

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

Rimenez Rodrigues de Souza

**PAPEL DOS CORTICOSTEROIDES NO PROCESSAMENTO DE
MEMÓRIAS AVERSIVAS: CONSEQUÊNCIAS BIDIRECIONAIS
NO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO DE MEDO**

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Pádua Carobrez.

Florianópolis
2011

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

S729p Souza, Rimenez Rodrigues de
Papel dos corticosteroides no processamento de memórias
aversivas [tese] : consequências bidirecionais no
condicionamento olfatório de medo / Rimenez Rodrigues de Souza
; orientador, Antônio de Pádua Carobrez. - Florianópolis, SC,
2011.
106 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Animais de laboratório - Comportamento.
3. Glicocorticoides. 4. Mineralocorticóides. 5. Memória. I.
Carobrez, Antonio de Padua. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III.
Titulo.

CDU 615

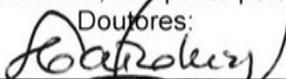
**PAPEL DOS CORTICOSTEROIDES NO
PROCESSAMENTO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS:
CONSEQUÊNCIAS BIDIRECIONAIS NO
CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO DE MEDO**

por

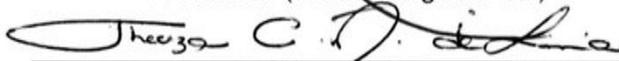
RIMENEZ RODRIGUES DE SOUZA

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros
da Banca Examinadora, composta pelos Professores

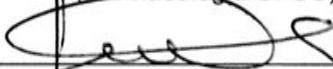
Doutores:



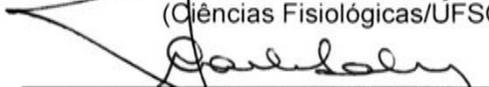
Prof. Dr. Antonio de Padua Carobrez
Presidente (Farmacologia/UFSC)



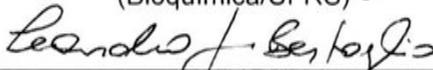
Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima
(Farmacologia/UFSC)



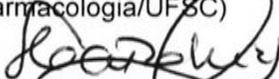
Prof. Dr. José Marino Neto
(Ciências Fisiológicas/UFSC)



Profa. Dra. Carla Dalmaz
(Bioquímica/UFRS)



Prof. Dr. Leandro José Bertoglio
(Farmacologia/UFSC)



Prof. Dr. Antonio de Padua Carobrez
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC

Florianópolis, 22 de Setembro de 2011.

MINHA MÃE, ANA

Por seu apoio, sua paciência, sua compreensão, e pelo amor incondicional aos seus filhos.

MEU PAI, LUIZ

Pelos princípios inabaláveis que têm me guiado.

MINHA ESPOSA, LUANA

Por permitir que eu compartilhe meu amor e também minhas sandices, e, principalmente, por fazer tudo valer a pena.

Este trabalho é dedicado a vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao professor Antônio de Pádua Carobrez, pelo exemplo de caráter e de mediador do conhecimento. Por me contaminar com a excitação pelo questionamento e também pela arte. Pelo senso crítico, pela amizade e, acima de tudo, por permitir que a minha formação acadêmica tenha sido um processo prazeroso e divertido;

Aos membros do Departamento de Farmacologia da UFSC, pelo belo trabalho como mediadores do conhecimento, e por permitirem meu acesso aos seus laboratórios;

Aos professores Thereza Christina Monteiro de Lima e José Marino Neto, por estenderem suas mãos neste período de transição e por gentilmente avaliarem este trabalho;

Aos professores Carla Dalmaç e Leandro José Bertoglio, pela generosidade de avaliar este trabalho e contribuírem com a minha formação;

Aos “amigos” Fabrício H. M. do Monte e Rafael M. Bittencourt, para os quais não acho palavras que definam o período em que dividimos ciência e diversão;

Meu eterno agradecimento ao grupo do Laboratório de Neurobiologia Comportamental, Grasi, Ju Kroon, Fabrício, Ju Cavalli, Eloisa, Cris, Frank, Taiane e, mais recentemente, Karina e Naty, pela força, pelo debate científico e pelas críticas. Pelos sorrisos, pela alegria e pela paciência com os meus devaneios;

Aos companheiros da república Juriti 301, Rafael (Mad), Gilliard (Gillioswaldo), Murilo (Murça), Gustavo (Logosofinas) e

Henrique (Nariz), por me ensinarem o valor que a palavra amizade possui;

Minha admiração aos professores (e tios) Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza e Dra. Azair Canto de Souza, por me apontarem o caminho da pesquisa, pelo incentivo e pela troca de idéias durante os verões destes últimos quatro anos;

Aos demais colegas de pós-graduação, aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UFSC, e a todos aqueles que, direta ou indiretamente, possibilitaram a realização deste trabalho;

Ao governo brasileiro que, através da CAPES, do CNPq, da FAPESP e das demais agências de fomento, tem financiado a pesquisa e o desenvolvimento da nossa nação;

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”
Cora Coralina (1889 – 1985), poetisa Brasileira

RESUMO

O funcionamento anormal dos receptores corticosteroides no cérebro tem sido apontado como peça fundamental para o desenvolvimento de psicopatologias no homem, tais qual a depressão e alguns transtornos de ansiedade, como o Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT). O TEPT é uma patologia comum às situações traumáticas ou de estresse intenso, e o desenvolvimento da patologia parece envolver a ação dos corticosteroides nos mecanismos de armazenamento e gerenciamento de memórias relacionadas ao trauma. O presente trabalho buscou investigar o papel de agonistas dos receptores corticosteroides GR (glicocorticoide) e MR (mineralocorticoide) na aquisição, consolidação, e expressão de memórias aversivas, utilizando o paradigma do Condicionamento Olfatório de Medo (COM). Ratos *Wistar* machos foram submetidos ao paradigma experimental do COM, que consiste de duas fases: a aquisição do COM pela associação entre os estímulos condicionado (EC; odor) e incondicionado (EI; choques elétricos nas patas; 0,4mA, 2s) em uma caixa de condicionamento, e a expressão do COM pela exposição ao estímulo condicionado (odor) em uma caixa de exposição ao odor. Inicialmente, quatro grupos experimentais foram condicionados com crescentes intensidades do EI para avaliar a eficiência do condicionamento. Os níveis séricos de corticosterona foram avaliados após o condicionamento e após a expressão da resposta condicionada. Os resultados comportamentais apontaram que as respostas emocionais condicionadas (RECs) mais robustas foram obtidas com a utilização de cinco choques em uma sessão de 4 min de exposição ao EC. O condicionamento com cinco choques, mas não com um, promoveu intensa liberação de corticosterona 30 min após o condicionamento ou a exposição ao EC. Foi também avaliado o papel de agonistas dos receptores corticosteroides nas diferentes etapas de aprendizado, utilizando os agonistas GR dexametasona (DEX) e MR fludrocortisona (FLU). Os resultados mostraram que a administração de DEX ou FLU na dose de 3,0 mg/kg, imediatamente após o condicionamento com um choque, promoveu intensa facilitação do condicionamento, observado pelo aumento das RECs em exposição ao EC. De maneira oposta, a administração de DEX 3,0 mg/kg ou FLU 3,0 mg/kg, 60 min antes do condicionamento com cinco choques, promoveu um prejuízo na aquisição do condicionamento, observado pelo prejuízo na exibição das RECs em exposição ao EC. A administração de DEX 1,0 mg/kg, 60 min antes da evocação, também prejudicou a expressão das RECs. Já a

administração de FLU 1,0 mg/kg, 60 min antes da evocação, prejudicou pontualmente a REC, observado pela redução apenas da avaliação de risco. Também foi observado que o tratamento com DEX ou FLU, na dose de 1,0 mg/kg, causou intensa supressão do eixo HPA em resposta ao condicionamento com cinco choques. Em resumo, os dados do presente trabalho reforçam o COM como ferramenta para o estudo das memórias aversivas e sugerem um papel temporal bidirecional dos corticosteroides, fortalecendo memórias recém-formadas ao atuarem em torno do estímulo a ser lembrado, mas prejudicando o seu processamento quando sua ação se dá em determinado tempo antes da aquisição ou da expressão do condicionamento.

Palavras-chave: Condicionamento olfatório. Estresse. Glicocorticoides. Mineralocorticoides. Memórias aversivas.

ABSTRACT

The abnormal function of brain corticosteroid receptors has been suggested as the central core of some psychiatric conditions such as depression and anxiety disorders, as well as the post-traumatic stress disorder (PTSD). PTSD is a common reaction after the exposure to traumatic situations or intense stress and the general process involves the actions of stress hormones over the storage and management mechanisms of the trauma-related memories. In this way, the present study was designed to investigate the role of corticosteroid GR (glucocorticoid) and MR (mineralocorticoid) receptors over the aversive memory acquisition, consolidation and expression using the Olfactory Fear Conditioning (OFC) paradigm. Male *Wistar* rats were exposed to the OFC protocol, which consisted of two phases: the OFC acquisition by association between the conditioned (CS; odor) and the unconditioned stimuli (US; footshock; 0,4 mA, 2 s) in the conditioning chamber, and the conditioned emotional response (CER) expression by the exposure to the CS in the olfactory box. Initially, four experimental groups were conditioned with crescent US intensities in order to evaluate the most efficient conditioning protocol. Serum levels of corticosterone were also evaluated after conditioning and exposure to the CS. The first results demonstrated that the most robust defensive CER was observed with five paired footshocks along with a 4 min CS exposure. The five footshock conditioning, but not one, promoted intense corticosterone release, both 30 min after conditioning or CS exposure. We have also evaluated the role of corticosteroid receptor agonists over different learning phases using the GR agonist dexamethasone (DEX) and the MR agonist fludrocortisone (FLU). The results pointed out that DEX or FLU injection (at 3.0 mg/kg doses) immediately after conditioning with one footshock promoted intense conditioning facilitation, showed by the CERs increasing in the exposure to the CS. On the other hand, impairment of memory acquisition was observed when DEX or FLU (3.0 mg/kg) was administered 60 min prior the five footshock conditioning. Administration of DEX (1.0 mg/kg) 60 min before memory retrieval also impaired expression of the CERs to the CS. Administration of FLU (1.0 mg/kg) 60 min prior the retrieval impaired CERs in a specific manner, by reducing risk assessment behavior. DEX or FLU, at 1.0 mg/kg doses, caused an intense suppression of the HPA axis in response to five footshock conditioning session. In summary, the present study reinforces the OFC protocol as a useful tool to understand the

neurobiology of trauma-related memories and supports a temporal bidirectional role for the corticosteroids, strengthening new formed memories when acting around the task to be remembered, but impairing memory function when acting in a certain time before the conditioning acquisition or expression.

Keywords: Aversive memories. Olfactory conditioning. Glucocorticoid. Mineralocorticoid. Stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Colocalização central para a ação dos mediadores da resposta ao estresse. Nestas áreas, ao menos duas classes de mediadores são altamente expressas. O receptores adrenérgicos do subtipo β_1 (β_1), os receptores para o hormônio liberador de corticotrofinas dos subtipos 1 e 2 (CRH1 e CRH2), e os receptores mineralo e glicocorticoide (MR e GR) são expressos agrupadamente em áreas estratégicas (“hot spots”) como o córtex pré-frontal, núcleos específicos da amígdala (central, medial e basolateral), no giro denteado e nas áreas CA1 e CA3 do hipocampo, no septo lateral e no núcleo paraventricular do hipotálamo. Tais zonas fazem parte de redes que controlam a resposta ao estresse, o aprendizado e a memória, a tomada de decisão, além de respostas hormonais e autonômicas relacionadas às emoções. (adaptado de JOELS e BARAM, 2009). 11

Figura 2: Níveis de corticosteróides após a exposição a um estressor e durante sobre as diferentes fases do aprendizado relacionado. Inicialmente, os corticosteróides atuam sobre os receptores do subtipo mineralocorticoide (MR), favorecendo as etapas de aquisição e consolidação, enquanto os receptores do subtipo glicocorticoide (GR) promovem a normalização dos processos e a supressão neuronal em uma etapa mais tardia, protegendo a informação recém adquirida contra a entrada de novos estímulos não relacionados. O deslocamento na curva (p. ex.: caso um estresse ocorra antes da tarefa a ser aprendida) para a esquerda (antes) ou para a direita (após) prejudica as diferentes fases do aprendizado. Legenda: CHR = Hormônio Liberador de Corticotrofinas..... 12

Figura 3: Circuitos ativados em resposta ao estresse. Caso os sistemas sensoriais percebam alguma ameaça (p.ex. odor de um predador), o cérebro ativa duas principais linhas de defesa: a via rápida pelo sistema nervoso autonômico (SNA, em cinza), e também uma via lenta pelo eixo hipotálamo – pituitária - adrenal (HPA, em vermelho). A primeira linha (em azul) parte da ativação da amígdala (AM), que estimula o hipotálamo, o qual irá iniciar a resposta pelo SNA secretando um coquetel composto por 20% de noradrenalina (NA) e 80% de adrenalina (A) pela medula da glândula suprarrenal. Esta ativação autonômica promove ainda a liberação de noradrenalina no cérebro via núcleo do trato solitário e locus coeruleus. A segunda linha de defesa inicia sua resposta com a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), que por sua age sobre

a hipófise anterior liberando o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea. Em consequência, o ACTH viaja até o córtex da glândula suprarrenal induzindo a secreção de corticosteroides (CORT). Em conjunto, as ações rápidas despertam os sistemas sensoriais, e põem o organismo em estado de alerta aumentando a atenção e a vigilância. Em contrapartida, as ações lentas iniciam a tecidual, mobilizam as reservas de energia e preparam o organismo para o futuro através da ação sobre áreas cerebrais como a amígdala (AM), o córtex pré-frontal (CPF) e o hipocampo (HPC). A alça de retroalimentação negativa exercida pelos corticosteroides é feita em nível rápido sobre o hipotálamo e pituitária, e lento sobre a formação hipocampal. (adaptado de JOELS e BARAM, 2009; e SCHWABE, WOLF et al., 2010). 14

Figura 4: Modelos representativos das caixas de a) condicionamento, e b) exposição ao odor. 28

Figura 5: Representação esquemática do protocolo do condicionamento olfatório de medo durante os 5 dias de experimento. Legenda: NP – não pareado 5 choques; FAM – sessão de familiarização na caixa de condicionamento; EC + EI – estímulo condicionado (odor) + estímulo incondicionado (choque nas patas); FAM – sessão familiarização na caixa de odor; EC-I – sessão de exposição ao estímulo condicionado I (odor); e EC-II – sessão de exposição ao estímulo condicionado II (contexto). 30

Figura 6: Representação esquemática do protocolo de COM para coleta de sangue e dosagem dos níveis séricos de corticosterona. Coletas: A) após o condicionamento e B) após o teste EC-I. Legenda: FAM – sessão de familiarização na caixa de condicionamento; EC + EI – estímulo condicionado (odor) + estímulo incondicionado (choque nas patas); FAM – sessão familiarização na caixa de odor; EC-I – sessão de exposição ao estímulo condicionado I (odor); e EC-II – sessão de exposição ao estímulo condicionado II (contexto). 31

Figura 7: Representação esquemática do experimento de avaliação dos efeitos da dexametasona (DEX) administrada imediatamente após o condicionamento com 1 choque. 32

Figura 8: Representação esquemática do experimento de avaliação dos efeitos da fludrocortisona (FLU) administrada imediatamente após o condicionamento com 1 choque. 33

| | |
|---|----|
| Figura 9: Representação esquemática do experimento de avaliação dos efeitos da dexametasona (DEX) administrada 60 min antes do condicionamento. | 34 |
| Figura 10: Representação esquemática do experimento de avaliação do papel temporal da administração de fludrocortisona (FLU) 60 min antes do condicionamento. | 35 |
| Figura 11: Representação esquemática da avaliação do papel temporal da administração de dexametasona 60 min antes da evocação da memória olfatória aversiva. | 35 |
| Figura 12: Representação esquemática da avaliação do papel temporal da administração de fludrocortisona (FLU) 60 min antes da evocação da memória olfatória aversiva. | 36 |
| Figura 13: Diagrama superior: padronização do condicionamento olfatório de medo (COM) com diferentes protocolos de associação. Painéis inferiores: a) porcentagem de tempo próximo à fonte de odor durante as três sessões de experimento. b) porcentagem de tempo escondido no compartimento fechado. Os valores comportamentais basais de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os histogramas verticais representam a média \pm e.p.m. em cada sessão (EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ comparado ao grupo não pareado 5, na respectiva sessão (n=8-9/grupo). | 41 |
| Figura 14: Padronização do condicionamento olfatório de medo (COM) com diferentes protocolos de associação. a) tempo em avaliação de risco (head-out) e b) parâmetros de locomoção (número de cruzamentos). Os valores basais, de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os pontos representam a média \pm e.p.m. dos grupos em cada sessão (FAM, EC-I e EC-II). Legenda: ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,0005$ comparados ao grupo não pareado 5, na respectiva sessão (n=8-9/grupo). | 42 |
| Figura 15: Exemplo dos planos de posicionamento (painel esquerdo) e locomoção (painel direito) na caixa de odor (EC-I) de animais submetidos aos diferentes protocolos de associação. No plano de posicionamento, a temperatura de cor se correlaciona com o tempo de permanência em determinado local da caixa durante a sessão (min máx). No plano de locomoção, a linha violeta indica por onde o animal | |

transitou durante a sessão. Legenda: A) Não pareado 5; B) Pareado1; C) Pareado 3; e D) Pareado 5..... 43

Figura 16: Análise dos padrões de locomoção dos diferentes grupos submetidos à padronização do COM. Os histogramas horizontais representam a média \pm e.p.m. dos grupos na sessão EC-I. Legenda: ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,0005$ comparado ao grupo não pareado 5 na respectiva sessão (n=8-9/grupo)..... 44

Figura 17: Painel superior: representação esquemática do protocolo de COM para coleta de sangue e dosagem dos níveis séricos de corticosterona. Painéis inferiores: níveis séricos de corticosterona em animais submetidos COM em diferentes condições experimentais. a) coleta A, 30 min após a sessão de condicionamento; e b) coleta B, 30 min após a sessão EC-I. Legenda: * $p < 0,05$ comparado ao grupo não pareado, e +++ $p < 0,0005$ comparado a todos os grupos na respectiva sessão (n=5-6/grupo)..... 46

Figura 18: Diagrama superior: representação do protocolo de facilitação com a administração de dexametasona após o condicionamento com 1 choque. Painéis inferiores: efeitos da administração de veículo (Controle) ou dexametasona (DEX 1 ou 3 mg/kg) imediatamente após o condicionamento com 1 choque. Um grupo adicional foi administrado com dexametasona na ausência de pareamento (DEX 3 mg s/c – sem choque). As colunas verticais representam os parâmetros de porcentagem de tempo a) próximo da fonte de odor e b) tempo escondido. Os valores comportamentais basais de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os histogramas verticais representam a média \pm e.p.m. em cada sessão (EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ comparados ao grupo controle na respectiva sessão (n=6-9/grupo)..... 49

Figura 19: Avaliação dos efeitos da administração de veículo (Controle) ou dexametasona (DEX 1 ou 3 mg/kg) imediatamente após o condicionamento com um choque sobre a) o tempo em avaliação de risco (head-out) e b) o parâmetro de locomoção (número de cruzamentos). Um grupo adicional foi administrado com dexametasona na ausência de pareamento (DEX 3 mg s/c – sem choque). Os valores basais de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os pontos representam a média \pm e.p.m. dos grupos em cada

sessão (FAM, EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0005$ comparados ao grupo controle na respectiva sessão (n=6-9/grupo)..... 50

Figura 20: Diagrama superior: representação do protocolo de facilitação com a administração de fludrocortisona após o condicionamento com 1 choque. Painéis inferiores: efeitos comportamentais da administração de veículo (Controle) ou fludrocortisona (FLU 1 ou 3 mg/kg) imediatamente após o condicionamento com 1 choque. Um grupo adicional foi administrado com fludrocortisona na ausência de pareamento (FLU 3 mg s/c – sem choque). As colunas verticais representam os parâmetros de porcentagem de tempo a) próximo da fonte de odor e b) escondido. Os valores comportamentais basais de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os histogramas verticais representam a média \pm e.p.m. em cada sessão (EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle na respectiva sessão (n=8-9/grupo)..... 52

Figura 21: Avaliação dos efeitos da administração de veículo (Controle) ou fludrocortisona (FLU 1 ou 3 mg/kg sobre a) o tempo em avaliação de risco (head-out) e b) o parâmetro de locomoção (número de cruzamentos). Um grupo adicional foi administrado com fludrocortisona na ausência de pareamento (FLU 3 mg s/c – sem choque). Os valores basais, de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os pontos representam a média \pm e.p.m. dos grupos em cada sessão (FAM, EC-I e EC-II). Legenda: ** $p < 0,005$ comparados ao grupo controle na respectiva sessão (n=6-9/grupo)..... 53

Figura 22: Diagrama superior: representação do protocolo do COM com a administração de dexametasona antes da sessão de condicionamento. Painéis inferiores: efeitos da administração de veículo (Controle) ou dexametasona (DEX 1 ou 3 mg/kg) 60 min antes do condicionamento com 5 choques. Um grupo adicional foi administrado com dexametasona 20 min antes do condicionamento (DEX 3 mg - 20 min). As colunas verticais representam os parâmetros de porcentagem de tempo a) próximo da fonte de odor e b) escondido. Os valores comportamentais basais de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os histogramas verticais representam a média \pm e.p.m. em cada sessão (EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ comparados ao grupo controle na respectiva sessão (n=7-15/grupo).... 56

Figura 23: Avaliação dos efeitos da administração de veículo (Controle) ou dexametasona (DEX 1 ou 3 mg/kg) 60 min antes do condicionamento, sobre a) o tempo em avaliação de risco (head-out) e b) o parâmetro de locomoção (número de cruzamentos). Um grupo adicional foi administrado com dexametasona 20 min antes do condicionamento (DEX 3 mg – 20 min). Os valores basais, de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os pontos representam a média \pm e.p.m. dos grupos em cada sessão (FAM, EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ comparados ao grupo controle na respectiva sessão (n=7-15/grupo)..... 57

Figura 24: Diagrama superior: representação do protocolo do COM com a administração de fludrocortisona antes da sessão de condicionamento. Painéis inferiores: efeitos da administração de veículo (Controle) ou fludrocortisona (FLU 1 ou 3 mg/kg) 60 min antes do condicionamento com 5 choques. Um grupo adicional foi administrado com fludrocortisona 20 min antes do condicionamento (FLU 3 mg - 20 min). As colunas verticais representam os parâmetros de porcentagem de tempo a) próximo da fonte de odor e b) escondido. Os valores comportamentais basais de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os histogramas verticais representam a média \pm e.p.m. em cada sessão (EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle na respectiva sessão (n=6-10/grupo). 59

Figura 25: Avaliação dos efeitos da administração de veículo (Controle) ou fludrocortisona (FLU 1 ou 3 mg/kg) 60 min antes do condicionamento, sobre a) o tempo em avaliação de risco (head-out) e b) o parâmetro de locomoção (número de cruzamentos). Um grupo adicional foi administrado com fludrocortisona 20 min antes do condicionamento (FLU 3 mg – 20 min). Os valores basais, de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os pontos representam a média \pm e.p.m. dos grupos em cada sessão (FAM, EC-I e EC-II). Legenda: ** $p < 0,005$ comparado ao grupo controle na respectiva sessão (n=6-10/grupo)..... 60

Figura 26: Diagrama superior: representação do protocolo do COM com a administração de dexametasona antes da sessão de teste EC-I. Painéis inferiores: efeitos da administração de veículo (Controle) ou dexametasona (DEX 1 ou 3 mg/kg) 60 min antes do sessão de teste EC-

I. Um grupo adicional foi administrado com dexametasona 20 min antes da sessão de teste EC-I (DEX 1 mg - 20 min). As colunas verticais representam os parâmetros de porcentagem de tempo a) próximo da fonte de odor e b) escondido. Os valores comportamentais basais de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os histogramas verticais representam a média \pm e.p.m. em cada sessão (EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ comparado ao grupo controle na respectiva sessão (n=9-12/grupo). 63

Figura 27: Avaliação dos efeitos da administração de veículo (Controle) ou dexametasona (DEX 1 ou 3 mg/kg) 60 min antes da sessão de teste EC-I, sobre a) o tempo em avaliação de risco (head-out) e b) o parâmetro de locomoção (número de cruzamentos). Um grupo adicional foi administrado com dexametasona 20 min antes da sessão teste EC-I (DEX 1 mg - 20 min). Os valores basais, de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os pontos representam a média \pm e.p.m. dos grupos em cada sessão (FAM, EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ comparados ao grupo controle na respectiva sessão (n=6-10/grupo). 64

Figura 28: Diagrama superior: representação do protocolo do COM com a administração de fludrocortisona antes da sessão de teste EC-I. Painéis inferiores: efeitos da administração de veículo (Controle) ou fludrocortisona (FLU 1 ou 3 mg/kg) 60 min antes da sessão de teste EC-I. Um grupo adicional foi administrado com fludrocortisona 20 min antes da sessão de teste EC-I (FLU 1 mg - 20 min). As colunas verticais representam os parâmetros de porcentagem de tempo a) próximo da fonte de odor e b) escondido. Os valores comportamentais basais de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os histogramas verticais representam a média \pm e.p.m. em cada sessão (EC-I e EC-II) (n=6-10/grupo). 66

Figura 29: Avaliação dos efeitos da administração de veículo (Controle) ou fludrocortisona (FLU 1 ou 3 mg/kg) 60 min antes da sessão de teste EC-I, sobre a) o tempo em avaliação de risco (head-out) e b) o parâmetro de locomoção (número de cruzamentos). Um grupo adicional foi administrado com fludrocortisona 20 min antes da sessão de teste EC-I (FLU 3 mg - 20 min). Os valores basais, de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa

hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os pontos representam a média \pm e.p.m. dos grupos em cada sessão (FAM, EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ comparados ao grupo controle na respectiva sessão (n=9-11/grupo)..... 67

Figura 30: Painel superior: procedimento experimental. Painel direito: Efeito do tratamento (60 min antes) com veículo (Controle), dexametasona (DEX 1 mg/kg) ou fludrocortisona (FLU 1 mg/kg) sobre a atividade do eixo HPA em resposta ao estresse (COM; 5 choques). Legenda: +++ $p < 0,0005$ comparados ao grupo controle (n=6/grupo)... 69

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Resumo das atividades não genômicas e genômicas dos receptores MR e GR sobre a dinâmica celular. (1) efeitos pré-sinápticos e (2) pós-sinápticos..... | 18 |
| Tabela 2: Duração das sessões experimentais nas caixas de condicionamento e de exposição ao odor..... | 28 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACTH* – Hormônio adrenocorticotrófico
AOS – Sistema olfatório acessório
COM – Condicionamento olfatório de medo
CRH – Hormônio liberador de corticotrofina
EC – Estímulo condicionado
EI – Estímulo incondicionado
GRs – Receptores glicocorticoides
HPA – Hipotálamo-pituitária-adrenal
MOS – Sistema olfatório principal
MRs – Receptores mineralocorticoides
PVN – Núcleo paraventricular do hipotálamo
RC – Resposta condicionada
REC – Resposta emocional condicionada
SNA – Sistema nervoso autonômico
SNC – Sistema nervoso central
TEPT – Transtorno do estresse pós-traumático
TAG – Transtorno de ansiedade generalizada

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 | AS RESPOSTAS DE MEDO E ANSIEDADE | 1 |
| 1.2 | ALÉM DA FRONTEIRA: O TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO (TEPT) | 3 |
| 1.3 | MODELANDO MEMÓRIAS TRAUMÁTICAS PELO CONDICIONAMENTO DE MEDO | 5 |
| 1.3.1 | Fases do condicionamento de medo..... | 6 |
| 1.3.2 | O Condicionamento Olfatório de Medo (COM)..... | 6 |
| 1.5 | OS CORTICOSTEROIDES COMO NEUROEFETORES DA RESPOSTA DE ESTRESSE | 10 |
| 1.6 | NO CENTRO DA QUESTÃO: O EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL | 13 |
| 1.7 | “TIQUE-TAQUE” RÁPIDO E LENTO: OS RECEPTORES CORTICOSTEROIDES | 15 |
| 1.8 | COMO OS CORTICOSTEROIDES INFLUENCIAM AS DIFERENTES FASES DO APRENDIZADO? | 17 |
| 1.8.1 | Efeitos sobre a aquisição e consolidação de memórias ... | 19 |
| 1.8.2 | Efeitos sobre a expressão de memórias..... | 20 |
| 2 | OBJETIVOS E METAS..... | 24 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 3.1 | ANIMAIS | 25 |
| 3.2 | DROGAS | 25 |
| 3.3 | COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE E DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO | 26 |
| 3.4 | MODELO E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS | 27 |
| 3.4.1 | Experimento 1: Padronização do Condicionamento Olfatório de Medo..... | 29 |
| 3.4.2 | Experimento 2: Avaliação dos níveis séricos de corticosterona após as sessões de condicionamento e teste EC-I | 30 |
| 3.4.3 | Experimento 3: Efeitos da administração sistêmica aguda de agonistas GR e MR sobre um traço fraco de memória no condicionamento olfatório de medo..... | 32 |
| 3.4.4 | Experimento 4: Efeitos da administração sistêmica aguda de agonistas GR e MR sobre a AQUISIÇÃO do condicionamento olfatório de medo | 33 |
| 3.4.5 | Experimento 5: Efeitos da administração sistêmica aguda de agonistas GR e MR na EVOCAÇÃO da memória olfatória aversiva..... | 35 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.4.6 | <i>Experimento 6: Avaliação do efeito da administração sistêmica aguda de agonistas GR e MR sobre o eixo HPA em resposta a um estressor</i> | 36 |
| 3.5 | <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i> | 37 |
| 4 | RESULTADOS | 39 |
| 4.1 | <i>EXPERIMENTO 1: PADRONIZAÇÃO DO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO DE MEDO</i> | 39 |
| 4.2 | <i>EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA APÓS AS SESSÕES DE CONDICIONAMENTO E TESTE EC-I</i> 45 | 45 |
| 4.3 | <i>EXPERIMENTO 3: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA AGUDA DE AGONISTAS GR E MR SOBRE UM TRAÇO FRACO DE MEMÓRIA NO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO DE MEDO</i> | 47 |
| 4.4 | <i>EXPERIMENTO 4: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA AGUDA DE AGONISTAS GR E MR SOBRE A AQUISIÇÃO DO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO DE MEDO</i> | 54 |
| 4.5 | <i>EXPERIMENTO 5: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA AGUDA DE AGONISTAS GR E MR NA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA OLFATÓRIA AVERSIVA</i> | 61 |
| 4.6 | <i>EXPERIMENTO 6: AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA AGUDA DE AGONISTAS GR E MR SOBRE O EIXO HPA EM RESPOSTA A UM ESTRESSOR</i> | 68 |
| 5 | DISCUSSÃO | 70 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 85 |
| 7 | GLOSSÁRIO | 86 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 88 |

1 Introdução

Todos os organismos vivos tendem a buscar um equilíbrio dinâmico, o qual é conhecido como homeostase. Desta forma, qualquer ameaça a estabilidade deste balanço, seja física ou psicológica, desencadeia uma resposta de estresse, a qual por sua vez tem como consequência primordial reestabelecer a homeostase e promover adaptações (DE KLOET, VREUGDENHIL *et al.*, 1998; KOOLHAAS, KORTE *et al.*, 1999; DE KLOET, JOELS *et al.*, 2005). De maneira geral, todas as informações ligadas a um estressor detectadas pelos sistemas sensoriais, sejam elas interoceptivas, como por exemplo, mudanças na frequência cardíaca ou aumento dos níveis de lactato, ou exteroceptivas, tal qual o cheiro de um predador, são conduzidas ao cérebro, que por sua vez recruta diversos sistemas neurais e também neuroendócrinos visando minimizar os custos ao indivíduo (ULRICH-LAI e HERMAN, 2009). Assim, uma vez detectada uma ameaça, os sistemas sensoriais enviam as informações para um grupo de neurônios de extrema importância localizados no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), que por sua vez secreta o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e outro secretagogo, a vasopressina (VP), bem como outros neuropeptídeos que promovem a atividade dos eixos simpato-adrenomedular e hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Destes dois sistemas, o eixo HPA tem sido apontado como de extrema importância na regulação e controle de diversas funções, tanto comportamentais como cognitivas. Embora tais respostas possam ser de extrema importância para uma melhor adaptação dos indivíduos a situações de curto prazo, a ativação crônica ou um desequilíbrio temporário destas respostas de estresse pode contribuir para o desenvolvimento de estados psicopatológicos, como depressão ou transtornos de ansiedade, e para o comprometimento de diversas funções fisiológicas, como a diminuição da resposta imune, o desenvolvimento de hipertensão e a resistência à insulina, entre outros processos patológicos (SAPOLSKY, ROMERO *et al.*, 2000; MCEWEN, 2003).

