinapse. A degradação de AEA se dá principalmente pela enzima FAAH (hidrolase de ácidos graxos) e de 2-

AG pela enzima MGL (monoacilglicerol lipase). Essas características garantem uma sinalização retrógrada e sob demanda, regulando o ajuste fino da ativação neuronal por meio de retroalimentação negativa (Moreira e Wotjak, 2009; Castillo, Younts *et al.*, 2012; Mechoulam, Hanus *et al.*, 2014).

Antagonistas de receptores CB1, quando administrados em concentrações elevadas, podem apresentar efeito pró-aversivo. Portanto, é possível que o receptor CB1 tenha atividade intrínseca, e então, essa interferência farmacológica pode ser melhor caracterizada como um agonismo inverso ao invés de um antagonismo. Por esse motivo, no presente trabalho as referências à atividade deste conjunto de fármacos são descritas como agonista inverso, de acordo com pesquisadores da área (Pertwee, 2005; Casarotto, Terzian *et al.*, 2012; Castillo, Younts *et al.*, 2012; Fogaça, Lisboa *et al.*, 2012; Moreira, Aguiar, Terzian *et al.*, 2012).

A interferência farmacológica sobre a sinalização eCB pode gerar efeitos sobre as respostas emocionais em seres humanos. Em 2008, uma droga inibidora do apetite, rimonabanto, (comercializada com o nome de Acomplia[®]) gerou um aumento nos casos de suicídio em pacientes com depressão (Mechoulam, Hanus *et al.*, 2014). Por esta razão, o medicamento teve sua comercialização interrompida. Um efeito semelhante foi evidenciado experimentalmente quando o rimonabanto foi administrado em seres humanos saudáveis, por potencializar a sensação de ansiedade entre os participantes do teste de falar em público (Bergamaschi, Queiroz *et al.*, 2014). O rimonabanto possui função de antagonista/agonista inverso de receptores CB1. Sendo assim, esses relatos clínicos indicam um efeito pró-aversivo da interferência sobre a atividade de receptores CB1 em seres humanos.

Em roedores, a exposição ao odor de predador interfere sobre a expressão de genes relacionados à sinalização eCB. No núcleo *accumbens*, esta experiência aumentou a expressão do gene responsável pela codificação da enzima FAAH, que degrada AEA. Enquanto isso, na amígdala e MCP, houve uma redução da expressão de FAAH, assim como de genes relacionados a enzimas responsáveis pela produção de eCB: PLD e DGL. Isso indica que a experiência aversiva gerou modificações na sinalização eCB, e ainda, que estas modificações são específicas para diferentes estruturas encefálicas (Sütt, Raud *et al.*, 2008). Como a amígdala e a MCP encontram-se mais ativas após o encontro com o predador (Dielenberg, Hunt *et al.*, 2001), é possível que localmente uma diminuição da sinalização eCB esteja relacionada com a maior atividade neuronal.

As intervenções farmacológicas disponíveis na literatura são diversas e incluem fitocanabinoides (derivados de plantas), agonistas, antagonistas, agonistas inversos, inibidores da síntese, recaptação ou degradação de eCB. Testes em animais para avaliação de fármacos com potencial ansiolítico/ansio gênico, tais como o labirinto em cruz elevado (LCE), caixa claro-escuro e teste de Vogel evidenciam um aspecto dual na sinalização eCB (Moreira e Wotjak, 2009). Em síntese, baixas doses de AEA produzem redução nas respostas defensivas, interpretada como um efeito ansiolítico. Este efeito se perde com doses mais altas e, em alguns casos, foram detectados aumentos na expressão de respostas defensivas, interpretados como efeito ansio gênico (Moreira, Aguiar, Resstel *et al.*, 2012).

Além disso, os efeitos de agonistas canabinoides dependem da região estudada. Por exemplo, a ativação de receptores CB1 na amígdala basolateral tende a aumentar a atividade nesta região, relacionada ao aumento das respostas defensivas (Azad, Monory *et al.*, 2004). Já no córtex prefrontal ventromedial ou hipocampo ventral (Rubino, Guidali *et al.*, 2008), a ativação destes receptores promove uma redução de respostas defensivas. Isto pode ser explicado pela configuração local do sistema, que apresenta variações na quantidade e localização de receptores e enzimas em cada estrutura. Os receptores CB1 localizados em neurônios GABAérgicos, por exemplo, reduzem a liberação de GABA, gerando, portanto, uma redução no tônus inibitório local. Este parece ser o caso de uma parte considerável das sinapses na amígdala basolateral, por exemplo (Herkenham, Lynn *et al.*, 1990; Azad, Monory *et al.*, 2004; Cristino, De Petrocellis *et al.*, 2006).

Através de técnicas imunohistoquímicas, foram coletadas evidências de que os receptores CB1 estão presentes na MCP, inclusive na porção dorsolateral (Herkenham, Lynn *et al.*, 1990; Cristino, De Petrocellis *et al.*, 2006). Em ratos, foram realizadas microinjeções locais de agonistas CB1 (AEA ou ACEA) na MCPdl e exposição ao labirinto em cruz elevado (LCE, um teste para efeitos ansiolíticos ou ansio gênicos). Neste estudo, foi detectado um aumento do tempo nos braços abertos, o que pode ser interpretado como redução nas respostas defensivas. Este efeito foi bloqueado pelo agonista inverso AM251, reforçando a possibilidade de ação via receptores CB1 (Moreira, Aguiar *et al.*, 2007).

No teste de lambar punido de Vogel, a microinjeção de AEA na MCPdl aumentou o número de lambidas, o que foi interpretado como efeito ansiolítico (Lisboa, Resstel *et al.*, 2008). Aliado a isso, durante a fase de evocação no teste de condicionamento contextual, respostas

como congelamento, alterações na frequência cardíaca e na pressão arterial média foram reduzidas pela AEA na MCPdl (Resstel, Lisboa *et al.*, 2008). Sendo assim, a ativação de CB1 na MCPdl tem efeito de reduzir as respostas defensivas dos animais, o que foi interpretado como ação ansiolítica (Moreira, Aguiar, Resstel *et al.*, 2012). Um resumo das principais intervenções farmacológicas na MCPdl pode ser encontrado na tabela 1.

1.5.3. Receptores vaniloides TRPV1

O receptor TRPV1 foi clonado pela primeira vez em 1997. Trata-se de um canal sensível a variações de pH, temperatura e ao componente das pimentas, capsaicina (Caterina, Schumacher *et al.*, 1997). Este receptor é composto por seis domínios transmembranares, formando um canal catiônico não-seletivo de baixa voltagem com permeabilidade ao Ca^{+2} e ao Na^{+} (Caterina, Schumacher *et al.*, 1997; Guo, Vulchanova *et al.*, 1999). Por estas características, os receptores TRPV1 centrais podem ter um papel importante na regulação da atividade neuronal. Ao contrário dos receptores CB1, que são essencialmente pré-sinápticos, os TRPV1 também são encontrados na pós-sinapse (Tóth, Boczán *et al.*, 2005; Xing e Li, 2007; Aguiar, Moreira *et al.*, 2014).

Os receptores TRPV1 estão presentes na MCPdl, inclusive colocalizados com receptores CB1, conforme revelado por técnicas imunohistoquímicas (Cristino, De Petrocellis *et al.*, 2006; Casarotto, Terzian *et al.*, 2012). Portanto, estes receptores poderiam contribuir para o controle da ativação desta estrutura e para a expressão de respostas defensivas. O principal ponto de intersecção entre os receptores TRPV1 e CB1 se dá por compartilharem um ligante endógeno, a AEA (Moreira, Aguiar, Terzian *et al.*, 2012). Isso explicaria a perda dos efeitos em doses relativamente altas de AEA, pois a ativação de TRPV1 aumenta o influxo de cátions, potencializando a ocorrência de despolarização neuronal (Kawahara, Drew *et al.*, 2010; Moreira, Aguiar, Terzian *et al.*, 2012).

De fato, no LCE, a microinjeção do agonista TRPV1, capsaicina (CAP), diminuiu o tempo de permanência dos animais nos braços abertos, caracterizando um aumento nas respostas defensivas neste teste. No mesmo trabalho, o antagonista de receptores TRPV1, capsazepina, reverteu esse efeito (Mascarenhas, Gomes *et al.*, 2013). No modelo de exposição ao predador, observou-se um aumento na ativação de neurônios TRPV1-positivos na MCPdl de ratos após o encontro com um gato (Aguiar, Almeida-Santos *et al.*, 2015). Essa ativação, bem

como as respostas defensivas, foram reduzidas quando os animais receberam a microinjeção de capsazepina na MCPdl (Aguiar, Almeida-Santos *et al.*, 2015). Isso indica que os receptores TRPV1 na MCPdl são ativados durante a expressão de respostas defensivas, e que seu bloqueio reduz a expressão emocional frente ao predador. Um resumo das principais interferências farmacológicas sobre os sistemas endocanabinoide e vaniloide na MCPdl pode ser encontrado na tabela 1.

1.5.4. Outros moduladores

Outros receptores e mediadores da atividade da MCPdl interferem no funcionamento de receptores NMDA, CB1, TRPV1 e AMPA. Esta interferência pode ocorrer diretamente, como a produção de óxido nítrico (NO) como consequência da ativação de canais TRPV1 (Batista, Fogaça *et al.*, 2015), ou ainda indiretamente, como a regulação de níveis intracelulares de Ca^{+2} pelos receptores metabotrópicos CB1 e serotoninérgicos $5HT_{1A}$ (Jenck, Broekkamp *et al.*, 1989). Intervenções farmacológicas sobre estes e outros moduladores estão descritas na tabela 2 no apêndice C do presente trabalho.

Tabela 1: Moduladores da resposta defensiva microinjetados na MCPdl: endocanabinoides e vaniloides

Ações de Drogas	Modelos	Avaliação	Resposta	Referências
Agonistas de receptores CB1	LCE, Vogel, exposição ao predador, condicionamento contextual, estimulação elétrica, CA	sob efeito de droga	↓ respostas defensivas	(Finn, Jhaveri <i>et al.</i> , 2003; Moreira, Aguiar <i>et al.</i> , 2007; Lisboa, Resstel <i>et al.</i> , 2008; Resstel, Lisboa <i>et al.</i> , 2008; Campos e Guimarães, 2009; Casarotto, Terzian <i>et al.</i> , 2012; Almeida-Santos, Moreira <i>et al.</i> , 2013; Lisboa, Camargo <i>et al.</i> , 2014; Batista, Fogaça <i>et al.</i> , 2015)
Inibidores da captação ou degradação de AEA ou 2-AG	LCE, Vogel, condicionamento contextual	sob efeito de droga	↓ respostas defensivas	(Moreira, Aguiar <i>et al.</i> , 2007; Lisboa, Resstel <i>et al.</i> , 2008; Resstel, Lisboa <i>et al.</i> , 2008; Almeida-Santos, Moreira <i>et al.</i> , 2013)
Agonistas inversos de receptores CB1	LCE, Vogel, exposição ao predador, condicionamento contextual, estimulação elétrica	sob efeito de droga	↓ efeitos de agonistas CB1 ↓ efeitos de inibidores da captação de AEA ↑ respostas defensivas	(Finn, Jhaveri <i>et al.</i> , 2003; Moreira, Aguiar <i>et al.</i> , 2007; Lisboa, Resstel <i>et al.</i> , 2008; Resstel, Lisboa <i>et al.</i> , 2008; Casarotto, Terzian <i>et al.</i> , 2012; Almeida-Santos, Moreira <i>et al.</i> , 2013; Lisboa, Camargo <i>et al.</i> , 2014; Uliana, Hott <i>et al.</i> , 2016)
Agonista TRPV1	LCE, condicionamento contextual, estimulação elétrica	sob efeito de droga	↑ respostas defensivas	(Mascarenhas, Gomes <i>et al.</i> , 2013; Uliana, Hott <i>et al.</i> , 2016)
Antagonistas de receptores TRPV1	LCE, Vogel, exposição ao predador, estimulação elétrica	sob efeito de droga	↓ efeitos de altas doses de AEA ↓ respostas defensivas	(Campos e Guimarães, 2009; Casarotto, Terzian <i>et al.</i> , 2012; Mascarenhas, Gomes <i>et al.</i> , 2013; Aguiar, Almeida-Santos <i>et al.</i> , 2015; Batista, Fogaça <i>et al.</i> , 2015; Uliana, Hott <i>et al.</i> , 2016)

Tabela 1: Efeitos dos moduladores endocanabinoides e vaniloides microinjetados na MCPdl sobre as respostas defensivas. LCE = labirinto em cruz elevado, Vogel = teste de lamber punido, CA = campo aberto.

1.6. Condicionamento clássico

Respostas comportamentais incondicionadas são aquelas que não dependem de aprendizagem prévia, conservadas evolutivamente pela grande relevância para a sobrevivência. O desencadeamento destas respostas ocorre rapidamente, e alguns exemplos são o piscar de olhos, o reflexo de contração muscular ao sentir dor, ou respostas defensivas frente a um predador. No momento em que um animal se expõe a um estímulo que deflagra as respostas incondicionadas, ocorre em paralelo a associação de pistas ambientais. Caso o animal encontre novamente pistas semelhantes às conhecidas, reações de defesa são desencadeadas na expectativa que o estímulo incondicionado esteja presente. Assim, um animal que apresente congelamento frente ao predador pode também apresentar um comportamento semelhante quando reexposto ao contexto, mesmo na ausência do predador (Souza, 2007; Eichenbaum, 2008; Souza e Carobrez, 2016).

Experimentalmente, o protocolo de condicionamento clássico foi descrito pelo fisiologista Ivan Pavlov em 1927 [Pavlov, 1927, apud (Rescorla e Wagner, 1972)]. Ao estudar o reflexo de salivação em cães, Pavlov percebeu que esta resposta poderia ser evocada também quando um som fosse emitido. Este fenômeno decorreu de um pareamento prévio entre a apresentação de comida e de som. Mais detalhadamente, a apresentação da comida (estímulo incondicionado, EI) desencadeava uma resposta incondicionada do cão (salivação). Neste momento, a apresentação de som (estímulo neutro, EN) não desencadeava salivação. Porém, após algumas apresentações conjuntas de comida e do som, a salivação (resposta condicionada) foi desencadeada pela emissão do som (estímulo condicionado, EC).

O condicionamento aversivo foi testado experimentalmente em humanos. No polêmico trabalho de Watson e Rayner em 1920 [publicado novamente em 2000 (Watson e Rayner, 2000)], um bebê (conhecido como “pequeno Albert”) foi exposto a um estrondo repentino (EI), que desencadeava o susto seguido de choro. Em momentos diferentes, o pequeno Albert foi colocado em contato com um rato branco (EN). Nestas ocasiões, a curiosidade, tranquilidade e brincadeira foram observadas. No entanto, após algumas apresentações conjuntas entre o rato e o barulho, o bebê passou a chorar e evitar contato com o rato branco (EC). Curiosamente, as respostas condicionadas de choro também foram desencadeadas por pistas semelhantes, como pedaços de pano branco felpudo (Maren, 2001).

Comumente, utiliza-se o protocolo de condicionamento clássico em animais como ratos e camundongos, com choques elétricos nas patas

e diversas pistas contextuais (Ledoux, 2000; Eichenbaum, 2008). Este protocolo permite intervenções sobre o processo inicial de aprendizagem, sobre a consolidação de memórias, bem como interferências posteriores como reconsolidação ou extinção. O condicionamento clássico apresenta-se como um dos principais testes para estudos das consequências de eventos aversivos, por possuir algumas características como alta taxa de reprodutibilidade, simplicidade e baixo custo (Ledoux, 2000; Maren, 2001).

Embora o choque elétrico nas patas seja o estímulo aversivo incondicionado mais amplamente utilizado, existem outros estímulos que desencadeiam respostas defensivas incondicionadas. Este é o caso de sons altos (Leaton e Cranney, 1990), inalação de dióxido de carbono (Mongeluzi, Rosellini *et al.*, 1996), apresentação do predador (Dielenberg, Hunt *et al.*, 2001), substâncias que causam náuseas (cloreto de lítio) (Guitton e Dudai, 2004), estimulação química de receptores adrenérgicos no hipotálamo (PMd) (Pavesi, Canteras *et al.*, 2011) ou glutamatérgicos na MCPdl (Bittencourt, Carobrez *et al.*, 2004; Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012). Ressalta-se, no entanto, que a aprendizagem depende da natureza, tempo de exposição e intensidade da apresentação destes estímulos. Portanto, um estímulo pode desencadear respostas incondicionadas sem gerar aprendizagem (Fanselow, 1984; Fanselow e Lester, 1988).

Para os estímulos neutros, passíveis de serem transformados em estímulos condicionados, são utilizados estímulos visuais e sonoros de baixa intensidade. Além destas pistas, o próprio contexto no qual o animal passa pelo condicionamento pode se transformar em estímulo condicionado. Em menor escala, estímulos olfatórios também são utilizados (Slotnick e Katz, 1974; Otto, Cousins *et al.*, 2000).

1.7. MCP e aprendizagem

O trabalho com esQUIVA inibitória no qual os animais interrompem a estimulação da MCPdl traz uma informação importante. Os animais modificam sua estratégia comportamental ao longo das sessões, indicando que a aversão da estimulação promoveu aprendizagem (Schenberg e Graeff, 1978). Em outro protocolo, a apresentação de uma pista luminosa ocorreu pouco antes da estimulação elétrica da MCPdl. Quando os mesmos animais foram expostos somente à pista luminosa, emitiram respostas defensivas (Di Scala, Mana *et al.*, 1987). Portanto, a estimulação elétrica da MCPdl foi capaz de gerar uma associação entre a pista visual e o estímulo aversivo. Mais recentemente,

parte destes dados foram reproduzidos no condicionamento contextual e ao som (Kim, Horovitz *et al.*, 2013).

Resultados convergentes foram encontrados por meio de uma ferramenta farmacológica. A exposição ao predador em um ambiente controlado faz com que os ratos apresentem respostas defensivas quando reexpostos ao mesmo ambiente, 24 horas depois. Caso os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na MCPdl estejam bloqueados no momento da exposição ao predador, as respostas defensivas imediatas são reduzidas. Principalmente, na reexposição ao contexto, estes animais apresentam respostas exploratórias inalteradas em relação aos controles (Souza, 2007; Souza e Carobrez, 2016). Estes resultados indicam que as respostas defensivas frente ao predador, e também a aprendizagem resultante desta experiência, dependem da ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na MCPdl.

1.8. Condicionamento aversivo olfatório

O bom funcionamento do sistema olfatório garante que roedores encontrem fontes de alimento, parceiros sexuais e evitem os predadores (Su, Menuz *et al.*, 2009). Sendo assim, pistas olfativas têm grande importância na interação animal/meio ambiente, e o sistema olfatório pode ser considerado como a principal via de entrada de informações sensoriais em roedores. De fato, odores servem como estímulos neutros/condicionados no condicionamento com choques nas patas (Otto, Cousens *et al.*, 2000; Kroon e Carobrez, 2009).

Apesar do olfato não ser o sentido predominante em seres humanos, pistas olfativas são capazes de desencadear ataques de pânico em refugiados de guerra (Hinton, Pich *et al.*, 2004). Ainda, a organização funcional do sistema olfatório está bem preservada filogeneticamente, uma vez que apresenta similaridades desde insetos até seres humanos (Su, Menuz *et al.*, 2009). Por estas razões, o estudo do condicionamento aversivo por pista olfatória apresenta-se como uma boa ferramenta na pesquisa das bases neurobiológicas de fenômenos emocionais e mnemônicos (Otto, Cousens *et al.*, 2000).

A extinção de respostas defensivas requer sessões mais longas para ocorrer caso pistas olfatórias sejam utilizadas, em comparação com pistas visuais ou sonoras (Richardson, Tronson *et al.*, 2002). Esta diferença comportamental tem como base o acionamento de diferentes vias de processamento neural dos estímulos. Para odores, a ativação de neurônios do epitélio olfativo desencadeia a ativação do bulbo olfatório, que possui projeções diretas para a amígdala. No caso de estímulos visuais e auditivos, a rede neuronal depende de uma modulação talâmica

antes de atingir outras regiões cerebrais como a amígdala. Por esta razão, pistas olfatórias têm maior potencial e rapidez no processamento de associações emocionais (Price, 1973).

A exposição de um rato ao gato gera um condicionamento contextual à caixa de exposição (Blanchard e Blanchard, 1969; 1989). Além disso, resultados semelhantes podem ser obtidos apenas com a apresentação do odor de gato (Dielenberg e Mcgregor, 2001; Souza, 2007; Do Monte, Canteras *et al.*, 2008; Souza e Carobrez, 2016). O condicionamento aversivo olfatório pode ser também produzido experimentalmente pela estimulação de receptores NMDA na MCPdl, associado a um odor neutro (Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012). Neste protocolo, os animais responderam à estimulação com respostas de fuga, seguidas por alguns minutos de congelamento. Quando reexpostos ao odor condicionado, os animais desenvolveram estratégias comportamentais defensivas, caracterizadas pela esquiva. A estimulação da MCPdl, portanto, promoveu um estado emocional aversivo capaz de associar-se ao odor (Canteras, Pavesi *et al.*, 2015).

A manutenção da memória deste evento foi verificada 48 horas após o condicionamento, ressaltando o caráter duradouro da memória associativa. No entanto, uma avaliação minuciosa das respostas defensivas logo após a microinjeção não foi realizada (Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012), o que até o momento inviabilizou a relação entre estas respostas defensivas incondicionadas com a formação de uma memória traumática, revelada a partir de um estímulo condicionado.

2. Justificativa

Considerando o que foi exposto até aqui, a MCPdl pode atuar como iniciadora do processo de formação de uma memória traumática. Essa instrução seria passível de modulação farmacológica local, resultando em mudanças tanto nas respostas incondicionadas quanto no processo subsequente de aprendizagem. Neste âmbito, modificações na expressão de respostas incondicionadas poderiam prever alterações na aprendizagem. A literatura atual indica que os receptores endocanabinoides CB1 e os vaniloides TRPV1 modulam a excitabilidade da MCPdl, apresentando-se como alvos de intervenções farmacológicas. Ainda, a análise comportamental durante estes processos poderia indicar como a modulação farmacológica em uma estrutura mesencefálica pode gerar consequências sistêmicas duradouras.

3. Hipótese

Os receptores CB1 e TRPV1 na MCPdl modulam a expressão de respostas defensivas e a aprendizagem por meio do controle da atividade glutamatérgica nesta estrutura.

4. Objetivo geral

Estudar a influência da sinalização endocanabinoide CB1 e vaniloide TRPV1 na reação de defesa incondicionada produzida pelo NMDA aplicado na MCPdl e na aquisição de um condicionamento aversivo olfatório.

4.1. Objetivos específicos

1- Investigar os efeitos da microinjeção de NMDA na MCPdl sobre as respostas defensivas incondicionadas e a formação de memória.

2- Analisar a possibilidade da potencialização da estimulação na MCPdl pela interferência em receptores CB1 sobre as respostas defensivas incondicionadas e a aprendizagem subsequente.

3- Estudar possíveis interações funcionais entre os receptores CB1 e TRPV1 presentes na MCPdl e os seus efeitos nas respostas defensivas incondicionadas e a aprendizagem.

4- Investigar a contribuição do glutamato endógeno e de receptores glutamatérgicos AMPA na modulação dos receptores CB1 e TRPV1 na MCPdl durante as respostas defensivas incondicionadas e a consequente formação de memória.

5. Material e métodos

5.1. Animais

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram usados ratos *Wistar* machos, com peso entre 280 a 350 gramas e idade entre três a quatro meses. Os animais são provenientes de uma colônia mantida no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Após o desmame – o que acontece em torno de vinte e um dias –, os ratos foram transportados para o Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia e ali mantidos até atingirem a idade e peso adequados para o procedimento cirúrgico.

Em torno de sete dias antes do procedimento cirúrgico, os animais foram deslocados para o Biotério do Laboratório de Neurobiologia Comportamental, onde foram distribuídos em grupos de três a quatro animais por caixa, em gaiolas de polipropileno (40 x 33 x 16 cm) com maravalha. Todos estes ambientes possuem controle de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo de luz (12/12 h) iniciados às sete horas da manhã e desligados às 19 h. Com exceção dos momentos da cirurgia e protocolos comportamentais, os animais tiveram livre acesso à água e à ração.

5.2. Considerações éticas

Este trabalho utilizou procedimentos experimentais aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o número 042/CEUAPROPESC/2013, projeto de pesquisa PP0849/2013. Sendo assim, foram respeitadas as recomendações éticas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e a lei AROUCA (Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008).

O cálculo estatístico para definir o tamanho da amostra utilizou o teste de estimativas aplicado à fórmula descrita abaixo:

$$n = \{[(z_\alpha + z_\beta) * s]/\delta\}^2$$

O cálculo baseia-se no intervalo de confiança da diferença entre as médias ou entre proporções (δ), do desvio-padrão (s) do parâmetro alfa (α) que é a probabilidade aceitável de erro do Tipo I (falso positivo) e do parâmetro beta (β), erro do Tipo II (falso negativo).

Portanto:

1. O valor de α foi fixado em 0,05. Assim o valor de z_α baseado na tabela de valores de z para distribuição bi-caudal é 1,96.
2. O valor de β foi fixado em 0,10. Assim o valor de z_β baseado na tabela de valores de z (distribuição unicaudal) é 1,28.

3. O valor da diferença entre as médias dos grupos como sendo pelo menos 40% (baseado em dados experimentais do nosso laboratório). Experimentos biológicos têm embutido um erro da ordem de 10-15% (resultantes de variações individuais), pois diferenças entre dois grupos que sejam menores que 20% do valor da média de cada grupo aumentam a probabilidade de cometer erros tipo I ou tipo II.

4. O valor do desvio padrão como sendo em média 35% do valor das médias. (baseado em dados experimentais do nosso laboratório):

$$n = \{[(1,96 + 1,28) * 35]/40\}^2 = 8,0$$

Portanto, cada grupo experimental foi composto por 8 animais. Considerando a estimativa de acerto de 60% na cirurgia estereotáxica, cada grupo experimental foi constituído de 14 animais.

5.3. Cirurgia estereotáxica

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implantação de cânulas-guia direcionadas para a porção rostral da matéria cinzenta periaquedutal (MCPdl). Tal procedimento teve início com a anestesia por meio de uma solução de cloridrato de quetamina (10%) e cloridrato de xilazina (2%, ambas produzidas por Syntec do Brasil[®], Ltda. Cotia/SP) (4:3; 1,5 ml/Kg). Após verificação da ausência de reflexos, os ratos foram posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting modelo 300, EUA). A assepsia do escalpo foi realizada com uma solução de álcool iodado (2%), e um anestésico e vasoconstritor local foi injetado por via subcutânea (lidotesim 3%: cloridrato de lidocaína e norepinefrina 1:50.000; 0,1 ml, PROBEM, Alpino Catanduva/SP).

Após os procedimentos descritos, seguiu-se com a retirada do escalpo e a assepsia com H₂O₂ (3%), permitindo a visualização de lambda e bregma. Então, dois parafusos de aço inoxidável foram inseridos, um no osso frontal ipsilateral à cânula-guia e outro no osso parietal, contralateral à cânula-guia. Tomando-se o bregma como referência e com base no atlas de Paxinos (Paxinos e Watson, 1998), a cânula-guia (13 mm, 22G) foi posicionada em um ângulo de 22°, nas coordenadas AP= - 5,8; ML= + 2,0; DV= - 4,0 mm.

Em seguida ao posicionamento da cânula-guia, a superfície craniana foi recoberta por um acrílico auto-polimerizável (Jet[®], Brasil), reunindo a cânula-guia e os dois parafusos em uma prótese única. Para prevenir a oclusão do canal, um mandril nº 30 foi inserido na cânula-guia. Além disso, para garantir a saúde dos animais, foi iniciado o tratamento com pentabiótico (benzilpenicilina e estreptomicina, 10 mg/Kg, 60.000 IU; 0,1 ml; Fort Dodge[®], Brasil) via intramuscular na

coxa direita e um analgésico e antitérmico banamine (flunixinameglumina, 2,5 mg/Kg; 0,1 ml; Schering-Plough[®], Brasil) via subcutânea no dorso dos animais. Após os tratamentos, os animais se recuperaram em ambiente aquecido (25°C), recobertos por maravalha. Uma vez recuperados da anestesia, os animais foram realocados no biotério do Laboratório de Neurobiologia do Comportamento.

5.4. Fármacos e soluções utilizados nos experimentos

- N-metil-D-aspartato (NMDA; Sigma-Aldrich[®]): agonista dos receptores NMDA glutamatérgicos. Atua na subunidade GluN2.
- AM251 (Tocris Bioscience[®]): antagonista/agonista inverso dos receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) $IC_{50} = 8$ nM, $K_i = 7,49$ nM e agonista de receptores GPR55 $EC_{50} = 39$ nM.
- Capsaicina (Sigma-Aldrich[®]): agonista dos receptores vaniloides subtipo 1 (TRPV1) composto ativo de pimentas.
- AP5 (RBI[®]): antagonista competitivo dos receptores NMDA glutamatérgicos. Atua na subunidade GluN2.
- Riluzol (Sigma-Aldrich[®]): inibidor da liberação de glutamato, anticolvulsivante e medicamento utilizado para o tratamento da esclerose amiotrófica lateral.
- DNQX (RBI[®]): antagonista competitivo de canais AMPA/cainato. Atua sobre a subunidade GluA2 do receptor de AMPA, portanto, sem ação sobre o sítio da glicina (na subunidade GluN1 ou do glutamato GluN2) em receptores NMDA.
- Acetato de amila (Aldrich Chemical[®], EUA): odor sintético de banana.

As concentrações dos fármacos e intervalos de microinjeções foram baseadas na literatura: NMDA (25, 50, 100 e 200 pmol) (Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012), AM251 (50, 100, 200 pmol) (Moreira, Aguiar *et al.*, 2007; Lisboa, Resstel *et al.*, 2008; Resstel, Lisboa *et al.*, 2008), capsaicina (CAP, 0,1; 1; 10 nmol) (Palazzo, De Novellis *et al.*, 2002; Mcgaraughty, Chu *et al.*, 2003; Terzian, Aguiar *et al.*, 2009; Mascarenhas, Gomes *et al.*, 2013), AP5 (6 nmol) (Souza, 2007; Kincheski e Carobrez, 2010), riluzol (2 e 4 nmol) (Palazzo, De Novellis *et al.*, 2002) e DNQX (2 e 4 nmol) (Haghparast, Gheitasi *et al.*, 2007). O NMDA e AP5 foram diluídos em uma solução-tampão fosfato (PBS 0,1 M; pH=7,4), enquanto AM251, CAP, riluzol e DNQX foram dissolvidos em Tween 80 a 5% e então em PBS.

Conforme o protocolo experimental, os grupos controle receberam somente PBS ou a solução PBS + Tween 80. Todos os fármacos foram diluídos em soluções iniciais de maior concentração e armazenados em alíquotas em congelador a -20°C . No dia das microinjeções, as soluções foram descongeladas e diluídas para as concentrações necessárias. A solução de acetato de amila foi diluída em propilenoglicol a 5%, mantida em congelador a -20°C e levada à temperatura ambiente para ser usada nos experimentos.

5.5. Microinjeção cerebral

A administração dos fármacos diretamente na porção rostral da MCPdl ocorreu através de uma agulha 27G de 14,5 mm (portanto, 1,5 mm além da cânula-guia). Para isso, os animais foram cuidadosamente contidos com uma flanela e o mandril foi retirado. Uma lima odontológica de 13 mm foi inserida na cânula-guia para eliminar qualquer obstrução. Em seguida, a agulha foi inserida vagarosamente, alcançando a MCPdl. Esta agulha estava acoplada a uma microseringa (Hamilton, 5 μl) por um tubo de polietileno transparente, através do qual o fluxo das soluções poderia ser conferido. A microseringa, por sua vez, foi controlada por uma bomba de microinjeção (*Insight*, modelo BI 2.000), regulada para microinfundir o volume de 0,2 μl a uma taxa de 0,6 $\mu\text{l}/\text{min}$, desta forma, tomando 30 segundos.

Uma vez encerrada a microinjeção, a agulha permaneceu no local por mais 20 segundos, a fim de permitir a infusão das soluções. Apenas nas microinjeções de NMDA este intervalo de tempo não foi cumprido, uma vez que a resposta comportamental iniciou durante as microinjeções, confirmando a infusão do fármaco. Por isso, os animais sujeitos à microinjeção de NMDA foram colocados na caixa de condicionamento imediatamente após a microinjeção. Todo o procedimento durou de um minuto e meio a dois minutos.

5.6. Teste comportamental

Passado o período de recuperação da cirurgia (sete a dez dias), iniciou-se o teste comportamental. Para ambientação, os animais foram retirados do biotério do Laboratório de Neurobiologia Comportamental e foram colocados em uma sala adjacente à sala de experimentação. Ali permaneceram por 30 minutos, com iluminação de 80 lux e temperatura controlada ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Uma caixa pequena, com maravalha, foi utilizada para transportar os animais da sala de ambientação para a sala de experimentação.

Logo após a exposição aos aparatos, os animais foram colocados em outra caixa moradia em uma sala de espera. Assim, não houve contato entre os animais que passaram pelo procedimento e os que ainda seriam submetidos. Após a realização do experimento com todos os animais da mesma caixa, os ratos foram recolocados na caixa moradia original e retornados ao biotério.

O condicionamento por pista olfatória foi composto de duas fases: a primeira, aquisição da memória aversiva, e a segunda, expressão desta memória (figura 3). A primeira fase foi dividida em duas sessões em dois dias consecutivos. No primeiro dia, os animais foram colocados dentro de uma caixa (25 x 25 x 25 cm) com piso gradeado e com a parede frontal e tampa em acrílico transparente, permitindo a visualização do animal pelo experimentador. Os animais permaneceram nesta caixa por cinco minutos, e esta sessão foi chamada de familiarização na caixa de condicionamento (dia 1, figura 3).

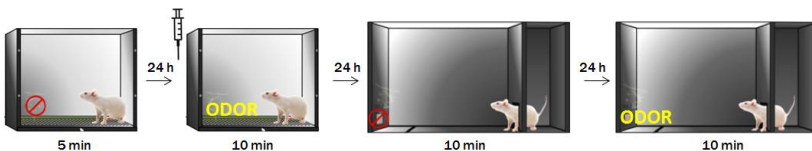


Figura 3: protocolo experimental do condicionamento aversivo olfatório. A fase de aquisição consiste nos dois primeiros dias, e a fase de expressão nos dois últimos. Todas as microinjeções foram realizadas no dia 2, dia do condicionamento. O odor esteve presente no segundo e quarto dia. Protocolo e figuras adaptados de (Kroon e Carobrez, 2009; Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012).

No dia seguinte, os animais receberam os tratamentos farmacológicos na MCPdl e então reexpostos à caixa com piso gradeado. Desta vez, um pedaço de papel filtro (3 x 3 cm), embebido com 100 μ l da solução de acetato de amila (odor de banana, com valência emocional neutra) foi posicionado abaixo do piso gradeado. Os ratos permaneceram nesta caixa por dez minutos após as microinjeções na MCPdl, e os comportamentos foram registrados e analisados (dia 2). Com base na literatura, a expressão de comportamentos defensivos, aliada à redução de comportamentos exploratórios e de autolimpeza (considerados não defensivos) foi interpretada como ativação da MCPdl. Porém, uma confirmação do sítio de microinjeção foi também realizada (item 5.8).

Durante a segunda fase, os animais foram expostos a uma nova caixa, dividida em dois compartimentos. Um maior (40 x 40 x 25 cm),

sem cobertura e, portanto, mais iluminado (4 lux), e um compartimento menor (40 x 20 x 25 cm), com cobertura e menos iluminado (0-1 lux). A passagem dos animais entre os dois ambientes foi possibilitada por uma abertura (6 x 6 cm). Esta caixa foi construída em acrílico preto, com as paredes frontais em acrílico transparente, possibilitando o registro dos comportamentos. Esta caixa foi chamada de “caixa de odor”.

A divisão da caixa em compartimentos propiciou um ambiente no qual se pode observar o conflito entre a exploração *versus* comportamentos defensivos, uma vez que simula um ambiente potencialmente perigoso (o compartimento maior e de maior luminosidade) e um ambiente seguro (o compartimento menor e menos iluminado). Desta forma, pode-se analisar os comportamentos defensivos relacionados à esquia de potenciais ameaças (Dielenberg, Hunt *et al.*, 2001; Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012).

Ainda, por ser diferente da caixa de condicionamento, a caixa de odor possibilitou a redução de interferências contextuais na expressão da memória aversiva, isolando como único fator comum o odor de acetato de amila. Portanto, a expressão de comportamentos de esquia à fonte de odor neste aparato foi interpretada como aprendizagem da associação odor/instrução aversiva causada pela estimulação da MCPdl no dia do condicionamento.

