

**TATIANA LIMA FERREIRA**

**EFEITOS DA DESCONEXÃO FUNCIONAL ENTRE O  
ESTRIADO DORSAL E A AMÍGDALA NAS TAREFAS DE  
CONDICIONAMENTO CLÁSSICO DE MEDO AO SOM E AO  
CONTEXTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

**São Paulo  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ferreira, Tatiana Lima

**Efeitos da desconexão funcional entre o estriado dorsal e a amígdala nas tarefas de condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto** / Tatiana Lima Ferreira -- São Paulo, 2008.

xxi, 145f

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

Título em inglês: Effects of functional disconnection between dorsal striatum and amygdala on tone fear conditioning and contextual fear conditioning

1. Memória. 2. Gânglios da base 3. Amígdala. 4. Condicionamento clássico. 5. Aprendizagem.

**TATIANA LIMA FERREIRA**

**EFEITOS DA DESCONEXÃO FUNCIONAL ENTRE O  
ESTRIADO DORSAL E A AMÍGDALA NAS TAREFAS DE  
CONDICIONAMENTO CLÁSSICO DE MEDO AO SOM E AO  
CONTEXTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Gabriela Menezes de Oliveira  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Sara Joyce Shammah-Lagnado

**São Paulo  
2008**

Esta tese foi realizada no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP).

*Com amor e imensa gratidão, dedico esta tese aos meus pais,  
Airton Ferreira e Neuza da Cruz Lima Ferreira.  
Pelo apoio e incentivo constante, pelo exemplo de vida e de ser  
humano, pelos valores morais e pela educação que me  
proporcionaram.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

À Profa. Maria Gabriela Menezes de Oliveira, pela orientação neste longo período. Pela dedicação, paciência e entusiasmo. Pela oportunidade, liberdade e confiança depositada. Por ser assim, deste modo apaixonante e cativar todos que convivem com ela. Amiga, muito obrigado por esses 10 anos de convívio!

À Profa. Sara Joyce Shammah-Lagnado, por co-orientar este trabalho. Pelos ensinamentos anatômicos e científicos. Pela dedicada colaboração neste e nos próximos estudos.

À Escola, também conhecida como UNIFESP, e a todos os profissionais desta instituição, pelos 11 anos aqui passados. Por ser única, especial, aconchegante e reunir pessoas muito interessantes.

Às meninas da equipe Ferreira e “colegas” (1999 a 2008), Raquel e Karin, pela ajuda, teórica e prática. Pelo apoio, companheirismo e amizade, na alegria e na tristeza. Por lutarem bravamente contra o sono e o cansaço e estarem ao meu lado nestes momentos finais. Pelas sugestões, críticas e também pelas risadas, que foram muitas. Muito obrigada! Eu amo vocês!

Às amigas Paulinha, Juliana, Roberta, Karin e Raquel, que participaram da execução de alguns experimentos. Pelos ensinamentos compartilhados, pelo apoio constante e por fazerem parte desta história.

Ao Prof. Orlando, pelas discussões sobre o presente trabalho e sobre a vida. Pelas reuniões de filosofia da ciência, pelo bom humor e pela genialidade.

À Profa Deborah Suchecki, pela amizade, colaboração e pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa e discussão.

À Profa Mônica Levy Andersen, pelo empréstimo de alguns fármacos e da bomba de infusão utilizados no presente estudo.

A todos os professores e pesquisadores do Departamento de Psicobiologia, pelas aulas, pelo conhecimento compartilhado, pelo ambiente de trabalho e pelo apoio oferecido.

À Profa Débora Hipólide, pela amizade, pelo apoio e enorme carinho e pelas sugestões sempre bem vindas.

Ao grupo de neurobiologia da memória em animais: Gabi, Raquel, Karin, Larissa, Paulinha, Juliana, Danilo, Dudu, Nadine, Alberto, Francisco Godoi, Francisco Dubiela, Sérgio Arthur e Roberta, pelas nossas infinitas discussões sobre os trabalhos científicos, sobre as hipóteses, sobre os objetivos. Por ser esse grupo assim, totalmente acelerado e dinâmico.

A Roberta, minha primeira “filha científica”, pela ajuda essencial em muitos momentos, pelo convívio, pelo respeito, pela amizade. Pela dedicação e seriedade nos experimentos. Seu “crescimento” notável me deixa muito feliz e orgulhosa.

Ao Zé, José Bernardo da Costa, pela dedicação e profissionalismo nos experimentos conduzidos. Pela ajuda prática inestimável e pela amizade. E aos meninos do biotério, em especial ao Tomé Pimentel dos Anjos, pela dedicação e cuidado com os animais.

À Marilde Costa, Gilberto de Carvalho e Diva Lima, pelo apoio técnico e ajuda em parte dos experimentos, pela disposição e pelo convívio agradável.

À Cristina Jorge, pelo auxílio na construção das referências bibliográficas desta tese. Pela dedicação e competência no cuidado da biblioteca. Por ser amiga e companheira!

A todo o pessoal da secretaria, pela colaboração e auxílio em questões burocráticas da pós-graduação. Em especial à Nereide Lourdes Garcia e ao Júlio Nascimento, pela dedicação e bom humor.



Aos pós-graduandos do departamento, pelas conquistas e ideais compartilhados ao logo desses anos, em especial aos amigos: Bel, Fúlvio, Bia, Rafa, Raquel, Karin, Paulinha, Mônica Carolina, Zila, Jú, Francisco G., Francisco D., Ricardo, Agatha, Nadine, Karina, Suzi, Shirley e Cláudia, e também aos novatos, que têm a responsabilidade de continuar essa história.

Aos amigos da Bio da UNIFESP, em especial: Carol, Angela, Fabi, Francine, Lú, Bel, Cláudio e Paulinha, pelos maravilhosos momentos vividos em um dos melhores cursos de graduação do país.

Aos meninos do primeiro, segundo e terceiro X: Léo, Pedrão, Chernobyl, Calabra, Felipe, Diogão, Padilha, Fredinho, Cacá, Fester, Piauí, Rosca, Xisto, César, Daniel, Mineiro, Manga e outros, pela amizade e pelo divertida convivência.

Aos moradores fixos e flutuantes da casa maluca, em especial ao Fester e Léo (irmãos que não tive), ao Fábio e a Cris, e aos frutos deste relacionamento: Juju e Lala, pela amizade, companheirismo e exemplo de vida.

Aos amigos eternos: Carol, Tru, Gaúcha, Karina, Cezinha, Nico, Ana Paula, Paulinha, Karin e Dé, pelo apoio e por fazerem parte da minha vida.

Aos amigos da praça e de Rio Preto: Tchello, Girino, Matheus, Jê, Linho, Lhão, Rodolfo, Carlos, Murad, Alessander, Lissandra, Bruna, Adriana, Karina, Claudinha, que estão sempre comigo, em qualquer lugar.

Ao João, pelo amor e amizade de tantos anos. Por ser esta pessoa única, inesquecível. Obrigado por fazer parte da minha vida e estar ao meu lado sempre.

À toda minha família, em especial as minhas irmãs, Thalita e Thais, minha tia Odete, meus avós e à Maria, pelo amor e apoio incondicional.

À IBRO (International Brain Research Organization) pelo apoio educacional e financeiro para a realização de Escuelas de Neurociencia.

À Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT .....	xx
INTRODUÇÃO .....	1
OBJETIVO.....	23
ETAPA 1 - EFEITOS DAS LESÕES PRÉ-TREINO DE ESTRIADO DORSAL E AMÍGDALA NAS TAREFAS DE CONDICIONAMENTO DE MEDO AO SOM E AO CONTEXTO.....	24
MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS.....	24
EXPERIMENTO 1 - Efeitos das lesões pré-treino bilaterais e unilaterais de estriado dorsal e CeA nas tarefas de condicionamento de medo ao som e ao contexto.....	29
<i>Experimento 1.1. - Efeitos da lesão unilateral e bilateral do CeA no condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto.....</i>	<i>29</i>
<i>Experimento 1.2. - Efeitos da lesão unilateral e bilateral de estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto.....</i>	<i>34</i>
EXPERIMENTO 2 - Efeitos das lesões pré-treino assimétricas de CeA-estriado dorsal nas tarefas de condicionamento de medo ao som e ao contexto.....	37
<i>Experimento 2.1. Efeito da lesão contralateral e ipsilateral de CeA-estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som. ....</i>	<i>37</i>
<i>Experimento 2.2. Efeito da lesão contralateral de CeA-estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao contexto. ....</i>	<i>40</i>
ETAPA 2 - EFEITOS DAS LESÕES PRÉ-TESTE DE ESTRIADO DORSAL E AMÍGDALA NAS TAREFAS DE CONDICIONAMENTO DE MEDO AO SOM E AO CONTEXTO.....	43

MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS.....	43
EXPERIMENTO 1 : Efeitos da lesão pré-teste de estriado dorsal na expressão da resposta condicionada de medo ao som e ao contexto e nos níveis de ACTH plasmáticos medidos após o teste comportamental.....	45
EXPERIMENTO 2: Efeito das lesões assimétricas contralateral e ipsilateral pré-teste de CeA-estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som. ....	51
ETAPA 3 - EFEITOS DA INATIVAÇÃO TEMPORÁRIA DE ESTRIADO DORSAL E DA AMÍGDALA NA AQUISIÇÃO E CONSOLIDAÇÃO DO CONDICIONAMENTO DE MEDO AO SOM. ....	55
MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS.....	55
EXPERIMENTO 1 - Efeitos da administração pré-treino intra-estriatal de muscimol no condicionamento clássico de medo ao som.....	58
EXPERIMENTO 2 - Efeitos da administração pré-treino de muscimol no CeA e no estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som. ....	63
EXPERIMENTO 3 - Efeitos da administração pós-treino de lidocaína no estriado dorsal associada à lesão contralateral de CeA na tarefa de condicionamento clássico de medo ao som. ....	66
DISCUSSÃO .....	71
CONCLUSÕES .....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	92
ANEXOS.....	119

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 6 OHDA** – 6-hidroxi-dopamina
- AB** - Núcleo Acessório Basal da Amígdala
- ACTH** – Hormônio Adrenocorticotrófico
- ANOVA** – Análise de Variância
- B** - Núcleo Basal da Amígdala
- BLA** - Núcleo Basolateral da Amígdala
- BMA** - Núcleo Basomedial da Amígdala
- BNST** – Núcleo Intersticial da Estria Terminal
- cBLA** – Complexo Basolateral da Amígdala
- CeA** - Núcleo Central da Amígdala
- CGM** – Corpo Geniculado Medial
- DSM IV** – Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais
- EDTA** – Ácido etileno-diamino-tetra-acético
- GABA** – Ácido  $\gamma$  aminobutírico
- i.m.** - intramuscular
- i.p.**- intraperitoneal
- LA** – Núcleo Lateral da Amígdala
- LTP** – Potenciação de Longo Prazo
- MPTP** – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
- NMDA** – *N*-metil-*D*-aspartato
- PAG** - Substância Cinzenta Periaquedutal
- PIT** - Transfência Pavloviana Instrumental
- RNA<sub>m</sub>** – RNA mensageiro
- RR** – Núcleo retrorubral
- SN<sub>c</sub>** – Substância Negra compacta
- SN<sub>r</sub>** - Substância Negra reticulata
- S-R** – Estímulo–Resposta
- S-S** – Estímulo-Estímulo
- TAN** – Neurônio Tonicamente Ativo

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo das principais conexões dos núcleos da base.....	5
Figura 2 – Caixa de condicionamento .....	26
Figura 3 – Câmara de teste .....	26
Figura 4 – Delineamento experimental da ETAPA 1. ....	28
Figura 5 – Representação dos resultados histológicos da ETAPA 1 e 2.....	31
Figura 6 – Efeitos da lesão unilateral e bilateral do CeA no condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto. ....	33
Figura 7 – Efeitos da lesão unilateral e bilateral do estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto.....	36
Figura 8 – Efeito da lesão contralateral e ipsilateral de CeA-estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som. ....	39
Figura 9 – Efeito da lesão contralateral de CeA-estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao contexto. ....	41
Figura 10 – Delineamento experimental da ETAPA 2. ....	45
Figura 11 – Efeito da lesão bilateral pré-teste de estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som. ....	48
Figura 12 – Efeito da lesão bilateral pré-teste de ED no condicionamento clássico de medo ao contexto. ....	50
Figura 13 – Efeito das lesões assimétricas contralateral e ipsilateral pré-teste de CeA-estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som.....	53
Figura 14 – Delineamento experimental dos Experimentos 1 e 2 da ETAPA 3.....	59
Figura 15 – Representações dos resultados histológicos da ETAPA 3.....	60
Figura 16 – Efeitos da administração intra-estriatal de muscimol no condicionamento clássico de medo ao som. ....	62

Figura 17 – Efeitos da administração de muscimol no CeA e no ED no condicionamento clássico de medo ao som. ....	65
Figura 18 – Delineamento experimental do Experimento 3 (ETAPA 3).....	66
Figura 19 – Efeitos da administração de lidocaína no estriado dorsal associada à lesão contralateral de CeA na consolidação do condicionamento clássico de medo ao som. ....	68
Figura 20 – Representação esquemática do circuito neural responsável pelo medo condicionado. ....	90

## **LISTA DE TABELAS**

QUADRO 1. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NAS ETAPAS 1, 2 E 3 .....70



RESUMO

## RESUMO

O núcleo central da amígdala (CeA) – uma estrutura crítica na memória emocional – projeta para a substância negra compacta e para o núcleo retrorubral, ambos os quais fornecem inervação dopaminérgica ao estriado dorsal. O estriado dorsal está envolvido em vários processos de aprendizagem e memória, tais como memória de procedimento, aprendizagem de hábitos, associação com recompensa e memória emocional. A proposta do presente estudo foi verificar os efeitos de lesões do estriado dorsal e das conexões indiretas entre o CeA e o estriado dorsal nas tarefas de condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto. Na Etapa 1, ratos Wistar receberam, antes da sessão de treino, lesões bilaterais do CeA e do estriado dorsal, e lesões assimétricas de CeA-estriado dorsal (desconexão funcional) - que consistia em uma lesão eletrolítica do CeA em um hemisfério cerebral combinada com uma lesão do estriado dorsal no hemisfério contralateral - e foram submetidos às tarefas de condicionamento de medo ao som e ao contexto. A lesão pré-treino do CeA prejudicou o desempenho dos animais em ambas as tarefas. Por outro lado, a lesão bilateral do estriado dorsal e a lesão assimétrica contralateral do CeA-estriado dorsal prejudicaram o desempenho dos animais apenas na tarefa de condicionamento de medo ao som. Esses resultados sugerem que tanto o estriado dorsal como as conexões entre o CeA e o estriado são importantes na mediação do condicionamento de medo ao som. Na Etapa 2, foram realizadas lesões bilaterais do estriado dorsal e lesões assimétricas do CeA-estriado dorsal antes do teste (após o treino) dos animais na tarefa comportamental. Os resultados mostraram que os animais com lesões bilaterais do estriado dorsal, pré-teste, apresentaram prejuízo na tarefa de condicionamento de medo ao som, mas não na de condicionamento de medo ao contexto. As concentrações plasmáticas de ACTH avaliadas após os testes das tarefas comportamentais não foram diferentes entre os animais lesados e os animais controles. A lesão assimétrica contralateral CeA-estriado dorsal realizada antes do teste não prejudicou o desempenho dos animais na tarefa de condicionamento de medo ao som. Os resultados desta etapa sugerem que o estriado dorsal também está envolvido na expressão da resposta condicionada de medo ao som, sendo este envolvimento seletivo às respostas que apresentam um componente somatomotor, como a resposta de congelamento. Entretanto, a interação entre o CeA e o estriado dorsal não é importante no momento da expressão desta mesma resposta. Os principais achados

do presente trabalho foram confirmados após a inativação temporária pré-treino de estriado dorsal e das conexões indiretas entre o CeA-estriado dorsal na tarefa de condicionamento de medo ao som (Etapa 3). No último experimento da Etapa 3 observou-se ainda que a lesão de CeA combinada com a inativação temporária de estriado dorsal imediatamente após o treino do animal, não prejudicou o desempenho da tarefa de condicionamento de medo ao som. Estes resultados indicam que as conexões entre o CeA e o estriado dorsal são importantes para a aquisição do condicionamento de medo ao som, mas não para a consolidação desta tarefa. O estriado dorsal, por sua vez, é importante para a aquisição/consolidação e expressão do condicionamento de medo ao som. Os resultados do presente estudo sugerem, pela primeira vez, que a via indireta CeA-estriado dorsal está envolvida na aquisição da tarefa de condicionamento de medo ao som, indicando que uma estrutura prosencefálica – o estriado dorsal - medeia a resposta somatomotora condicionada a um estímulo discreto. Esses resultados, também estão de acordo com outros estudos que mostram que os condicionamentos de medo ao som e ao contexto são mediados por diferentes vias anatômicas.

# ABSTRACT

## ABSTRACT

The central nucleus of the amygdala (CeA) - a critical structure in emotional memory - projects to the substantia nigra pars compacta and retrorubral nucleus, both of which provide dopaminergic innervation to the dorsal striatum. Dorsal striatum is involved in several learning and memory processes, such as procedural memory, habit learning, reward-association and emotional memory. The purpose of the present study was to verify the effects of lesions in the dorsal striatum and in the indirect pathway between the CeA and dorsal striatum on tone and contextual fear conditioning tasks. In Phase 1, Wistar rats received pre-training bilateral lesions of the CeA and dorsal striatum, and pre-training asymmetrical CeA-dorsal striatum lesions that consist of an electrolytic lesion of the CeA in one cerebral hemisphere combined with a dorsal striatum lesion in the contralateral hemisphere, and were submitted to tone and contextual fear conditioning tasks. Pre-training CeA lesion impaired the performance of animals on both tasks. However, bilateral dorsal striatum lesion and the asymmetrical contralateral CeA-dorsal striatum lesion only disrupted the performance in the tone fear conditioning task. These results suggest that both the dorsal striatum and the indirect CeA-dorsal striatum pathways are important in mediating tone fear conditioning. In Phase 2, bilateral dorsal striatum lesions and asymmetrical CeA-dorsal striatum lesions were performed before the test (after training) of animals in the behavioral tasks. The results showed that animals with bilateral pre-test dorsal striatum lesions showed impairment in tone, but not in contextual fear conditioning tasks. ACTH plasma levels, measured after the behavioral tests, did not differ between lesioned and control animals. Asymmetrical contralateral CeA-dorsal striatum lesion carried out before the test did not impair the performance of animals in the tone fear conditioning task. The results observed in Phase 2 suggest that dorsal striatum is also involved in the expression of the conditioned fear response to tone, and that this involvement is selective to responses that present a somatomotor component, such as freezing response. However, the interaction between CeA and dorsal striatum is not important for the expression of this response. The main findings of the present work were confirmed by pre-training temporal inactivation of the dorsal striatum and the indirect CeA-dorsal striatum pathway in tone fear conditioning (Phase 3). The last experiment of this phase showed that the temporal inactivation of CeA-dorsal striatum, immediately after training, did not impair the behavioral performance of animals in the tone fear

conditioning task. These results indicate that the CeA-dorsal striatum pathway is important for the acquisition, but not for the consolidation of this task. On the other hand, the dorsal striatum is involved in the acquisition/consolidation and expression of tone fear conditioning. The present results suggest, for the first time, that an indirect CeA-dorsal striatum pathway is involved in the acquisition of tone fear conditioning, implying that a forebrain structure – the dorsal striatum - mediates a somatomotor conditioned response to an explicit stimulus. Moreover, these results corroborate previous studies showing that tone and contextual fear conditioning are mediated by distinct anatomical pathway.