1.1 As respostas de medo e ansiedade

As reações aversivas são parte das principais vias de indução da resposta de estresse, ativando uma ampla gama de mecanismos endócrinos que permitem ao organismo lidar com as ameaças. Ao mesmo tempo, tais respostas endócrinas também causam impacto no

cérebro, alterando a maneira com que os sistemas cognitivo e emocional processam as informações (SAPOLSKY, ROMERO *et al.*, 2000; MCEWEN, 2003).

O termo medo diz respeito tanto aos estados psicológicos quanto às respostas fisiológicas e motoras que ocorrem sob a forma de reação de defesa em resposta a um estímulo potencialmente ameaçador. Embora as definições de ansiedade estejam frequentemente ligadas à resposta de medo, conceitualmente três correntes já tentaram definir e identificar cada componente em separado. A primeira, compartilhada por Freud¹ e Skinner² nas décadas de 30 e 40, descreve a ansiedade como uma resposta a um estímulo potencial, enquanto que a resposta destinada a uma ameaça real e clara seria observada na reação de medo propriamente dito (1930 e 1941 apud BLANCHARD e BLANCHARD, 2008). A segunda corrente desta divisão conceitual define tais respostas de acordo com a relação com os comportamentos acompanhados. Desta forma, enquanto o conceito de medo parece permanecer o mesmo, a ansiedade passa a ser descrita em termos de sentimentos subjetivos de apreensão para o qual os processos cognitivos estão direcionados, podendo ser algo meramente potencial ou pouco específico, como maus resultados em determinada situação ou evento (BLANCHARD e BLANCHARD, 2008). O último e mais atual conceito sobre a distinção medo/ansiedade se refere ao tipo de processo em si. Desta forma, enquanto o medo é tido como uma resposta evolutivamente programada e adaptativa, a ansiedade seria provocada por processos mal adaptados (BLANCHARD e BLANCHARD, 2008). Assim, enquanto não existem “transtornos de medo” no DSM-IV (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, publicado pela associação americana de psiquiatria), a lista de transtornos de ansiedade e suas características expande a cada nova versão do manual. Portanto, embora a definição para a qual cada termo é empregado seja em geral feita sem uma distinção muito precisa, é de consenso geral que o termo ansiedade seria empregado quando a fonte de ameaça é incerta, ambígua ou irreal, associada a uma resposta emocional subjetivamente desagradável e focada nos pensamentos e cogitações ligados a resolução da situação, enquanto o medo seria uma resposta a um estímulo ameaçador eminente

¹ Freud, S. *Inhibitions, Symptoms and Anxiety*. London, Hogarth Press. 1930.

² Estes, W.K. and Skinner, B.F. Some quantitative properties of anxiety. **J. Exper. Psychol.**, 29: p390-400. 1941.

e envolveria reações elaboradas para o rápido desfecho da situação, como comportamentos de esquiva e fuga da situação (MCNAUGHTON e CORR, 2004; MAREN, 2007; BLANCHARD e BLANCHARD, 2008). Por fim, do ponto de vista neuroendócrino, tanto o medo quanto a ansiedade podem desencadear uma potente ativação hormonal, que por sua vez é determinante para a ligação entre memórias altamente resistentes e as situações de estresse (PACAK e PALKOVITS, 2001).

1.2 Além da fronteira: O Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT)

O transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) é uma patologia comum a situações traumáticas ou de estresse intenso, como assaltos, sequestros, desastres ou acidentes graves. A sintomatologia inclui revivências repetidas e indesejáveis do evento (as quais são geralmente muito vívidas), hiperexcitação, perda do controle emocional e esquiva dos estímulos relacionados (incluindo pensamentos) que podem evocar memórias ligadas ao trauma. Cerca de 60% dos pacientes experienciam pelo menos algum destes sintomas como consequência imediata do trauma (até três dias após) num processo conhecido como *reação aguda ao estresse*. No entanto, enquanto grande parte dos indivíduos se recupera em algumas semanas ou meses, em um grupo significativo os sintomas persistem, levando ao quadro clínico do TEPT (EHLERS e CLARK, 2000). Em uma revisão, Kessler e colaboradores (2005) reportam que nos EUA o TEPT possui uma incidência de 3,9% e uma prevalência de 1,9% na população. Além disto, estima-se que 7% da população irá experienciar o TEPT ao longo da vida (KESSLER, CHIU *et al.*, 2005). Um importante fator desencadeador do transtorno é a característica do estímulo causador, ou do trauma. Assim, dependendo da etiologia do trauma, diferentes incidências de TEPT são observadas. Pesquisas demonstram que entre as principais causas de TEPT estão sequestros, abuso sexual, ataques armados, catástrofes naturais, desastres, e guerras (TERR, 1981; PYNOOS, FREDERICK *et al.*, 1987; SACK, SEELEY *et al.*, 1997; KOROL, GREEN *et al.*, 1999). Atualmente, já está claro que mulheres são duas vezes mais predispostas a desenvolver o TEPT do que homens, e que a remissão dos sintomas também é três vezes menor em mulheres do que em homens (KESSLER, CHIU *et al.*, 2005). Portanto, o conjunto de dados disponíveis sugere que o desenvolvimento da doença é multifacetado, e envolve fatores biológicos (resiliência ou algum tipo de predisposição), ambientais (tipo de trauma) e culturais (existência de preparo prévio

contra determinada ameaça) (MCLEER, DEBLINGER *et al.*, 1988; NAJARIAN, GOENJIAN *et al.*, 1996; SHAW, APPLGATE *et al.*, 1996; MARCH, AMAYA-JACKSON *et al.*, 1997; MCCLOSKEY e WALKER, 2000).

Da maneira importante, sabe-se que outras comorbidades estão presentes nos pacientes com TEPT, como a depressão, outros transtornos de ansiedade e uso e abuso de drogas, o que acarreta em milhões de dólares em tratamentos, e uma considerável baixa de recursos humanos (KESSLER, SONNEGA *et al.*, 1995; WARNER, KESSLER *et al.*, 1995; GALEA, AHERN *et al.*, 2002; KESSLER, CHIU *et al.*, 2005).

Conceitualmente, o TEPT é considerado uma patologia dos sistemas de memória, onde as respostas se tornam amplificadas e, portanto, debilitantes. Trabalhos utilizando humanos e animais sugerem que haja na neurobiologia deste transtorno processos patológicos ligados a aquisição e à consolidação, mas também à expressão e a extinção de memórias (RAUCH, SHIN *et al.*, 2006; QUIRK e MUELLER, 2008). Em todos os casos, respostas inadequadas de estresse ou de ativação dos sistemas orgânicos relacionados, como o eixo HPA, parecem ser candidatos a contribuir para o desenvolvimento desta psicopatologia (BREMNER, RANDALL *et al.*, 1995).

Embora muito ainda tenha que ser feito para determinar a relação entre os corticoides e o TEPT, evidências experimentais sugerem uma clara relação entre o cortisol e a formação e armazenamento de memórias. Em animais de laboratório, já está bem claro que a consolidação da memória é aumentada quando a corticosterona é administrada durante ou imediatamente após aquisição, e que esta mesma administração provoca prejuízos quando realizada antes da evocação de memórias ou mesmo durante a aquisição de tarefas envolvendo memórias de curto prazo (MCGAUGH, CAHILL *et al.*, 1996; MCGAUGH e ROOZENDAAL, 2002; ROOZENDAAL, 2002; JOELS, PU *et al.*, 2006). Porém, estudos em humanos não têm demonstrado uma clara correlação entre disfunções no eixo HPA e o desenvolvimento do TEPT (PITMAN, SHIN *et al.*, 2001).

Joels e colaboradores (2006), buscando unificar os conhecimentos e desenvolver uma teoria mais clara para o processo, propuseram que o estresse agudo apenas facilita o aprendizado e o processo de consolidação quando: experienciado no contexto e por volta

do momento em que o evento a ser lembrado ocorre, e quando os hormônios e neurotransmissores liberados em resposta exercem suas funções nos mesmos circuitos cerebrais ativados pela situação. A tal fenômeno, os autores chamaram de convergência espaço-temporal (JOELS, PU *et al.*, 2006). Assim, tal hipótese poderia explicar como o estresse, dentro de um determinado contexto, induziria uma melhora na atenção aos estímulos e nos processos mnemônicos relacionados à informação, e em outros casos, prejudicaria o aprendizado e a evocação de memórias, processos essenciais na extinção de memórias.

1.3 Modelando memórias traumáticas pelo condicionamento de medo

Durante a primeira metade do século passado, a neurociência se voltou para o entendimento dos mecanismos das emoções. Nomes como Charles Sherrington, Walter Cannon, James Papez, Donald Hebb, Konrad Lorenz, Nikolaas Tinbergen e Frederic Skinner foram os pioneiros nesta área. O surgimento da ciência da cognição levou a importantes avanços na compreensão dos mecanismos de percepção, atenção, memória e processos cognitivos relacionados. Um dos grandes avanços feitos está no campo dos mecanismos cerebrais das emoções ligadas ao medo e ao aprendizado das respostas correlatas, e no contexto de um paradigma atribuído, denominado condicionamento de medo. Através deste novo paradigma, o medo pôde ser operacionalizado e, enfim, se tornou experimentalmente modelável (LEDOUX, 2000). Neste sentido, os sistemas cerebrais de medo têm sido tratados como uma série de circuitos de processamento que detectam e respondem ao perigo, muito mais do que um mecanismo de estados subjetivos.

O condicionamento Pavloviano de medo é um procedimento experimental no qual um estímulo condicionado neutro (EC), como um som, cheiro ou luz, é pareado (ou associado) a um estímulo aversivo incondicionado (EI), tipicamente um choque nas patas, levando ao aprendizado aversivo. Após uma, ou algumas associações, a apresentação do EC passa por si só a desencadear comportamentos de defesa, que incluem imobilidade, esquiva da fonte do estímulo, bem como padrões de atividade cerebral e secreção de hormônios de estresse. Assim, o medo aprendido não apenas gera respostas de defesa, mas permite que estímulos ambientais associados também o façam. Tipicamente, a ocorrência de processos associativos, que acarreta na indução destas respostas condicionadas (RCs), é observada na maioria das espécies animais (TULLY, 1997). Além disto, tais reações de defesa

ocorrem tanto na presença dos estímulos aprendidos quanto na presença de ameaças incondicionadas ou inatas, como por exemplo, a ameaça por estímulos provenientes de predadores (LEDOUX, 2000; APFELBACH, BLANCHARD *et al.*, 2005).

1.3.1 Fases do condicionamento de medo

Em estudos de condicionamento de medo, as respostas evocadas pelo EC são frequentemente medidas em sessões de aquisição e de exposição ao EC. A aquisição é o aprendizado inicial, ou a associação entre os estímulos condicionado (p. ex. odor) e incondicionado (p. ex. choque), em uma sessão geralmente chamada de treino ou condicionamento. A evocação, ou teste, é uma sessão utilizada para verificar a associação entre EC-EI, e é feita pela apresentação apenas do EC. Sessões de teste que são feitas dentro de uma janela de poucas horas avaliam memórias de curta duração, enquanto as que são realizadas após um período maior (tipicamente 24h) avaliam memórias de longo prazo. Sessões de avaliação entre memórias de curta e longa duração são utilizadas para o entendimento de como memórias instáveis se tornam estáveis (MCGAUGH, 2000; DUDAI, 2004). Sessões de teste, também podem ser chamadas de reativação, em referência a evocação das memórias estabelecidas, e são usadas para induzir um estado de labilidade, o qual ocorre sempre que memórias são evocadas. A labilidade que ocorre após a reativação promove degradação e síntese de novas proteínas, processo que parece determinar o fortalecimento da memória e sua estabilização (NADER, SCHAFE *et al.*, 2000; DUDAI, 2006). Entretanto, nesta etapa, a memória pode sofrer atualização em ambos os sentidos, inserindo novos aspectos para fortalecer ou para apagar a memória. Em um processo que envolve sucessivas reexposições (geralmente longas) ao EC e que é chamado de extinção, também podemos ver o desmembramento entre EC e EI e, este, por sua vez, envolve um novo aprendizado, o de que ambos os estímulos já não possuem ligação. Este último processo é menos robusto do que o de atualização por reconsolidação, e como resultado, a memória original pode ser recuperada espontaneamente (BOUTON, WESTBROOK *et al.*, 2006; JI e MAREN, 2007).

1.3.2 O Condicionamento Olfatório de Medo (COM)

A olfação é para muitas espécies o sentido mais desenvolvido. Utilizado para detectar e reconhecer coespecíficos, presas e predadores,

bem como para executar comportamentos relacionados à reprodução e alimentação, o olfato de roedores é um sentido extremamente sofisticado (BRENNAN e KEVERNE, 1997). Nestes animais, as áreas cerebrais dedicadas ao processamento dos estímulos olfatórios são muito maiores do que em outras espécies, refletindo uma relevância filogenética³ substancial (RESTREPO, ARELLANO *et al.*, 2004). Anatômica e funcionalmente, o sistema olfatório de ratos é dividido principalmente em dois sistemas quimiossensoriais: os sistemas olfatórios principal (MOS) e acessório (AOS). Enquanto o MOS estaria implicado na detecção de uma ampla variedade de odores presentes no ambiente, o AOS seria responsável pela comunicação intraespecífica e pela detecção de estímulos provenientes de outras espécies, como predadores (BRENNAN e KEVERNE, 1997). Entretanto, embora haja uma visão tradicional de que estes dois sistemas processem os estímulos de maneira segregada, estudos recentes têm demonstrado que ambos os sistemas principal e acessório podem ser ativados por odores em geral, e por feromônios⁴ e cairomônios⁵ (KOBAYAKAWA, KOBAYAKAWA *et al.*, 2007; ZUFALL e LEINDERS-ZUFALL, 2007; MUNGER, LEINDERS-ZUFALL *et al.*, 2009). Desta forma, a olfação exerce funções dominantes sobre o comportamento.

Neste sentido, estudos prévios demonstram que o aprendizado utilizando pistas olfatórias possui características únicas em relação às diferentes fases do armazenamento da informação (SLOTNICK, 2001). Baseando-se no condicionamento Pavloviano, Otto e colaboradores (1997; 2000) demonstraram que o condicionamento aversivo utilizando odores como estímulo condicionado resulta em uma associação robusta e de longo prazo entre o estímulo olfatório condicionado e o estímulo incondicionado (choque elétrico nas patas). Além disto, alguns achados mostram que odores previamente pareados com choques são muito eficazes em potencializar a resposta de sobressalto em ratos (RICHARDSON, VISHNEY *et al.*, 1999; PASCHALL e DAVIS, 2002) e também em prejudicar a extinção de outros condicionamentos (RICHARDSON, TRONSON *et al.*, 2002). Em adição, trabalhos recentes demonstraram que odores utilizados como estímulos condicionados em exposição a ratos, parecem ser os únicos estímulos

³ Ligada a processos adaptativos e evolutivos favoráveis.

⁴ Moléculas liberadas por indivíduos da mesma espécie (e.g. comunicação entre machos e fêmeas).

⁵ Odores envolvidos na comunicação interespecífica (e.g. presa x predador).

capazes de ativar o sistema hipotalâmico de defesa, uma rede neural ligada a respostas naturais de medo frente ao odor de predadores (CANTERAS, 2002; CANTERAS, KROON *et al.*, 2008).

Por estas razões, o condicionamento olfatório de medo tem sido amplamente utilizado para o entendimento das bases neurobiológicas das reações de defesa baseadas em memórias traumáticas (CANTERAS, KROON *et al.*, 2008; KROON e CAROBREZ, 2009).

1.4 O estresse como resposta adaptativa

O fisiologista americano Walter Cannon foi o primeiro a introduzir o termo “homeostase” para descrever os “*processos fisiológicos coordenados que mantêm a maioria dos estados padrões do organismo*” (CANNON, 1929). No entanto Cannon nunca utilizou o termo “estresse”. Em 1936, Hans Selye introduziu e popularizou o estresse como termo médico. O ponto de partida para a elaboração de sua teoria do estresse foi uma carta para o periódico *Nature* onde ele descrevia uma “tríade” produzida por uma variedade de estressores: 1) aumento da glândula adrenal, 2) ulceração gastrointestinal, e 3) atrofia do timo e linfonodos (para revisão, ver SELYE, 1998). Em 1950, Selye propôs o termo “síndrome de adaptação geral” (GAS), o qual, segundo ele, seria o conjunto de reações não específicas desencadeadas quando o organismo é exposto a um estímulo ameaçador e que era constituída de três fases consecutivas: os estágios de alarme, de resistência e de exaustão (SELYE, 1950). Porém, Selye parecia estar errado em um aspecto: a carência de especificidade das respostas de estresse frente aos estímulos. Assim, Mason (1971) em uma crítica à teoria de Selye, destacou que em resposta a diferentes estressores a atividade do eixo HPA poderia aumentar, diminuir ou permanecer inalterada, e desta forma a presença da tríade de Selye poderia não indicar a presença de estresse (MASON, 1971). Mason propôs ainda que a ansiedade e o medo fariam parte dos estímulos estressores que não possuíam especificidade na produção das respostas hormonais (MASON, 1971). Mais recentemente, Chrousos e Gold (1992) definiram o estresse como um estado de desarmonia ou homeostase ameaçada que leva a respostas específicas ou não, na qual a perda da especificidade seria desencadeada por um estado que excederia os limites homeostáticos (CHROUSOS e GOLD, 1992). Atualmente, sabe-se que de fato as respostas de estresse não são igualmente desencadeadas por diferentes estímulos, e que grande parte das diferenças no grau de ativação do eixo HPA nos

transtornos de ansiedade se devem não apenas a natureza do estímulo, mas também a outros fatores, como o *background* genético, o histórico de vida, a intensidade/frequência do estímulo, o contexto, o sexo e a idade, entre outros (PACAK e PALKOVITS, 2001; JOELS e BARAM, 2009).

Desde a metade do último século, quando a existência do eixo HPA foi proposta, extraordinários avanços têm sido feitos na descrição das ações dos hormônios do estresse em seus tecidos-alvos. Quando descritos pela primeira vez nos anos 30 por Hans Selye, os corticosteroides eram um tópico aparentemente destinado aos fisiologistas (ver SAPOLSKY, ROMERO *et al.*, 2000). Assim, com o passar dos anos, o interesse no campo cresceu e avançou não só nas descobertas de seu papel na dor e inflamação, mas em todo o organismo e em seus diversos sistemas e órgãos, incluindo o sistema nervoso central (SNC). Foi então, na década de 60, juntamente com uma avalanche de dados no campo dos neuropeptídeos, que os neurocientistas passaram a observar as ações dos corticosteroides no cérebro e suas ações sobre os mecanismos de emoção, tópicos que até aquela época não eram considerados “quentes” (ver DE KLOET, 2000). Hoje, o impacto do estresse nas funções cognitivas e nas emoções é amplamente reconhecido. Sabe-se, por exemplo, que o tipo de estressor influencia populações neuronais que detectam a ameaça em potencial, bem como áreas cerebrais específicas e hormônios específicos engajados na promoção de alterações adaptativas (PACAK e PALKOVITS, 2001; MCNAUGHTON e CORR, 2004; MCEWEN, 2007; RODRIGUES, LEDOUX *et al.*, 2009). Estressores físicos, como por exemplo, a perda de sangue, traumas ou frio, rapidamente recrutam regiões do tronco cerebral e hipotálamo, enquanto estímulos psicológicos, como situações traumáticas, empregam primariamente regiões ligadas à emoção (amígdala e córtex pré-frontal), aprendizado e memória (hipocampo) e tomada de decisão (córtex pré-frontal) (PACAK e PALKOVITS, 2001). Apesar disto, estes sistemas não são segregados, já que estressores físicos com frequência possuem aspectos psicológicos, e vice-versa (JOELS e BARAM, 2009). Sabe-se também que a duração do estresse influencia enormemente as respostas neuronais. Estímulos agudos, como a rápida aproximação de um automóvel, causam rápida atividade neural, com conseqüente aumento da secreção de hormônios do estresse, que de maneira geral, também retorna rapidamente aos níveis basais. Entretanto, estas situações, ainda que rápidas, podem causar mudanças na expressão gênica em sítios

neurais específicos no hipotálamo e hipocampo, por exemplo, alterando as respostas comportamentais futuras (MCEWEN, 2007). Por outro lado, o estresse crônico (que dura tipicamente semanas ou mais) promove alterações sustentadas na expressão de genes particulares, mudanças estruturais e nos padrões de disparo neuronal, que, se persistirem, podem levar a mudanças graves no funcionamento original de certas redes neurais, resultando em psicopatologias como a depressão, os transtornos de ansiedade, e até demência nos casos mais graves (JOELS, KARST *et al.*, 2007).

1.5 Os corticosteroides como neuroefetores da resposta de estresse

Do ponto de vista cognitivo, o estresse provém de ameaças reais ou potenciais que requerem ações e alterações comportamentais imediatas e também modificações nos comportamentos futuros. Essas mudanças são por sua vez determinadas por diferentes neuroefetores agindo durante e após a exposição a ameaças. De maneira geral, cada tipo de mediador possui suas particularidades do ponto de vista de ação. Tais características podem ser espaciais, que envolvem a localização de receptores em sítios cerebrais específicos e/ou a colocalização com outros mediadores (figura 1), mas também temporais, onde tanto sua liberação quanto o término de suas ações deve andar em concerto com as características do estímulo (p. ex.: intensidade, duração, repetição) e com o curso das respostas (figura 2) (JOELS e BARAM, 2009).

Um dos principais mediadores envolvidos no controle da resposta de estresse são os corticosteroides (cortisol no homem e a corticosterona em roedores). O cortisol é um corticosteroide secretado pelo córtex da glândula suprarrenal de maneira circadiana (controlando processos fisiológicos ao longo do dia), ou pulsátil (sob demanda, principalmente do estresse), diretamente na corrente sanguínea (LIGHTMAN, WILES *et al.*, 2008). Em geral, durante uma situação de estresse, os níveis plasmáticos aumentam rapidamente cerca 10 vezes acima dos níveis máximos circadianos, retornando aos níveis basais cerca de 1-3 horas após (DE KLOET, 1991).

O acesso dos corticosteroides aos receptores em áreas cerebrais é regulado por três fatores: a) uma globulina de ligação aos corticosteroides (CBG), b) a glicoproteína P de múltipla resistência a drogas (MDRpG), e c) o metabolismo pela desidrogenase 11 β -

hidroxiesteroide (11 HSD, principalmente tipo 1) (SECKL, 1997; BREUNER e ORCHNIK, 2002; NARANG, FRAGA *et al.*, 2008). A primeira se liga aos glicocorticoides naturais como a corticosterona e o cortisol, e alguns de seus metabólitos, mas não aos glicocorticoides sintéticos, como a dexametasona, impedindo a penetração no cérebro de esteroides ligados a ela. Entretanto a MDRpG transporta ativamente os esteroides sintéticos, e até certo ponto o cortisol, pela barreira hematoencefálica para fora do cérebro. Assim, os esteroides não penetram prontamente o cérebro, mas apenas em altas concentrações. Já no tecido cerebral, a enzima 11 HSD-1 converte os metabólitos da corticosterona e do cortisol de volta, assim reativando-os (MCEWEN, 2007), e permitindo que os aspectos centrais e periféricos de suas ações estejam em concerto (MASON, PARIANTE *et al.*, 2008). A princípio, todas as áreas cerebrais estão expostas a este hormônio, o que de certa forma contrasta o caráter localizacional das monoaminas e dos neuropeptídeos (para revisão, ver MILLAN, 2003).

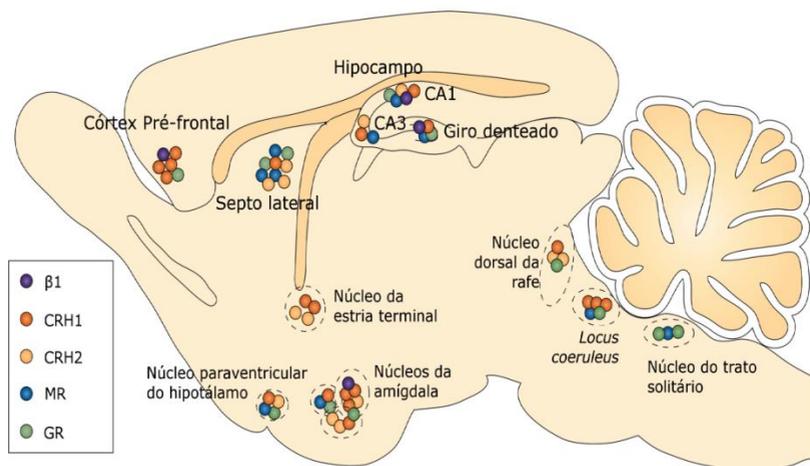


Figura 1: Colocalização central para a ação dos mediadores da resposta ao estresse. Nestas áreas, ao menos duas classes de mediadores são altamente expressas. O receptores adrenérgicos do subtipo $\beta 1$ ($\beta 1$), os receptores para o hormônio liberador de corticotrofinas dos subtipos 1 e 2 (CRH1 e CRH2), e os receptores mineralo e glicocorticoide (MR e GR) são expressos agrupadamente em áreas estratégicas (“hot spots”) como o córtex pré-frontal, núcleos específicos da amígdala (central, medial e basolateral), no giro denteado a nas áreas CA1 e CA3 do hipocampo, no septo lateral e no núcleo paraventricular do hipotálamo. Tais zonas fazem parte de redes que controlam a resposta ao estresse, o aprendizado e a memória, a tomada de decisão, além de respostas hormonais e autonômicas relacionadas às emoções. (adaptado de JOELS e BARAM, 2009).

Outro fator determinante para suas ações no SNC é a localização de seus receptores, que no cérebro dos mamíferos constitui os subtipos mineralocorticoide e glicocorticoide (MRs e GRs). Os dois receptores estão distribuídos diferentemente no cérebro (figura 1). Enquanto o subtipo MR está presente principalmente em neurônios da formação hipocampal, septo lateral e moderadamente na amígdala, *locus coeruleus* e núcleo paraventricular, acarretando em ações primárias envolvendo cognição, emoção e processamento do estresse, os receptores GR estão encontrados na maioria das áreas cerebrais, atuando tanto no processamento emocional quanto na recuperação tecidual (DE KLOET, 1991; DE KLOET, JOELS *et al.*, 2005). Apesar da ampla distribuição dos receptores GR, eles estão presentes em maior número em áreas como o hipocampo, septo lateral e núcleo paraventricular, onde controlam não só as respostas emocionais da reação de estresse como o aprendizado, mas também a alça de retroalimentação do eixo HPA (REUL e DE KLOET, 1986).

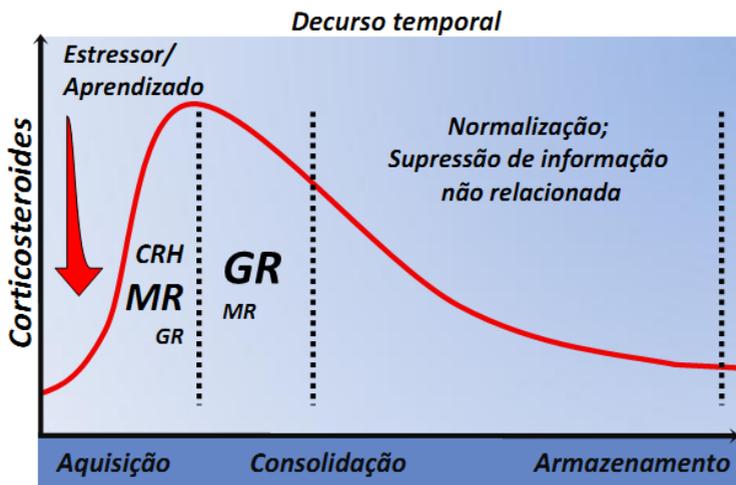


Figura 2: Níveis de corticosteróides após a exposição a um estressor e durante sobre as diferentes fases do aprendizado relacionado. Inicialmente, os corticosteróides atuam sobre os receptores do subtipo mineralocorticoide (MR), favorecendo as etapas de aquisição e consolidação, enquanto os receptores do subtipo glicocorticoide (GR) promovem a normalização dos processos e a supressão neuronal em uma etapa mais tardia, protegendo a informação recém adquirida contra a entrada de novos estímulos não relacionados. O deslocamento na curva (p. ex.: caso um estresse ocorra antes da tarefa a ser aprendida) para a esquerda (antes) ou para a direita (após) prejudica as diferentes fases do aprendizado. Legenda: CHR = Hormônio Liberador de Corticotrofinas.

No SNC, uma das principais características dos corticosteroides é a de que depois de ativados, os receptores promovem ações que demandam minutos e até dias no curso de seus efeitos (figura 2) (JOELS e BARAM, 2009). Assim, em comparação às monoaminas, como a noradrenalina, a ativação dos respectivos receptores resulta em um padrão quase inverso, com os corticosteroides mediando principalmente ações mais duradouras (horas – dias), induzindo ou reprimindo fatores de transcrição, resultando em efeitos genômicos, e as monoaminas promovendo efeitos principalmente sinápticos, para o controle rápido dos processos. Graças às ações em concerto destes dois sistemas, é possível manter o fluxo de informação a ser processada em tempo real (JOELS, KARST *et al.*, 2007), e posteriormente gerar a supressão neuronal que previne a entrada de novos estímulos e protegendo a informação relacionada ao estímulo estressor contra eventos que possam prejudicar a consolidação ou que possam promover a associação com informações provenientes de novos estímulos (MCEWEN, DE KLOET *et al.*, 1986; SAPOLSKY, 1996).

1.6 No centro da questão: o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal é, juntamente com o eixo simpato-adrenal, o mecanismo primário de manutenção e reestabelecimento da homeostase durante e após o estresse (figura 3). Desta forma, a exposição a um estressor ativa os neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo que secretam hormônios liberadores, como o CRH e a VP, na circulação portal da eminência mediana. Assim, os hormônios liberadores atuam na pituitária anterior, promovendo a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que por sua vez viaja pela corrente sanguínea até a zona fasciculada no córtex da glândula adrenal, iniciando a síntese e a liberação corticosteroides. Assim que liberados, os corticosteroides circulantes promovem a mobilização das reservas de energia, potencializando os efeitos dos mediadores simpáticos (MCEWEN, DE KLOET *et al.*, 1986). Através de uma interação entre o sistema simpático e eixo HPA, ambos os sistemas acabam por exercer funções complementares, como aumento do tônus cardiovascular, aumento da pressão arterial, mobilização das reservas de energia, aumento transitório da capacidade imunológica e inibição de processos de alto custo como reprodução e crescimento (FINK, 2007; RODRIGUES, LEDOUX *et al.*, 2009; ULRICH-LAI e HERMAN, 2009).

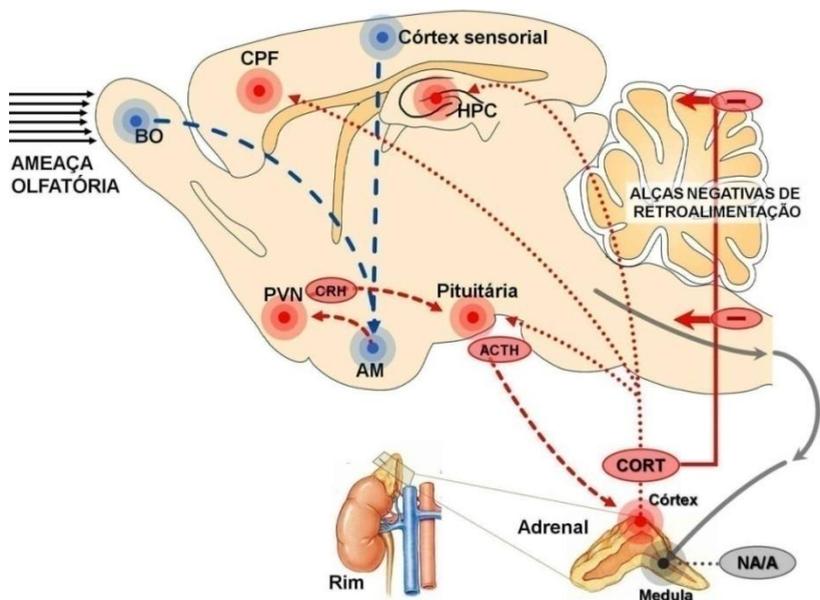


Figura 3: Circuitos ativados em resposta ao estresse. Caso os sistemas sensoriais percebam alguma ameaça (p.ex. odor de um predador), o cérebro ativa duas principais linhas de defesa: a via rápida pelo sistema nervoso autônomo (SNA, em cinza), e também uma via lenta pelo eixo hipotálamo – pituitária - adrenal (HPA, em vermelho). A primeira linha (em azul) parte da ativação da amígdala (AM), que estimula o hipotálamo, o qual irá iniciar a resposta pelo SNA secretando um coquetel composto por 20% de noradrenalina (NA) e 80% de adrenalina (A) pela medula da glândula suprarrenal. Esta ativação autônoma promove ainda a liberação de noradrenalina no cérebro via núcleo do trato solitário e locus coeruleus. A segunda linha de defesa inicia sua resposta com a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), que por sua vez age sobre a hipófise anterior liberando o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea. Em consequência, o ACTH viaja até o córtex da glândula suprarrenal induzindo a secreção de corticosteroides (CORT). Em conjunto, as ações rápidas despertam os sistemas sensoriais, e põem o organismo em estado de alerta aumentando a atenção e a vigilância. Em contrapartida, as ações lentas iniciam a tecidual, mobilizam as reservas de energia e preparam o organismo para o futuro através da ação sobre áreas cerebrais como a amígdala (AM), o córtex pré-frontal (CPF) e o hipocampo (HPC). A alça de retroalimentação negativa exercida pelos corticosteroides é feita em nível rápido sobre o hipotálamo e pituitária, e lento sobre a formação hipocampal. (adaptado de JOELS e BARAM, 2009; e SCHWABE, WOLF et al., 2010).