Esta segunda fase foi composta de dois dias. Uma sessão de familiarização, na qual os animais foram expostos à caixa de odor por dez minutos, na ausência de pista olfatória, para que pudessem explorar o novo ambiente livremente (dia 3, figura 3). No dia seguinte, os ratos foram reexpostos à caixa de odor, desta vez na presença de um pedaço de papel filtro impregnado com 100 µl de solução de acetato de amila, localizado em um pequeno recipiente de acrílico transparente (9 x 6 x 1 cm) no compartimento maior, fixado na parede oposta à divisão entre os compartimentos (dia 4). Uma marcação a sete centímetros da parede foi usada como referência para a medida do comportamento de aproximação à fonte de odor.

Ambas as caixas experimentais foram posicionadas dentro de uma capela de fluxo, para exaustão do odor. A fim de evitar o acúmulo de odor no aparato, o exaustor foi mantido acionado por cerca de dois minutos nos intervalos entre a exposição de cada animal. Na presença dos animais, o exaustor foi desligado a fim de evitar barulho e fluxo de ar durante a análise comportamental. Ao final do procedimento, o exaustor permaneceu ligado até o dia seguinte. Além disso, os aparatos foram higienizados com uma solução de álcool a 10 % nos intervalos entre as exposições dos animais.

Todas as sessões foram registradas em vídeo. Os comportamentos durante o dia de condicionamento (dia 2) e na fase de expressão (dias 3 e 4) foram avaliados. Na sessão de condicionamento, destacam-se os seguintes comportamentos:

Fuga (*backward defense*, recuo defensivo): movimentos bruscos de fuga, direcionados para trás do animal, característicos da estimulação da porção rostral da MCPdl (Bandler, Carrive *et al.*, 1991).

Congelamento (*freezing*): postura imóvel, com a única exceção dos movimentos necessários à respiração. Considerada uma resposta comportamental clássica de medo em roedores (Blanchard e Blanchard, 1969; Crawford, 1982; Bittencourt, Carobrez *et al.*, 2004).

Agachar-cheirar (*crouch sniffing*): o rato permanece com o dorso arqueado, sem movimentos, com exceção dos movimentos das vibrissas e cabeça. Uma resposta defensiva intermediária entre congelamento e ambulação, possuindo características de avaliação de risco (Blanchard e Blanchard, 1989).

Investigação vertical (*rearing*): o animal assume uma postura ereta, apoiando-se nas patas traseiras e na cauda. As patas dianteiras, na grande maioria do tempo, permanecem apoiadas nas laterais da caixa. Comportamento exploratório clássico, caracterizado pelo ato de levantar, acompanhado com movimentos de vibrissas (Lever, Burton *et al.*, 2006).

Autolimpeza (*grooming*): com as patas dianteiras e a boca, os ratos limpam o pelo da cabeça e do restante do corpo. Comportamento geralmente observado quando os animais estão fora de perigo (Bolles, 1960).

Ambulação (*sniffing*): animal caminha pela caixa, com movimentos das vibrissas e da cabeça, cheirando o ambiente. Comportamento exploratório mais evidente em aparatos experimentais que permitem a livre movimentação dos animais (Blanchard e Blanchard, 1989).

Durante a fase de expressão (dias 3 e 4), foram avaliados os comportamentos frente à caixa de odor, expressos pela porcentagem do tempo total da sessão:

Tempo escondido (%TE): tempo em que o animal permaneceu dentro do compartimento menor, contado a partir do momento em que as quatro patas entram no compartimento e encerrado somente quando todas as quatro patas saíam do compartimento. Medida relacionada à esquivas, mantendo a maior distância possível (Kroon e Carobrez, 2009; Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012).

Tempo de aproximação (%TA): tempo de permanência na zona delimitada entre o odor e uma marcação a sete centímetros. O cronômetro foi acionado a partir do momento em que o animal cruzava a linha com o focinho, e parado somente quando todas as patas estavam fora da área delimitada. Medida relacionada à esquiva, evitando contato com o odor (Kroon e Carobrez, 2009; Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012).

Número de cruzamentos (CR): número de entradas no compartimento fechado somado ao número de aproximações da fonte de odor. Foi considerada uma entrada no compartimento fechado toda vez que o animal entrava com as quatro patas neste compartimento. Já o número de aproximações foi considerado como toda vez que o animal passava com o focinho da marcação a sete centímetros da fonte de odor. Este somatório indica a locomoção dos animais durante os dez minutos de sessão. (Kroon e Carobrez, 2009; Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012)

Avaliação de risco (*head-out*): tempo de permanência na divisão entre os dois compartimentos, com a cabeça para fora e o corpo para dentro do compartimento menor. O cronômetro foi acionado quando o focinho atravessava a passagem entre os dois compartimentos, e pausado assim que o animal saía com as quatro patas do compartimento menor, ou retornava a cabeça para o compartimento menor. Este comportamento também foi expresso como porcentagem, mas foi considerado como porcentagem total o tempo escondido (%TE) (Kroon e Carobrez, 2009; Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012).

5.7. Protocolo experimental

Todos os animais foram submetidos ao protocolo de condicionamento aversivo olfatório. Os experimentos apresentados diferem pelas intervenções farmacológicas antes da sessão de condicionamento, no dia 2. Sendo assim, os procedimentos durante as demais sessões não diferem entre os experimentos e foram detalhados no item 5.6.

Objetivo específico 1: investigar os efeitos da microinjeção de NMDA na MCPdl sobre as respostas defensivas incondicionadas e a formação de memória.

5.7.1. Experimento 1: curva dose-resposta para a estimulação da MCPdl pelo agonista glutamatérgico NMDA.

Este experimento foi desenhado para investigar se as diferentes doses de NMDA seriam capazes de gerar respostas defensivas durante a

sessão de condicionamento. Também tem o objetivo de estabelecer ao menos uma dose subefetiva para experimentos subsequentes sobre a potencialização das respostas defensivas. O desenho experimental também proporcionou a análise da relação entre respostas defensivas e aprendizagem nas diferentes doses.

No dia 2, os animais receberam a microinjeção de veículo (como controle para experimentos posteriores, nos quais os animais foram submetidos a duas microinjeções) e dez minutos após, as microinjeções de PBS (salina com tampão fosfato) ou NMDA nas doses de 25, 50, 100 ou 200 pmol na MCPdl. Imediatamente após a segunda microinjeção, os animais foram expostos à caixa de condicionamento na presença do odor, e foram mantidos ali por dez minutos.

Objetivo específico 2: analisar a possibilidade da potencialização da estimulação na MCPdl pela interferência em receptores CB1 sobre as respostas defensivas incondicionadas e a aprendizagem subsequente.

5.7.2. Experimento 2: potencialização das respostas defensivas e aprendizagem pelo antagonista/agonista inverso de receptores CB1 associado à estimulação subefetiva de NMDA na MCPdl.

Neste experimento foi testada a possibilidade de que o pré-tratamento com o agonista inverso de receptores CB1 poderia potencializar as respostas defensivas e aprendizagem de uma estimulação subefetiva de receptores NMDA.

Portanto, os animais receberam um pré-tratamento com AM251, um agonista inverso de receptores CB1, nas doses de 50, 100 ou 200 pmol e, dez minutos após, a segunda microinjeção com NMDA na dose de 25 pmol. Os grupos controle foram compostos por 1) pré-tratamento com veículo associado ao tratamento com NMDA 25 pmol, ou 2) pré-tratamento com AM251 200 pmol associado ao tratamento com PBS. Após a segunda microinjeção, todos os animais foram colocados na caixa de condicionamento, preenchida com odor.

Objetivo específico 3: estudar possíveis interações funcionais entre os receptores CB1 e TRPV1 presentes na MCPdl e os seus efeitos nas respostas defensivas incondicionadas e a aprendizagem. (experimentos 3 a 7).

5.7.3. Experimento 3: curva dose-resposta para a estimulação da MCPdl pelo agonista de receptores vaniloides TRPV1.

Os receptores CB1 e TRPV1 são ativados pelo mesmo agonista, a anandamida (AEA), porém, com efeitos opostos. Tendo isso em vista, uma potencialização da atividade na MCPdl poderia ser obtida tanto pelo agonista inverso de receptores CB1 quanto por um agonista de receptores TRPV1. Portanto, coube investigar se a ativação de receptores TRPV1 por um agonista seletivo poderia gerar respostas defensivas e aprendizagem.

Sendo assim, os animais receberam um pré-tratamento com o agonista de receptores TRPV1, capsaicina (CAP), nas doses de 0,1, 1 e 10 nmol na MCPdl. Dez minutos após, receberam a segunda microinjeção com PBS e então foram colocados na caixa de condicionamento, com o odor.

5.7.4. Experimento 4: influência do bloqueio de receptores NMDA sobre os efeitos da maior dose do agonista TRPV1.

De acordo com o experimento 3, a microinjeção de CAP na dose de 10 nmol produziu respostas defensivas e aprendizagem. Neste experimento, investigou-se a possibilidade de que os efeitos observados se dariam pela ativação direta de receptores NMDA na MCPdl, possivelmente por uma perda de seletividade da CAP na dose maior.

Sendo assim, os animais deste experimento receberam o pré-tratamento com o antagonista de receptores NMDA, AP5, na dose de 6 nmol. Cinco minutos após, receberam o tratamento com CAP 10 nmol e dez minutos depois, PBS. Em seguida à microinjeção de PBS, os animais foram colocados na caixa de condicionamento impregnada com o odor. O grupo controle recebeu PBS - 5 min - CAP 10 nmol - 10 min - PBS.

5.7.5. Experimento 5: potencialização das respostas defensivas e aprendizagem pelo agonista de receptores TRPV1 associado à estimulação subefetiva de NMDA na MCPdl.

Aqui foi testada a possibilidade de que o pré-tratamento com o agonista de receptores TRPV1 em doses subefetivas poderia potencializar as respostas defensivas e aprendizagem da estimulação subefetiva de receptores NMDA.

Portanto, os animais receberam um pré-tratamento com CAP nas doses de 0,1 ou 1 nmol e, dez minutos após, a segunda microinjeção com NMDA na dose de 25 pmol. Os grupos controle foram compostos por 1) pré-tratamento com veículo associado ao tratamento com NMDA 25 pmol, ou 2) pré-tratamento com CAP 0,1 ou 3) 1 nmol associado ao

tratamento com PBS. Após a segunda microinjeção, todos os animais foram submetidos à caixa de condicionamento, preenchida pelo odor.

5.7.6. Experimento 6: condicionamento aversivo olfatório pela associação entre o agonista inverso de receptores CB1 e o agonista de receptores TRPV1 na MCPdl.

Ambos os tratamentos (agonista inverso em CB1 e agonista em TRPV1) foram capazes de potencializar os efeitos de uma estimulação subefetiva de receptores NMDA. Tendo isso em vista, neste experimento investigou-se a possibilidade de que uma associação destes dois pré-tratamentos poderia desencadear efeitos sobre as respostas defensivas e aprendizagem, independentemente da estimulação direta de receptores NMDA.

Assim, uma solução contendo AM251 200 pmol mais 1 nmol de CAP (no mesmo volume de 0,2 µl) foi microinjetada na MCPdl. Dez minutos após, os animais foram sujeitos à segunda microinjeção, com PBS, e então expostos ao odor na caixa de condicionamento. Os grupos controle para este experimento receberam 1) AM251 200 pmol ou 2) CAP 1 nmol de forma independente. Após a segunda microinjeção, todos os animais foram colocados na caixa de condicionamento, impregnada com odor.

5.7.7. Experimento 7: potencialização das respostas defensivas através de interferência nos receptores CB1, TRPV1 e NMDA na MCPdl.

As respostas defensivas e aprendizagem parecem ocorrer sem a estimulação exógena de receptores NMDA. Portanto, procurou-se esclarecer quais as consequências de uma ativação mais intensa, resultante dos efeitos do agonista inverso em CB1 associado ao agonista em TRPV1 e ainda a estimulação por agonista NMDA.

Para isso, os animais deste experimento receberam uma solução contendo AM251 200 pmol mais CAP 0,1 nmol, em um volume de 0,2 µl, e dez minutos após, a segunda microinjeção, com 25 pmol de NMDA. Os grupos controle receberam 1) AM251 200 pmol ou 2) CAP 0,1 nmol de forma independente, seguidos, dez minutos após, pela microinjeção de NMDA 25 pmol. Só então os animais foram colocados na caixa de condicionamento, com odor.

Objetivo específico 4: investigar a contribuição de glutamato endógeno e de receptores glutamatérgicos AMPA na modulação dos receptores CB1 e TRPV1 na MCPdl durante as respostas defensivas incondicionadas e a consequente formação de memória (experimentos 8-13).

5.7.8. Experimento 8: bloqueio da liberação de glutamato durante o condicionamento aversivo olfatório antes da estimulação da MCPdl por AM251 associado ao NMDA.

Dentre os diversos mecanismos para o controle da ativação da MCPdl, destaca-se a regulação da liberação de glutamato endógeno. Neste experimento, foram avaliados os efeitos do bloqueio da liberação de glutamato sobre as respostas defensivas e aprendizagem. Para tal, tratamentos de experimentos anteriores que resultaram em respostas defensivas e aprendizagem foram selecionados como controles positivos.

Sendo assim, os animais receberam riluzol, um inibidor da liberação de glutamato, nas doses de 2 ou 4 nmol. Cinco minutos após, os ratos receberam AM251 200 pmol e, dez minutos depois, NMDA 25 pmol. Em seguida, os animais foram colocados na caixa de condicionamento preenchida com odor. Para controle, grupos independentes de animais receberam 1) veículo - 5 minutos - AM251 200 pmol - 10 minutos - NMDA 25 pmol (controles positivos), ou 2) somente a microinjeção de riluzol nas doses de 2 ou 4 nmol: riluzol - 5 minutos - veículo - 10 minutos - PBS (controles negativos).

5.7.9. Experimento 9: efeitos do bloqueador de receptores AMPA/cainato na MCPdl sobre o condicionamento aversivo olfatório por AM251 associado ao NMDA.

Este experimento foi desenhado para investigar a possibilidade de que os efeitos observados pelo pré-tratamento com riluzol poderiam ocorrer pela redução do aporte de glutamato e na consequente redução da ativação de receptores AMPA/cainato, um dos alvos de glutamato. Para investigar essa possibilidade, o bloqueador de receptores AMPA/cainato DNQX foi utilizado.

Portanto, os animais receberam DNQX 2 ou 4 nmol na primeira microinjeção. Cinco minutos após, os ratos receberam AM251 200 pmol e, dez minutos depois, NMDA 25 pmol. Imediatamente, os animais foram colocados na caixa de condicionamento contendo o odor. Para controle, grupos independentes de animais receberam 1) veículo ao invés de DNQX (veículo - 5 minutos - AM251 200 pmol - 10 minutos -

NMDA 25 pmol, controles positivos), ou 2) a microinjeção de DNQX nas doses de 2 ou 4 nmol (DNQX - 5 minutos - veículo - 10 minutos - PBS, controle negativo).

5.7.10. Experimento 10: bloqueio da liberação de glutamato no condicionamento aversivo olfatório antes da estimulação da MCPdl por CAP.

O tratamento com CAP resultou em respostas defensivas e consequente aprendizagem (experimento 3). Portanto, neste experimento o bloqueio da liberação de glutamato foi feito antes da estimulação por CAP. Sendo assim, os animais receberam riluzol nas doses de 2 ou 4 nmol. Cinco minutos após, os ratos receberam CAP 10 nmol e, dez minutos depois, PBS. Em seguida, os animais foram colocados na caixa de condicionamento com odor.

Para controle, grupos independentes de animais receberam 1) veículo - 5 minutos - CAP 10 nmol - 10 minutos - PBS (controles positivos), ou 2) somente a microinjeção de riluzol nas doses de 2 ou 4 nmol: riluzol - 5 minutos - veículo - 10 minutos - PBS (controles negativos).

5.7.11. Experimento 11: efeitos do bloqueador de receptores AMPA/cainato na MCPdl sobre o condicionamento aversivo olfatório por CAP.

Na tentativa de elucidar o mecanismo pelo qual a CAP produziu respostas defensivas e aprendizagem, e em consequência dos resultados da inibição da liberação de glutamato, o passo seguinte consistiu em investigar os receptores AMPA/cainato. Tal investigação pode contribuir para uma possível diferenciação entre os mecanismos de receptores TRPV1 e CB1 no controle da atividade da MCPdl. Portanto, da mesma forma que o experimento 10, o bloqueio de receptores AMPA/cainato foi feito antes da estimulação por CAP.

Assim, os animais receberam DNQX 2 nmol na primeira microinjeção. Cinco minutos após, receberam CAP 10 nmol e, dez minutos depois, PBS. Em seguida, foram colocados na caixa de condicionamento, preenchida pelo odor. Para controle, grupos independentes de animais receberam 1) veículo ao invés de DNQX (veículo - 5 minutos - CAP 10 nmol - 10 minutos - PBS, controles positivos), ou 2) a microinjeção de DNQX na dose de 2 nmol (DNQX - 5 minutos - veículo - 10 minutos - PBS, controle negativo).

5.7.12. Experimento 12: bloqueio da liberação de glutamato no condicionamento aversivo olfatório antes da estimulação da MCPdl por NMDA.

Em vista dos resultados da modulação de receptores CB1 e TRPV1, restou investigar os efeitos da inibição da liberação de glutamato nos animais sujeitos à estimulação efetiva da MCPdl por agonista NMDA. Tal abordagem experimental teve o objetivo de elucidar o mecanismo pelo qual o NMDA produz respostas defensivas e aprendizagem, e ainda possibilitar a comparação com os efeitos produzidos pela modulação em CB1 e TRPV1.

Para este fim, os animais receberam riluzol nas doses de 2 ou 4 nmol. Cinco minutos após, receberam NMDA 50 pmol. Em seguida, os animais foram colocados na caixa de condicionamento, impregnada com odor. Para controle, grupos independentes de animais receberam 1) veículo - 5 minutos - NMDA 50 pmol (controles positivos), ou 2) riluzol nas doses de 2 ou 4 nmol: riluzol - 5 minutos - PBS (controles negativos).

5.7.13. Experimento 13: efeitos do bloqueador de receptores AMPA/cainato na MCPdl sobre o condicionamento aversivo olfatório por NMDA.

Como a inibição da liberação de glutamato interferiu sobre as respostas defensivas e aprendizagem decorrentes da estimulação por NMDA, resta saber se este efeito também se daria, pelo menos em parte, pela redução da ativação de receptores AMPA/cainato. Portanto, da mesma forma que nos experimentos anteriores, com a ativação da MCPdl por AM251 associado ao NMDA ou CAP, o bloqueio de receptores AMPA/cainato ocorreu antes da estimulação por NMDA 50 pmol.

Desta forma, os animais receberam DNQX 2 nmol na primeira microinjeção. Desta vez, cinco minutos após, os ratos receberam NMDA 50 pmol. Logo em seguida, foram colocados na caixa de condicionamento, com odor. Para controle, grupos independentes de animais receberam 1) veículo ao invés de DNQX (veículo - 5 minutos - NMDA 50 pmol, controles positivos), ou 2) a microinjeção de DNQX na dose de 2 nmol (DNQX - 5 minutos - PBS, controle negativo).

5.8. Verificação do sítio de microinjeção

Após o experimento comportamental, os ratos foram novamente anestesiados com quetamina e xilasina (4:3; 1,5 ml/Kg) e então foi feita a eutanásia com 1 ml de hidrato de cloral (Vetec, diluída a 15%). Após verificação da ausência de movimentos respiratórios e opacidade dos olhos, uma solução de Azul de Evans (0,5%, Sigma-Aldrich[®], St. Louis, EUA) foi microinjetada, exatamente conforme o item 5.5, a fim de identificar o sítio de microinjeção.

Os encéfalos foram então retirados e armazenados em uma solução de formaldeído (10%), por no mínimo três dias para fixação do tecido. Após esse período, foram imersos em uma solução de sacarose (30%, Vetec[®], Brasil) por 24 horas para criopreservação. Depois deste procedimento, os encéfalos foram congelados a -25°C e cortes coronais na espessura de 50 µm foram realizados em criostato (Leica[®] CM1850, Microsystems AG[®], Wetzlar, Alemanha).

Os cortes que possuíam a marcação com Azul de Evans foram coletados em lâminas de vidro e analisados por meio de um microscópio óptico para visualização do sítio de microinjeção. Com base no atlas de Paxinos (Paxinos e Watson, 1998), foram considerados para a análise estatística os animais com o sítio de microinjeção na porção dorsolateral da MCP. Os demais sítios incluem a porção dorsal e ventral da MCP, o aqueduto e o colículo superior. Já os animais que receberam as microinjeções no colículo superior foram agrupados como “Col. Sup.”, servindo como controle anatômico para os efeitos comportamentais (figuras 4 e 5).

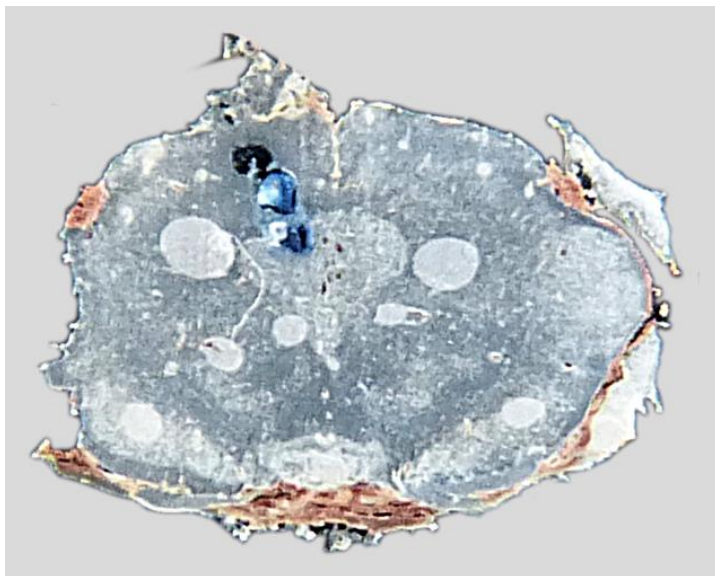


Figura 4: fotos de cortes coronais do mesencéfalo de ratos no eixo anteroposterior evidenciando os sítios de microinjeção. -5.8 mm em relação ao bregma. O sítio de microinjeção na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) rostral esquerda foi destacado com o corante azul de Evans.

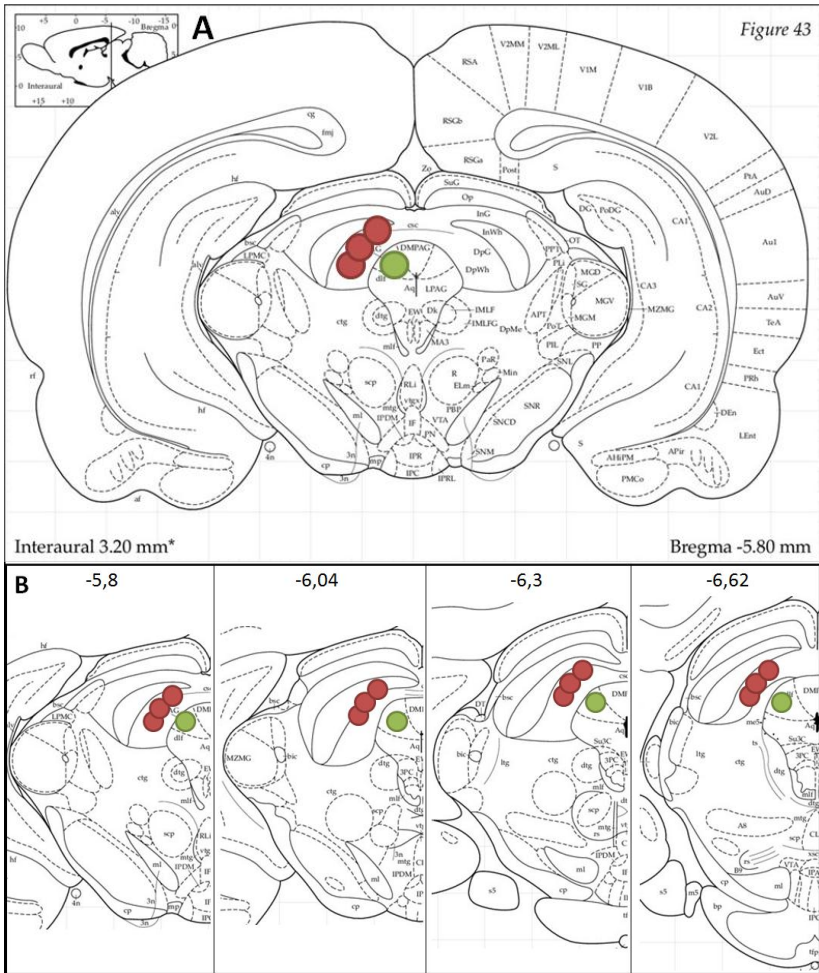


Figura 5: sítios de microinjeção. Desenhos esquemáticos de cortes coronais de encéfalos de ratos, no eixo anteroposterior. Em verde, posicionamento da agulha microinjetora unilateral na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) rostral esquerda. Em vermelho, microinjeções no colículo superior. A) -5.8 mm em relação ao bregma. B) em maior detalhe, referências anteroposteriores que foram consideradas como MCPdl rostral, com relação ao bregma (Paxinos e Watson, 1998).

5.9. Análise estatística

Os dados comportamentais coletados durante a sessão de condicionamento, assim como durante a sessão de exposição ao odor, foram submetidos primeiramente ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e ao teste de Levene para homocedasticidade. Uma vez confirmado que os dados respeitavam uma distribuição normal e homocedástica, foi realizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, considerando como fator o tratamento. Quando a ANOVA indicou alguma diferença, o teste *post hoc* Newman-Keuls foi aplicado. Para todo o conjunto de dados, determinou-se um erro de 5%, portanto, quando $p < 0,05$, uma diferença estatística foi sinalizada. Quando $0,05 < p < 0,1$, foi indicado como tendência, embora não sinalizado nos gráficos. Portanto, com exceção da familiarização na caixa de odor, todos os dados são representados pela média + erro padrão da média (EPM).

Os dados da sessão de familiarização na caixa de odor foram analisados separadamente por uma ANOVA de uma via. Uma vez que nesta sessão não foram encontradas diferenças entre os grupos, os dados de cada comportamento foram agrupados e representados nos gráficos por uma barra horizontal hachurada contendo 95% do intervalo de confiança dos dados.

As análises foram realizadas através do programa Statistica[®] (versão 10.1; Statsoft, Tulsa, EUA) e os gráficos montados no programa Prisma 5.0 (GraphPad Prism[®], San Diego, EUA).

6. Resultados

Efeitos da microinjeção de NMDA na MCPdl sobre as respostas defensivas incondicionadas e a formação de memória.

6.1. Experimento 1: curva dose-resposta para a estimulação da porção rostral da MCPdl pelo agonista glutamatérgico NMDA.

A figura 6 ilustra os efeitos imediatos da microinjeção de NMDA (0, 25, 50, 100 ou 200 pmol) na MCPdl ou no colículo superior (NMDA 50 pmol). Durante a sessão de condicionamento, a ANOVA detectou um efeito do tratamento sobre as respostas defensivas (Figura 5 A) [$F(5, 51)=17,00$; $p<0,00001$] e sobre as respostas não defensivas (Figura 5 B) [$F(5,51)=17,50$; $p<0,00001$].

O teste *post hoc* indicou um aumento nas respostas defensivas nos grupos que receberam NMDA nas doses de 50, 100 e 200 pmol na MCPdl em relação ao grupo que recebeu PBS. Além disso, uma mudança qualitativa no padrão de resposta defensiva foi detectada na maior dose de NMDA, com o surgimento da resposta de fuga na caixa de condicionamento (figura 5 A). Em paralelo, houve uma redução dos comportamentos não defensivos nos grupos que receberam NMDA 50, 100 ou 200 pmol (figura 5 B). No entanto, a dose de 25 pmol não apresentou diferenças em relação ao controle. Ainda, os animais que receberam a dose de 50 pmol no colículo superior apresentaram diferenças estatísticas dos animais NMDA 50 pmol na MCPdl, mas não dos animais PBS.

Estes resultados indicam que a estimulação de receptores NMDA na MCPdl rostral modifica a expressão comportamental dos animais sujeitos às doses de 50, 100 e 200 pmol. Com relação ao posicionamento da microinjeção, os dados mostram que o efeito não ocorre com 50 pmol de NMDA no colículo superior. Uma descrição temporalmente mais detalhada dos comportamentos nesta sessão pode ser encontrada no apêndice A. Uma ilustração destes comportamentos em comparação a outros grupos experimentais pode ser visualizada no apêndice B.

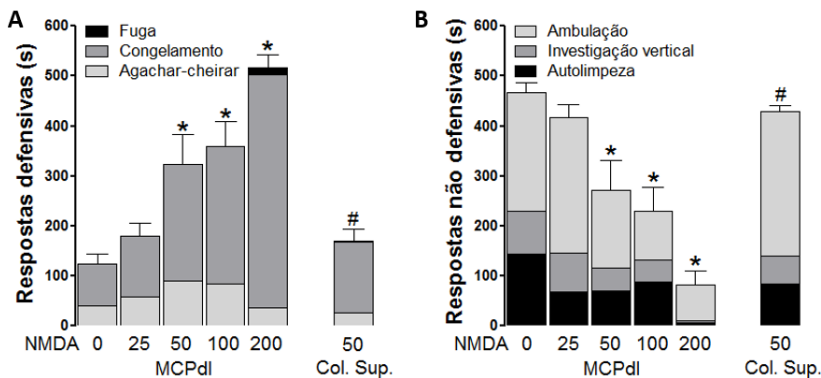


Figura 6: Respostas comportamentais logo após a microinjeção de NMDA na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) ou colículo superior (Col. Sup.). As barras verticais representam a média + erro padrão da média dos comportamentos defensivos (A) e comportamentos exploratórios e de autolimpeza (B) representados em segundos. ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo PBS; $\# = p<0,05$ em relação ao grupo NMDA 50 pmol na MCPdl. n: 0=PBS (8), NMDA 25 pmol (8), NMDA 50 pmol (8), NMDA 100 pmol (10), NMDA 200 pmol (8) e NMDA 50 pmol (Col. Sup.) (15).

A figura 7 ilustra a etapa de expressão de respostas comportamentais frente ao odor, 48 horas após os tratamentos, na caixa de odor. Portanto, foram avaliadas as consequências da estimulação da MCPdl em um contexto diferente de onde ocorreu a associação EI + EC.

Para este e os demais experimentos, os dados coletados durante a sessão de familiarização na caixa de odor foram submetidos à ANOVA de uma via. Uma vez que não foram detectadas diferenças em %TA, %TE, CR ou *head-out*, estes dados foram agrupados e representados por uma barra horizontal hachurada contendo 95% do intervalo de confiança dos dados.

Na sessão de exposição ao odor, foi observado um efeito do tratamento sobre os comportamentos de %TA [$F(5,51)=6,59$; $p<0,005$], %TE [$F(5,51)=7,69$; $p<0,00005$] e do CR [$F(5,51)=4,30$; $p<0,005$]. Não foram detectadas alterações no comportamento de *head-out*.

A análise *post hoc* indicou uma redução na %TA (figura 6 A) e um aumento na %TE (figura 6 B) nos grupos microinjetados com NMDA 50 ou 100 pmol. Quanto à frequência de cruzamentos, apenas os animais que receberam NMDA 50 pmol apresentaram uma redução deste parâmetro (figura 6 C).

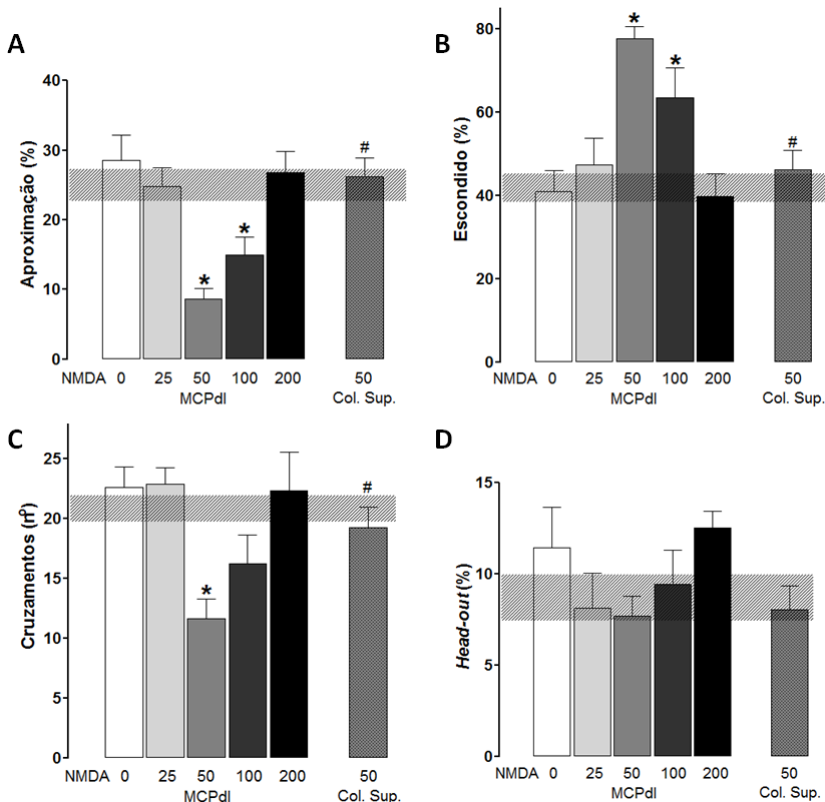


Figura 7: Comportamentos durante a reexposição ao odor. As barras verticais representam a média + erro padrão da média do tempo em que os animais permaneceram próximos à fonte de odor (A) ou no compartimento fechado, distante da fonte de odor (B), número de cruzamentos na caixa de odor (C) e tempo em que os animais permaneceram em postura de *head-out* (D). ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo PBS; $\#=p<0,05$ em relação ao grupo NMDA 50 pmol na MCPdl. As barras horizontais representam o intervalo de confiança de 95% dos dados da familiarização. n: 0=PBS (8), NMDA 25 pmol (8), NMDA 50 pmol (8), NMDA 100 pmol (10), NMDA 200 pmol (8) e NMDA 50 pmol (Col. Sup.) (15).

Em adição, foi detectada diferença entre os grupos NMDA 50 pmol na MCPdl e NMDA 50 pmol no colículo superior nos índices de %TA, %TE e CR, indicando a especificidade anatômica dos efeitos da estimulação. Já os animais sujeitos à estimulação por NMDA na dose de 200 pmol não apresentaram modificações comportamentais durante a reexposição ao odor.

Sendo assim, os resultados mostram que a estimulação com NMDA 50 ou 100 pmol na MCPdl gerou um comportamento de esquiva ao odor durante a reexposição. No entanto, a estimulação por NMDA 200 pmol não promoveu mudanças nos comportamentos na sessão de reexposição ao odor, apesar deste grupo apresentar respostas defensivas imediatas mais intensas (figura 5 A).

Potencialização da estimulação na MCPdl pela interferência em receptores CB1 sobre as respostas defensivas incondicionadas e a aprendizagem subsequente.

6.2. Experimento 2: potencialização das respostas defensivas e aprendizagem pelo agonista inverso de receptores CB1 associado à estimulação subefetiva de NMDA na MCPdl.

Na figura 8 estão ilustrados os efeitos imediatos da microinjeção de NMDA 25 pmol precedida por AM251 (50, 100, 200 pmol) na MCPdl ou AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol no colículo superior.

Durante a sessão de condicionamento, a ANOVA detectou um efeito do tratamento sobre as respostas defensivas (Figura 7 A) [$F(5, 55)=3,63$; $p<0,05$] e sobre as respostas não defensivas (Figura 7 B) [$F(5,55)=3,61$; $p<0,05$].

O teste de Newman-Keuls indicou um aumento nas respostas defensivas no grupo que recebeu AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol na MCPdl em comparação com o que recebeu AM251 200 pmol + PBS e indicou apenas uma tendência ($p=0,07$, não destacada no gráfico) quando comparado ao grupo veículo + NMDA 25 pmol (figura 7 A). Houve uma redução nas respostas não defensivas do grupo AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol em comparação com o grupo AM251 200 pmol + PBS e apenas uma tendência ($p=0,08$) em relação ao grupo veículo + NMDA 25 pmol (figura 7 B).

O tratamento de AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol no colículo superior não alterou as respostas comportamentais, mantendo os mesmos níveis dos controles. Portanto, o teste *post hoc* indicou uma redução das respostas defensivas e aumento das respostas não defensivas deste grupo em relação ao grupo que recebeu o mesmo tratamento na MCPdl (figura 7, A e B). Além disso, os animais submetidos a apenas AM251 na maior dose não apresentaram diferenças do controle (veículo + NMDA 25 pmol), descartando um possível efeito de AM251 isoladamente.

Estes resultados mostram que o agonista inverso de receptores CB1, quando associado ao agonista de receptores NMDA em uma dose baixa, promove respostas defensivas, assim como reduz a ocorrência de comportamentos não defensivos, simulando uma ativação obtida com doses maiores de NMDA (experimento 1). Novamente, a ausência de efeitos no tratamento direcionado ao colículo superior sugere que esta área, ao menos para este tratamento, não participa das respostas comportamentais observadas. Uma descrição dos comportamentos durante o condicionamento, minuto a minuto, encontra-se no apêndice B.