# INTRODUÇÃO

# INTRODUÇÃO

## Sistemas Múltiplos de Memória

As habilidades de aprender, armazenar, evocar e esquecer afetam a vida do ser humano em muitos aspectos. Provavelmente, isso explica o fato de que a memória e o prejuízo de memória (amnésia) atraem estudiosos e pensadores desde muito tempo atrás. A idéia da existência de sistemas múltiplos (não unitários) de memória também é antiga, sendo que, há mais de um século, psicólogos e filósofos como por exemplo, Maine de Biran, 1804<sup>1</sup>; William James, 1890<sup>2</sup> e Bérghson, 1910<sup>3</sup> escreveram sobre esses possíveis diferentes tipos de memória (citado por Squire, 2004). Mas, somente a partir da metade do século XX, esse tópico de estudo tornou-se experimental, no sentido de verificar como o encéfalo adquire, armazena, codifica e evoca as informações aprendidas. De acordo com Squire (2004), a era moderna da cognição experimental iniciou-se com os trabalhos da psicóloga Brenda Milner, no final da década de 60.

Em 1953, o neurocirurgião William Beecher Scoville realizou uma ressecção bilateral no lobo temporal medial do paciente de 27 anos - H.M. - com objetivo de tratar as graves crises de epilepsia apresentadas pelo mesmo. Após quatro anos da cirurgia, foi publicado o trabalho: 'Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions' (Scoville & Milner, 1957) - trabalho este que apresenta 1744 citações bibliográficas até 2002 (Corkin, 2002). Neste estudo, os autores descreveram o prejuízo de memória observado em H.M. e concluíram que a formação hipocampal seria importante para a memória e, mais, que a gravidade da amnésia encontrada seria proporcional à quantidade de tecido hipocampal removido (Scoville & Milner, 1957). Mais tarde, surgiram os primeiros trabalhos mostrando que, apesar do quadro amnésico

---

<sup>1</sup> Maine de Biran FPG. The influence of habit on the faculty of thinking. Baltimore: Williams & Wilkins; 1929 (first published in 1804). apud Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. Neurobiol Learn Mem. 2004;82(3):171-7.

<sup>2</sup> William J. Principles of Psychology. 1890. apud Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. Neurobiol Learn Mem. 2004;82(3):171-7.

<sup>3</sup> Bergson HL. Matter and Memory (authorized translation by Nancy M. Paul and W. Scott Palmer). London: Allen; 1910. apud Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. Neurobiol Learn Mem. 2004;82(3):171-7.



observado, algumas habilidades de memória e aprendizagem estavam preservadas nos pacientes amnésicos (Milner, 1962<sup>4</sup>, citado por Milner et al., 1998; Corkin, 1968). Por exemplo, Milner, em 1962, relatou que a habilidade de desenhar no espelho podia ser aprendida pelo paciente H.M., mesmo este não se recordando desta prática (citado por Milner et al., 1998). Ou seja, apesar do prejuízo cognitivo observado após a lesão de estruturas do lobo temporal e de regiões diencefálicas em alguns tipos de tarefas utilizadas para se avaliar a memória, outras habilidades estavam preservadas.

Diversos estudos, ao longo dos últimos 50 anos, permitiram mais recentemente a construção da taxonomia da memória de longo prazo. Existem muitas propostas de classificação da memória e muitos modelos descrevem fenômenos semelhantes, atribuindo nomes diferentes a esses sistemas (para revisões ver, Oliveira & Bueno, 1993; Magila & Xavier, 1999). Estas classificações foram baseadas nos achados do que está preservado ou prejudicado em pacientes amnésicos - como por exemplo, no paciente HM - em relação aos diversos testes de memória aplicados.

Desta forma foi possível dividir a memória em sistemas que dependem ou independem da formação hipocampal e outras estruturas. A memória prejudicada nos pacientes com lesão de hipocampo é denominada de explícita ou declarativa: definida como a capacidade de armazenar e recordar conscientemente fatos e acontecimentos. Por outro lado, a memória intacta pertence à classe denominada de implícita ou não-declarativa (de procedimento), que pode ser observada, por exemplo, através da aquisição gradual de habilidades percepto-motoras e cognitivas (Squire, 1986; Schacter, 1987; Cohen, 1984). Este tipo de memória não necessita ser trazida à mente de forma consciente, sendo demonstrada através do desempenho. Bérghson (1910) tem uma elegante caracterização da memória implícita e do hábito: “[It is]...a memory profoundly different ... always bent upon action, seated in the present and looking only to the future...In truth it no longer represent our past to us, it acts it; and if it still deserves the name of memory, it is not because it conserves bygone images, but

---

<sup>4</sup> Milner B. Les troubles de la mémoire accompagnant les lésions hippocampiques bilatérales. In *Physiologie de l'Hippocampe, Colloques Internationaux No.107* (Paris, C.N.R.S.), 257-272. [English translation. Milner PM, Glickman S. In *Cognitive processes and the brain*, Princetown, NJ: Van Nostrand; 1965 97-111]. apud Milner B, Squire LR, Kandel ER. *Cognitive neuroscience and the study of memory*. *Neuron*. 1998;20(3):445-68.

because it prolongs their useful effect into the present moment.”(Bérgson, 1910<sup>5</sup>; p 93; citado por Squire, 2004).

Em geral os pacientes amnésicos apresentam desempenho normal nos testes de condicionamento clássico (Weiskrantz & Warrington, 1979; Clark & Squire, 1998), testes que avaliam a memória de procedimento (Squire et al., 1984; Musen & Squire, 1991; Cohen & Squire, 1980; Knowlton et al., 1992), beneficiam-se do efeito de pré-ativação (Warrington & Weiskrantz, 1968; Tulving & Schacter, 1990) e desempenham bem tarefas que avaliam a memória de curto prazo (Baddeley & Warrington, 1970; Cave & Squire, 1992). Com exceção das tarefas que avaliam a memória de curto prazo, todos os testes anteriormente citados são utilizados como medida de memória implícita.

O substrato neural da memória explícita foi melhor estudado e caracterizado nos últimos anos, tendo como uma das estruturas principais o hipocampo e suas conexões diretas e indiretas. Já o substrato neural da memória implícita não foi tão amplamente estudado. Esse tipo de memória compreende uma vasta e heterogênea categoria que inclui: habilidades e hábitos percepto-motores e cognitivos, o condicionamento simples, o fenômeno de pré-ativação, entre outras habilidades (para revisão ver Squire, 1992). Nos últimos anos, diferentes sistemas cerebrais foram envolvidos com esse tipo de aprendizagem, sendo que dissociação de desempenho foi observada em pacientes que sofreram lesões cerebrais, os quais apresentaram, por exemplo, prejuízo em um tipo de tarefa que avalia a memória implícita e desempenho normal em tarefas que avaliam a memória explícita. Dentre essas regiões encefálicas estão o estriado, o cerebelo, a amígdala e o neocórtex (para revisões ver Squire, 1992; Squire et al., 1993).

O estriado pertence a um conjunto de estruturas subcorticais denominadas de núcleos da base, constituídas de distintas regiões interconectadas no prosencéfalo, mesencéfalo e diencefalo. É bem aceito que os núcleos da base participam do controle do movimento, pelo fato de que a maioria das projeções destas estruturas se direcionam a áreas motoras e, também pelo fato de que a lesão destas estruturas

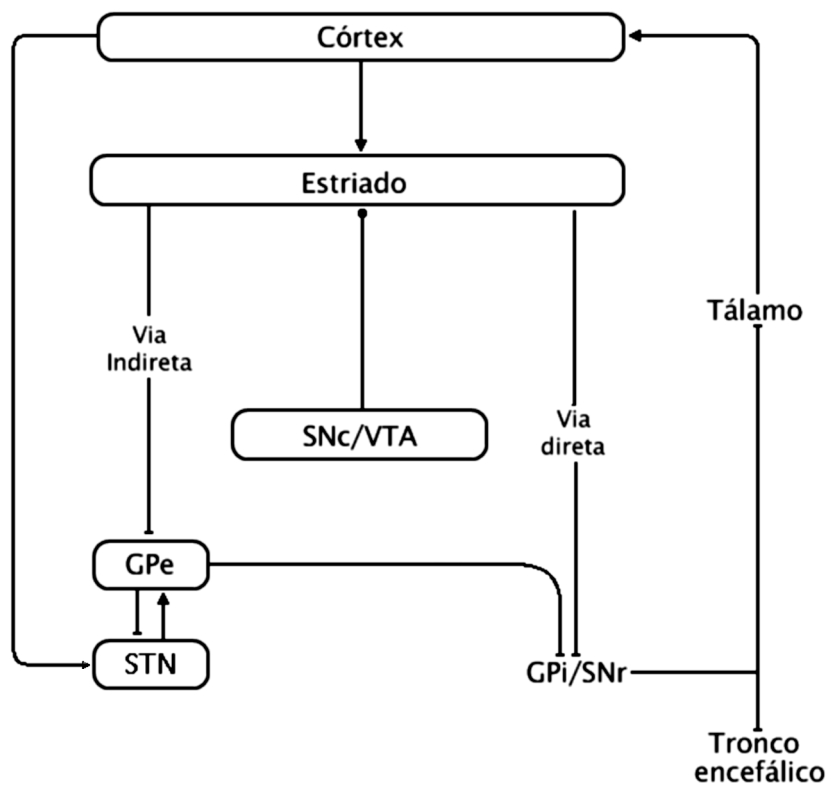
---

<sup>5</sup> Bergson HL. Matter and Memory (authorized translation by Nancy M. Paul and W. Scott Palmer). London: Allen; 1910, p 93. apud Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem.* 2004;82(3):171-7.

provoca anormalidade de movimentos (Graybiel et al., 1994; Knowlton, 2002). Fazem parte dos núcleos da base: o caudado e o putâmen (este conjunto forma o estriado dorsal), o núcleo accumbens (cerne e concha) e o tubérculo olfatório (este conjunto também é conhecido como estriado ventral), o globo pálido (externo e interno, e ventral), a substância negra (compacta e reticulata) e o núcleo subtalâmico (para revisão ver, Parent & Hazrati, 1995). Este conjunto bastante heterogêneo de estruturas encefálicas apresenta uma unidade anátomo-funcional bem descrita. A maioria das aferências aos núcleos da base se origina no córtex cerebral e nos núcleos intralaminares do tálamo (Parent, 1990). Essas projeções são topograficamente organizadas e provêm de praticamente todo o manto cortical, atingindo os núcleos da base na região do estriado dorsal e ventral - via de entrada dos núcleos da base (McGeorge & Faull, 1989; Parent & Hazrati, 1995). O estriado, por sua vez, projeta-se para o globo pálido interno e substância negra reticulata - via de saída dos núcleos da base - de onde partem projeções para núcleos talâmicos e para o tronco encefálico (Groenewegen et al., 1990; Alexander et al., 1986). Com relação às projeções que se direcionam para núcleos talâmicos e posteriormente se dirigem para o córtex cerebral, foi proposto um modelo de alças paralelas córtico-núcleos da base-tálamo-corticais (Alexander et al., 1986), existindo contradição na literatura da área com respeito a esses circuitos serem convergentes ou divergentes (Parent & Hazrati, 1995). Um recente trabalho verificou que as projeções córtico-estriatais podem tanto partir de diferentes regiões corticais e se direcionar para uma mesma região estriatal, quanto partir de uma mesma região cortical e se direcionar para diferentes regiões do estriado. Essas características atribuem um possível papel integrativo ao estriado, permitindo ações em conjunto com o córtex cerebral em muitos aspectos (Haber et al., 2006). Além das projeções ascendentes para os núcleos talâmicos, os núcleos da base aferentam o tronco encefálico (Beckstead et al., 1979; Beitz, 1982; Kirouac et al., 2004; Cebrian et al., 2005; Spann & Grofová, 1991; Rodriguez et al., 2001).

Neurônios da via de entrada (estriado) sofrem uma importante modulação dopaminérgica, proveniente da substância negra compacta e área tegmental ventral (Graybiel, 1990). Além disso, de uma forma diferente do córtex cerebral, o qual tem neurônios de projeção excitatórios glutamatérgicos, os núcleos da base contêm neurônios de projeção inibitórios GABAérgicos (neurônios espinhosos de tamanho médio) que co-expressam vários peptídeos neuroativos, como substância P, encefalina, dinorfina (para revisões ver Graybiel, 1990; Parent & Hazrati, 1995). O

estriado também possui uma variedade de interneurônios que compartilham a característica de ausência de espinhas em seus dendritos. Dentre eles estão interneurônios colinérgicos, que se caracterizam por grande corpo celular e extensa arborização dendrítica (Parent & Hazratti, 1995). Alguns trabalhos sugerem que a interação entre o sistema dopaminérgico e colinérgico que acontece no estriado regula de forma importante a função estriatal (Pisani et al., 2000; Centonze et al., 2003; DeBouer & Abercrombie, 1996; Kudernatsch & Sutor, 1994). Essa complexa neurotransmissão e hodologia proporcionam aos núcleos da base a capacidade de atuar das mais diferentes formas sobre as vias tálamo-corticais e sobre o tronco encefálico. Um esquema resumindo as principais conexões dos núcleos da base pode ser visualizado na Figura 1.



**Figura 1 – Esquema representativo das principais conexões dos núcleos da base.**

(adaptado de Yin & Knowlton, 2006). GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; SNC: substância negra compacta; SNr: substância negra reticulata; STN: núcleo subtalâmico; VTA: área tegmental ventral.

Projeções glutamatergicas → ; projeções dopaminérgicas ●→ ; projeções GABAérgicas —T

Essa atuação, classicamente descrita como motora, também foi sugerida nos aspectos cognitivos e emocionais do comportamento. Em 1984, Mishkin e Petri sugeriram o envolvimento do estriado no estabelecimento do “hábito” em humanos (equivalente ao que alguns autores chamavam de memória de procedimento).

De fato, alguns estudos avaliaram a aprendizagem e a memória de pacientes com alguma disfunção nos núcleos da base (Martone et al., 1984; Saint-Cyr et al., 1988; Knowlton et al., 1996; Butters et al., 1985; Lewis et al., 2003). Martone et al. (1984), por exemplo, compararam o desempenho de pacientes portadores do mal de Huntington e da síndrome de Korsakoff com indivíduos saudáveis. Os resultados mostraram uma dupla dissociação no desempenho: os pacientes com Korsakoff tiveram um desempenho pobre na tarefa de reconhecimento de palavras (teste neuropsicológico utilizado para avaliar a memória explícita), mas aprenderam tão eficientemente quanto indivíduos saudáveis a tarefa de leitura de palavras invertidas (uma tarefa de memória implícita). Pacientes portadores do mal de Huntington tiveram desempenho inferior aos indivíduos saudáveis na tarefa de leitura de palavras invertidas, enquanto que na tarefa de reconhecimento seu desempenho foi normal. O mal de Huntington é uma doença genética na qual é observada uma atrofia dos núcleos da base (Aylward et al., 2004). Já pacientes com a síndrome de Korsakoff apresentam degeneração de núcleos talâmicos e dos corpos mamilares (Gold & Squire, 2006). Sant-Cyr et al., em 1988, encontraram em pacientes com Parkinson prejuízo seletivo em uma tarefa de memória implícita (Torre de Hanoi simplificada), enquanto que o desempenho em testes que avaliam a memória explícita ou declarativa permanecia intacto. Pacientes com doença de Parkinson apresentam degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra compacta que se projetam para a região do estriado dorsal e, portanto, uma degeneração da via dopaminérgica nigro-estriatal (Thomas & Beal, 2007).

Os resultados dos estudos em pacientes que apresentam lesões dos núcleos da base sugerem o envolvimento destas estruturas cerebrais no processamento da memória implícita. Esses estudos, em conjunto com os resultados observados em pacientes com lesão de lobo temporal medial e estruturas diencefálicas, sugerem a existência de sistemas cerebrais múltiplos de memória especializados quanto ao tipo de memória que medeiam (para revisões ver Milner et al., 1998; Squire, 2004).

De forma paralela e convergente, os estudos experimentais em animais também sugerem a existência de sistemas múltiplos especializados de aprendizagem e memória em primatas não-humanos e outros mamíferos, como por exemplo em

roedores (Sherry & Schacter, 1987; White & McDonald, 2002). E da mesma forma que nos estudos em humanos, em animais de laboratório a lesão de estruturas cerebrais está relacionada a prejuízos de desempenho em algumas tarefas utilizadas para avaliar aprendizagem e memória, enquanto outras estão preservadas.