A retroalimentação do eixo HPA envolve ações em uma série de locais, de maneira rápida, mas também lenta. Sua retroalimentação rápida surge imediatamente após a liberação dos glicocorticoides, e dura cerca de 5-15 min, enquanto que sua via lenta surge apenas 1-2 h após e pode persistir por até 4 horas. Tais diferenças surgem, presumivelmente, de diferenças quanto a ações não genômicas e genômicas, respectivamente (DE KLOET, VREUGDENHIL *et al.*, 1998). Em nível celular, a retroalimentação rápida é exercida primariamente por inibição da síntese e liberação de ACTH no nível hipotalâmico, através da redução da expressão de RNA mensageiro para CRH e VP. Já a retroalimentação lenta se dá ao nível da hipófise anterior, onde os glicocorticoides reduzem a expressão de RNA mensageiro para o precursor da ACTH (HARBUZ e LIGHTMAN, 1992). Outro mecanismo descrito envolve as ações em altos centros como o hipocampo, prevenindo assim a ativação continuada de todo o sistema. Tais ações regulatórias são essenciais para assegurar que a resposta de estresse seja bem coordenada, permitindo que a resposta tenha um pronto início, mas também que seja encerrada adequadamente (FULFORD e HARBUZ, 2005).

1.7 “Tique-taque” rápido e lento: os receptores corticosteroides

As principais ações dos corticosteroides são mediadas por receptores nucleares específicos, dos quais existem dois tipos já anteriormente descritos: os receptores mineralocorticoide e glicocorticoide. Entretanto, dados acumulados nos últimos anos mostram que estes receptores estão localizados também em membranas, mediando assim as ações rápidas dos corticosteroides (tabela 1) (FULFORD e HARBUZ, 2005; PRAGER e JOHNSON, 2009).

Mecanismos não genômicos

Na pré-sinapse, diversos eventos são regulados pelos receptores MR, como a excitabilidade e a liberação vesicular, e o aumento da frequência de liberação de neurotransmissores como o glutamato, via proteína G (KARST, BERGER *et al.*, 2005; OLIJSLAGERS, DE KLOET *et al.*, 2008). Recentemente, também foi demonstrado que os receptores MR podem inibir canais de potássio (OLIJSLAGERS, DE KLOET *et al.*, 2008).

Em contrapartida, a ativação dos receptores GR acoplados a proteína G resulta na síntese e liberação retrógrada de

endocanabinoides, que por sua vez reduzem a liberação de glutamato na pré-sinapse (DI, MALCHER-LOPES *et al.*, 2003; TASKER, DI *et al.*, 2006). Ainda, na pós-sinapse, os receptores GR acoplados a proteína G inibem canais de cálcio tipo L e N, e também proteínas cinase C, reduzindo as correntes dos canais de cálcio (DIVERSE-PIERLUISSI e DUNLAP, 1993; FFRENCH-MULLEN, 1995). Estes mesmos receptores também inibem, indiretamente, receptores NMDA através de proteína cinase A (DIVERSE-PIERLUISSI e DUNLAP, 1993) e aumentam a hiperpolarização induzida pelos receptores GABA_A (DALLMAN, 2005).

Mecanismos genômicos

Glicocorticoides circulantes penetram facilmente a membrana celular e se ligam aos receptores MR e GR intracelulares. Após formarem dímeros, as moléculas se ligam a elementos de resposta modulando a transcrição gênica. O resultado é a codificação de proteínas para outros receptores (GROC, CHOQUET *et al.*, 2008), proteínas do citoesqueleto (HARRELL, MURPHY *et al.*, 2004), neurofilamentos, cinases, e proteínas que regulam a dinâmica vesicular (MORSINK, JOELS *et al.*, 2006; DATSON, MORSINK *et al.*, 2008) e por isso estão consequentemente envolvidos na plasticidade sináptica e morfologia celular. Sabe-se também que ambos os receptores podem estar presentes na membrana celular, exercendo suas ações através de segundos-mensageiros, como as MAP cinases e proteína cinases, ou mesmo acoplados a complexos de proteínas G, nos quais direta ou indiretamente o sinal bioquímico migra até o núcleo induzindo modificação na transcrição gênica (LI, QIU *et al.*, 2001; QIU, WANG *et al.*, 2001; KINO, TIULPAKOV *et al.*, 2005).

Afinidade dos receptores corticosteroides

Os receptores MR têm de moderada a alta afinidade pela aldosterona, corticosterona, cortisol e desoxicorticosterona, e baixa afinidade pelos glicocorticoides sintéticos como a dexametasona. Já o receptor GR pode ser diferenciado pelo seguinte perfil de afinidade: dexametasona > cortisol > corticosterona > aldosterona (FULFORD e HARBUZ, 2005).

Os receptores MR possuem dez vezes mais afinidade pelos corticosteroides circulantes do que os receptores GR. Devido a esse diferencial de afinidade, os receptores MR permanecem, em sua maioria, ocupados em condições basais, enquanto os receptores GR

estão apenas parcialmente ocupados, sendo estes últimos ocupados em sua plenitude apenas quando os níveis circulantes de corticosteroides aumentam, por exemplo, em situações de estresse (DE KLOET, 1991).

Devido a tais particularidades, os receptores MR parecem estar envolvidos nos processos contínuos de avaliação e atenção, e não apenas nas respostas de estresse (JOELS, KARST *et al.*, 2008). Já os receptores GR parecem terminar as reações de estresse, armazenando memórias e facilitando a recuperação. Desta forma, os dois sistemas parecem formar uma rede de sinalização interativa determinante para os processos adaptativos (DE KLOET, JOELS *et al.*, 2005).

1.8 Como os corticosteroides influenciam as diferentes fases do aprendizado?

Muitos estudos têm buscado compreender como o estresse influencia o aprendizado e as memórias. (MCGAUGH, 2004; LUPIEN, FIOCCO *et al.*, 2005; JOELS, PU *et al.*, 2006; SHORS, 2006). Neste sentido, é consenso geral que situações de estresse intenso são muito bem recordadas, como no caso do TEPT. Da mesma forma, estudos utilizando ferramentas genéticas e farmacológicas têm demonstrado que o estresse pode sim possuir um efeito facilitatório sobre o aprendizado, e até mesmo indispensável para a estabilidade das memórias e o desempenho cognitivo (OITZL e DE KLOET, 1992; SCHWABE, OITZL *et al.*, 2007; SCHWABE, DALM *et al.*, 2008). Entretanto, embora grande parte dos dados da literatura apontem para efeitos facilitatórios, alguns estudos também sugerem que o estresse possa estar associado a prejuízos cognitivos em determinadas situações, e também com a promoção de memórias pobres em detalhes (CHRISTIANSON, 1992; CAHILL, GORSKI *et al.*, 2003; LUPIEN, FIOCCO *et al.*, 2005). Mas como estes achados paradoxais podem ser explicados?

Lupien e McEwen (1997) listaram uma série de evidências que indicam que os corticosteroides possuem múltiplos efeitos, frequentemente conflitantes, sobre as funções da memória. Os autores enfatizam que uma dissociação dos efeitos em diferentes fases da memória é um passo crítico para uma correta interpretação dos efeitos dos corticosteroides sobre os processos cognitivos (LUPIEN e MCEWEN, 1997).

Tabela 1: Resumo das atividades não genômicas e genômicas dos receptores MR e GR sobre a dinâmica celular. (1) efeitos pré-sinápticos e (2) pós-sinápticos.

| <i>Mecanismos</i> | Mineralocorticoide | Receptor | Glicocorticoide |
|----------------------|---|--|--|
| Não genômicos | <ul style="list-style-type: none"> • Regulação vascular ⁽¹⁾; • Aumento da liberação de glutamato ⁽¹⁾; • Inibição de canais de potássio ⁽²⁾. | <ul style="list-style-type: none"> • Aumento da liberação de endocanabinoides ⁽²⁾; • Inibição de canais de Ca²⁺ tipo L e N ⁽²⁾; • Redução na corrente dos canais de Ca²⁺ ⁽²⁾; • Inibição de receptores NMDA ⁽²⁾; • Modulação de receptores GABA_A ⁽²⁾. | |
| Genômicos | | | <ul style="list-style-type: none"> • Codificação de proteínas para outros receptores, alterações no citoesqueleto; • Modulação de cinases e segundos mensageiros (MAP, NFκB, PLC, PKC, ERK1/2, Rac1, Hsp40); • Alteração na dinâmica vesicular; • Modulação sobre a plasticidade sináptica e morfologia celular. |

Ao que parece, a capacidade mnemônica é extremamente influenciada pela ação ordenada dos hormônios do estresse, que podem facilitar ou prejudicar a aquisição, consolidação ou a acessibilidade às memórias de acordo com um padrão temporal, de balanço de receptores e também com o local onde estes hormônios estariam agindo dentro do SNC (figura 4) (DE KLOET, VREUGDENHIL *et al.*, 1998; DE KLOET, JOELS *et al.*, 2005; JOELS, PU *et al.*, 2006).

Assim, diversos estudos, tanto em humanos quanto em animais, têm sugerido que quando os corticosteroides são liberados em resposta a um estressor muito tempo antes (p. ex.: 1-4h) ou muito tempo após (p. ex.: +30 min) o estímulo a ser lembrado, a capacidade cognitiva pode ser prejudicada (KIRSCHBAUM, WOLF *et al.*, 1996; DE QUERVAIN, ROOZENDAAL *et al.*, 1998; DIAMOND, PARK *et al.*, 2005). De maneira oposta, quando a ação destes hormônios ocorre por volta do estímulo a ser lembrado, há uma facilitação dos processos mnemônicos (OITZL e DE KLOET, 1992; ROOZENDAAL, QUIRARTE *et al.*, 1997).

Por fim, é essencial lembrar que a ação dos corticosteroides promove um padrão de resposta em sino. Assim, concentrações baixas ou muito elevadas parecem prejudicar a consolidação (NEWCOMER, CRAFT *et al.*, 1994; KIRSCHBAUM, WOLF *et al.*, 1996), enquanto que doses moderadas promovem facilitação dos processos cognitivos (SHORS, WEISS *et al.*, 1992; SANDI, LOSCERTALES *et al.*, 1997).

1.8.1 Efeitos sobre a aquisição e consolidação de memórias

Como anteriormente descrito, o curso temporal dos efeitos induzidos pelo estresse apresenta um amplo alcance (figura 2). Logo após a apresentação a um estressor, os níveis de corticosteroides aumentam. As ações primárias se iniciam dentro de minutos após a exposição à ameaça. Através de sua atividade sobre receptores de membrana, os corticosteroides promovem aumento da probabilidade da liberação de glutamato, e em sinergismo com as ações da noradrenalina facilitam a potenciação de longa duração (LTP). Além disto, este sistema funciona em coordenação com outros neurotransmissores, como as catecolaminas (principalmente adrenalina e noradrenalina), os neuropeptídeos, a vasopressina e o próprio CRH, controlando funções de vigilância, alerta, excitação e atenção, essenciais para o processamento de informações sobre estímulos em andamento e a

consequente aquisição de memórias (LUIPIEN e MCEWEN, 1997; DE KLOET, KARST *et al.*, 2008).

Quando a transição entre a aquisição e a consolidação assume seu lugar no processo, os corticosteroides auxiliam na estabilização da informação adquirida, promovendo mudanças funcionais e estruturais extremamente duradouras, via mecanismos genômicos anteriormente descritos. Assim, já foi demonstrado que a frequência de disparo neuronal no hipocampo é suprimida pelos corticosteroides, fortalecendo a consolidação através da prevenção da entrada de novos estímulos (PFAFF, SILVA *et al.*, 1971). A tabela 1 mostra que, por diversos mecanismos, os receptores MR e GR promovem plasticidade sináptica e contribuem para a consolidação de memórias. Um exemplo disto, é que a ativação dos receptores corticosteroides aumenta as correntes de cálcio e a expressão de receptores NMDA em neurônios hipocampais (MCEWEN, 1999). Da mesma maneira, a exposição aguda a um estressor também aumenta os níveis de RNAm para receptores cainato, contribuindo para o funcionamento da LTP (JOELS, BOSMA *et al.*, 1996).

Em resumo, os dados obtidos até agora apontam para um papel facilitatório dos receptores corticosteroides sobre a aquisição e consolidação de memórias, que envolvem principalmente ações plásticas sobre o hipocampo (MCEWEN, 1999), mas que também podem ser estendidos a outras áreas como a amígdala (YANG, CHAO *et al.*, 2007) e córtex pré-frontal (BARSEGYAN, MACKENZIE *et al.*, 2010).

1.8.2 Efeitos sobre a expressão de memórias

Os efeitos do estresse sobre a evocação de memórias parecem diferir dos efeitos facilitatórios observados na aquisição e consolidação. Desta maneira, vários estudos têm sugerido que o estresse pode prejudicar a evocação das memórias (DE QUERVAIN, ROOZENDAAL *et al.*, 1998; DE QUERVAIN, ROOZENDAAL *et al.*, 2000). Um exemplo clássico disto é que quando indivíduos são submetidos a um teste estressante, eles frequentemente apresentam um prejuízo na evocação da informação armazenada. Entretanto, ao mesmo tempo esta difícil situação grava profundamente as memórias que estão sendo consolidadas durante a situação. Esta competição entre uma informação prévia e um desafio atual parece não ser mal adaptativa, considerando que consolidar as informações sobre uma nova ameaça

pode aumentar as chances de sobrevivência no futuro (JOELS, PU *et al.*, 2006).

Em animais, diversos trabalhos demonstram que a evocação de memórias pode ser prejudicada pelo estresse ou pela administração de corticosteroides. (DE QUERVAIN, ROOZENDAAL *et al.*, 1998; DIAMOND, PARK *et al.*, 2005). Recentes evidências apontam para a necessidade de uma coincidência temporal entre a atividade noradrenérgica e corticosteroide na amígdala durante a evocação, assim como na consolidação, já que o bloqueio de receptores adrenérgicos do subtipo beta ou a lesão da amígdala basolateral impede o prejuízo induzido pelos corticosteroides na evocação da memória espacial em ratos (ROOZENDAAL, 2002; 2003; ROOZENDAAL, HAHN *et al.*, 2004).

Em humanos, trabalhos também indicam que o estresse, bem como a administração de corticosteroides, prejudica a evocação de memórias declarativas (BUCHANAN, TRANEL *et al.*, 2006; COLUCCIA, WOLF *et al.*, 2008). Além disto, assim como observado em roedores, a administração de bloqueadores adrenérgicos beta reduz os prejuízos induzidos pela administração de corticosteroides sobre a evocação (DE QUERVAIN, AERNI *et al.*, 2007; SCHWABE, ROMER *et al.*, 2009). De maneira interessante, os corticosteroides parecem não influenciar o desempenho na evocação de memórias em situações sem carga emocional, sugerindo uma ação coordenada entre os eixos simpato-adrenal e HPA, e reforçando a interação entre estes dois sistemas e o papel do estresse no gerenciamento das memórias aversivas (KUHLMANN e WOLF, 2006).

Os efeitos do estresse sobre a evocação de memórias também parecem ser dependentes de uma escala temporal. Assim, em animais submetidos a uma tarefa de memória espacial, a exposição a um estressor, 2 min ou 4 h antes da expressão da memória retida não prejudicou a evocação, mas sim quando o estressor foi apresentado 30 min antes (DE QUERVAIN, ROOZENDAAL *et al.*, 1998). Tal efeito parece ter relação direta com a elevação dos níveis plasmáticos de corticosteroides induzida pelo estressor, que não atingiu seu pico em escala temporal coincidente com a evocação. Da mesma maneira, o bloqueio da síntese e liberação de corticosteroides impediu os efeitos observados (DE QUERVAIN, ROOZENDAAL *et al.*, 1998).

O envolvimento do hipocampo no processo de evocação mediado pelos corticosteroides também tem sido sugerido. As ações celulares dos

corticosteroides no hipocampo são condizentes com este processo, já que a administração de altas doses de corticosterona reduz substancialmente a frequência de disparo neuronal por aproximadamente 30-60 min (PFAFF, SILVA *et al.*, 1971; JOELS, 2001).

Desta forma, parece evidente que a liberação aguda de corticosteroides influencia as diferentes fases do processamento cognitivo. A administração de corticosteroides imediatamente antes ou após o aprendizado parece intensificar a aquisição e a consolidação de memórias, enquanto que a administração “fora do contexto” da tarefa parece prejudicar estes processos. De maneira oposta, a administração aguda de corticosteroides parece prejudicar a evocação de memórias.

Na busca pelo entendimento e tratamento dos transtornos de ansiedade ligados ao estresse provocado por eventos traumáticos, como o TEPT, o desenvolvimento de testes e modelos experimentais com o objetivo de melhor entender os processos psicopatológicos, bem como a pesquisa de possíveis alvos para seu tratamento e/ou prevenção, podem ser importantes ferramentas na compreensão da psicobiologia dos transtornos de ansiedade. Neste sentido, nosso laboratório têm desenvolvido trabalhos relevantes utilizando o condicionamento olfatório de medo, sugerindo que este modelo possa ser uma ferramenta importante para o estudo do estresse e das memórias aversivas.

Considerando o que foi descrito nos capítulos anteriores, parece evidente que os hormônios do estresse, em particular os corticosteroides, possuem papel crucial na aquisição e no gerenciamento de memórias traumáticas, e que as drogas de ação sobre o sistema corticoesteroide podem se mostrar promissoras como ferramentas para o entendimento dos processos psicopatológicos, bem como servir de referência para o desenvolvimento de tratamentos visando a redução da vulnerabilidade e as consequências de um trauma ou atenuar as memórias debilitantes (CONRAD, LUPIEN *et al.*, 1997; MARIN, HUPBACH *et al.*, 2011; PITMAN, MILAD *et al.*, 2011). Assim sendo, o desafio proposto no presente trabalho foi testar a hipótese de que no TEPT, a susceptibilidade a formação de memórias aversivas passa por uma modulação feita pelos corticosteroides. Ao mesmo tempo, dados da literatura sugerem que os pacientes com TEPT possuem uma inabilidade em extinguir as memórias aversivas após um trauma, e assim, nós acreditamos que os corticosteroides possam impedir a extinção por prejudicar a evocação (processo crucial para a extinção) das memórias

traumáticas recém-formadas. Para testar estas hipóteses, o presente trabalho buscou entender quais são as regras que governam estes processos modulatórios exercidos pelos corticosteroides.

Para tanto, buscamos investigar quais as condições básicas para o estabelecimento do COM (e.g. número de choques), e a sua repercussão sobre o eixo HPA; e se agonistas dos receptores GR e MR poderiam influenciar na aquisição de uma memória relacionada a um condicionamento fraco ou prejudicar a aquisição e a expressão do COM efetivo. Para tanto, foram utilizadas as medidas bioquímicas e as respostas comportamentais exibidas por animais submetidos aos protocolos experimentais descritos nos próximos capítulos. Buscando investigar a hipótese anteriormente descrita, os objetivos a seguir foram traçados.

2 Objetivos e metas

2.1 *Objetivos*

Com base na hipótese de que os receptores GR e MR estariam modulando de maneira bidirecional os aspectos funcionais do armazenamento de memórias traumáticas, o presente trabalho objetivou avaliar o papel de ambos os receptores nas etapas de aquisição, consolidação e evocação do Condicionamento Olfatório de Medo. Para tanto, as seguintes estratégias experimentais foram delineadas:

2.2 *Metas*

- Ajustar o condicionamento olfatório de medo com a utilização de diferentes protocolos de associação;
- Investigar a resposta de estresse no modelo, detectando possíveis estratégias experimentais para o estudo da facilitação e do prejuízo provocado por agonistas dos receptores GR e MR;
- Determinar os níveis de corticosterona em resposta à exposição COM nas diferentes condições experimentais;
- Investigar os efeitos da administração de agonistas GR e MR antes da aquisição do condicionamento olfatório de medo;
- Avaliar os efeitos da administração aguda de agonistas GR e MR imediatamente após a aquisição do condicionamento olfatório de medo;
- Investigar os efeitos da administração de agonistas GR e MR antes da expressão do condicionamento olfatório de medo;
- Verificar os efeitos dos agonistas GR e MR sobre o eixo HPA em resposta ao estresse (COM).

3 Material e Métodos

3.1 Animais

Ratos machos da linhagem *Wistar*, com 12-16 semanas de idade e pesando entre 300-400 gramas foram utilizados para a realização do trabalho. Os animais, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina, foram alojados em caixas moradia plásticas (50 x 30 x 15 cm), forradas com maravalha de madeira, e em número de 4-5 por caixa. Após serem trazidos do biotério setorial do departamento de Farmacologia, os animais foram alojados no biotério do Laboratório de Neurobiologia Comportamental, em uma sala com temperatura ($23\pm 1^\circ\text{C}$) e fluxo de ar (mantido por dois exaustores de vazão $280\text{ m}^3/\text{h}$) constantes, em ciclo claro-escuro 12/12h (luzes acesas às 07:00 h) e com comida e água *ad libitum*.

Todos os animais eram inexperientes do ponto de vista experimental até o início dos testes. Os experimentos comportamentais foram sempre conduzidos entre 09:00 e 16:00 h. Os procedimentos de cuidado, manutenção e manuseio dos animais foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do NIH (*INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH, 2011*) e previamente aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo nº 23080.008789/2009-46).

3.2 Drogas

Para a realização dos experimentos, as seguintes drogas foram utilizadas: Os agonistas do receptor glicocorticoide Dexametasona (DEX; Tocris Bioscience®, USA; 1 ou 3 mg/kg), e do receptor mineralocorticoide Fludrocortisona (FLU; Sigma-Aldrich®, USA; 1 ou 3 mg/kg; em parte gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Roberto Andreatini - UFPR). Todas as drogas foram dissolvidas em veículo composto de solução salina (NaCl 0,9%) adicionada de 2% de solvente (Tween 80), o qual também serviu como padrão experimental (controle). As doses utilizadas foram escolhidas de acordo com dados prévios da literatura (MILLER, SPENCER *et al.*, 1992; OITZL e DE KLOET, 1992; TAUBENFELD, RICEBERG *et al.*, 2009; NINOMIYA, MARTYNHAK *et al.*, 2010) e com estudos piloto desenvolvidos em nosso laboratório. Todas as soluções foram administradas por via subcutânea em fração de 1 ml/kg.

3.3 Coleta das amostras de sangue e determinação dos níveis séricos de corticosterona por ensaio imunoenzimático

As concentrações de corticosterona foram determinadas em amostras de soro após as sessões de condicionamento e EC-I. O procedimento de coleta (300 µl) foi conduzido através de uma pequena incisão na cauda de acordo com Fluttert et al (2000), 30 min após cada respectivo experimento. Imediatamente após os experimentos, os animais foram transportados para uma sala adjacente e alojados em caixas onde os respectivos animais haviam sido previamente habituados, permanecendo sem serem perturbados até o momento da coleta. Para o procedimento de coleta, os animais foram transportados individualmente para outra sala onde, após realizar o procedimento de contenção manual, as amostras foram coletadas a partir de uma incisão a 3 cm da extremidade final da cauda. O procedimento de contenção e coleta durava até dois minutos. As amostras foram coletadas usando micropipeta (Hamilton Softgrip Pipette 100 µL-1000 µL, USA) e imediatamente armazenadas em eppendorf até que coagulassem por completo (± 90 min). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 RPM durante 10 min (4°C) para a separação de fases e coleta das amostras de soro, que foram estocadas em freezer (-30°C) até a realização do ensaio imunoenzimático. No dia do ensaio, as amostras foram descongeladas e reconstituídas por agitação em vórtice. As amostras foram diluídas em concentração de 1:10. As concentrações de corticosterona foram avaliadas em duplicata por conjunto para ensaio imunoenzimático (ELISA - Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay; Corticosterone ELISA, IBL International®, Germany). Para o ensaio, 20 µl das soluções padrão e das amostras foram utilizados. A construção das curvas padrão foi feita através de concentrações padrão de 0,5, 15, 30, 60, 120 e 240 nmol/L providas pelo conjunto ELISA. A densidade óptica (450 nm) para cada poço das placas do conjunto foi medida utilizando um leitor de placa (TECAN Group Ltd., Switzerland) dentro de 10 min após a adição de solução de parada para o encerramento da reação enzimática. A determinação das curvas de concentração foi feita por método automatizado (*4 parameter logistics curve fit*) utilizando programa de computador específico (MasterPlex® 2010; Hitachi Software Engineering Co. Ltd., USA). O cálculo dos resultados foi feito após a construção de curvas padrão e plotagem das absorvâncias médias dentro das curvas padrão. Todas as amostras ficaram dentro do limite das curvas padrão. Os coeficientes de variação intra e interensaio foram de 6,7% e 13,6%, respectivamente.

3.4 Modelo e procedimentos experimentais

Os procedimentos experimentais com o modelo de Condicionamento Olfatório de Medo (COM) foram realizados com base em um trabalho previamente desenvolvido em nosso laboratório (KROON e CAROBREZ, 2009). O protocolo experimental foi realizado utilizando dois aparatos diferentes: uma caixa de condicionamento e uma caixa de exposição ao odor. Antes de cada sessão experimental, todos os animais foram habituados em uma sala adjacente às salas de experimento por no mínimo 30 min.

A *caixa de condicionamento* (50 x 26 x 35 cm, Insight® Equipamentos, Brasil) foi construída com três paredes de aço inoxidável, e com uma parede lateral e o teto (com dobradiças para abertura) de acrílico transparente (figura 4a). O assoalho gradeado foi construído com barras de aço inoxidável (3 mm de diâmetro, afastadas em 7 mm) ligadas a um gerador de choque programável em intensidade (0,4 mA) e duração (2 s). A aplicação do choque como estímulo condicionado foi realizada manualmente por um botão de disparo disponível no gerador de choques. Durante a sessão de condicionamento os animais foram colocados cuidadosamente na caixa de choque, onde foram utilizados períodos de 40 s, de atraso para o primeiro choque, de intervalo entre cada disparo, e após o último choque. Abaixo do piso gradeado, uma gaveta (50 x 26 x 1 cm) permitia a colocação do estímulo olfatório durante as sessões. Um pequeno pedaço de papel filtro (4 x 4 cm) foi utilizado como controle de odor neutro, e para distribuição de acetato de amila⁶ (100 µl, 5%; Sigma-Aldrich®, USA) como estímulo olfatório. O aparato foi limpo com álcool 10% antes e após a exposição de cada animal, e com álcool 70% após cada experimento. Durante as sessões na caixa de condicionamento, a iluminação era mantida em 100 lux, e um exaustor posicionado logo acima da caixa garantia a retirada de ar para o lado externo do laboratório.

A *caixa de odor* (figura 4b) foi utilizada para avaliar a resposta defensiva dos animais frente a um estímulo unimodal, ou seja, apenas as respostas ligadas à memória evocada pela pista olfatória. Para tanto, a caixa de odor foi construída em acrílico (Plexiglas®) preto e com uma das laterais em acrílico transparente que permitiu a observação comportamental. Em suas dimensões, o aparato era constituído de uma

⁶ Essência sintética de banana utilizada em estudos de função olfatória (CAIN e BINDRA, 1972; PASCHALL e DAVIS, 2002).

área aberta (40 x 26 x 36 cm) ligada por uma pequena entrada (6 x 6 cm) a um compartimento fechado (20 c 26 x 36 cm), permitindo que os animais transitassem por ambos os espaços. Na parede oposta à entrada do compartimento fechado, uma pequena caixa de acrílico (5 x 5 x 1 cm) com vários furos era aderida ao aparato, servindo de dispositivo para a colocação de papel filtro (4 x 4 cm) impregnado ou não pelo estímulo olfatório. Uma pequena faixa branca, pintada no assoalho da caixa à 7 cm da fonte de odor, serviu para caracterizar o perímetro de aproximação. Durante os testes na caixa de odor, a intensidade luminosa era alterada para 10 lux, e o fluxo de ar mantido por exaustor posicionado acima da caixa, o qual retirava o ar para o lado externo do laboratório. A caixa foi completamente limpa com uma solução de álcool 10% entre a exposição de cada animal, e com álcool 70% antes e após cada sessão. Cada uma das caixas possuía uma das laterais em acrílico transparente, permitindo a observação comportamental e filmagem por um sistema de câmera conectado a um gravador de DVD (LG[®], South Korea).

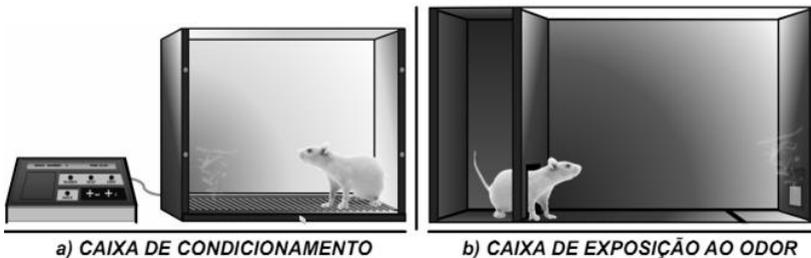


Figura 4: Modelos representativos das caixas de a) condicionamento, e b) exposição ao odor.

A exposição às caixas de condicionamento e odor variou em duração de acordo com o protocolo, como descrito a seguir:

Tabela 2: Duração das sessões experimentais nas caixas de condicionamento e de exposição ao odor.

| Caixa de condicionamento | | Caixa de odor | |
|--------------------------|--|-----------------------|-----|
| Familiarização | 4' (sem choque) | Familiarização | 10' |
| EC+EI | 1'20" (1 choque); 2'40" (3 choques) 4' (5 choques) | EC-I | 10' |
| | | EC-II | 10' |

Os parâmetros comportamentais observados ao longo das sessões de teste EC-I e EC-II na caixa de odor foram:



- Tempo próximo (%): tempo em que os animais permaneceram dentro do perímetro de aproximação da fonte de odor, demarcado no assoalho da caixa;



- Tempo escondido (%): tempo em que os animais permaneceram dentro do compartimento fechado da caixa;



- Tempo de *head-out* (s): tempo de permanência dentro do compartimento fechado, mas com a cabeça ou a parte anterior do corpo posicionada para o lado externo;



- Número de cruzamentos: número de transições entre o compartimento fechado e o perímetro de aproximação.

3.4.1 *Experimento 1: Padronização do Condicionamento Olfatório de Medo*

Na primeira etapa do trabalho, buscou-se avaliar e padronizar algumas alterações procedurais efetuadas no protocolo de COM previamente estabelecido em nosso laboratório (CANTERAS, KROON *et al.*, 2008; KROON e CAROBREZ, 2009). Dentre outros fatores, as principais alterações realizadas foram na qualidade e nível do estímulo olfatório. Assim, em substituição ao café como fonte de odor, nós introduzimos o acetato de amila (100 μ ; 5%) e, de acordo com a condição experimental, submetemos os animais ao COM padrão (figura 5).

Para tanto, 35 ratos foram separados em quatro grupos experimentais de acordo com a condição. Os animais do grupo Não pareado 5 (n=9) foram expostos ao odor durante a sessão de familiarização na caixa de condicionamento durante 4 min, e condicionados 24 h após com 5 choques, também em uma sessão de 4 min. Os animais dos grupos Pareado 1 (n=8), Pareado 3 (n=9) e Pareado 5 (n=8), foram regularmente familiarizados (4 min) na caixa de condicionamento na ausência de odor, e 24 h após, os animais foram condicionados com 1, 3 ou 5 choques, respectivamente, na presença de odor.