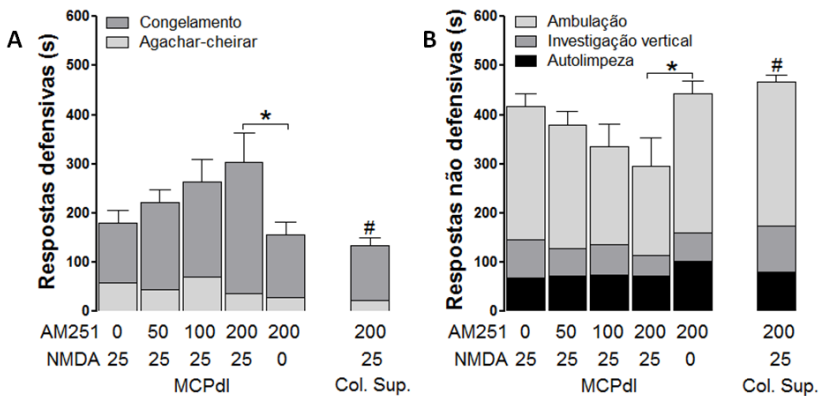


Figura 8: Respostas comportamentais logo após a microinjeção de NMDA 25 pmol em animais previamente tratados com diferentes doses de AM251 na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) ou colículo superior (Col. Sup.). As barras verticais representam a média + erro padrão da média dos comportamentos defensivos (A) e comportamentos exploratórios e de autolimpeza (B) representados em segundos. ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo AM251 200 pmol + PBS; $\# = p<0,05$ em relação ao grupo AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol na MCPdl. 0=veículo ou PBS. n: veículo + NMDA 25 pmol (8), AM251 50 pmol + NMDA 25 pmol (12), AM251 100 pmol + NMDA 25 pmol (9), AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (10), AM251 200 pmol + veículo (9) e AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (Col. Sup.) (13).

Os dados referentes à reexposição ao odor estão representados na figura 9. Nesta avaliação, 48 horas após as microinjeções, os animais não estão sob efeito agudo dos tratamentos. Portanto, foram observadas as possíveis consequências da interferência em receptores CB1 na expressão de comportamentos relacionados à aprendizagem.

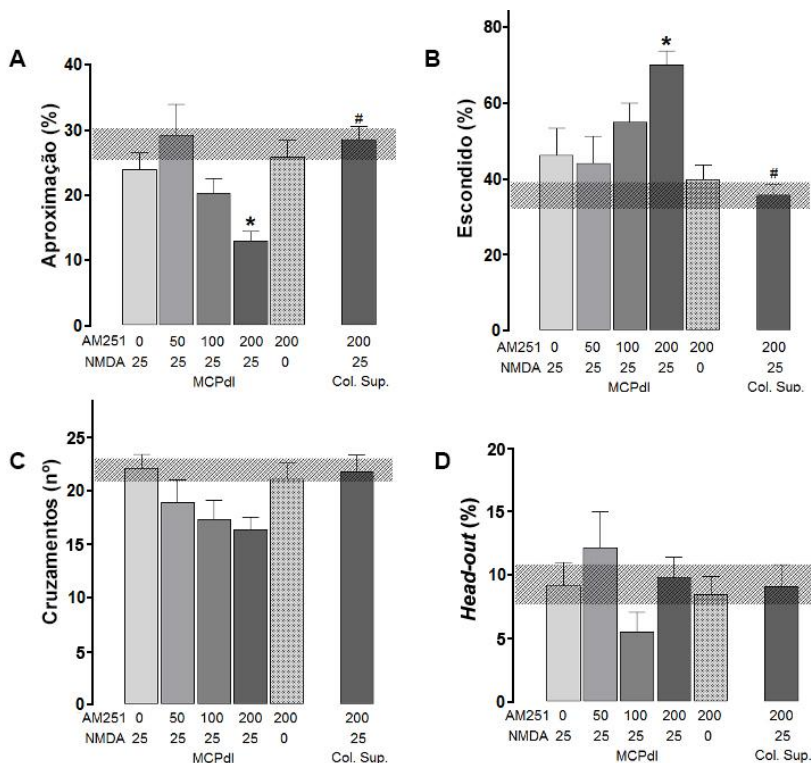


Figura 9: Comportamentos durante a reexposição ao odor. As barras verticais representam a média + erro padrão da média do tempo em que os animais permaneceram próximos à fonte de odor (A) ou no compartimento fechado, distante da fonte de odor (B), número de cruzamentos na caixa de odor (C) e tempo em que os animais permaneceram em postura de *head-out* (D). ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, *= $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo + NMDA 25 pmol e em relação ao grupo AM251 200 pmol + PBS; #= $p < 0,05$ em relação ao grupo NMDA 50 pmol na MCPdl. As barras horizontais representam o intervalo de confiança de 95% dos dados da familiarização. 0=veículo ou PBS. n: veículo + NMDA 25 pmol (8), AM251 50 pmol + NMDA 25 pmol (12), AM251 100 pmol + NMDA 25 pmol (9), AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (10), AM251 200 pmol + veículo (9) e AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (Col. Sup.) (13).

Na exposição ao odor condicionado, foi observado um efeito do tratamento sobre os comportamentos de % TA [$F(5,55)=5,63$; $p < 0,0005$], % TE [$F(5,55)=7,37$; $p < 0,00005$], mas apenas uma tendência à redução

no CR [$F(5,55)=2,324$; $p=0,06$]. Alterações no comportamento de *head-out* não foram detectadas.

A análise *post hoc* apontou para uma redução na %TA (figura 8 A) e aumento na %TE (figura 8 B) no grupo que recebeu AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol em comparação ao grupo veículo + NMDA 25 pmol e também ao grupo AM251 200 pmol + PBS.

A associação entre AM251 200 pmol e NMDA 25 pmol no colículo superior não modificou as respostas comportamentais observadas e, portanto, apresentou níveis semelhantes ao grupo controle (figura 8 A-D). Diferenças foram detectadas nas comparações entre as microinjeções no colículo superior e na MCPdl, destacadas nas figuras 8 A e B. Portanto, os resultados mostram que o agonista inverso de receptores CB1 microinjetado 10 minutos antes da estimulação subfetiva de NMDA durante o dia do condicionamento foi capaz de aumentar a esquiva dos animais frente à reexposição ao odor, dois dias após o condicionamento.

Interações funcionais entre os receptores CB1 e TRPV1 presentes na MCPdl e os efeitos nas respostas defensivas incondicionadas e a aprendizagem (experimentos 3 a 7).

6.3. Experimento 3: curva dose-resposta para a estimulação da MCPdl pelo agonista de receptores vaniloides TRPV1.

Na figura 10 estão demonstrados os efeitos da microinjeção de CAP (0,1, 1 ou 10 nmol) na MCPdl ou no colículo superior (CAP 10 nmol). Na sessão de condicionamento, a ANOVA indicou um efeito do tratamento sobre as respostas defensivas (Figura 9 A) [$F(4, 39)=3,43$; $p<0,05$] e sobre as respostas não defensivas (Figura 9 B) [$F(4,39)=3,10$; $p<0,05$].

O teste *post hoc* indicou um aumento nas respostas defensivas (figura 9 A) e redução nas respostas não defensivas (figura 9 B) nos animais que receberam CAP na dose de 10 nmol em relação ao grupo que recebeu veículo + PBS na MCPdl. Neste experimento, não foi detectada diferença estatística relacionada ao sítio de microinjeção.

Estes resultados mostram que a estimulação de receptores TRPV1 pela dose alta de CAP promove respostas defensivas. Este efeito foi observado na MCPdl, mas também há um indício de que o mesmo EI possa produzir uma resposta semelhante no colículo superior. Uma ilustração dos comportamentos durante o condicionamento, minuto a minuto, pode ser encontrada no apêndice B.

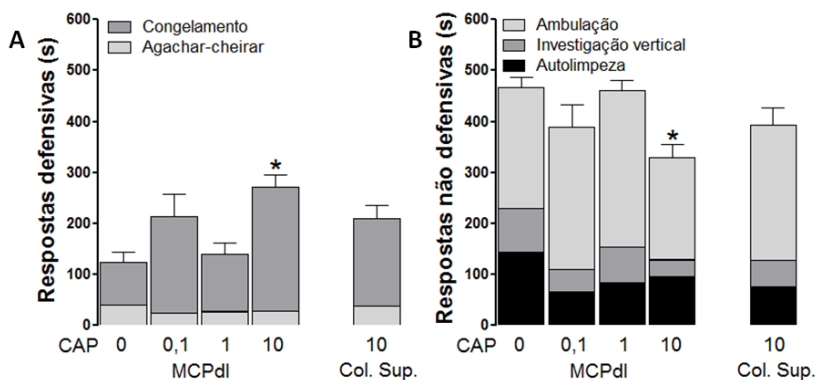


Figura 10: Respostas comportamentais após a microinjeção de capsaicina (CAP, 0,1, 1 ou 10 nmol) na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) ou colículo superior (Col. Sup.). As barras verticais representam a média + erro padrão da média dos comportamentos defensivos (A) e comportamentos exploratórios e de autolimpeza (B) representados em segundos. ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo 0=veículo + PBS. n: veículo + PBS (8), CAP 0,1 nmol + PBS (7), CAP 1 nmol + PBS (8), CAP 10 nmol + PBS (9), CAP 10 nmol + PBS (Col. Sup.) (12).

A figura 11 ilustra a etapa de expressão de respostas comportamentais frente ao odor, 48 horas após as microinjeções de CAP.

Na reexposição ao odor, foi observado um efeito do tratamento sobre os comportamentos de %TA [$F(4,39)=10,27$; $p<0,0005$], %TE [$F(4,39)=17,90$; $p<0,0005$] e do CR [$F(4,39)=8,46$; $p<0,0005$], no entanto, alterações no comportamento de *head-out* não foram detectadas.

O teste *post hoc* Newman-Keuls indicou uma redução da %TA (figura 10 A) e um aumento em %TE (figura 10 B) no grupo submetido à microinjeção de CAP 10 nmol + PBS em comparação com o controle veículo + PBS. Quanto ao CR, houve uma redução no grupo CAP 10 nmol + PBS em comparação com o controle (figura 10 C). O grupo submetido às microinjeções no colículo superior apresentou diferenças em relação ao grupo CAP 10 nmol + PBS na MCPdl, mantendo os níveis próximos aos controles. (figura 10 A, B e C).

Sendo assim, os resultados mostram que a estimulação de receptores TRPV1 na MCPdl durante a sessão de condicionamento foi capaz de alterar os comportamentos de esquiva na reexposição ao odor.

Tal efeito foi observado apenas com as microinjeções na MCPdl, e não no colículo superior.

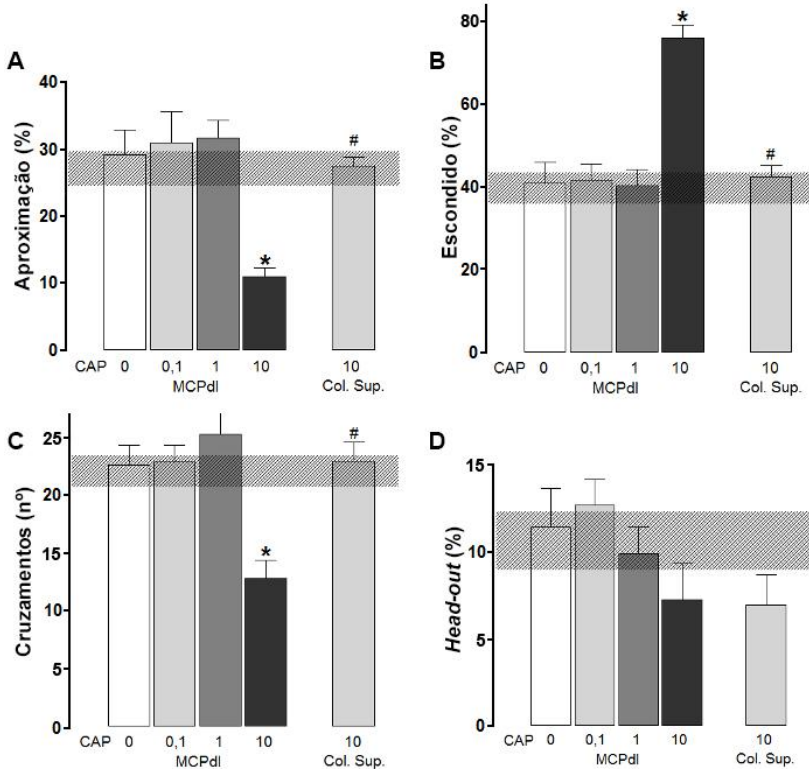


Figura 11: Comportamentos durante a reexposição ao odor. As barras verticais representam a média + erro padrão da média do tempo em que os animais permaneceram próximos à fonte de odor (A) ou no compartimento fechado, distante da fonte de odor (B), número de cruzamentos na caixa de odor (C) e tempo em que os animais permaneceram em postura de *head-out* (D). ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo veículo + PBS; $\#=p<0,05$ em relação ao grupo CAP 10 nmol + PBS na MCPdl. As barras horizontais representam o intervalo de confiança de 95% dos dados da familiarização. 0=veículo + PBS. n: veículo + PBS (8), CAP 0,1 nmol + PBS (7), CAP 1 nmol + PBS (8), CAP 10 nmol + PBS (9), CAP 10 nmol + PBS (Col. Sup.) (12).

6.4. Experimento 4: influência do bloqueio em receptores NMDA sobre os efeitos da maior dose do agonista TRPV1.

Os efeitos do bloqueio de receptores NMDA (AP5 6 nmol) antes da estimulação por CAP (10 nmol) estão ilustrados na figura 12. Na sessão de condicionamento, a ANOVA indicou um efeito do tratamento sobre as respostas defensivas (Figura 11 A) [$F(4, 40)=2,85$; $p<0,05$] e sobre as respostas não defensivas (Figura 11 B) [$F(4,40)=2,47$; $p<0,05$].

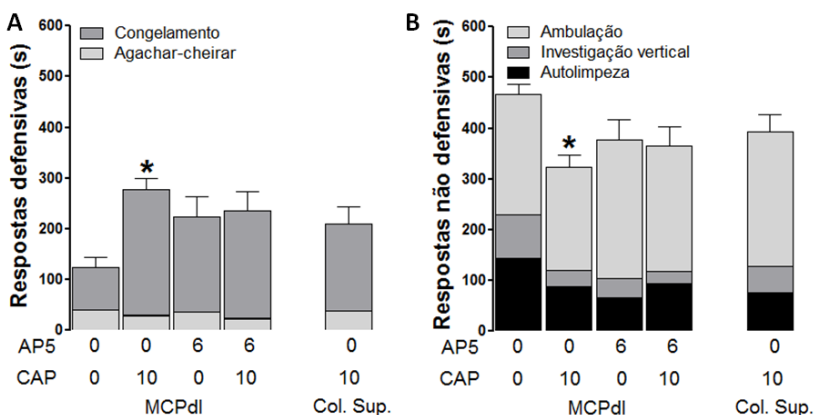


Figura 12: Respostas comportamentais após a microinjeção de capsaicina (CAP) 10 nmol em animais previamente tratados com o antagonista de receptores NMDA, AP5, na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) ou colículo superior (Col. Sup.). As barras verticais representam a média + erro padrão da média dos comportamentos defensivos (A) e comportamentos exploratórios e de autolimpeza (B) representados em segundos. ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo PBS + veículo + PBS. 0=veículo ou PBS. n: PBS + veículo + PBS (8), PBS + CAP 10 nmol + PBS (8), AP5 6 nmol + veículo + PBS (9), AP5 6 nmol + CAP 10 nmol + PBS (8), AP5 6 nmol + CAP 10 nmol + PBS (Col. Sup.) (12).

Um aumento nas respostas defensivas (figura 12 A) e uma redução nas respostas não defensivas (figura 12 B) foram detectados nos animais que receberam PBS + CAP 10 nmol + PBS em relação ao grupo que recebeu PBS + veículo + PBS na MCPdl. O teste *post hoc* também indicou uma tendência ao aumento das respostas defensivas no grupo que recebeu AP5 6 nmol + CAP 10 nmol + PBS em comparação ao grupo PBS + veículo + PBS ($p=0,08$). Ademais, não foram encontradas diferenças estatísticas entre o grupo que recebeu AP5 6 nmol + CAP 10

nmol + PBS e PBS + CAP 10 nmol + PBS, o que sugere pouca interferência do bloqueio de receptores NMDA nos efeitos de CAP 10 nmol. Similar ao observado no experimento anterior, o teste *post hoc* detectou apenas uma tendência relacionada ao sítio de microinjeção ($p=0,07$ tanto para comportamentos defensivos quanto não defensivos).

Os resultados indicam que o bloqueio de receptores NMDA não interferiu nos efeitos desencadeados pelo agonista TRPV1 na maior dose. Portanto as respostas comportamentais decorrentes da estimulação por CAP 10 nmol não ocorrem pela ativação direta de receptores NMDA. Porém, os efeitos parciais podem indicar uma participação indireta dos receptores NMDA nos efeitos observados com a CAP.

Na figura 13 estão demonstrados os comportamentos avaliados durante a reexposição ao odor, 48 horas após os tratamentos.

Os comportamentos de %TA [$F(4,40)=8,20$; $p<0,0005$], %TE [$F(4,40)=12,87$; $p<0,000005$] e do CR [$F(4,40)=5,95$; $p<0,005$] indicaram um efeito do tratamento, embora alterações no comportamento de *head-out* não tenham sido detectadas.

O teste *post hoc* apontou para uma redução da %TA (figura 12 A) e aumento da %TE (figura 12 B) nos grupos submetidos às microinjeções de PBS + CAP 10 nmol + PBS ou AP5 6 nmol + CAP 10 nmol + PBS em comparação com o controle PBS + veículo + PBS. Quanto ao CR, houve uma redução no grupo PBS + CAP 10 nmol + PBS em comparação com o controle (figura 12 C). O grupo submetido às microinjeções no colículo superior apresentou diferenças em relação ao grupo PBS + CAP 10 nmol + PBS na MCPdl, mantendo os níveis próximos aos controles. (figura 12 A, B e C).

Portanto, os resultados mostram que o bloqueio de receptores NMDA não foi capaz de impedir os efeitos decorrentes da estimulação por CAP nas respostas defensivas e aprendizagem.

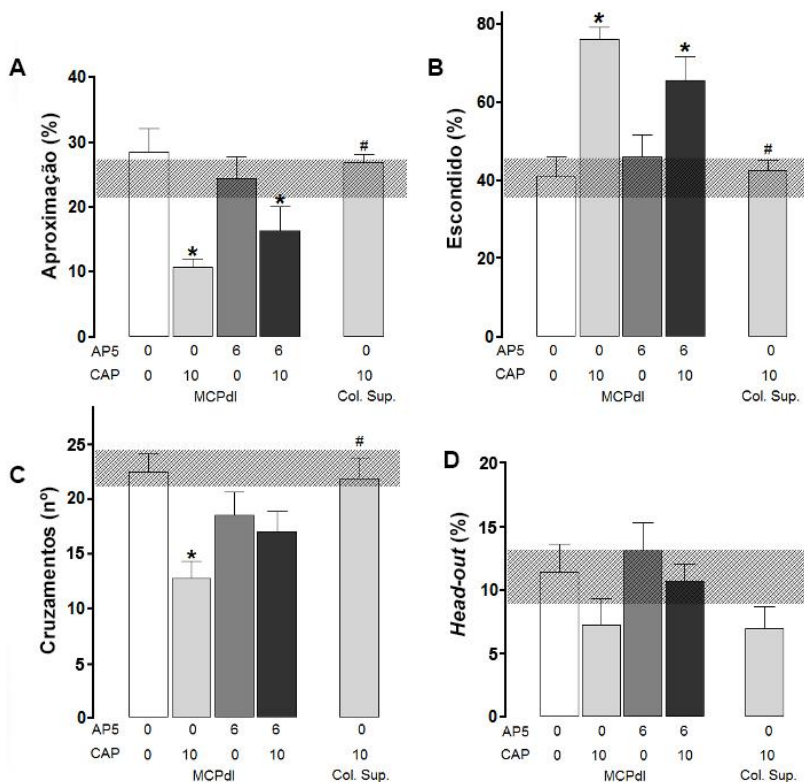


Figura 13: Comportamentos durante a reexposição ao odor. As barras verticais representam a média + erro padrão da média do tempo em que os animais permaneceram próximos à fonte de odor (A) ou no compartimento fechado, distante da fonte de odor (B), número de cruzamentos na caixa de odor (C) e tempo em que os animais permaneceram em postura de *head-out* (D). ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, *= $p < 0,05$ em relação ao grupo PBS + veículo + PBS; #= $p < 0,05$ em relação ao grupo PBS + CAP 10 nmol + PBS na MCPdl. As barras horizontais representam o intervalo de confiança de 95% dos dados da familiarização. 0=veículo ou PBS. n: PBS + veículo + PBS (8), PBS + CAP 10 nmol + PBS (8), AP5 6 nmol + veículo + PBS (9), AP5 6 nmol + CAP 10 nmol + PBS (8), AP5 6 nmol + CAP 10 nmol + PBS (Col. Sup.) (12).

6.5. Experimento 5: potencialização das respostas defensivas e aprendizagem pelo agonista de receptores TRPV1 associado à estimulação subfletiva de NMDA na MCPdl.

A figura 14 ilustra os comportamentos avaliados logo após a microinjeção de NMDA 25 pmol, precedida por CAP (0,1 ou 1 nmol),

no dia do condicionamento. Neste conjunto de dados, a ANOVA não indicou diferenças entre os tratamentos para as respostas defensivas (figura 13 A) ou não defensivas (figura 13 B).

Os resultados do dia do condicionamento mostram que as doses de 0,1 ou 1 nmol de CAP não foram suficientes para potencializar as respostas defensivas ou reduzir os comportamentos não defensivos decorrentes da ativação subefetiva de NMDA 25 pmol. Isto pode ser observado tanto para a MCPdl quanto para o colículo superior.

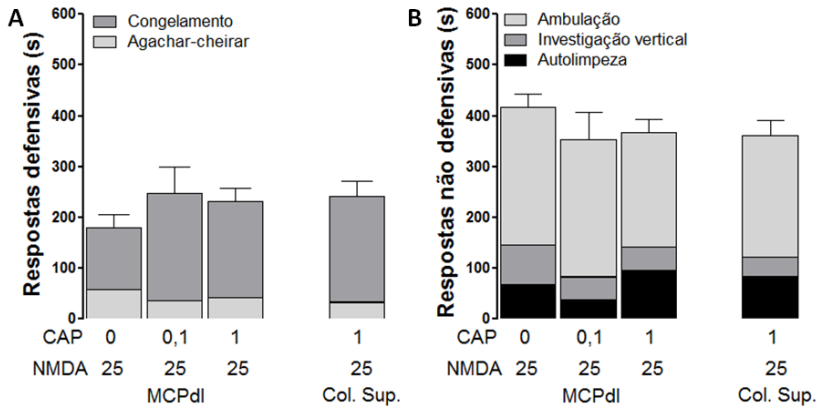


Figura 14: Respostas comportamentais logo após a microinjeção de NMDA 25 pmol em animais previamente tratados com diferentes doses de capsaicina (CAP) na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) ou colículo superior (Col. Sup.). As barras verticais representam a média + erro padrão da média dos comportamentos defensivos (A) e comportamentos exploratórios e de autolimpeza (B) representados em segundos. ANOVA de uma via. 0=veículo. n: veículo + NMDA 25 pmol (8), CAP 0,1 nmol + NMDA 25 pmol (9), CAP 1 nmol + NMDA 25 pmol (7), CAP 1 nmol + NMDA 25 pmol (Col. Sup.) (12).

Os comportamentos analisados na sessão de reexposição ao odor estão ilustrados na figura 15.

Durante a reexposição ao odor, o teste ANOVA indicou diferenças nos comportamentos de %TA [$F(3,32)=6,30$; $p<0,005$], %TE [$F(3,32)=8,11$; $p<0,0005$] e do CR [$F(3,32)=3,57$; $p<0,05$] no fator tratamento. Para o comportamento de *head-out* foi indicada apenas uma tendência [$F(3,32)=2,80$; $p=0,06$].

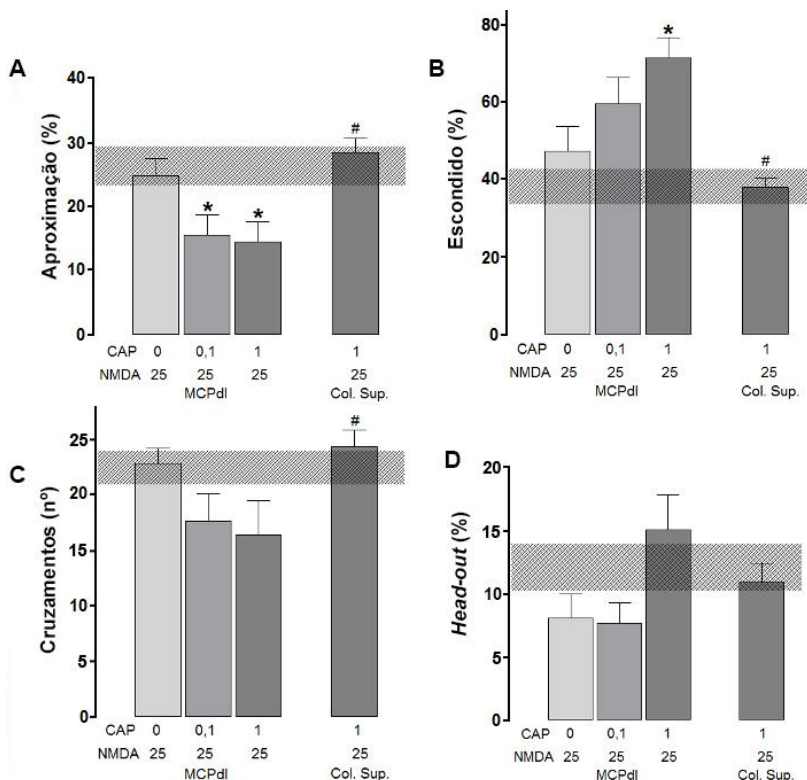


Figura 15: Comportamentos durante a reexposição ao odor. As barras verticais representam a média + erro padrão da média do tempo em que os animais permaneceram próximos à fonte de odor (A) ou no compartimento fechado, distante da fonte de odor (B), número de cruzamentos na caixa de odor (C) e tempo em que os animais permaneceram em postura de *head-out* (D). ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, *= $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo + NMDA 25 pmol; #= $p < 0,05$ em relação ao grupo CAP 1 nmol + NMDA 25 pmol MCPdl. As barras horizontais representam o intervalo de confiança de 95% dos dados da familiarização. 0=veículo. n: veículo + NMDA 25 pmol (8), CAP 0,1 nmol + NMDA 25 pmol (9), CAP 1 nmol + NMDA 25 pmol (7), CAP 1 nmol + NMDA 25 pmol (Col. Sup.) (12).

O teste *post hoc* Newman-Keuls indicou uma redução da %TA (figura 15 A) e aumento na %TE (figura 15 B) no grupo submetido às microinjeções de CAP 1 nmol + NMDA 25 pmol em relação ao controle veículo + NMDA 25 pmol. O tratamento CAP 0,1 nmol + NMDA 25 pmol apresentou apenas uma redução da %TA. O grupo submetido às microinjeções no colículo superior apresentou diferenças em relação ao

grupo CAP 1 nmol + NMDA 25 pmol na MCPdl, mantendo os níveis comportamentais próximos aos controles. (figura 14 A, B e C).

Sendo assim, os resultados mostram que o tratamento com CAP 0,1 ou 1 nmol, associado à subdose de NMDA 25 pmol na MCPdl foi capaz de promover comportamentos de esquiva quando os animais foram reexpostos ao odor, 48 horas após a sessão de condicionamento. Este efeito foi observado mesmo na ausência de alterações comportamentais durante a sessão de condicionamento. Novamente, estes efeitos se restringem à MCPdl, quando comparados ao colículo superior.

6.6. Experimento 6: condicionamento aversivo olfatório pela associação entre o agonista inverso de receptores CB1 e o agonista de receptores TRPV1 na MCPdl.

Na figura 16 estão ilustrados os efeitos da microinjeção conjunta de (AM251 200 pmol + CAP 1 nmol) na MCPdl ou no colículo superior. Como controles, grupos independentes de animais receberam AM251 200 pmol ou CAP 1 nmol. Todos os animais receberam a microinjeção de PBS dez minutos após, ou seja, logo antes de entrar em contato com o odor.

Na sessão de condicionamento, a ANOVA indicou um efeito do tratamento sobre as respostas defensivas (figura 15 A) [$F(3, 29)=5,63$; $p<0,005$] e sobre as respostas não defensivas (figura 15 B) [$F(3,29)=5,51$; $p<0,005$].

O teste *post hoc* indicou um aumento nas respostas defensivas (figura 15 A) e redução das respostas não defensivas (figura 15 B) nos animais que receberam a microinjeção conjunta de AM251 200 pmol + CAP 1 nmol em relação a ambos os grupos controle (AM251 200 pmol + veículo ou CAP 1 nmol + veículo). Ainda, o grupo submetido ao tratamento (AM251 200 pmol + CAP 1 nmol) + PBS no colículo superior apresentou diferenças estatísticas do grupo com o mesmo tratamento na MCPdl, mas não do grupo PBS.

Os resultados desta sessão de condicionamento mostram que a expressão de respostas defensivas pela estimulação da MCPdl pode ser evidenciada por meio do agonista inverso de receptores CB1 em conjunto ao agonista TRPV1, independente de uma ativação exógena de receptores NMDA. Estes resultados estão ilustrados minuto a minuto no apêndice B.

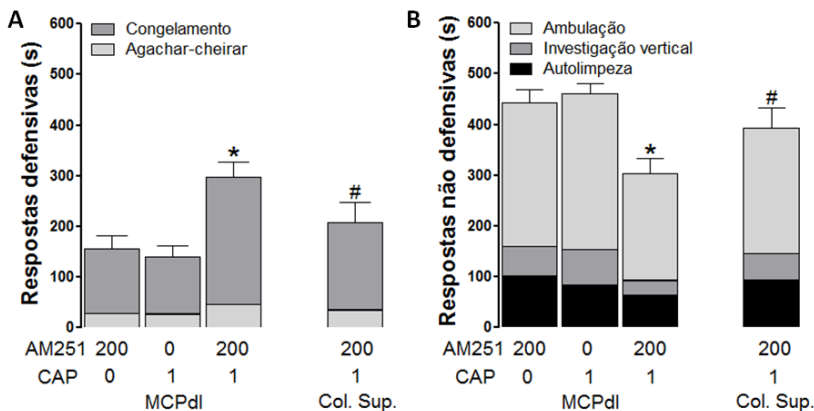


Figura 16: Respostas comportamentais após a microinjeção de AM251 200 pmol e capsaicina (CAP) 1 nmol na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) ou colículo superior (Col. Sup.). As barras verticais representam a média + erro padrão da média dos comportamentos defensivos (A) e comportamentos exploratórios e de autolimpeza (B) representados em segundos. ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação aos grupos AM251 200 pmol + PBS e CAP 1 nmol + PBS; $\# = p<0,05$ em relação ao grupo (AM251 200 pmol + CAP 1 nmol) + PBS na MCPdl. n: AM251 200 pmol + PBS (9), CAP 1 nmol + PBS (8), (AM251 200 pmol + CAP 1 nmol) + PBS (8) e (AM251 200 pmol + CAP 1 nmol) + PBS (Col. Sup.) (8).

Os comportamentos durante a reexposição ao odor, 48 horas após as microinjeções, estão ilustrados na figura 17.

Na reexposição ao odor, foi observado um efeito do tratamento sobre os comportamentos de %TA [$F(3,29)=13,11$; $p<0,0005$], %TE [$F(3,29)=15,25$; $p<0,0005$] e do CR [$F(3,29)=6,32$; $p<0,005$]. Alterações no comportamento de *head-out* não foram detectadas.

O teste *post hoc* indicou uma redução na %TA (figura 16 A) e aumento da %TE (figura 16 B) no grupo submetido à microinjeção conjunta de (AM251 200 pmol + CAP 1 nmol) + PBS em comparação com os grupos controle (AM251 200 pmol ou CAP 1 nmol) + PBS. Quanto ao CR, o grupo que recebeu (AM251 200 pmol + CAP 1 nmol) + PBS apresentou níveis mais baixos em relação aos controles (figura 16 C). Foi também indicada diferença entre os grupos (AM251 200 pmol + CAP 1 nmol) + PBS na MCPdl e o mesmo tratamento no colículo superior nos índices de %TA, %TE e CR, indicando a especificidade anatômica dos efeitos da estimulação (figura 16, A, B e C).

Portanto, os resultados do presente experimento mostram que as interferências conjuntas em receptores CB1 e TRPV1 no dia do condicionamento são capazes de produzir respostas defensivas após as microinjeções e também alterar os comportamentos de esquiva em uma reexposição ao odor, 48 horas após (figuras 16 e 17).

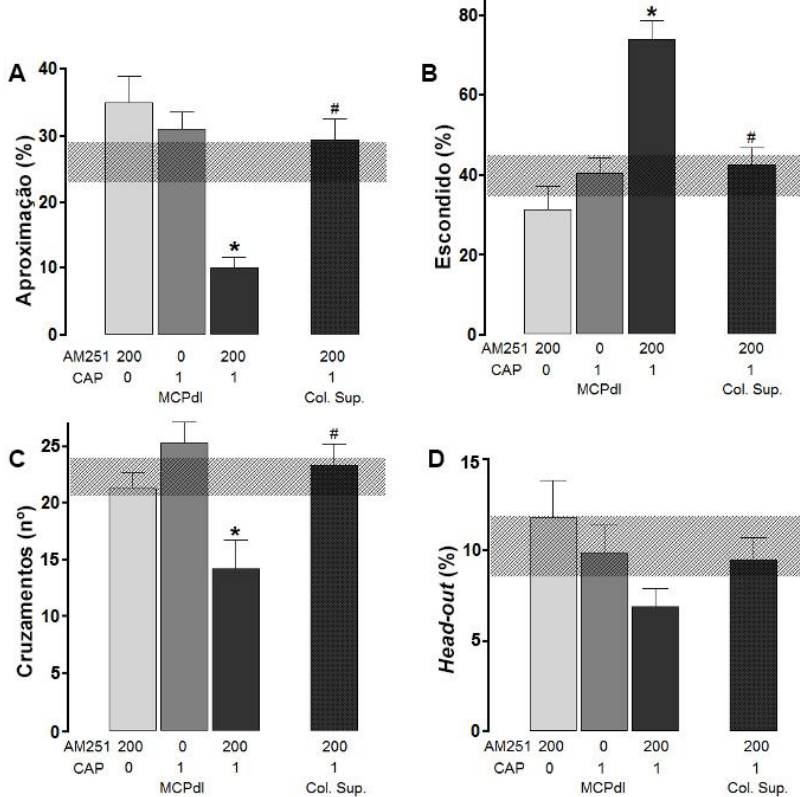


Figura 17: Comportamentos durante a reexposição ao odor. As barras verticais representam a média + erro padrão da média do tempo em que os animais permaneceram próximos à fonte de odor (A) ou no compartimento fechado, distante da fonte de odor (B), número de cruzamentos na caixa de odor (C) e tempo em que os animais permaneceram em postura de *head-out* (D). ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação aos grupos AM251 200 pmol + PBS e CAP 1 nmol + PBS; $\#=p<0,05$ em relação ao grupo (AM251 200 pmol + CAP 1 nmol) + PBS na MCPdl. As barras horizontais representam o intervalo de confiança de 95% dos dados da familiarização. n: AM251 200 pmol + PBS (9), CAP 1 nmol + PBS (8), (AM251 200 pmol + CAP 1 nmol) + PBS (8) e (AM251 200 pmol + CAP 1 nmol) + PBS (Col. Sup.) (8).

6.7. Experimento 7: potencialização das respostas defensivas através de interferência nos receptores CB1, TRPV1 e NMDA na MCPdl.

Na figura 18 estão ilustrados os efeitos imediatos da microinjeção de NMDA 25 pmol precedida pela microinjeção conjunta de (AM251 200 pmol + CAP 0,1 nmol) na MCPdl ou no colículo superior. Os grupos controle receberam NMDA 25 pmol precedidos por AM251 200 pmol ou CAP 0,1 nmol.

A ANOVA indicou um efeito do tratamento sobre as respostas defensivas [$F(3, 37)=2,88$; $p<0,05$] nos dados referentes ao dia do condicionamento, logo após a última microinjeção (Figura 17 A). Também foi detectado um efeito sobre as respostas não defensivas (Figura 17 B) [$F(3, 37)=3,03$; $p<0,05$].