Logo após o estudo pioneiro de Scoville & Milner, em 1957, vários pesquisadores tentaram estabelecer modelos animais em macacos e roedores que mimetizassem o prejuízo cognitivo observado nos pacientes amnésicos. Mishkin, em 1978, descreveu o prejuízo observado em macacos após lesão bilateral de lobo temporal medial na tarefa de “delayed nonmatching to sample”. Uma série de estudos posteriores caracterizou de forma precisa as regiões do lobo temporal medial que estavam envolvidas no desempenho desta tarefa (Zola-Morgan & Squire, 1985; 1986) e de outras tarefas de aprendizagem e memória relacionadas à função hipocampal (para revisão ver, Eichenbaum, 1997). Além disso, vários estudos e teorias surgiram no final da década de 70 e durante a década 80 sobre a função do hipocampo na aprendizagem e memória de ratos (OKeefe & Nadel, 1978; 1979; Olton et al., 1979; Rawlins, 1985). Da mesma forma que em seres humanos, os estudos em animais de laboratório também verificaram que a lesão de estruturas hipocampais e áreas relacionadas não aboliam o desempenho de tarefas de aprendizagem e memória de uma forma generalizada, sendo que algumas tarefas estavam preservadas após esta manipulação (Zola-Morgan & Squire, 1984; Morris et al., 1982; OKeefe & Nadel, 1979). Por exemplo, a lesão de hipocampo afetou a aquisição da tarefa espacial no labirinto aquático de Morris, na qual o animal aprende a localizar uma plataforma submersa em uma piscina circular. Nesta versão da tarefa a plataforma ocupa um lugar fixo em relação aos estímulos do ambiente no qual se encontra o aparelho e, para localizar a plataforma, os animais orientam-se pelos estímulos espaciais existentes na sala. A aquisição da versão de pista da tarefa no mesmo labirinto, na qual a plataforma é visível ou sinalizada por uma pista, porém sua localização varia em cada sessão, não foi afetada pela lesão de hipocampo (Morris et al., 1982). Nesta versão o animal não precisa utilizar as dicas espaciais do ambiente, apenas deve reconhecer a plataforma ou a pista associada à mesma e nadar até ela. Estes resultados estão de acordo com a teoria de OKeefe e Nadel de 1978, na qual é atribuído um papel para o hipocampo na formação de mapas cognitivos e na aprendizagem espacial ou contextual.

Assim como em seres humanos, em animais de laboratório também foi atribuído um papel para o estriado em tarefas de aprendizagem e memória (Potegal, 1969; 1972;

Cook & Kesner, 1988; White, 1989). Potegal, em 1969, verificou o desempenho de ratos com lesão de estriado em uma tarefa de aprendizagem no labirinto radial de 12 braços. A tarefa foi planejada de tal forma que, para localizar um alimento no labirinto, o animal tinha que se orientar pelos movimentos do próprio corpo (como, por exemplo, promover uma rotação de 30 graus à direita ou à esquerda). Os animais com lesão de estriado apresentaram prejuízo na aquisição desta tarefa. De acordo com Potegal (1972), o estriado, além do papel classicamente motor, seria responsável pelo uso de uma estratégia egocêntrica<sup>6</sup> para o animal se localizar no labirinto. Este tipo de estratégia não é afetada pela lesão de hipocampo (Oliveira, 1994; Oliveira et al., 1997). Cook e Kesner, em 1988, verificaram o efeito da lesão de estriado no desempenho de ratos em uma tarefa que avalia estratégia egocêntrica em um teste de labirinto e, mais uma vez, a lesão de estriado prejudicou o desempenho.

Packard et al. (1989), utilizando o paradigma de “win-shift” e “win-stay” no labirinto radial proposto por Olton e Samuelson, em 1976<sup>7</sup> (citado por Packard et al., 1989), verificaram os efeitos de lesões cerebrais na questão de sistemas múltiplos de memória. Lesão de fímbria-fórnix (uma grande via aferente e eferente do hipocampo), mas não lesão de estriado, prejudicou a aquisição de uma tarefa espacial no labirinto radial, a qual requer que o animal lembre quais foram os braços do labirinto previamente visitados naquela tentativa (“win-shift”). Por outro lado, lesão de estriado e não de fímbria-fórnix prejudicou a aquisição da resposta de discriminação visual (“win-stay”) que, por sua vez, não requer que o animal lembre qual braço foi previamente visitado, pois o braço que contém a recompensa é sempre sinalizado por uma luz acesa em sua entrada (Packard et al., 1989). Em um estudo posterior, esses pesquisadores também mostraram que injeções pós-treino de agonista dopaminérgico intra-estriado ou intra-hipocampo melhoraram o desempenho seletivamente nas tarefas “win-stay” e “win-shift”, respectivamente, de uma forma tempo dependente (Packard & White, 1991). Outros estudos em animais com lesão de estriado e fórnix também

---

<sup>6</sup> De acordo com Potegal (1972), no sistema de orientação egocêntrico, a posição de qualquer ponto no espaço é definido pela distância e direção a partir do observador através dos movimentos corporais necessários para alcançar aquele ponto.

<sup>7</sup> Olton DS, Samuelson RJ. Remembrance of places passed: spatial memory in rats. *J Exp Psychol. (Animal Behav Proc.)* 2: 97-115. apud Packard MG, Hirsh R, White NM. Differential effects of fornix and caudate nucleus on two radial maze tasks: Evidence for multiple memory systems. *J Neurosci.* 1989;9(5):1465-72.

indicaram esta dupla dissociação: a lesão de fórnix prejudicou a aquisição da versão espacial do labirinto aquático de Morris e, em contraste, a lesão de estriado prejudicou a aquisição da versão de pista neste labirinto (não afetada pela lesão de fórnix), mas não teve efeito na aquisição da versão espacial (Packard & McGaugh, 1992; Devan, et al., 1996).

Esses achados levantaram a hipótese da existência de sistemas cerebrais múltiplos de memória em ratos (para revisão ver, White & McDonald, 2002). É importante ressaltar que nem todas as tarefas de memória preservadas após a lesão de hipocampo são afetadas por manipulações de estriado (Pisa & Cyr, 1990; Oliveira et al., 1997) e, também, que algumas tarefas de memória podem ser prejudicadas por manipulações dessas duas estruturas, como por exemplo, a esquivas inibitória (Glick & Greenstein, 1973; Glick et al., 1974). Em particular, Oliveira et al., em 1997, mostraram que animais com lesão de hipocampo foram incapazes de utilizar uma estratégia espacial (aprendizagem de lugar) na tarefa de discriminação no labirinto em T, porém desempenhavam bem a tarefa utilizando uma estratégia egocêntrica. Por outro lado, a lesão de estriado não apresentou efeito nessa tarefa (Oliveira, 1994; Oliveira et al., 1997). Resultado diferente foi obtido por Packard e McGaugh, em 1996, no qual foi verificado que a lesão de estriado bloqueou a expressão da aprendizagem de resposta (estratégia egocêntrica) na mesma tarefa. Uma importante diferença entre esses dois trabalhos consiste no fato de que, no trabalho de Packard e McGaugh (1996) foi utilizado um protocolo comportamental de treinamento extenso (“overtraining”), sendo que os animais controles apresentaram uma mudança na utilização da estratégia de lugar para a estratégia de resposta no decorrer do treinamento. Neste momento a inativação do estriado levou os animais a utilizarem a estratégia de lugar (Packard & McGaugh, 1996). No trabalho de Oliveira et al. (1997) não foi utilizado o protocolo de “overtraining”; sendo assim, a ausência de prejuízo após a lesão de estriado na versão egocêntrica da tarefa poderia estar relacionada a um papel já descrito para esta estrutura na formação gradual e lenta do hábito, função esta revelada pelo treino extenso utilizado por Packard & McGaugh, 1996 (para revisão ver Yin & Knowlton, 2006).

De acordo com Mishikin e Petri (1984), os hábitos são associações que diferem das memórias associativas (este termo corresponde a memória explícita ou declarativa), pelo fato de serem ligações não-cognitivas de estímulos e respostas. As teorias existentes sobre o tipo de aprendizagem estímulo-resposta (S-R, do inglês



“stimulus-response learning”) foram baseadas nos trabalhos pioneiros de Thordinke e Hull (citado por Yin & Knowlton, 2006; Mishikin & Petri, 1984; White & McDonald, 2002). Neste tipo de tarefa, acredita-se que se uma resposta comportamental (R) provocada por um determinado estímulo (S) for reforçada (por exemplo, com uma recompensa), esse reforço aumenta a probabilidade desta resposta ocorrer. De acordo com White e McDonald (2002), acredita-se que esse tipo de aprendizagem proceda de uma forma automatizada e inconsciente, e alguns autores consideram esse processo envolvido na formação de hábitos (Mishikin & Petri, 1984; Yin & Knowlton, 2006). Muitos trabalhos encontrados na literatura estão de acordo com a idéia de que o estriado estaria envolvido na formação do hábito e na aprendizagem do tipo S-R (Graybiel, 1998; White & McDonald, 2002; Yin & Knowlton, 2006). De fato, os trabalhos citados anteriormente verificaram prejuízo de desempenho de animais após a lesão de estriado dorsal em tarefas de aprendizagem e memória do tipo S-R (Packard & McGaugh, 1992; Packard et al., 1989). Por outro lado, existem indícios na literatura de que o estriado dorsal também pode estar envolvido na associação entre um estímulo e uma recompensa ou um reforço, ou mesmo nas respostas comportamentais provocadas por associação entre dois estímulos (S-S, do inglês “simulus-stimulus”), como no caso do condicionamento clássico (Aosaki et al., 1994a; Powell et al., 1978; Ferreira et al., 2003, Han et al., 1997). Esses achados podem sugerir que o estriado está envolvido em outros tipos de aprendizagem e memória, além do envolvimento bem descrito em processos de aprendizagem do tipo S-R.

## **Memória emocional**

A dissociação observada após a lesão de estriado e hipocampo em tarefas de aprendizagem e memória também foi verificada em estudos que avaliam a memória emocional através do condicionamento clássico. O condicionamento clássico de medo é um dos paradigmas mais utilizados na literatura para se avaliar a memória emocional, e muitos progressos foram realizados no sentido de desvendar a maquinaria cerebral que sustenta essa forma de memória (para revisões ver, Fendt & Fanselow, 1999; LeDoux, 2000; Kim & Jung, 2006). Esse modelo foi descrito no início do século XX, por Ivan Pavlov, e foi denominado de condicionamento pavloviano ou condicionamento clássico. Neste paradigma experimental, um estímulo neutro pareado temporalmente com um evento biologicamente significativo adquire posteriormente a propriedade de

eliciar respostas comportamentais e fisiológicas aprendidas. No condicionamento clássico de medo, um estímulo condicionado, que pode ser um som ou uma luz, é pareado com um estímulo incondicionado aversivo, como um choque. O estímulo condicionado neutro adquire propriedades aversivas e, mesmo quando apresentado sozinho, evoca reações emocionais de medo: alterações autonômicas, como aumento da frequência cardíaca e pressão arterial (Cohen & Randall, 1984; LeDoux, 1993; Iwata & Ledoux, 1988), alterações neuroendócrinas, como liberação de alguns hormônios do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal – hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona (Van de Kar et al., 1991; Guijarro et al., 2007; Sullivan et al., 2004) – e respostas comportamentais, como o sobressalto e a resposta de congelamento ou “freezing” (Blanchard & Blanchard, 1969; 1972; Fanselow & Bolles, 1979; Davis, 1992; LeDoux, 1993; Fendt & Fanselow, 1999). Quando se utiliza um estímulo sonoro, esta tarefa de memória é denominada de condicionamento de medo ao som. No entanto, essas respostas condicionadas de medo também podem ser observadas quando os animais retornam ao ambiente onde receberam o estímulo aversivo, mesmo na ausência do estímulo condicionado discreto<sup>8</sup>. Neste caso, a tarefa é denominada de condicionamento de medo ao contexto. A lesão de hipocampo, antes do treino ou até 24 horas depois, prejudica o condicionamento clássico de medo ao contexto, sem interferir no condicionamento clássico de medo ao som (Kim e Fanselow, 1992; Phillips & LeDoux, 1992; Anagnostaras et al., 1999). A lesão de estriado dorsal, ao contrário, prejudica a tarefa de condicionamento de medo ao som, sem interferir com o condicionamento de medo ao contexto (Ferreira et al., 2003). Esse padrão de resultados está de acordo com a teoria da existência de sistemas múltiplos de memória em roedores, onde tarefas que apresentam um componente espacial, como por exemplo o condicionamento de medo ao contexto, são afetadas pela lesão de hipocampo. Já algumas tarefas hipocampo-independentes, como o condicionamento de medo ao som, são afetadas pela lesão de estriado dorsal. No entanto, esses dois tipos de condicionamento são afetados pela lesão de amígdala (Phillips & Ledoux, 1992; Maren et al., 1996a). Tais resultados sugerem que a amígdala poderia estar envolvida na formação de associações entre o estímulo incondicionado aversivo e

---

<sup>8</sup> Nesta tese, considerou-se estímulo discreto aquele que é composto de apenas uma modalidade sensorial, como por exemplo o estímulo sonoro.

algum dos vários tipos de estímulos condicionados, variando do mais simples (como o som) ao mais complexo (como o contexto).

O envolvimento da amígdala nos processos emocionais teve início na primeira metade do século passado, com o surgimento de teorias sobre o papel do sistema límbico nas emoções. O termo límbico foi usado pioneiramente pelo anatomista Paul Broca, em 1878<sup>9</sup>, e definia uma região cerebral circular no limite inferior dos hemisférios (borda, do latim *limbus*; citado por Finger, 1994). Posteriormente, James Papez, em 1937 postulou que o hipocampo, o giro do cíngulo, o hipotálamo e os núcleos anteriores do tálamo e as conexões entre essas estruturas (circuito de Papez) constituíam um mecanismo harmonioso, o qual podia elaborar as funções centrais da emoção, bem como participar da expressão emocional. Também nesse ano, dois pesquisadores da Universidade de Chicago, Heinrich Klüver e Paul Bucy, publicaram um trabalho no qual descreveram os efeitos de lobotomia bilateral temporal no macaco rhesus (Klüver & Bucy, 1937). O conjunto de sintomas ficou conhecido como a síndrome de Klüver & Bucy e se caracterizava por distúrbios emocionais, como ausência de medo e fúria, hiperoralidade e hipersexualidade. Os autores descreveram que: “...The bilateral temporal monkeys shows a strong tendency to approach animate and inanimate objects without hesitation, This tendency appears even in the presence of objects which previously called forth avoidance reactions, extreme excitement and others forms of emotional response. The animal tends to contact every object in sight and to examine it by mouth rather than by hand. ...” (Klüver & Bucy, 1937, p984).

Em conjunto, esses trabalhos influenciaram Paul McLean, na metade do século XX (1952), que retomou a nomenclatura utilizada por Broca e criou o termo “sistema límbico”, adicionando estruturas como a amígdala, a região septal e o córtex pré-frontal àquelas já descritas no circuito de Papez. Nesta época, foi atribuído ao hipocampo e às estruturas do lobo temporal medial um papel central no sistema límbico e nas emoções (LeDoux, 2000; Dalgleish, 2004). Alguns autores sugerem o abandono da nomenclatura “sistema límbico”, pela ausência de características funcionais e

---

<sup>9</sup> Broca P. Anatomie comparée des circonvolutions cérébrales. Le grand lobe limbique et la scissure limbique dans la série des mamifères. Revue d'Anthropologie, 1878;2(1):385-498. apud Finger S. Origins of neuroscience: a history of explorations into brain function. Oxford: Oxford University Press; 1994.

anatômicas comuns entre essas estruturas (para revisão ver LeDoux, 2000; mas ver também Heimer & Van Hoesen, 2006).

Esse breve histórico<sup>10</sup> sobre os estudos da neurobiologia da emoção chama a atenção para o fato de que, apenas na metade do século passado, a amígdala foi relacionada a funções emocionais. Atualmente essa estrutura cerebral é considerada como uma das principais mediadoras dos processos emocionais (LeDoux, 2000; Dalgleish, 2004).

O termo amígdala tem origem na palavra grega para amêndoa e compreende uma região cerebral, originalmente identificada por Karl Friedrich Burdach em 1819, que identificou uma massa de substância cinzenta localizada profundamente no lobo temporal medial do encéfalo humano (Swanson, 2003; Heimer & Van Hoesen, 2006). Nos últimos 50 anos, muitos estudos morfológicos da amígdala permitiram concluir que esta região apresenta uma vasta e heterogênea coleção de núcleos e sub-regiões que podem ser distinguidos em bases citoarquitetônicas, citoquímicas e hodológicas (Pitkänen et al., 1997). Existem muitas classificações e terminologias adotadas para os núcleos da amígdala. Por exemplo, de acordo com Price (2003), levando-se em consideração os padrões de conexões das regiões da amígdala, esta estrutura poderia ser dividida em: 1) sensorial; 2) hipotalâmico e tronco encefálico; e 3) prosencefálico. Importante notar que nos três sistemas o padrão de conexões é relativamente conservado entre os mamíferos (gatos, macacos e roedores). Já Swanson e Petrovich (1998) propõem uma classificação anátomo-funcional em quatro sistemas: olfativo acessório, olfativo principal, autonômico e fronto-temporal; sendo que cada um deles exerce funções específicas e são derivados de diferentes regiões cerebrais (córtex, claustrum e estriado). Alheid & Heimer, (1988), por outro lado, introduziram o conceito de amígdala e amígdala expandida, que seria composta por um cinturão ou corredor amigdalar ventral, inicialmente descrito por Johnston em 1923 (Alheid et al., 1995). Existe muito debate na literatura da área sobre como a amígdala deveria ser dividida e nomeada com base em vários critérios (LeDoux, 2007) .

No mesmo sentido, também é difícil construir um modelo funcional da amígdala e suas regiões, em parte pela ampla variedade de processos atribuídos a esta região. A memória, a atenção, o medo, a ansiedade, as reações de defesa, os sistemas de recompensa, de reforço e de motivação, os comportamentos agressivo, maternal,

---

<sup>10</sup> Para um histórico mais detalhado sobre sistema límbico e emoções, ver Dalgleish, 2004.

sexual e ingestivo e o controle neuroendócrino estão de alguma forma direta ou indiretamente relacionados ao funcionamento da amígdala (para revisões, ver Holland & Gallagher, 1999; Maren, 2001; Shuhama et al., 2007; Everitt, 2003; Robbins & Everitt, 2002; Hull & Dominguez, 2007; King, 2006;), o que torna difícil um modelo integrado funcional e anatômico de uma região tão heterogênea. No presente trabalho será utilizada a nomenclatura anatômica da amígdala que foi sugerida por Amaral et al., em 1992, para macacos e adaptada para ratos por Pitkänen et al., em 1997, na qual os núcleos principais da amígdala são divididos em: lateral, basal, acessório basal, medial, central e corticais (anteriores e posteriores). Esta nomenclatura foi escolhida por ser a mais utilizada pelos grupos que trabalham com modelos comportamentais semelhantes ao do presente estudo, tornando mais fácil a comparação entre os resultados. Considerando-se as áreas da amígdala mais importantes para o medo condicionado tem-se os seguintes núcleos: 1) lateral (LA); 2) basal (B) ou basolateral (BLA); 3) basal acessório (AB) ou basomedial (BMA) e 4) central (CeA). Outro termo bastante utilizado na literatura da área é complexo basolateral da amígdala (cBLA) que inclui os núcleos LA, BLA e BMA. Além disso, existem subdivisões anatômicas destes núcleos que também são relevantes na circuitaria do medo condicionado (LeDoux, 2007).