No terceiro dia, todos os grupos foram familiarizados na caixa de odor na ausência de estímulo olfatório. Vinte e quatro e quarenta e oito horas após, os animais foram expostos ao estímulo olfatório na sessão EC-I e ao contexto na sessão EC-II, respectivamente.

Neste primeiro experimento de padronização, além dos parâmetros comportamentais descritos anteriormente, uma análise um pouco mais detalhada do padrão comportamental durante o teste EC-I foi realizada utilizando o software de análise de imagem ANY-maze[®] (Stoelting Co.,USA). Com isso os seguintes parâmetros adicionais foram observados: distância percorrida (m) e velocidade máxima (m/s), bem como o plano de posicionamento padrão dos animais na caixa de odor frente ao estímulo condicionado.



Figura 5: Representação esquemática do protocolo do condicionamento olfatório de medo durante os 5 dias de experimento. Legenda: NP – não pareado 5 choques; FAM – sessão de familiarização na caixa de condicionamento; EC + EI – estímulo condicionado (odor) + estímulo incondicionado (choque nas patas); FAM – sessão familiarização na caixa de odor; EC-I – sessão de exposição ao estímulo condicionado I (odor); e EC-II – sessão de exposição ao estímulo condicionado II (contexto).

3.4.2 *Experimento 2: Avaliação dos níveis séricos de corticosterona após as sessões de condicionamento e teste EC-I*

Buscando investigar o impacto dos diferentes protocolos de condicionamento sobre o eixo HPA, dois experimentos foram delineados: influência A) do condicionamento e B) da exposição ao EC-I sobre os níveis séricos de corticosterona (figura 6).

Secreção de corticosterona após o condicionamento

No dia 1, os animais foram familiarizados na caixa de condicionamento. No segundo dia, imediatamente após o condicionamento, grupos independentes de animais (n=5-6) foram transportados para uma sala adjacente e alojados em caixas com

maravalha da caixa moradia, onde permaneceram sem serem perturbados até o momento da coleta (30 min após). Os seguintes grupos experimentais foram avaliados: sem odor/sem choque; odor/sem choque; Pareado 1; e Pareado 5. Os níveis séricos de corticosterona foram avaliados conforme descrito anteriormente.

Secreção de corticosterona após a sessão de teste EC-I

No primeiro dia, todos os animais foram regularmente familiarizados na caixa de condicionamento, exceto pelo grupo Não pareado 5, o qual foi exposto ao odor na sessão de familiarização. No dia seguinte, os animais foram expostos a sessão de condicionamento sem choques (grupo Não pareado 5 e grupo exposto apenas ao odor), ou com 1 ou 5 choques pareados. Assim, os seguintes grupos foram formados (n=5-6): Odor, Não pareado 5, Pareado 1 e Pareado 5. Vinte e quatro horas após, todos os animais foram expostos à sessão de familiarização na caixa de odor na ausência de estímulo olfatório. No quarto dia, os animais foram submetidos à sessão EC-I na presença do EC. Imediatamente após a sessão EC-I, os animais foram transportados para uma sala adjacente e alojados em caixas com maravalha da caixa moradia, onde permaneceram sem serem perturbados até o momento da coleta (30 min após). Os níveis séricos de corticosterona foram avaliados conforme descrito anteriormente.

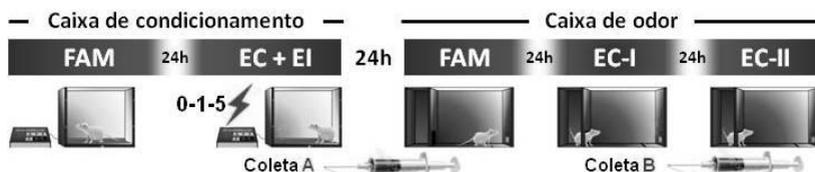


Figura 6: Representação esquemática do protocolo de COM para coleta de sangue e dosagem dos níveis séricos de corticosterona. Coletas: A) após o condicionamento e B) após o teste EC-I. Legenda: FAM – sessão de familiarização na caixa de condicionamento; EC + EI – estímulo condicionado (odor) + estímulo incondicionado (choque nas patas); FAM – sessão familiarização na caixa de odor; EC-I – sessão de exposição ao estímulo condicionado I (odor); e EC-II – sessão de exposição ao estímulo condicionado II (contexto).

3.4.3 Experimento 3: Efeitos da administração sistêmica aguda de agonistas GR e MR sobre um traço fraco de memória no condicionamento olfatório de medo

Como descrito anteriormente, um importante papel facilitatório dos corticosteroides sobre a formação de memórias tem sido sugerido. Tal efeito ocorreria principalmente na consolidação de novas memórias ao serem liberados em resposta a um estressor. Neste experimento nós avaliamos uma possível ação facilitatória dos receptores glico e mineralocorticoides sobre a consolidação de um traço de memória fraco. Para tanto, dois experimentos foram delineados: a administração subcutânea dos agonistas seletivos dos receptores corticosteroides dexametasona (GR) e fludrocortisona (MR) imediatamente após a aquisição do COM.

Administração do agonista GR dexametasona imediatamente após a aquisição do COM

No primeiro dia, todos os animais foram familiarizados na caixa de condicionamento na ausência de estímulo olfatório ou choque nas patas. No dia do condicionamento (dia 2), os animais receberam apenas um choque nas patas e imediatamente após serem retirados da caixa, foram administrados por via subcutânea com o agonista dos receptores glicocorticoides dexametasona (DEX), nas doses de 1 ou 3 mg/kg, ou veículo como controle experimental. Um grupo de animais exposto apenas ao odor (sem choque como EI, mas nas mesmas condições experimentais dos animais condicionados) também recebeu a administração de dexametasona para avaliar possíveis efeitos pró-associativos aversivos da administração de dexametasona *per se*. No terceiro dia, os animais foram regularmente familiarizados na caixa de odor. No dia 4, todos os animais foram expostos ao estímulo olfatório condicionado (EC-I) e 24 h após o contexto (EC-II) conforme a figura 7.

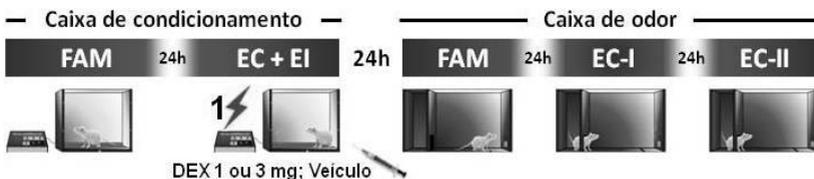


Figura 7: Representação esquemática do experimento de avaliação dos efeitos da dexametasona (DEX) administrada imediatamente após o condicionamento com 1 choque.

Administração do agonista MR fludrocortisona imediatamente após a aquisição do COM

No primeiro dia, todos os animais foram familiarizados na caixa de condicionamento na ausência de estímulo olfatório ou choque nas patas. No dia do condicionamento (dia 2), os animais foram condicionados com apenas um choque nas patas e imediatamente após serem retirados da caixa, eles receberam a administração subcutânea do agonista dos receptores mineralocorticoides fludrocortisona (FLU), nas doses de 1 ou 3 mg/kg, ou veículo como controle experimental. Um grupo de animais exposto apenas ao odor (sem choque como EI, mas nas mesmas condições experimentais dos animais condicionados) também recebeu a administração de fludrocortisona para avaliar possíveis efeitos pró-associativos aversivos da administração de fludrocortisona *per se*. No terceiro dia, os animais foram regularmente familiarizados na caixa de odor. No dia 4, todos os animais foram expostos ao estímulo olfatório condicionado (EC-I) e 24 h após o contexto (EC-II) conforme a figura 8.

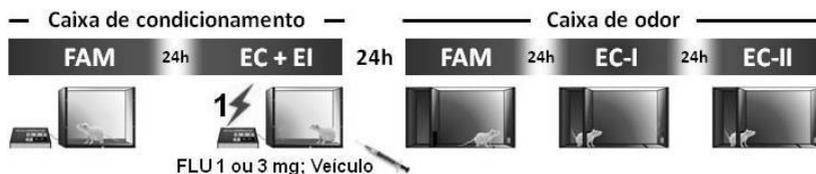


Figura 8: Representação esquemática do experimento de avaliação dos efeitos da fludrocortisona (FLU) administrada imediatamente após o condicionamento com 1 choque.

3.4.4 *Experimento 4: Efeitos da administração sistêmica aguda de agonistas GR e MR sobre a AQUISIÇÃO do condicionamento olfatório de medo*

O papel temporal da ação dos receptores corticosteroides sobre o prejuízo da aquisição de memórias aversivas foi avaliado pela administração de agonistas seletivos GR e MR 60 min antes do condicionamento olfatório de medo.

Papel dos receptores glicocorticoides (GR) sobre a AQUISIÇÃO de memórias aversivas

No dia 1 todos os animais foram familiarizados na caixa de condicionamento. No dia seguinte, 60 min antes do condicionamento

com 5 choques, os animais foram tratados com o agonista glicocorticoide dexametasona (DEX), nas doses de 1 ou 3 mg/kg, ou veículo como controle, conforme a figura 9. Para confirmar possíveis efeitos temporais da ativação dos receptores glicocorticoides, um grupo de animais também foi tratado com dexametasona 20 min antes do condicionamento. No dia 3, todos os animais foram familiarizados na caixa de exposição ao odor, sem a presença de estímulo olfatório condicionado. No dia seguinte (dia 4), os animais foram submetidos ao teste EC-I na caixa de condicionamento na presença do odor condicionado, e 24 h após estes mesmos animais retornaram à caixa de odor na sessão de contexto EC-II.

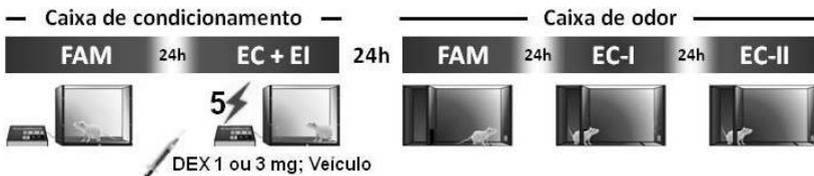


Figura 9: Representação esquemática do experimento de avaliação dos efeitos da dexametasona (DEX) administrada 60 min antes do condicionamento.

Papel dos receptores mineralocorticoides (MR) na AQUISIÇÃO de memórias aversivas

No dia 1 todos os animais foram familiarizados na caixa de condicionamento. No dia seguinte, 60 min antes do condicionamento com 5 choques, os animais foram tratados com o agonista mineralocorticoide fludrocortisona (FLU), nas doses de 1 ou 3 mg/kg, ou veículo como controle, conforme a figura 10. Para confirmar possíveis efeitos temporais da ativação dos receptores mineralocorticoides, um grupo de animais também foi tratado com fludrocortisona 20 min antes do condicionamento. No dia 3, todos os animais foram familiarizados na caixa de exposição ao odor, sem a presença de estímulo olfatório condicionado. No dia seguinte (dia 4), os animais foram submetidos ao teste EC-I na caixa de condicionamento na presença do odor condicionado, e 24 h após estes mesmos animais retornaram à caixa de odor na sessão de contexto EC-II.

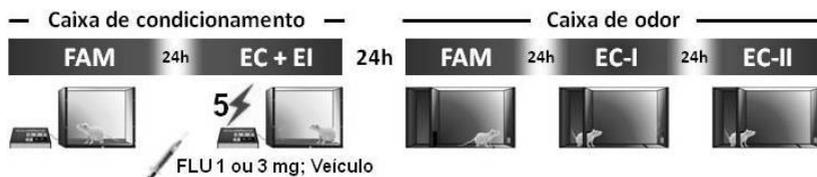


Figura 10: Representação esquemática do experimento de avaliação do papel temporal da administração de fludrocortisona (FLU) 60 min antes do condicionamento.

3.4.5 *Experimento 5: Efeitos da administração sistêmica aguda de agonistas GR e MR na EVOCAÇÃO da memória olfatória aversiva*

A avaliação dos efeitos da ativação dos receptores glico e mineralocorticoides antes da evocação de memórias aversivas foi realizada pela administração de agonistas GR e MR 60 min antes da exposição ao estímulo condicionado aversivo no COM.

Avaliação dos efeitos da administração do agonista GR, dexametasona, na EVOCAÇÃO do COM

Todos os animais foram primeiramente familiarizados (dia 1) na caixa de condicionamento, na ausência de odor ou choque. Vinte e quatro horas após, todos os animais foram condicionados com 5 choques na presença de odor. No terceiro dia, os animais foram regularmente familiarizados na caixa de odor. Sessenta minutos antes da exposição ao EC-I (dia 4), os animais foram randomicamente divididos em grupos que receberam a administração do agonista glicocorticoide dexametasona (DEX), nas doses de 1 ou 3 mg/kg, ou veículo como controle (figura 11). Adicionalmente, um grupo recebeu a administração de DEX 20 min antes da evocação para confirmar a possível função temporal destes receptores. No último dia, os animais retornaram a caixa de odor, na ausência de estímulo condicionado, para a avaliação do medo contextual na sessão EC-II.

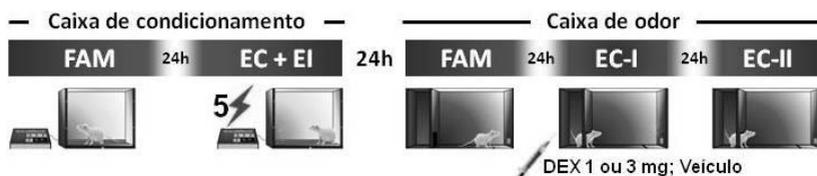


Figura 11: Representação esquemática da avaliação do papel temporal da administração de dexametasona 60 min antes da evocação da memória olfatória aversiva.

Avaliação dos efeitos da administração do agonista MR, fludrocortisona, na EVOCAÇÃO do COM

Todos os animais foram primeiramente familiarizados (dia 1) na caixa de condicionamento, na ausência de odor ou choque. Vinte e quatro horas após, todos os animais foram condicionados com 5 choques na presença de odor. No terceiro dia, os animais foram regularmente familiarizados na caixa de odor. Sessenta minutos antes da exposição ao EC-I (dia 4), os animais foram randomicamente divididos em grupos que receberam a administração do agonista mineralocorticoide fludrocortisona (FLU), nas doses de 1 ou 3 mg/kg, ou veículo como controle (figura 12). Um grupo adicional foi tratado com FLU 20 min antes da evocação para confirmar a possível função temporal destes receptores. No último dia, os animais retornaram a caixa de odor, na ausência de estímulo condicionado, para a avaliação do medo contextual na sessão EC-II.

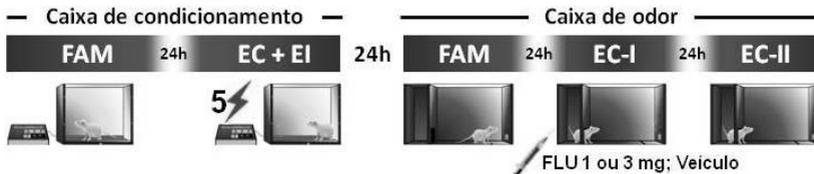


Figura 12: Representação esquemática da avaliação do papel temporal da administração de fludrocortisona (FLU) 60 min antes da evocação da memória olfatória aversiva.

3.4.6 *Experimento 6: Avaliação do efeito da administração sistêmica aguda de agonistas GR e MR sobre o eixo HPA em resposta a um estressor*

O efeito supressor da resposta hormonal ao estresse exercido pela ativação dos receptores glico e mineralocorticoide foi avaliado neste experimento. Para tanto, grupos independentes de animais receberam a administração do agonista GR dexametasona (DEX), na dose de 1 mg/kg; do agonista MR fludrocortisona (FLU) 1 mg/kg; ou de veículo, 60 min antes do condicionamento com 5 choques. Imediatamente após o condicionamento, os animais foram transportados para uma sala adjacente e alojados em caixas com serragem moradia, onde permaneceram sem serem perturbados até o momento da coleta das amostras de sangue 30 min após. Os níveis séricos de corticosterona foram avaliados de acordo com o protocolo descrito anteriormente.

3.5 Análise estatística

O cálculo do número de animais necessários para cada grupo experimental foi feito a partir da seguinte fórmula: $n = \{[(z_{\alpha} + z_{\beta}) * s] / \delta\}^2$

O teste baseia-se no cálculo do 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 achar uma diferença quando na verdade ela não existe (erro do Tipo I; falso verdadeiro; quanto menor for o alfa escolhido, maior será a amostra necessária) e do parâmetro beta (β) que é o risco aceitável de estar perdendo uma diferença que realmente existe (erro do Tipo II)

Assim sendo, partiu-se dos seguintes pressupostos para cálculo do número de animais:

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 (*two tailed*) é 1,96.
2. O valor de β será 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, erro no procedimento cirúrgico, erros de dosagem, etc.), diferenças entre dois grupos que sejam menores que 20% do valor da média de cada grupo podem aumentar 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).

A análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls foi utilizada para as comparações nos seguintes parâmetros comportamentais durante as sessões de familiarização na caixa de odor: tempo próximo (%), tempo escondido (%), tempo de *head-out* (%), e número de cruzamentos. A ANOVA para medidas repetidas, também seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls, foi utilizada para a avaliação dos parâmetros acima descritos quando os grupos foram expostos às sessões de teste EC-I e EC-II. Os dados obtidos na avaliação dos níveis de corticosterona foram submetidos à ANOVA de uma via, seguida de teste *post hoc* de Newman-Keuls quando apropriado. Os dados foram todos expressos pela média \pm erro

padrão da média (e.p.m.). O nível mínimo de significância estatística adotado em todos os experimentos foi de (*) $p < 0,05$, e os níveis de significância inferiores à $p < 0,005$ e $p < 0,0005$ estão representados por (**) e (***), respectivamente.

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa STATISTICA v.8 (Statsoft[®], Tulsa, USA). As representações gráficas (histogramas) foram feitas utilizando o software GraphPad Prism[®] v.5 (GraphPad Software Inc, San Diego, USA). A análise dos planos de posicionamento e locomoção (experimento 1) foi realizada utilizando o software de análise de imagem ANY-maze[®] (Stoelting Co., USA).

4 Resultados

4.1 Experimento 1: Padronização do Condicionamento Olfatório de Medo

O padrão comportamental dos ratos submetidos à padronização do COM foi avaliado 24, 48 e 72 h após o condicionamento, nas sessões de familiarização, EC-I e EC-II respectivamente. Conforme visualizado nas figuras 13 e 14, a análise estatística não revelou diferenças significativas entre os grupos durante a sessão de familiarização. Portanto, os resultados dos parâmetros comportamentais, avaliados em todos os grupos, foram agrupados e representados pela média \pm limite de confiança ($\pm 95\%$) da população, através das barras hachuradas horizontais apresentadas nos gráficos. Ainda, ao compararmos com dados prévios de nosso laboratório (SOUZA, 2007; KROON e CAROBREZ, 2009), a ausência de resposta defensiva dos animais durante a sessão de familiarização sugere que não houve generalização da resposta ou aumento de ansiedade induzido pelo condicionamento 24 h antes.

Durante as sessões de teste EC-I e EC-II, a ANOVA revelou uma diferença significativa para o fator condição (Não pareado 5, Pareado 1, Pareado 3, e Pareado 5) dentro de cada sessão, nos parâmetros de tempo próximo [$F_{(3,30)}=10,77$; $p<0,0005$] e tempo escondido [$F_{(3,30)}=15,10$; $p<0,0005$] (figura 13), e também para o tempo de *head-out* [$F_{(3,30)}=19,59$; $p<0,0005$] (figura 13), mas não detectou diferenças para o fator repetição (sessão). A ANOVA também não revelou alterações no número de cruzamentos em nenhum dos fatores (condição x sessão). Ainda, a análise estatística não detectou diferenças nos parâmetros avaliados entre o grupo Não pareado 5 e os grupos Pareado 1 ou 3 (figuras 13 e 14).

A posteriori, o teste de Newman-Keuls revelou uma redução no tempo próximo ($p<0,005$; figura 13a) e um aumento nos tempos escondido ($p<0,005$; figura 13b) e de *head-out* ($p<0,005$; figura 14a) no grupo Pareado 5 (5 choques pareados) quando comparado ao grupo Não pareado 5 (5 choques não pareados) em ambas as sessões (EC-I/EC-II), sugerindo a formação de um condicionamento olfatório de associação entre os estímulos olfatório (EC) e 5 choques elétricos nas patas (EI), bem como a ocorrência de condicionamento de segunda ordem, entre o EC (odor) e o ambiente (caixa de odor) na sessão de teste EC-I, o qual foi expresso quando os animais foram submetidos ao teste EC-II.

Da mesma maneira, quando realizamos uma análise do plano de posicionamento na sessão de teste EC-I (figura 15), utilizando um software de análise de imagem, pôde-se observar um deslocamento no padrão de posicionamento entre os grupos dentro da caixa em direção ao compartimento fechado, além de uma redução nos comportamentos de exploração vertical e de investigação da fonte de odor, conforme a intensidade e o número de pareamentos aumentava (desde os animais não pareados até os animais pareados com 5 choques), corroborando os dados comportamentais anteriormente descritos.

Quando analisamos o padrão de locomoção (figura 16), a ANOVA detectou diferenças significativas na velocidade máxima [$F_{(3,30)}=15,98$; $p<0,0005$] e na distância percorrida [$F_{(3,30)}=5,13$; $p<0,05$]. Na sessão de teste EC-I, a análise *post hoc* revelou um aumento na velocidade máxima ($p<0,005$) no grupo Pareado 5 comparado ao grupo Não pareado 5, sugerindo a ocorrência de comportamentos intensos de esquiva, como fuga. Este mesmo teste *post hoc* revelou ainda uma redução no parâmetro de distância percorrida nos grupos Pareado 1, Pareado 3 e Pareado 5, quando comparados ao grupo Não pareado 5, sugerindo uma possível redução da exploração quando os animais condicionados são expostos ao EC na sessão de teste EC-I, corroborando os dados comportamentais de aumento de resposta defensiva condicionada observados nas figuras 13 e 14.

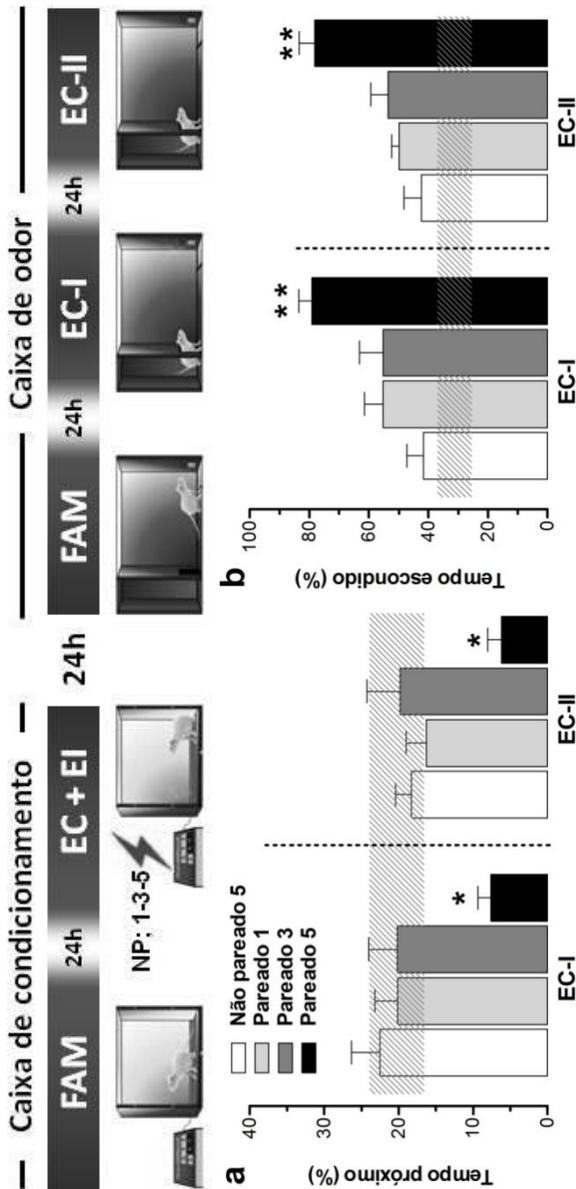


Figura 13: Diagrama superior: padronização do condicionamento olfatório de medo (COM) com diferentes protocolos de associação. Painéis inferiores: a) porcentagem de tempo próximo à fonte de odor durante as três sessões de experimento. b) porcentagem de tempo escondido no compartimento fechado. Os valores comportamentais básicos de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os histogramas verticais representam a média \pm e.p.m. em cada sessão (EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ comparado ao grupo não pareado 5, na respectiva sessão ($n=8-9$ /grupo).

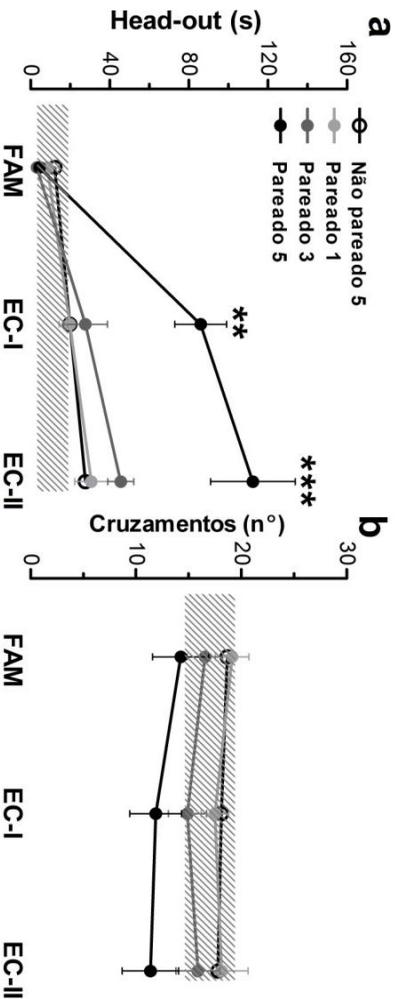


Figura 14: Padronização do condicionamento olfatório de medo (COM) com diferentes protocolos de associação. a) tempo em avaliação de risco (head-out) e b) parâmetros de locomoção (número de cruzamentos). Os valores basais, de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os pontos representam a média \pm e.p.m. dos grupos em cada sessão (FAM, EC-I e EC-II). Legenda: ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,0005$ comparados ao grupo não pareado 5, na respectiva sessão ($n=8-9$ /grupo).

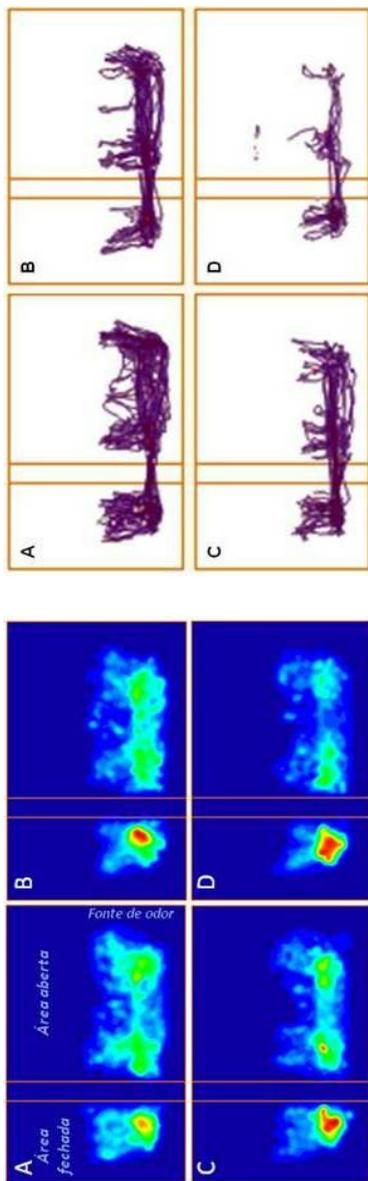


Figura 15: Exemplo dos planos de posicionamento (painel esquerdo) e locomoção (painel direito) na caixa de odor (EC-I) de animais submetidos aos diferentes protocolos de associação. No plano de posicionamento, a temperatura de cor se correlaciona com o tempo de permanência em determinado local da caixa durante a sessão (min máx). No plano de locomoção, a linha violeta indica por onde o animal transitou durante a sessão. Legenda: A) Não Pareado 5; B) Pareado 1; C) Pareado 3; e D) Pareado 5.

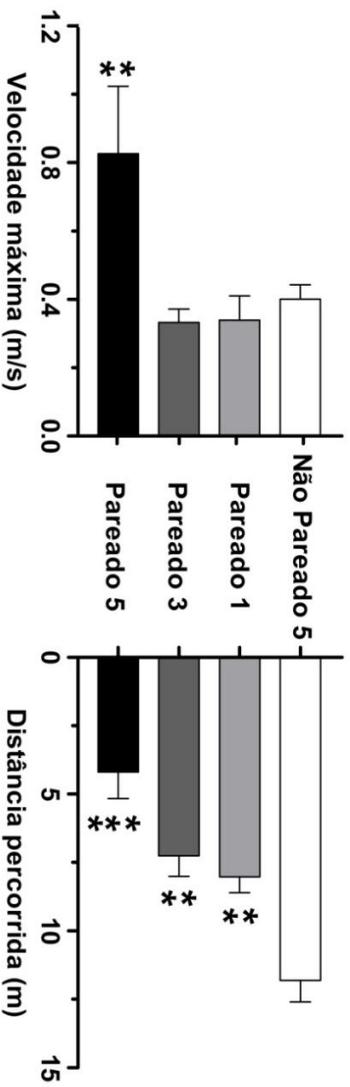


Figura 16: Análise dos padrões de locomoção dos diferentes grupos submetidos à padronização do COM. Os histogramas horizontais representam a média \pm e.p.m. dos grupos na sessão EC-1. Legenda: ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,0005$ comparado ao grupo não pareado 5 na respectiva sessão (n=8-9/grupo).

4.2 *Experimento 2: Avaliação dos níveis séricos de corticosterona após as sessões de condicionamento e teste EC-I*

Secreção de corticosterona após o condicionamento

A figura 17a ilustra as concentrações séricas de corticosterona 30 min após os animais serem expostos à caixa de condicionamento nas seguintes condições: sem choque/sem odor ou sem choque/com odor, e Pareados 1 ou 5. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o tratamento (tipo de pareamento) [$F_{(3,16)}=40,37$; $p<0,0005$]. O teste subsequente de Newman-Keuls apontou um aumento significativo ($p<0,0005$) no grupo Pareado 5 quando comparado aos demais grupos. De maneira oposta, ambos os grupos sem choque/odor e Pareado 1 não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo que foi exposto apenas à caixa de condicionamento (sem choque/sem odor).

Em conjunto, os dados sugerem uma intensa ativação do eixo HPA induzida pelo condicionamento com 5 choques.

Secreção de corticosterona após a sessão de teste EC-I

A figura 17b mostra a resposta hormonal em animais expostos ao teste EC-I 48 h após serem submetidos a diferentes protocolos de condicionamento: Não condicionado, Não pareado 5, Pareados 1 ou 5. A análise de variância demonstrou uma diferença significativa nos níveis séricos de corticosterona entre os grupos avaliados [$F_{(3,17)}=62,82$; $p<0,05$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou um aumento significativo nos grupos Pareado 1 ($p<0,005$) e Pareado 5 ($p<0,0005$) quando comparados ao grupo Não pareado 5, sugerindo uma importante ativação do eixo HPA nos animais pareados com 5 choques em resposta ao EC, corroborando os dados comportamentais observados no experimento 1. Em contrapartida, o aumento nos níveis de corticosterona no grupo Pareado 1 sugere a possível formação de um traço de memória, decorrente do condicionamento possivelmente fraco, o qual parece não foi detectado comportamentalmente (experimento 1).