A avaliação *post hoc* apontou para um aumento das respostas defensivas nos animais que receberam a microinjeção conjunta de (AM251 200 pmol + CAP 0,1 nmol) seguida de NMDA 25 pmol em relação a ambos os grupos controle (AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol ou CAP 0,1 + NMDA 25 pmol) (figura 17 A). Além disso, houve o aparecimento do comportamento de fuga no grupo sujeito à (AM251 200 pmol + CAP 0,1 nmol) + NMDA 25 pmol. Porém, as respostas não defensivas deste grupo apresentaram redução somente quando comparadas às do grupo CAP 0,1 nmol + NMDA 25 pmol (figura 17 B). A comparação entre os tratamentos (AM251 200 pmol + CAP 0,1 nmol) + NMDA 25 pmol e AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol indicou apenas uma tendência à redução em relação ao controle ($p=0,09$). A comparação entre os sítios de microinjeção aponta apenas para tendências tanto das respostas defensivas, quanto das respostas não defensivas ($p=0,06$).

Os resultados comportamentais coletados imediatamente após a microinjeção de NMDA 25 pmol neste experimento mostram que a estimulação da MCPdl gerou respostas defensivas mais intensas quando houve interferência simultânea tanto em receptores CB1 quanto em TRPV1. O surgimento da resposta de fuga, embora pouco expressivo, também indica um nível de ativação maior da MCPdl no grupo que recebeu AM251, CAP e NMDA.

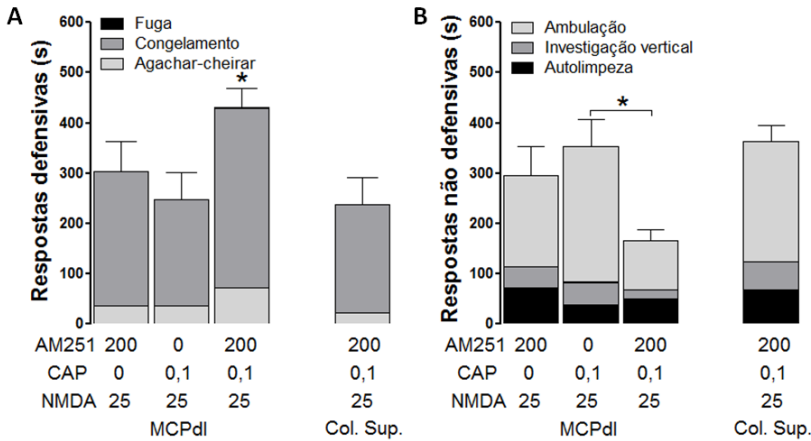


Figura 18: Respostas comportamentais logo após a microinjeção de NMDA 25 pmol em animais que receberam AM251 200 pmol e capsaicina (CAP) 0,1 nmol na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) ou colículo superior (Col. Sup.). As barras verticais representam a média + erro padrão da média dos comportamentos defensivos (A) e comportamentos exploratórios e de autolimpeza (B) representados em segundos. ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação aos grupos AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol e CAP 0,1 nmol + NMDA 25 pmol. n: AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (10), CAP 0,1 nmol + NMDA 25 pmol (9), (AM251 200 pmol + CAP 0,1 nmol) + NMDA (10) e (AM251 200 pmol + CAP 0,1 nmol) + NMDA (Col. Sup.) (12).

A figura 19 ilustra a etapa de expressão de respostas comportamentais frente ao odor, 48 horas após as microinjeções.

Durante a reexposição ao odor, o teste ANOVA revelou diferenças nos comportamentos de %TA [$F(3,37)=21,43$; $p<0,000005$], da %TE [$F(3,37)=15,60$; $p<0,000005$] e do CR [$F(3,37)=6,81$; $p<0,005$] que indicaram um efeito do tratamento. Não houve diferenças nas medidas de *head-out*.

O teste *post hoc* indicou um aumento da %TA (figura 19 A) e redução da %TE (figura 19 B) no grupo submetido às microinjeções de NMDA 25 pmol precedidos pela combinação de (AM251 200 pmol + CAP 0,1 nmol) e em relação a ambos os controles positivos AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol ou CAP 0,1 + NMDA 25 pmol. Também foi detectado um aumento em CR no grupo (AM251 200 pmol + CAP 0,1 nmol) + NMDA 25 pmol em comparação com os mesmos controles positivos (figura 19 C).

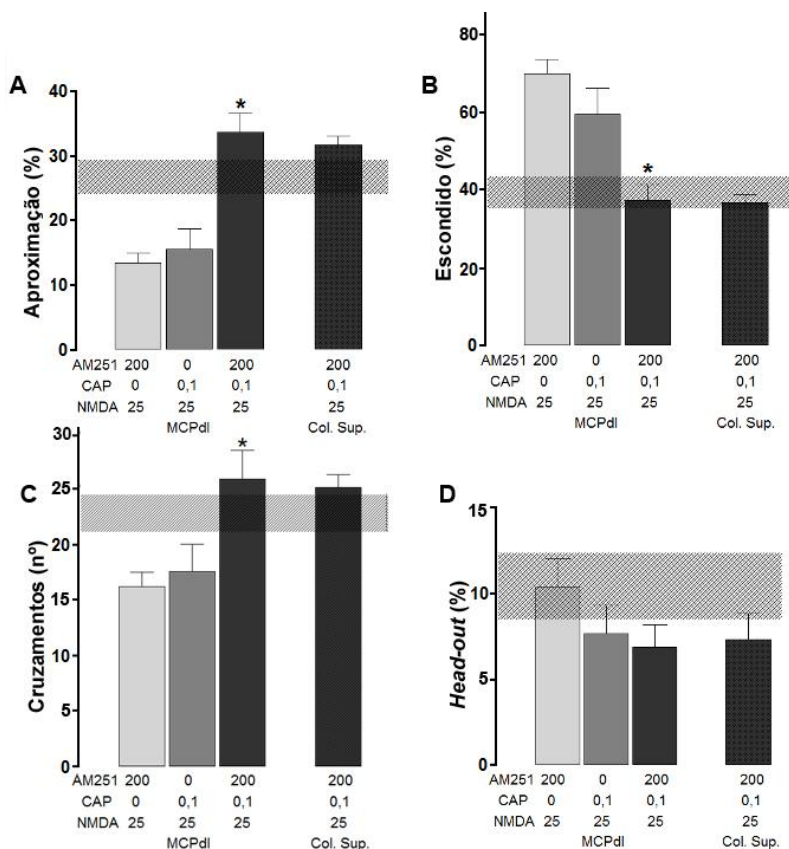


Figura 19: Comportamentos durante a reexposição ao odor. As barras verticais representam a média + erro padrão da média do tempo em que os animais permaneceram próximos à fonte de odor (A) ou no compartimento fechado, distante da fonte de odor (B), número de cruzamentos na caixa de odor (C) e tempo em que os animais permaneceram em postura de *head-out* (D). ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação aos grupos AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol e CAP 0,1 nmol + NMDA 25 pmol. As barras horizontais representam o intervalo de confiança de 95% dos dados da familiarização. n: AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (10), CAP 0,1 nmol + NMDA 25 pmol (9), (AM251 200 pmol + CAP 0,1 nmol) + NMDA (10) e (AM251 200 pmol + CAP 0,1 nmol) + NMDA (Col. Sup.) (12).

O grupo submetido às microinjeções no colículo superior não apresentou diferenças em relação ao grupo (AM251 200 pmol + CAP 0,1 nmol) + NMDA 25 pmol na MCPdl, mantendo os níveis

comportamentais próximos aos observados durante a familiarização. (figura 19 A, B e C).

Portanto, os resultados deste experimento mostram que a estimulação da MCPdl por (AM251 200 pmol + CAP 0,1 nmol) + NMDA 25 pmol gerou um incremento nas respostas defensivas no dia do condicionamento, superando os níveis observados nos grupos controle positivos. Na sessão de reexposição ao odor, os animais dos grupos controle demonstram respostas de esquiva, indicando aprendizagem. Por outro lado, os animais do grupo (AM251 200 pmol + CAP 0,1 nmol) + NMDA 25 pmol apresentaram respostas de esquiva condizentes com um prejuízo na aprendizagem da associação entre EI e EN.

Contribuição de glutamato endógeno e de receptores glutamatérgicos AMPA na modulação dos receptores CBI e TRPV1 na MCPdl durante as respostas defensivas incondicionadas e a consequente formação de memória (experimentos 8-13).

6.8. Experimento 8: bloqueio da liberação de glutamato durante o condicionamento aversivo olfatório antes da estimulação da MCPdl por AM251 associado ao NMDA.

Neste experimento, cujos dados encontram-se ilustrados na figura 20, os animais receberam riluzol (2 ou 4 nmol) cinco minutos antes da microinjeção de AM251 200 pmol, e dez minutos após, receberam NMDA 25 pmol e foram colocados imediatamente em contato com o odor.

A ANOVA indicou um efeito do tratamento sobre as respostas defensivas (figura 20 A) [$F(6, 58)=19,33; p<0,000005$] e as respostas não defensivas (figura 20 B) [$F(6, 58)=18,93; p<0,000005$] nos dados referentes ao dia do condicionamento.

O teste *post hoc* indicou um aumento das respostas defensivas (figura 20 A) e redução das respostas não defensivas (figura 20 B) nos animais que receberam as microinjeções de veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol em comparação ao controle veículo + veículo + PBS. Além disso, houve um incremento nas respostas defensivas (figura 19 A) e decréscimo das respostas não defensivas (figura 19 B) nos animais que receberam riluzol 2 ou 4 nmol antes de AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol, em comparação com o grupo que recebeu veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol. Este incremento foi acompanhado pelo aparecimento de respostas de fuga. Ainda, o teste revelou um aumento nas respostas defensivas (figura 19 A) e redução das respostas não

defensivas (figura 20 B) nos grupos que receberam apenas riluzol (2 ou 4 nmol) + veículo + PBS.

O tratamento de veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol no colículo superior apresentou diferença do mesmo tratamento direcionado à MCPdl, apresentando, portanto, níveis comportamentais similares aos do grupo veículo + veículo + PBS.

Estes resultados mostram que o riluzol promoveu respostas defensivas quando administrado como único tratamento. Além disso, foi capaz de incrementar as respostas defensivas no grupo tratado com o agonista inverso de receptores CB1 associado ao NMDA.

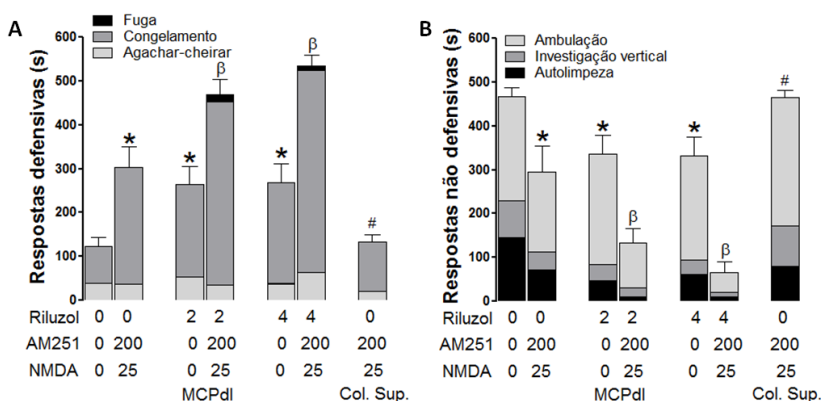


Figura 20: Respostas comportamentais logo após a microinjeção de NMDA 25 pmol em animais que receberam riluzol (2 ou 4 nmol) e/ou AM251 200 pmol na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) ou colículo superior (Col. Sup.). As barras verticais representam a média + erro padrão da média dos comportamentos defensivos (A) e comportamentos exploratórios e de autolimpieza (B) representados em segundos. ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls. 0=veículo ou PBS. *= $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo + veículo + PBS. $\beta = p < 0,05$ em relação ao grupo veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol e aos grupos que receberam somente riluzol. #= $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol na MCPdl. n: veículo + veículo + PBS (8), veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (10), riluzol 2 nmol + veículo + PBS (7), riluzol 2 nmol + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (12), riluzol 4 nmol + veículo + PBS (7), riluzol 4 nmol + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (8), veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (Col.Sup.) (13).

Na figura 21 estão demonstrados os resultados da reexposição destes animais ao odor, 48 horas após as microinjeções.

Na reexposição ao odor, a ANOVA mostrou um efeito do tratamento sobre os comportamentos de %TA [$F(6, 58)=6,89$; $p<0,00005$] e de %TE [$F(6, 58)=5,28$; $p<0,000005$]. Houve apenas uma tendência no comportamento de CR [$F(6, 58)=2,61$; $p=0,05$] e o comportamento de *head-out* não apresentou diferenças quanto ao fator tratamento.

O teste *post hoc* Newman-Keuls indicou uma redução na %TA (figura 21 A) e aumento da %TE (figura 21 B) no grupo submetido às microinjeções de veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol em comparação ao controle veículo + veículo + PBS. Também foi indicada uma redução da %TA (figura 21 A) no grupo riluzol 2 nmol + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol em comparação ao controle riluzol 2 nmol + veículo + PBS.

O grupo submetido ao riluzol 4 nmol + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol não apresentou diferenças do controle veículo + veículo + PBS ou do grupo riluzol 4 nmol + veículo + PBS (figura 20 A e B).

Os animais submetidos às microinjeções no colículo superior mantiveram os mesmos níveis de comportamento do dia da familiarização, portanto, diferentes do mesmo tratamento direcionado à MCPdl (figura 21 A e B).

Desta forma, os resultados do presente experimento mostram que o riluzol potencializou a expressão de respostas defensivas no dia do condicionamento, porém, prejudicou a associação EI+EN neste dia. Portanto, os efeitos do agonista inverso de receptores CB1 sobre as respostas defensivas e aprendizagem dependem de mecanismos glutamatérgicos. Além disso, apesar do riluzol microinjetado na MCPdl evocar respostas defensivas *per se*, este tratamento não foi capaz de promover a associação EI+EN.

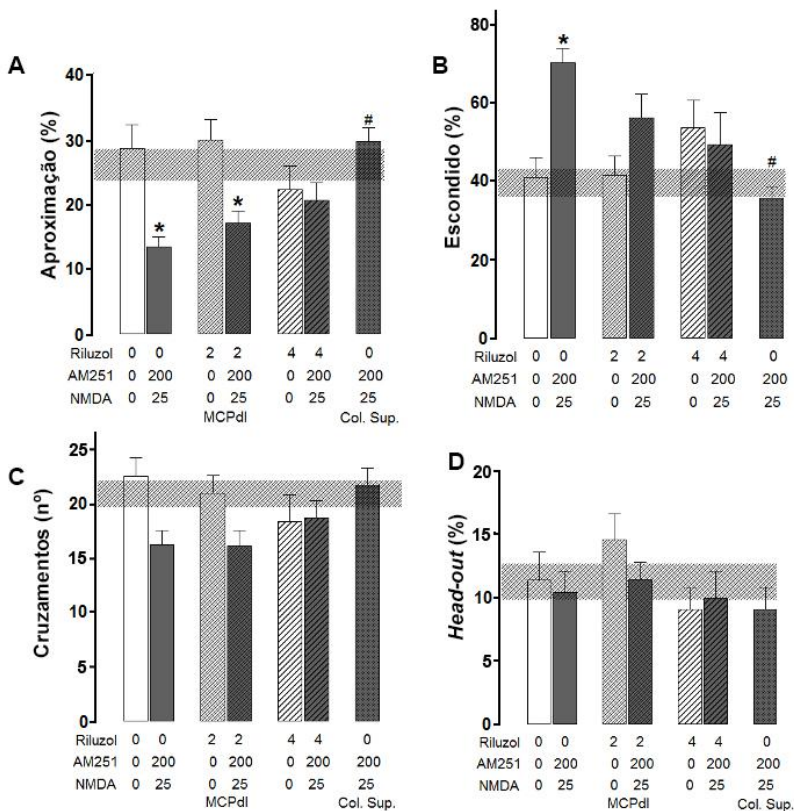


Figura 21: Comportamentos durante a reexposição ao odor. As barras verticais representam a média + erro padrão da média do tempo em que os animais permaneceram próximos à fonte de odor (A) ou no compartimento fechado, distante da fonte de odor (B), número de cruzamentos na caixa de odor (C) e tempo em que os animais permaneceram em postura de *head-out* (D). ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo veículo + veículo + PBS. $\#=p<0,05$ em relação ao grupo veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol na matéria cinzenta periaquedutal (MCPdl). As barras horizontais representam o intervalo de confiança de 95% dos dados da familiarização. n: veículo + veículo + PBS (8), veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (10), riluzol 2 nmol + veículo + PBS (7), riluzol 2 nmol + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (12), riluzol 4 nmol + veículo + PBS (7), riluzol 4 nmol + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (8), veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (Col.Sup.) (13).

6.9. Experimento 9: efeitos do bloqueador de receptores AMPA/cainato na MCPdl sobre o condicionamento aversivo olfatório por AM251 associado ao NMDA.

Os efeitos do bloqueio de receptores AMPA/cainato no grupo que recebeu AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol estão demonstrados na figura 22. Neste experimento, os animais receberam DNQX (2 ou 4 nmol) cinco minutos antes da microinjeção de AM251 200 pmol, e dez minutos após, receberam NMDA 25 pmol e foram imediatamente colocados em contato com o odor.

A ANOVA indicou um efeito do tratamento sobre as respostas defensivas (figura 22 A) [$F(6, 56)=19,74$; $p<0,000005$] e não defensivas (Figura 22 B) [$F(6, 56)=19,11$; $p<0,000005$] nos dados referentes ao dia do condicionamento, logo após a última microinjeção.

O teste *post hoc* apontou para um aumento das respostas defensivas (figura 22 A) e uma redução das respostas não defensivas (figura 22 B) nos animais que receberam a microinjeção de veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol em comparação ao controle veículo + veículo + PBS. Ocorreu também um incremento nas respostas defensivas e um decréscimo nas respostas não defensivas nos grupos que receberam DNQX (2 ou 4 nmol) + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol em comparação com o grupo veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol. Este incremento foi acompanhado pelo aparecimento de respostas de fuga. O pré-tratamento com DNQX *per se* não alterou as respostas defensivas.

O tratamento com veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol no colículo superior apresentou diferenças significativas do grupo com o mesmo tratamento na MCPdl, mas não foi diferente do controle negativo veículo + veículo + PBS.

Portanto, os resultados mostram que o bloqueio de receptores AMPA/cainato potencializou as respostas defensivas produzidas pelo agonista inverso de receptores CB1 associado ao agonista NMDA na MCPdl, sem apresentar modificações comportamentais *per se*.

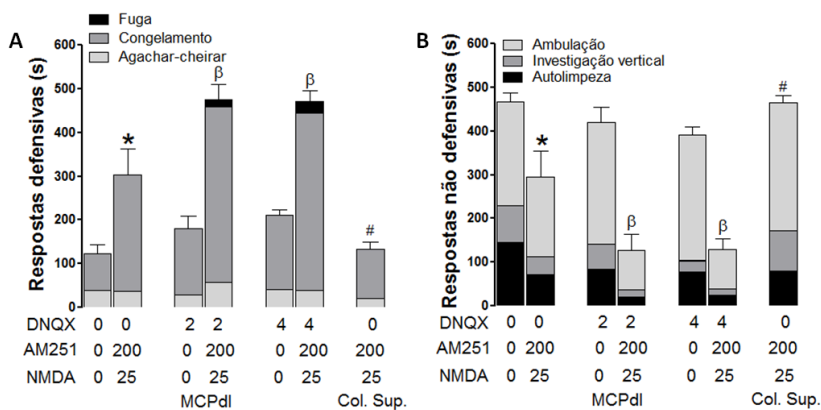


Figura 22: Respostas comportamentais logo após a microinjeção de NMDA 25 pmol em animais que receberam DNQX (2 ou 4 nmol) e/ou AM251 200 pmol na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) ou colículo superior (Col. Sup.). As barras verticais representam a média + erro padrão da média dos comportamentos defensivos (A) e comportamentos exploratórios e de autolimpieza (B) representados em segundos. ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls. 0=veículo ou PBS. *= $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo + veículo + PBS. $\beta = p < 0,05$ em relação ao grupo veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol e aos grupos que receberam somente DNQX. #= $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol na MCPdl. n: veículo + veículo + PBS (8), veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (10), DNQX 2 nmol + veículo + PBS (7), DNQX 2 nmol + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (9), DNQX 4 nmol + veículo + PBS (8), DNQX 4 nmol + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (8), veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (Col.Sup.) (13).

Na figura 23 estão ilustrados os resultados da reexposição destes animais ao odor, 48 horas após as microinjeções.

Na sessão de reexposição ao odor, a ANOVA mostrou um efeito do tratamento sobre os comportamentos de %TA [$F(6, 56)=3,01$; $p < 0,05$] e de %TE [$F(6, 56)=6,15$; $p < 0,0005$]. Houve apenas uma tendência no comportamento de CR [$F(6, 56)=2,80$; $p=0,05$] e o comportamento de *head-out* não apresentou diferenças quanto ao fator tratamento.

O teste *post hoc* indicou uma redução na %TA (figura 23 A) e um aumento da %TE (figura 23 B) no grupo submetido às microinjeções de veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol em comparação ao controle veículo + veículo + PBS. Ainda, os grupos submetidos ao DNQX (2 ou 4 nmol) + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol não

apresentaram diferenças dos controles positivos ou negativos, e mantiveram os mesmos níveis comportamentais da familiarização (figura 23 A e B). Os grupos tratados com o DNQX não apresentaram diferenças em relação ao controle negativo veículo + veículo + PBS (figura 23 B).

O grupo submetido às microinjeções no colículo superior apresentou diferenças em relação ao grupo controle positivo com microinjeções na MCPdl (figura 23 A e B).

Estes resultados mostram que o bloqueio de receptores AMPA/cainato incrementa as respostas defensivas causadas pelo tratamento AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol no dia do condicionamento, assim como prejudicam a associação de EI + EN. Ainda, corroboram os dados obtidos no experimento com riluzol sem produzir efeitos quando administrados separadamente.

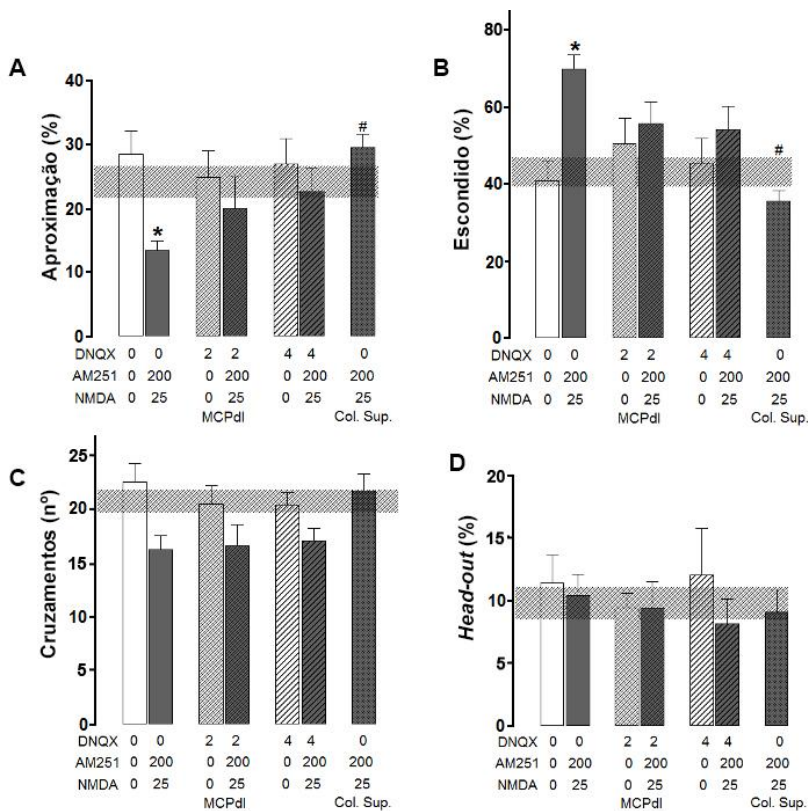


Figura 23: Comportamentos durante a reexposição ao odor. As barras verticais representam a média + erro padrão da média do tempo em que os animais permaneceram próximos à fonte de odor (A) ou no compartimento fechado, distante da fonte de odor (B), número de cruzamentos na caixa de odor (C) e tempo em que os animais permaneceram em postura de *head-out* (D). ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo veículo + veículo + PBS. $\#=p<0,05$ em relação ao grupo veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol na matéria cinzenta periaquedutal (MCPdl). As barras horizontais representam o intervalo de confiança de 95% dos dados da familiarização. n: veículo + veículo + PBS (8), veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (10), DNQX 2 nmol + veículo + PBS (7), DNQX 2 nmol + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (9), DNQX 4 nmol + veículo + PBS (8), DNQX 4 nmol + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (8), veículo + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (Col.Sup.) (13).

6.10. Experimento 10: bloqueio da liberação de glutamato no condicionamento aversivo olfatório antes da estimulação da MCPdl por CAP.

Os efeitos do bloqueio da liberação de glutamato no grupo que recebeu CAP 10 nmol + PBS estão ilustrados na figura 24. Neste experimento, os animais receberam riluzol (2 ou 4 nmol) cinco minutos antes da microinjeção de CAP 10 nmol, dez minutos após, receberam PBS e então foram imediatamente colocados em contato com o odor.

A ANOVA indicou um efeito do tratamento sobre as respostas defensivas (figura 24 A) [$F(6, 53)=2,82$; $p<0,05$] e sobre as respostas não defensivas (Figura 24 B) [$F(6, 53)=2,51$; $p<0,05$] nos dados referentes ao dia do condicionamento, logo após a última microinjeção.

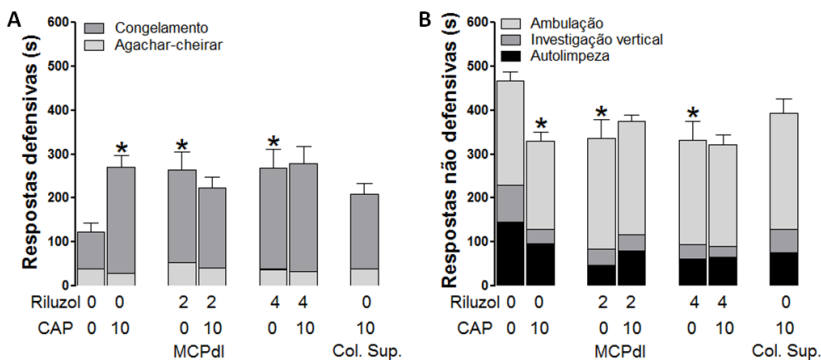


Figura 24: Respostas comportamentais após a microinjeção de capsaicina (CAP) 10 nmol em animais que receberam riluzol (2 ou 4 nmol) na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) ou colículo superior (Col. Sup.). As barras verticais representam a média + erro padrão da média dos comportamentos defensivos (A) e comportamentos exploratórios e de autolimpeza (B) representados em segundos. ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls. 0=veículo. $*=p<0,05$ em relação ao grupo veículo + veículo + PBS. n: veículo + veículo + PBS (8), veículo + CAP 10 nmol + PBS (9), riluzol 2 nmol + veículo + PBS (7), riluzol 2 nmol + CAP 10 nmol + PBS (9), riluzol 4 nmol + veículo + PBS (7), riluzol 4 nmol + CAP 10 nmol + PBS (8), veículo + CAP 10 nmol + PBS (Col.Sup.) (12).

O teste *post hoc* indicou um aumento das respostas defensivas (figura 24 A) e redução das respostas não defensivas (figura 24 B) nos animais que receberam a microinjeção de veículo + CAP 10 nmol + PBS em comparação ao controle veículo + veículo + PBS. Foi também detectado um aumento nas respostas defensivas e redução das respostas

não defensivas nos grupos que receberam apenas riluzol (2 ou 4 nmol) + veículo + PBS. Porém, ao contrário do experimento 8, o pré-tratamento com riluzol não incrementou as respostas defensivas ou reduziu as respostas não defensivas do grupo CAP 10 nmol + PBS.

O tratamento de veículo + CAP 10 nmol + PBS no colículo superior não apresentou diferenças significativas do controle negativo veículo + veículo + PBS ou do grupo com o tratamento na MCPdl.

Estes resultados mostram que o riluzol não interfere sobre as respostas defensivas produzidas pela ativação de receptores TRPV1.

A figura 25 contém os resultados dos animais pré-tratados com riluzol (2 ou 4 nmol) frente ao tratamento com CAP (10 nmol) durante a reexposição ao odor, 48 horas após as microinjeções.

Na avaliação dos resultados obtidos durante a reexposição ao odor, a ANOVA revelou um efeito do tratamento sobre os comportamentos de %TA [F(6, 53)=4,43; $p < 0,005$], de %TE [F(6, 53)=6,78; $p < 0,00005$] e de CR [F(6, 53)=6,00; $p < 0,0005$], mas não para o comportamento de *head-out*.

O teste *post hoc* indicou uma redução na %TA (figura 25 A) e aumento da %TE (figura 25 B) no grupo tratado com microinjeções de veículo + CAP 10 nmol + PBS em relação ao controle veículo + veículo + PBS. Os grupos riluzol (2 ou 4 nmol) + CAP 10 nmol + PBS não apresentaram diferenças do controle veículo + veículo + PBS ou dos grupos riluzol (2 ou 4 nmol) + veículo + PBS (figura 25 A) e, portanto, mantiveram os mesmos índices de respostas defensivas e não defensivas do dia da familiarização.

Houve uma redução do CR (figura 25 C) no grupo que recebeu as microinjeções de veículo + CAP 10 nmol + PBS em relação ao controle veículo + veículo + PBS, enquanto os outros grupos mantiveram os mesmos níveis da sessão de familiarização.

O grupo tratado com microinjeções no colículo superior apresentou diferenças do grupo que recebeu as microinjeções de veículo + CAP 10 nmol + PBS na MCPdl, mantendo os mesmos níveis de respostas do dia da familiarização (figura 25 A, B e C).

Assim sendo, os resultados deste experimento mostram que a interferência na liberação de glutamato não alterou as respostas defensivas evocadas pela ativação de receptores TRPV1, porém, prejudicou a associação entre EI+EN.

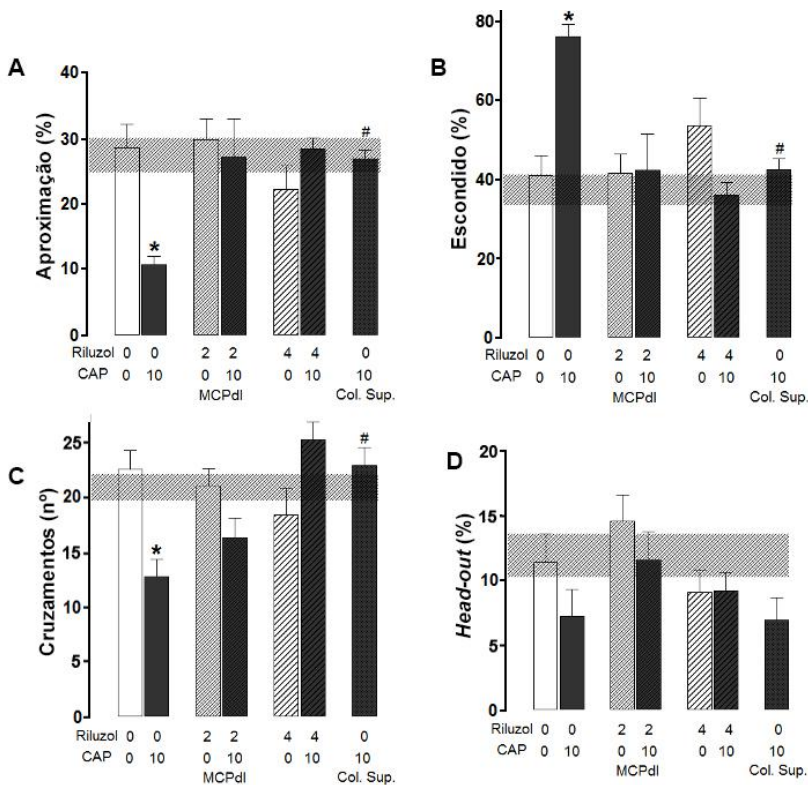


Figura 25: Comportamentos durante a reexposição ao odor. As barras verticais representam a média + erro padrão da média do tempo em que os animais permaneceram próximos à fonte de odor (A) ou no compartimento fechado, distante da fonte de odor (B), número de cruzamentos na caixa de odor (C) e tempo em que os animais permaneceram em postura de *head-out* (D). ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo veículo + veículo + PBS. $\#=p<0,05$ em relação ao grupo veículo + CAP 10 nmol + PBS na matéria cinzenta periaquedutal (MCPdl). As barras horizontais representam o intervalo de confiança de 95% dos dados da familiarização. n: veículo + veículo + PBS (8), veículo + CAP 10 nmol + PBS (9), riluzol 2 nmol + veículo + PBS (7), riluzol 2 nmol + CAP 10 nmol + PBS (9), riluzol 4 nmol + veículo + PBS (7), riluzol 4 nmol + CAP 10 nmol + PBS (8), veículo + CAP 10 nmol + PBS (Col.Sup.) (12).

6.11. Experimento 11: efeitos do bloqueador de receptores AMPA/cainato na MCPdl sobre o condicionamento aversivo olfatório por CAP.

Os efeitos do bloqueio de receptores AMPA/cainato no grupo que recebeu CAP 10 nmol + PBS estão ilustrados na figura 26. Neste experimento, os animais receberam DNQX 2 nmol cinco minutos antes da microinjeção de CAP 10 nmol, e dez minutos após, receberam PBS e foram imediatamente colocados em contato com o odor.

A ANOVA indicou um efeito do tratamento sobre as respostas defensivas (figura 26 A) [$F(4, 39)=3,86$; $p<0,05$] e sobre as respostas não defensivas (figura 26 B) [$F(4, 39)=3,38$; $p<0,05$] nos dados referentes ao dia do condicionamento.

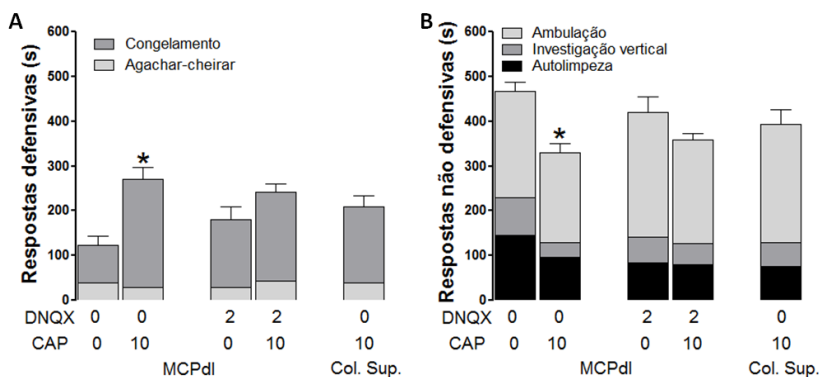


Figura 26: Respostas comportamentais após a microinjeção de capsaicina (CAP) 10 nmol em animais que receberam DNQX 2 nmol na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) ou cóliculo superior (Col. Sup.). As barras verticais representam a média + erro padrão da média dos comportamentos defensivos (A) e comportamentos exploratórios e de autolimpeza (B) representados em segundos. ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls. 0=veículo. *= $p<0,05$ em relação ao grupo veículo + veículo + PBS. n: veículo + veículo + PBS (8), veículo + CAP 10 nmol + PBS (9), DNQX 2 nmol + veículo + PBS (7), DNQX 2 nmol + CAP 10 nmol + PBS (8) e veículo + CAP 10 nmol + PBS (Col.Sup.) (12).

O teste *post hoc* indicou um aumento das respostas defensivas (figura 26 A) e redução das respostas não defensivas (figura 26 B) nos animais que receberam a microinjeção de veículo + CAP 10 nmol + PBS em comparação ao controle veículo + veículo + PBS. Diferenças relacionadas ao pré-tratamento com DNQX não foram encontradas.

O tratamento com veículo + CAP 10 nmol + PBS no colículo superior não apresentou diferenças significativas do controle negativo veículo + veículo + PBS ou do grupo com o tratamento na MCPdl.

Estes resultados mostram que o bloqueio de receptores AMPA/cainato não interfere sobre as respostas comportamentais produzidas pela ativação de receptores TRPV1 durante o condicionamento.

A figura 27 contém os resultados dos animais pré-tratados com DNQX 2 nmol frente ao tratamento com CAP 10 nmol durante a reexposição ao odor, 48 horas após as microinjeções.

Nos comportamentos durante esta sessão, a ANOVA revelou um efeito do tratamento sobre os comportamentos de %TA [F(4, 39)=6,30; p<0,005], de %TE [F(4, 39)=10,77; p<0,00005] e de CR [F(4, 39)=6,03; p<0,005], sem alterações no o comportamento de *head-out*.

O teste *post hoc* revelou uma redução na %TA (figura 27 A) e aumento da %TE no grupo submetido às microinjeções de veículo + CAP 10 nmol + PBS em relação ao controle veículo + veículo + PBS. No entanto, o grupo DNQX 2 nmol + CAP 10 nmol + PBS não apresentou diferenças dos controles veículo + veículo + PBS ou DNQX 2 nmol + veículo + PBS com relação à %TA e à %TE e, portanto, manteve os mesmos índices do dia da familiarização.