Evidências experimentais do envolvimento da amígdala com a emoção são provenientes do trabalho de Weiskrantz (1956), que mostrou que a região do lobo temporal medial responsável por gerar a síndrome descrita por Klüver e Bucy (1937) em macacos era a amígdala. De 1956 a 2007 surgiram muitos trabalhos na literatura científica a respeito do papel desta estrutura e seus núcleos. Mas, sem dúvida, uma das funções mais estudadas nas neurociências atuais atribuída à amígdala é o envolvimento desta estrutura no medo condicionado e na memória emocional.

Existem alguns motivos pelos quais o medo e a memória emocional atraem a atenção de pesquisadores. Em primeiro lugar, o medo pode ser considerado um mecanismo de defesa evolucionário que permite aos animais responder adaptativamente a situações novas ou mudanças ambientais (para revisão ver Kim & Jung, 2006). Em segundo lugar, as experiências emocionais ocupam locais centrais em nossas memórias, sendo rapidamente adquiridas e por muito tempo recordadas. Além disso, as investigações das bases neurais do medo e da ansiedade podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para tratar uma série de patologias modernas, tais quais desordens de ansiedade, fobias, síndrome do estresse pós-traumático e outras

(para revisão ver Fendt & Fanselow, 1999). Vale ressaltar que algumas respostas de medo em animais de laboratório apresentam correspondência com as características utilizadas para diagnósticos de ansiedade de acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais, DSM IV (Davis, 1992). Assim sendo, muitos estudos foram conduzidos nos últimos anos com o objetivo de elucidar os mecanismos cerebrais pelos quais as emoções são aprendidas, armazenadas e evocadas.

Os estudos das bases neurais do medo condicionado dão suporte a idéia de que a amígdala está criticamente envolvida com essa forma de aprendizagem (para revisões ver Kim & Jung, 2006; Fendt & Fanselow, 1999; Davis, 1992, LeDoux, 1993; 1995). Em 1972, Blanchard e Blanchard mostraram que a lesão de amígdala prejudicou as respostas de congelamento incondicionado ao gato e condicionado ao ambiente. Fuster & Uyeda (1971) foram os primeiros a mostrar que a amígdala continha células que respondiam a um som previamente pareado com um choque. Desde então surgiu na literatura uma imensa variedade de trabalhos a respeito do envolvimento da amígdala na memória emocional. Estudos de lesão (Phillips & LeDoux, 1992; Nader et al., 2001), manipulação farmacológica (Davis & Myers, 2002; Wilensky et al., 2006; 1999), registros eletrofisiológicos (Bauer et al., 2002; Quirk et al., 1995; Repa et al., 2001; Maren, 2000) e estudos bioquímicos, genéticos e moleculares (Scicli et al., 2004; Han et al., 2007; Impey et al., 1998) sugerem a participação desta região e de núcleos específicos no condicionamento clássico aversivo (para revisão ver Kim & Jung, 2006).

As vias neurais do condicionamento clássico de medo ao som e à luz em ratos foram exaustivamente estudadas pelos laboratórios dos pesquisadores Joseph LeDoux (utilizando o congelamento como resposta de medo) e Michael Davis (utilizando a potenciação do sobressalto como resposta de medo). Considerando as vias auditivas que trazem informações a respeito do estímulo sonoro, foi verificado que a lesão do corpo geniculado medial (CGM) bem como do colículo inferior (uma das principais regiões que aferenta o CGM) prejudicam as respostas condicionadas comportamentais e autonômicas de medo condicionado ao som (LeDoux et al., 1983; Campeau & Davis, 1995). É interessante notar que a lesão do córtex auditivo parece não prejudicar essas mesmas respostas (LeDoux et al., 1983). Esses dados estariam de acordo com outros trabalhos na literatura, que mostraram que lesões corticais, ou até mesmo decorticação, não prejudicam a resposta condicionada aversiva de piscar em coelhos (Thompson & Krupa, 1994). Posteriormente, Romanski e LeDoux, em 1992, mostraram que tanto a via direta tálamo-amígdala quanto a via indireta tálamo-córtex-amígdala

são suficientes para a aquisição do condicionamento de medo ao som e, provavelmente no cérebro intacto, desempenham papéis diferentes neste processo, de acordo com suas características hodológicas. Por exemplo, neurônios da amígdala exibem eventos de plasticidade induzidos pelo treino do animal antes dos neurônios do córtex auditivo, o que pode indicar que esta via é ativada primeiramente durante o medo condicionado (Quirk et al., 1995; 1997). Além disso, a via CGM-amígdala mostrou ser seletiva em prejudicar o condicionamento aversivo ao estímulo sonoro, sendo que o condicionamento clássico de medo à luz não foi afetado por lesão de CGM (Campeau & Davis, 1995).

A entrada de estímulos de uma única modalidade sensorial, incluindo os auditivos, na amígdala ocorre principalmente no LA (LeDoux et al., 1990a; Amaral et al., 1992) e a lesão do LA interfere no condicionamento de medo ao som (LeDoux et al., 1990b; Campeau & Davis, 1995; Goosens & Maren, 2001). Estudos de registro unitário mostraram que as respostas eliciadas pelo estímulo condicionado nos neurônios do LA são modificadas após o pareamento com o estímulo incondicionado (Quirk et al., 1995; 1997). A potenciação de longa duração (LTP, do inglês “long term potentiation”), sugerida por muitos como um mecanismo mnemônico sináptico, foi verificada no LA tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Rogan et al., 1997; Clugnet & LeDoux, 1990). Ainda, um estudo mostrou que, em um paradigma modificado de medo condicionado em gatos, neurônios do LA diminuem a taxa de disparo frente a um estímulo que foi explicitamente não pareado ao estímulo incondicionado durante o treino do animal nesta tarefa (Collins & Paré, 2000). Outros núcleos da amígdala também apresentam plasticidade sináptica induzida pelo estímulo condicionado, como por exemplo, o BLA (Maren & Fanselow, 1995) e o CeA (Pascoe & Kapp, 1985). No primeiro exemplo, foram verificados fenômenos de plasticidade sináptica na via subiculum-BLA (Maren & Fanselow, 1995), e estas conexões parecem ser a via pela qual os estímulos ditos contextuais analisados pela formação hipocampal atingem o BLA (para revisão ver Maren, 2001). Esses dados estariam de acordo com o fato de que a lesão de hipocampo prejudica o condicionamento de medo ao contexto (Phillips & LeDoux, 1992; 1994; Kim & Fanselow, 1992; Maren & Fanselow, 1997).

De acordo com o modelo atual a convergência dos estímulos condicionado e incondicionado no complexo basolateral da amígdala aumentaria a eficácia sináptica dos neurônios desta região (Paré et al., 2004; LeDoux, 2000; Walker & Davis, 2000). Assim, uma subsequente apresentação do estímulo condicionado sozinho evocaria

respostas eletrofisiológicas maiores (no caso do estímulo condicionado auditivo) nos neurônios do LA (Collins & Paré, 2000; Quirk et al., 1995; Repa et al., 2001). Projeções diretas do LA para o BLA, e deste para ao CeA eliciariam as respostas condicionadas de medo via eferências do CeA a diferentes regiões do tronco encefálico (Davis 1992, Maren 2001; LeDoux, 2000). Recentemente alguns dados surgiram na literatura mostrando que o CeA por si só também pode ser a região de associação entre os estímulos (para revisão ver, Paré et al., 2004), pois, como citado anteriormente, essa região também apresenta eventos de plasticidade associados ao condicionamento (Pascoe & Kapp, 1985) e conexões diretas com os relês auditivos talâmicos (LeDoux et al., 1990a; Linke et al., 2000; Turner & Herkenham, 1991). No mesmo sentido, a administração de muscimol (agonista do receptor GABA A) no CeA - método conhecido como inativação temporária - prejudica a aquisição do condicionamento de medo (Wilensky et al., 2006).

Vários estudos examinaram a função do CeA na expressão do aprendizado dependente da amígdala. As respostas de congelamento, potenciação do sobressalto, aumento da frequência cardíaca e alterações neuroendócrinas são mediadas pelo CeA e parecem depender das distintas eferências do CeA ao tronco encefálico e às áreas hipotalâmicas (respectivamente, substância cinzenta periaquedutal (PAG), núcleo pontino caudal, hipotálamo lateral e núcleo paraventricular do hipotálamo (Kapp et al., 1979; Hitchcock & Davis, 1991; Kim et al., 1993; LeDoux et al., 1988; De Oca et al., 1998). A expressão emocional destas respostas condicionadas pode então ser mediada por conexões do cBLA ao CeA, o qual envia projeções a outras regiões cerebrais que seriam capazes de coordenar respostas comportamentais, endócrinas e autonômicas, formando uma resposta emocional integrada (Galagher & Chiba, 1996). LeDoux et al. (1988) mostraram que as respostas comportamentais e autonômicas condicionadas foram separadamente prejudicadas por lesões seletivas de algumas regiões inervadas pelo CeA. Por exemplo, a lesão do hipotálamo lateral prejudicou somente a resposta autonômica condicionada, já a lesão da PAG caudal prejudicou somente a resposta de congelamento ao som previamente pareado com o choque (LeDoux, et al., 1988).

Os resultados citados acima levaram à elaboração de um modelo de funcionamento serial da amígdala (LA-BLA-CeA) no medo condicionado a diferentes modalidades de estímulos condicionados (para revisões ver LeDoux, 1993; Pitkanen et al., 1997). Como os neurônios do LA não projetam diretamente para os neurônios da



via de saída da amígdala, que se encontram na porção medial do CeA (para revisão ver, Paré et al., 2004), o LA enviaria as informações sobre a associação entre os estímulos para o CeA através de um relê sináptico no núcleo BLA, de acordo com esse modelo serial. Contudo, alguns trabalhos da literatura não verificaram efeito de lesões do BLA no condicionamento aversivo discreto (Nader et al., 2001; Anglada-Figueroa & Quirk, 2005). Nader et al. (2001) verificou que apenas a lesão dos núcleos LA e CeA afetaram o desempenho da tarefa de condicionamento de medo ao som. Esses resultados sugerem que, pelo menos para a tarefa de condicionamento de medo ao som, exista outro sistema de funcionamento entre os núcleos da amígdala em contraposição ao sistema serial descrito (para revisão ver Everitt et al., 2003; Pare et al., 2004). De fato, alguns dados recentes encontrados na literatura estão de acordo com a idéia de que existem vias alternativas capazes de suportar o medo condicionado na ausência de estruturas amigdalares classicamente envolvidas nestes tipos de tarefa, como por exemplo o BLA (Ponnusamy et al., 2007). A existência de diferentes vias existentes na amígdala também foi observada em outras tarefas associativas pavlovianas como, por exemplo, o condicionamento clássico apetitivo (para revisão ver Everitt et al., 2003). Neste paradigma foi observado que a resposta de orientação condicionada a um estímulo pareado com comida parece depender do CeA, mas não do BLA (Gallagher et al., 1990).

A função da amígdala na memória emocional também não é limitada à aquisição e expressão da associação pavloviana. Existem muitas evidências na literatura atribuindo um papel ao BLA na modulação da consolidação de outros tipos de memória (para revisão ver McGaugh, 2004; McGaugh et al., 2002). De acordo com este modelo, a modulação da consolidação de memórias pelo BLA seria dependente de uma série de neurotransmissores e hormônios que agiriam neste núcleo, como por exemplo os hormônios do estresse (glicocorticóides) e os produtos dos sistemas noradrenérgico e colinérgico. Além disso, o BLA interagiria com outros sistemas cerebrais na consolidação dos diferentes tipos de memória (para revisão ver McGaugh, 2004). Por exemplo, Packard e Teather (1998), utilizando as versões espacial e de pista no labirinto aquático de Morris, verificaram que a administração intra-amígdala de anfetamina melhorou o desempenho dos animais nas duas versões da tarefa. Mas esse efeito foi revertido na versão espacial, pela administração de lidocaína (um fármaco que bloqueia canal de Na<sup>+</sup>) no hipocampo, mas não no estriado. Por outro lado, a administração de lidocaína no estriado bloqueou a melhora de desempenho na

versão de pista da tarefa, induzida pela administração de anfetamina na amígdala. Já a administração de lidocaína no hipocampo não apresentou efeito sobre a melhora de desempenho na versão de pista induzida pela anfetamina na amígdala. Esses achados confirmam a dupla dissociação entre as funções do hipocampo e estriado na memória, bem como sugerem que a amígdala exerce uma função modulatória em ambos os sistemas de memória: hipocampo-dependente e estriado-dependente.

O envolvimento da amígdala na consolidação da memória é particularmente bem descrito em tarefas de aprendizagem e memória emocional que apresentam componentes instrumentais, como por exemplo a esquiva inibitória. Esta tarefa consiste basicamente em uma sessão de treino, na qual o animal é punido com um choque nas patas após emitir um determinado comportamento (passar de um compartimento da caixa de esquiva para outro ou descer de uma plataforma), e em uma sessão de teste de retenção, na qual o tempo (latência) que o animal leva para emitir o mesmo comportamento é registrado e utilizado como uma medida de aprendizagem. Após o treino da tarefa de esquiva inibitória, a taxa de disparo dos neurônios do BLA permanece aumentada por 2 horas e a redução da atividade desta região neste período prejudica a memória do evento aversivo (Pelletier et al., 2004; Cahil & McGaugh, 1998; Izquierdo & Medina, 1993). No mesmo sentido, a administração de drogas que aumentam a atividade da BLA, quando injetadas até duas horas após o treino da esquiva, melhora o desempenho do animal no teste (Hatfield & McGaugh, 1999; Ferry & McGaugh, 1999). E assim como nos resultados observados em tarefas de labirinto, na consolidação da tarefa de esquiva inibitória parece existir uma interação entre a amígdala e o hipocampo. Alguns autores verificaram que a melhora de desempenho da tarefa de esquiva, induzida por administração de glicocorticóide sintético no hipocampo, foi bloqueada pela administração de antagonistas de  $\beta$ -adrenoceptores ou lesão na BLA (Roosendaal & McGaugh, 1997; Roosendaal et al., 1999). Em resumo, os resultados indicam existir uma modulação da amígdala na consolidação de tarefas hipocampo-dependentes. Por outro lado, o papel do cBLA na consolidação de memórias aversivas não foi verificado quando se utiliza o condicionamento clássico de medo. Infusão de muscimol no cBLA, imediatamente após o treino do animal nesta tarefa, não prejudicou o desempenho dos animais durante os testes de condicionamento de medo ao som e ao contexto, ao passo que esta mesma manipulação antes do treino prejudicou a tarefa (Wilensky et al., 1999; 2000). Um resultado semelhante foi obtido pela infusão de um antagonista do receptor

glutamatérgico do tipo NMDA (Maren et al., 1996b). Assim, parece que a função da amígdala na aquisição e expressão ou na consolidação da memória emocional depende de características associativas e instrumentais intrínsecas da tarefa comportamental utilizada (Vazdarjanova & McGaugh, 1998; 1999; Wilensky et al., 1999; 2000).

Independente da função que o cBLA exerça nas diferentes fases da memória emocional associativa ou instrumental, os estudos citados previamente sugerem a existência de uma interação da amígdala com outras estruturas cerebrais na mediação de tarefas mnemônicas. Por exemplo, tanto a amígdala quanto o hipocampo são importantes para a tarefa de condicionamento de medo ao contexto, pois as lesões destas estruturas prejudicam o desempenho dos animais (Kim & Fanselow, 1992; Phillips & LeDoux, 1992). Em um elegante estudo, foi verificado que a elevação dos níveis de RNAm da proteína c-fos e da proteína Arc – produtos de genes de expressão imediata - no hipocampo (induzidos pela associação de um contexto com o choque) foram bloqueados pela administração de muscimol no BLA . E ainda que esse aumento nos níveis de Arc e RNAm do c-fos induzidos no hipocampo pela simples exposição ao ambiente não foi bloqueado pela infusão de muscimol no BLA (Huff et al., 2006), sugerindo que a interação BLA-hipocampo é importante na associação do ambiente com o estímulo incondicionado. Alguns trabalhos também relataram que a LTP hipocampal parece sofrer modulação via ação dos hormônios do estresse regulada pelo BLA (Kim et al., 2001; Akirav & Richter-Levin, 2002).

Com relação ao condicionamento clássico de medo a um estímulo discreto, não existem trabalhos que relatam a interação da amígdala com outras regiões cerebrais, com exceção daquelas estruturas que sabidamente participam da resposta de medo condicionado e que recebem projeções do CeA (tronco encefálico e hipotálamo). Apesar do estriado não fazer parte da circuitaria clássica que medeia o medo condicionado (como a amígdala), existem evidências na literatura que indicam um possível envolvimento desta estrutura em tarefas pavlovianas. Em 1978, Powel et al., mostraram que a lesão desta estrutura prejudica a aquisição da resposta condicionada de piscar da membrana nictitante em coelhos. De fato, dados recentes do nosso laboratório (Ferreira et al., 2003) revelaram que o estriado está envolvido na mediação do condicionamento clássico de medo auditivo, mas não do condicionamento de medo contextual.

Conexão funcional entre a amígdala e o estriado foi sugerida por Cahill e McGaugh, em 1993, pois a administração intra-amígdala de NMDA – um aminoácido excitatório – induz expressão da proteína c-fos no estriado e no hipocampo. Esta conexão funcional pode ser embasada nas relações anatômicas diretas que existem entre o cBLA e o estriado, ou indiretas entre o CeA e a substância negra compacta e região retrorubral e destas para a região do estriado (Kelley et al., 1982; McDonald, 1991; Gonzales & Chesselet, 1990). Além disso, um recente estudo mostrou que as projeções diretas do BLA para a região do estriado ventral facilita a LTP córtico-estriatal via receptores NMDA (Popescu et al., 2007).