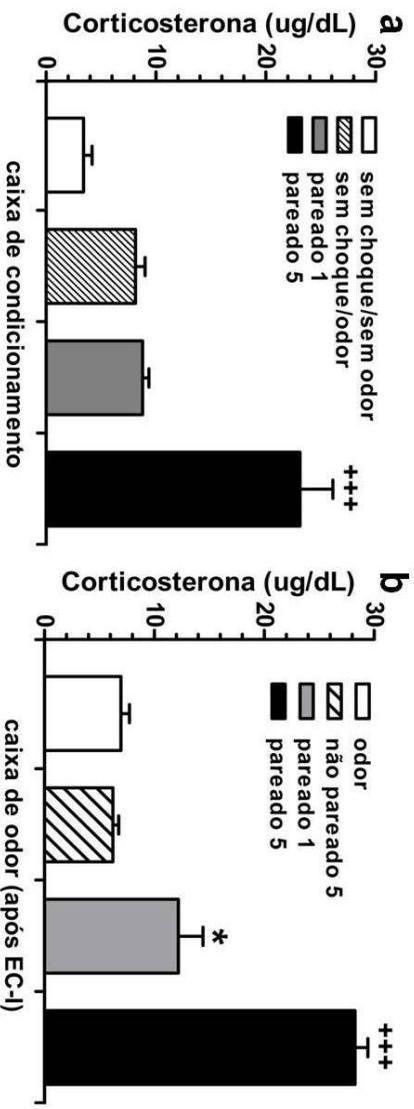
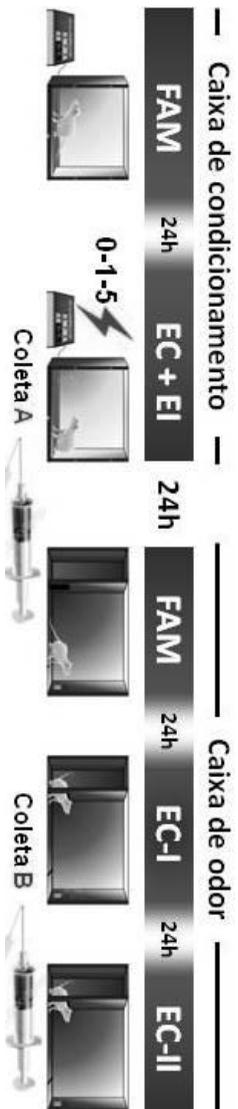


Figura 17: Painel superior: representação esquemática do protocolo de COM para coleta de sangue e dosagem dos níveis séricos de corticosterona. Painéis inferiores: níveis séricos de corticosterona em animais submetidos COM em diferentes condições experimentais. a) coleta A, 30 min após a sessão de condicionamento; e b) coleta B, 30 min após a sessão EC-I. Legenda: * $p < 0,05$ comparado ao grupo não pareado, e +++ $p < 0,0005$ comparado a todos os grupos na respectiva sessão (n=5-6/grupo).

4.3 Experimento 3: Efeitos da administração sistêmica aguda de agonistas GR e MR sobre um traço fraco de memória no condicionamento olfatório de medo

Dexametasona e Fludrocortisona são potentes agonistas GR e MR, respectivamente. Assim, para identificar uma possível facilitação da consolidação no COM, ratos foram tratados com uma única administração sistêmica de dexametasona (1,0 ou 3,0 mg/kg) ou fludrocortisona (1,0 ou 3,0 mg/kg), ou seus respectivos controles, imediatamente após o condicionamento com 1 choque, o qual foi anteriormente demonstrado (experimento 1) ineficiente para causar resposta comportamental condicionada.

Efeitos da administração de dexametasona sobre a formação de memórias aversivas

As figuras 18 e 19 ilustram os parâmetros comportamentais avaliados nas sessões de familiarização, teste EC-I e teste EC-II: tempo próximo à fonte de odor e tempo escondido, bem como os parâmetros de avaliação de risco (*head-out*) e locomoção (número de cruzamentos).

A *priori*, a ANOVA não detectou diferenças estatísticas entre os grupos nos parâmetros avaliados durante a sessão de familiarização. Portanto, os dados da familiarização estão representados pelas barras hachuradas horizontais, que expressam as médias e os limites de confiança ($\pm 95\%$).

Conforme observado na figura 18, a administração de DEX (3 mg/kg), imediatamente após o condicionamento, promoveu uma facilitação do COM. A ANOVA revelou diferenças no fator tratamento nos parâmetros de aproximação [$F_{(3,25)}=6,28$; $p<0,005$] e tempo escondido [$F_{(3,25)}=12,62$; $p<0,0005$]. O teste *post hoc* revelou uma redução significativa da aproximação (figura 18a) tanto na sessão de teste EC-I ($p<0,05$) quanto EC-II ($p<0,05$), e um aumento do tempo escondido (figura 18b) também nas sessões de teste EC-I ($p<0,05$) e teste EC-II ($p<0,05$) no grupo tratado com DEX 3,0 mg/kg comparado ao grupo controle na respectiva sessão. Da mesma maneira a ANOVA detectou diferenças significativas na avaliação de risco [$F_{(3,25)}=12,56$; $p<0,0005$], mas não no parâmetro de locomoção (figura 19a/b). O teste de Newman-Keuls revelou um aumento no tempo de *head-out* nos animais tratados com DEX 3,0 mg/kg, tanto na sessão de teste EC-I ($p<0,05$) quanto na sessão de teste EC-II ($p<0,0005$), quando comparado ao grupo controle na respectiva sessão (figura 19a).

De maneira interessante, nos animais não condicionados (DEX 3mg s/c), a administração de DEX 3,0 mg/kg não promoveu associação *per se*, observado pela ausência de resposta defensiva neste grupo (figuras 18 e 19). Estes dados sugerem um efeito facilitatório, que ocorreria apenas quando há apresentação do estímulo incondicionado, ainda que fraco. Em resumo, os resultados sugerem um processo de facilitação induzido pela ativação dos receptores glicocorticoides durante a fase de consolidação.

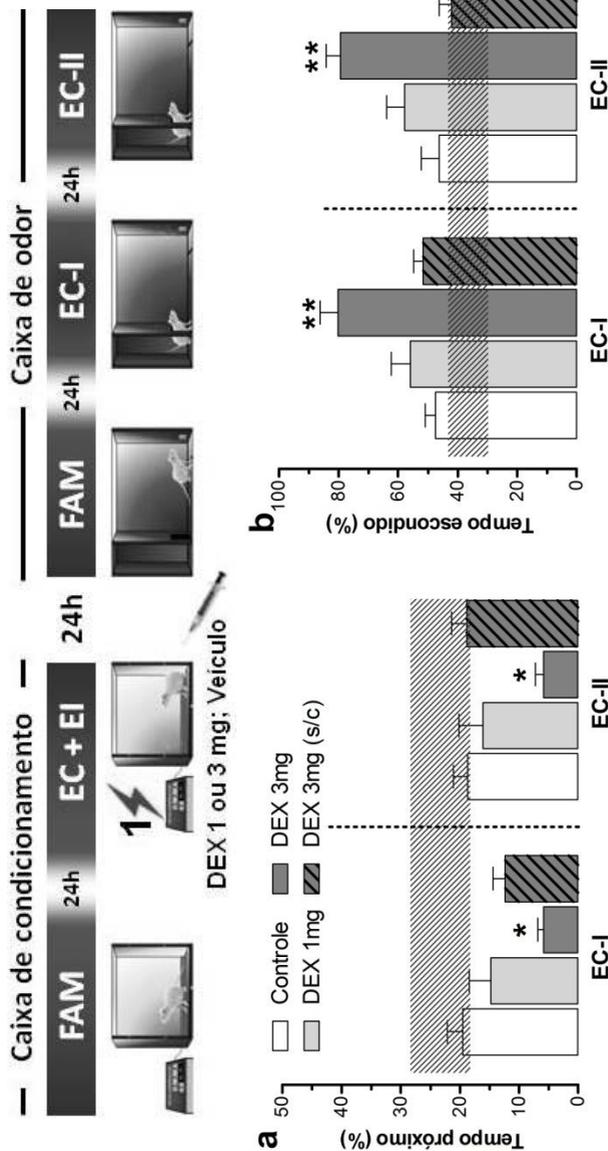


Figura 18: Diagrama superior: representação do protocolo de facilitação com a administração de dexametasona após o condicionamento com 1 choque. Painéis inferiores: efeitos da administração de veículo (Controle) ou dexametasona (DEX 1 ou 3 mg/kg) imediatamente após o condicionamento com 1 choque. Um grupo adicional foi administrado com dexametasona na ausência de pareamento (DEX 3 mg s/c - sem choque). As colunas verticais representam os parâmetros de porcentagem de tempo a) próximo da fonte de odor e b) tempo escondido. Os valores comportamentais básicos de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os histogramas verticais representam a média \pm e.p.m. em cada sessão (EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ comparados ao grupo controle na respectiva sessão ($n = 6-9$ /grupo).

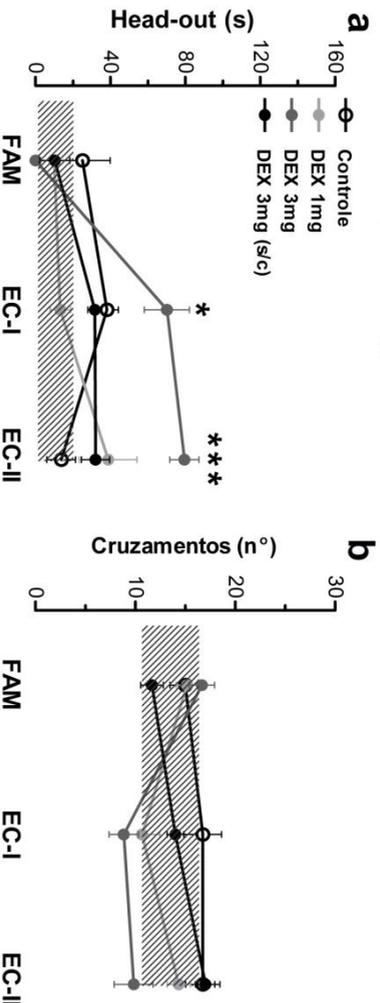
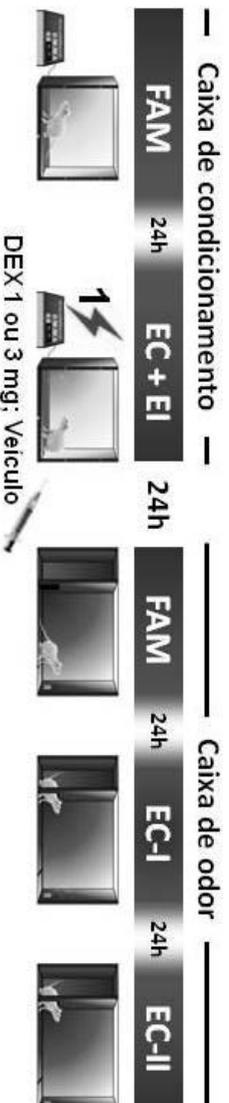


Figura 19: Avaliação dos efeitos da administração de veículo (Controle) ou dexametasona (DEX 1 ou 3 mg/kg) imediatamente após o condicionamento com um choque sobre a) o tempo em avaliação de risco (head-out) e b) o parâmetro de locomoção (número de cruzamentos). Um grupo adicional foi administrado com dexametasona na ausência de pareamento (DEX 3 mg s/c – sem choque). Os valores basais de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os pontos representam a média \pm e.p.m. dos grupos em cada sessão (FAM, EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0005$ comparados ao grupo controle na respectiva sessão ($n = 6-9$ /grupo).

Efeitos da administração de fludrocortisona sobre a formação de memórias aversivas

As figuras 20 e 21 ilustram os parâmetros comportamentais avaliados nas sessões de familiarização, teste EC-I e teste EC-II: tempo próximo à fonte de odor e tempo escondido, bem como os parâmetros de avaliação de risco (*head-out*) e locomoção (número de cruzamentos).

A ANOVA não detectou diferenças estatísticas entre os grupos nos parâmetros avaliados durante a sessão de familiarização. Assim, os dados da familiarização estão representados pelas barras hachuradas horizontais e expressam as médias e os limites de confiança ($\pm 95\%$).

A resposta defensiva observada nas figuras 20 e 21 ilustra os efeitos da administração de FLU (3 mg/kg) imediatamente após o condicionamento. Neste experimento a ANOVA revelou diferenças para o fator tratamento, nos parâmetros de tempo escondido [$F_{(3,31)}=9,79$; $p<0,0005$] e *head-out* [$F_{(3,31)}=23,43$; $p<0,0005$]. A ANOVA não detectou diferenças significativas no parâmetro de tempo próximo e no parâmetro de locomoção. O teste Newman-Keuls não revelou uma redução significativa no tempo próximo na sessão de teste EC-I ($p=0,22$; figura 20a), mas revelou uma tendência para redução no teste EC-II ($p=0,054$; figura 20a) no grupo tratado com FLU 3,0 mg/kg quando comparado ao grupo controle na respectiva sessão. Em contrapartida, a análise *post hoc* revelou um aumento do tempo escondido (figura 20b) nas sessões de teste EC-I ($p<0,05$) e teste EC-II ($p<0,05$) nos animais administrados com FLU 3,0 mg/kg comparados ao grupo controle na respectiva sessão. O teste *post hoc* também revelou um aumento no tempo de *head-out* nos animais tratados com FLU, em ambas as doses, tanto na sessão de teste EC-I ($p<0,005$) quanto na sessão de teste EC-II ($p<0,005$), quando comparados ao grupo controle na respectiva sessão (figura 21a).

A administração de FLU 3,0 mg/kg em animais não condicionados (FLU 3mg s/c) não promoveu resposta defensiva nas sessões de teste EC-I ou EC-II (figuras 20 e 21), sugerindo um efeito facilitatório que é dependente da exposição ao estímulo incondicionado (1 choque).

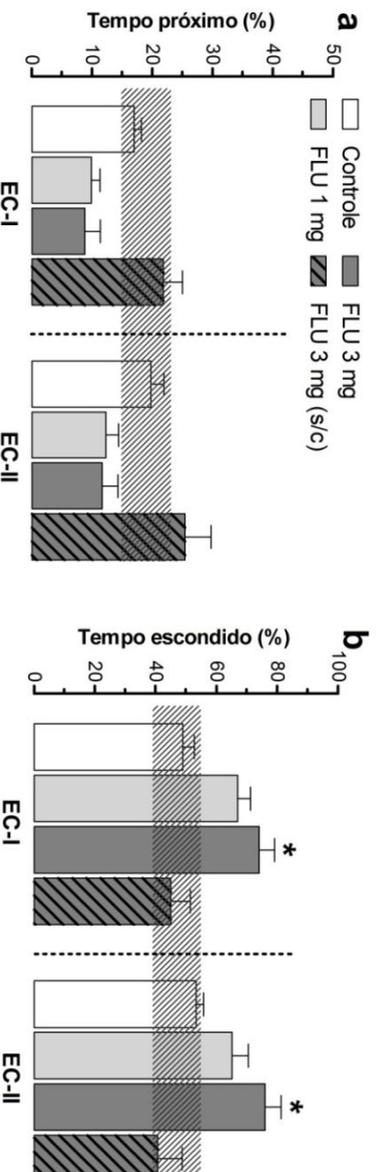
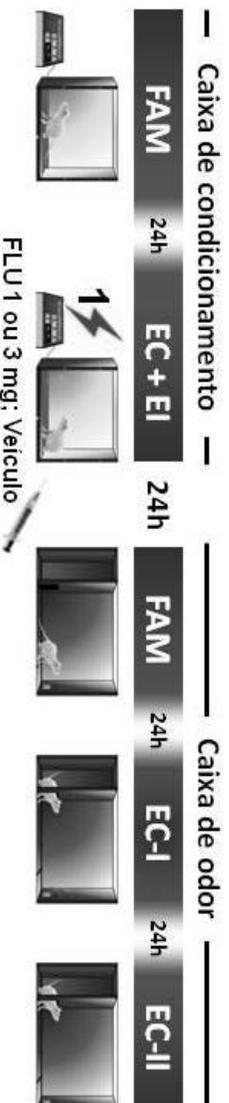


Figura 20: Diagrama superior: representação do protocolo de facilitação com a administração de fludrocortisona após o condicionamento com 1 choque. Painéis inferiores: efeitos comportamentais da administração de veículo (Controle) ou fludrocortisona (FLU 1 ou 3 mg/kg) imediatamente após o condicionamento com 1 choque. Um grupo adicional foi administrado com fludrocortisona na ausência de pareamento (FLU 3 mg s/c – sem choque). As colunas verticais representam os parâmetros de porcentagem de tempo a) próximo da fonte de odor e b) escondido. Os valores comportamentais basais de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os histogramas verticais representam a média \pm e.p.m. em cada sessão (EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle na respectiva sessão (n=8-9/grupo).

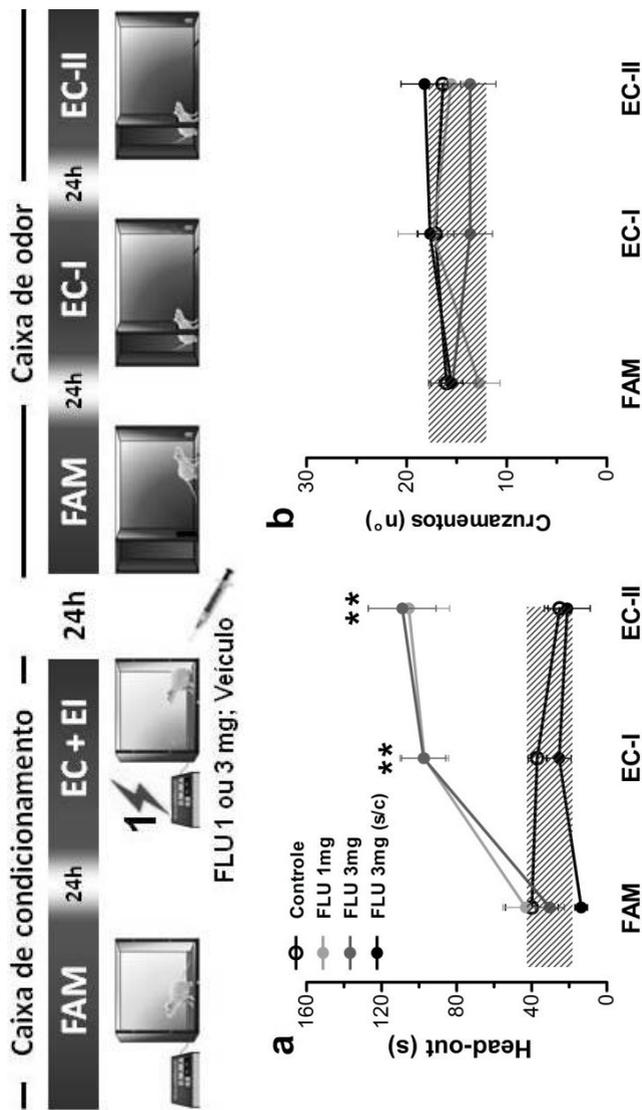


Figura 21: Avaliação dos efeitos da administração de veículo (Controle) ou fludrocortisona (FLU 1 ou 3 mg/kg sobre a) o tempo em avaliação de risco (head-out) e b) o parâmetro de locomoção (número de cruzamentos). Um grupo adicional foi administrado com fludrocortisona na ausência de pareamento (FLU 3 mg s/c – sem choque). Os valores basais, de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os pontos representam a média \pm e.p.m. dos grupos em cada sessão (FAM, EC-I e EC-II). Legenda: ** $p < 0,005$ comparados ao grupo controle na respectiva sessão ($n=6-9$ /grupo).

4.4 Experimento 4: Efeitos da administração sistêmica aguda de agonistas GR e MR sobre a AQUISIÇÃO do condicionamento olfatório de medo

Dados da literatura também têm sugerido que o estresse ou uma grande ativação dos receptores corticosteroides que ocorra determinado tempo *antes* de uma tarefa de aprendizado, poderia prejudicar a formação de memórias. Desta forma, para avaliar o papel temporal da ativação dos receptores corticosteroides sobre a aquisição do COM, ratos foram tratados com uma única administração sistêmica de dexametasona (1,0 ou 3,0 mg/kg) ou fludrocortisona (1,0 ou 3,0 mg/kg), ou seus respectivos controles, 60 ou 20 min antes do condicionamento com 5 choques, o qual demonstramos no experimento 1 ser um protocolo eficiente em promover COM.

Papel dos receptores glicocorticoides (GR) sobre a aquisição de memórias aversivas

As figuras 22 e 23 ilustram o perfil comportamental dos animais em relação aos tempos próximo à fonte de odor, escondido e em avaliação de risco (*head-out*), bem como do número de cruzamentos, durante as três fases do experimento na caixa de odor (familiarização, EC-I e EC-II). Nenhuma diferença estatística foi observada nos parâmetros comportamentais avaliados durante a familiarização e, portanto, os dados da familiarização estão representados pelas barras hachuradas horizontais e expressam as médias e os limites de confiança ($\pm 95\%$).

A ANOVA revelou diferenças significativas para o fator tratamento nos parâmetros de tempo próximo [$F_{(3,35)}=6,22$; $p<0,005$], tempo escondido [$F_{(3,35)}=10,45$; $p<0,0005$] e avaliação de risco (*head-out*) [$F_{(3,35)}=28,04$; $p<0,0005$]. As comparações pelo teste *post hoc* revelaram um aumento significativo no tempo próximo ($p<0,05$; figura 22a), e uma redução nos parâmetros de tempo escondido ($p<0,005$; figura 22b) e *head-out* ($p<0,05$; figura 23a) na sessão de teste EC-I nos animais tratados com DEX 3,0 mg/kg 60 min antes, e também uma redução no tempo em *head-out* ($p<0,05$; figura 23a) nos animais tratados com DEX 1,0 mg/kg 60 min antes, comparados ao grupo controle na respectiva sessão. No teste EC-II (contexto) o teste de Newman-Keuls também revelou um aumento no tempo próximo ($p<0,05$; figura 22a) e uma redução nos parâmetros de tempo escondido ($p<0,005$; figura 22b) e *head-out* ($p<0,005$; figura 23a) nos animais

tratados com DEX 3,0 mg/kg 60 min antes, e uma redução no tempo de *head-out* ($p < 0,05$; figura 23a) nos animais tratados com DEX 1,0 mg/kg 60 min antes, comparados ao grupo controle na respectiva sessão. Não foram observadas alterações no parâmetro de locomoção (figura 23b).

A administração de DEX 3,0 mg/kg 20 min antes do condicionamento não promoveu alterações nos parâmetros de tempo próximo e escondido, e no número de cruzamentos. Entretanto, o teste *post hoc* revelou um aumento no parâmetro de avaliação de risco nas sessões de teste EC-I ($p < 0,005$) e teste EC-II ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle na respectiva sessão (figura 23a), sugerindo um efeito facilitatório sobre o processo associativo.

Em resumo, os dados apontam para um papel temporal na atividade dos receptores glicocorticoides, prejudicando o aprendizado quando ativados 60 min antes da tarefa, mas facilitando o armazenamento quando ativados próximo da tarefa a ser lembrada (20 min antes).

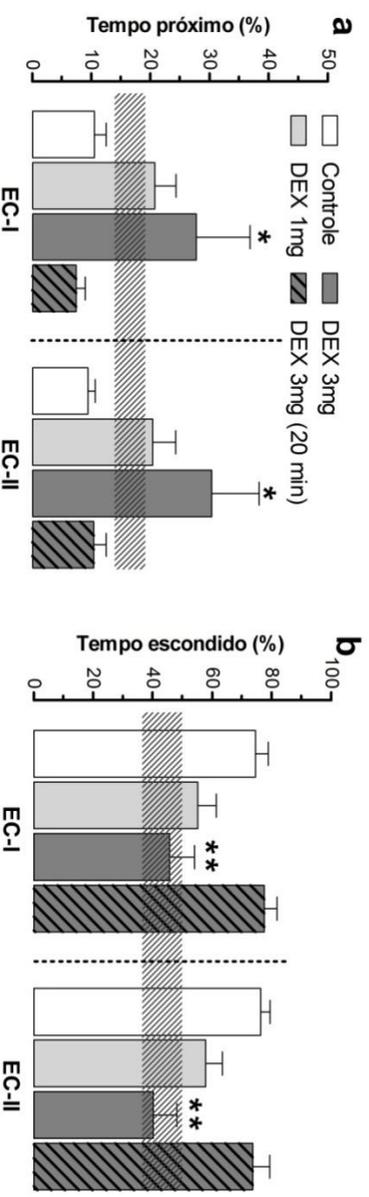
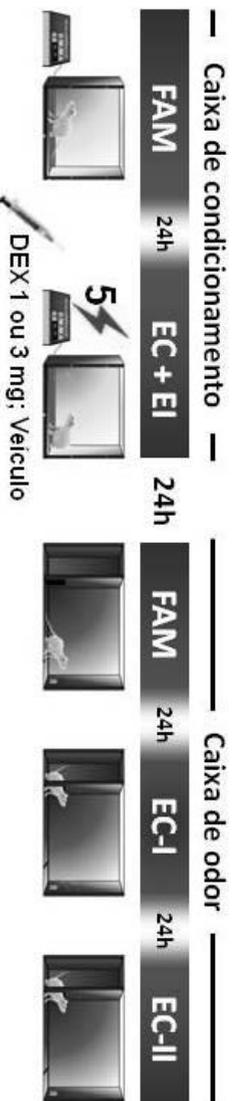


Figura 22: Diagrama superior: representação do protocolo do COM com a administração de dexametasona antes da sessão de condicionamento. Painéis inferiores: efeitos da administração de veículo (Controle) ou dexametasona (DEX 1 ou 3 mg/kg) 60 min antes do condicionamento com 5 choques. Um grupo adicional foi administrado com dexametasona 20 min antes do condicionamento (DEX 3 mg - 20 min). As colunas verticais representam os parâmetros de porcentagem de tempo a) próximo da fonte de odor e b) escondido. Os valores comportamentais basais de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os histogramas verticais representam a média \pm e.p.m. em cada sessão (EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ comparados ao grupo controle na respectiva sessão ($n = 7-15$ /grupo).

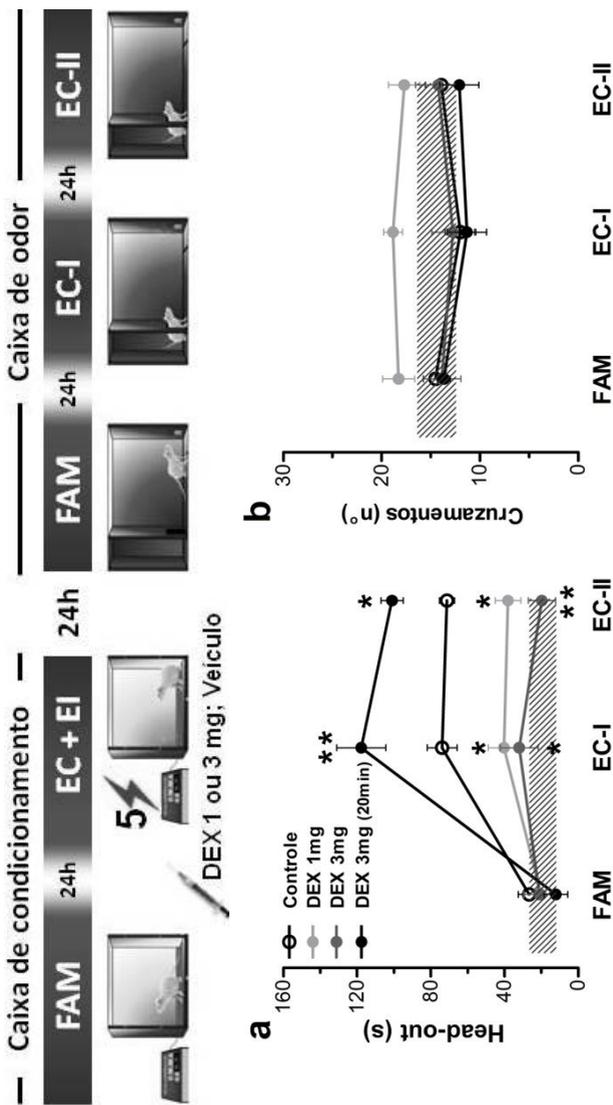


Figura 23: Avaliação dos efeitos da administração de veículo (Controle) ou dexametasona (DEX 1 ou 3 mg/kg) 60 min antes do condicionamento, sobre a) o tempo em avaliação de risco (head-out) e b) o parâmetro de locomoção (número de cruzamentos). Um grupo adicional foi administrado com dexametasona 20 min antes do condicionamento (DEX 3 mg - 20 min). Os valores basais, de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os pontos representam a média \pm e.p.m. dos grupos em cada sessão (FAM, EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ comparados ao grupo controle na respectiva sessão ($n = 7-15$ /grupo).

Papel do agonista mineralocorticoide (MR) na AQUISIÇÃO de memórias aversivas

As figuras 24 e 25 ilustram o perfil comportamental dos animais em relação aos tempos próximo à fonte de odor, escondido e em avaliação de risco (*head-out*), bem como do número de cruzamentos, durante as três fases do experimento na caixa de odor (familiarização, EC-I e EC-II). Nenhuma diferença estatística foi observada nos parâmetros comportamentais avaliados durante a familiarização. Os dados da familiarização estão representados pelas barras hachuradas horizontais e expressam as médias e os limites de confiança ($\pm 95\%$).

A ANOVA revelou diferenças significativas para o fator tratamento nos parâmetros de tempo escondido [$F_{(3,31)}=6,55$; $p<0,005$] e avaliação de risco (*head-out*) [$F_{(3,31)}=17,22$; $p<0,005$]. A *posteriori*, o teste de Newman-Keuls revelou uma redução nos parâmetros de tempo escondido ($p<0,05$; figura 24b) e *head-out* ($p<0,005$; figura 25a) na sessão de teste EC-I nos animais tratados com FLU 3,0 mg/kg 60 min antes, e também uma redução no tempo em *head-out* ($p<0,005$; figura 25a) nos animais tratados com FLU 1,0 mg/kg 60 min antes, comparados ao grupo controle na respectiva sessão. Na sessão de teste EC-II (contexto) a análise *post hoc* também revelou uma redução nos parâmetros de tempo escondido ($p<0,05$; figura 24b) e *head-out* ($p<0,005$; figura 25a) nos animais tratados com FLU 3,0 mg/kg 60 min antes, e uma redução no tempo de *head-out* ($p<0,005$; figura 25a) nos animais tratados com FLU 1,0 mg/kg 60 min antes, comparados ao grupo controle na respectiva sessão.

Diferentemente do que foi observado no experimento anterior (figura 23a), a administração de FLU 3,0 mg/kg 20 min antes do condicionamento não promoveu alterações comportamentais, sugerindo também um papel temporal prejudicial exercido pelo agonista MR sobre o aprendizado quando administrado 60 min antes da tarefa assim como os receptores glicocorticoides, embora um efeito reforçador do agonista administrado 20 min antes possa ser descartado.

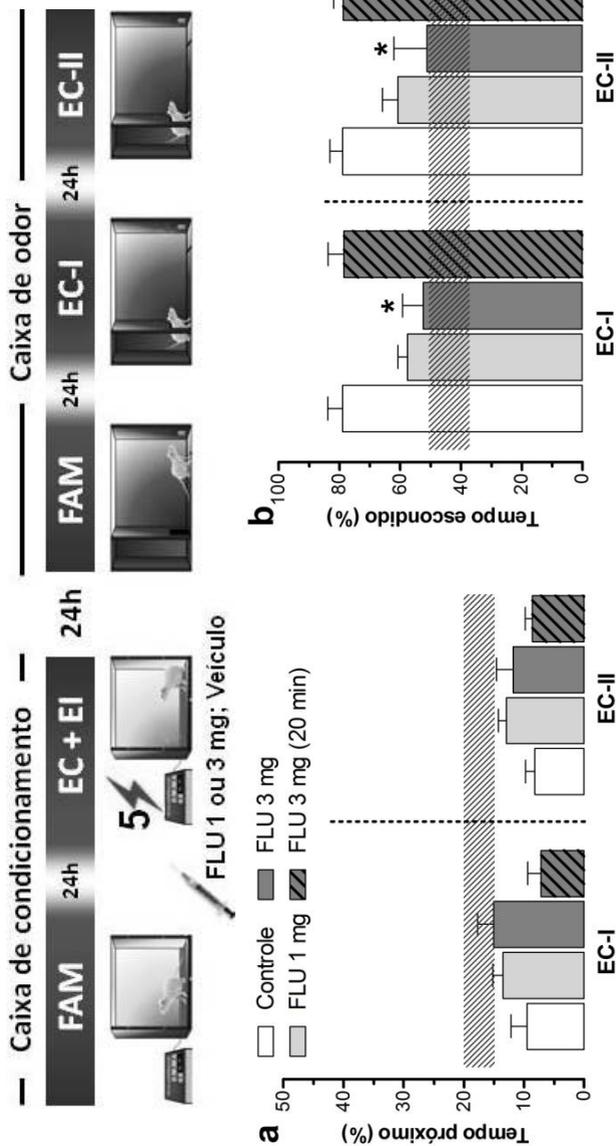


Figura 24: Diagrama superior: representação do protocolo do COM com a administração de fludrocortisona antes da sessão de condicionamento. Painéis inferiores: efeitos da administração de veículo (Controle) ou fludrocortisona (FLU 1 ou 3 mg/kg) 60 min antes do condicionamento com 5 choques. Um grupo adicional foi administrado com fludrocortisona 20 min antes do condicionamento (FLU 3 mg - 20 min). As colunas verticais representam os parâmetros de porcentagem de tempo a) próximo da fonte de odor e b) escondido. Os valores comportamentais básicos de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os histogramas verticais representam a média \pm e.p.m. em cada sessão (EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle na respectiva sessão ($n = 6-10$ /grupo).