Ocorreu uma redução do CR no grupo microinjetado com veículo + CAP 10 nmol + PBS em relação ao controle veículo + veículo + PBS, enquanto os outros grupos mantiveram os mesmos níveis da sessão de familiarização.

No grupo submetido às microinjeções no colículo superior, o teste *post hoc* acusou diferenças do grupo que recebeu as microinjeções na MCPdl, desta forma, ratos que receberam veículo + CAP 10 nmol + PBS no colículo superior mantiveram os mesmos níveis dos comportamentos observados no dia da familiarização (figura 27 A, B e C).

Sendo assim, os resultados deste experimento mostram que o bloqueio de receptores AMPA/cainato interferiu somente na associação entre EI+EN, sem alterar as respostas defensivas promovidas pela CAP. Estes resultados são similares aos obtidos com riluzol, sem os efeitos basais do pré-tratamento.

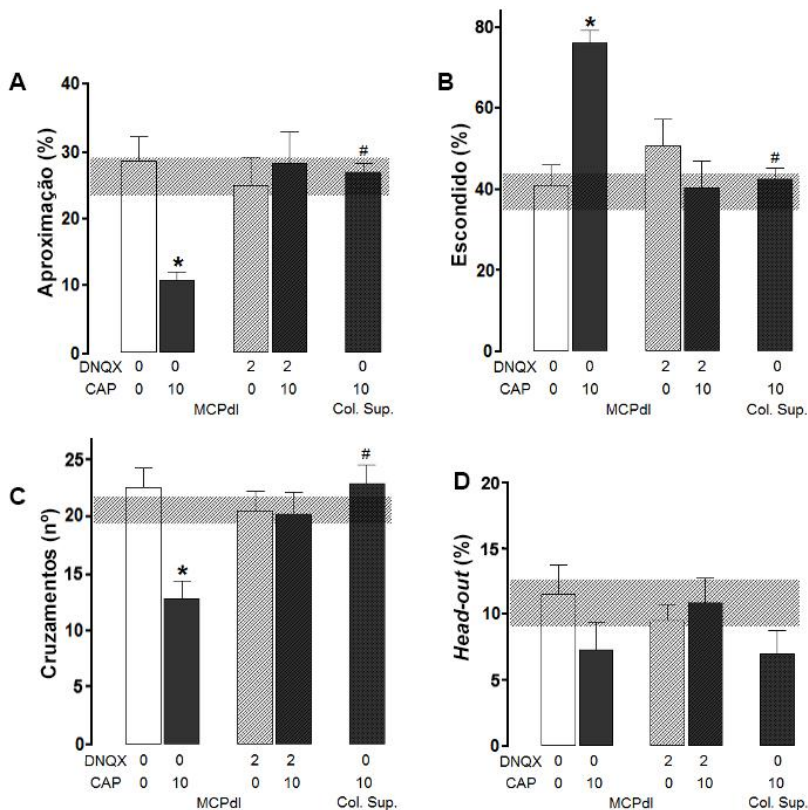


Figura 27: Comportamentos durante a reexposição ao odor. As barras verticais representam a média + erro padrão da média do tempo em que os animais permaneceram próximos à fonte de odor (A) ou no compartimento fechado, distante da fonte de odor (B), número de cruzamentos na caixa de odor (C) e tempo em que os animais permaneceram em postura de *head-out* (D). ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo veículo + veículo + PBS. $\#=p<0,05$ em relação ao grupo veículo + capsaicina (CAP) 10 nmol + PBS na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl). As barras horizontais representam o intervalo de confiança de 95% dos dados da familiarização. n: veículo + veículo + PBS (8), veículo + CAP 10 nmol + PBS (9), DNQX 2 nmol + veículo + PBS (7), DNQX 2 nmol + CAP 10 nmol + PBS (8) e veículo + CAP 10 nmol + PBS (Col.Sup.) (12).

6.12. Experimento 12: bloqueio da liberação de glutamato no condicionamento aversivo olfatório antes da estimulação da MCPdl por NMDA.

Os efeitos do bloqueio da liberação de glutamato no grupo que recebeu NMDA 50 pmol estão ilustrados na figura 28. Neste experimento, os animais receberam riluzol (2 ou 4 nmol) cinco minutos antes da microinjeção de NMDA 50 pmol e foram imediatamente colocados em contato com o odor.

A ANOVA indicou um efeito do tratamento sobre as respostas defensivas (figura 28 A) [$F(6, 58)=26,09$; $p<0,000005$] e sobre as respostas não defensivas (figura 28 B) [$F(6, 58)=25,72$; $p<0,000005$] nos dados referentes ao dia do condicionamento.

O teste *post hoc* indicou um aumento das respostas defensivas (figura 28 A) e uma redução das respostas não defensivas (figura 28 B) nos animais que receberam a microinjeção de veículo + NMDA 50 pmol em comparação ao controle veículo + PBS. Além disso, houve um incremento das respostas defensivas e um decréscimo das respostas não defensivas nos animais que receberam riluzol 2 ou 4 nmol antes de NMDA 50 pmol, em comparação com o grupo que recebeu veículo + NMDA 50 pmol. Este incremento das respostas defensivas foi acompanhado de respostas de fuga (figura 28 A). Ainda, o teste apontou para um aumento nas respostas defensivas e redução das respostas não defensivas nos grupos que receberam apenas riluzol (2 ou 4 nmol) + PBS (figura 28 A e B).

O tratamento de veículo + NMDA 50 pmol no colículo superior manteve os mesmos níveis do controle e, portanto, apresentou diferença quando comparado ao mesmo tratamento realizado na MCPdl (figura 28 A e B).

Estes resultados mostram que o riluzol incrementa as respostas defensivas no grupo tratado com o agonista de receptores NMDA de forma similar ao observado no experimento 8 com a potencialização de NMDA 25 pmol por AM251 200 pmol.

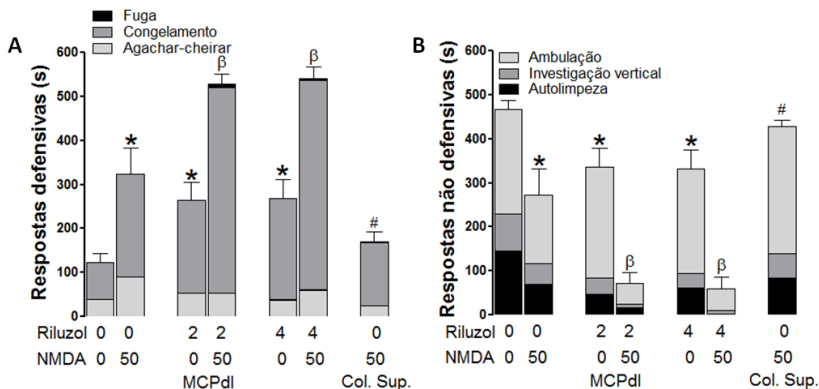


Figura 28: Respostas comportamentais logo após a microinjeção de NMDA 50 pmol em animais que receberam riluzol (2 ou 4 nmol) na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) ou colículo superior (Col. Sup.). As barras verticais representam a média + erro padrão da média dos comportamentos defensivos (A) e comportamentos exploratórios e de autolimpieza (B) representados em segundos. ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls. 0=veículo ou PBS. *= $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo + NMDA 50 pmol e aos grupos que receberam somente riluzol. β= $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo + NMDA 50 pmol e aos grupos que receberam somente riluzol. #= $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo + NMDA 50 pmol na MCPdl. n: veículo + PBS (8), veículo + NMDA 50 pmol (8), riluzol 2 nmol + PBS (7), riluzol 2 nmol + NMDA 50 pmol (13), riluzol 4 nmol + PBS (7), riluzol 4 nmol + NMDA 50 pmol (7) e veículo + NMDA 50 pmol (Col.Sup.) (15).

A figura 29 ilustra os resultados coletados durante a reexposição destes animais ao odor, 48 horas após as microinjeções.

Na reexposição ao odor, a ANOVA revelou um efeito do tratamento sobre os comportamentos de %TA [$F(6, 58)=4,64$; $p < 0,005$], de %TE [$F(6, 58)=4,92$; $p < 0,0005$] e de CR [$F(6, 58)=2,80$; $p < 0,05$]. O comportamento de *head-out* não apresentou diferenças quanto ao fator tratamento.

O teste *post hoc* Newman-Keuls indicou uma redução na %TA (figura 29 A) e um aumento na %TE (figura 29 B) no grupo submetido às microinjeções de veículo + NMDA 50 pmol em comparação ao controle veículo + PBS. Os grupos submetidos ao riluzol (2 ou 4 nmol) + NMDA 50 pmol não diferiram dos controles quanto a este comportamento (figura 29 A e B). Uma redução em CR foi observada no grupo veículo + NMDA 50 pmol em comparação ao controle veículo + PBS (figura 29 C).

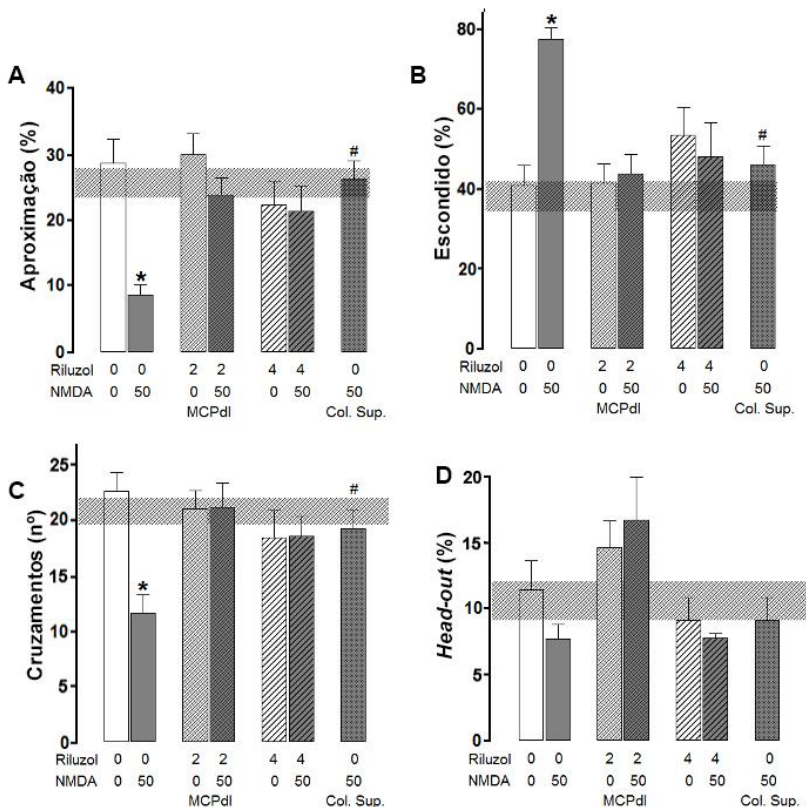


Figura 29: Comportamentos durante a reexposição ao odor. As barras verticais representam a média + erro padrão da média do tempo em que os animais permaneceram próximos à fonte de odor (A) ou no compartimento fechado, distante da fonte de odor (B), número de cruzamentos na caixa de odor (C) e tempo em que os animais permaneceram em postura de *head-out* (D). ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo veículo + PBS. $\#=p<0,05$ em relação ao grupo veículo + NMDA 50 pmol na matéria cinzenta periaquedutal (MCPdl). As barras horizontais representam o intervalo de confiança de 95% dos dados da familiarização. n: veículo + PBS (8), veículo + NMDA 50 pmol (8), riluzol 2 nmol + PBS (7), riluzol 2 nmol + NMDA 50 pmol (13), riluzol 4 nmol + PBS (7), riluzol 4 nmol + NMDA 50 pmol (7) e veículo + NMDA 50 pmol (Col.Sup.) (15).

O grupo submetido às microinjeções no colículo superior manteve os mesmos níveis de comportamento do dia da familiarização,

portanto, diferentes do mesmo tratamento direcionado à MCPdl (figura 29 A, B e C).

Portanto, os resultados deste experimento mostram que o riluzol incrementou a expressão de respostas defensivas no dia do condicionamento, e ainda prejudicou a associação EI+EN neste dia. Resultados similares foram observados no experimento 8 com o agonista inverso de receptores CB1 somado à dose baixa de NMDA, indicando um mecanismo em comum entre NMDA 50 pmol e a associação entre AM251 e NMDA em dose subefetiva.

6.13. Experimento 13: efeitos do bloqueador de receptores AMPA/cainato na MCPdl sobre o condicionamento aversivo olfatório por NMDA.

A figura 30 ilustra os efeitos do bloqueio de receptores AMPA/cainato no grupo que recebeu NMDA 50 pmol. Neste experimento, os animais receberam DNQX (2 nmol) cinco minutos antes da microinjeção de NMDA 50 pmol e foram imediatamente colocados em contato com o odor.

A ANOVA indicou um efeito do tratamento sobre as respostas defensivas (figura 30 A) [$F(4, 40)=14,34; p<0,000005$] e não defensivas (figura 30 B) [$F(4, 40)=14,27; p<0,00005$] nos dados referentes ao dia do condicionamento, logo após a última microinjeção.

O teste *post hoc* apontou para o aumento das respostas defensivas (figura 30 A) e redução das respostas não defensivas (figura 30 B) nos animais que receberam a microinjeção de veículo + NMDA 50 pmol em comparação ao controle veículo + PBS. Houve um incremento nas respostas defensivas e decréscimo das respostas não defensivas nos grupos que receberam DNQX 2 nmol + NMDA 50 pmol em comparação com o grupo veículo + NMDA 50 pmol. Este incremento das respostas defensivas foi acompanhado por resposta de fuga. O pré-tratamento com DNQX *per se* não alterou as respostas defensivas.

O tratamento com veículo + NMDA 50 pmol no colículo superior apresentou diferenças significativas do grupo com o mesmo tratamento na MCPdl, não sendo diferente do controle negativo veículo + PBS (figura 30 A e B).

Sendo assim, os resultados mostram que o bloqueio de receptores AMPA/cainato potencializou as respostas defensivas produzidas pelo agonista de receptores NMDA na MCPdl, sem apresentar atividade *per se*. Estes dados se assemelham aos obtidos com o tratamento de riluzol + NMDA 50 pmol e indicam que a emissão de

respostas defensivas imediatas pela ativação da MCPdl depende também de um controle da ativação de receptores AMPA/cainato locais, similar ao observado no experimento 9.

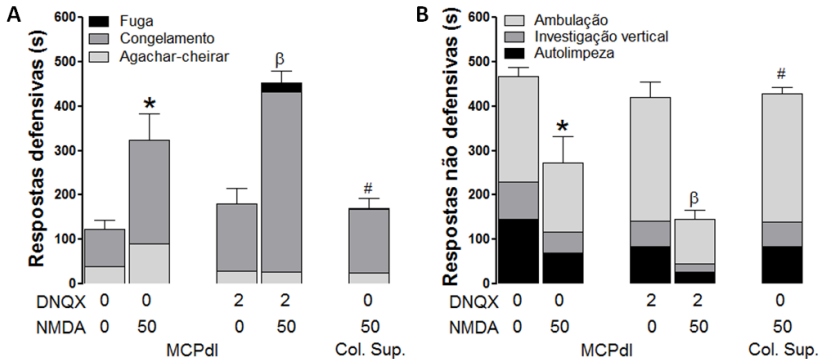


Figura 30: Respostas comportamentais logo após a microinjeção de NMDA 50 pmol em animais que receberam DNQX 2 nmol na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) ou colículo superior (Col. Sup.). As barras verticais representam a média + erro padrão da média dos comportamentos defensivos (A) e comportamentos exploratórios e de autolimpeza (B) representados em segundos. ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls. 0=veículo ou PBS. *= $p<0,05$ em relação ao grupo veículo + PBS. β = $p<0,05$ em relação ao grupo veículo + NMDA 50 pmol e ao grupo que recebeu somente riluzol. $\#$ = $p<0,05$ em relação ao grupo veículo + NMDA 50 pmol na MCPdl n: veículo + PBS (8), veículo + NMDA 50 pmol (8), DNQX 2 nmol + PBS (7), DNQX 2 nmol + NMDA 50 pmol (7) e veículo + NMDA 50 pmol (Col.Sup.) (12).

Na figura 31 estão ilustrados os resultados comportamentais da reexposição destes animais ao odor, 48 horas após as microinjeções.

Na sessão de reexposição ao odor, a ANOVA identificou um efeito do tratamento sobre os comportamentos de %TA [$F(4, 40)=5,26$; $p<0,005$], de %TE [$F(4, 40)=7,56$; $p<0,0005$] e de CR [$F(4, 40)=4,86$; $p=0,005$], mas o comportamento de *head-out* não apresentou diferenças quanto ao fator tratamento.

A análise *post hoc* indicou uma redução na %TA (figura 10 A) e aumento da %TE (figura 31 B) no grupo submetido às microinjeções de veículo + NMDA 50 pmol em comparação ao controle veículo + PBS. Uma redução em CR foi observada no grupo veículo + NMDA 50 pmol em comparação ao controle veículo + PBS (figura 31 C). Além disso, o grupo submetido ao DNQX 2 nmol + NMDA 50 pmol não apresentou

diferenças do controle, e, portanto, manteve os mesmos níveis comportamentais da familiarização (figura 31 A, B e C).

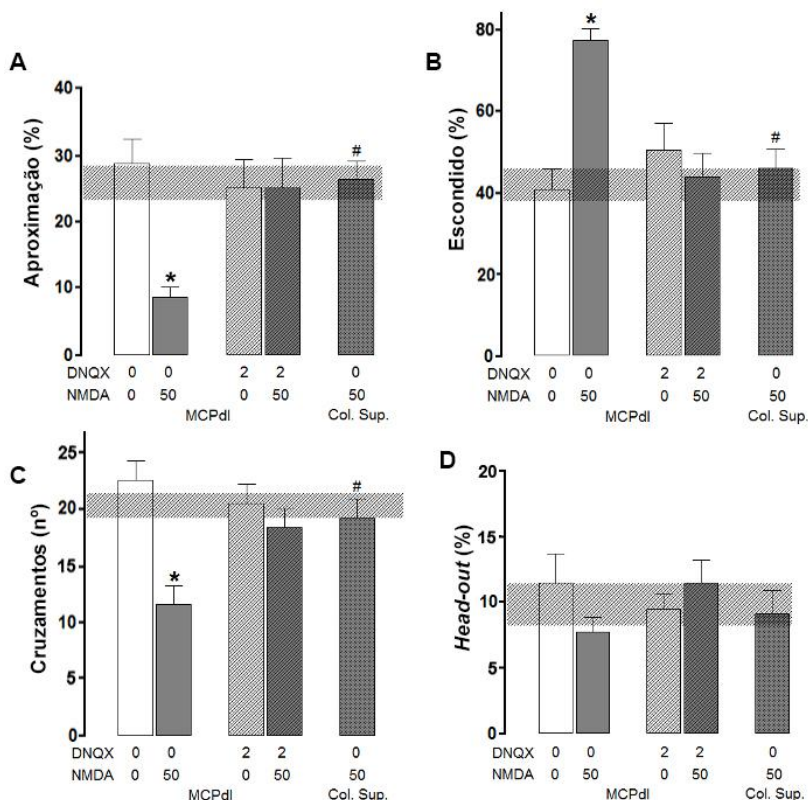


Figura 31: Comportamentos durante a reexposição ao odor. As barras verticais representam a média + erro padrão da média do tempo em que os animais permaneceram próximos à fonte de odor (A) ou no compartimento fechado, distante da fonte de odor (B), número de cruzamentos na caixa de odor (C) e tempo em que os animais permaneceram em postura de *head-out* (D). ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo veículo + PBS. $\#=p<0,05$ em relação ao grupo veículo + NMDA 50 pmol na matéria cinzenta periaquedutal (MCPdl). As barras horizontais representam o intervalo de confiança de 95% dos dados da familiarização. n: veículo + PBS (8), veículo + NMDA 50 pmol (8), DNQX 2 nmol + PBS (7), DNQX 2 nmol + NMDA 50 pmol (7) e veículo + NMDA 50 pmol (Col.Sup.) (12).

As microinjeções no colículo superior apresentaram diferenças apenas quando comparadas ao grupo que recebeu veículo + NMDA 50 pmol na MCPdl, portanto, mantiveram os mesmos níveis do dia da familiarização (figura 31 A, B e C).

Os presentes resultados mostram que o bloqueio de receptores AMPA/cainato prejudica a associação entre o estado aversivo (EI) e o odor (EN). Portanto, ressaltam a importância da ativação de receptores AMPA/cainato durante os efeitos de NMDA para a aprendizagem. Além do mais, apresentam resultados semelhantes aos obtidos no experimento com riluzol sem produzir efeitos quando administrados separadamente. Isto indica que a inibição da liberação de glutamato pode estar diretamente relacionada à redução da ativação de receptores AMPA/cainato, traçando um possível mecanismo para o controle da ativação da MCPdl por receptores CB1, TRPV1, NMDA e AMPA/cainato.

7. Discussão

Há poucos anos, foi demonstrado experimentalmente que uma única estimulação da MCPdl com o agonista glutamatérgico NMDA era capaz de produzir respostas defensivas. Mais que isso, o caráter aversivo desta estimulação havia sido transferido para uma pista olfatória, configurando a associação EI+EC (Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012).

Desta forma, a MCPdl deixou de ser considerada um simples relê em uma via descendente de resposta defensiva. Até então, a estimulação da MCPdl possuía um caráter de ato reflexo, por conta das respostas rápidas e explosivas evocadas pela estimulação elétrica (Schenberg e Graeff, 1978; Carobrez, Schenberg *et al.*, 1983; Kim, Horovitz *et al.*, 2013), química (Keay e Bandler, 2001; Bittencourt, Carobrez *et al.*, 2004; Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012) e optogenética (Deng, Xiao *et al.*, 2016; Tovote, Esposito *et al.*, 2016). Com base nas conexões funcionais ascendentes da MCPdl (Gross e Canteras, 2012; Kim, Horovitz *et al.*, 2013; Canteras, Pavesi *et al.*, 2015; Horovitz e Richter-Levin, 2015) e a capacidade de promover aprendizagem (Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012; Souza e Carobrez, 2016), esta estrutura passou a ser considerada como integradora de informações polimodais primárias e processadora de informações (intero e exteroceptivas) relacionadas a condições aversivas (Motta, Carobrez *et al.*, 2016).

No presente estudo, foram propostos mecanismos de modulação da atividade local na MCPdl. Esses mecanismos poderiam alterar tanto a responsividade imediata quanto as consequências da instrução aversiva sobre a aprendizagem.

A coluna da MCPdl pode ser subdividida ao longo do eixo rostro-caudal em uma porção rostral, caudal e intermediária (Bandler, Carrive *et al.*, 1991; Paxinos e Watson, 1998). Embora as coordenadas utilizadas em boa parte dos trabalhos (Bittencourt, Carobrez *et al.*, 2004; Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012; Deng, Xiao *et al.*, 2016; Tovote, Esposito *et al.*, 2016) direcionem as microinjeções para a porção caudal da MCPdl, optou-se, no presente trabalho, pela porção rostral desta estrutura.

Esta escolha se deve aos resultados obtidos durante a exposição de ratos ao odor de gato (Souza, 2007; Souza e Carobrez, 2016). Neste protocolo, os ratos apresentaram respostas defensivas frente ao odor (EI). Consequentemente, exibiram respostas de esquiva quando reexpostos à mesma caixa onde haviam encontrado previamente o odor, o que foi interpretado como medida de aprendizagem. O bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na porção rostral da MCPdl

antes da exposição ao odor reduziu as respostas defensivas frente à ameaça e prejudicou a aquisição/consolidação. Entretanto, este bloqueio não causou as mesmas alterações quando as microinjeções foram aplicadas na porção caudal da MCPdl.

Aliado a isso, as porções rostral e caudal da MCPdl diferem sutilmente quanto às respostas autonômicas e comportamentais (Keay e Bandler, 2001). A estimulação por aminoácidos excitatórios na porção caudal produziu vasodilatação na musculatura esquelética, vasoconstrição nas vísceras e na vasculatura orofacial. Segundo os autores, os resultados desta estimulação lembrariam respostas explosivas de fuga, presentes em crises de pânico. Por outro lado, a estimulação da porção rostral produziu redução do fluxo sanguíneo na musculatura esquelética e visceral, porém, aumentou a vasodilatação orofacial. Nesta situação, as respostas comportamentais estariam relacionadas, por exemplo, à exposição a um predador (Keay e Bandler, 2001).

No presente estudo foi utilizado um protocolo experimental que privilegia a análise temporal de respostas incondicionadas durante a associação EI+EN e as consequências comportamentais sobre a aprendizagem do EC em uma etapa seguinte, 48 horas após. Desta forma foi possível avaliar características comportamentais em uma janela de tempo que incluiu tanto as respostas imediatamente pós-estimulação da MCPdl quanto as consequências desta estimulação em sessões subsequentes. Assim, após a microinjeção de NMDA na MCPdl, ocorreu resposta de fuga, seguida por congelamento e um predomínio do comportamento de agachar-cheirar. Após estimulações mais intensas, quando a fuga se estendeu por mais alguns segundos, este comportamento pode ser quantificado na caixa de condicionamento. Esta dinâmica temporal está alinhada com os comportamentos defensivos, redução da atividade locomotora e comportamentos de avaliação de risco observados durante a exposição ao predador (Blanchard e Blanchard, 1989), e ainda pode indicar uma consequente ativação de diferentes colunas da MCP a partir da MCPdl.

Efeitos da microinjeção de NMDA na MCPdl sobre as respostas defensivas incondicionadas e a formação de memória.

Os dados dos experimentos aqui relatados indicam que as respostas defensivas e aprendizagem foram evidenciadas com a microinjeção de agonista NMDA nas doses de 50 ou 100 pmol, com resultados mais consistentes na dose de 50 pmol. Em resultados

anteriores do nosso laboratório, somente a dose de 100 pmol produziu aprendizagem quando microinjetada na porção caudal da MCPdl (Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012). Esta diferença de resultados pode indicar que além das características já citadas, as porções rostral e caudal da MCPdl apresentam diferentes densidades de receptores NMDA (Albin, Makowiec *et al.*, 1990).

Quando a porção rostral da MCPdl recebe um estímulo de 200 pmol de NMDA, são observados comportamentos defensivos de grande magnitude com o aparecimento de respostas de fuga. Curiosamente, apesar de passarem por esta experiência de grande caráter aversivo, os animais não apresentaram comportamentos de esquiva na reapresentação do odor. Este mesmo perfil comportamental também foi observado quando as microinjeções atingiram a porção caudal da MCPdl (Kincheski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012), sugerindo que neste nível de ativação, as porções rostral e caudal apresentam um conjunto de respostas semelhante. Uma possível explicação para este prejuízo na aprendizagem seria o dano tecidual à MCPdl. De fato, doses altas de NMDA podem causar dano celular por excitotoxicidade. Contudo, protocolos elaborados para a lesão por NMDA utilizam doses de 80 nmol divididas em três microinjeções de 0,2 µl cada. Portanto, mesmo os protocolos que causam respostas defensivas intensas ainda conservam a funcionalidade da MCPdl (Leman, Dielenberg *et al.*, 2003).

Um prejuízo na aprendizagem de um treino forte foi também observado com choques elétricos nas patas de ratos (Fanselow, 1984; Fanselow e Lester, 1988). Nestes trabalhos, choques de intensidade baixa são diretamente relacionados às taxas de aprendizagem até atingirem uma assíntota em 1 mA. Porém, choques de 4 mA, apesar de evocarem respostas defensivas intensas, não produziram aprendizagem associativa da experiência (Fanselow, 1984).

Sendo assim, é possível sugerir que a MCPdl atua como integradora de informações polimodais primárias e instrutora de informações relacionadas a situações aversivas, colaborando nos processos de aprendizagem. Porém, ao atingir um nível de ativação elevado, esta instrução torna-se suficiente para desencadear respostas mais intensas, em detrimento de processos associativos. Como estes animais modificam o repertório comportamental logo após a estimulação da MCPdl, seria possível inferir que processos essenciais para a aprendizagem, como a atenção e a relevância emocional são afetados pela estimulação intensa. Desta forma, é possível que os mecanismos que regulam a neurotransmissão na MCPdl durante o

desencadeamento de respostas defensivas também possam regular os processos de aprendizagem subsequente.

Interações funcionais entre os receptores CB1 e TRPV1 presentes na MCPdl e os efeitos nas respostas defensivas incondicionadas e a aprendizagem

Dentre os moduladores da atividade neuronal destacam-se os receptores CB1 e TRPV1, colocalizados em neurônios da MCPdl (Cristino, De Petrocellis *et al.*, 2006; Casarotto, Terzian *et al.*, 2012). Em geral, agonistas de receptores CB1 reduzem respostas defensivas (em doses baixas), enquanto agonistas de receptores TRPV1 produzem respostas defensivas. Isto foi evidenciado com relação às respostas defensivas produzidas por aprendizado prévio (Uliana, Hott *et al.*, 2016), e também na apresentação de estímulos estressores, como a exposição ao predador (Lisboa, Camargo *et al.*, 2014; Aguiar, Almeida-Santos *et al.*, 2015). Os resultados aqui apresentados reforçam a literatura quanto ao papel de receptores CB1 e TRPV1 da MCPdl na expressão de respostas defensivas.

Neste ponto, a contribuição do presente trabalho se dá pela avaliação dos animais durante a retenção mnemônica desta experiência. A partir destas análises, foi obtida a confirmação de que o equilíbrio entre os receptores CB1 e TRPV1 na MCPdl durante o evento aversivo modula a formação de uma memória emocional. Além disso, uma visão da interação entre estes receptores ajudou a compreender parte da modulação sináptica presente nesta região encefálica.

Os presentes resultados indicam que o agonista inverso de receptores CB1 foi capaz de promover respostas defensivas e aprendizagem quando associado à dose subefetiva de NMDA (que não desencadeia *per se* respostas defensivas ou aprendizagem detectáveis neste teste). Estes resultados corroboram os obtidos em outro estudo, no qual ocorreu a diminuição da ambulação associada ao aumento de saltos (um componente defensivo de fuga) na associação entre AM251 e uma dose subefetiva de NMDA (Viana, Hott *et al.*, 2015). Isto indica que a estimulação por NMDA produz a ativação de receptores CB1, e que se este mecanismo inibitório for bloqueado, ocorre potencialização dos efeitos de NMDA, possivelmente por uma maior liberação de glutamato.

Dentre os endocanabinoides (eCB) estudados na MCPdl, a anandamida (AEA) apresenta papel fundamental, principalmente pela afinidade dual entre receptores CB1 e TRPV1 (Moreira, Aguiar, Terzian *et al.*, 2012). A administração de AEA na MCPdl reduziu as respostas

defensivas, mas com doses maiores, ocorreu perda dos efeitos (Moreira, Aguiar *et al.*, 2007). Em níveis elevados, a AEA pode ativar receptores TRPV1. Esta ativação em TRPV1 pode ser contornada com a administração de um agonista sintético com maior seletividade para receptores CB1, o ACEA (Moreira, Aguiar *et al.*, 2007; Viana, Hott *et al.*, 2015), pela inibição do transporte ou ainda da degradação de AEA (Moreira, Aguiar *et al.*, 2007; Lisboa, Resstel *et al.*, 2008; Resstel, Lisboa *et al.*, 2008). Recentemente, a utilização de AA-5-HT, um inibidor da degradação de AEA e bloqueador de canais TRPV1 (Vilela, Medeiros *et al.*, 2014), produziu, em tese, um efeito da AEA somente em receptores CB1. Porém, a AEA não é a única representante dos eCB na MCPdl. A microinjeção de 2-AG ou a inibição da degradação deste eCB também revelou um perfil comportamental similar, sem os possíveis efeitos via ativação de receptores TRPV1 (Viana, Hott *et al.*, 2015). A estimulação química da MCPdl desencadeou a liberação de AEA e 2-AG, que exercem sua atividade em receptores CB1, TRPV1 e outros como CB2. Portanto, não foi descartada a possibilidade do envolvimento de outros eCB como derivados etanolamídicos (Pertwee, 2010) e outros receptores menos estudados, que podem contribuir para os efeitos comportamentais aqui observados.

A ativação de receptores TRPV1 aumenta o potencial de membrana em neurônios glutamatérgicos da MCPdl (Kawahara, Drew *et al.*, 2010). Em adição, os dados aqui apresentados permitem afirmar que a estimulação de receptores TRPV1 na MCPdl foi capaz de produzir congelamento e aprendizagem, configurando-se como uma estimulação aversiva. Além disso, doses baixas do agonista de receptores TRPV1 foram capazes de promover a associação EI+EC quando associadas ao NMDA em doses subefetivas, em paralelo ao que havia sido observado com o agonista inverso de receptores CB1.

No entanto, o tratamento de CAP 0,1 nmol ou CAP 1 nmol associado ao NMDA 25 pmol, apesar de permitir a formação de uma memória aversiva, não produziu um aumento nas respostas defensivas durante o condicionamento. Isto indica que a associação EI+EC pode ocorrer mesmo sem a expressão de respostas comportamentais detectáveis durante o pareamento de estímulos. Também indica que a dinâmica de receptores TRPV1 e CB1 apresenta grande importância sobre a aprendizagem. Portanto, os receptores TRPV1 da MCPdl podem atuar como efetores de respostas defensivas e aprendizagem, ao menos nas condições experimentais aqui apresentadas, com a dose alta. Porém, doses relativamente baixas revelam uma maior influência sobre a aprendizagem. Provavelmente este seja o reflexo funcional da

localização destes receptores, tanto na pós-sinapse quanto na pré-sinapse.

Além disso, como o bloqueio de receptores NMDA não interferiu nos efeitos de CAP, pode-se sugerir que os efeitos da CAP se devem pela ativação de receptores TRPV1, e não pela ativação direta de receptores NMDA. No entanto, os receptores NMDA possivelmente participam nestes efeitos por uma via indireta, na qual a CAP promova maior liberação de glutamato na pré-sinapse (Kawahara, Drew *et al.*, 2010). O glutamato liberado então competiria com o antagonista AP5 nos sítios glutamatérgicos. Portanto, os resultados comportamentais aconteceriam como resultante desta combinação, na qual os receptores TRPV1 se apresentam como principal componente.

No labirinto em cruz elevado (LCE), a microinjeção de 1 nmol de CAP na MCPdl de ratos provocou um aumento no número de entradas nos braços abertos, o que foi interpretado como um efeito ansiolítico (Terzian, Aguiar *et al.*, 2009). Em contraste, o mesmo tratamento em camundongos provocou uma redução no número de entradas e no tempo despendido nos braços abertos, o que foi interpretado como um efeito ansiogênico (Mascarenhas, Gomes *et al.*, 2013). Os resultados inesperados do primeiro trabalho foram atribuídos a uma possível dessensibilização de receptores TRPV1. No entanto, este fenômeno ocorre pela readaptação de receptores após estimulação intensa e, ao menos na MCPdl, depende de um processo que dura horas (Mcgaraughty, Chu *et al.*, 2003). Em um terceiro trabalho, a dessensibilização de receptores TRPV1 na MCPd foi atingida com uma dose de 10 nmol em um volume de 0,4 μ l (Mcgaraughty, Chu *et al.*, 2003), portanto, o dobro do volume aplicado no presente trabalho, e com uma quantidade dez vezes maior de agonista que o trabalho de Terzian (Terzian, Aguiar *et al.*, 2009). Além disso, a dessensibilização foi descrita como um período de analgesia após um estágio inicial de hiperalgisia, que durou mais de duas horas (Mcgaraughty, Chu *et al.*, 2003). Portanto, com base na literatura, caso a dessensibilização esteja presente na estimulação pela maior dose de CAP, ela ocorre em torno de 1 hora e 40 minutos além do final da sessão de condicionamento.

Este último estudo levantou a possibilidade de que o efeito aversivo da maior dose de CAP possa ser provocado pela ativação de vias descendentes de nocicepção. Porém, no teste de sensibilidade ao calor plantar, a microinjeção de CAP (6 nmol) na MCPdl provoca o efeito contrário, ou seja, antinocicepção. Curiosamente, esta antinocicepção foi revertida por antagonistas de receptores TRPV1, NMDA, GluM_{1/5} e pela inibição da liberação de glutamato. Isto sugere

que a CAP atua por um mecanismo de ativação de receptores TRPV1, aumento na liberação de glutamato e consequente ativação de receptores glutamatérgicos, que promovem a liberação de endocanabinoides (Palazzo, De Novellis *et al.*, 2002). Aliado a isso, a microinjeção de NMDA na MCPdl também produz efeito antinociceptivo (Miguel e Nunes-De-Souza, 2006), revelando mecanismos comuns entre os receptores TRPV1 e NMDA na MCPdl.

A potencialização das respostas defensivas e aprendizagem causada pelo agonista inverso de receptores CB1 pode também ser explicada pela prevalência da atividade dos receptores TRPV1. Então, o efeito comportamental seria decorrente da inibição da atividade intrínseca de CB1, que ressalta a atividade de TRPV1. De fato, doses altas de agonistas inversos de receptores CB1 podem produzir respostas defensivas (Rodgers, Evans *et al.*, 2005; Gobira, Aguiar *et al.*, 2013).