Existem alguns indícios de que a conexão entre a amígdala e o estriado possa ser importante na mediação de tarefas de aprendizagem e memória associativa pavloviana. Alguns autores já demonstraram que tanto o estriado quanto a amígdala estão envolvidos na resposta de orientação condicionada à pista pareada com comida. Lesão do núcleo central da amígdala afeta a aquisição da resposta de orientação condicionada a pistas de modalidade visuais ou aditivas, mas não afeta a orientação espontânea a pistas apresentadas como novo estímulo, anteriormente ao condicionamento (Gallagher et al., 1990). Em 1997, Han et al. usaram um modelo de lesão assimétrica (ou desconexão funcional) para examinar o papel da amígdala e do estriado dorsal na aprendizagem associativa apetitiva. Como as projeções da amígdala são predominantemente ipsilaterais (Pitkänen, 2000), este modelo permite estudar o papel de uma determinada circuitaria cerebral, em uma tarefa cognitiva em particular. Efetuando uma lesão unilateral da amígdala em um hemisfério cerebral e uma lesão unilateral do estriado dorsal no hemisfério contralateral, os autores verificaram que os animais lesados tiveram prejuízo em adquirir a resposta de orientação condicionada, mas não tiveram prejuízo na orientação espontânea e também em outras respostas aprendidas, como se aproximar da recompensa (comida) – estímulo incondicionado (Han et al., 1997), sugerindo a participação desta circuitaria neste tipo de aprendizagem associativa.

Muitos trabalhos utilizaram o modelo de desconexão funcional para avaliar o papel de diferentes regiões cerebrais em um determinado comportamento (Di Ciano & Everitt, 2004; Everitt et al., 1991; Han et al., 1997; Warburton et al., 2000; 2001). Esse procedimento é baseado na premissa de que manipulações unilaterais (em lados opostos do encéfalo) de duas estruturas interconectadas deveriam causar um prejuízo funcional apenas se existisse uma interação serial entre estas estruturas (Parkinson et

al., 2000). Através deste tipo de manipulação, alguns autores mostraram que a conexão entre a amígdala e o estriado ventral são importantes para o fenômeno de auto-administração de cocaína em roedores (Di Ciano & Everitt, 2004) e para a tarefa de preferência condicionada ao lugar por comida (Everitt et al., 1991). Aggleton et al., em uma série de estudos utilizando o modelo de desconexão funcional, caracterizaram o papel do hipocampo e de suas conexões com estruturas diencefálicas, como os corpos mamilares e os núcleos talâmicos, em tarefas espaciais hipocampo-dependentes (Warburton et al., 2000; 2001; Aggleton & Brown, 2002).

Uma vez que a lesão de estriado dorsal prejudica o desempenho dos animais seletivamente na tarefa de condicionamento clássico de medo ao som (Ferreira et al., 2003), poderia ser esperado, de acordo com os estudos anteriores, que a circuitaria envolvendo a amígdala e o estriado fosse importante para o condicionamento clássico de medo ao som, mas não ao contexto. Esta interação já foi observada anteriormente em outros paradigmas comportamentais, onde estímulos neutros adquirem valores motivacionais, como por exemplo no condicionamento clássico apetitivo (Han et al., 1997).

OBJETIVO

## OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi investigar, através de métodos de lesão e inativação temporária, o envolvimento do estriado dorsal e das conexões entre a amígdala e o estriado dorsal nas tarefas de condicionamento de medo ao som e ao contexto. Para isto, este trabalho apresenta-se dividido em três etapas, com os seguintes objetivos específicos:

### Etapa 1:

- Verificar o efeito de lesões pré-treino bilaterais de estriado dorsal, núcleo central da amígdala e lesões assimétricas de CeA-estriado dorsal nas tarefas de condicionamento de medo ao som e ao contexto.

### Etapa 2:

- Verificar o efeito de lesões pré-teste bilaterais de estriado dorsal nas tarefas de condicionamento de medo ao som e ao contexto, e, de lesões assimétricas de CeA-estriado dorsal na tarefa de condicionamento de medo ao som.

### Etapa 3:

- Verificar, através do método de inativação temporária, o papel do estriado na aquisição/consolidação do condicionamento clássico de medo ao som, assim como a participação das conexões entre o CeA-estriado dorsal na aquisição e consolidação desta tarefa.

**ETAPA 1**



## ETAPA 1 - EFEITOS DAS LESÕES PRÉ-TREINO DE ESTRIADO DORSAL E AMÍGDALA NAS TAREFAS DE CONDICIONAMENTO DE MEDO AO SOM E AO CONTEXTO.

A ETAPA 1 do presente trabalho teve como objetivo geral verificar os efeitos das lesões pré-treino de estriado dorsal e do núcleo central da amígdala (CeA) sobre as tarefas de condicionamento de medo ao som e ao contexto.

### MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

#### ***Animais***

Foram utilizados ratos Wistar, machos, de 2-3 meses de idade, pesando de 280 a 350 gramas, mantidos em grupos de 6 animais por gaiola (30x16x18 cm), provenientes do biotério do Departamento de Psicobiologia da UNIFESP-EPM. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e período claro/escuro de 12/12 horas (o período claro começando às 7 horas da manhã), com livre acesso ao alimento e à água (*ad libitum*).

#### ***Cirurgia***

Cada rato foi anestesiado com xilasina na dose de 10mg/kg e quetamina na dose de 90mg/kg, intraperitonealmente. O animal foi colocado em um aparelho estereotáxico David Kopf, sendo realizada então uma incisão na pele da cabeça para expor o crânio e um orifício foi aberto para introdução de eletrodos de aço inoxidável isolados, de 0,5 mm de diâmetro e ponta exposta de aproximadamente 0,7 mm. Através do eletrodo foi passada uma corrente anódica de 1 mA durante 10 segundos para cada ponto de lesão do núcleo central da amígdala, tendo por terra um outro eletrodo ligado à borda da pele incisada. Para a lesão eletrolítica de estriado dorsal foi passada uma corrente anódica de 5 mA por 10 segundos para cada ponto de lesão. Depois de efetuada a lesão, a pele da cabeça do animal foi suturada e o animal recebeu injeções de pentabiótico (0,2 ml, i.m.) e de diclofenaco sódico (0,2 ml, i.p), mantido em ambiente aquecido por uma lâmpada de 15 W até a recuperação da anestesia.

Nos ratos do grupo controle o procedimento foi idêntico ao executado nos animais experimentais, com exceção de que nenhuma corrente foi aplicada.

As coordenadas estereotáticas (Paxinos e Watson, 1997a) para lesão eletrolítica do núcleo central da amígdala usadas neste experimento foram:

- 2,0 mm e 2,6 mm posterior ao bregma;
- 4,0 mm lateral à linha média (direita e/ou esquerda - escolhida ao acaso e balanceada entre os hemisférios, para o grupo de animais com lesão unilateral);
- 8,1 mm abaixo da superfície do crânio.

Para a lesão eletrolítica de estriado dorsal foram usadas as seguintes coordenadas estereotáticas (Paxinos e Watson, 1997a):

- 0,7 mm posterior ao bregma;
- 2,5 mm e 3,5 mm lateral à linha média (direita e/ou esquerda - escolhida ao acaso e balanceada entre os hemisférios, para o grupo de animais com lesão unilateral);
- 4,5 mm e 5,0 mm abaixo da superfície do crânio, de acordo com a coordenada lateral.

Os animais foram submetidos a um período mínimo de recuperação da cirurgia de 7 dias, antes de serem iniciados os testes comportamentais.

### **Aparelhos**

Para a tarefa de condicionamento clássico de medo, foi utilizada uma caixa de condicionamento (Figura 2). A caixa (base: 21 x 26 cm; altura: 27,5 cm) é formada por paredes pretas e apresenta, afixados em cada uma delas, alguns padrões visuais (5 quadrados de 6 x 6 cm, de cartolina branca). A tampa do aparelho consiste em uma placa de acrílico transparente por onde foi observado o comportamento do animal. A base da caixa acrílica é formada por barras metálicas condutoras de corrente elétrica dispostas em paralelo (cada barra medindo 0,4 cm de diâmetro e distantes 1,2 cm uma da outra) e conectadas a um gerador de choque elétrico Ugo Basile (Passive

Avoidance controler mod. CAT7551), que produz uma corrente de 1mA, provocando choque nas patas do animal.

Para o teste de condicionamento clássico de medo ao som foi utilizada uma câmara de teste cilíndrica, branca, medindo 35 cm de diâmetro x 60 cm de altura, e uma tampa transparente com orifícios circulares (Figura 3). Os aparelhos foram mantidos em salas diferentes, limpos com diferentes substâncias e foi acoplado a ambos um gerador de som (80dB), utilizado como estímulo condicionado.



**Figura 2 – Caixa de condicionamento**



**Figura 3 – Câmara de teste**

### **Procedimento Comportamental**

Foram utilizados diferentes grupos de animais para cada teste comportamental.

#### *Condicionamento Clássico de Medo ao Som*

No dia 1, **Treino**, após o período de recuperação da cirurgia e sem distinção entre animais controles e lesão, cada animal foi colocado, individualmente e por 5 minutos, na caixa de condicionamento e, após este período, recebeu cinco pareamentos som-choque (estímulo condicionado-estímulo incondicionado). O som teve duração de 5 segundos e no último segundo foi liberado um choque nas patas (de 1 segundo de duração). Foi mantido um intervalo de 30 segundos entre cada pareamento. Trinta segundos após o último pareamento, cada animal foi retirado do aparelho e colocado de volta à caixa moradia. O treino teve duração total de 7 minutos e 30 segundos.

No dia 2, **Teste**, 24 horas após o treino, cada animal foi colocado na câmara cilíndrica de teste (novo contexto) onde permaneceu por 6 minutos. Durante o quarto e quinto minutos de permanência na câmara, apenas o estímulo condicionado (som) foi apresentado 5 vezes ao animal, com o mesmo padrão do dia do treino, começando no final do terceiro minuto. O tempo de congelamento -“freezing”-, definido como uma completa imobilidade do animal, com ausência de movimento de vibrissas e de farejamentos (Fanselow e Bolles, 1979), foi registrado continuamente durante os 6 minutos do teste comportamental com um cronômetro, minuto a minuto, antes e depois da apresentação do som, sendo o tempo de congelamento por minuto utilizado como medida de condicionamento.

#### *Condicionamento Clássico de Medo ao Contexto*

No dia 1, **Treino**, após o período de recuperação da cirurgia, cada animal foi treinado exatamente como descrito anteriormente para a tarefa de condicionamento clássico de medo ao som.

No dia 2, **Teste**, 24 horas após o treino, o animal foi colocado no mesmo contexto do treino, isto é, na caixa de condicionamento, e o tempo de congelamento foi registrado continuamente, minuto a minuto, durante 5 minutos. Neste período não foram apresentados os estímulos de som e choque. O tempo de congelamento foi utilizado como medida de condicionamento.

### **Sacrifício dos Animais**

Depois de concluído o procedimento experimental das tarefas comportamentais, os animais utilizados foram sacrificados, usando-se hidrato de cloral em dose letal (30%). Depois de sacrificados, os cérebros dos animais foram retirados e posteriormente congelados, permanecendo em temperatura de -80°C.

### **Histologia**

O procedimento histológico foi realizado utilizando-se criostato de congelamento (temperatura interior mantida em torno de -18°C). Para cada cérebro, foram realizados 15-20 cortes com 40µm de espessura cada. As regiões incluíram os núcleos da amígdala ou o estriado dorsal e adjacências, com suficiente margem de segurança. Depois de realizados os cortes, as lâminas foram submetidas à coloração com violeta de cresil e, posteriormente, foram montadas e limpas. Os dados histológicos obtidos serviram para mostrar o local das lesões, de acordo com o objetivo do experimento, e também para visualizar a extensão das mesmas.

### **Análise Estatística**

Os parâmetros utilizados para a análise estatística dos testes comportamentais foram a média do tempo de congelamento por minuto na tarefa de Condicionamento Clássico de Medo ao Som e ao Contexto. Os resultados foram analisados através de uma Análise de Variância (ANOVA) de duas vias com um dos fatores repetidos (Grupo x Minuto) e seguidos de teste *a posteriori* de Tukey ( $p < 0,05$ ), quando necessário. Os animais que não apresentaram as lesões adequadas, de acordo com o objetivo de cada experimento, foram descartados da análise estatística.

O delineamento experimental de todos os experimentos realizados na ETAPA 1 pode ser visualizado na Figura 4.

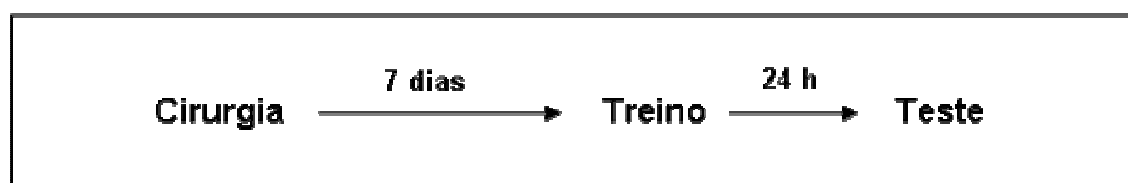


Figura 4 – Delineamento experimental da ETAPA 1.

---

## **EXPERIMENTO 1 - Efeitos das lesões pré-treino bilaterais e unilaterais de estriado dorsal e CeA nas tarefas de condicionamento de medo ao som e ao contexto.**

O objetivo deste experimento foi verificar os efeitos de lesões bilaterais e unilaterais do núcleo central da amígdala (Experimento 1 .1) e estriado dorsal (Experimento 1.2) nas tarefas de condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto.

### **Experimento 1.1. - Efeitos da lesão unilateral e bilateral do CeA no condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto.**

#### ***Procedimento experimental***

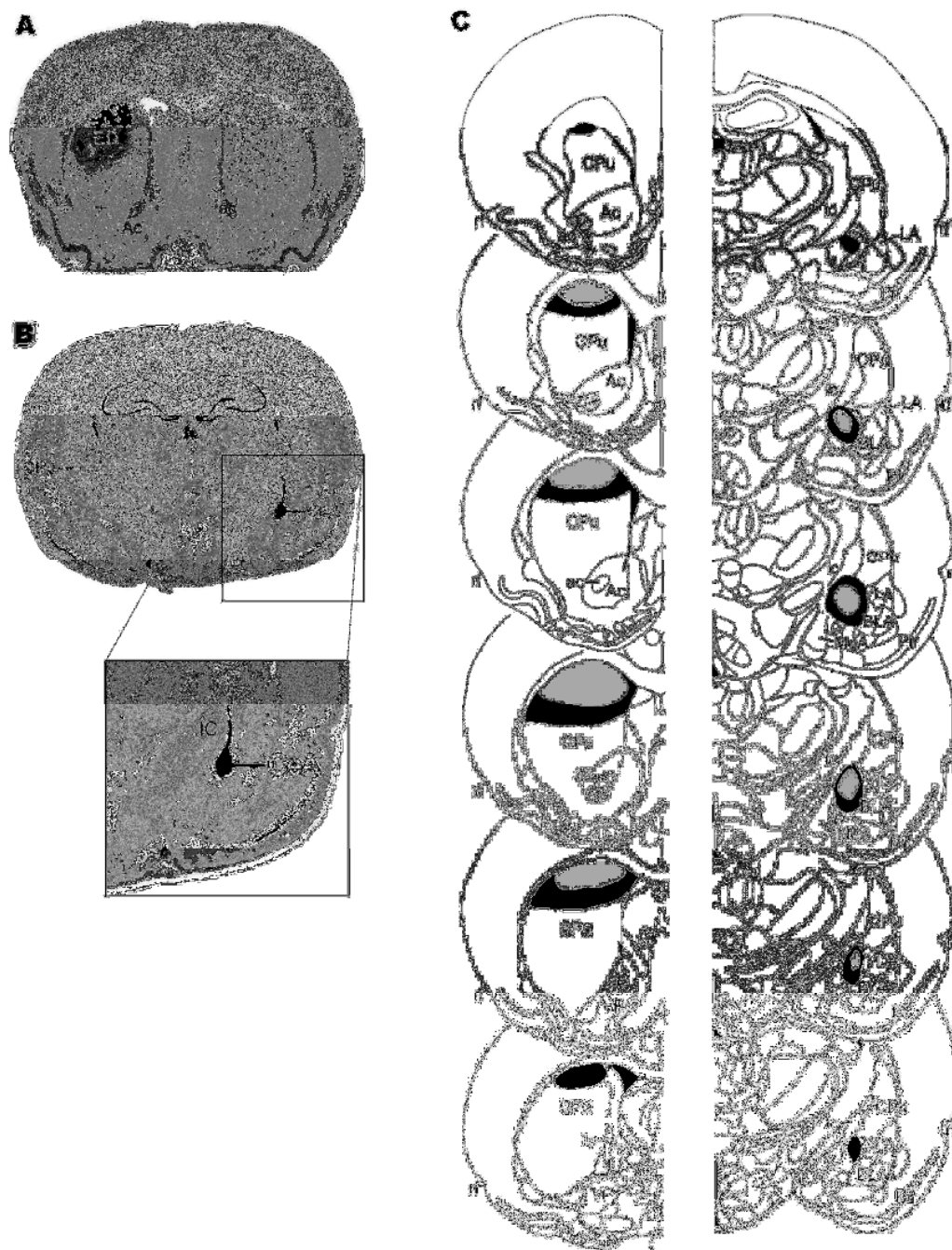
Para verificar os efeitos da lesão pré-treino do núcleo central da amígdala nas tarefas de condicionamento de medo ao som (experimento 1.1 A) e ao contexto (Experimento 1.1 B), diferentes grupos de animais foram utilizados para cada tarefa comportamental. Os animais receberam lesões bilaterais, unilaterais ou cirurgia controle de CeA, como descrito nos MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS. Após a recuperação da cirurgia, foram submetidos ao treino e teste das tarefas comportamentais.