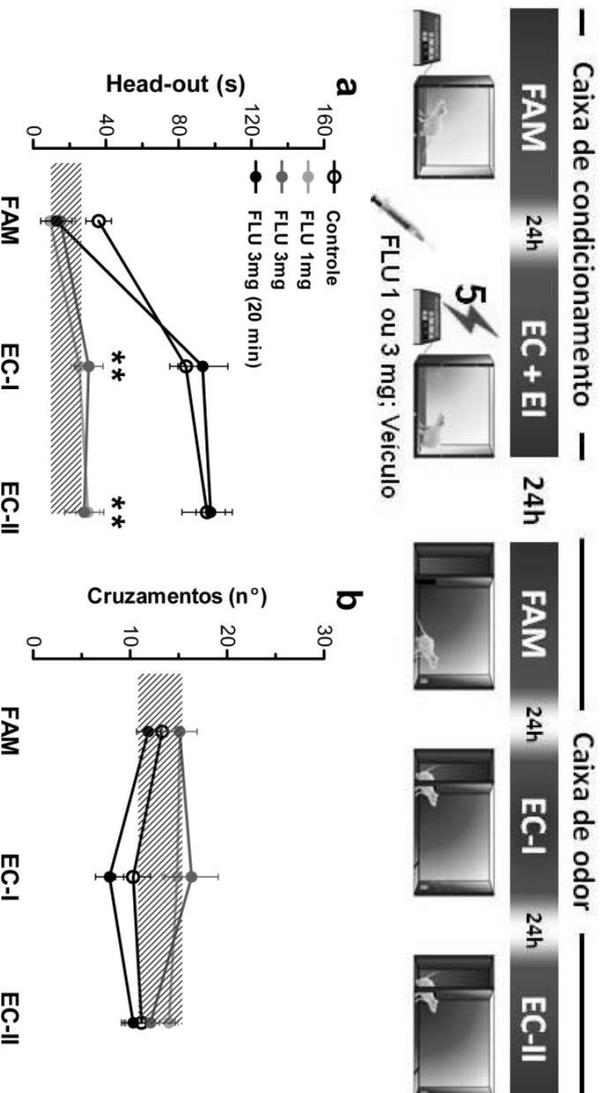


Figura 25: Avaliação dos efeitos da administração de veículo (Controle) ou fludrocortisona (FLU 1 ou 3 mg/kg) 60 min antes do condicionamento, sobre a) o tempo em avaliação de risco (head-out) e b) o parâmetro de locomoção (número de cruzamentos). Um grupo adicional foi administrado com fludrocortisona 20 min antes do condicionamento (FLU 3 mg – 20 min). Os valores basais, de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os pontos representam a média \pm e.p.m. dos grupos em cada sessão (FAM, EC-I e EC-II). Legenda: ** $p < 0,005$ comparado ao grupo controle na respectiva sessão (n=6-10/grupo).

4.5 *Experimento 5: Efeitos da administração sistêmica aguda de agonistas GR e MR na EVOCAÇÃO da memória olfatória aversiva*

Da mesma maneira que os corticosteroides modulam os aspectos funcionais da aquisição e consolidação de memórias, dados da literatura têm sugerido que estes mesmos hormônios podem facilitar ou prejudicar a evocação de determinadas memórias, de acordo com sua escala temporal de ação. Assim, para avaliar o papel temporal da ativação dos receptores corticosteroides sobre a evocação do COM, ratos foram tratados com uma única administração sistêmica de dexametasona (1,0 ou 3,0 mg/kg) ou fludrocortisona (1,0 ou 3,0 mg/kg), ou seus respectivos controles, 60 ou 20 min antes do da exposição ao EC (odor) na sessão de teste EC-I.

Efeitos da administração do agonista GR, dexametasona, na EVOCAÇÃO do COM

A evocação da resposta defensiva de ratos condicionados com 5 choques foi avaliada 60 min após a administração de solução controle ou dexametasona (1,0 ou 3,0 mg/kg), ou 20 min após a administração de dexametasona 1 mg/kg, como mostram as figuras 26 e 27. Não foram encontradas diferenças estatísticas nos parâmetros comportamentais avaliados durante a familiarização. Desta forma, os dados da familiarização estão representados pelas barras hachuradas horizontais e expressam as médias e os limites de confiança ($\pm 95\%$).

A análise de variância revelou diferenças significativas para o fator tratamento nos parâmetros tempo próximo [$F_{(3,38)}=7,21$; $p<0,005$] e tempo escondido [$F_{(3,38)}=7,80$; $p<0,005$], e para os fatores tratamento x sessão (EC-I, EC-II) no tempo de *head-out* [$F_{(3,38)}=8,00$; $p<0,0005$]. Não foram encontradas diferenças no número de cruzamentos.

As comparações pelo teste de Newman-Keuls revelaram um aumento significativo no tempo próximo ($p<0,005$; figura 26a), e uma redução nos tempos escondido ($p<0,005$; figura 26b) e em *head-out* ($p<0,005$; figura 27a) no grupo tratado com DEX 1,0 mg/kg em relação ao grupo controle na sessão de EC-I. O teste *post hoc* também revelou uma redução no tempo de *head-out* ($p<0,005$; figura 27a) nos animais tratados com DEX 3,0 mg/kg na mesma sessão. Em relação ao teste EC-II, o teste de Newman-Keuls também revelou uma redução dos comportamentos defensivos nos animais tratados com DEX 1,0 mg/kg, observada pelo aumento no tempo próximo ($p<0,05$; figura 26a), e

redução nos tempos escondido ($p < 0,05$; figura 26b) e em *head-out* ($p < 0,05$; figura 27a). A administração de DEX 1,0 mg/kg 20 min antes da sessão de teste EC-I não promoveu efeito observável. De maneira interessante, a administração de dexametasona 3,0 mg/kg não prejudicou o condicionamento de segunda ordem subsequente (EC-I/EC-II), demonstrado pelo aumento do comportamento de avaliação de risco, ausente na sessão de EC-I mas presente na sessão de EC-II (figura 27a).

Por fim, os dados sugerem um importante prejuízo na evocação da memória aversiva com conseqüente prejuízo no condicionamento de segunda ordem visualizado pela redução nos comportamentos aversivos em ambas as sessões (EC-I, EC-II).

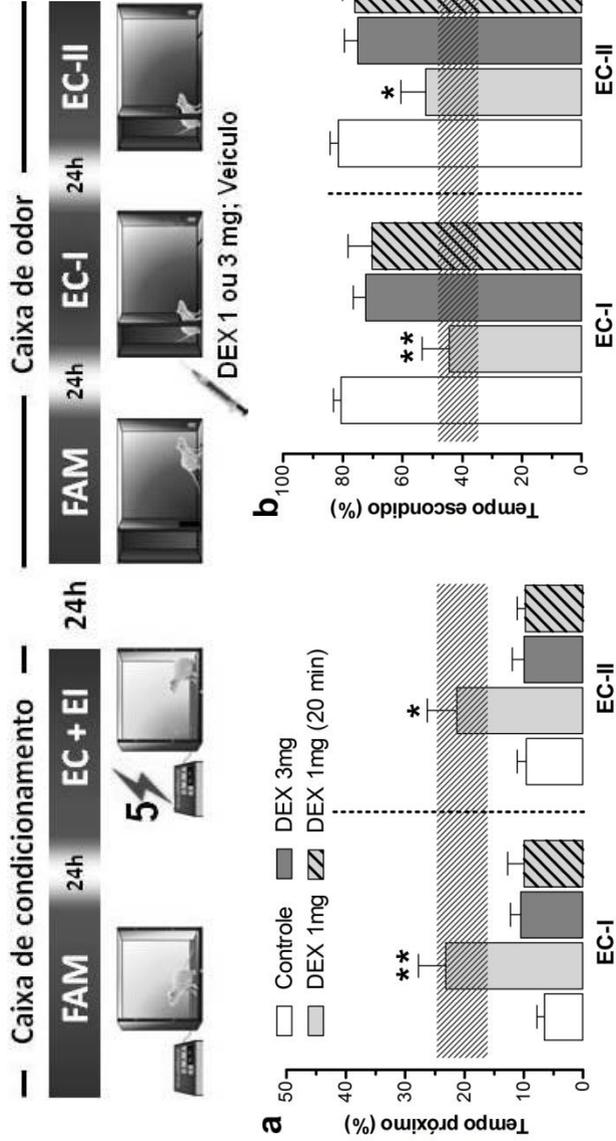


Figura 26: Diagrama superior: representação do protocolo do COM com a administração de dexametasona antes da sessão de teste EC-I. Painéis inferiores: efeitos da administração de veículo (Controle) ou dexametasona (DEX 1 ou 3 mg/kg) 60 min antes do teste EC-I. Um grupo adicional foi administrado com dexametasona 20 min antes da sessão de teste EC-I (DEX 1 mg - 20 min). As colunas verticais representam os parâmetros de porcentagem de tempo a) próximo da fonte de odor e b) escondido. Os valores comportamentais básicos de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, ±95%). Os histogramas verticais representam a média ± e.p.m. em cada sessão (EC-I e EC-II). Legenda: *p<0,05 e **p<0,005 comparado ao grupo controle na respectiva sessão (n=9-12/grupo).

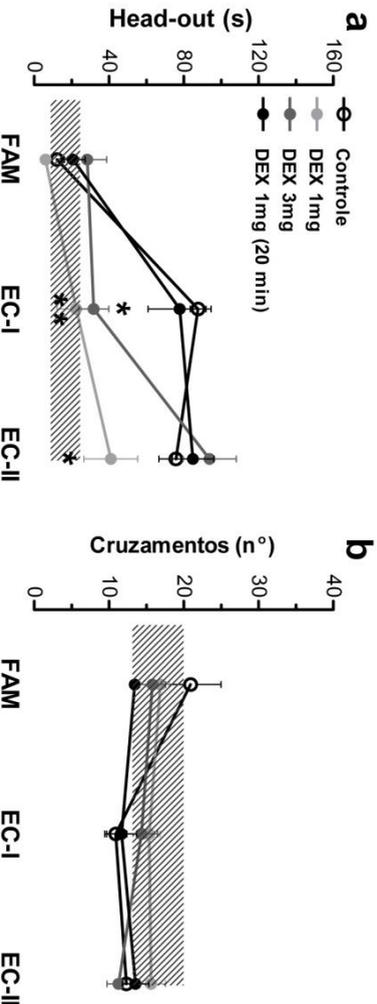
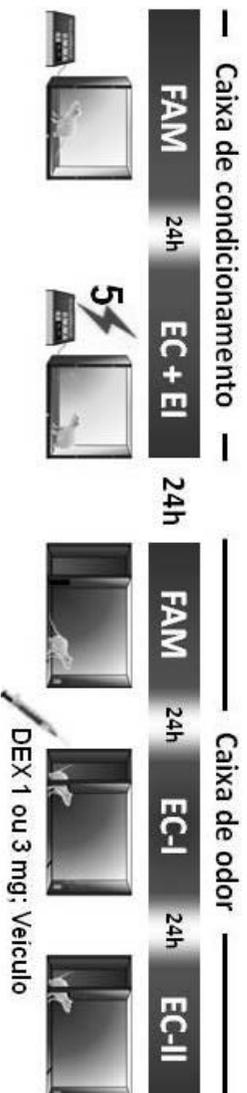


Figura 27: Avaliação dos efeitos da administração de veículo (Controle) ou dexametasona (DEX 1 ou 3 mg/kg) 60 min antes da sessão de teste EC-I, sobre a) o tempo em avaliação de risco (head-out) e b) o parâmetro de locomoção (número de cruzamentos). Um grupo adicional foi administrado com dexametasona 20 min antes da sessão teste EC-I (DEX 1 mg – 20 min). Os valores basais, de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os pontos representam a média \pm e.p.m. dos grupos em cada sessão (FAM, EC-I e EC-II). Legenda: * $p<0,05$ e ** $p<0,005$ comparados ao grupo controle na respectiva sessão ($n=6-10$ /grupo).

Efeitos da administração do agonista MR, fludrocortisona, na EVOCAÇÃO do COM

A evocação da resposta defensiva de ratos condicionados com 5 choques foi avaliada 60 min após a administração de solução controle ou fludrocortisona (1,0 ou 3,0 mg/kg), ou 20 min após a administração de fludrocortisona 1 mg/kg, de acordo com as figuras 28 e 29. Não foram encontradas diferenças estatísticas nos parâmetros comportamentais avaliados durante a familiarização. Desta forma, os dados da familiarização estão representados pelas barras hachuradas horizontais e expressam as médias e os limites de confiança ($\pm 95\%$).

A análise de variância para medidas repetidas não revelou diferenças significativas para o fator tratamento nos parâmetros tempo próximo, tempo escondido (figura 28a/b) e número de cruzamentos (figura 29b). No entanto, a ANOVA revelou significância para o fator tratamento no parâmetro de tempo em *head-out* [$F_{(3,36)}=6,89$; $p<0,005$]. O teste *post hoc* revelou uma redução no tempo de *head-out* nos animais tratados com fludrocortisona 1 mg/kg na sessão de teste EC-I ($p<0,005$) e EC-II ($p<0,05$) em relação ao grupo controle na respectiva sessão (figura 29a). Esta redução pontual no parâmetro de *head-out* sugere uma modificação no processamento de comportamentos ligados à avaliação de risco ou a tomada de decisão, com reflexos tanto ao teste EC-I quanto ao contexto.

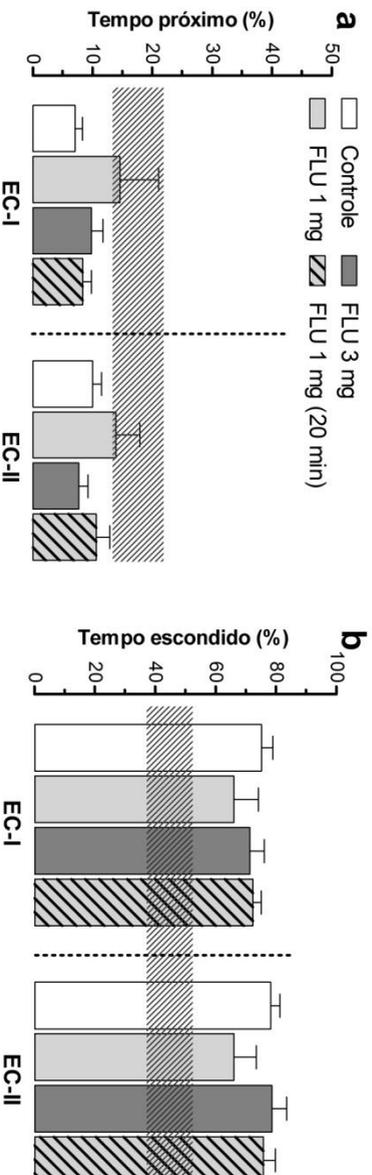
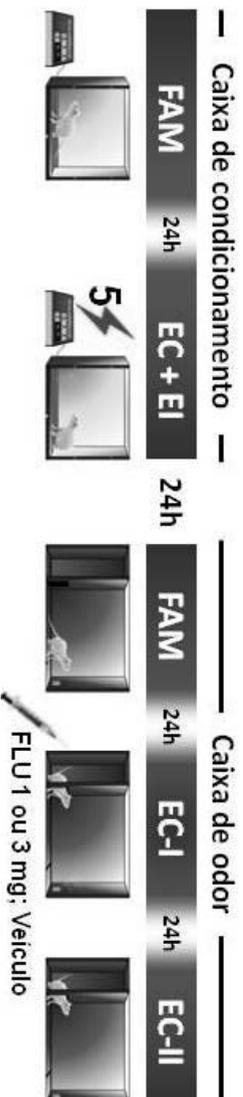


Figura 28: Diagrama superior: representação do protocolo do COM com a administração de fludrocortisona antes da sessão de teste EC-I. Painéis inferiores: efeitos da administração de veículo (Controle) ou fludrocortisona (FLU 1 ou 3 mg/kg) 60 min antes da sessão de teste EC-I. Um grupo adicional foi administrado com fludrocortisona 20 min antes da sessão de teste EC-I (FLU 1 mg - 20 min). As colunas verticais representam os parâmetros de percentagem de tempo a) próximo da fonte de odor e b) escondido. Os valores comportamentais basais de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os histogramas verticais representam a média \pm e.p.m. em cada sessão (EC-I e EC-II) ($n=6-10$ /grupo).

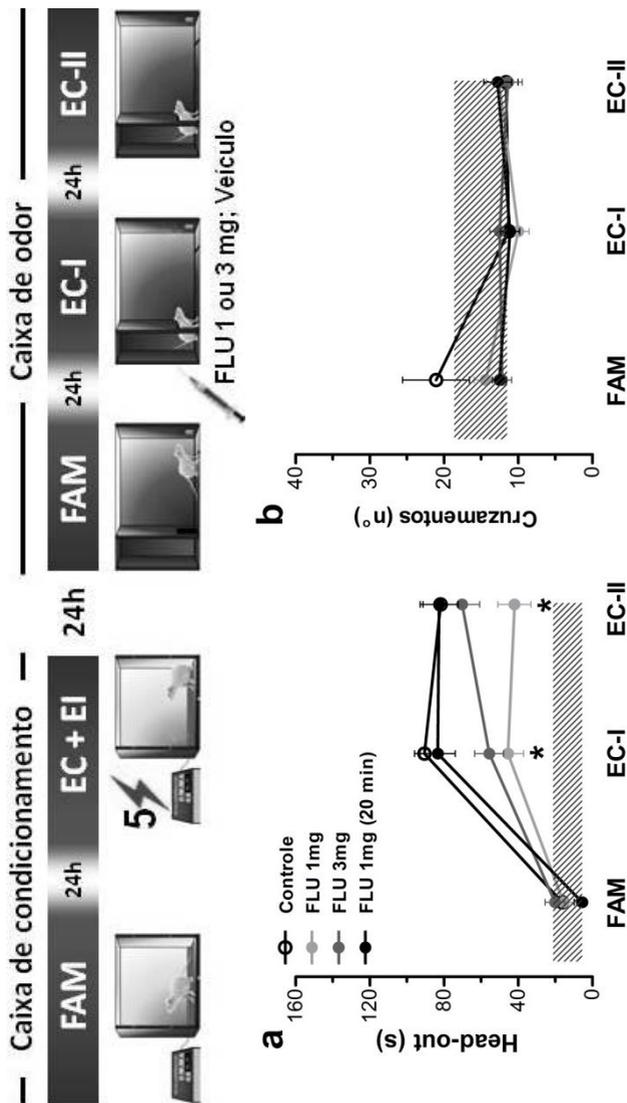


Figura 29: Avaliação dos efeitos da administração de veículo (Controle) ou flurocortisona (FLU 1 ou 3 mg/kg) 60 min antes da sessão de teste EC-I, sobre a) o tempo em avaliação de risco (head-out) e b) o parâmetro de locomoção (número de cruzamentos). Um grupo adicional foi administrado com flurocortisona 20 min antes da sessão de teste EC-I (FLU 3 mg – 20 min). Os valores basais, de todos os animais, obtidos durante a sessão de familiarização, estão expressos pela faixa hachurada horizontal (limites de confiança, $\pm 95\%$). Os pontos representam a média \pm e.p.m. dos grupos em cada sessão (FAM, EC-I e EC-II). Legenda: * $p < 0,05$ comparados ao grupo controle na respectiva sessão ($n = 9-11$ /grupo).

4.6 *Experimento 6: Avaliação da administração sistêmica aguda de agonistas GR e MR sobre o eixo HPA em resposta a um estressor*

O protocolo de supressão induzida pelos agonistas GR e MR, principalmente a dexametasona, foi utilizado aqui para avaliar a função do eixo HPA nos animais tratados com dexametasona ou fludrocortisona em resposta ao estresse no modelo do COM. Na clínica, baixas doses de dexametasona suprimem a liberação de cortisol em indivíduos normais. Já a administração de fludrocortisona é útil na identificação de estados patológicos ligados ao receptor mineralocorticoide, como produção anormal de aldosterona. Entretanto, trabalhos recentes têm demonstrado que o controle do funcionamento do eixo HPA durante a resposta de estresse também pode ser modulada por receptores mineralocorticoide em áreas como o hipocampo. Desta forma, para avaliar a possível desativação do eixo HPA, foram administradas dexametasona ou fludrocortisona na dose de 1 mg/kg, 60 min antes do condicionamento com 5 choques, o qual demonstrou (ver experimento 2) ser um potente estímulo estressor. Trinta minutos após o condicionamento, amostras de sangue foram coletadas para a quantificação dos níveis de corticosterona.

Conforme mostra a figura 30, a análise de variância revelou diferenças significativas no fator tratamento para o níveis séricos de corticosterona [$F_{(2,15)}=34,76$; $p<0,0005$]. O teste de Newman-Keuls revelou uma redução significativa nos grupos tratados com dexametasona 1,0 mg/kg ($p<0,0005$) ou fludrocortisona ($p<0,0005$) sugerindo uma supressão do eixo HPA na situação de estresse gerada pelo condicionamento.

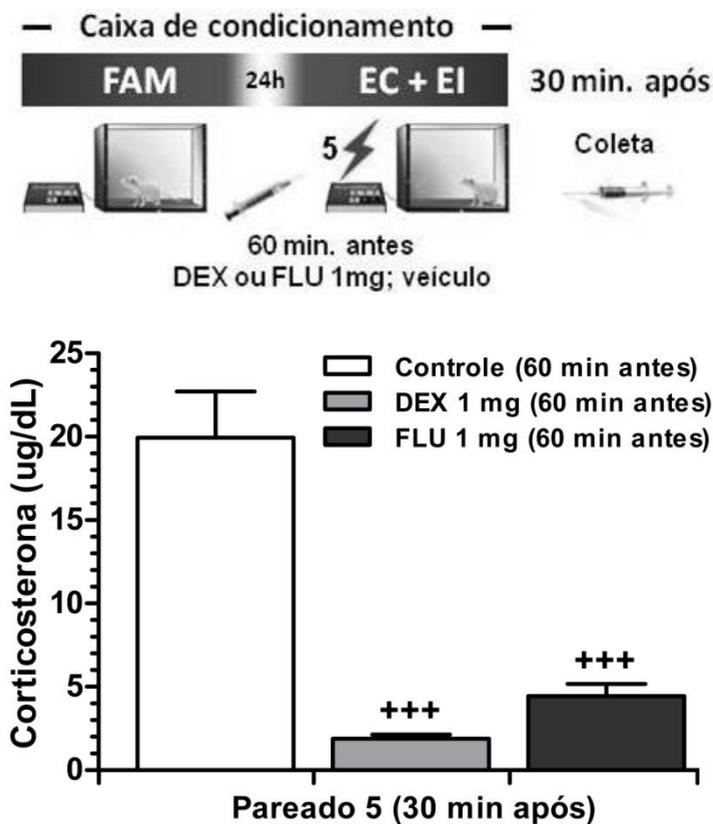


Figura 30: Painel superior: procedimento experimental. Painel direito: Efeito do tratamento (60 min antes) com veiculo (Controle), dexametasona (DEX 1 mg/kg) ou fludrocortisona (FLU 1 mg/kg) sobre a atividade do eixo HPA em resposta ao estresse (COM; 5 choques). Legenda: +++ $p < 0,0005$ comparados ao grupo controle (n=6/grupo).

5 Discussão

A principal proposta do presente trabalho foi identificar algumas das propriedades temporais da administração de agonistas dos receptores corticosteroides (GR e MR) sobre o armazenamento de memórias traumáticas. Adicionalmente, o trabalho buscou investigar se estes mesmos receptores poderiam modular a evocação de memórias previamente consolidadas. Como resultado, o presente trabalho confirma diversos achados da literatura que apontam efeitos facilitatórios dos receptores GR e MR sobre a aquisição de memórias quando ativados próximo ao momento em que a tarefa é aprendida. Da mesma maneira, nós demonstramos que os receptores corticosteroides, principalmente glicocorticoides, podem prejudicar a formação e a evocação de memórias, enquanto os receptores mineralocorticoides modulariam principalmente aspectos ligados à avaliação de risco. Tais resultados reforçam o papel chave dos receptores corticosteroides na formação e gerenciamento de memórias aversivas, sugerindo que fármacos que atuem sobre estes receptores poderiam auxiliar no desmembramento destas memórias, e servindo como estratégia terapêutica em pacientes com patologias decorrentes de memórias aversivas.

O condicionamento olfatório de medo (COM) como uma ferramenta útil para o estudo da psicobiologia do aprendizado aversivo

Para executar o objetivo primário de estabelecer um condicionamento aversivo eficiente, nós utilizamos uma tarefa de condicionamento olfatório de medo (COM), a qual foi previamente descrita em nosso laboratório por Kroon e Carobrez (2009). O modelo permitiu a investigação de alguns componentes específicos de memórias ligadas a uma situação aversiva baseada em uma pista olfatória.

Basicamente, a aquisição do COM ocorre quando um estímulo inicialmente neutro (e.g. um odor) é pareado com um evento de significância biológica aversiva (e.g. choques nas patas) (PAVLOV e ANREP, 1960). Assim, o presente trabalho confirma que após uma sessão de 5 pareamentos entre EC + EI, o estímulo condicionado, inicialmente neutro, adquire propriedades aversivas capazes de induzir resposta emocional condicionada (REC) durante a reexposição ao EC (teste EC-I), demonstrada pela esquivas da fonte de odor, e aumento significativo do tempo no esconderijo e da avaliação de risco nos animais submetidos ao teste EC-I.

Devido a sua importância para a interação e adaptação ao meio, tem sido descrito que os roedores contam essencialmente com a olfação para encontrar alimento, para a reprodução e interação social, bem como para detecção de ameaças (BRENNAN e KEVERNE, 1997; RESTREPO, ARELLANO *et al.*, 2004). Assim, confirmando dados prévios de nosso laboratório (CANTERAS, KROON *et al.*, 2008; CAVALLI, BERTOGLIO *et al.*, 2009; KROON e CAROBREZ, 2009; PAVESI, CANTERAS *et al.*, 2011), e em concordância com achados de outros grupos (OTTO, COUSENS *et al.*, 2000), o presente trabalho demonstra que o condicionamento olfatório com 5 choques induz uma potente REC, a qual é muito semelhante a observada em ratos expostos ao odor de um predador (BLANCHARD e BLANCHARD, 1989; DIELENBERG e MCGREGOR, 2001; SOUZA, 2007; DO MONTE, CANTERAS *et al.*, 2008). Ademais, os resultados obtidos apontam que a associação com 1 ou 3 choques não parece ser suficiente para promover respostas condicionadas de medo quando os animais foram expostos à sessão de teste EC-I, e conseqüentemente ao teste EC-II (Experimento 1). No mesmo sentido o condicionamento com 5 choques não pareados também não foi capaz de induzir resposta defensiva, corroborando dados da literatura que demonstram que uma associação temporal entre os estímulos é crucial para que haja condicionamento (OTTO, COUSENS *et al.*, 1997; OTTO, COUSENS *et al.*, 2000; MAREN, 2001). Também é importante salientar que nenhum dos grupos submetidos ao COM, nas diferentes condições experimentais, exibiu respostas defensivas durante a exposição à caixa de odor na sessão de familiarização (sem odor), sugerindo a ausência de generalização ao condicionamento ou indução de resposta defensiva frente à novidade. Da mesma forma, os animais dos grupos pareados com 1 ou 3 choques também não apresentaram respostas defensivas frente ao odor, de maneira que não foi possível detectar diferenças significativas do grupo não pareado 5 na mesma sessão, ou deles próprios ao longo das sessões de familiarização, teste EC-I e teste EC-II.

Entretanto, ao investigarmos os padrões de atividade dos grupos durante a sessão de teste EC-I, utilizando o software de vídeo monitoramento, ficou evidente que conforme os protocolos de associação se tornavam mais intensos (Não pareado 5 > Pareado 1 > Pareado 3 > Pareado 5), a atividade exploratória também se modificava, de forma que o tempo de permanência em determinados sítios da caixa era deslocado para o interior do compartimento fechado, refletindo a esquiva da fonte de odor. Além disto, os aspectos de investigação

também mudam, alternando para padrões de investigação verticais menos intensos. Da mesma forma, pôde-se observar que a intensidade da locomoção no espaço interno e externo parece ser reduzida conforme o número de pareamentos aumentava. Ainda, apesar de o número de cruzamentos totais não se alterar o padrão de locomoção se modificava de acordo com o número de pareamentos, ou seja, a velocidade máxima atingida aumenta enquanto que a distância percorrida diminui durante a sessão nos animais pareados com 5 choques.

De maneira geral, a grande maioria dos trabalhos que investigam os substratos neurais do condicionamento aversivo se utiliza de respostas comportamentais menos sutis, como o congelamento ou o sobressalto potencializado pelo medo (BOUTON e BOLLES, 1980; PHILLIPS e LEDOUX, 1992; OTTO, COUSENS *et al.*, 1997; MAREN, 2001). Os comportamentos de defesa compreendem uma série de respostas adaptativas e flexíveis contra situações de ameaça (MCNAUGHTON e CORR, 2004). Neste sentido, o desenvolvimento de metodologias que avaliem de maneira mais dinâmica a resposta de defesa como índice de memória aversiva se torna essencial. Blanchard e colaboradores, sugerem, por exemplo, que a avaliação de risco é um importante padrão de atividade envolvido na detecção e análise durante situações ameaçadoras. Ela seria um processo essencial pelo qual os sistemas de defesa escolheriam respostas específicas como fuga, congelamento ou ataque. Além disto, estes comportamentos podem mudar ao longo do tempo em resposta às informações encontradas sobre a presença do perigo (BLANCHARD, GRIEBEL *et al.*, 2011). Da mesma forma, a sensibilidade dos comportamentos de defesa a drogas parece ser variável, de acordo com a série de comportamentos empregados, bem como com o padrão de atividade dos neurotransmissores e núcleos cerebrais envolvidos na resposta (MCNAUGHTON e CORR, 2004; BLANCHARD, GRIEBEL *et al.*, 2011). Um exemplo disto é o de drogas utilizadas para o tratamento do transtorno de ansiedade generalizada (TAG), como os benzodiazepínicos e o tratamento crônico com antidepressivos tricíclicos, que são efetivas em reduzir os comportamentos de avaliação de risco, enquanto que outros tipos de defesa como o ataque defensivo não são reduzidas (BLANCHARD, GRIEBEL *et al.*, 2001). Da mesma forma, a buspirona, uma droga amplamente utilizada para o tratamento do TAG não é efetiva em reduzir a avaliação de risco em modelos animais (GRIEBEL, PERRAULT *et al.*, 1998). Sob a perspectiva do estresse, enquanto os receptores glicocorticoides parecem promover

modificações importantes no armazenamento de memórias, principalmente por sua interação com sistemas neurotransmissores como glutamato e noradrenalina, atuando em áreas como amígdala e hipocampo e hipotálamo (CORDERO e SANDI, 1998; JOELS, KARST *et al.*, 2004), refletindo em mudanças mais extensas no repertório comportamental, os receptores mineralocorticoides parecem modular aspectos diferenciados e específicos do aprendizado (OITZL e DE KLOET, 1992; SANDI e ROSE, 1994; BERGER, WOLFER *et al.*, 2006; NINOMIYA, MARTYNHAK *et al.*, 2010). Por estas razões, a utilização de modelos animais que possuam uma abordagem abrangente dos comportamentos de defesa, bem como a combinação com modelos animais é de extrema importância para a melhor compreensão dos processos envolvidos nas reações emocionais como o medo e a ansiedade.