A dose de 200 pmol de AM251 utilizada no experimento 2 não foi suficiente para desencadear respostas comportamentais. Porém, supõe-se que o efeito observado com a maior dose de CAP poderia ser atingido também por uma dose alta de AM251, uma vez que o agonista inverso de receptores CB1 produz resultados semelhantes aos do agonista de receptores TRPV1 (Fawley, Hofmann *et al.*, 2014; Uliana, Hott *et al.*, 2016).

Apesar dos resultados deste e de outros estudos fundamentarem-se na ideia de que os efeitos observados na MCPdl são decorrentes da ativação/bloqueio de receptores CB1 na pré-sinapse glutamatérgica, estes receptores podem estar localizados também em neurônios GABAérgicos, outros neurotransmissores e neuromoduladores, além da na glia, ou até nas membranas mitocondriais (Oliveira Da Cruz, Robin *et al.*, 2016) e figura 34. Portanto, embora o efeito dos tratamentos indique uma predominância da função e da localização de receptores CB1 na pré-sinapse glutamatérgica, estas outras localizações podem contribuir para os resultados comportamentais.

Dados experimentais aqui mostrados indicam que a interferência conjunta em receptores CB1 e TRPV1 foi capaz de produzir respostas defensivas, mesmo sem a microinjeção de NMDA. Deste modo, os receptores CB1 e TRPV1, além de possuírem função modulatória na MCPdl, têm potencial para gerar um componente aversivo independente da ativação exógena de NMDA. A reexposição ao EC revelou que este tratamento foi suficiente para produzir aprendizagem da situação aversiva. Uma abordagem farmacológica como esta trouxe a vantagem de interferir ao mesmo tempo em dois

receptores que competem pelo ligante AEA, mimetizando um estado de grande liberação de eCB independente da ativação exógena de receptores NMDA. De fato, estes resultados estão de acordo com o observado na liberação de eCB em concentrações elevadas, geralmente produzidos logo após intensa atividade sináptica (Wotjak, 2005; Moreira e Wotjak, 2009).

O condicionamento aversivo olfatório foi produzido pelas intervenções nos receptores CB1 e TRPV1. Com base nos dados do presente estudo, a dose de NMDA 200 pmol produziu intensas respostas defensivas, mas um prejuízo na aprendizagem. Com estes resultados, coube investigar se os efeitos observados por uma modulação nos três receptores (CB1, TRPV1 e a dose de NMDA 25 pmol) poderia produzir resultados similares à dose de NMDA 200 pmol. Desta forma, a apresentação de respostas defensivas intensas foi acompanhada por um prejuízo na aprendizagem, similar ao observado com a maior dose de NMDA. Supõe-se, portanto, que a dinâmica dos receptores CB1 e TRPV1 possa influenciar a mudança de um estado no qual as respostas defensivas possam prever a aprendizagem para um estado em que as respostas defensivas se tornam tão intensas a ponto de prejudicar a associação com o estímulo olfatório.

Estes resultados contribuem para a compreensão dos fenômenos modulatórios na MCPdl e sugerem um ajuste complexo entre pelo menos três receptores. Somado a isso, essa modulação pode interferir sobre o processo de aprendizagem através do controle do grau de atividade local.

A MCPdl tem sido considerada pela maioria dos pesquisadores como executora de respostas explosivas de fuga. Isto se deve ao fato de que as estimulações utilizadas experimentalmente (Bittencourt, Carobrez *et al.*, 2004; Gobira, Almeida-Santos *et al.*, 2016) estão além do que foi aqui considerado como estimulação intensa. Por exemplo, a probabilidade de que 50% dos animais apresentem imobilidade ou exoftalmia ocorre com doses na ordem de 1 nmol, ou seja, 1000 pmol de NMDA (Bittencourt, Carobrez *et al.*, 2004). Nesta dose são observadas respostas de fuga, como galopes e saltos. Respostas deste tipo são tratadas inclusive como um modelo de ataques de pânico (Gobira, Almeida-Santos *et al.*, 2016).

Por outro lado, doses baixas de NMDA como 6 pmol promovem alterações na regulação da temperatura e frequência cardíaca de ratos (De Menezes, Zaretsky *et al.*, 2009; De Abreu, Abreu *et al.*, 2015). Então, a ativação da MCPdl pode ocorrer em faixas de dose menores, sem o desencadeamento de respostas comportamentais.

Portanto, os processos de aprendizagem desencadeados por pistas aversivas ocorrem em uma faixa de atividade relativamente baixa em comparação com a atividade durante as respostas defensivas intensas.

Com relação à modulação da atividade da MCPdl nas respostas defensivas e aprendizagem, os presentes dados ampliam a discussão de resultados anteriores do laboratório. Em um deles, a estimulação da MCPdl se deu pela administração de bicuculina, um antagonista de receptores GABAérgicos (Zanella, 2015). Esta desinibição da MCPdl gerou respostas extremas compostas por corrida, saltos e vocalizações através da perda do controle inibitório sobre a liberação de diversos transmissores, inclusive do glutamato. No entanto, os animais não demonstraram esquiva frente ao odor 48 horas após a experiência aversiva. Atualmente, estes resultados podem ser interpretados como um predomínio de ativação de sistemas de defesa imediata, em detrimento de mecanismos de aprendizagem, semelhante ao ocorrido com a maior dose de NMDA ou pela modulação de receptores CB1, TRPV1 e NMDA.

Contribuição de glutamato endógeno e de receptores glutamatérgicos AMPA na modulação dos receptores CB1 e TRPV1 na MCPdl durante as respostas defensivas incondicionadas e a consequente formação de memória

Na tentativa de revelar os mecanismos pelos quais a modulação na MCPdl altera respostas defensivas e aprendizagem, os tratamentos que alteraram as respostas comportamentais foram submetidos ao bloqueio da liberação de glutamato, ou dos receptores AMPA/cainato. Estes experimentos foram desenhados com base na hipótese de que a liberação de glutamato sofre influência de receptores CB1 e TRPV1 (Kawahara, Drew *et al.*, 2010), e que os receptores glutamatérgicos AMPA/cainato seriam importantes para fenômenos de aprendizagem (Kessels e Malinow, 2009).

O riluzol é um medicamento aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento da esclerose lateral amiotrófica (Sarl, 2009), doença na qual ocorre perda das conexões neuromusculares por excitotoxicidade. Embora este medicamento tenha sido aprovado, ainda não foi determinado o mecanismo exato pelo qual ocorre a redução da atividade glutamatérgica. Isto decorre do fato de que o riluzol atua por um conjunto de mecanismos sinérgicos que garante maior seletividade para a redução da atividade glutamatérgica.

Existem ao menos seis mecanismos já descritos para este medicamento: 1- inibição da liberação de vesículas glutamatérgicas, 2- redução da mobilização de íons Ca^{+2} ; 3- bloqueio de canais de Na^+ dependentes de voltagem; 4- antagonismo incompetitivo (*uncompetitive*) de receptores NMDA, 5- aumento da atividade de transportadores de glutamato e 6- bloqueio da recaptação de GABA.

Mais detalhadamente, a liberação de glutamato foi quantificada por microdiálise do núcleo caudado de gatos, seguida de cromatografia líquida de alto desempenho. Neste modelo *in vivo*, o riluzol reduziu a liberação de glutamato espontânea e evocada (Chéramy, 1992). Este efeito depende da ativação de proteína G inibitória, pois a utilização da toxina pertussis (que se liga covalentemente à subunidade α_i da proteína G) impediu os efeitos de riluzol (Doble, Hubert *et al.*, 1992).

A inibição de canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem parece compartilhar do mesmo mecanismo, pois a toxina pertussis também bloqueou este efeito (Hubert, Delumeau *et al.*, 1994). Além disso, o riluzol parece produzir efeitos através da interferência direta em canais de Na^+ pela interação com a subunidade α , aumentando o intervalo de tempo em que permanecem inativos. Esta ação apresenta-se mais pronunciada em neurônios que disparam em alta frequência, como neurônios encefálicos, do que em neurônios com perfil de disparo rítmico, como os cardíacos. Isto garante uma maior seletividade para os efeitos encefálicos e reduz os riscos de efeitos adversos como arritmias (Doble, 1996).

Os mecanismos restantes são menos prevalentes. Dentre eles está o antagonismo incompetitivo de receptores NMDA (Kretschmer, 1998). Aparentemente, esta interação ocorre por vias indiretas, uma vez que estudos com radioligantes não revelaram ligação entre riluzol e receptores NMDA, AMPA ou cainato (Debono, 1993). Portanto, este efeito parece ser mediado também por uma via dependente de proteína $\text{G}\alpha_i$ (Doble, 1996).

A redução da ação glutamatérgica pelo riluzol também pode ser explicada pelo aumento na atividade de transportadores de glutamato, que auxiliam na remoção deste neurotransmissor das fendas sinápticas. Isto foi demonstrado *in vitro* em diferentes linhagens de células gliais que expressam estes transportadores (Fumagalli, Funicello *et al.*, 2008). Em paralelo, o bloqueio da recaptação de GABA constitui um dos mecanismos sugeridos, embora o riluzol não seja capaz de aumentar o limiar para crises convulsivas produzidas por inibidores da síntese de GABA ou antagonistas GABAérgicos como a bicuculina e o pentilenotetrazol (Doble, 1996). Em contraste, apresenta eficácia sobre

crises convulsivas desencadeadas por mecanismos glutamatérgicos (Doble, 1996).

Portanto, não existe apenas um mecanismo de ação para o riluzol, e os efeitos observados resultam dos seis mecanismos descritos, bem como da interação entre estes mecanismos, predominantemente glutamatérgicos. Como efeito geral, ocorre a redução do tônus glutamatérgico.

Os efeitos comportamentais da administração sistêmica de riluzol incluem relaxamento muscular, ataxia e redução na coordenação de movimentos (Kretschmer, 1998). Efeitos adversos incluem tonturas, náuseas e dificuldade de respirar (Sarl, 2009). Em testes como o LCE, campo aberto (CA) ou caixa claro-escuro, esta droga promoveu redução das respostas defensivas, o que foi interpretado como efeito ansiolítico (Sugiyama, Saitoh *et al.*, 2012). No entanto, a administração intra MCPdl nas mesmas doses utilizadas no presente trabalho não promoveu quaisquer alterações, ao menos em relação à nocicepção (Palazzo, De Novellis *et al.*, 2002).

Os dados aqui apresentados indicam um aumento nas respostas defensivas após a administração de riluzol na MCPdl. Portanto, o riluzol microinjetado na MCPdl teve um efeito aversivo inesperado. Dentre os efeitos adversos da administração sistêmica de riluzol citados acima, estão incluídos náuseas e dificuldade de respirar. Portanto, um caráter aversivo do riluzol poderia ser explicado por estes efeitos. De fato, as porções laterais e dorsolaterais da MCP atuam no controle da atividade respiratória e cardíaca em gatos, regulando a frequência de ativação destes sistemas em situações com considerável relevância emocional (Bandler, Carrive *et al.*, 1991). Uma base teórica para tal explicação pode ser encontrada na existência de um circuito responsável pelo desencadeamento de respostas defensivas frente a episódios de dispneia (Klein, 1993), nos quais a porção dorsal da MCP participa (Schimitel, De Almeida *et al.*, 2012). Neste último estudo, a exposição de ratos a um ambiente rico em CO₂ (8%) reduziu o comportamento de autolimpeza (Schimitel, De Almeida *et al.*, 2012), o que também foi observado no presente estudo.

Comportamentalmente, a administração de NMDA em animais que foram submetidos ao riluzol aumentou as respostas defensivas e fez surgir respostas de fuga. Considerando que os efeitos imediatos do NMDA foram potencializados pela administração prévia de riluzol, seria possível inferir que ambos os tratamentos apresentam um caráter aversivo. Uma potencialização dos efeitos de NMDA por riluzol foi também observada com a redução da exploração vertical e aumento da

imobilidade em animais que receberam injeções sistêmicas no teste do campo aberto (Kretschmer, 1998). Os autores descreveram os resultados inesperados e propuseram uma interação indireta entre riluzol e os receptores NMDA.

Esta potencialização das respostas defensivas foi observada nos grupos que receberam riluzol mais NMDA (50 pmol ou NMDA 25 pmol associado ao AM251), mas não no grupo que recebeu CAP 10 nmol. Portanto, este fenômeno parece depender de mecanismos glutamatérgicos e sua interação com receptores NMDA. Ainda, revela possíveis diferenças no mecanismo pelo qual a CAP produz respostas comportamentais em comparação com os grupos que receberam a estimulação direta em receptores NMDA.

No experimento em que o riluzol foi administrado antes de AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol, o prejuízo na aprendizagem ficou evidente apenas com a maior dose de riluzol. Porém, a dose de 2 nmol foi suficiente para prejudicar a aprendizagem nos animais que receberam a estimulação por NMDA 50 pmol ou CAP 10 nmol. Esta diferença de efeitos pode revelar o peso do fator CB1/TRPV1 sobre a liberação de glutamato (Kawahara, Drew *et al.*, 2010). Uma possível dinâmica para este fenômeno está proposta nas figuras 32 e 33.

No grupo experimental tratado com riluzol, AM251 e NMDA na dose baixa, os receptores TRPV1 e CB1 (este último através da inibição do pulso inibitório) atuam a favor da liberação de glutamato, contra a ação de riluzol (figura 32). No caso da estimulação somente com NMDA 50 pmol, os receptores CB1 estão livres e, portanto, contribuem para a inibição da liberação de glutamato, facilitando a ação do riluzol (figura 33). Curiosamente, este efeito foi observado somente sobre a aprendizagem, e aumenta a importância da regulação CB1/TRPV1 sobre a liberação de glutamato neste processo.

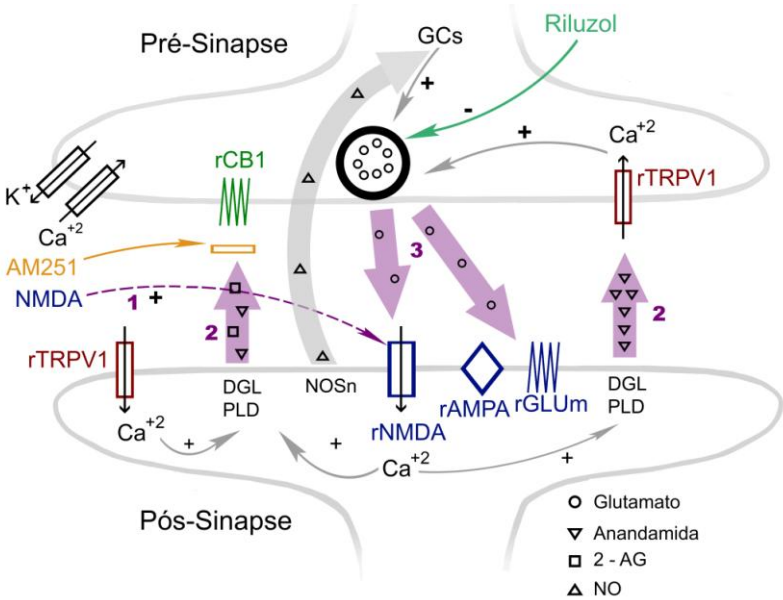


Figura 32: Dinâmica proposta para a matéria cinzenta periaquedual dorsolateral no grupo que recebeu riluzol 2 nmol + AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol. A liberação de vesículas glutamatergicas está em destaque, no centro da figura. 1) o agonista NMDA ativa os receptores NMDA (rNMDA) que aumentam o fluxo de íons Ca⁺² e desencadeiam a 2) produção de endocanabinoides, que encontram os receptores CB1 (rCB1) ocupados pelo agonista inverso AM251. Portanto, o tônus inibitório sobre a liberação de glutamato é retirado, e a dose de 2 nmol de riluzol não é suficiente para contrabalançar a atividade dos receptores TRPV1 (rTRPV1) e do óxido nítrico pela ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs). Sendo assim, ocorre 3) a liberação de glutamato suficiente para ativar receptores AMPA (rAMPA) e metabotrópicos (rGlum) resultando em aprendizagem. Ou seja, a retirada do tônus inibitório de rCB1, somada à maior ativação de rTRPV1 suplanta a inibição da liberação de glutamato, mesmo com o estímulo subefetivo em rNMDA. Quando a dose de riluzol foi utilizada, a resultante tendeu à inibição da liberação de glutamato (3) e prejuízo da aprendizagem. DGL = diacilglicerol lipase, PLD = fosfolipase D, NOSn = NO sintase neuronal.

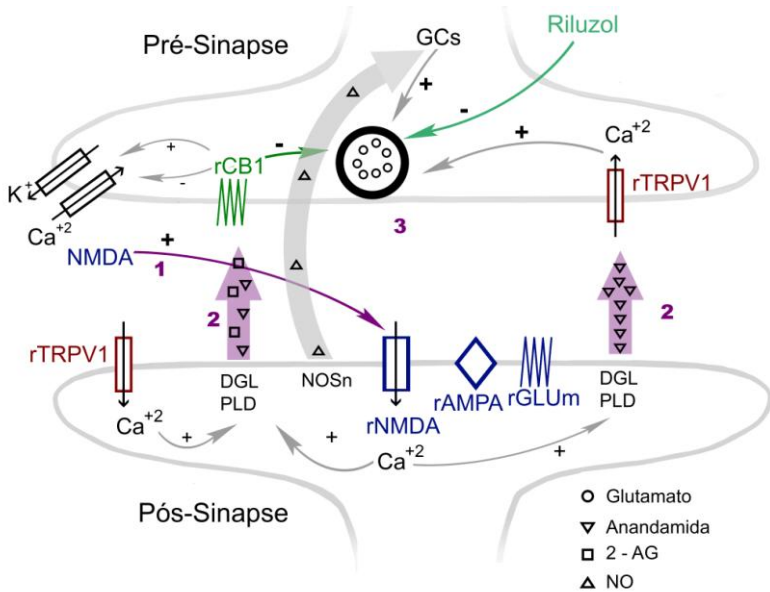


Figura 33: Dinâmica proposta na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral para o grupo que recebeu riluzol + NMDA 50 pmol. A liberação de vesículas glutamatérgicas está em destaque, no centro da figura. 1) o agonista NMDA ativa os receptores NMDA (rNMDA) que aumentam o fluxo de íons Ca^{+2} a níveis que promoveriam respostas defensivas e aprendizagem. Em comparação à figura anterior, há uma 2) maior liberação de endocanabinoides que encontram os receptores CB1 (rCB1) livres. Portanto, o tônus inibitório sobre a liberação de glutamato é mantido, contribuindo para os efeitos de riluzol, apesar da ativação dos receptores TRPV1 (rTRPV1) e do óxido nítrico (NO) pela ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs). Nesta situação, ocorre 3) a inibição da liberação de glutamato, menor ativação em receptores AMPA (rAMPA) e metabotrópicos (rGLUm), impossibilitando a aprendizagem. Ou seja, a ativação de rCB1 potencializa os efeitos inibitórios de riluzol, mesmo com uma estimulação efetiva de rNMDA. DGL = diacilglicerol lipase, PLD = fosfolipase D, NOSn = NO sintase neuronal.

O bloqueio de receptores AMPA/cainato com CNQX na MCPdl produz aumento da exploração nos braços abertos durante a exposição ao LCE, caracterizando uma redução das respostas defensivas (Matheus e Guimarães, 1997). Isto ressalta o papel de receptores AMPA/cainato na expressão comportamental frente a uma possível ameaça. Em relação ao CNQX, outro bloqueador de receptores AMPA, DNQX, apresenta algumas vantagens. O primeiro bloqueia também o sítio da glicina em

receptores NMDA (Honore, Davies *et al.*, 1988; Watkins, Korgsgaard-Larsen *et al.*, 1990). Além disso, o CNQX possui maior afinidade pelo sítio ligante na subunidade GluN2 de NMDA (CNQX IC_{50} 25 μ M, DNQX IC_{50} 40 μ M) (Honore, Davies *et al.*, 1988). Portanto, o DNQX possui maior seletividade para os receptores AMPA do que seu equivalente e mais utilizado, CNQX.

O DNQX tem maior afinidade pelos receptores AMPA do que cainato, pois possui IC_{50} 0,5 μ M para AMPA e IC_{50} 2,0 μ M para cainato (Watkins, Korgsgaard-Larsen *et al.*, 1990). Este bloqueador liga-se na subunidade GluA2 (Armstrong e Gouaux, 2000) e, portanto, atua sobre os receptores AMPA impermeáveis ao Ca^{+2} . Quando microinjetado na MCPdl antes de AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol, assim como antes de NMDA 50 pmol, o DNQX produziu uma potencialização das respostas defensivas, similar ao já observado no pré-tratamento com o inibidor da liberação de glutamato, riluzol.

Com o bloqueio de receptores AMPA, pode ter ocorrido uma maior ativação de receptores NMDA, causada pelo glutamato endógeno somado ao agonista exógeno. Esta é uma das possíveis explicações para a potencialização das respostas defensivas e o aparecimento de respostas de fuga. Contudo, ao contrário do riluzol, a microinjeção de somente DNQX não provocou alterações comportamentais dos parâmetros analisados, portanto, não aumentou o caráter aversivo da experiência *per se*.

Além disso, o tratamento com DNQX prejudicou a aprendizagem em todos os grupos experimentais, inclusive no grupo que recebeu CAP 10 nmol, sem alterar as respostas defensivas neste último. Isto sugere que os receptores CI-AMPA são imprescindíveis para a aprendizagem resultante da estimulação da MCPdl. Sugere também que este prejuízo na aprendizagem por DNQX pode ocorrer independentemente de alterações comportamentais no dia do condicionamento.

De acordo com os fenômenos de plasticidade sináptica e tráfego comentados acima, surgem algumas explicações mecânicas para os resultados encontrados. A primeira consiste em um prejuízo no desencadeamento do tráfego de CP-AMPA, uma vez que este processo depende de uma ativação inicial de CI-AMPA e NMDA (Henley e Wilkinson, 2016). Embora o DNQX atue apenas sobre CI-AMPA e os receptores mais importantes na sinalização durante a aprendizagem sejam os CP-AMPA, a exocitose (ou endocitose, no caso de LTD) destes últimos é controlada pela atividade dos primeiros. Portanto, o

DNQX se ligaria aos receptores CI-AMPA, dificultando o processo de tráfego de receptores CP-AMPA.

Uma segunda explicação consiste em alterações relativas na disponibilidade de CP-AMPA/CI-AMPA. Na LTD os receptores CP-AMPA são endocitados e parcialmente substituídos por CI-AMPA, com o resultado final de uma redução na excitabilidade da sinapse (Henley e Wilkinson, 2016). Porém, relativamente, isto colocaria mais CI-AMPA disponíveis em sinapses que passaram por LTD do que as que sofreram LTP, e o DNQX, por sua seletividade por CI-AMPA, atuaria mais fortemente sobre sinapses que passassem por LTD. Este desequilíbrio tanto em LTD quanto LTP poderia prejudicar a aprendizagem.

No entanto, a primeira explicação parece ser mais lógica, uma vez que o DNQX foi microinjetado cinco minutos antes da estimulação por NMDA ou pela modulação em CB1. O estímulo que causaria aprendizagem, portanto, encontra os receptores CI-AMPA da MCPdl já bloqueados, sugerindo um efeito na etapa inicial da plasticidade. Entretanto, o fenômeno de tráfego foi descrito e estudado em neurônios hipocámpais e corticais, então ainda se sabe pouco sobre esta dinâmica em estruturas como a MCPdl.

As microinjeções de 0,2 μ l na MCPdl atingem neurônios, astrócitos e glia que são imersos total ou parcialmente em agonistas, antagonistas e moduladores exógenos. Portanto, pensar apenas em plasticidade sináptica hebbiana pode apresentar limitações, apesar de que este modelo sirva bem para explicar os dados observados comportamentalmente. Por conta disso, os fenômenos de plasticidade intrínseca (Frick e Johnston, 2005) e de escalonamento sináptico (Turrigiano, 2012) têm se apresentado como explicações mais completas para o rearranjo funcional de neurônios no processo de aprendizagem.

A plasticidade intrínseca é determinada pela expressão de canais iônicos em todo o corpo celular, aumentando ou diminuindo o nível de responsividade do neurônio ao meio celular (Frick e Johnston, 2005). Especialmente, esta regulação tem uma proporção grande se comparada às alterações em algumas sinapses. Porém, os fármacos utilizados no presente trabalho têm seletividade para receptores que estão localizados em maior concentração nas sinapses.

A exceção a esta regra se dá pelo riluzol, que dentre os seus mecanismos pode atuar na inibição direta de canais de Na^+ . No entanto, os efeitos dos fármacos utilizados podem ocorrer indiretamente por alterações na funcionalidade de canais iônicos ao longo de todo um neurônio. Este é o caso do AM251, por exemplo, que também regula canais de Na^+ através de proteína $G_{\alpha i}$ (Mechoulam, Hanus et al., 2014).

Portanto, os esquemas de sinalização intra MCPdl na literatura, e inclusive do presente trabalho (figuras 32, 33, 34 e 35), representam de forma simplificada a resultante destes mecanismos sinápticos e extrasinápticos.

O escalonamento sináptico caracteriza-se por modificações plásticas na sinapse, produzindo maior eficiência sináptica, com um menor custo energético. Essas alterações proporcionam uma resposta mais rápida ou mais robusta frente a estímulos de mesma natureza (Turrigiano, 2012). Este mecanismo foi proposto a partir de uma aparente inconsistência do modelo hebbiano em relação, por exemplo, à LTP. Segundo o modelo de Hebb [reimpresso em (Morris, 1999)], o reforço de uma sinapse ocorre quando há o disparo sincronizado de dois neurônios. Isto é, conforme as sinapses são reforçadas, maior é a sincronia entre os disparos, e maior é o reforço, proporcionando um ciclo mecanístico interminável e cada vez mais distante do fisiológico. Seria necessário, portanto, um mecanismo de controle.

Assim, o escalonamento sináptico funciona com a ideia de que existem mecanismos de detecção dos níveis de Ca^{+2} intracelulares, que desencadeiam a endocitose de canais AMPA (no caso de uma estimulação intensa ou prolongada). Da mesma forma, este mecanismo de detecção regularia a exocitose de canais AMPA (inclusive os CP-AMPA) no caso da ausência ou dessincronização da estimulação basal (Turrigiano, 2012).

Ao considerar este fenômeno, o DNQX poderia interferir com estes mecanismos de regulação, sinalizando uma “ausência” de glutamato, que seria contrabalanceada com a exocitose de CP-AMPA, aumentando assim a entrada de Ca^{+2} em neurônios glutamatérgicos. Esta pode ser uma das explicações para a potencialização das respostas defensivas no dia do condicionamento, assim como para o prejuízo da aprendizagem. Porém, ainda não se sabe se este fenômeno seria rápido o suficiente para produzir os efeitos observados.

Os dados aqui apresentados sugerem que as respostas defensivas e aprendizagem ocorreram pela ativação de receptores NMDA (ou TRPV1, diretamente), dependeram da modulação da liberação de glutamato (por receptores CB1 e TRPV1) e então causaram ativação de receptores AMPA impermeáveis ao Ca^{+2} . Além disso, aparentemente, os receptores NMDA apresentaram maior influência sobre as respostas defensivas imediatas, enquanto os receptores AMPA influenciaram a aprendizagem.

Esta hipótese surgiu a partir dos resultados de NMDA associado ao riluzol ou ao DNQX. Nestes grupos houve um aumento quantitativo

e mudança qualitativa nas respostas defensivas. Nesta situação, o grau de ativação do receptor NMDA e outros receptores glutamatérgicos, incluindo AMPA/cainato, poderia ser considerado como NMDA > AMPA/cainato/Glum, pois o agonista exógeno NMDA estaria disponível aos receptores NMDA, e haveria uma inibição da liberação de glutamato. Isto sugere, portanto, uma predominância na ativação de receptores NMDA em relação aos outros receptores glutamatérgicos. Possivelmente, esta relação seja similar à obtida com o tratamento de NMDA 200 pmol.

Para os grupos que receberam TRPV1 precedido por riluzol ou DNQX não houve potencialização das respostas defensivas. Neste caso, a ativação dos receptores glutamatérgicos estaria próximo de NMDA = AMPA/cainato/Glum. Nesta situação, ocorre inibição da liberação de glutamato sem a estimulação exógena de NMDA. Isto sugere níveis baixos e semelhantes de ativação de receptores glutamatérgicos. Portanto, aparentemente, os receptores NMDA podem estar diretamente relacionados com respostas defensivas imediatas, em relação aos receptores AMPA.

Por outro lado, o bloqueio de receptores AMPA prejudicou a aprendizagem em todos os tratamentos, independentemente das alterações sobre as respostas defensivas. Esta possível segregação de importância entre os receptores NMDA e AMPA respectivamente nas respostas comportamentais e processos de aprendizagem pode ser apenas teórica. Porém, traz à tona a relevância da dinâmica glutamatérgica na MCPdl e as consequências sobre estes processos. A utilização de drogas mais seletivas como o DNQX contribuiu para esta discussão.

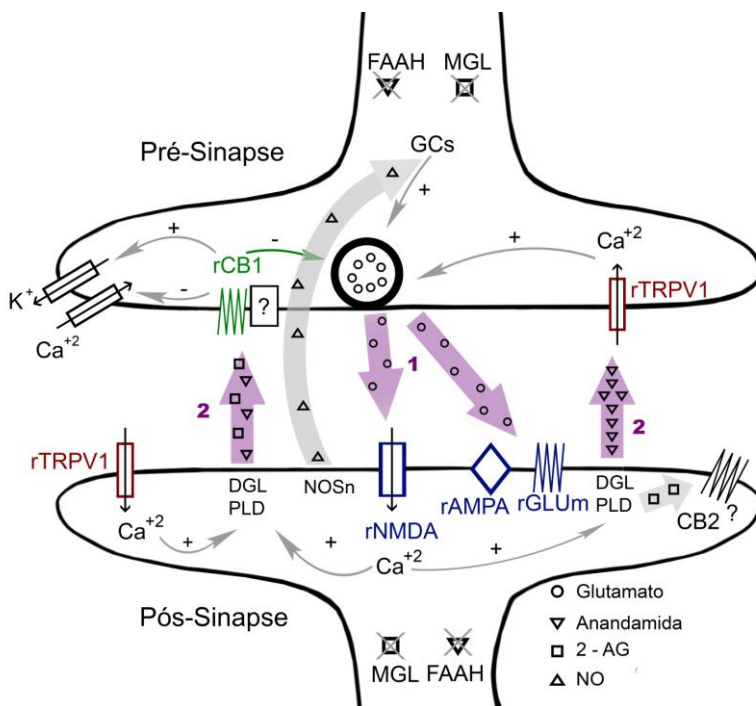


Figura 34: Dinâmica proposta para a modulação da atividade na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral em uma sinapse glutamatérgica. Controle da liberação de glutamato como peça central. 1) a liberação de glutamato basal ou decorrente de um estímulo aversivo ativa receptores NMDA (rNMDA), AMPA (rAMPA) e metabotrópicos (rGlum), que desencadeiam a 2) produção de endocanabinoides, que atuam sobre receptores CB1 (rCB1) e TRPV1 (rTRPV1). Por fim, esta sinalização retrógrada regula a liberação de glutamato. Esta dinâmica influencia a expressão de respostas defensivas incondicionadas, assim como modificações duradouras relacionadas com fenômenos de aprendizagem. No entanto, alguns pontos ainda permanecem desconhecidos, como a possibilidade de heteromerização de receptores CB1 com receptores opioides, serotoninérgicos e outros, ou a participação de receptores CB2 (sinalizados por ?). GCs = guanilato ciclase solúvel, ativada por óxido nítrico (NO), DGL = diacilglicerol lipase, PLD = fosfolipase D, NOSn = NO sintase neuronal, MGL = monoacilglicerol lipase, FAAH = hidrolase de ácidos graxos (Carvalho-Netto, Gomes *et al*, 2005; Pelosi e Corrêa, 2005; Wotjak, 2005; Moreis e Wotjak, 2009; Kawahara, Drew *et al*, 2010; Pertwee, 2010; Soares, Campos *et al*, 2010; Castillo, Younts *et al*, 2012; Fogaça, Lisboa *et al*, 2012; Aguiar, Moreira *et al*, 2014; Mechoulam, Hanus *et al*, 2014; Batista, Fogaça *et al*, 2015; Campos, Fogaça *et al*, 2016).

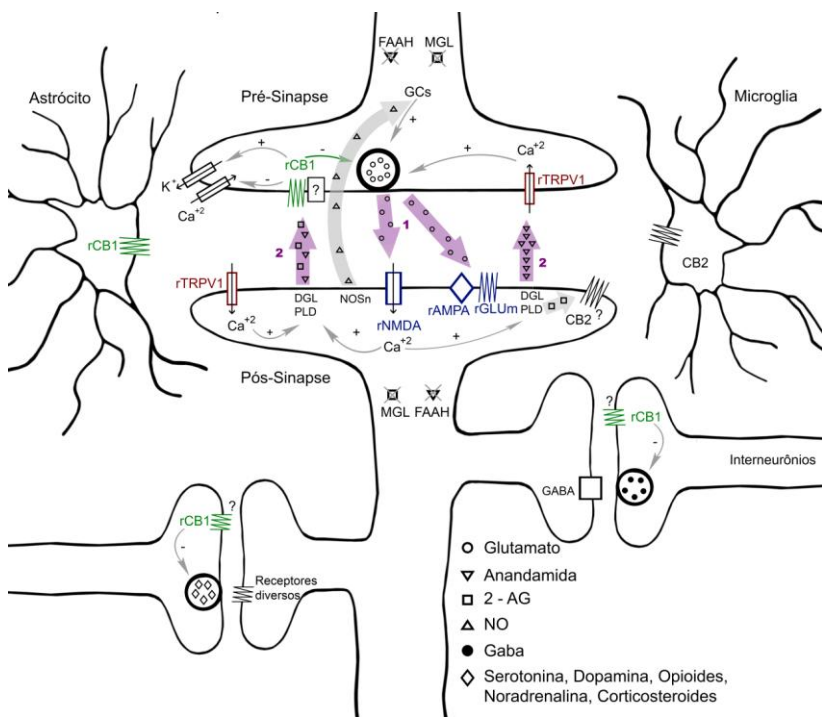


Figura 35: Dinâmica multisináptica na atividade da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral. Além dos mecanismos já citados, ocorrem outros pontos de modulação. Os receptores CB1 (rCB1) podem controlar a liberação de outros neurotransmissores além de glutamato. Além disso, estão presentes em astrócitos e microglia, interferindo sobre a recaptação de glutamato e outros neurotransmissores na fenda sináptica. Todos estes processos, e outros ainda nem sequer sugeridos, contribuem para a expressão dos comportamentos analisados. Novamente, como peça central estão os rCB1 e rTRPV1 no controle da liberação de glutamato e consequente ativação de receptores glutamatérgicos, dentre eles, os rAMPA. GCs = guanilato ciclase solúvel, ativada por óxido nítrico (NO), DGL = diacilglicerol lipase, PLD = fosfolipase D, rGLUm = receptores glutamatérgicos metabotrópicos, NOSn = NO sintase neuronal, MGL = monoacilglicerol lipase, FAAH = hidrolase de ácidos graxos (Carvalho-Netto, Gomes *et al*, 2005; Pelosi e Corrêa, 2005; Wotjak, 2005; Moreira e Wotjak, 2009; Kawahara, Drew *et al*, 2010; Pertwee, 2010; Soares, Campos *et al*, 2010; Castillo, Younts *et al*, 2012; Fogaça, Lisboa *et al*, 2012; Aguiar, Moreira *et al*, 2014; Mechoulam, Hanus *et al*, 2014; Batista, Fogaça *et al*, 2015; Campos, Fogaça *et al*, 2016).

Alterações na atividade da MCPdl e repercussões para estruturas anatômicas funcionalmente conectadas

O presente trabalho teve como foco a modulação intra MCPdl na promoção de uma instrução aversiva e as consequências sobre a aprendizagem. No entanto, modificações na atividade da MCPdl repercutem em outras estruturas do sistema nervoso central. As conexões da MCPdl relacionadas às respostas imediatas de fuga são intensamente estudadas em modelos animais de pânico ou de nocicepção. Em contrapartida, as aferências ascendentes e suas relações com a aprendizagem receberam menor atenção até o momento.

Como as intervenções farmacológicas na MCPdl foram capazes de produzir aprendizagem, cabe investigar as possíveis vias ascendentes desta instrução. A estimulação elétrica da MCPd gera LTP na amígdala (Kim, Horovitz *et al.*, 2013; Horovitz e Richter-Levin, 2015) e núcleo accumbens (Horovitz e Richter-Levin, 2015). Porém, esta modificação funcional só foi encontrada quando houve também uma estimulação no subículo ventral (porção do hipocampo), indicando que esta comunicação MCPd-amígdala ou MCPd-núcleo accumbens é indireta. Aliado a isso, a MCPdl conecta-se a diversos subnúcleos talâmicos e hipotalâmicos, que desta forma alimentam o hipocampo, a amígdala e o córtex com a instrução aversiva (Canteras, Pavesi *et al.*, 2015).