#### ***Resultados***

##### ***Histologia***

Os animais do grupo lesão bilateral e do grupo lesão unilateral apresentaram, de uma forma geral, lesão predominantemente do CeA, atingido as subdivisões da porção medial e lateral deste núcleo. Alguns animais ainda apresentaram lesões parciais dos núcleos basolateral e também do núcleo medial da amígdala. Foram descartados da análise comportamental animais com lesões que não atingiram o CeA ou que apresentaram lesões extensas de outros núcleos da amígdala em qualquer dos

hemisférios cerebrais. No experimento 1.1 A, nenhum animal foi descartado da análise comportamental. No experimento 1.1 B cinco animais não apresentaram lesões adequadas de CeA e foram descartados da análise comportamental. Os resultados histológicos estão representados na Figura 5.



**Figura 5 – Representação dos resultados histológicos da ETAPA 1 e 2.**

Fotografia de secções coronais do encéfalo do rato, coradas com cresil violeta, mostrando lesão eletrolítica de estriado dorsal - ED - (A) e CeA (B). (C) - Representações esquemáticas de cortes coronais, mostrando a extensão das menores (em cinza) e maiores (em preto) lesões eletrolíticas de ED – esquerda - e CeA – direita - (adaptado de Paxinos e Watson, 1997b). Ac: núcleo accumbens; ac: comissura anterior; BLA: núcleo basolateral da amígdala; cc: corpo caloso; CeA: núcleo central da amígdala; Cpu: caudado-putâmen; ED: estriado dorsal; ic: cápsula interna; LA: núcleo lateral da amígdala; MeA: núcleo medial da amígdala; Pir: córtex piriforme; rf: fissura rinal; VP: pálido ventral.



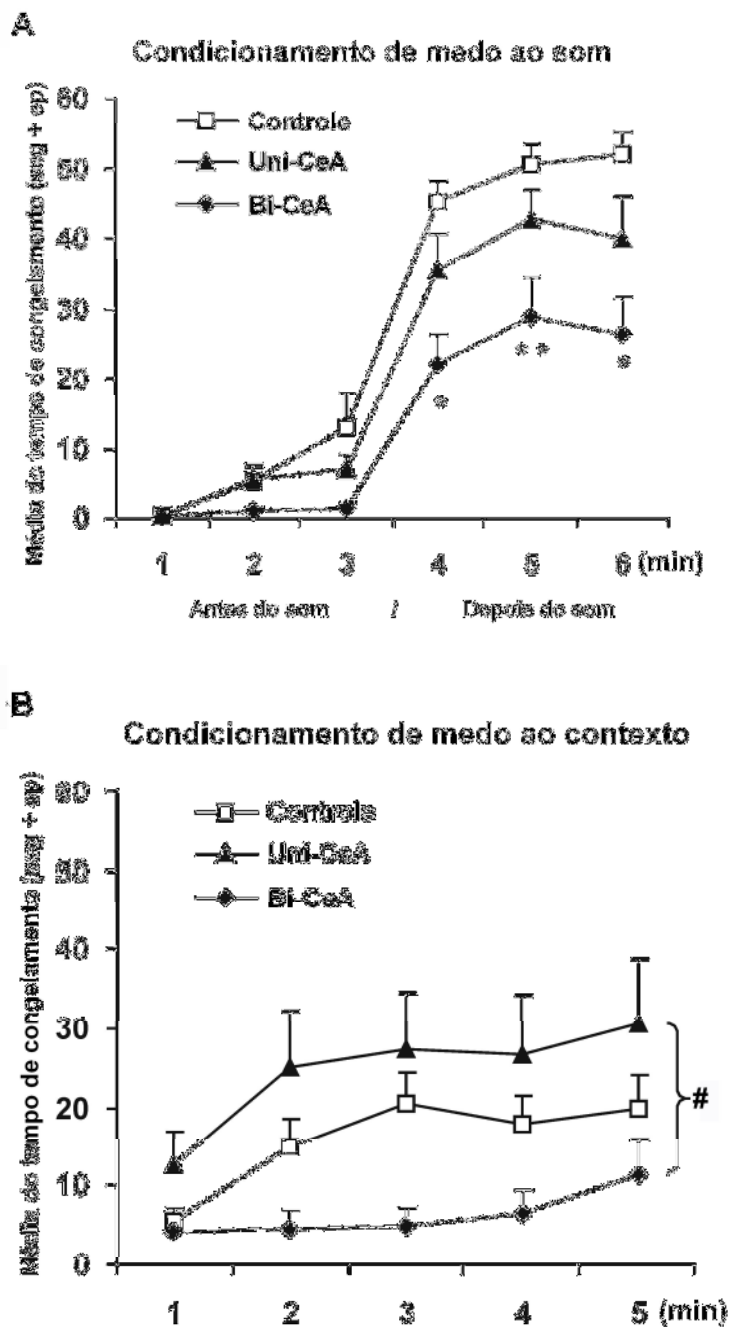
## **Resultados comportamentais**

### **1.1. A Efeito da lesão unilateral e bilateral do CeA no condicionamento clássico de medo ao som.**

A Figura 6A mostra o desempenho de animais com lesão bilateral de CeA (n= 11), lesão unilateral de CeA (n= 11) e animais controles (n= 10) no teste da tarefa de condicionamento de medo ao som. A ANOVA de duas vias indicou que houve efeito Grupo [ $F_{(2,29)} = 8,97$ ;  $p < 0,001$ ] e efeito Minuto [ $F_{(5,145)} = 132,73$ ;  $p < 0,0001$ ] estatisticamente significativos. O teste *a posteriori* de Tukey para o efeito Grupo mostrou que os animais com lesão bilateral foram estatisticamente diferentes dos animais do grupo lesão unilateral e controle ( $p < 0,05$ ), e o grupo controle e lesão unilateral não diferiram entre si. O efeito Interação (Minuto x Grupo) também foi significativo [ $F_{(10,145)} = 3,60$ ;  $p < 0,001$ ]. O teste *a posteriori* de Tukey revelou que os animais de todos os grupos apresentaram um aumento no tempo de congelamento após a apresentação do som, mas os animais com lesão bilateral permaneceram menos tempo em congelamento do que os animais controles e com lesão unilateral a partir do terceiro minuto, ou seja após a apresentação do som ( $p < 0,05$ ).

### **1.1. B Efeito da lesão unilateral e bilateral do CeA no condicionamento clássico de medo ao contexto.**

A Figura 6B mostra o desempenho na tarefa de condicionamento clássico de medo ao contexto de animais com lesão bilateral de CeA (n= 6), lesão unilateral de CeA (n= 8) e controles (n= 12). A ANOVA de duas vias mostrou que houve efeito Grupo [ $F_{(2,23)} = 4,20$ ;  $p < 0,03$ ] e efeito Minuto [ $F_{(4,92)} = 7,02$ ;  $p < 0,0001$ ] estatisticamente significativos. A interação Minuto x Grupo [ $F_{(8,92)} = 0,86$ ;  $p = 0,54$ ] não foi significativa. O teste *a posteriori* de Tukey para o efeito Minuto mostrou que os animais aumentaram o tempo de congelamento durante os 5 minutos de teste ( $p < 0,05$ ). O teste *a posteriori* de Tukey para o efeito Grupo revelou que os animais com lesão bilateral foram estatisticamente diferentes dos animais do grupo lesão unilateral ( $p < 0,05$ ). Como pode ser visto na figura, os animais do grupo lesão bilateral apresentaram menos tempo de congelamento quando comparados aos animais com lesão unilateral. Por outro lado, os animais dos grupos lesão unilateral e controle não foram diferentes entre si.



**Figura 6 – Efeitos da lesão unilateral e bilateral do CeA no condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto.**

**(A)** Tempo de congelamento por minuto (média + erro padrão) dos animais com lesão bilateral de CeA (Bi-CeA; n=11), lesão unilateral de CeA (Uni-CeA; n=11) e controles (controle; n=10) no teste da tarefa de condicionamento de medo ao som. **(B)** Média e erro padrão do tempo de congelamento dos animais com lesão bilateral de CeA (Bi-CeA; n=6), lesão unilateral de CeA (Uni-CeA; n=8) e controles (controle; n=12) no teste da tarefa de condicionamento de medo ao contexto.

\* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey).

\*\* $p < 0,05$ , quando comparado aos grupos controle e lesão unilateral (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey).

#  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo unilateral (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey)

---

***Experimento 1.2. - Efeitos da lesão unilateral e bilateral de estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto.***

***Procedimento experimental***

Para verificar os efeitos da lesão pré-treino de estriado dorsal nas tarefas de condicionamento de medo ao som (experimento 1.2 A) e ao contexto (Experimento 1.2 B) também foram utilizados diferentes grupos de animais para cada tarefa comportamental. Os animais receberam lesões bilaterais, unilaterais ou cirurgia controle de estriado dorsal, como descrito anteriormente, e, após o período de recuperação da cirurgia, foram submetidos ao treino e teste de cada tarefa comportamental.

***Resultados***

***Histologia***

Os animais do grupo lesão bilateral e lesão unilateral apresentaram lesões na porção anterior e dorsal do estriado, compreendendo as regiões dorsomedial e dorsolateral. As lesões atingiram o estriado desde a abertura do corpo caloso até o cruzamento da comissura anterior, ou seja, atingiram grande porção rostro-caudal desta estrutura. Alguns animais apresentaram alargamento dos ventrículos laterais. No experimento 1.2 A nenhum animal lesado foi descartado da análise comportamental. No experimento 1.2 B foi descartado apenas um animal por apresentar uma lesão muito pequena de estriado dorsal em um dos hemisférios cerebrais. Os resultados histológicos estão representados na Figura 5.

***Resultados comportamentais***

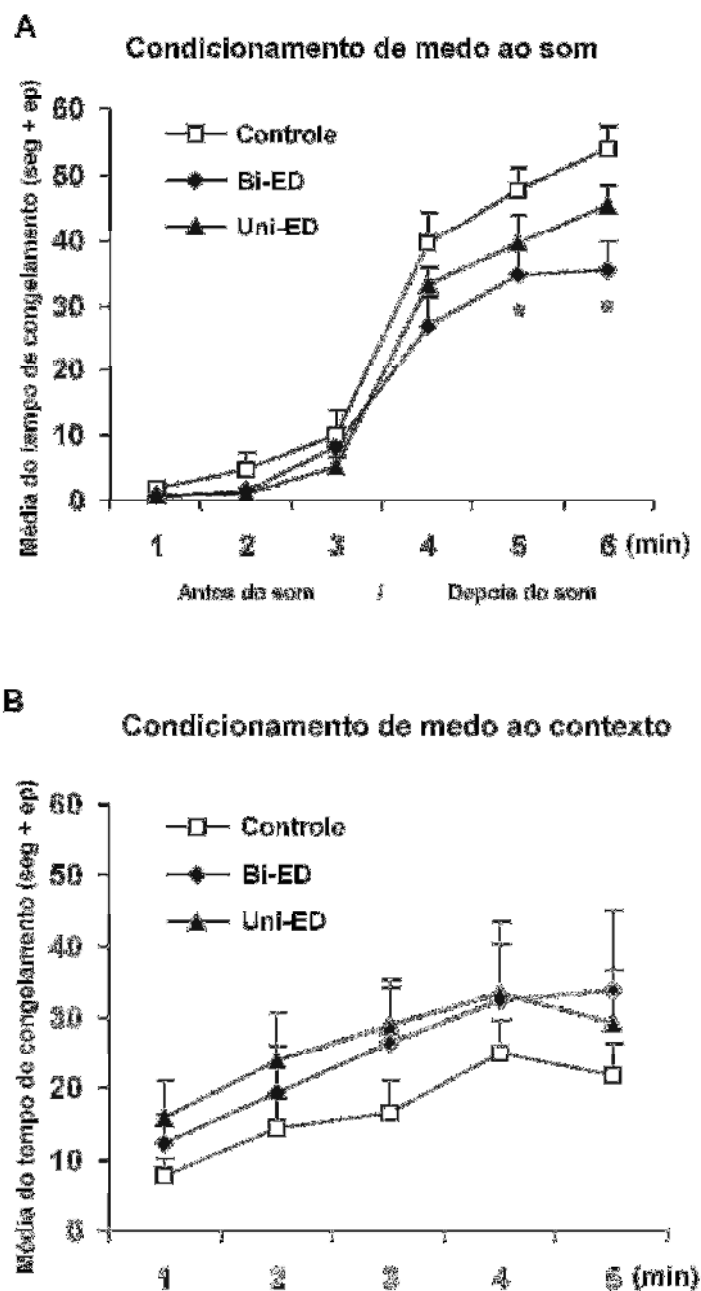
***1.2. A Efeito da lesão unilateral e bilateral estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som.***

A Figura 7A mostra os efeitos da lesão bilateral e unilateral no desempenho de animais na tarefa de condicionamento de medo ao som. A ANOVA de duas vias indicou que houve efeito Grupo estatisticamente significativo [ $F_{(2,31)} = 4,80$ ;  $p=0,015$ ]. O

teste a posteriori de Tukey para o efeito Grupo mostrou que os animais com lesão bilateral apresentaram menos tempo de congelamento quando comparados aos animais controles ( $p < 0,05$ ). O efeito Minuto [ $F_{(5,155)} = 182,16$ ;  $p < 0,0001$ ] e o efeito interação (Grupo x Minuto) [ $F_{(10,155)} = 2,09$ ;  $p = 0,028$ ] também foram significativos. Como pode ser visto na figura, os animais com lesão bilateral ( $n = 10$ ) apresentaram menos tempo de congelamento quando comparados aos animais controles ( $n = 12$ ), após a apresentação do som ( $p < 0,05$ , teste a posteriori de Tukey). Os animais com lesão unilateral ( $n = 12$ ) não foram diferentes dos animais controles em nenhum dos minutos analisados ( $p > 0,05$ , teste a posteriori de Tukey).

### **1.2. B Efeito da lesão unilateral e bilateral do estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao contexto.**

As lesões bilaterais (grupo Bi-ED;  $n = 10$ ) e unilaterais de estriado (grupo Uni-ED;  $n = 10$ ) não afetaram o desempenho da tarefa de condicionamento de medo ao contexto quando comparadas ao grupo controle ( $n = 10$ ) - ver Figura 7B. A ANOVA de duas vias indicou que não houve efeito Grupo [ $F_{(2,27)} = 1,33$ ;  $p = 0,28$ ] e efeito interação (Minuto x Grupo) [ $F_{(8,108)} = 0,34$ ;  $p = 0,94$ ] estatisticamente significativos. O efeito Minuto foi significativo [ $F_{(4,108)} = 12,16$ ;  $p < 0,0001$ ], e o teste a posteriori de Tukey para o efeito minuto mostra que, de uma forma geral, os animais aumentaram o tempo de congelamento no decorrer dos minutos analisados no teste comportamental ( $p < 0,05$ ).



**Figura 7 – Efeitos da lesão unilateral e bilateral do estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto.**

ED = estriado dorsal **(A)** Tempo de congelamento por minuto (média + erro padrão) dos animais com lesão bilateral de ED (Bi-ED; n=10), lesão unilateral de ED (Uni-ED; n=12) e controles (controle; n=12) no teste da tarefa de condicionamento de medo ao som. **(B)** Média e erro padrão do tempo de congelamento dos animais com lesão bilateral de ED (Bi-ED; n=10), lesão unilateral de ED (Uni-ED; n=10) e controles (controle; n=10) no teste da tarefa de condicionamento de medo ao contexto.

\* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey).

## **EXPERIMENTO 2 - Efeitos das lesões pré-treino assimétricas de CeA-estriado dorsal nas tarefas de condicionamento de medo ao som e ao contexto.**

O objetivo deste experimento foi verificar os efeitos de lesões pré-treino contralaterais e ipsilaterais do núcleo central da amígdala e estriado dorsal nas tarefas de condicionamento clássico de medo ao som (experimento 2.1) e ao contexto (experimento 2.2).

### ***Experimento 2.1. Efeito da lesão contralateral e ipsilateral de CeA-estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som.***

#### ***Procedimento experimental***

Neste experimento foi realizada uma lesão de estriado dorsal em um hemisfério cerebral, combinada com lesão do núcleo central da amígdala no hemisfério contralateral ou ipsilateral. Este paradigma de lesão assimétrica permite investigar a função das conexões entre a amígdala e o estriado na tarefa de condicionamento clássico de medo ao som. Foram utilizados três grupos de animais: controles, lesão contralateral de CeA-estriado dorsal e lesão ipsilateral de CeA-estriado dorsal. Após o período de recuperação da cirurgia estereotáxica os animais foram submetidos ao treino e teste a tarefa de condicionamento de medo ao som.

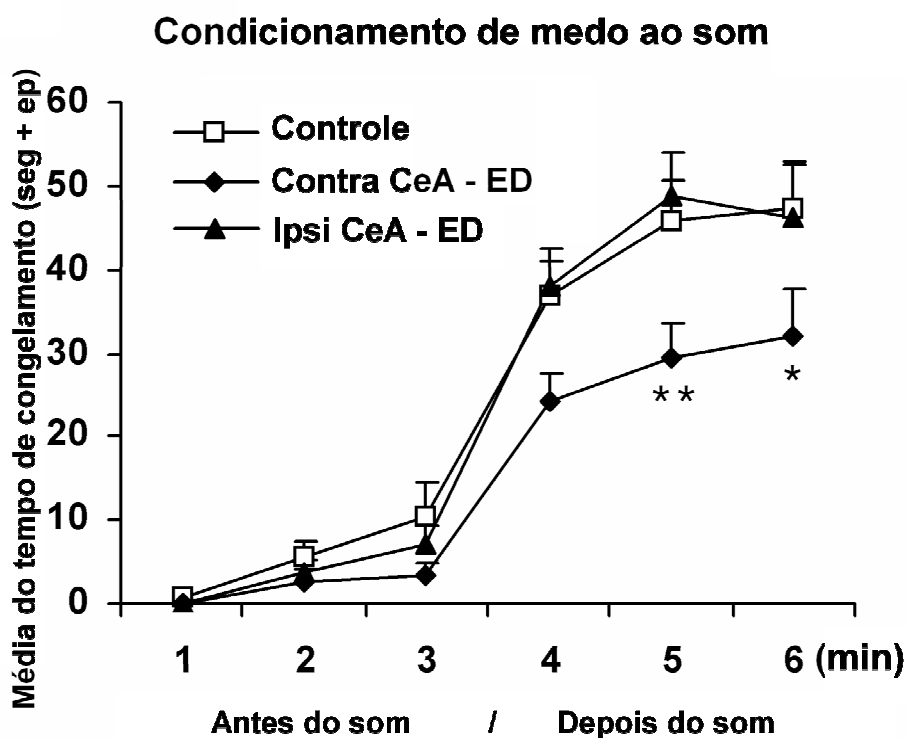
#### ***Resultados***

##### ***Histologia***

Foram incluídos na análise comportamental apenas os animais que apresentaram lesão unilateral de núcleo central da amígdala, como descrito nos resultados histológicos do experimento 1.1, e que apresentaram contralateral ou ipsilateral à lesão do núcleo central, lesão unilateral de estriado dorsal, como descrito no experimento 1.2. Apenas dois animais foram descartados da análise comportamental, um por apresentar lesão que atingiu grande porção do núcleo medial da amígdala e outro por não apresentar lesão do CeA. Estes resultados estão representados na Figura 5.