Para confirmar os achados comportamentais obtidos no COM, foram avaliados também os níveis séricos de corticosterona em dois momentos do protocolo experimental: após a sessão de condicionamento e após a exposição ao estímulo condicionado (teste EC-I). Já está bem estabelecido que a secreção de corticosterona ocorre minutos após a exposição a um estressor, ou mesmo à novidade, auxiliando na nos processos de adaptação do organismo (DE KLOET, 1991; PACAK e PALKOVITS, 2001; JOELS, PU *et al.*, 2006). A exposição ao condicionamento com 5 choques induziu um significativo aumento nos níveis séricos de corticosterona em comparação ao grupo condicionado com 1 choque e ao os grupos que não receberam choques (com ou sem odor). Este rápido aumento dos níveis de corticosterona está de acordo com a noção de que a liberação de corticosterona é essencial para a formação de memórias traumáticas (ROOZENDAAL, BOHUS *et al.*, 1996; PACAK e PALKOVITS, 2001; MARIN, HUPBACH *et al.*, 2011). É importante mencionar que, apesar de não haverem diferenças significativas, o grupo exposto apenas ao odor e o grupo pareado com 1 choque apresentaram um leve aumento nos níveis de corticosterona. Esse aumento se deve provavelmente à exposição à novidade (odor) e à novidade (odor) + EI (1 choque), respectivamente (FLUTTERT, DALM *et al.*, 2000). Também é importante ressaltar que, no presente trabalho, o pareamento com 3 choques não foi eficaz em provocar condicionamento. Entretanto, dados prévios de nosso laboratório demonstram que, de fato, em animais pareados com 3 choques pode haver uma variabilidade considerável, onde parte dos animais adquirem condicionamento enquanto que outros não o fazem

(CAVALLI, BERTOGLIO *et al.*, 2009; KROON e CAROBREZ, 2009). Desta forma, optou-se por realizar as dosagens dos níveis de corticosterona apenas nos grupos condicionados com 1 ou 5 choques, visando especificamente os experimentos futuros de avaliação da possível facilitação ou prejuízo provocado pelos corticosteroides na formação e evocação de memórias, respectivamente.

Neste mesmo sentido, quando os níveis de corticosterona foram avaliados após a sessão de teste EC-I, um importante aumento no grupo condicionado com 5 choques foi observado em comparação ao grupo não pareado. Estes resultados então em concordância com dados prévios da literatura que demonstram que os hormônios do estresse são necessários não apenas para a aquisição e consolidação de memórias, mas também após sua expressão, facilitando a recuperação após a reexperiência do estressor e armazenando informações para uso futuro (DE KLOET, JOELS *et al.*, 2005; DE QUERVAIN, AERNI *et al.*, 2009; BLUNDELL, BLAISS *et al.*, 2011). De maneira importante, a exposição ao teste EC-I no grupo condicionamento com 1 choque induziu um aumento significativo nos níveis de corticosterona quando comparado ao grupo não pareado. Isto sugere que, embora não tenham sido observadas diferenças comportamentais no pareamento com 1 choque, um possível traço de memória fraco, conteúdo informação da sessão de condicionamento, tenha induzido a liberação de corticosterona nestes animais perante a exposição ao EC-I (MACKINTOSH, 1965; SCHMAJUK e DICARLO, 1991; FRANKLAND, JOSSELYN *et al.*, 2004). Estes resultados levam a crer que, embora o condicionamento com 1 choque seja percebido, o estado ou a resposta hormonal não é suficiente para auxiliar na promoção do processo associativo completo.

Em resumo, os dados suportam aspectos teóricos já bem estabelecidos, de que durante o condicionamento alguns eventos precisam ocorrer simultaneamente: a) os circuitos cerebrais de defesa necessitam ser ativados por certa intensidade de estímulo aversivo (p. ex. EI=5 choques); b) áreas cerebrais ligadas à percepção dos sistemas sensoriais precisam estar em funcionamento (p. ex. pista olfatória); c) a resposta hormonal ao estressor precisa entrar em funcionamento; e d) a aquisição do condicionamento requer uma associação temporal entre o EC e o EI (LEDOUX, 1994; MAREN, 2001; JOELS, PU *et al.*, 2006).

Coletivamente, estes dados confirmam o condicionamento olfatório de medo como um fenômeno consistente (OTTO, COUSENS *et al.*, 2000). Em contrapartida, de acordo com dados da literatura que

sugerem um papel bidirecional dos hormônios do estresse no armazenamento de memórias, os dados iniciais do presente trabalho nos levam a questionar se a ativação dos receptores corticosteroides por agonistas específicos poderia promover a facilitação do condicionamento de um traço fraco de memória (condicionamento com 1 choque) ou o prejuízo em memórias mais resistentes, como no condicionamento com 5 choques.

A administração pós-treino de agonistas GR ou MR promove facilitação na formação de memórias aversivas no COM

Dados da literatura têm demonstrado efeitos facilitatórios dos corticosteroides sobre o armazenamento de memórias nas mais diversas tarefas de aprendizado, tais como os condicionamentos gustatório e apetitivo (ZORAWSKI e KILLCROSS, 2002; MIRANDA, QUIRARTE *et al.*, 2008), a esquia inibitória (ROOZENDAAL e MCGAUGH, 1997; MEDINA, CHARLES *et al.*, 2007), na memória espacial (SANDI, LOSCERTALES *et al.*, 1997), e no reconhecimento de objeto (OKUDA, ROOZENDAAL *et al.*, 2004). Em humanos, a exposição a um estressor (como frio ou administração de adrenalina) durante uma tarefa de aprendizado, aumenta a retenção do aprendizado (CAHILL, GORSKI *et al.*, 2003). De acordo com essa visão, os achados demonstraram que ambos os agonistas GR e MR administrados imediatamente após o condicionamento com 1 choque (anteriormente demonstrado ser ineficaz em promover condicionamento; experimentos 1 e 2), facilitaram a formação de uma memória de longa duração. Por outro lado, quando a administração foi realizada na ausência de condicionamento (sessão sem choque), não foram observadas respostas condicionadas de medo. Tais resultados sugerem que o efeito facilitatório da ativação dos receptores corticosteroides requer um aumento do estado emocional, o qual parece ser conferido pelo EI. Assim, recentes trabalhos sugerem que um recrutamento de áreas cerebrais coincidente com a ativação GR/MR em tais áreas promove o fortalecimento de memórias ligadas a estímulos emocionalmente salientes e não de informações neutras (JOELS, PU *et al.*, 2006; JOELS e BARAM, 2009). Trabalhos com enfoque nas bases neurais do condicionamento de medo indicam que a amígdala desempenha um papel crucial neste tipo de aprendizado associativo (LEDOUX, 2000). Neste sentido, a lesão eletrolítica ou o bloqueio farmacológico desta estrutura impedem a aquisição do condicionamento aversivo (CAMPEAU e DAVIS, 1995; MULLER, CORODIMAS *et al.*, 1997). Da mesma forma, a infusão de tetrodotoxina imediatamente após o

pareamento entre choque e odor prejudica a consolidação do condicionamento (KILPATRICK e CAHILL, 2003).

Notavelmente, a amígdala e o hipocampo se conectam simultaneamente e também independentemente com o sistema hipotalâmico medial de defesa, atribuindo *status* aversivo a um odor condicionado previamente neutro (CANTERAS, KROON *et al.*, 2008), e a grande maioria das estruturas participantes nesta circuitaria são classicamente descritas como possuidoras de grandes concentrações de receptores corticosteroides. Diversos trabalhos também apontam que os corticosteroides alteram a atividade neuronal em áreas que desempenham papel central nos processos atencionais e na seleção de estratégias comportamentais apropriadas (e.g. hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala) (DE KLOET, JOELS *et al.*, 2005; ROOZENDAAL, MCEWEN *et al.*, 2009; JOELS, 2011).

In vitro, a ativação dos receptores GR retarda o reestabelecimento da atividade neuronal (JOELS e DE KLOET, 1989; KERR, CAMPBELL *et al.*, 1989; KIM e DIAMOND, 2002). Além disto, grande parte da maquinaria celular envolvida no processo de plasticidade é modulada pelos receptores GR (PRAGER e JOHNSON, 2009). Teoricamente, o bom funcionamento destes processos de armazenamento e a supressão neuronal induzida pela atividade dos receptores GR impede que estímulos não relacionados na escala temporal sejam processados juntamente, conferindo seletividade ao processo de armazenamento da informação traumática e impedindo a generalização de estímulos.

Os dados existentes sobre o papel dos receptores MR na atividade neuronal e nas funções cognitivas justificam indagar se os receptores MR também participariam durante a fase inicial da formação de memórias em adição ao papel prolongado dos receptores GR. Desta forma o presente trabalho demonstra também que a atividade dos receptores MR pode contribuir para a formação de memórias traumáticas decorrentes de um estímulo aversivo. Estes dados estão em concordância com dados prévios da literatura que apontam um importante papel na modulação da aquisição de informação, já que a ativação dos receptores MR promove rápido aumento da atividade neuronal no hipocampo e amígdala (KARST, BERGER *et al.*, 2005; OLIJSLAGERS, DE KLOET *et al.*, 2008). Vários estudos apontam ainda que os receptores MR estão envolvidos na avaliação da informação e seleção de respostas em várias tarefas de aprendizado

(OITZL e DE KLOET, 1992; SANDI e ROSE, 1994; BRINKS, V., VAN DER MARK, M. H. *et al.*, 2007).

Estes resultados corroboram dados prévios da literatura e suportam a ideia de que ambos os agonistas dos receptores GR e MR podem facilitar o armazenamento de memórias traumáticas.

A ação dos corticosteróides pode prejudicar a aquisição e a evocação de memórias

A dicotomia entre as ações facilitatórias e inibitórias dos corticosteroides sobre o armazenamento de informações tem sido sugerida em diversos estudos, e a natureza da convergência temporal entre a ativação dos sistemas neuro-hormonais e a tarefa a ser aprendida parece ser crucial para a natureza atribuída à memória (JOELS e BARAM, 2009).

Assim, embora os hormônios do estresse tenham um efeito facilitatório quando presentes junto do período do aprendizado, eles parecem ter efeitos opostos quando presentes em grandes quantidades em um tempo considerável antes da tarefa a ser aprendida. Kirshbaum e colaboradores (1996) demonstraram que a memória declarativa é prejudicada em indivíduos expostos ao estresse ou a altos níveis de cortisol, 15 ou 60 min antes, respectivamente (KIRSCHBAUM, WOLF *et al.*, 1996). Neste mesmo sentido, Diamond e colegas demonstraram que os corticosteroides, agindo após a tarefa a ser aprendida, podem, não apenas facilitar a formação de novas memórias, mas também promover amnésia retrógrada, seguindo o caráter seletivo que as memórias traumáticas parecem ter (DIAMOND, PARK *et al.*, 2005). Coletivamente, estes dados enfatizam um princípio importante sobre estresse e memória: aumentos nos níveis de hormônios de estresse dentro do contexto do aprendizado parecem melhorar esta habilidade, enquanto que sua ação muito tempo fora do contexto parece prejudicá-la. De maneira simplista, isso se daria por um processo meramente mecânico, onde a ação dos hormônios do estresse antes da tarefa a ser aprendida faz com que a maquinaria celular esteja ocupada processando algo anterior ao que deve ser lembrado. Ou seja, não há a contraparte entre a maquinaria celular e o estímulo a ser lembrado (JOELS, PU *et al.*, 2006).

A dicotomia nas ações dos corticosteroides também tem sido atribuída ao balanço entre as ações dos receptores GR e MR (DE KLOET, VREUGDENHIL *et al.*, 1998). Em humanos, a aquisição de

uma memória declarativa é prejudicada pela exposição a hormônios do estresse até uma hora antes da tarefa a ser aprendida (KIRSCHBAUM, WOLF *et al.*, 1996). Resultados preliminares de nosso laboratório demonstram que a administração de corticosterona nas doses de 3 ou 10mg/kg, 60 min antes do condicionamento, não promovem prejuízos no COM (dados não publicados). Entretanto, já está bem estabelecido que em seu ritmo ultradiano os corticosteroides endógenos são liberados de hora em hora. Entretanto, embora sua eliminação renal ocorre de maneira muito rápida (cerca de 10 min) (LIGHTMAN, WILES *et al.*, 2008), os corticosteróides liberados pela glândula supra-renal penetram livremente em áreas cerebrais ligando-se a ambos os receptores GR e MR (DE KLOET, 1991). Possivelmente, estes fatores explicariam a ausência de efeitos com a administração de corticosterona na tarefa do COM.

Com base neste contexto, o presente trabalho demonstrou que a administração de agonistas GR e MR em um tempo considerável antes (60 min) da aquisição do condicionamento com 5 choques. Os resultados demonstram que o potente agonista GR, dexametasona, administrado 60 min antes do condicionamento, prejudicou a aquisição do COM visualizado pela redução de todos os comportamentais de defesa avaliados durante a exposição ao teste EC-I.

A administração de dexametasona 20 min antes, não só foi incapaz de prejudicar as respostas de defesa como também promoveu uma facilitação do condicionamento, observada pelo aumento dos comportamentos de avaliação de risco, corroborando os dados da administração de dexametasona após o treino com um choque (experimento 3).

A ideia de que o estresse está implicado no prejuízo da formação de memórias não é tão recente. Extensivos estudos demonstram que a exposição a um predador ou a um estímulo extremamente relevante prejudica a formação de novas memórias (ZANGROSSI e FILE, 1992; FILE, ZANGROSSI *et al.*, 1993; DIAMOND e ROSE, 1994; ADAMEC, BURTON *et al.*, 1999; DIAMOND e PARK, 2000) e induz amnésia (WOODSON, MACINTOSH *et al.*, 2003). Ao nível celular, tem sido demonstrado que os receptores glicocorticoides bloqueiam a LTP hipocampal e outros tipos de potenciação (FOY, STANTON *et al.*, 1987; DIAMOND e ROSE, 1994; DIAMOND e PARK, 2000), além de influenciar negativamente o funcionamento da amígdala (ROOZENDAAL,

MCEWEN *et al.*, 2009). Além disto, dentre os dois tipos de receptores corticosteroides, o subtipo GR é o mais amplamente descrito por afetar positivamente a aquisição e a estabilização da memória (MCGAUGH e ROOZENDAAL, 2002), mas também em prejudicar a evocação de informações previamente armazenadas (ROOZENDAAL, 2002). Neste sentido, nós demonstramos que a administração do agonista GR 60 min antes do teste EC-I também promoveu prejuízo na evocação, o qual também sustentou a não ocorrência de condicionamento de segunda ordem (EC-I – EC-II), corroborando os dados do bloqueio da aquisição pelo mesmo agonista administrado antes do condicionamento. Em revisão da literatura, diversos estudos demonstram que a administração pós-treino de glicocorticoides produz um aumento da consolidação. Entretanto, há evidências de que o estresse promova prejuízo na retenção quando ratos ou humanos são testados pouco tempo depois, quando os níveis circulantes de hormônios ainda estão elevados (KIRSCHBAUM, WOLF *et al.*, 1996; DIAMOND e PARK, 2000; KIM e DIAMOND, 2002). Estas observações sugerem que os corticosteroides podem não apenas facilitar a consolidação, mas também afetar diretamente a evocação de memórias. Assim estes dados podem ser interpretados como um efeito negativo específico do estresse sobre a evocação de memórias, mas também podem significar um processo facilitado de utilização da maquinaria celular para um novo aprendizado, promovido pela ativação dos receptores glicocorticoides, em concorrência ou em sobreposição a aprendizados posteriores.

De maneira importante, dados da literatura sugerem que, em contraste com os efeitos da ativação dos receptores GR, os receptores MR parecem modular a atividade comportamental em curso durante as tarefas de aprendizado e evocação de memórias (OITZL e DE KLOET, 1992; OITZL, JOSEPHY *et al.*, 1993; OITZL, FLUTTERT *et al.*, 1994; SANDI e ROSE, 1994). O bloqueio dos receptores MR imediatamente após uma tarefa de aprendizado também afeta o desempenho cognitivo para a evocação de memórias em tarefas de aprendizado espacial (OITZL e DE KLOET, 1992). Ainda, dados da literatura demonstram que a administração de antagonista dos receptores MR antes do treino afeta o desempenho cognitivo em tarefa de aprendizado espacial por causar um impacto negativo sobre os mecanismos de estratégia e sobre a resposta comportamental à novidade (OITZL e DE KLOET, 1992). Neste sentido, os dados do presente trabalho apontam que a administração do agonista MR fludrocortisona 60 min antes do condicionamento com 5 choques prejudicou a aquisição do COM,

observado pela redução do comportamento defensivo em exposição ao teste EC-I. Os dados apontam que os principais efeitos foram a redução do tempo escondido e da avaliação de risco, mas não da aproximação da fonte de odor, indicando que apesar de prejudicar a aquisição da tarefa, os animais adquiriram em determinado grau a esquivar da fonte de odor, corroborando dados da literatura que sugerem um papel modulatório sobre a tomada de decisão pelos receptores MR. Neste sentido, Brinks e colaboradores (2007) demonstraram que, em camundongos adrenalectomizados, a ativação predominante dos receptores MR sobre os receptores GR promove uma redução dos comportamentos de defesa, resultando em benefícios para o aprendizado, enquanto que um aumento na ativação dos receptores GR prejudica o aprendizado. Ainda, o bloqueio pré-treino dos receptores GR parece promover melhora no aprendizado, possivelmente por levar a um aumento da atividade dos receptores MR livres (ZHOU, BAKKER *et al.*, 2010). Contudo, quando administramos o agonista MR fludrocortisona 60 min antes da evocação da tarefa, os animais apresentaram prejuízos na aquisição do condicionamento de segunda ordem (EC-I – EC-II), que se restringiram ao comportamento de avaliação de risco (*head-out*), reforçando o caráter de especificidade sobre os comportamentos mais sutis, possivelmente modulados pelos receptores MR. Teoricamente, poder-se-ia esperar que assim como na administração de fludrocortisona antes do condicionamento, a administração de fludrocortisona antes do EC-I deveria prejudicar também a execução de outros comportamentos no teste EC-II. Entretanto, cabe salientar que o aprendizado em questão difere enormemente em contexto e característica do aprendizado inicial, que passa a ser o próprio odor no teste EC-I ao invés do choque na sessão de condicionamento (*aprendizado I*: odor x choque; *aprendizado II*: contexto x odor). Apesar de todos estes fatores, fica evidente que a ativação dos receptores MR antes do condicionamento, antes da evocação e do condicionamento de segunda ordem, prejudica a arquitetura mnemônica de modo a interferir principalmente com os comportamentos de avaliação de risco. Cabe ainda ressaltar que não é possível descartar que a administração de doses mais elevadas do agonista MR fludrocortisona poderiam afetar outros parâmetros comportamentais.

O presente trabalho também demonstrou que tanto a administração de dexametasona quanto a administração de fludrocortisona provocaram uma supressão da resposta hormonal ao estresse, sugerindo que os achados que mostram que a administração de

ambas as drogas prejudicam o aprendizado e a evocação das memórias aversivas possa ter como componente importante a desativação do eixo HPA em resposta ao estresse, já que a adrenalectomia ou a administração de inibidor da síntese de corticosteroides, como a metirapona, promove prejuízos na aquisição de memórias, assim como o fazem o antagonistas dos receptores GR e MR (PUGH, TREMBLAY *et al.*, 1997; BARRETT e GONZALEZ-LIMA, 2004; BURMAN, HAMILTON *et al.*, 2010). Entretanto, pode-se considerar que este não seja o principal componente do prejuízo na aquisição e evocação do condicionamento, já que a administração de fludrocortisona em ambas as doses promoveu efeitos relativamente menores sobre o COM, mesmo provocando desativação substancial do eixo HPA, e já que a meia vida de ambos os agonistas é superior ao intervalo entre a administração subcutânea e a sessão de condicionamento (MEIKLE e TYLER, 1977; BAXTER e ROUSSEAU, 1979). Em humanos, dados recentes apontam que a supressão temporária do eixo HPA pode reduzir as respostas de medo em pacientes com TEPT (JOVANOVIC, PHIFER *et al.*, 2011). Em contrapartida, diversos autores sugerem que o efeito primordial é sobre a ativação dos receptores substancialmente antes da tarefa a ser aprendida/lembrada, o que promove a ocupação da maquinaria celular e a competição pelo processamento dos estímulos (JOELS, PU *et al.*, 2006).

De acordo com a linha de raciocínio de que os corticosteroides parecem prejudicar a aquisição e a evocação de memórias, dados da literatura demonstram que humanos expostos a um estressor ou tratados com altas doses de hidrocortisona, antes da evocação de uma memória, apresentam um reduzido desempenho na recordação da tarefa, reforçando o papel bifásico do estresse sobre o armazenamento de informação (DE QUERVAIN, ROOZENDAAL *et al.*, 2000; KUHLMANN, PIEL *et al.*, 2005). Empiricamente, sabe-se que durante a exposição a uma situação de estresse, como um teste ou entrevista, os indivíduos têm em geral um déficit na relembração de informações anteriormente aprendidas (prejuízo na evocação). Mas, ao mesmo tempo, a exposição a tal situação de embarço ou prejuízo grava profundamente os detalhes do contexto (facilitação da consolidação). Na natureza, tal competição entre as informações aprendidas e o desafio em curso não parece ser um processo mal adaptativo, já que consolidar a informação sobre novos estímulos ameaçadores, sejam eles físicos ou psicológicos, pode aumentar as chances de sobrevivência (ver JOELS, PU *et al.*, 2006).

Outro aspecto importante do funcionamento do sistema corticosteroide sobre a formação de memórias está em sua relação com o reforço ou a fragmentação de memórias aversivas. Sabe-se que dentre as terapias de combate aos transtornos de ansiedade ligados a memórias aversivas, como traumas ou fobias, está a exposição repetida aos estímulos ameaçadores ou a pistas relacionadas, processo conhecido como extinção de memórias (MYERS e DAVIS, 2007; INDA, MURAVIEVA *et al.*, 2011). Recentemente, outro tipo de terapia cognitivo-comportamental tem sido estudada. Ela consistiria de uma breve evocação da memória aversiva e da modificação do processo de consolidação subsequente, numa fase conhecida como reconsolidação, onde a memória original se torna lábil e passível de modificação (PRZYBYSLAWSKI e SARA, 1997; LEE, 2008). Essencialmente, estas duas abordagens diferem quanto à natureza do processo de esquecimento: enquanto na extinção, a memória original é sobreposta por um novo aprendizado com características neutras ou positivas, na reconsolidação a memória original é fragmentada ou modificada pela nova consolidação da mesma memória (SUZUKI, JOSSELYN *et al.*, 2004). Curiosamente, ambas as abordagens requerem um componente que serve de gatilho para o processo: a evocação da memória original. Neste sentido, dados recentes, sugerem que a modulação conferida pelos hormônios do estresse poderia ser um importante alvo terapêutico tanto na extinção (YANG, CHAO *et al.*, 2006; NINOMIYA, MARTYNHAK *et al.*, 2010) quanto na reconsolidação (SCHWABE e WOLF, 2010; PITMAN, MILAD *et al.*, 2011).

Nesta mesma linha de raciocínio, um grande número de evidências sugere que um dos principais fatores que contribuem para o desenvolvimento do TEPT é o prejuízo nos mecanismos de extinção das memórias relacionadas ao trauma (RAUCH, SHIN *et al.*, 2006), o qual pode ser mediado pelos corticosteroides (BLUNDELL, BLAISS *et al.*, 2011). Pouco ainda se sabe sobre as bases neurobiológicas do processo de reconsolidação, especialmente em pacientes com TEPT. Entretanto, do ponto de vista clínico, as terapias envolvendo a utilização de fármacos com atividade amnésica, ou que prejudiquem a síntese de novas proteínas envolvidas na consolidação, têm demonstrado serem muito promissoras (INDA, MURAVIEVA *et al.*, 2011). Neste contexto, corroborando dados da literatura, nos demonstramos que a ativação dos receptores GR e MR pré-treino prejudica a aquisição, bem como a ativação principalmente GR, também prejudica a evocação, ambas etapas necessárias na extinção e na reconsolidação.

Pouco consenso se tem em relação aos níveis de cortisol em pacientes com TEPT (PITMAN, ORR *et al.*, 1987; YEHUDA, KEEFE *et al.*, 1995; YEHUDA e MCFARLANE, 1995; YEHUDA e LEDOUX, 2007), possivelmente porque, em geral, o processo de desenvolvimento da patologia é multifatorial (idade, sexo, fundo genético, experiências prévias, e a origem do trauma) (YEHUDA e LEDOUX, 2007). Entretanto, ao que tudo indica, os níveis de cortisol são particularmente baixos nestes pacientes, provavelmente por modificações nas alças de retroalimentação e o eixo HPA, o que reflete em prejuízos no processo de extinção, já que os corticosteroides presentes durante a evocação promovem facilitação do novo aprendizado (extinção), e conseqüentemente da consolidação da extinção (QUIRK e MUELLER, 2008). Da mesma maneira, a evocação necessária em ambos os processos de extinção e reconsolidação é prejudicada pelos corticosteroides (DE QUERVAIN, ROOZENDAAL *et al.*, 1998), sugerindo que os pacientes com TEPT também possam ter prejuízos no processo de esquecimento do trauma. Entretanto mais estudos são necessários para comprovar tal hipótese, já que o TEPT tem como principal característica a recorrência indesejada e frequente das memórias ligadas ao trauma.

Guardadas as diferenças entre as dinâmicas do estresse crônico e agudo, em modelos que utilizam estresse prolongado ou tratamentos crônicos com corticosteroides, bem como as condições clínicas como o hipercortisolismo, ou síndrome de Cushing, os prejuízos parecem ser principalmente sobre a consolidação de memórias (CONRAD, GALEA *et al.*, 1996; PAVLIDES, NIVON *et al.*, 2002; WRIGHT, LIGHTNER *et al.*, 2006). Assim, com base nos achados do presente trabalho é possível afirmar que muitos dos efeitos encontrados podem estar ligados também a prejuízos na aquisição e na evocação das memórias.

Coletivamente, os dados do presente trabalho fornecem uma ampla demonstração de que ambos os receptores GR e MR estariam envolvidos no processo de aquisição e manutenção da informação contida em eventos traumáticos, convertendo memórias de curta duração em memórias de longo prazo, e em algumas situações prejudicando o fluxo de informações necessárias para a aquisição de novas memórias e a evocação de dados anteriormente obtidos, dependendo de quando o estresse é parte intrínseca do evento ou não.

Finalmente, os resultados obtidos corroboram o pressuposto da hipótese de que é possível que os corticosteroides estejam na raiz da

susceptibilidade ao desenvolvimento de memórias traumáticas resistentes, como no caso do TEPT, possivelmente por potencializar os condicionamentos aversivos, facilitando a aquisição e a consolidação de traços de memória, ou por impedir o esquecimento, através de prejuízos na evocação e na aquisição de novos aprendizados. Assim, é plausível sugerir que abordagens terapêuticas com enfoque nos receptores corticosteroides, em momentos adequados, podem ser uma importante estratégia no tratamento de pacientes com psicopatologias de memórias aversivas, como o TEPT e também as fobias, as quais tem como base psicobiológica o estabelecimento de condicionamento aversivo.

6 Considerações finais

Os resultados do presente trabalho reforçam que o condicionamento olfatório de medo é uma ferramenta útil para o entendimento das bases biológicas do armazenamento de memórias aversivas, bem como do estresse decorrente da exposição ao trauma e às suas lembranças. Da mesma maneira, os resultados obtidos reforçam o papel dos receptores GR e MR no armazenamento de memórias traumáticas, modulando a aquisição, a consolidação e a evocação das informações ligadas à estímulos aversivos. De maneira específica, os dados obtidos mostram os seguintes aspectos:

Em concordância com dados da literatura, tanto a ativação dos receptores GR quando dos receptores MR promove facilitação do condicionamento olfatório de medo, reforçando o caráter promotor de associação que o estresse confere durante situações de perigo ou desafio;

De maneira oposta, a ação dos corticosteroides em tempo considerável antes da aquisição ou da evocação prejudica o processamento dos estímulos. Estes efeitos têm repercussões importantes, já que podem impedir a adaptação através do bloqueio da aquisição de novas informações, resultando, por exemplo, em prejuízo na extinção;

Entretanto, embora mais estudos sejam necessários, os dados do presente trabalho também sugerem que estes receptores podem ser alvos para a possível modificação de memórias traumáticas resistentes. Dados recentes da literatura já apontam que, através do bloqueio do processo de reconsolidação, os antagonistas GR e MR poderiam promover a fragmentação e o enfraquecimento de memórias traumáticas.

Em conjunto, os dados obtidos reforçam o papel bidirecional dos receptores corticosteroides sobre o armazenamento de memórias, os quais podem facilitar ou prejudicar os processos adaptativos que envolvam o armazenamento de informações, bem como reforçam o enfoque nestes receptores como possíveis alvos terapêuticos para os transtornos de ansiedade.

7 Glossário

Condicionamento de segunda ordem: procedimento no qual um estímulo previamente condicionado, passa, por si só, a induzir o aprendizado de um segundo estímulo inicialmente neutro, como o que acontece para o EC-II no modelo do condicionamento olfatório, onde o odor se associa ao contexto, e este, por sua vez adquire propriedades aversivas.

Condicionamento Pavloviano: procedimento pelo qual um estímulo inicialmente neutro, como um som ou um odor, incapaz de gerar resposta condicionada, se torna biologicamente relevante após o pareamento com um estímulo condicionado (p.ex. choque).

Consolidação: processo pelo qual as memórias são armazenadas após um novo aprendizado.

Convergência espacial: o estressor está presente durante a tarefa a ser aprendida e ativa as mesmas áreas de processamento do estímulo e de aquisição e consolidação de memórias, bem como áreas envolvidas na resposta defensiva.

Convergência temporal: estressores presentes nos momentos que antecedem ou imediatamente após a exposição a um estímulo a ser aprendido fortalecem o aprendizado, enquanto que o estresse horas antes ou após a tarefa prejudica o aprendizado.

Extinção: se refere à sobreposição do aprendizado de um estímulo previamente associado por um aprendizado oposto, o qual leva a uma redução da resposta ao estímulo inicial. Apesar do nome extinção, o processo não leva ao apagamento da memória original, e sim sobrepõe um novo aprendizado.

Labilização: instabilização de uma memória previamente consolidada. É o processo pelo qual a memória se atualiza e se torna susceptível a modificação. Durante o período de labilidade, a memória original pode sofrer interferências farmacológicas.

Reativação: também chamada de evocação, é o retorno de memórias previamente estabelecidas para um estado consciente, resultando em labilização da memória.

Reconsolidação: processo pelo qual uma memória previamente consolidada se atualiza e se estabiliza após cada reativação.

Recuperação espontânea: evocação espontânea de uma memória previamente extinta, geralmente muito tempo depois, na ausência de qualquer manipulação experimental, novo treino ou modificação no contexto.

Reinstalação: reevocação de uma memória extinta após a exposição a um estímulo incondicionado não relacionado, p.ex. um som alto.

Traço de memória: se refere a uma memória, forte ou não, resultado de modificação sináptica.

8 Referências bibliográficas

ADAMEC, R. E. *et al.* Unilateral block of NMDA receptors in the amygdala prevents predator stress-induced lasting increases in anxiety-like behavior and unconditioned startle--effective hemisphere depends on the behavior. *Physiol Behav* [S.I.], v. 65, n. 4-5, p. 739-51, Jan 1-15 1999.

APFELBACH, R. *et al.* The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. *Neurosci Biobehav Rev* [S.I.], v. 29, n. 8, p. 1123-44, 2005.

BARRETT, D.; GONZALEZ-LIMA, F. Behavioral effects of metyrapone on Pavlovian extinction. *Neuroscience Letters* [S.I.], v. 371, n. 2-3, p. 91-96, Nov 2004.

BARSEGYAN, A. *et al.* Glucocorticoids in the prefrontal cortex enhance memory consolidation and impair working memory by a common neural mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 107, n. 38, p. 16655-60, Sep 21 2010.

BAXTER, J. D.; ROUSSEAU, G. G. Glucocorticoid hormone action: an overview. *Monogr Endocrinol* [S.I.], v. 12, p. 1-24, 1979.

BERGER, S. *et al.* Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioral plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 103, n. 1, p. 195-200, Jan 2006.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Chapter 2.4 Defensive behaviors, fear, and anxiety. In: BLANCHARD, D. C. *et al.* (Ed.). *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Amsterdam: Elsevier, 2008. p. 63-79. (Handbook of behavioral neuroscience).

BLANCHARD, D. C. *et al.* Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* [S.I.], v. 25, n. 3, p. 205-218, May 2001.

BLANCHARD, D. C. *et al.* Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. *Neurosci Biobehav Rev* [S.I.], v. 35, n. 4, p. 991-8, Mar 2011.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol* [S.I.], v. 103, n. 1, p. 70-82, Mar 1989.

BLUNDELL, J. *et al.* Block of glucocorticoid synthesis during re-activation inhibits extinction of an established fear memory. *Neurobiol Learn Mem* [S.I.], v. 95, n. 4, p. 453-60, May 2011.

BOUTON, M. E.; BOLLES, R. C. Conditioned fear assessed by freezing and by the suppression of 3 different baselines. *Animal Learning & Behavior* [S.I.], v. 8, n. 3, p. 429-434, 1980.