A estimulação de um dos núcleos hipotalâmicos, o pré-mamilar dorsal (PMd), gerou aprendizagem no teste de condicionamento aversivo olfatório (Pavesi, Canteras *et al.*, 2011). Portanto, estes resultados indicaram que o PMd também foi capaz de produzir uma instrução aversiva. Nesse trabalho, o bloqueio de receptores NMDA na MCPdl anulou o efeito sobre a aprendizagem. Isto indica que a instrução vinda do PMd depende da ativação de receptores NMDA na MCPdl (Pavesi, Canteras *et al.*, 2011). Curiosamente, o bloqueio prévio de receptores beta-adrenérgicos no PMd impede o condicionamento pela microinjeção de NMDA na MCPdl (Kinchski, Mota-Ortiz *et al.*, 2012). Estes resultados sugerem que estas duas estruturas atuam em conjunto na promoção do condicionamento aversivo olfatório.

O PMd, junto com o AHN (núcleo anterior do hipotálamo) e o VMHdm (núcleo hipotalâmico ventromedial, porção dorsomedial) compõem um conjunto de estruturas denominado de circuito hipotalâmico de resposta ao predador (Cezario, Ribeiro-Barbosa *et al.*, 2008; Canteras, Pavesi *et al.*, 2015). Evidência para esta afirmação foi

encontrada pela ativação destes subnúcleos hipotalâmicos em ratos expostos ao predador (Cezario, Ribeiro-Barbosa *et al.*, 2008).

O circuito hipotalâmico de resposta ao predador possui conexões com algumas estruturas talâmicas envolvidas com aprendizagem, como o AMv (núcleo anterior do tálamo, porção ventral) e RE (núcleo reuniens), sendo que estes dois possuem projeções diretas para o hipocampo (Canteras, Pavesi *et al.*, 2015). A inativação farmacológica do AMv não interferiu nas respostas defensivas frente ao predador, mas prejudicou a aprendizagem contextual desta experiência aversiva (De Lima, Baldo *et al.*, 2016). Por outro lado, a estimulação com NMDA no hipocampo não foi capaz de produzir, *per se*, um condicionamento aversivo olfatório. A aprendizagem neste teste foi evidenciada somente quando os animais receberam previamente um choque de baixa intensidade nas patas (Kroon, 2012). Portanto, estruturas como a MCPdl e o PMd provocam respostas defensivas incondicionadas e podem promover a aprendizagem, enquanto estruturas talâmicas como o AMv são responsáveis pelo processamento e transferência desta instrução para o hipocampo.

No presente trabalho, a estimulação por NMDA no colículo superior não gerou respostas defensivas ou aprendizagem. Algumas respostas defensivas podem ser evocadas pela estimulação de receptores NMDA no colículo superior, mas em doses mais altas que as usadas na MCPdl (Bittencourt, Nakamura-Palacios *et al.*, 2005). Isto pode indicar que o colículo superior possui conexões com algumas estruturas relacionadas às respostas defensivas, mas também que a densidade de receptores NMDA é menor, se comparada à da MCPdl (Albin, Makowiec *et al.*, 1990).

Os animais que receberam CAP no colículo superior apresentaram uma tendência de aumento nas respostas defensivas, que não produziu associação entre EI e EN. Estes dados sugerem que o colículo superior estaria relacionado com a emissão de respostas defensivas, mas não com a aprendizagem. Ainda, que os receptores TRPV1 possam apresentar uma distribuição equivalente entre a MCPdl e o colículo superior. Esta hipótese ainda não foi confirmada, pois a avaliação de receptores TRPV1 em encéfalos de ratos não diferenciou a MCPdl do colículo superior (Tóth, Boczán *et al.*, 2005).

Com base nas conexões da MCPdl, seria possível sugerir que um EI provocou a ativação de estruturas relacionadas à expressão imediata de respostas defensivas, como núcleos hipotalâmicos de resposta ao predador. O EI também desencadeou a ativação de estruturas relacionadas à associação entre EI e EC, como tálamo, hipocampo e

amígdala, proporcionando a aprendizagem da experiência (Gross e Canteras, 2012; Canteras, Pavesi *et al.*, 2015). No entanto, a ativação intensa da MCPdl foi capaz de gerar um incremento nas respostas defensivas, refletindo em um prejuízo na associação EI+EN. Sugere-se, portanto, que um EI de maior intensidade pode alterar as relações entre a MCPdl e estruturas anatômicas conectadas, favorecendo a emissão de respostas defensivas em detrimento de processos de aprendizagem.

Considerações finais

O presente trabalho contribui para uma discussão sobre o desencadeamento do processo de aprendizagem a partir da estimulação da MCPdl. Os resultados indicam que existe um nível de ativação condizente com a associação EI+EC. Como reguladores-chave deste processo foram indicados os receptores CB1 e TRPV1. Estes receptores regulam a liberação de glutamato e a consequente ativação de receptores AMPA. Um equilíbrio da ativação entre receptores NMDA e AMPA foi proposto como importante nos processos de tráfego de receptores AMPA, fenômenos de escalonamento sináptico, plasticidade intrínseca e LTD/LTP. Estes fenômenos de plasticidade são funcionalmente relacionados à aprendizagem, possivelmente intra MCPdl, mas também em estruturas do sistema hipotalâmico de defesa e estruturas como córtex, hipocampo e amígdala.

8. Conclusões

Com base nos presentes resultados e na literatura disponível, foi possível formular algumas conclusões, a saber: 1) a atividade na MCPdl gera uma informação de caráter aversivo, capaz de instruir outras estruturas encefálicas; 2) esta instrução gera uma memória emocional com valência negativa, relacionada à experiência; 3) durante a aquisição dessa experiência, a expressão de respostas defensivas imediatas depende de um equilíbrio da ativação da MCPdl no qual se fazem importantes os receptores NMDA, CB1 e TRPV1.

O processo de aprendizagem subsequente depende da sinalização glutamatérgica regulada por receptores CB1 e TRPV1, que acarreta na ativação de receptores AMPA/cainato. Portanto, a regulação da liberação de glutamato se apresentou como peça central nas respostas defensivas e aprendizagem, com maior influência sobre esta última.

Também foram encontradas evidências que dão suporte a uma desvinculação entre respostas defensivas e aprendizagem. Ao menos, esta relação não é linear e estes fenômenos podem ocorrer de forma independente. Considerando isso, a ativação da MCPdl pode ser deslocada para um nível no qual ocorrem respostas defensivas intensas e prejuízo na aprendizagem. Ainda, do ponto de vista farmacológico, a estimulação química de receptores NMDA na MCPdl influencia diretamente a expressão de respostas defensivas imediatas. Enquanto isso, a aprendizagem sofre maior influência dos receptores AMPA/cainato localizados na MCPdl.

Os estudos pioneiros de Goltz, Cannon e Hess (Goltz, 1892; Cannon, Britton *et al.*, 1927; Hess, 1928) levantaram a hipótese de que regiões corticais atuam em um controle inibitório sobre estruturas caudais evolutivamente mais conservadas. No presente estudo, procurou-se ampliar esta hipótese para um ajuste fino, local e imediato, com consequências sobre a expressão de respostas incondicionadas e também modificações comportamentais duradouras, configurando aprendizagem. Neste âmbito, os dados são compatíveis com a hipótese inicial de que “os receptores CB1 e TRPV1 na MCPdl modulam a expressão de respostas defensivas e a consequente aprendizagem através do controle da atividade glutamatérgica nesta estrutura”. Além disso, foi ressaltado um papel fundamental dos receptores AMPA/cainato na MCPdl no desencadeamento da aprendizagem.

9. Referências

Adamec, R. Does long term potentiation in periaqueductal gray (PAG) mediate lasting changes in rodent anxiety-like behavior (ALB) produced by predator stress? Effects of low frequency stimulation (LFS) of PAG on place preference and changes in ALB produced by predator stress. Behavioural Brain Research, v.120, n.2, p.111-135. 2001.

Aguiar, D. C., A. F. Almeida-Santos, *et al.* Involvement of TRPV1 channels in the periaqueductal grey on the modulation of innate fear responses. Acta Neuropsychiatrica, v.27, n.02, p.97-105. 2015.

Aguiar, D. C., F. A. Moreira, *et al.* Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-d-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.83, n.2, p.296-301. 2006.

_____. Modulation of defensive behavior by Transient Receptor Potential Vanilloid type-1 (TRPV1) channels. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.46, Part 3, p.418-428. 2014.

Albin, R. L., R. L. Makowiec, *et al.* Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. Neuroscience Letters, v.118, n.1, p.112-115. 1990.

Alexander, S., A. Davenport, *et al.* The Concise Guide to Pharmacology 2015/16: G protein-coupled receptors. British Journal of Pharmacology, v.172, p.5744-5869. 2015.

Alexander, S., J. Peters, *et al.* The Concise Guide to Pharmacology 2015/16: Ligand-gated ion channels. British Journal of Pharmacology, v.172, p.5870-5903. 2015.

Almeida-Santos, A. F., F. A. Moreira, *et al.* Role of TRPV1 receptors on panic-like behaviors mediated by the dorsolateral periaqueductal gray in rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.105, p.166-172. 2013.

Armini, R. D. S., C. S. Bernabé, *et al.* In a rat model of panic, corticotropin responses to dorsal periaqueductal gray stimulation depend on physical exertion. Psychoneuroendocrinology, v.53, p.136-147. 2015.

Armstrong, N. e E. Gouaux. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. Neuron, v.28, n.1, p.165-181. 2000.

Atsak, P., B. Roozendaal, *et al.* Role of the endocannabinoid system in regulating glucocorticoid effects on memory for emotional experiences. Neuroscience, v.204, n.0, p.104-116. 2012.

Azad, S. C., K. Monory, *et al.* Circuitry for associative plasticity in the amygdala involves endocannabinoid signaling. The Journal of Neuroscience, v.24, n.44, November 3, 2004, p.9953-9961. 2004.

Bandler, R., P. Carrive, *et al.* In: A. Depaulis e R. Bandler (Ed.). The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization. New York: Plenum Publishing Corporation, 1991, p.1-8

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

Banerjee, A., R. S. Larsen, *et al.* Roles of presynaptic NMDA receptors in neurotransmission and plasticity. Trends in Neurosciences, v.39, n.1, p.26-39. 2016.

Batista, P. A., M. V. Fogaça, *et al.* The endocannabinoid, endovanilloid and nitregeric systems could interact in the rat dorsolateral periaqueductal gray matter to control anxiety-like behaviors. Behavioural Brain Research, v.293, p.182-188. 2015.

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

Bergamaschi, M. M., R. H. C. Queiroz, *et al.* Rimonabant effects on anxiety induced by simulated public speaking in healthy humans: a preliminary report. Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental, v.29, n.1, p.94-99. 2014.

Bertoglio, L. J. e H. Zangrossi, Jr. Involvement of dorsolateral periaqueductal gray N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors in the regulation of risk assessment and inhibitory avoidance behaviors in the rat elevated T-maze. Behavioural Pharmacology, v.17, n.7, p.589-596. 2006.

Bittencourt, A. S. Função dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA nos comportamentos de defesa induzidos por estimulação de colunas distintas da matéria cinzenta periaqueductal e estruturas adjacentes. Centro Biomédico, Universidade Federal doEspírito Santo, Vitória, 2003.

Bittencourt, A. S., A. P. Carobrez, *et al.* Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the

rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. Neuroscience, v.125, n.1, p.71-89. 2004.

Bittencourt, A. S., E. M. Nakamura-Palacios, *et al.* Organization of electrically and chemically evoked defensive behaviors within the deeper collicular layers as compared to the periaqueductal gray matter of the rat. Neuroscience, v.133, n.4, p.873-892. 2005.

Blanchard, R. J. e D. C. Blanchard. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. Journal of Comparative and Physiological Psychology, v.68, n.1, Pt.1, p.129-135. 1969.

_____. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. Journal of Comparative Psychology, v.103, n.1, p.70-82. 1989.

Bolles, R. C. Grooming behavior in the rat. Journal of Comparative and Physiological Psychology, v.53, n.3, p.306-310. 1960.

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

Campolongo, P., B. Roozendaal, *et al.* Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.106, n.12, p.4888-4893. 2009.

Campos, A. C., M. V. Fogaça, *et al.* Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. Pharmacological Research, v.112, p.119-127. 2016.

Campos, A. C. e F. S. Guimarães. Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, v.33, n.8, p.1517-1521. 2009.

Cannon, W., S. Britton, *et al.* Studies on the conditions of activity in endocrine glands: the influence of motion and emotion on medulloadrenal secretion. American Journal of Physiology, v.79, p.433-465. 1927.

Canteras, N. S., E. Pavesi, *et al.* Olfactory instruction for fear: neural system analysis. Frontiers in Neuroscience, v.9, 2015-August-6. 2015.

Carobrez, A. P., L. C. Schenberg, *et al.* Neuroeffector mechanisms of the defense reaction in the rat. Physiology & Behavior, v.31, n.4, p.439-444. 1983.

Carroll, R. C., D. V. Lissin, *et al.* Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. Nat Neurosci, v.2, n.5, p.454-460. 1999.

Carvalho-Netto, E. F., K. S. Gomes, *et al.* Role of glutamate NMDA receptors and nitric oxide located within the periaqueductal gray on defensive behaviors in mice confronted by predator. Psychopharmacology, v.204, n.4, p.617-625. 2009.

Casarotto, P. C., A. L. B. Terzian, *et al.* Opposing roles for cannabinoid receptor type-1 (CB1) and transient receptor potential vanilloid type-1 channel (TRPV1) on the modulation of panic-like responses in rats. Neuropsychopharmacology, v.37, n.2, p.478-486. 2012.

Castillo, Pablo e., Thomas j. Younts, *et al.* Endocannabinoid signaling and synaptic function. Neuron, v.76, n.1, p.70-81. 2012.

Caterina, M. J., M. A. Schumacher, *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature, v.389, n.6653, p.816-824. 1997.

Cezario, A. F., E. R. Ribeiro-Barbosa, *et al.* Hypothalamic sites responding to predator threats – the role of the dorsal preammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. European Journal of Neuroscience, v.28, n.5, p.1003-1015. 2008.

Chéramy, A. B., L; Godeheu, G; Glowinski, J. Riluzole inhibits the release of glutamate in the caudate nucleus of the cat in vivo. Neuroscience Letters, v.147, n.2, p.209-212. 1992.

Chia, L., A. S. Jonathan, *et al.* Mu opioid receptor modulation of dopamine neurons in the periaqueductal gray/dorsal raphe: a role in regulation of pain. Neuropsychopharmacology, v.41, n.8, p.2122-32. 2016.

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

Crawford, M. M., Fa. Species-specific defense reactions and avoidance learning. An evaluative review. The Pavlovian Journal of Biological Science, v.17, n.4, p.204-14. 1982.

Cristino, L., L. De Petrocellis, *et al.* Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. Neuroscience, v.139, n.4, p.1405-1415. 2006.

De Abreu, A. R., A. R. Abreu, *et al.* Amygdalar neuronal activity mediates the cardiovascular responses evoked from the dorsolateral periaqueductal gray in conscious rats. Neuroscience, v.284, p.737-750. 2015.

De Lima, M. A. X., M. V. C. Baldo, *et al.* A role for the anteromedial thalamic nucleus in the acquisition of contextual fear memory to predatory threats. Brain Structure and Function, p.1-17. 2016.

De Menezes, R. C. A., D. V. Zaretsky, *et al.* Cardiovascular and thermal responses evoked from the periaqueductal grey require neuronal activity in the hypothalamus. The Journal of Physiology, v.587, n.Pt 6, p.1201-1215. 2009.

De Oliveira Sergio, T., V. C. De Bortoli, *et al.* Serotonin-2A receptor regulation of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray matter: the role of GABA. Psychopharmacology, v.218, n.4, p.725-732. 2011.

De Oliveira Sergio, T., A. Spiacci Jr, *et al.* Effects of dorsal periaqueductal gray CRF1- and CRF2-receptor stimulation in animal models of panic. Psychoneuroendocrinology, v.49, p.321-330. 2014.

Debono, M. L. G., J; Canton, T; Doble, a; Pradier, L. Inhibition by riluzole of electrophysiological responses mediated by rat kainate and NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. European Journal of Pharmacology, v.235, n.2-3, p.283-9. 1993.

Deng, H., X. Xiao, *et al.* Periaqueductal gray neuronal activities underlie different aspects of defensive behaviors. The Journal of Neuroscience, v.36, n.29, p.7580-7588. 2016.

Devane, W. A., L. Hanus, *et al.* Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science, v.258, n.5090, December 18, 1992, p.1946-1949. 1992.

Di Scala, G., M. J. Mana, *et al.* Evidence of Pavlovian conditioned fear following electrical stimulation of the periaqueductal grey in the rat. Physiology & Behavior, v.40, n.1, p.55-63. 1987.

Dielenberg, R. A., G. E. Hunt, *et al.* "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. Neuroscience, v.104, n.4, p.1085-1097. 2001.

Dielenberg, R. A. e I. S. Mcgregor. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.25, p.597-609. 2001.

Do Monte, F. H. M., N. S. Canteras, *et al.* 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.

Doble, A. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. Neurology, v.47, n.6, p.S233-41. 1996.

Doble, A., J. P. Hubert, *et al.* Pertussis toxin pretreatment abolishes the inhibitory effect of riluzole and carbachol on D-[3H]aspartate release from cultured cerebellar granule cells. Neuroscience Letters, v.140, n.2, p.251-254. 1992.

Eichenbaum, H. Learning & Memory. Boston: W.W. Norton Company, v.I. 2008. 438 p.

Fanselow, M. Shock-induced analgesia on the formalin test: effects of shock severity, naloxone, hypophysectomy, and associative variables. Behavioral Neuroscience, v.98, n.1, p.79-85. 1984.

Fanselow, M. e L. Lester. A functional behavioristic approach to aversively motivated behavior: predatory imminence as a determinant of the topography of defensive behavior. In: R. C. Bolles e M. D. Beecher (Ed.). Evolution and learning. Hillsdale, NJ, US: Lawrence Erlbaum Associates, Inc, 1988. A functional behavioristic approach to aversively motivated behavior: predatory imminence as a determinant of the topography of defensive behavior, p.185-212

Fawley, J. A., M. E. Hofmann, *et al.* Cannabinoid 1 and transient receptor potential vanilloid 1 receptors discretely modulate evoked glutamate separately from spontaneous glutamate transmission. The Journal of Neuroscience, v.34, n.24, June 11, 2014, p.8324-8332. 2014.

Ferré, S., V. Casadó, *et al.* G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. Pharmacological Reviews, v.66, n.2, p.413-434. 2014.

Finn, D. P., M. D. Jhaveri, *et al.* Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats. Neuropharmacology, v.45, n.5, p.594-604. 2003.

Fogaça, M. V., S. F. Lisboa, *et al.* Fine-tuning of defensive behaviors in the dorsal periaqueductal gray by atypical neurotransmitters. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.45, n.4, p.357-365. 2012.

- Frick, A. e D. Johnston. Plasticity of dendritic excitability. Journal of Neurobiology, v.64, n.1, p.100-115. 2005.
- Fumagalli, E., M. Funicello, *et al.* Riluzole enhances the activity of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1. European Journal of Pharmacology, v.578, p.171-176. 2008.
- Giachero, M., G. D. Calfa, *et al.* Hippocampal structural plasticity accompanies the resulting contextual fear memory following stress and fear conditioning. Learning & Memory, v.20, n.11, November 1, 2013, p.611-616. 2013.
- Giachero, M. e A. P. Carobrez. Muscimol applied to the dorsolateral periaqueductal gray matter impairs the negative valence instruction from a stressful experience. International Behavioral Neuroscience Society. British Columbia, Canada 2016.
- Gladding, C. M., S. M. Fitzjohn, *et al.* Metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression: molecular mechanisms. Pharmacological Reviews, v.61, n.4, p.395-412. 2009.
- Gobira, P., D. Aguiar, *et al.* Effects of compounds that interfere with the endocannabinoid system on behaviors predictive of anxiolytic and panicolytic activities in the elevated T-maze. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.110, p.33-9. 2013.
- Gobira, P. H., A. F. Almeida-Santos, *et al.* Role of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in aversive responses mediated by the dorsolateral periaqueductal grey. European Neuropsychopharmacology, v.26, n.1, p.15-22. 2016.
- Goltz, F. Der Hund ohne Grosshirn. Siebente Abhandlung über dir Verrichtungen des Grosshirn., Pfluger´s Archiv für die gessante Physiologie, v.51, p.570-614. 1892.
- Graeff, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.27, n.4, p.811-29. 1994.
- Gray, J. A. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. 1982
- Gray, J. A. e N. Mcnaughton. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system, second edition. 2000

Gross, C. T. e N. S. Canteras. The many paths to fear. Nat Rev Neurosci, v.13, n.9, p.651-658. 2012.

Guitton, M. J. e Y. Dudai. Anxiety-like state associates with taste to produce conditioned taste aversion. Biological Psychiatry, v.56, n.11, p.901-904. 2004.

Guo, A., L. Vulchanova, *et al.* Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. European Journal of Neuroscience, v.11, n.3, p.946-958. 1999.

Haghparsat, A., I-P. Gheitsi, *et al.* Involvement of glutamatergic receptors in the nucleus cuneiformis in modulating morphine-induced antinociception in rats. European Journal of Pain, v.11, n.8, p.855-862. 2007.

Henley, J. M. e K. A. Wilkinson. Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. Nat Rev Neurosci, v.17, n.6, p.337-350. 2016.

Herkenham, M., A. B. Lynn, *et al.* Cannabinoid receptor localization in brain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.87, n.5, p.1932-1936. 1990.

Hess, W. Stammganglien-Reizversuche Berichte über die gesamte Physiologie und experimentelle Pharmacologie, v.42, p.554-555. 1928.

_____. Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina. Estocolmo 1949.

Hill, M. N. e B. S. McEwen. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioral effects of stress and glucocorticoids. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry, v.34, n.5, p.791-797. 2009.

Hinton, D., V. Pich, *et al.* Olfactory-triggered panic attacks among Khmer refugees: a contextual approach. Transcultural psychiatry, v.41, n.2, p.155-199. 2004.

Honore, T., S. N. Davies, *et al.* Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. Science, v.241, n.4866, p.701-703. 1988.

Horovitz, O. e G. Richter-Levin. Dorsal periaqueductal gray simultaneously modulates ventral subiculum induced-plasticity in the basolateral amygdala and the nucleus accumbens. Frontiers in Behavioral Neuroscience, v.9, p.53. 2015.

Hubert, J. P., J. C. Delumeau, *et al.* Antagonism by riluzole of entry of calcium evoked by NMDA and veratridine in rat cultured granule cells: evidence for a dual mechanism of action. British Journal of Pharmacology, v.113, n.1, p.261-267. 1994.

Hunsperger, R. Affective reaction from electric stimulation of brain stem in cats. Helvetica Physiologica et Pharmacologica acta, v.14, n.1, p.70-92. 1956.

Jenck, F., C. Broekkamp, *et al.* Effects of serotonin receptor antagonists on PAG stimulation induced aversion: different contributions of 5HT1, 5HT2 and 5HT3 receptors. Psychopharmacology. 1989.

Kawahara, H., G. M. Drew, *et al.* Inhibition of fatty acid amide hydrolase unmasks CB1 receptor and TRPV1 channel-mediated modulation of glutamatergic synaptic transmission in midbrain periaqueductal grey. British Journal of Pharmacology, v.163, n.6, p.1214-1222. 2010.

Keay, K. A. e R. Bandler. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.25, p.669-678. 2001.

Kessels, H. W. e R. Malinow. Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. Neuron, v.61, n.3, p.340-350. 2009.

Kim, E. J., O. Horowitz, *et al.* Dorsal periaqueductal gray-amygdala pathway conveys both innate and learned fear responses in rats. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.110, n.36, p.14795-14800. 2013.

Kincheski, G. C. Condicionamento olfatório induzido pela estimulação química da matéria cinzenta periaqueductal dorsolateral de ratos Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011. 127 p.

Kincheski, G. C. e A. P. Carobrez. The dorsal periaqueductal gray modulates the increased fear-like behavior exhibited by experienced rats in the elevated plus-maze. Behavioural Brain Research, v.206, n.1, p.120-126. 2010.

Kincheski, G. C., S. R. Mota-Ortiz, *et al.* The dorsolateral periaqueductal gray and its role in mediating fear learning to life threatening events. PLoS ONE, v.7, n.11, p.e50361. 2012.

Klein, D. False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. Archives of General Psychiatry, v.50, n.2, p.306-17. 1993.

Kretschmer, B. K., U; Schmidt, Wj. Riluzole, a glutamate release inhibitor, and motor behavior. Naunyn Schmiedeberg's archives of Pharmacology, v.358, n.2, p.181-90. 1998.

Kroon, J. A. V. O hipocampo e o condicionamento olfatório aversivo: mediação por receptores glutamatérgicos subtipo NMDA. Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012. 104 p.

Kroon, J. A. V. e A. P. Carobrez. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: Effects of midazolam, propranolol or scopolamine. Neurobiology of Learning and Memory, v.91, n.1, p.32-40. 2009.

Leaton, R. N. e J. Cranney. Potentiation of the acoustic startle response by a conditioned stimulus paired with acoustic startle stimulus in rats. Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes, v.16, n.3, p.279-287. 1990.

Ledoux, J. Emotion Circuits in the Brain. Annual Review of Neuroscience, v.23, n.1, p.155-184. 2000.

Leman, S., R. A. Dielenberg, *et al.* Effect of dorsal periaqueductal gray lesion on cardiovascular and behavioural responses to contextual conditioned fear in rats. Behavioural Brain Research, v.143, n.2, p.169-176. 2003.

Lever, C., S. Burton, *et al.* Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. Reviews in Neurosciences, v.17, n.1-2, p.22. 2006.

Lisboa, S. F., L. H. A. Camargo, *et al.* Cannabinoid modulation of predator fear: involvement of the dorsolateral periaqueductal gray. International Journal of Neuropsychopharmacology, v.17, n.8, p.1193. 2014.

Lisboa, S. F., L. B. M. Resstel, *et al.* Activation of cannabinoid CB1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray induces anxiolytic effects in rats submitted to the Vogel conflict test. European Journal of Pharmacology, v.593, p.73-78. 2008.

Maren, S. Neurobiology of pavlovian fear conditioning. Annual Review of Neuroscience, v.24, n.1, p.897-931. 2001.

Martins, A. P., R. A. Marras, *et al.* Anxiogenic effect of corticotropin-releasing hormone in the dorsal periaqueductal grey. NeuroReport, v.8, n.16, p.3601-3604. 1997.

Mascarenhas, D. C., K. S. Gomes, *et al.* Anxiogenic-like effect induced by TRPV1 receptor activation within the dorsal periaqueductal gray matter in mice. Behavioural Brain Research, v.250, n.0, p.308-315. 2013.

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

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

Matsuda, L. A., S. J. Lolait, *et al.* Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature, v.346, n.6284, p.561-564. 1990.

Mcgarraughty, S., K. L. Chu, *et al.* Capsaicin infused into the PAG affects rat tail flick responses to noxious heat and alters neuronal firing in the RVM. Journal of Neurophysiology, v.90, n.4, p.2702. 2003.

Mcnaughton, N. e P. J. Corr. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.28, n.3, p.285-305. 2004.

Mechoulam, R., S. Ben-Shabat, *et al.* Identification of an endogenous 2-monoacylglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. Biochemical Pharmacology, v.50, n.1, p.83-90. 1995.

Mechoulam, R., L. O. Hanus, *et al.* Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. Nat Rev Neurosci, v.15, n.11, p.757-764. 2014.

Meyer, P. J., M. M. Morgan, *et al.* Contribution of dopamine receptors to periaqueductal gray-mediated antinociception. Psychopharmacology, v.204, n.3, p.531-540. 2009.

Miguel, T. T. e R. L. Nunes-De-Souza. Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. Brain Research, v.1076, n.1, p.42-48. 2006.

_____. Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice. Brain Research, v.1240, p.39-46. 2008.

Molchanov, M. e F. Guimarães. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. Psychopharmacology, v.160, n.1, p.30-38. 2002.

Molchanov, M. L. e F. S. Guimarães. Defense reaction induced by a metabotropic glutamate receptor agonist microinjected into the dorsal periaqueductal gray of rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.32, p.1533-1537. 1999.

Mongeluzi, D. L., R. A. Rosellini, *et al.* Pavlovian aversive context conditioning using carbon dioxide as the unconditional stimulus. Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes, v.22, n.3, p.244-257. 1996.

Moraes, C. L. K., L. J. Bertoglio, *et al.* Interplay between glutamate and serotonin within the dorsal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior of rats exposed to the elevated plus-maze. Behavioural Brain Research, v.194, n.2, p.181-186. 2008.

Moreira, F. A., D. C. Aguiar, *et al.* Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. Neuropharmacology, v.52, n.3, p.958-965. 2007.

_____. Neuroanatomical substrates involved in cannabinoid modulation of defensive responses. Journal of Psychopharmacology, v.26, n.1, January 1, 2012, p.40-55. 2012.

_____. Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety: two sides of one coin? Neuroscience, v.204, p.186-192. 2012.

Moreira, F. A. e C. T. Wotjak. Cannabinoids and anxiety. In: Springer (Ed.). Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment - Current Topics in Behavioral Neurosciences Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v.2, 2009. Cannabinoids and anxiety, p.429-450

Morris, R. G. M. D.O. Hebb: The Organization of Behavior, Wiley: New York; 1949. Brain Research Bulletin, v.50, 1999/12//, p.437. 1999.

Motta, S. C., A. P. Carobrez, *et al.* The periaqueductal gray and primal emotional processing critical to influence complex defensive responses, fear learning and reward seeking: Neuroscience Biobehavioral Reviews 2016.

Munro, S., K. L. Thomas, *et al.* Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. Nature, v.365, n.6441, p.61-65. 1993.

Nashold, B., Jr., P. W. William, *et al.* Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. Journal of Neurosurgery, v.30, n.1, p.14-24. 1969.

Oliveira Da Cruz, J. F., L. M. Robin, *et al.* Astroglial type-1 cannabinoid receptor (CB1): a new player in the tripartite synapse. Neuroscience, v.323, p.35-42. 2016.

Otto, T., G. Cousins, *et al.* Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. Behavioural Brain Research, v.110, n.1-2, p.119-128. 2000.

Palazzo, E., V. De Novellis, *et al.* Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception. European Journal of Pharmacology, v.439, n.1-3, p.69-75. 2002.

Passafaro, M., V. Piëch, *et al.* Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. Nat Neurosci, v.4, n.9, p.917-926. 2001.

Paul, E. D., P. L. Johnson, *et al.* The Deakin/Graeff hypothesis: focus on serotonergic inhibition of panic. Neuroscience and biobehavioral reviews, v.46 Pt 3, p.379-396. 2014.

Pavesi, E., N. S. Canteras, *et al.* Acquisition of pavlovian fear conditioning using beta-adrenoceptor activation of the dorsal preammillary nucleus as an unconditioned stimulus to mimic live predator-threat exposure. Neuropsychopharmacology, v.36, n.5, p.926-939. 2011.

Paxinos, G. e C. Watson. The rat brain in stereotaxic coordinates: Academic Press. 1998

Pelosi, G. G. e F. M. A. Corrêa. Cardiovascular effects of noradrenaline microinjected into the dorsal periaqueductal gray area of unanaesthetized rats. European Journal of Neuroscience, v.22, n.12, p.3188-3194. 2005.

Pertwee, R. G. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. Life Sciences, v.76, n.12, p.1307-1324. 2005.

_____. Cannabinoid Receptor Ligands. Toocris Cookson, v.27. 2010.

Pissiota, A., Ö. Frans, *et al.* Neurofunctional correlates of posttraumatic stress disorder: a PET symptom provocation study. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience, v.252, n.2, p.68-75. 2002.

- Price, J. L. An autoradiographic study of complementary laminar patterns of termination of afferent fibers to the olfactory cortex. The Journal of Comparative Neurology, v.150, n.1, p.87-108. 1973.
- Reimer, A. E., A. R. De Oliveira, *et al.* Glutamatergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray matter modulate the expression of conditioned freezing and fear-potentiated startle. Neuroscience, v.219, p.72-81. 2012.
- Rescorla, R. A. e A. R. Wagner. A theory of Pavlovian conditioning: variations in the effectiveness of reinforcement and non reinforcement. Classical Conditioning II: Current Research and Theory, p.64-99. 1972.
- Resstel, L. B. M., S. F. Lisboa, *et al.* Activation of CB1 cannabinoid receptors in the dorsolateral periaqueductal gray reduces the expression of contextual fear conditioning in rats. Psychopharmacology, v.198, n.3, p.405-411. 2008.
- Richardson, R., N. Tronson, *et al.* Extinction of conditioned odor potentiation of startle. Neurobiology of Learning and Memory, v.78, n.2, p.426-440. 2002.
- Rodgers, R. J., P. M. Evans, *et al.* Anxiogenic profile of AM-251, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in plus-maze-naïve and plus-maze-experienced mice. Behavioural Pharmacology, v.16, n.5-6, p.405-413. 2005.
- Rozenfeld, R., I. Bushlin, *et al.* Receptor heteromerization expands the repertoire of cannabinoid signaling in rodent neurons. PLoS ONE, v.7, n.1, p.e29239. 2012.
- Rubino, T., C. Guidali, *et al.* CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour. Neuropharmacology, v.54, n.1, p.151-160. 2008.
- Sarl, C. P. Rilutek (riluzole). Fda. Estados Unidos da América: 48 p. 2009.
- Schenberg, L. C. Modulação pelo ácido Gama-Aminobutírico (GABA) da reação de defesa provocada pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaqueductal do rato. Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1984.
- Schenberg, L. C. e F. G. Graeff. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.9, n.3, p.287-295. 1978.
- Schmitel, F. G., G. M. De Almeida, *et al.* Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. Neuroscience, v.200, p.59-73. 2012.

Schmitt, M., F. Graeff, *et al.* Anxiolytic effect of kynurenic acid microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter of rats placed in the elevated plus-maze test. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.23, n.8, p.677-9. 1990.

Schmitt, M. L., W. Coelho, *et al.* Anxiogenic-like effect of glycine and d-serine microinjected into dorsal periaqueductal gray matter of rats. Neuroscience Letters, v.189, n.2, p.93-96. 1995.

Slotnick, B. M. e H. M. Katz. Olfactory learning-set formation in rats. Science, v.185, n.4153, p.796-798. 1974.

Soares, V. D. P., A. C. Campos, *et al.* Intra-dorsal periaqueductal gray administration of cannabidiol blocks panic-like response by activating 5-HT1A receptors. Behavioural Brain Research, v.213, n.2, p.225-229. 2010.

Souza, R. Dupla dissociação da função dos receptores NMDA da substância cinzenta periaqueductal rostral e caudal no medo inato e condicionado de odor de gato. Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007. 80 p.

Souza, R. R. e A. P. Carobrez. 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.

Sperandio, M. Efeitos da administração de fludrocortisona e espironolactona sobre as respostas defensivas induzidas pela ativação da matéria cinzenta periaqueductal dorsolateral em ratos submetidos a um condicionamento aversivo olfatório. Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

Su, C.-Y., K. Menuz, *et al.* Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. Cell, v.139, n.1, p.45-59. 2009.

Sütt, S., S. Raud, *et al.* Cat odour-induced anxiety - a study of the involvement of the endocannabinoid system. Psychopharmacology, v.198, n.4, p.509-520. 2008.

Sugiyama, A., A. Saitoh, *et al.* Riluzole produces distinct anxiolytic-like effects in rats without the adverse effects associated with benzodiazepines. Neuropharmacology, v.62, n.8, p.2489-2498. 2012.

Sweatt, J. D. Neural plasticity and behavior – sixty years of conceptual advances. Journal of Neurochemistry, p.n/a-n/a. 2016.

Terzian, A. L. B., D. C. Aguiar, *et al.* Modulation of anxiety-like behaviour by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. European Neuropsychopharmacology, v.19, n.3, p.188-195. 2009.

Tóth, A., J. Boczán, *et al.* Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. Molecular Brain Research, v.135, p.162-168. 2005.

Tovote, P., M. S. Esposito, *et al.* Midbrain circuits for defensive behaviour. Nature, v.534, n.7606, p.206-212. 2016.

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

Turrigiano, G. Homeostatic Synaptic Plasticity: Local and Global Mechanisms for Stabilizing Neuronal Function. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v.4, n.1, p.a005736. 2012.

Uliana, D., S. Hott, *et al.* Dorsolateral periaqueductal gray matter CB1 and TRPV1 receptors exert opposite modulation on expression of contextual fear conditioning. Neuropharmacology, v.103, p.257-69. 2016.

Van Dogen, A. Biology of the NMDA receptor: CRC Press/Taylor & Francis. 2009

Viana, T. R. G., S. C. Hott, *et al.* Anti-aversive role of the endocannabinoid system in the periaqueductal gray stimulation model of panic attacks in rats. Psychopharmacology, v.232, n.9, p.1545-1553. 2015.

Vilela, L. R., D. C. Medeiros, *et al.* Anticonvulsant effects of n-arachidonoyl-serotonin, a dual fatty acid amide hydrolase enzyme and transient receptor potential vanilloid type-1 (TRPV1) channel blocker, on experimental seizures: the roles of cannabinoid CB1 receptors and TRPV1 channels. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, v.115, n.4, p.330-334. 2014.