### **Resultados comportamentais**

Como pode ser visto na Figura 8, a lesão assimétrica contralateral de CeA-estriado dorsal prejudicou o desempenho dos animais na tarefa de condicionamento clássico de medo ao som. A ANOVA de duas vias revelou que houve um efeito Minuto estatisticamente significativo [ $F_{(5,155)} = 118,59$ ;  $p < 0,0001$ ], sendo que todos os grupos apresentaram mais tempo de congelamento após a apresentação do som (Tukey,  $p < 0,05$ ). O efeito Grupo também foi significativo [ $F_{(2,31)} = 5,55$ ;  $p < 0,01$ ] e o teste a posteriori de Tukey indicou que o tempo de congelamento dos animais com lesão contralateral foi diferente dos animais controles e dos animais com lesão ipsilateral ( $p < 0,05$ ). A interação (Minuto x Grupo) também foi significativa [ $F_{(10,155)} = 2,06$ ;  $p = 0,03$ ], e a análise a posteriori de Tukey mostrou que os animais do grupo lesão contralateral ( $n = 13$ ) apresentaram menos tempo de congelamento que os animais controles ( $n = 12$ ) e com lesão ipsilateral ( $n = 9$ ) durante o quinto minuto do teste ( $p < 0,05$ ). Além disso, os animais com lesão contralateral também apresentaram tempo de congelamento diferente dos animais controles, no último minuto durante a sessão de teste ( $p < 0,05$ ).



**Figura 8 – Efeito da lesão contralateral e ipsilateral de CeA-estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som.**

ED = estriado dorsal. Tempo de congelamento por minuto (média + erro padrão) dos animais com lesão contralateral de CeA-ED (Contra CeA-ED; n=13) e lesão ipsilateral de CeA-ED (Ipsi CeA-ED; n=9) e controles (controle; n=12) no teste da tarefa de condicionamento de medo ao som.

\* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey).

\*\* $p < 0,05$ , quando comparado aos grupos controle e lesão unilateral (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey).



## ***Experimento 2.2. Efeito da lesão contralateral de CeA-estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao contexto.***

### ***Procedimento experimental.***

Os animais receberam neste experimento lesão contralateral de CeA-estriado dorsal e foram submetidos a tarefa de condicionamento de medo ao contexto. Como a lesão bilateral de estriado dorsal não afetou o desempenho dos animais nesta tarefa (experimento 1.2), não era esperado que a lesão assimétrica de CeA-estriado dorsal afetasse o desempenho dos animais na tarefa de condicionamento de medo ao contexto. Sendo assim, apenas dois grupos de animais foram utilizados: controles e animais com lesão contralateral de CeA-estriado dorsal.

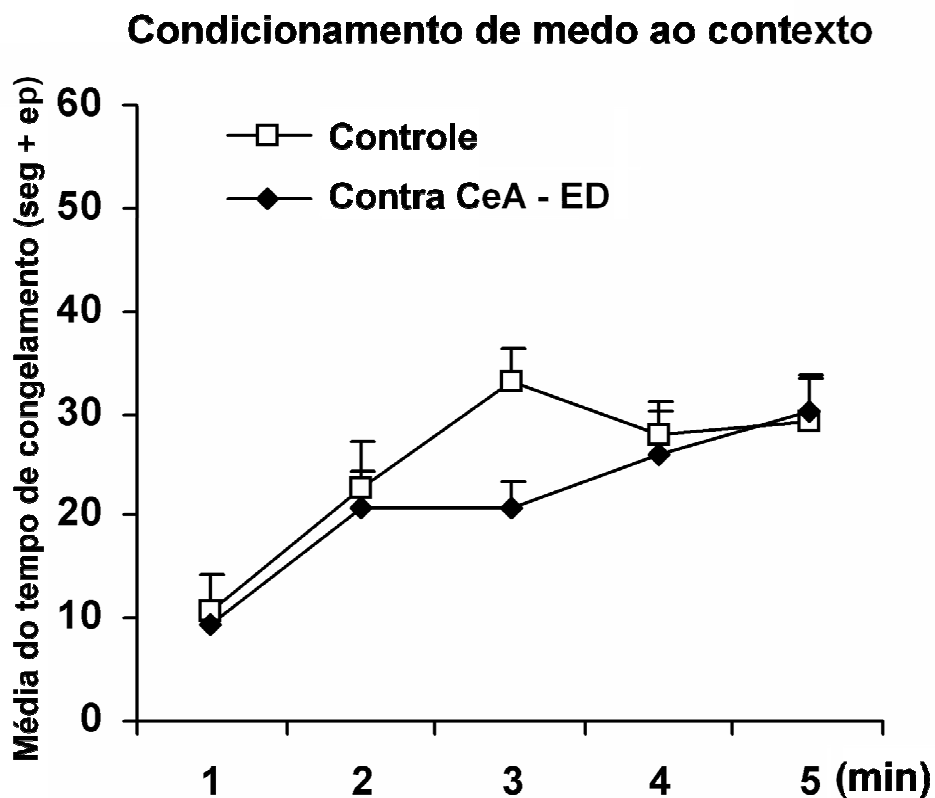
### ***Resultados***

#### ***Histologia***

Foram incluídos na análise comportamental apenas os animais que apresentaram lesão unilateral de núcleo central da amígdala, como descrito nos resultados histológicos do experimento 1.1, e que apresentaram contralateral à lesão do núcleo central, lesão unilateral de estriado dorsal, como descrito no experimento 1.2. Neste experimento, nenhum animal foi excluído após a análise histológica. Estes resultados estão representados na Figura 5.

#### ***Resultados comportamentais***

A lesão assimétrica contralateral de CeA-estriado dorsal não afetou o desempenho dos animais na tarefa de condicionamento clássico de medo ao contexto (ver Figura 9). A ANOVA de duas vias mostrou que o efeito Grupo não foi significativo [ $F_{(1,20)} = 0,83$ ;  $p=0,37$ ], o mesmo ocorrendo com o efeito Interação (Minuto x Grupo) [ $F_{(4,80)} = 1,5$ ;  $p=0,20$ ]. Contudo, o efeito Minuto foi significativo [ $F_{(4,80)} = 13,77$ ;  $p<0,0001$ ]. O teste a posteriori de Tukey para este efeito revelou que os animais do grupo controle ( $n= 12$ ) e do grupo lesão ( $n= 10$ ) apresentaram um aumento no tempo de congelamento no decorrer dos minutos do teste comportamental ( $p<0,05$ ).



**Figura 9 – Efeito da lesão contralateral de CeA-estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao contexto.**

ED = estriado dorsal. Tempo de congelamento por minuto (média + erro padrão) dos animais com lesão contralateral de CeA-ED (Contra CeA-ED; n=10) e controles (controle; n=12) no teste da tarefa de condicionamento de medo ao contexto.

Em resumo os resultados observados na ETAPA 1 do presente estudo mostraram que:

- 1) A lesão bilateral do núcleo central da amígdala prejudicou o desempenho dos animais na tarefa de condicionamento clássico de medo ao som, e este efeito não foi observado após a lesão unilateral desta estrutura (Experimento 1.1 A). A lesão bilateral do núcleo central da amígdala também prejudicou o desempenho dos animais na tarefa de condicionamento clássico de medo ao contexto, quando comparados aos animais com lesão unilateral (Experimento 1.1 B).
- 2) A lesão bilateral de estriado dorsal prejudicou o desempenho dos animais na tarefa de condicionamento clássico de medo ao som, efeito este que não foi observado após a lesão unilateral desta região cerebral (Experimento 1.2 A). Por outro lado, nem a lesão bilateral de estriado, nem a lesão unilateral desta região prejudicaram o desempenho da tarefa de condicionamento clássico de medo ao contexto (Experimento 1.2 B).
- 3) No experimento 2.1 foi observado que a lesão assimétrica contralateral do núcleo central da amígdala e estriado dorsal afetou o desempenho dos animais na tarefa de condicionamento de medo ao som, ao passo que a lesão destas mesmas estruturas no mesmo hemisfério cerebral não interferiu no desempenho dos animais nesta tarefa.
- 4) No último experimento realizado na ETAPA 1 (experimento 2.2), foi verificado que a lesão assimétrica contralateral do núcleo central da amígdala e do estriado dorsal não interferiu no desempenho da tarefa de condicionamento clássico de medo ao contexto.

**ETAPA 2**

## ETAPA 2 - EFEITOS DAS LESÕES PRÉ-TESTE DE ESTRIADO DORSAL E AMÍGDALA NAS TAREFAS DE CONDICIONAMENTO DE MEDO AO SOM E AO CONTEXTO.

A ETAPA 2 teve como objetivo geral verificar os efeitos das lesões pré-teste de estriado dorsal e do CeA sobre a tarefa de condicionamento de medo ao som e ao contexto.

### MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

#### ***Animais***

Foram utilizados ratos Wistar, machos, de 2-3 meses de idade, pesando de 280 a 350 gramas, mantidos em grupos de 4 animais por gaiola (30x16x18 cm), provenientes do biotério do Departamento de Psicobiologia da UNIFESP-EPM. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e período claro/escuro de 12/12 horas (o período claro começando às 7 horas da manhã), com livre acesso ao alimento e à água (*ad libitum*).

#### ***Aparelhos***

Para as tarefas de condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto foram utilizadas a caixa de condicionamento e a câmara de teste descritas na ETAPA 1.

#### ***Procedimento Experimental***

No dia 1, **Treino**, cada animal foi colocado individualmente na caixa de condicionamento e, após 5 minutos, recebeu cinco pareamentos som-choque. Os parâmetros utilizados para o treino do animal nos experimentos da ETAPA 2 foram idênticos àqueles descritos nos MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS da ETAPA 1.

Após exatos 14 dias do treino da tarefa de condicionamento clássico de medo, todos os animais foram anestesiados e receberam lesão eletrolítica no núcleo central da amígdala e estriado dorsal, da mesma forma descrita na ETAPA 1. As coordenadas estereotáxicas utilizadas foram idênticas às descritas na ETAPA 1. Depois de efetuada

a lesão, a pele da cabeça do animal foi suturada e o animal recebeu injeções de pentabiótico (0,2 ml, i.m.) e de diclofenaco sódico (0,2 ml, i.p), sendo mantido em ambiente aquecido até a recuperação da anestesia. Nos ratos controles o procedimento foi idêntico ao executado nos animais experimentais à exceção de que nenhuma corrente foi aplicada.

Sete dias depois (período de recuperação da cirurgia), todos os animais foram submetidos ao teste de condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto. Foram utilizados grupos diferentes de animais para cada teste comportamental, os quais foram conduzidos da mesma forma descrita nos experimentos da ETAPA 1, com exceção de que ocorreram após 21 dias do treino do animal.

### **Sacrifício dos Animais**

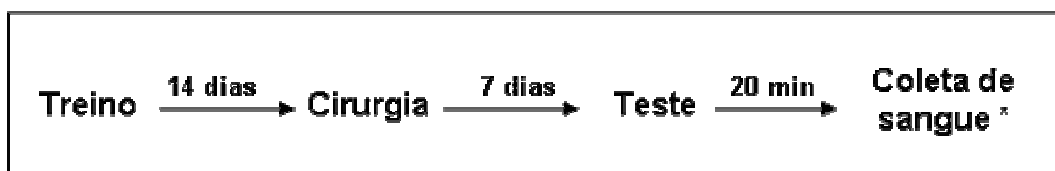
Vinte minutos após os testes de cada tarefa de condicionamento clássico de medo, cada animal foi sacrificado e os encéfalos foram imediatamente retirados e congelados, permanecendo em temperatura de -80°C.

### **Histologia**

O procedimento histológico realizado foi idêntico ao descrito nos materiais e métodos da ETAPA 1.

### **Análise Estatística**

Os parâmetros utilizados para a análise estatística dos testes comportamentais foram a média do tempo de congelamento por minuto na tarefa de Condicionamento Clássico de Medo ao Som e ao Contexto. Os resultados foram analisados através de uma ANOVA de duas vias com um dos fatores repetidos (Grupo x Minuto) e seguidos de teste *a posteriori* de Tukey ( $p < 0,05$ ), quando necessário. Os animais que não apresentaram as lesões adequadas, de acordo com o objetivo de cada experimento, foram descartados da análise estatística. O delineamento experimental de todos os experimentos realizados na ETAPA 2 pode ser visualizado na Figura 10.



**Figura 10 – Delineamento experimental da ETAPA 2.**

\* No Experimento 2 desta etapa não foi realizada a coleta de sangue.

**EXPERIMENTO 1 : Efeitos da lesão pré-teste de estriado dorsal na expressão da resposta condicionada de medo ao som e ao contexto e nos níveis de ACTH plasmáticos medidos após o teste comportamental.**

O objetivo deste experimento foi verificar os efeitos de lesões bilaterais pré-teste de estriado dorsal na expressão do condicionamento clássico de medo ao som (experimento 1 A) e ao contexto (experimento 1 B). Um segundo objetivo foi verificar os efeitos da lesão de estriado dorsal nos níveis plasmáticos de ACTH induzidos pelo teste do condicionamento de medo. De acordo com os resultados observados na literatura era esperado que a lesão de estriado dorsal prejudicasse a resposta somatomora de congelamento, mas não a resposta neuroendócrina (ACTH) eliciada pelo teste de condicionamento de medo.

***Procedimento experimental***

No primeiro experimento da ETAPA 2 foram utilizados dois grupos de animais (controles e lesão bilateral de estriado), na tarefa de condicionamento de medo ao som (experimento 1 A) e ao contexto (experimento 1 B). Diferentes grupos de animais foram utilizados em cada tarefa comportamental. Após 14 dias do treino, os animais receberam lesão bilateral eletrolítica de estriado dorsal ou cirurgia controle. Sete dias após o procedimento cirúrgico, cada animal foi testado na tarefa de condicionamento de medo ao som ou ao contexto. Vinte minutos após o término do teste da tarefa comportamental, cada animal foi sacrificado por decapitação, o sangue foi coletado e o encéfalo do animal foi retirado para procedimento histológico.

***Dosagem de ACTH***

As amostras de sangue coletadas por decapitação do animal foram colocadas em tubos com 0,2 ml de uma solução de 60mg/ml de EDTA. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 2300 rpm numa temperatura de 4°C durante 20 minutos, sendo que após esse procedimento o plasma foi extraído e congelado a -20° C.

Os níveis plasmáticos de ACTH foram determinados por quimioluminescência, utilizando anticorpo monoclonal específico (DPC Immulite, Los Angeles, CA, USA).

Para a análise estatística dos níveis plasmáticos de ACTH, foi utilizado o teste *t* de Student para amostras independentes. Um valor de *p* menor ou igual a 0,05 foi considerado significativo.

## **Resultados**

### **Histologia**

Após a análise histológica dos cérebros, foi verificado que todos os animais do experimento 1.1 e do experimento 1.2 da ETAPA 2 apresentaram lesão bilateral do estriado dorsal, que se estende desde a abertura do corpo caloso até o cruzamento da comissura anterior, da mesma forma descrita nos experimentos 1.2 da ETAPA 1. (ver Figura 5)

### **Resultados comportamental e hormonal**

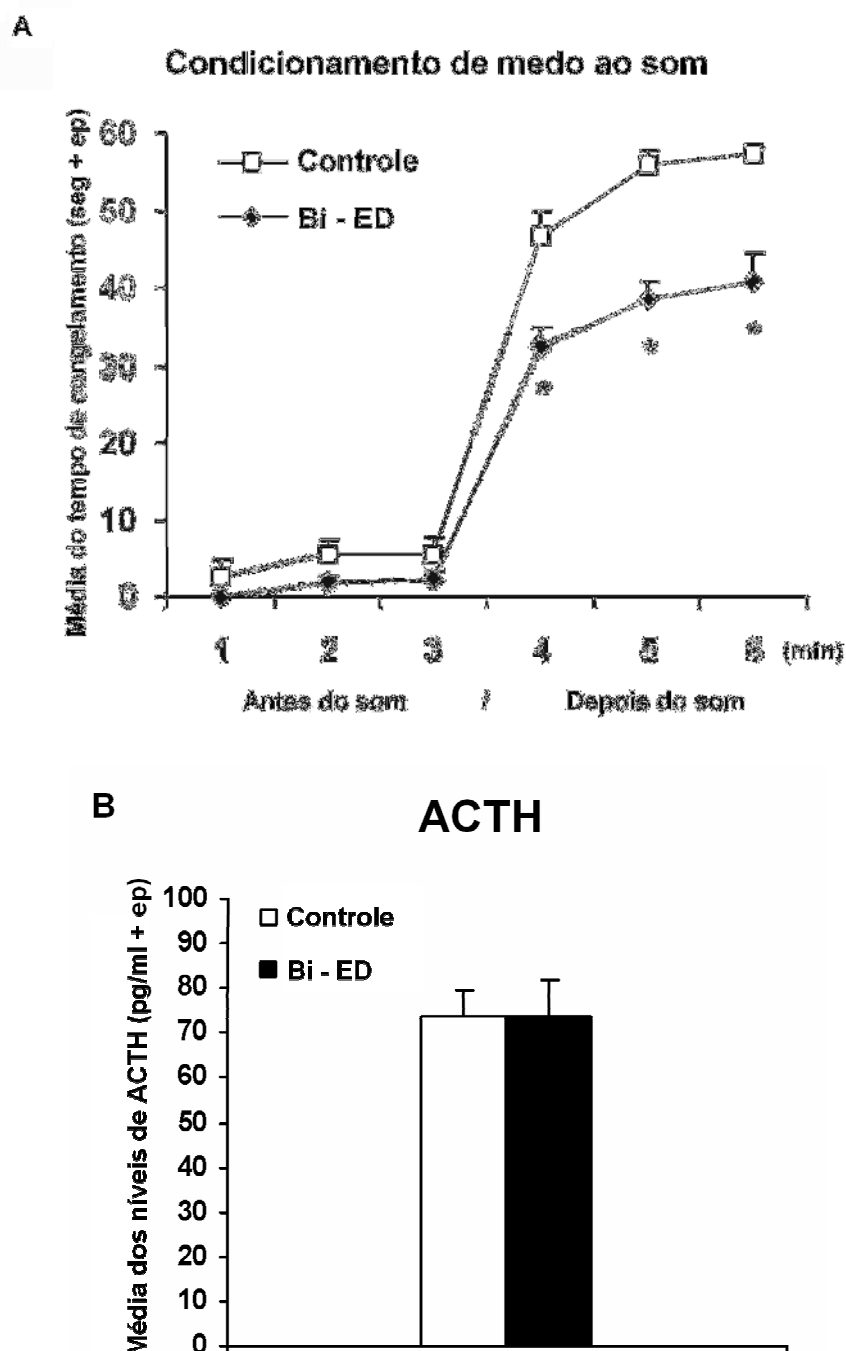
#### **1. A Efeito da lesão bilateral pré-teste de estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som.**

A lesão bilateral do estriado dorsal realizada antes do teste do animal na tarefa de condicionamento de medo ao som prejudicou o desempenho dos animais (ver Figura 11A). A ANOVA de duas vias revelou que os efeitos Grupo [ $F_{(1,21)} = 20,42$ ;  $p = 0,0002$ ], Minuto [ $F_{(5,105)} = 396,06$ ;  $p < 0,0001$ ] e a interação (Grupo X Minuto) [ $F_{(5,105)} = 8,92$ ;  $p < 0,00001$ ] foram significativos. O teste *a posteriori* de Tukey para a interação revelou que os animais aumentaram o tempo de congelamento após a apresentação do som, mas que os animais com lesão pré-teste de estriado dorsal (grupo Bi-ED;  $n = 11$ ) apresentaram menos tempo de congelamento, quando comparados aos animais



controles (grupo controle; n= 12) nos três últimos minutos do teste, ou seja após a apresentação do som ( $p < 0,05$ ).