BOUTON, M. E. *et al.* Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biol Psychiatry* [S.I.], v. 60, n. 4, p. 352-60, Aug 15 2006.

BREMNER, J. D. *et al.* MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* [S.I.], v. 152, n. 7, p. 973-81, Jul 1995.

BRENNAN, P. A.; KEVERNE, E. B. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Prog Neurobiol* [S.I.], v. 51, n. 4, p. 457-81, Mar 1997.

BREUNER, C. W.; ORCHINIK, M. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol* [S.I.], v. 175, n. 1, p. 99-112, Oct 2002.

BRINKS, V. *et al.* Emotion and cognition in high and low stress sensitive mouse strains: a combined neuroendocrine and behavioral study in BALB/c and C57BL/6J mice. *Front Behav Neurosci* [S.I.], v. 1, p. 8, 2007.

BRINKS, V. *et al.* Differential MR/GR activation in mice results in emotional states beneficial or impairing for cognition. *Neural Plast* [S.I.], v. 2007, p. 90163, 2007.

BUCHANAN, T. W. *et al.* Impaired memory retrieval correlates with individual differences in cortisol response but not autonomic response. *Learn Mem* [S.I.], v. 13, n. 3, p. 382-7, May-Jun 2006.

BURMAN, M. A. *et al.* Role of Corticosterone in Trace and Delay Conditioned Fear-Potentiated Startle in Rats. *Behavioral Neuroscience* [S.I.], v. 124, n. 2, p. 294-299, Apr 2010.

CAHILL, L. *et al.* Enhanced human memory consolidation with post-learning stress: interaction with the degree of arousal at encoding. *Learn Mem* [S.I.], v. 10, n. 4, p. 270-4, Jul-Aug 2003.

CAIN, D. P.; BINDRA, D. Responses of amygdala single units to odors in the rat. *Exp Neurol* [S.I.], v. 35, n. 1, p. 98-110, Apr 1972.

CAMPEAU, S.; DAVIS, M. Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *J Neurosci* [S.I.], v. 15, n. 3 Pt 2, p. 2301-11, Mar 1995.

CANNON, W. B. ORGANIZATION FOR PHYSIOLOGICAL HOMEOSTASIS. *Physiol. Rev.* [S.I.], v. 9, n. 3, p. 399-431, July 1, 1929 1929.

CANTERAS, N. S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol Biochem Behav* [S.I.], v. 71, n. 3, p. 481-91, Mar 2002.

CANTERAS, N. S. *et al.* Sensing danger through the olfactory system: the role of the hypothalamic dorsal preammillary nucleus. *Neurosci Biobehav Rev* [S.I.], v. 32, n. 7, p. 1228-35, Sep 2008.

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

CHRISTIANSON, S. A. Emotional stress and eyewitness memory: a critical review. *Psychol Bull* [S.I.], v. 112, n. 2, p. 284-309, Sep 1992.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* [S.I.], v. 267, n. 9, p. 1244-52, Mar 4 1992.

COLUCCIA, D. *et al.* Glucocorticoid therapy-induced memory deficits: acute versus chronic effects. *J Neurosci* [S.I.], v. 28, n. 13, p. 3474-8, Mar 26 2008.

CONRAD, C. D. *et al.* Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav Neurosci* [S.I.], v. 110, n. 6, p. 1321-34, Dec 1996.

- CONRAD, C. D. *et al.* The effects of type I and type II corticosteroid receptor agonists on exploratory behavior and spatial memory in the Y-maze. *Brain Res* [S.I.], v. 759, n. 1, p. 76-83, Jun 6 1997.
- CORDERO, M. I.; SANDI, C. A role for brain glucocorticoid receptors in contextual fear conditioning: dependence upon training intensity. *Brain Research* [S.I.], v. 786, n. 1-2, p. 11-17, Mar 1998.
- DALLMAN, M. F. Fast glucocorticoid actions on brain: back to the future. *Front Neuroendocrinol* [S.I.], v. 26, n. 3-4, p. 103-8, Oct-Dec 2005.
- DATSON, N. A. *et al.* Central corticosteroid actions: Search for gene targets. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 583, n. 2-3, p. 272-89, Apr 7 2008.
- DE KLOET, E. R. Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. *Frontiers in Neuroendocrinology* [S.I.], v. 12, n. 2, p. 95-164, 1991.
- DE KLOET, E. R. Stress in the brain. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 405, n. 1-3, p. 187-98, Sep 29 2000.
- DE KLOET, E. R. *et al.* Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* [S.I.], v. 6, n. 6, p. 463-75, Jun 2005.
- DE KLOET, E. R. *et al.* Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Front Neuroendocrinol* [S.I.], v. 29, n. 2, p. 268-72, May 2008.
- DE KLOET, E. R. *et al.* Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* [S.I.], v. 19, n. 3, p. 269-301, Jun 1998.
- DE QUERVAIN, D. J. *et al.* Preventive effect of beta-adrenoceptor blockade on glucocorticoid-induced memory retrieval deficits. *Am J Psychiatry* [S.I.], v. 164, n. 6, p. 967-9, Jun 2007.
- DE QUERVAIN, D. J. *et al.* Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. *Front Neuroendocrinol* [S.I.], v. 30, n. 3, p. 358-70, Aug 2009.
- DE QUERVAIN, D. J. *et al.* Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* [S.I.], v. 394, n. 6695, p. 787-90, Aug 20 1998.

DE QUERVAIN, D. J. *et al.* Acute cortisone administration impairs retrieval of long-term declarative memory in humans. *Nat Neurosci* [S.I.], v. 3, n. 4, p. 313-4, Apr 2000.

DI, S. *et al.* Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci* [S.I.], v. 23, n. 12, p. 4850-7, Jun 15 2003.

DIAMOND, D. M.; PARK, C. R. Predator exposure produces retrograde amnesia and blocks synaptic plasticity. Progress toward understanding how the hippocampus is affected by stress. *Ann N Y Acad Sci* [S.I.], v. 911, p. 453-5, Jun 2000.

DIAMOND, D. M. *et al.* Competitive interactions between endogenous LTD and LTP in the hippocampus underlie the storage of emotional memories and stress-induced amnesia. *Hippocampus* [S.I.], v. 15, n. 8, p. 1006-25, 2005.

DIAMOND, D. M.; ROSE, G. M. Stress impairs LTP and hippocampal-dependent memory. *Ann N Y Acad Sci* [S.I.], v. 746, p. 411-4, Nov 30 1994.

DIELENBERG, R. A.; MCGREGOR, I. S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neurosci Biobehav Rev* [S.I.], v. 25, n. 7-8, p. 597-609, Dec 2001.

DIVERSE-PIERLUISSI, M.; DUNLAP, K. Distinct, convergent second messenger pathways modulate neuronal calcium currents. *Neuron* [S.I.], v. 10, n. 4, p. 753-60, Apr 1993.

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

DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* [S.I.], v. 55, p. 51-86, 2004.

DUDAI, Y. Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Curr Opin Neurobiol* [S.I.], v. 16, n. 2, p. 174-8, Apr 2006.

EHLERS, A.; CLARK, D. M. A cognitive model of posttraumatic stress disorder. *Behav Res Ther* [S.I.], v. 38, n. 4, p. 319-45, Apr 2000.

- FFRENCH-MULLEN, J. M. Cortisol inhibition of calcium currents in guinea pig hippocampal CA1 neurons via G-protein-coupled activation of protein kinase C. *J Neurosci* [S.I.], v. 15, n. 1 Pt 2, p. 903-111, Jan 1995.
- FILE, S. E. *et al.* Dissociation between behavioral and corticosterone responses on repeated exposures to cat odor. *Physiol Behav* [S.I.], v. 54, n. 6, p. 1109-11, Dec 1993.
- FINK, G. *Encyclopedia of stress*. 2nd. ed. Amsterdam ; Boston: Academic Press, 2007.
- FLUTTERT, M. *et al.* A refined method for sequential blood sampling by tail incision in rats. *Lab Anim* [S.I.], v. 34, n. 4, p. 372-8, Oct 2000.
- FOY, M. R. *et al.* Behavioral stress impairs long-term potentiation in rodent hippocampus. *Behav Neural Biol* [S.I.], v. 48, n. 1, p. 138-49, Jul 1987.
- FRANKLAND, P. W. *et al.* Consolidation of CS and US representations in associative fear conditioning. *Hippocampus* [S.I.], v. 14, n. 5, p. 557-69, 2004.
- FULFORD, A. J.; HARBUZ, M. S. *An introduction to the HPA axis*. Elsevier, 2005. (Handbook of Stress and the Brain).
- GALEA, S. *et al.* Psychological sequelae of the September 11 terrorist attacks in New York City. *N Engl J Med* [S.I.], v. 346, n. 13, p. 982-7, Mar 28 2002.
- GRIEBEL, G. *et al.* Characterization of the behavioral profile of the non peptide CRF receptor antagonist CP-154,526 in anxiety models in rodents - Comparison with diazepam and buspirone. *Psychopharmacology* [S.I.], v. 138, n. 1, p. 55-66, Jul 1998.
- GROC, L. *et al.* The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation. *Nat Neurosci* [S.I.], v. 11, n. 8, p. 868-70, Aug 2008.
- HARBUZ, M. S.; LIGHTMAN, S. L. Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. *J Endocrinol* [S.I.], v. 134, n. 3, p. 327-39, Sep 1992.

HARRELL, J. M. *et al.* Evidence for glucocorticoid receptor transport on microtubules by dynein. *J Biol Chem* [S.I.], v. 279, n. 52, p. 54647-54, Dec 24 2004.

INDA, M. C. *et al.* Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *J Neurosci* [S.I.], v. 31, n. 5, p. 1635-43, Feb 2 2011.

INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D.C.: National Academies Press, 2011. p. xxv, 220 p.

JI, J.; MAREN, S. Hippocampal involvement in contextual modulation of fear extinction. *Hippocampus* [S.I.], v. 17, n. 9, p. 749-58, 2007.

JOELS, M. Corticosteroid actions in the hippocampus. *J Neuroendocrinol* [S.I.], v. 13, n. 8, p. 657-69, Aug 2001.

JOELS, M. Impact of glucocorticoids on brain function: relevance for mood disorders. *Psychoneuroendocrinology* [S.I.], v. 36, n. 3, p. 406-14, Apr 2011.

JOELS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* [S.I.], v. 10, n. 6, p. 459-66, Jun 2009.

JOELS, M. *et al.* Corticosteroid actions on the expression of kainate receptor subunit mRNAs in rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* [S.I.], v. 37, n. 1-2, p. 15-20, Apr 1996.

JOELS, M.; DE KLOET, E. R. Effects of glucocorticoids and norepinephrine on the excitability in the hippocampus. *Science* [S.I.], v. 245, n. 4925, p. 1502-5, Sep 29 1989.

JOELS, M. *et al.* Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress-the International Journal on the Biology of Stress* [S.I.], v. 7, n. 4, p. 221-231, Dec 2004.

JOELS, M. *et al.* The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci* [S.I.], v. 31, n. 1, p. 1-7, Jan 2008.

JOELS, M. *et al.* Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Front Neuroendocrinol* [S.I.], v. 28, n. 2-3, p. 72-96, Aug-Sep 2007.

JOELS, M. *et al.* Learning under stress: how does it work? *Trends Cogn Sci* [S.I.], v. 10, n. 4, p. 152-8, Apr 2006.

JOVANOVIC, T. *et al.* Cortisol suppression by dexamethasone reduces exaggerated fear responses in posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* [S.I.], May 19 2011.

KARST, H. *et al.* Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 102, n. 52, p. 19204-7, Dec 27 2005.

KERR, D. S. *et al.* Corticosteroid modulation of hippocampal potentials: increased effect with aging. *Science* [S.I.], v. 245, n. 4925, p. 1505-9, Sep 29 1989.

KESSLER, R. C. *et al.* Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* [S.I.], v. 62, n. 6, p. 617-27, Jun 2005.

KESSLER, R. C. *et al.* Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* [S.I.], v. 52, n. 12, p. 1048-60, Dec 1995.

KILPATRICK, L.; CAHILL, L. Modulation of memory consolidation for olfactory learning by reversible inactivation of the basolateral amygdala. *Behav Neurosci* [S.I.], v. 117, n. 1, p. 184-8, Feb 2003.

KIM, J. J.; DIAMOND, D. M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* [S.I.], v. 3, n. 6, p. 453-62, Jun 2002.

KINO, T. *et al.* G protein beta interacts with the glucocorticoid receptor and suppresses its transcriptional activity in the nucleus. *J Cell Biol* [S.I.], v. 169, n. 6, p. 885-96, Jun 20 2005.

KIRSCHBAUM, C. *et al.* Stress- and treatment-induced elevations of cortisol levels associated with impaired declarative memory in healthy adults. *Life Sci* [S.I.], v. 58, n. 17, p. 1475-83, 1996.

KOBAYAKAWA, K. *et al.* Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature* [S.I.], v. 450, n. 7169, p. 503-8, Nov 22 2007.

KOOLHAAS, J. M. *et al.* Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev* [S.I.], v. 23, n. 7, p. 925-35, Nov 1999.

KOROL, M. *et al.* Children's responses to a nuclear waste disaster: PTSD symptoms and outcome prediction. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* [S.I.], v. 38, n. 4, p. 368-75, Apr 1999.

KROON, J. A.; CAROBREZ, A. P. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, propranolol or scopolamine. *Neurobiol Learn Mem* [S.I.], v. 91, n. 1, p. 32-40, Jan 2009.

KUHLMANN, S. *et al.* Impaired memory retrieval after psychosocial stress in healthy young men. *J Neurosci* [S.I.], v. 25, n. 11, p. 2977-82, Mar 16 2005.

KUHLMANN, S.; WOLF, O. T. A non-arousing test situation abolishes the impairing effects of cortisol on delayed memory retrieval in healthy women. *Neurosci Lett* [S.I.], v. 399, n. 3, p. 268-72, May 22 2006.

LEDOUX, J. E. Emotion, memory and the brain. *Sci Am* [S.I.], v. 270, n. 6, p. 50-7, Jun 1994.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* [S.I.], v. 23, p. 155-84, 2000.

LEE, J. L. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci* [S.I.], v. 11, n. 11, p. 1264-6, Nov 2008.

LI, X. *et al.* Corticosterone-induced rapid phosphorylation of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in PC12 cells. *FEBS Lett* [S.I.], v. 492, n. 3, p. 210-4, Mar 16 2001.

LIGHTMAN, S. L. *et al.* The significance of glucocorticoid pulsatility. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 583, n. 2-3, p. 255-62, Apr 7 2008.

LUPIEN, S. J. *et al.* Stress hormones and human memory function across the lifespan. *Psychoneuroendocrinology* [S.I.], v. 30, n. 3, p. 225-42, Apr 2005.

- LUPIEN, S. J.; MCEWEN, B. S. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Brain Res Rev* [S.I.], v. 24, n. 1, p. 1-27, Jun 1997.
- MACKINTOSH, N. J. Incidental cue learning in rats. *Q J Exp Psychol* [S.I.], v. 17, n. 4, p. 292-300, Nov 1965.
- MARCH, J. S. *et al.* Posttraumatic symptomatology in children and adolescents after an industrial fire. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* [S.I.], v. 36, n. 8, p. 1080-8, Aug 1997.
- MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* [S.I.], v. 24, p. 897-931, 2001.
- MAREN, S. Neuroscience. The threatened brain. *Science* [S.I.], v. 317, n. 5841, p. 1043-4, Aug 24 2007.
- MARIN, M. F. *et al.* Metirapone Administration Reduces the Strength of an Emotional Memory Trace in a Long-Lasting Manner. *J Clin Endocrinol Metab* [S.I.], May 18 2011.
- MASON, B. L. *et al.* A revised role for P-glycoprotein in the brain distribution of dexamethasone, cortisol, and corticosterone in wild-type and ABCB1A/B-deficient mice. *Endocrinology* [S.I.], v. 149, n. 10, p. 5244-53, Oct 2008.
- MASON, J. W. A re-evaluation of the concept of "non-specificity" in stress theory. *J Psychiatr Res* [S.I.], v. 8, n. 3, p. 323-33, Aug 1971.
- MCCLOSKEY, L. A.; WALKER, M. Posttraumatic stress in children exposed to family violence and single-event trauma. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* [S.I.], v. 39, n. 1, p. 108-15, Jan 2000.
- MCEWEN, B. S. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* [S.I.], v. 22, p. 105-22, 1999.
- MCEWEN, B. S. Mood disorders and allostatic load. *Biol Psychiatry* [S.I.], v. 54, n. 3, p. 200-7, Aug 1 2003.
- MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* [S.I.], v. 87, n. 3, p. 873-904, Jul 2007.

MCEWEN, B. S. *et al.* Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev* [S.I.], v. 66, n. 4, p. 1121-88, Oct 1986.

MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. *Science* [S.I.], v. 287, n. 5451, p. 248-51, Jan 14 2000.

MCGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* [S.I.], v. 27, p. 1-28, 2004.

MCGAUGH, J. L. *et al.* Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 93, n. 24, p. 13508-14, Nov 26 1996.

MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr Opin Neurobiol* [S.I.], v. 12, n. 2, p. 205-10, Apr 2002.

MCLEER, S. V. *et al.* Post-traumatic stress disorder in sexually abused children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* [S.I.], v. 27, n. 5, p. 650-4, Sep 1988.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev* [S.I.], v. 28, n. 3, p. 285-305, May 2004.

MEDINA, A. C. *et al.* Glucocorticoid administration into the dorsal striatum [corrected] facilitates memory consolidation of inhibitory avoidance training but not of the context or footshock components. *Learn Mem* [S.I.], v. 14, n. 10, p. 673-7, Oct 2007.

MEIKLE, A. W.; TYLER, F. H. Potency and duration of action of glucocorticoids. Effects of hydrocortisone, prednisone and dexamethasone on human pituitary-adrenal function. *Am J Med* [S.I.], v. 63, n. 2, p. 200-7, Aug 1977.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* [S.I.], v. 70, n. 2, p. 83-244, Jun 2003.

MILLER, A. H. *et al.* Adrenal steroid receptor activation in rat brain and pituitary following dexamethasone: implications for the dexamethasone suppression test. *Biol Psychiatry* [S.I.], v. 32, n. 10, p. 850-69, Nov 15 1992.

- MIRANDA, M. I. *et al.* Glucocorticoids enhance taste aversion memory via actions in the insular cortex and basolateral amygdala. *Learn Mem* [S.I.], v. 15, n. 7, p. 468-76, 2008.
- MORSINK, M. C. *et al.* The dynamic pattern of glucocorticoid receptor-mediated transcriptional responses in neuronal PC12 cells. *J Neurochem* [S.I.], v. 99, n. 4, p. 1282-98, Nov 2006.
- MULLER, J. *et al.* Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli. *Behav Neurosci* [S.I.], v. 111, n. 4, p. 683-91, Aug 1997.
- MUNGER, S. D. *et al.* Subsystem organization of the mammalian sense of smell. *Annu Rev Physiol* [S.I.], v. 71, p. 115-40, 2009.
- MYERS, K. M.; DAVIS, M. Mechanisms of fear extinction. *Mol Psychiatry* [S.I.], v. 12, n. 2, p. 120-50, Feb 2007.
- NADER, K. *et al.* The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci* [S.I.], v. 1, n. 3, p. 216-9, Dec 2000.
- NAJARIAN, L. M. *et al.* Relocation after a disaster: posttraumatic stress disorder in Armenia after the earthquake. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* [S.I.], v. 35, n. 3, p. 374-83, Mar 1996.
- NARANG, V. S. *et al.* Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the rat blood-brain barrier. *Am J Physiol Cell Physiol* [S.I.], v. 295, n. 2, p. C440-50, Aug 2008.
- NEWCOMER, J. W. *et al.* Glucocorticoid-induced impairment in declarative memory performance in adult humans. *J Neurosci* [S.I.], v. 14, n. 4, p. 2047-53, Apr 1994.
- NINOMIYA, E. M. *et al.* Spironolactone and low-dose dexamethasone enhance extinction of contextual fear conditioning. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* [S.I.], v. 34, n. 7, p. 1229-35, Oct 2010.
- OITZL, M. S.; DE KLOET, E. R. Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behav Neurosci* [S.I.], v. 106, n. 1, p. 62-71, Feb 1992.

OITZL, M. S. *et al.* The effect of corticosterone on reactivity to spatial novelty is mediated by central mineralocorticosteroid receptors. *Eur J Neurosci* [S.I.], v. 6, n. 7, p. 1072-9, Jul 1 1994.

OITZL, M. S. *et al.* An ACTH/MSH(4-9) analog counteracts the behavioral effects of a mineralocorticoid receptor antagonist. *Pharmacol Biochem Behav* [S.I.], v. 44, n. 2, p. 447-50, Feb 1993.

OKUDA, S. *et al.* Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 101, n. 3, p. 853-8, Jan 20 2004.

OLIJSLAGERS, J. E. *et al.* Rapid changes in hippocampal CA1 pyramidal cell function via pre- as well as postsynaptic membrane mineralocorticoid receptors. *Eur J Neurosci* [S.I.], v. 27, n. 10, p. 2542-50, May 2008.

OTTO, T. *et al.* Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. *Behav Brain Res* [S.I.], v. 110, n. 1-2, p. 119-28, Jun 1 2000.

OTTO, T. *et al.* Odor-guided fear conditioning in rats: 1. Acquisition, retention, and latent inhibition. *Behav Neurosci* [S.I.], v. 111, n. 6, p. 1257-64, Dec 1997.

PACAK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* [S.I.], v. 22, n. 4, p. 502-48, Aug 2001.

PASCHALL, G. Y.; DAVIS, M. Olfactory-mediated fear-potentiated startle. *Behav Neurosci* [S.I.], v. 116, n. 1, p. 4-12, Feb 2002.

PAVESI, E. *et al.* Acquisition of Pavlovian Fear Conditioning Using beta-Adrenoceptor Activation of the Dorsal Premammillary Nucleus as an Unconditioned Stimulus to Mimic Live Predator-Threat Exposure. *Neuropsychopharmacology* [S.I.], v. 36, n. 5, p. 926-39, Apr 2011.

PAVLIDES, C. *et al.* Effects of chronic stress on hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus* [S.I.], v. 12, n. 2, p. 245-57, 2002.

PAVLOV, I. P.; ANREP, G. V. *Conditioned reflexes : an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. New York: Dover, 1960.

- PFAFF, D. W. *et al.* Telemetered recording of hormone effects on hippocampal neurons. *Science* [S.I.], v. 172, n. 981, p. 394-5, Apr 23 1971.
- PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience* [S.I.], v. 106, n. 2, p. 274-285, Apr 1992.
- PITMAN, R. K. *et al.* Systemic mifepristone blocks reconsolidation of cue-conditioned fear; Propranolol prevents this effect. *Behav Neurosci* [S.I.], v. 125, n. 4, p. 632-8, Aug 2011.
- PITMAN, R. K. *et al.* Psychophysiologic assessment of posttraumatic stress disorder imagery in Vietnam combat veterans. *Arch Gen Psychiatry* [S.I.], v. 44, n. 11, p. 970-5, Nov 1987.
- PITMAN, R. K. *et al.* Investigating the pathogenesis of posttraumatic stress disorder with neuroimaging. *J Clin Psychiatry* [S.I.], v. 62 Suppl 17, p. 47-54, 2001.
- PRAGER, E. M.; JOHNSON, L. R. Stress at the synapse: signal transduction mechanisms of adrenal steroids at neuronal membranes. *Sci Signal* [S.I.], v. 2, n. 86, p. re5, 2009.
- PRZYBYSLAWSKI, J.; SARA, S. J. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* [S.I.], v. 84, n. 1-2, p. 241-6, Mar 1997.
- PUGH, C. R. *et al.* A selective role for corticosterone in contextual-fear conditioning. *Behavioral Neuroscience* [S.I.], v. 111, n. 3, p. 503-511, Jun 1997.
- PYNOOS, R. S. *et al.* Life threat and posttraumatic stress in school-age children. *Arch Gen Psychiatry* [S.I.], v. 44, n. 12, p. 1057-63, Dec 1987.
- QIU, J. *et al.* Rapid activation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase by corticosterone in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 287, n. 4, p. 1017-24, Oct 5 2001.
- QUIRK, G. J.; MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* [S.I.], v. 33, n. 1, p. 56-72, Jan 2008.

RAUCH, S. L. *et al.* Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: Human neuroimaging research - Past, present, and future. *Biological Psychiatry* [S.I.], v. 60, n. 4, p. 376-382, Aug 2006.

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

REUL, J. M.; DE KLOET, E. R. Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with in vitro autoradiography and computerized image analysis. *J Steroid Biochem* [S.I.], v. 24, n. 1, p. 269-72, Jan 1986.

RICHARDSON, R. *et al.* Extinction of conditioned odor potentiation of startle. *Neurobiol Learn Mem* [S.I.], v. 78, n. 2, p. 426-40, Sep 2002.

RICHARDSON, R. *et al.* Conditioned odor potentiation of startle in rats. *Behav Neurosci* [S.I.], v. 113, n. 4, p. 787-94, Aug 1999.

RODRIGUES, S. M. *et al.* The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annu Rev Neurosci* [S.I.], v. 32, p. 289-313, 2009.

ROOZENDAAL, B. Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiol Learn Mem* [S.I.], v. 78, n. 3, p. 578-95, Nov 2002.

ROOZENDAAL, B. Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* [S.I.], v. 27, n. 8, p. 1213-23, Dec 2003.

ROOZENDAAL, B. *et al.* Dose-dependent suppression of adrenocortical activity with metyrapone: effects on emotion and memory. *Psychoneuroendocrinology* [S.I.], v. 21, n. 8, p. 681-93, Nov 1996.

ROOZENDAAL, B. *et al.* Glucocorticoid effects on memory retrieval require concurrent noradrenergic activity in the hippocampus and basolateral amygdala. *J Neurosci* [S.I.], v. 24, n. 37, p. 8161-9, Sep 15 2004.

ROOZENDAAL, B. *et al.* Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* [S.I.], v. 10, n. 6, p. 423-33, Jun 2009.

ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. *Eur J Neurosci* [S.I.], v. 9, n. 1, p. 76-83, Jan 1997.

ROOZENDAAL, B. *et al.* Stress-activated hormonal systems and the regulation of memory storage. *Ann N Y Acad Sci* [S.I.], v. 821, p. 247-58, Jun 21 1997.

SACK, W. H. *et al.* Does PTSD transcend cultural barriers? A study from the Khmer Adolescent Refugee Project. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* [S.I.], v. 36, n. 1, p. 49-54, Jan 1997.

SANDI, C. *et al.* Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *Eur J Neurosci* [S.I.], v. 9, n. 4, p. 637-42, Apr 1997.

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

SAPOLSKY, R. M. Why stress is bad for your brain. *Science* [S.I.], v. 273, n. 5276, p. 749-50, Aug 9 1996.

SAPOLSKY, R. M. *et al.* How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 55-89, Feb 2000.

SCHMAJUK, N. A.; DICARLO, J. J. A neural network approach to hippocampal function in classical conditioning. *Behav Neurosci* [S.I.], v. 105, n. 1, p. 82-110, Feb 1991.

SCHWABE, L. *et al.* Chronic stress modulates the use of spatial and stimulus-response learning strategies in mice and man. *Neurobiol Learn Mem* [S.I.], v. 90, n. 3, p. 495-503, Oct 2008.

SCHWABE, L. *et al.* Stress modulates the use of spatial versus stimulus-response learning strategies in humans. *Learn Mem* [S.I.], v. 14, n. 1, p. 109-16, Jan-Feb 2007.

SCHWABE, L. *et al.* Stress effects on declarative memory retrieval are blocked by a beta-adrenoceptor antagonist in humans. *Psychoneuroendocrinology* [S.I.], v. 34, n. 3, p. 446-54, Apr 2009.

SCHWABE, L.; WOLF, O. T. Stress impairs the reconsolidation of autobiographical memories. *Neurobiol Learn Mem* [S.I.], v. 94, n. 2, p. 153-7, Sep 2010.

SECKL, J. R. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? *Front Neuroendocrinol* [S.I.], v. 18, n. 1, p. 49-99, Jan 1997.

SELYE, H. Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J* [S.I.], v. 1, n. 4667, p. 1383-92, Jun 17 1950.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* [S.I.], v. 10, n. 2, p. 230-1, Spring 1998.

SHAW, J. A. *et al.* Twenty-one-month follow-up study of school-age children exposed to Hurricane Andrew. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* [S.I.], v. 35, n. 3, p. 359-64, Mar 1996.

SHORS, T. J. Stressful experience and learning across the lifespan. *Annu Rev Psychol* [S.I.], v. 57, p. 55-85, 2006.

SHORS, T. J. *et al.* Stress-induced facilitation of classical conditioning. *Science* [S.I.], v. 257, n. 5069, p. 537-9, Jul 24 1992.

SLOTNICK, B. Animal cognition and the rat olfactory system. *Trends Cogn Sci* [S.I.], v. 5, n. 5, p. 216-222, May 1 2001.

SOUZA, R. R. *Dupla dissociação da função dos receptores NMDA da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral rostral e caudal no medo inato e condicionado ao odor de gato.* (2007). 80 f. (Master) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia . Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

SUZUKI, A. *et al.* Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *Journal of Neuroscience* [S.I.], v. 24, n. 20, p. 4787-4795, May 2004.

TASKER, J. G. *et al.* Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* [S.I.], v. 147, n. 12, p. 5549-56, Dec 2006.

- TAUBENFELD, S. M. *et al.* Preclinical assessment for selectively disrupting a traumatic memory via postretrieval inhibition of glucocorticoid receptors. *Biol Psychiatry* [S.I.], v. 65, n. 3, p. 249-57, Feb 1 2009.
- TERR, L. C. Psychic trauma in children: observations following the Chowchilla school-bus kidnapping. *Am J Psychiatry* [S.I.], v. 138, n. 1, p. 14-9, Jan 1981.
- TULLY, T. Regulation of gene expression and its role in long-term memory and synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 94, n. 9, p. 4239-41, Apr 29 1997.
- ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* [S.I.], May 13 2009.
- WARNER, L. A. *et al.* Prevalence and correlates of drug use and dependence in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* [S.I.], v. 52, n. 3, p. 219-29, Mar 1995.
- WOODSON, J. C. *et al.* Emotion-induced amnesia in rats: working memory-specific impairment, corticosterone-memory correlation, and fear versus arousal effects on memory. *Learn Mem* [S.I.], v. 10, n. 5, p. 326-36, Sep-Oct 2003.
- WRIGHT, R. L. *et al.* Attenuating corticosterone levels on the day of memory assessment prevents chronic stress-induced impairments in spatial memory. *Eur J Neurosci* [S.I.], v. 24, n. 2, p. 595-605, Jul 2006.
- YANG, Y. L. *et al.* Systemic and intra-amygdala administration of glucocorticoid agonist and antagonist modulate extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* [S.I.], v. 31, n. 5, p. 912-24, May 2006.
- YANG, Y. L. *et al.* Glutamate NMDA receptors within the amygdala participate in the modulatory effect of glucocorticoids on extinction of conditioned fear in rats. *Neuropsychopharmacology* [S.I.], v. 32, n. 5, p. 1042-51, May 2007.
- YEHUDA, R. *et al.* Learning and memory in combat veterans with posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* [S.I.], v. 152, n. 1, p. 137-9, Jan 1995.

YEHUDA, R.; LEDOUX, J. Response variation following trauma: a translational neuroscience approach to understanding PTSD. *Neuron* [S.I.], v. 56, n. 1, p. 19-32, Oct 4 2007.

YEHUDA, R.; MCFARLANE, A. C. Conflict between current knowledge about posttraumatic stress disorder and its original conceptual basis. *Am J Psychiatry* [S.I.], v. 152, n. 12, p. 1705-13, Dec 1995.

ZANGROSSI, H., JR.; FILE, S. E. Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. *Brain Res Bull* [S.I.], v. 29, n. 3-4, p. 381-8, Sep-Oct 1992.

ZHOU, M. *et al.* Both mineralocorticoid and glucocorticoid receptors regulate emotional memory in mice. *Neurobiol Learn Mem* [S.I.], v. 94, n. 4, p. 530-7, Nov 2010.

ZORAWSKI, M.; KILLCROSS, S. Posttraining glucocorticoid receptor agonist enhances memory in appetitive and aversive Pavlovian discrete-cue conditioning paradigms. *Neurobiol Learn Mem* [S.I.], v. 78, n. 2, p. 458-64, Sep 2002.

ZUFALL, F.; LEINDERS-ZUFALL, T. Mammalian pheromone sensing. *Curr Opin Neurobiol* [S.I.], v. 17, n. 4, p. 483-9, Aug 2007.