Watkins, J. C., P. Korgsgaard-Larsen, *et al.* Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. Trends in Pharmacological Sciences, v.11, n.1, 2016/10/12, p.25-33. 1990.

Watson, J. B. e R. Rayner. Conditioned emotional reactions. American Psychologist, v.55, n.3, p.313-317. 2000.

Webber, C. Papel do receptores 5HT1A da matéria cinzenta periaqueductal dorsal na aquisição do condicionamento aversivo olfatório. Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

Wotjak, C. T. Role of endogenous cannabinoids in cognition and emotionality. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, v.5, n.7, p.659-670. 2005.

Xing, J. e J. Li. TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. Journal of Neurophysiology: American Physiological Society. 97: 503-511 p. 2007.

Zanella, C. Efeito da microinjeção de bicuculina na matéria cinzenta periaqueductal dorsal em ratos submetidos a um condicionamento olfatório aversivo. Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015. 88 p.

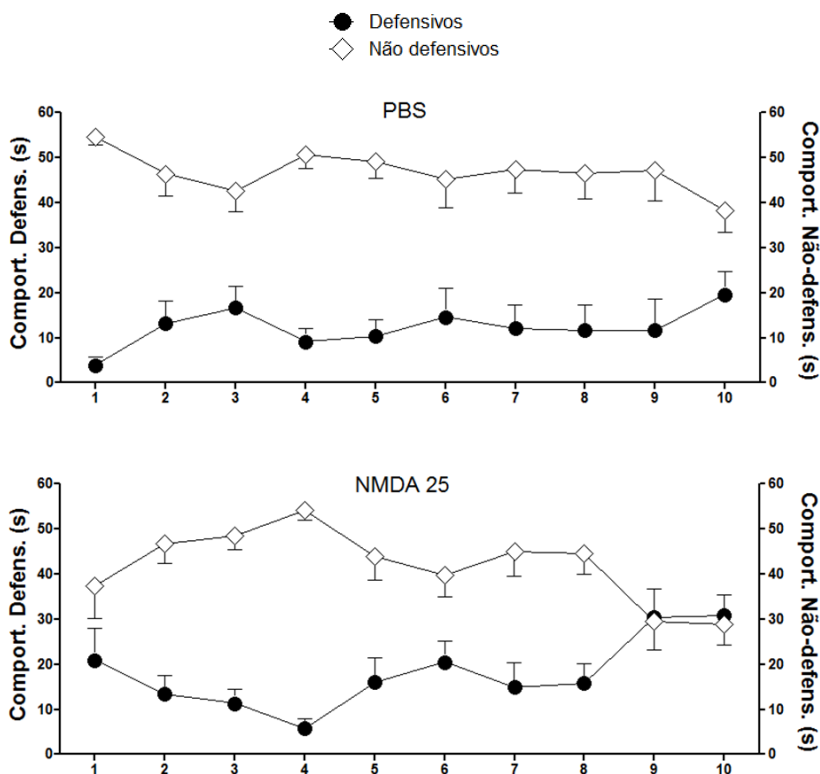
Zanoveli, J. M. e M. L. Brandão. The dorsal periaqueductal and basolateral amygdala are necessary for the expression of conditioned place avoidance induced by semicarbazide stimulation of the dorsal periaqueductal region. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, v.32, n.7, p.1715-1721. 2008.

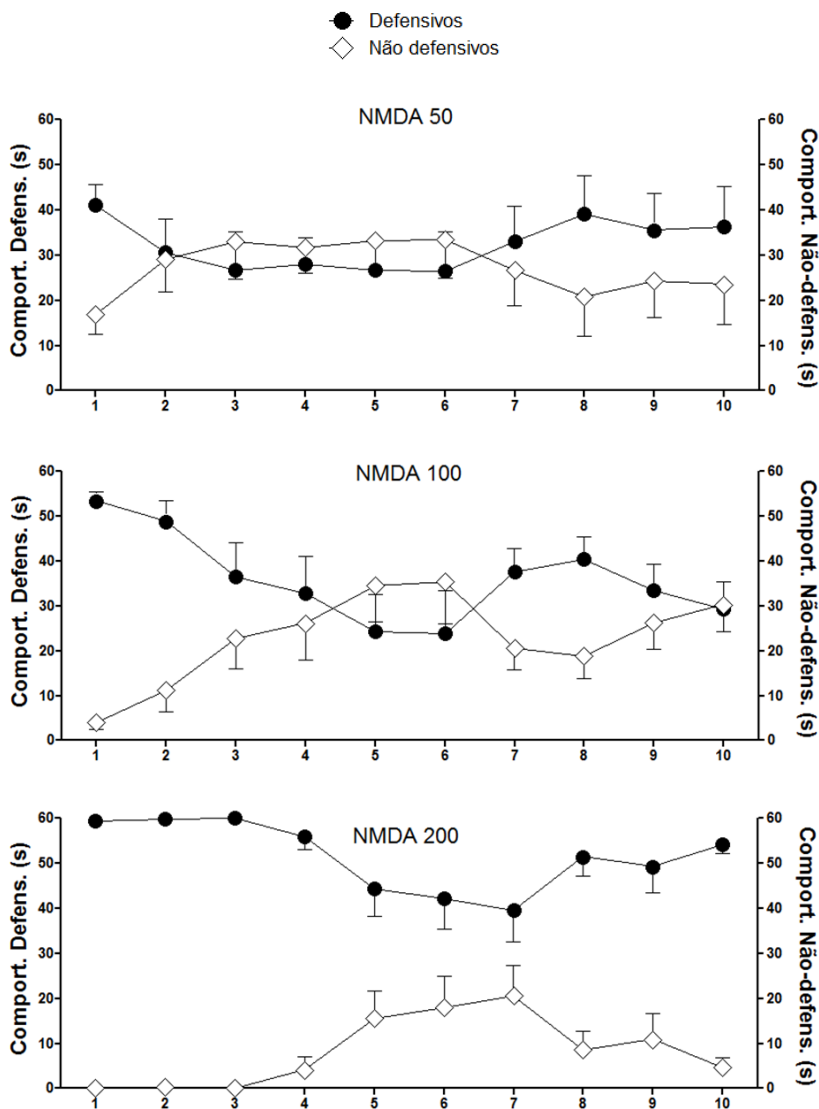
Zanoveli, J. M., C. F. Netto, *et al.* Systemic and intra-dorsal periaqueductal gray injections of cholecystokinin sulfated octapeptide (CCK-8s) induce a panic-like response in rats submitted to the elevated T-maze. Peptides, v.25, n.11, p.1935-1941. 2004.

Zuardi, A. W. History of cannabis as a medicine: a review. Revista Brasileira de Psiquiatria, v.28, p.153-157. 2006.

10. Apêndice A: comportamentos durante a sessão de condicionamento em animais que receberam NMDA na MCPdl (minuto a minuto).

A microinjeção de NMDA na MCPdl promoveu a expressão de respostas defensivas, evidentes a partir da dose de 50 pmol, mais proeminentes no início da sessão de condicionamento, portanto, logo após a microinjeção. A representação minuto a minuto indica que a dose de 25 pmol poderia causar alguma modificação comportamental, embora isto não tenha sido evidenciado estatisticamente. Por outro lado, os grupos de 50, 100 e 200 pmol apresentam um escalonamento linear das respostas defensivas, em detrimento das respostas não defensivas.





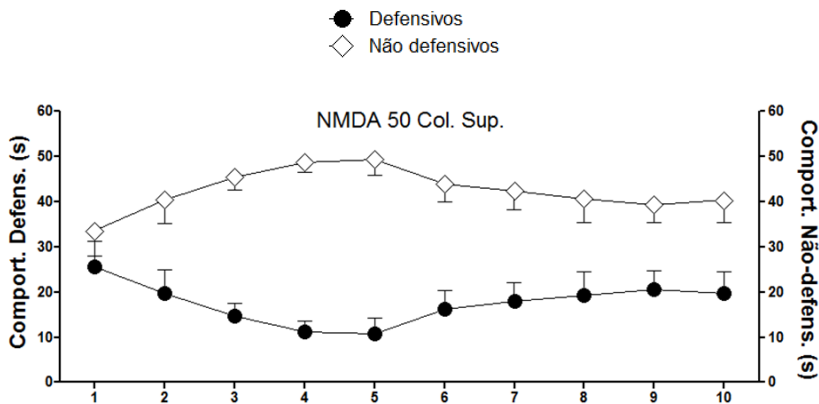


Figura 36, apêndice A: comportamentos defensivos (fuga, congelamento e agachar-cheirar) e não defensivos (ambulação, investigação vertical e autolimpeza), minuto a minuto após a microinjeção de PBS ou NMDA na MCPdl. A fuga compôs apenas as respostas do grupo NMDA 200 pmol. Cada gráfico representa um grupo experimental. Todos receberam a microinjeção na MCPdl, com exceção do último, que recebeu NMDA 50 pmol no colículo superior. Os dados estão representados em média \pm erro padrão da média. PBS (8), NMDA 25 pmol (8), NMDA 50 pmol (8), NMDA 100 pmol (10), NMDA 200 pmol (8) e NMDA 50 pmol (Col. Sup.) (15).

11. Apêndice B: comportamentos durante a sessão de condicionamento em animais que receberam 1) NMDA 50 pmol, 2) AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol, 3) CAP 10 nmol ou 4) AM251 200 pmol + CAP 1 nmol na MCPdl (minuto a minuto).

Aqui são comparados os grupos que apresentaram respostas defensivas e aprendizagem. Apenas os grupos que receberam NMDA (nas doses de 50 ou 25 pmol) apresentaram um incremento inicial das respostas defensivas. Nestes grupos, não houve a expressão de fuga dentro da caixa de condicionamento. Portanto, as respostas defensivas de todos os animais são compostas por congelamento mais agachar-chear.

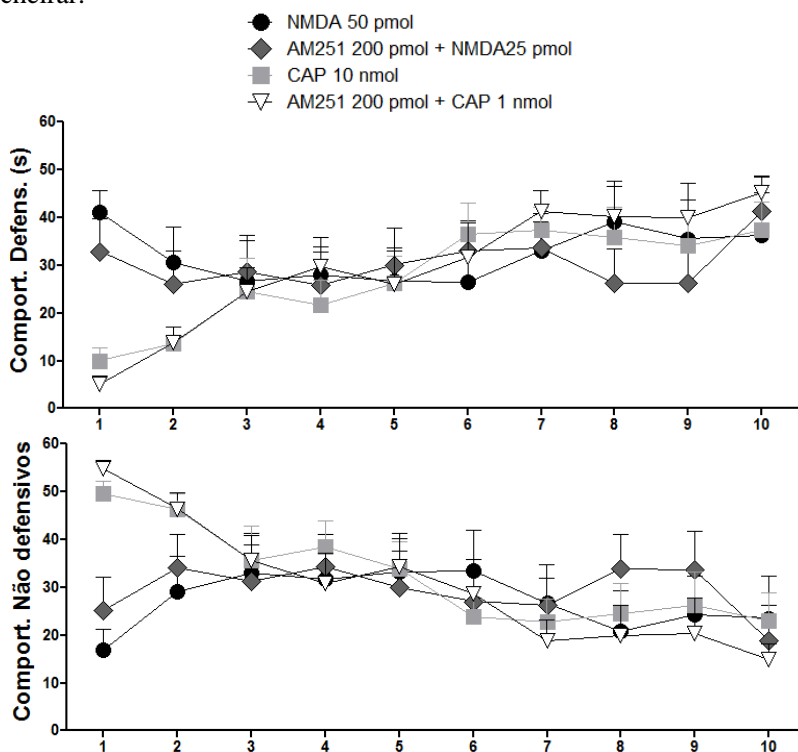


Figura 37, apêndice B: comportamentos defensivos (congelamento e agachar-chear) e não defensivos (ambulação, investigação vertical e autolimpeza), minuto a minuto após os tratamentos que geraram aprendizagem. Os dados estão representados em média + erro padrão da média. n: NMDA 50 pmol (8), AM251 200 pmol + NMDA 25 pmol (10), CAP 10 nmol (8), AM251 200 pmol + CAP 1 nmol (8).

12. Apêndice C: outros moduladores da atividade na MCPdl, interações com os mecanismos estudados e consequências sobre as respostas defensivas incondicionadas e aprendizagem

O equilíbrio da atividade da MCPdl é o resultado da interação entre receptores NMDA, TRPV1, CB1 e AMPA, neuromoduladores como os eCB e neurotransmissores como glutamato e GABA. Porém, outros receptores e moduladores presentes na MCPdl contribuem para o funcionamento de neurônios nesta região. Dentre eles, são destacados o óxido nítrico (NO), a serotonina, os corticosteroides, os opioides, a dopamina e a noradrenalina (figuras 33 e 34).

A estimulação da MCPdl por NMDA em camundongos (na faixa que não promove respostas defensivas intensas) promove o aumento de respostas de esquiva no LCE. Este efeito foi revertido pela inibição da enzima NOSn (NO sintase neuronal) (Miguel e Nunes-De-Souza, 2008). O mesmo foi observado quando o estímulo aversivo constituiu-se de uma associação entre NMDA na MCPdl e exposição ao predador (Carvalho-Netto, Gomes *et al.*, 2009).

Em contrapartida, as respostas de fuga pela microinjeção de NMDA 1 nmol parecem não depender da produção de NO. A inibição da NOSn, o sequestrador de NO ou a inibição da guanilato ciclase solúvel (GCs) não foram capazes de bloquear estas respostas intensas (Aguiar, Moreira *et al.*, 2006). Isto pode revelar um mecanismo diferente da ativação intensa de NMDA em relação às doses intermediárias, ou ainda que neste caso a produção de NO seja tão grande que não foi suplantada pelos pré-tratamentos.

O NO possui algumas características similares aos eCB, pois é produzido sob demanda após a despolarização de membrana (pela indução da enzima NO sintase neuronal, NOSn), atravessa facilmente as membranas plasmáticas e atua na pré-sinapse. No entanto, o NO promove um aumento na liberação de glutamato através da ativação da guanilato ciclase solúvel (Batista, Fogaça *et al.*, 2015). Este é um dos mecanismos pelos quais altas doses de AEA perdem o efeito de redução das respostas defensivas. A AEA em doses altas liga-se a receptores TRPV1, resultando em um aumento na produção de NO e consequente incremento de ativação na MCPdl. Isto foi confirmado experimentalmente, pois um antagonista de receptores TRPV1 e também um sequestrador de NO restaurou os efeitos ansiolíticos da maior dose de AEA (Batista, Fogaça *et al.*, 2015).

Estes experimentos sugerem que o NO atua no controle de atividade na MCPdl através do incremento na liberação de glutamato,

contribuindo para a promoção de respostas defensivas. Ainda, que parte do mecanismo de ação da CAP (ou NMDA nas doses aqui utilizadas) possa ser explicado pela produção deste neuromodulador. Supostamente, a transição de uma atividade que produz aprendizagem para um estado de ativação intensa pode contar com mecanismos de potencialização nitrérgica local. No entanto, pouco se sabe sobre o papel do NO na aprendizagem produzida pela estimulação glutamatérgica na MCPdl (figuras 33 e 34).

A serotonina, por outro lado, apresenta um aspecto dual na modulação de respostas defensivas. Os receptores $5HT_{2A}$ são ligados à proteína G_q e promovem a mobilização de Ca^{+2} . Enquanto isso, os auto receptores $5HT_{1A}$, ligados à proteína G_i/G_o inibitória estão localizados na pré-sinapse e reduzem a liberação de neurotransmissores, inclusive da serotonina (Jenck, Broekkamp *et al.*, 1989). Entretanto, a estimulação de ambos os receptores na MCPdl reduz respostas defensivas. Esta aparente contradição explica-se pela localização de receptores $5HT_{2A}$ em neurônios GABAérgicos na MCPdl (De Oliveira Sergio, De Bortoli *et al.*, 2011).

Projeções neuronais do núcleo dorsal da rafe liberam serotonina na MCPdl, atuando primariamente sobre receptores $5HT_{1A}$. Outra possível via serotonérgica conta com um interneurônio GABAérgico na porção ventral da MCP. Assim, os neurônios do núcleo dorsal da rafe secretam serotonina na MCPv, que por sua vez acionam neurônios GABAérgicos nesta coluna através da ativação de receptores $5HT_{2A}$ ligados à proteína G_q . Por fim, a ativação de neurônios GABAérgicos libera GABA na MCPdl (Paul, Johnson *et al.*, 2014).

Portanto, ambas as vias atuam na inibição da MCPdl resultando em redução de respostas defensivas (Kincheski, 2011; Webber, 2016). Um agonista de receptores $5HT_{1A}$ microinjetado na MCPdl foi capaz de reduzir as respostas defensivas causadas por NMDA (Webber, 2016) ou estimulação elétrica (Broiz, Oliveira *et al.*, 2008) e prejudicar a aprendizagem (Kincheski, 2011; Webber, 2016). Por outro lado, o antagonista de receptores $5HT_{1A}$ potencializou os efeitos de uma dose subfetiva de NMDA (Kincheski, 2011; Webber, 2016) ou de estimulação elétrica (Broiz, Oliveira *et al.*, 2008). Isto significa que a MCPdl recebe um pulso inibitório de serotonina mesmo em condições basais, e a interrupção deste pulso potencializa as respostas defensivas e a aprendizagem.

Sendo assim, as respostas defensivas desencadeadas pela ativação de neurônios da MCPdl sofrem influência de receptores serotonérgicos $5HT_{1A}$. No entanto, ainda não está claro se existe uma

interação direta entre os receptores $5HT_{1A}$ e CB1, TRPV1, NMDA ou AMPA (figuras 33 e 34).

A princípio, esta interação ocorre na pré-sinapse, na regulação de liberação de neurotransmissores pelo controle de Ca^{+2} (figura 33 e 34). Outro possível ponto de intersecção foi revelado pelo canabidiol. Esta droga promissora para o tratamento de transtornos de ansiedade atua por meio da ativação de receptores $5HT_{1A}$ na MCPdl. Além da ação como agonista de $5HT_{1A}$, o canabidiol também inibe a FAAH, enzima que degrada AEA. Então, a associação entre $5HT_{1A}$ e maior disponibilidade de AEA produz a redução de respostas defensivas e da taxa de aquisição de esquiva inibitória (Soares, Campos *et al.*, 2010). Para revisão, (Campos, Fogaça *et al.*, 2016).

Quanto à aprendizagem, existem evidências da ocorrência de modificações na responsividade de receptores $5HT_{1A}$ na MCPdl, que se tornam insensíveis ao agonista e antagonista. Esta internalização de receptores serotoninérgicos na MCPdl poderia estar relacionada à maior expressão de respostas defensivas frente ao estímulo condicionado (Broiz, Oliveira *et al.*, 2008).

A ativação de neurônios que contêm receptores glutamatérgicos da MCPdl gera respostas características do sistema nervoso simpático, como aumento na frequência cardíaca e na frequência respiratória (Carobrez, Schenberg *et al.*, 1983; De Abreu, Abreu *et al.*, 2015). Portanto, seria esperado que o caráter aversivo de tal estimulação promovesse também a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Curiosamente, alterações na secreção de corticosterona não são detectadas após a estimulação elétrica (Armini, Bernabé *et al.*, 2015) ou química (Sperandio, 2016) da MCPdl.

Porém, eventos aversivos que desencadeiam a massiva liberação de corticosterona, como o estresse por contenção, potencializam a aprendizagem no condicionamento por choque nas patas (Giachero, Calfa *et al.*, 2013). Este efeito promotor do estresse por contenção foi bloqueado por um agonista GABAérgico na MCPdl (Giachero e Carobrez, 2016). Ainda, a fludrocortisona, um agonista de receptores mineralocorticoides (MR), potencializou os efeitos de NMDA na MCPdl, mimetizando uma liberação de corticosterona em uma situação aversiva. Neste último trabalho, a fludrocortisona foi microinjetada sistemicamente logo após o condicionamento (Sperandio, 2016). Estes resultados indicam que a MCPdl medeia os aspectos aversivos durante a aquisição de um condicionamento. Ainda, que os níveis de corticosteroides circulantes atuam na promoção da aprendizagem.

Em regiões como hipocampo e amígdala, foram detectadas interações entre receptores CB1 e corticosteroides sistêmicos (Campolongo, Roozendaal *et al.*, 2009; Atsak, Roozendaal *et al.*, 2012). O AM251 microinjetado nestas regiões impediu os efeitos promotores da corticosterona sobre a expressão da memória. Além disso, a corticosterona aumentou os níveis hipocampais de 2-AG. Portanto, apesar de terem sido estudados em fase diferente da memória, existem evidências de que os efeitos da corticosterona sejam decorrentes da interação com receptores CB1 no hipocampo e amígdala (Hill e McEwen, 2009). Portanto, os corticosteroides liberados sistemicamente em decorrência de um evento estressor atuam principalmente em estruturas de processamento emocional e cognitivo, influenciando a aprendizagem do evento.

Embora no hipocampo e amígdala a configuração de receptores CB1, TRPV1, NMDA e AMPA seja diferente da MCPdl, seria possível que os efeitos aqui observados sejam decorrentes também da interação local com receptores MR e glicocorticoides (GR). De fato, ainda não foi descartada a possibilidade de que a ativação de receptores MR ou GR na MCPdl possa influenciar o sistema NMDA-CB1/TRPV1-glutamato-AMPA aqui proposto (figuras 33 e 34).

A estimulação da MCPdl produz antinocicepção através da desinibição de neurônios dopaminérgicos na MCPv em uma via descendente (Meyer, Morgan *et al.*, 2009; Chia, Jonathan *et al.*, 2016). Portanto, os mecanismos opioides e dopaminérgicos na MCP parecem estar intimamente relacionados. De fato, a heteromerização de tais receptores tem sido o foco de estudo de alguns pesquisadores, pela multiplicidade de possíveis respostas frente aos agonistas (Ferré, Casadó *et al.*, 2014). Como a maioria das pesquisas sobre nocicepção estuda a porção ventral da MCP, até o presente momento, permanece desconhecida a influência da secreção de opioides ou dopamina na MCPdl sobre as respostas defensivas e aprendizagem. Os receptores opioides podem contribuir para a atividade na MCPdl, uma vez que também compõem heterômeros com receptores CB1 (figura 33 e 34). A associação com receptores delta opioides modifica a repercussão do eCB ligado ao receptor CB1 (Rozenfeld, Bushlin *et al.*, 2012) através da mudança na via de sinalização dependente de proteína G. Neste caso, a via de proteína G_i daria lugar à G_s ou G_q . Portanto, seria possível que as modificações após a experiência aversiva sejam relacionadas também a uma reorganização dos receptores CB1 e associação com receptores opioides, modificando o resultado final da atividade na MCPdl (figuras 34 e 35).

A microinjeção de noradrenalina na MCPdl provocou um aumento na pressão arterial média e uma consequente bradicardia, supostamente pela liberação de vasopressina na corrente sanguínea (Pelosi e Corrêa, 2005). No teste de exposição do rato ao odor de predador, a injeção sistêmica de um antagonista dos adrenoceptores que atravessa a barreira hematoencefálica (propranolol) bloqueou as respostas defensivas e o condicionamento contextual. Enquanto isso, a microinjeção de nadolol, um antagonista que não atravessa a barreira hematoencefálica, não interferiu sobre as respostas defensivas ou aprendizagem. Isto indica que a noradrenalina atuou em regiões encefálicas, promovendo respostas defensivas e aprendizagem (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008). De fato, a estimulação de receptores beta-adrenérgicos em uma estrutura hipotalâmica com intensa projeção glutamatérgica para a MCPdl promoveu aprendizagem (Pavesi, Canteras *et al.*, 2011). Portanto, os adrenoceptores na MCPdl ou em estruturas relacionadas podem ter contribuído para os efeitos observados neste trabalho. Possivelmente por um mecanismo indireto, no qual uma liberação sistêmica de adrenalina ocorreu pela manipulação dos animais. Esta adrenalina circulante poderia aumentar os níveis de noradrenalina central, diminuindo o limiar de ativação de estruturas que determinam as respostas defensivas, como a MCPdl. Ou ainda, a estimulação da MCPdl fez com que os níveis sistêmicos de adrenalina e noradrenalina aumentassem, ativando receptores noradrenérgicos encefálicos (figuras 34 e 35).

Apêndice C, Tabela 2: Moduladores da resposta defensiva microinjetados na MCPdl

Drogas	Ação	Modelo	Injeção/Avaliação	Resposta	Referência
Sistema endocanabinoide					
AEA	agonista CB1/TRPV1	LCE			(Moreira, Aguiar <i>et al.</i> , 2007)
		Vogel	aquis /aquis.		(Lisboa, Resstel <i>et al.</i> , 2008)
		LCE e Vogel		↓ respostas defensivas	(Batista, Fogaça <i>et al.</i> , 2015)
		exposição ao predador condicionamento contextual	expres. / expres.		(Lisboa, Camargo <i>et al.</i> , 2014) (Resstel, Lisboa <i>et al.</i> , 2008)
2-AG	agonista CB1/CB2	LCE	aquis. / aquis.	↓ respostas defensivas	(Almeida-Santos, Moreira <i>et al.</i> , 2013)
WIN55,212	agonista CB1/CB2	LCE	aquis. / aquis.	↓ respostas defensivas	(Campos e Guimarães, 2009)
ACEA	agonista CB1	LCE estimulação elétrica	aquis /aquis. expres. / expres.	↓ respostas defensivas	(Moreira, Aguiar <i>et al.</i> , 2007) (Casarotto, Terzian <i>et al.</i> , 2012)
HU210	agonista CB1	CA	aquis. / aquis.	↓ respostas defensivas	(Finn, Jhaveri <i>et al.</i> , 2003)
AEA + AM404	agonista CB1/TRPV1 e inibidor da recaptação de AEA	LCE	aquis. / aquis.	↓ respostas defensivas	(Moreira, Aguiar <i>et al.</i> , 2007)

Drogas	Ação	Modelo	Injeção/Avaliação	Resposta	Referência
AM404	inibidor da recaptção de AEA	Vogel	aquis. / aquis.	↓ respostas defensivas	(Lisboa, Resstel <i>et al.</i> , 2008)
		condicionamento contextual	expres. / expres.		(Resstel, Lisboa <i>et al.</i> , 2008)
URB597	Inibidor da FAAH	Vogel	aquis. / aquis.	↓ respostas defensivas	(Lisboa, Resstel <i>et al.</i> , 2008)
URB602	inibidor da enzima MGL	LCE	aquis. / aquis.	↓ respostas defensivas	(Almeida-Santos, Moreira <i>et al.</i> , 2013)
AM251	agonista inverso CB1	LCE	aquis. / aquis.	reduziu o efeito de 2-AG e de URB602	(Almeida-Santos, Moreira <i>et al.</i> , 2013)
		LCE		reverteu os efeitos de AEA	(Moreira, Aguiar <i>et al.</i> , 2007)
		exposição ao predador		reverteu os efeitos de AEA, AM404 e URB597	(Lisboa, Resstel <i>et al.</i> , 2008)
		Vogel		reverte os efeitos de ACEA, CPZ e SB366791	(Casarotto, Terzian <i>et al.</i> , 2012)
		estimulação elétrica		reverteu os efeitos de AEA e AM404	(Resstel, Lisboa <i>et al.</i> , 2008)
		condicionamento contextual		↑ respostas defensivas	(Uliana, Hott <i>et al.</i> , 2016)
			— respostas defensivas em dose alta	(Uliana, Hott <i>et al.</i> , 2016)	
SR141716A	antagonista CB1	CA	aquis. / aquis.	bloqueou o efeito de HU210	(Finn, Jhaveri <i>et al.</i> , 2003)

Drogas	Ação	Modelo	Injeção/Avaliação	Resposta	Referência
AM630	antagonista CB2	LCE	aquis. / aquis.	reduziu o efeito de 2-AG e de URB602	(Almeida-Santos, Moreira <i>et al.</i> , 2013)
Sistema vaniloide					
CAP	agonista TRPV1	condicionamento contextual	expres. / expres.	↑ respostas defensivas	(Uliana, Hott <i>et al.</i> , 2016)
		LCE	aquis /aquis.	↓ respostas defensivas	(Mascarenhas, Gomes <i>et al.</i> , 2013) (Terzian, Aguiar <i>et al.</i> , 2009)
CPZ	antagonista TRPV1	estimulação elétrica	expres. / expres.	↓ respostas defensivas	(Casarotto, Terzian <i>et al.</i> , 2012)
		LCE	aquis. / aquis.	reverteu a ausência de efeito das doses altas de WIN 55, 212 e canabidiol	(Campos e Guimarães, 2009)
		exposição ao predador	expres. / expres.	↓ respostas defensivas	(Terzian, Aguiar <i>et al.</i> , 2009)
SB366791	antagonista TRPV1	estimulação elétrica	expres. / expres.	reverteu os efeitos de CAP	(Mascarenhas, Gomes <i>et al.</i> , 2013)
				↓ respostas defensivas	(Aguiar, Almeida-Santos <i>et al.</i> , 2015)
				↓ respostas defensivas	(Casarotto, Terzian <i>et al.</i> , 2012)

Droga	Ação	Modelo	Injeção/Avaliação	Resposta	Referência
6-Iodo	antagonista TRPV1	LCE e Vogel	aquis. / aquis.	recuperação dos efeitos da AEA	(Batista, Fogaça <i>et al.</i> , 2015)
		condicionamento contextual	expres. / expres.	reverteu os efeitos de AM251	(Uliana, Hott <i>et al.</i> , 2016)
Sistema glutamatérgico					
NMDA	agonista NMDA	CA	aquis. / aquis.		(Aguiar, Moreira <i>et al.</i> , 2006)
		exposição ao predador	expres. / expres.	↑ respostas defensivas	(Carvalho-Netto, Gomes <i>et al.</i> , 2009)
		condicionamento olfatório	aquis. / expres.	↑ aprendizagem	(Kincheski, Mota-Ortiz <i>et al.</i> , 2012)
		sobressalto potencializado pelo medo	expres. / expres.	↑ respostas defensivas, perde efeito com dose maior	(Reimer, De Oliveira <i>et al.</i> , 2012)
		CA	expres. / expres.	↑ respostas defensivas em doses maiores	(Reimer, De Oliveira <i>et al.</i> , 2012)
		LTE	expres. / expres.	↑ respostas defensivas	(Bertoglio e Zangrossi, 2006)
		LCE	expres. / expres.	↑ respostas defensivas	(Moraes, Bertoglio <i>et al.</i> , 2008)
DLH	agonista NMDA	CA	aquis. / aquis.	↑ respostas defensivas	(Finn, Jhaveri <i>et al.</i> , 2003)
Glicina	coagonista NMDA	LCE	aquis. / aquis.	↑ respostas defensivas	(Schmitt, Coelho <i>et al.</i> , 1995)

Droga	Ação	Modelo	Injeção/Avaliação	Resposta	Referência
D-serina	coagonista parcial NMDA	LCE	aquis. / aquis.	↑ respostas defensivas	(Schmitt, Coelho <i>et al.</i> , 1995)
t-ACPD	agonista Glum1/2	CA	aquis /aquis.	↑ respostas defensivas	(Molchanov e Guimarães, 1999)
Cainato	agonista AMPA/cainato	sobressalto potencializado pelo medo	expres. / expres.	↑ respostas defensivas, perde efeito com dose maior	(Reimer, De Oliveira <i>et al.</i> , 2012)
		CA		↑ respostas defensivas em doses maiores	
AP7	antagonista NMDA	condicionamento contextual	expres. / expres.	reverteu os efeitos de AM251 e CAP	(Uliana, Hott <i>et al.</i> , 2016)
		LCE Vogel	aquis /aquis.	↓ respostas defensivas	(Molchanov e Guimarães, 2002)
		LTE	expres. / expres.	↓ respostas defensivas	(Bertoglio e Zangrossi, 2006)
AP5	antagonista NMDA	LCE	aquis. / expres.	↓ respostas defensivas	(Kincheski e Carobrez, 2010)
KYN	antagonista glutamatérgico	LCE	aquis. / aquis.	↓ respostas defensivas	(Schmitt, Graeff <i>et al.</i> , 1990)
7-CI-KY	antagonista glicina/NMDA	LCE	aquis. / aquis.	↓ respostas defensivas	(Matheus, Nogueira <i>et al.</i> , 1994)
HA-966	antagonista glicina/NMDA	LCE	aquis. / aquis.	↓ respostas defensivas	(Matheus, Nogueira <i>et al.</i> , 1994)

Droga	Ação	Modelo	Injeção/Avaliação	Resposta	Referência
Ifenprodil	antagonista glicina/NMDA	LCE	aquis. / expres.	↓ respostas defensivas	(Kincheski e Carobrez, 2010)
Sistema nitrérgico					
		condicionamento contextual	expres. / expres.	reverteu os efeitos de AM251 e CAP	(Uliana, Hott <i>et al.</i> , 2016)
NPLA	inibidor da NOSn	exposição ao predador	aquis /aquis.	reverteu os efeitos da alta dose de AEA	(Lisboa, Camargo <i>et al.</i> , 2014)
			expres. / expres.	↓ respostas defensivas	(Carvalho-Netto, Gomes <i>et al.</i> , 2009)
ODQ	inibidor da GCs	condicionamento contextual	expres. / expres.	reverteu os efeitos de AM251 e CAP	(Uliana, Hott <i>et al.</i> , 2016)
		LCE e Vogel	aquis. / aquis.	recuperação dos efeitos da AEA	(Batista, Fogaça <i>et al.</i> , 2015)
C-PTIO	sequestrador de NO	condicionamento contextual	expres. / expres.	reverteu os efeitos de AM251 e CAP	(Uliana, Hott <i>et al.</i> , 2016)
6-Iodo + C-PTIO	antagonista TRPV1 e sequestrador de NO	LCE e Vogel	aquis. / aquis.	↓ respostas defensivas	(Batista, Fogaça <i>et al.</i> , 2015)
Sistema serotoninérgico					
Canabidiol	agonista 5TH1A, inibidor da FAAH	LCE	aquis. / aquis.	↓ respostas defensivas	(Campos e Guimarães, 2009)

Droga	Ação	Modelo	Injeção/Avaliação	Resposta	Referência
DPAT	agonista 5TH1A	condicionamento olfatório	aquis. / expres.	↓ aprendizagem	(Kincheski, 2011; Webber, 2016)
				↑ aprendizagem na estimulação por NMDA 200 pmol	(Kincheski, 2011; Webber, 2016)
		estimulação elétrica	expres. / expres.	↓ respostas defensivas	(De Oliveira Sergio, De Bortoli <i>et al.</i> , 2011)
DOI	agonista 5HT2A	estimulação elétrica	expres. / expres.	↓ respostas defensivas	(De Oliveira Sergio, De Bortoli <i>et al.</i> , 2011)
WAY100135	antagonista 5HT1A	condicionamento olfatório	aquis. / expres.	↑ respostas defensivas, generalização quando associado a NMDA 200 pmol	(Kincheski, 2011)
				↑ aprendizagem na estimulação subefetiva de NMDA	(Kincheski, 2011)
Corticotrofina					
CRF	agonista CRF1 e CRF2	LCE	aquis. / aquis.	↑ respostas defensivas	(Martins, Marras <i>et al.</i> , 1997)
		exposição ao predador			(Carvalho-Netto, Gomes <i>et al.</i> , 2009)
		LTE			(De Oliveira Sergio, Spiacci Jr <i>et al.</i> , 2014)

Droga	Ação	Modelo	Injeção/Avaliação	Resposta	Referência
Colecistocinina					
CCK	agonista de receptores CCK1 e CCK2	LTE	aquis. / aquis.	↑ respostas defensivas	(Zanoveli, Netto <i>et al.</i> , 2004)
Sistema GABAérgico					
Bicuculina	antagonista GABA	condicionamento contextual	expres. / expres.	reverteu os efeitos da dose alta de AM251	(Uliana, Hott <i>et al.</i> , 2016)
		estimulação elétrica		reverteu o efeito de DOI, mas não de DPAT	(De Oliveira Sergio, De Bortoli <i>et al.</i> , 2011)
		condicionamento olfatório	aquis. / expres.	↑ respostas defensivas ↓ aprendizagem	(Zanella, 2015)
Semicarbazida	antagonista GABA	CA e CAL	aquis. / aquis. expres. / espres.	respostas defensivas	(Zanoveli e Brandão, 2008)
Muscimol	agonista GABA	CA e CAL	aquis. / aquis. expres. / espres.	reversão dos efeitos da semicarbazida	(Zanoveli e Brandão, 2008)
		estresse por contenção	aquis. / aquis. aquis. / expres.	↓ respostas defensivas	(Giachero e Carobrez, 2016)

Tabela 2, Apêndice C: Efeitos dos moduladores endocanabinoides, vaniloides, glutamatérgicos, nitrérgicos, serotonérgicos, corticotrofina, colecistocinina, e GABAérgicos microinjetados na MCPdl sobre as respostas defensivas e aprendizagem. LCE = labirinto em cruz elevado, Vogel = teste de lambear punido, CA = campo aberto, CAL = condicionamento de aversão ao local.