Na Figura 11B, podem ser observados os níveis plasmáticos de ACTH dos animais controles (n= 12) e com lesão bilateral de estriado dorsal (n= 11) após o teste de condicionamento de medo ao som. O teste *t* de Student ( $t = -0,29$ ;  $p = 0,77$ ) revelou que os animais com lesão bilateral pré-teste de estriado não apresentaram diferenças nos níveis plasmáticos de ACTH, quando comparados aos animais controles após o teste da tarefa de condicionamento de medo ao som.



**Figura 11 – Efeito da lesão bilateral pré-teste de estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som.**

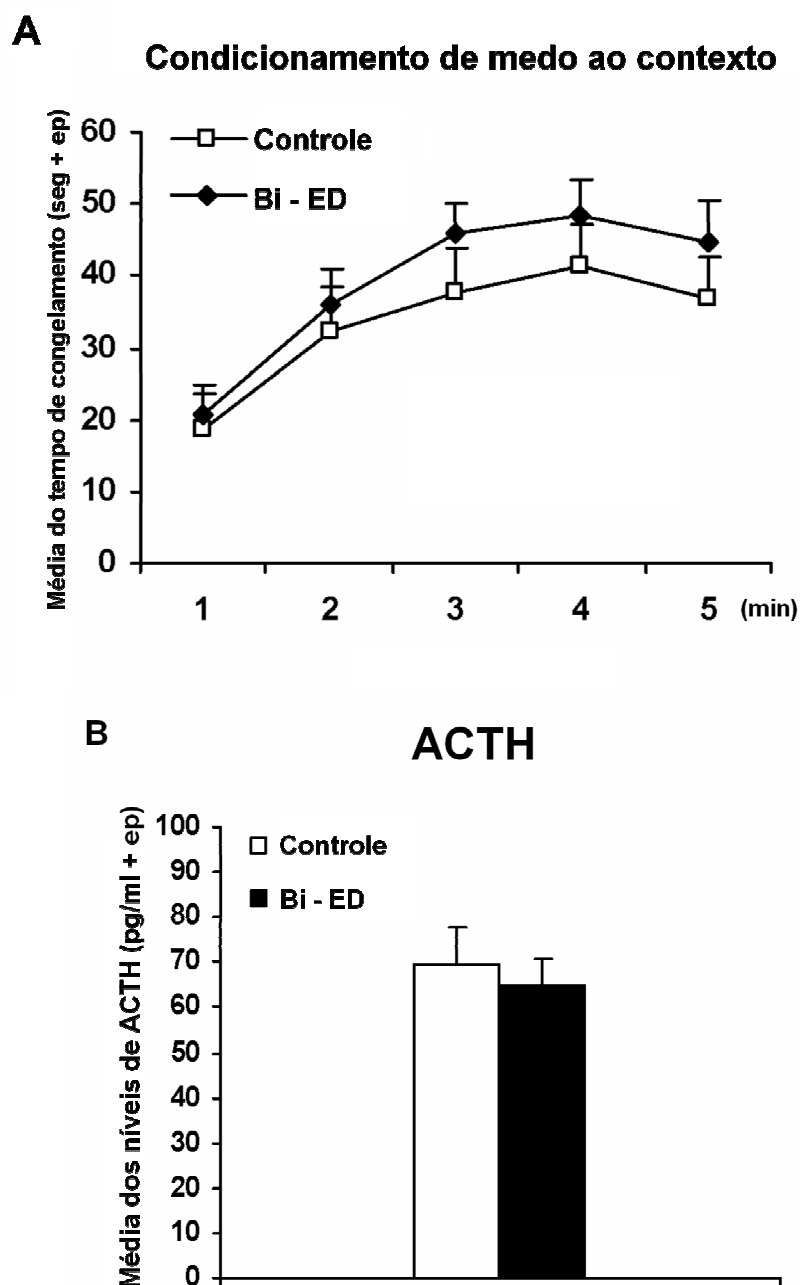
ED = estriado dorsal. **(A)** Tempo de congelamento por minuto (média + erro padrão) dos animais com lesão bilateral de ED (Bi-ED; n=11) e controles (controle; n=12) no teste da tarefa de condicionamento de medo ao som. **(B)** Média e erro padrão dos níveis plasmáticos de ACTH dos animais com lesão bilateral de ED (Bi-ED; n=11) e controles (controle; n=12) avaliados 20 minutos após o teste da tarefa de condicionamento de medo ao som,

\* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey).

### **1. B Efeito da lesão bilateral pré-teste de estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao contexto.**

Como pode ser visto na Figura 12A, os animais com lesão pré-teste de estriado dorsal (n= 12) não diferem dos animais controles (n= 10) no desempenho da tarefa de condicionamento de medo ao contexto. A ANOVA de duas vias revelou que não houve efeito Grupo estatisticamente significativo [ $F_{(1,20)} = 1,00$ ;  $p=0,32$ ], mas o efeito Minuto o foi [ $F_{(4,80)} = 14,55$ ;  $p<0,0001$ ]. Por sua vez, o efeito Interação (Grupo X Minuto) também não foi significativo [ $F_{(4,80)} = 0,28$ ;  $p= 0,88$ ].

A Figura 12B mostra os níveis plasmáticos de ACTH dos animais com lesão bilateral de estriado dorsal (n= 12) e controles (n= 10), após o teste da tarefa de condicionamento de medo ao contexto. Os níveis plasmáticos de ACTH avaliados após o teste de condicionamento de medo ao contexto não foram diferentes entre os animais controles e com lesão bilateral de estriado dorsal (teste *t* de Student,  $t= -0,47$ ;  $p=0,63$ ).



**Figura 12 – Efeito da lesão bilateral pré-teste de ED no condicionamento clássico de medo ao contexto.**

ED = estriado dorsal. **(A)** Tempo de congelamento por minuto (média + erro padrão) dos animais com lesão bilateral de ED (Bi-ED; n=12) e controles (controle; n=10) no teste da tarefa de condicionamento de medo ao contexto. **(B)** Média e erro padrão dos níveis plasmáticos de ACTH dos animais com lesão bilateral de ED (Bi-ED; n=12) e controles (controle; n=10) avaliados 20 minutos após o teste da tarefa de condicionamento de medo ao contexto.

## **EXPERIMENTO 2: Efeito das lesões assimétricas contralateral e ipsilateral pré-teste de CeA-estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som.**

O objetivo deste experimento foi verificar os efeitos de lesões assimétricas contralaterais e ipsilaterais do núcleo central da amígdala e estriado dorsal na expressão da tarefa de condicionamento clássico de medo ao som.

### ***Procedimento experimental***

Neste experimento foram utilizados três grupos de animais: animais que receberam cirurgia controle (grupo controle), animais que receberam lesão eletrolítica de estriado dorsal combinada a lesão eletrolítica de núcleo central da amígdala no hemisfério contralateral (grupo contralateral) e animais que receberam este mesmo tipo de lesão realizada no mesmo hemisfério cerebral (grupo ipsilateral). Após 14 dias do treino na tarefa de condicionamento de medo ao som, os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica, como descrito anteriormente. Sete dias após o procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos ao teste da tarefa de condicionamento de medo ao som. Ao término dos procedimentos comportamentais, os animais foram sacrificados e os encéfalos foram submetidos ao procedimento histológico. O delineamento experimental foi similar aos outros experimentos conduzidos na ETAPA 2 do presente trabalho, com a diferença de que não foram realizadas dosagens de ACTH neste experimento (ver Figura 10).

### ***Resultados***

#### ***Histologia***

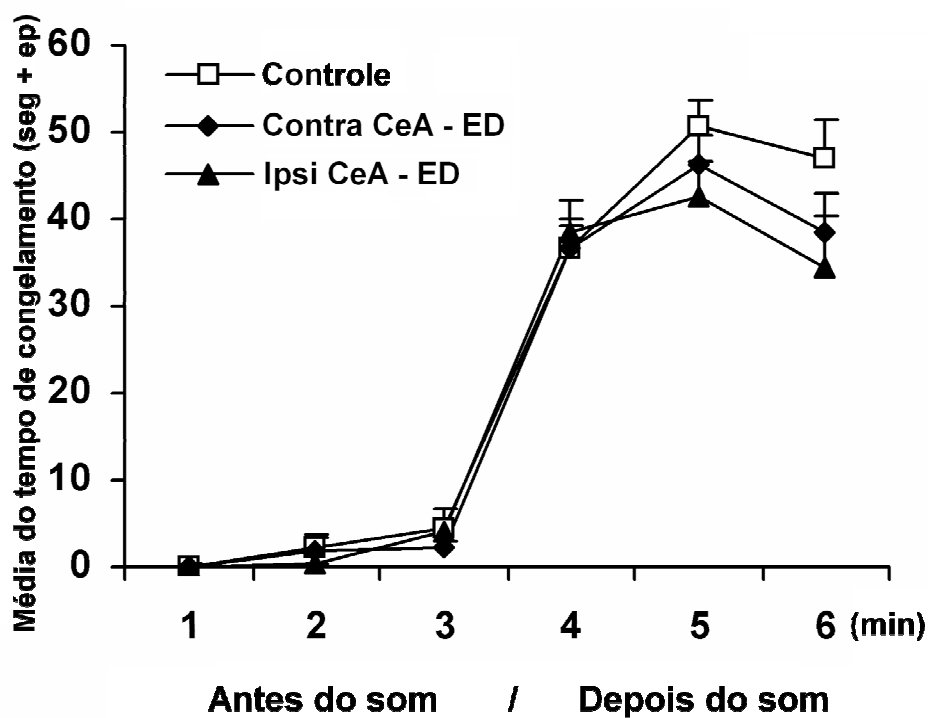
Foram incluídos na análise comportamental apenas os animais que apresentaram lesão unilateral de núcleo central da amígdala, como descrito nos resultados histológicos do experimento 1.1 (ETAPA 1), e que apresentaram contralateral ou ipsilateral à lesão do núcleo central, lesão unilateral de estriado dorsal, como descrito nos experimentos 1.2 (ETAPA 1). Neste experimento quatro animais foram descartados da análise comportamental: dois por apresentarem lesão pequena do CeA e dois por

não apresentarem lesão deste núcleo. Estes resultados estão representados na Figura 5.

### ***Resultado comportamental***

Como pode ser visto na Figura 13, a lesão assimétrica contralateral de CeA-estriado dorsal (grupo contra CeA-ED; n= 7), bem como a lesão destas estruturas no mesmo hemisfério cerebral (grupo ipsi CeA-ED; n= 10), quando realizadas antes do teste da tarefa de condicionamento clássico de medo ao som, não afetou o desempenho dos animais quando comparados ao grupo controle (n= 10). A ANOVA de duas vias mostrou que não houve efeito Grupo estatisticamente significativo [ $F_{(2,25)} = 0,97$ ;  $p=0,39$ ], o mesmo ocorrendo com o efeito Interação (Minuto x Grupo) [ $F_{(10,125)} = 1,42$ ;  $p=0,17$ ]. O efeito Minuto foi estatisticamente significativo [ $F_{(5,125)} = 211,78$ ;  $p<0,0001$ ] e o teste a posteriori de Tukey ( $p<0,05$ ) para este efeito mostrou que todos os grupos apresentaram aumento similar do tempo de congelamento, depois da apresentação do som no dia do teste comportamental.

### Condicionamento de medo ao som



**Figura 13 – Efeito das lesões assimétricas contralateral e ipsilateral pré-teste de CeA-estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som.**

ED= estriado dorsal. Tempo de congelamento por minuto (média + erro padrão) dos animais com lesão contralateral de CeA-ED (Contra CeA-ED; n=7) e lesão ipsilateral de CeA-ED (Ipsi CeA-ED; n=10) e controles (controle; n=11) no teste da tarefa de condicionamento de medo ao som.

Em resumo os resultados obtidos nesta etapa mostraram que:

- 1) A lesão bilateral de estriado dorsal, realizada 14 dias após o treino e 7 dias antes do teste comportamental da tarefa de condicionamento de medo ao som, prejudicou o desempenho na tarefa avaliado através da resposta condicionada de congelamento. Essa mesma lesão não apresentou efeito sobre a liberação de ACTH induzida pelo teste (experimento 1.2).
- 2) Como esperado, a lesão bilateral de estriado dorsal, realizada antes do teste da tarefa de condicionamento de medo ao contexto, não prejudicou a resposta condicionada de congelamento a um ambiente previamente pareado com um estímulo aversivo. E, também, esta mesma lesão não afetou a liberação de ACTH induzida pelo teste da tarefa de condicionamento de medo ao contexto.
- 3) As lesões assimétricas contralateral e ipsilateral de CeA-estriado dorsal, realizadas 14 dias após o treino e 7 dias antes do teste do animal na tarefa de condicionamento de medo ao som, não afetaram o desempenho dos animais neste paradigma.



**ETAPA 3**

## ETAPA 3 - EFEITOS DA INATIVAÇÃO TEMPORÁRIA DE ESTRIADO DORSAL E DA AMÍGDALA NA AQUISIÇÃO E CONSOLIDAÇÃO DO CONDICIONAMENTO DE MEDO AO SOM.

O objetivo geral da ETAPA 3 do presente trabalho foi verificar os efeitos da inativação temporária de estriado dorsal e amígdala sobre os processos de aquisição e consolidação da tarefa de condicionamento de medo ao som.

### MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

#### ***Animais***

Foram utilizados ratos Wistar, machos, de 2-3 meses de idade, pesando de 280 a 350 gramas, mantidos em grupos de 4 animais por gaiola (30x16x18 cm), provenientes do biotério do Departamento de Psicobiologia da UNIFESP-EPM. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e período claro/escuro de 12/12 horas (o período claro começando às 7 horas da manhã), com livre acesso ao alimento e à água (*ad libitum*).

#### ***Cirurgia***

Cada rato foi anestesiado com xilasina na dose de 10mg/kg e quetamina na dose de 90mg/kg, intraperitonealmente e colocado no aparelho estereotáxico. Cânulas-guia de aço inoxidável (23 gauge, 8 mm para a região do estriado e 11 mm para a região do núcleo central da amígdala) foram implantadas e posteriormente fixadas com cimento dental. Mandris de 8 e 11 mm foram colocados em cada cânula-guia para evitar obstruções.

As coordenadas estereotáxicas (Paxinos e Watson, 1997a) para canulação do núcleo central da amígdala usadas neste experimento foram as seguintes:

- 2,4mm posterior ao bregma;
- 4,0 mm lateral à linha média (direita ou esquerda - escolhidas ao acaso para os grupos de animais contralateral e ipsilateral);
- 6,1 mm abaixo da superfície do crânio.

Para a implantação de cânulas-guia no estriado dorsal foram usadas as seguintes coordenadas estereotáxicas (Paxinos e Watson, 1997a):

- 0,7 mm posterior ao bregma;
- 2,5 mm lateral à linha média (direita e/ou esquerda - escolhidas ao acaso para os grupos de animais contralateral e ipsilateral);
- 3,0 mm abaixo da superfície do crânio.

No final da cirurgia cada animal recebeu injeções de pentabiótico (0,2 ml, i.m) e de diclofenaco sódico (0,2 ml, i.p.) e permaneceu em uma caixa aquecida por uma lâmpada de 15 W até a recuperação da anestesia. Posteriormente, cada animal voltou ao biotério onde permaneceu um período mínimo de recuperação da cirurgia de 7 dias, antes de serem iniciados os testes comportamentais. Durante o período de recuperação, os animais foram agrupados em, no máximo, três ratos por gaiola (a maioria permaneceu alojado em pares) e foram manipulados por no mínimo 5 dias antes do procedimento comportamental. Dois dias antes do treino da tarefa comportamental, foi realizada uma limpeza das cânulas-guias - com a ajuda de uma agulha de micro-injeção do mesmo tamanho da cânula - e efetuou-se a troca do mandril de cada cânula para evitar obstruções das mesmas. Este procedimento também foi realizado com o objetivo de familiarizar os animais com o procedimento de micro-injeção.

### ***Drogas***

Com o objetivo de induzir inativação temporária da região estudada as seguintes drogas foram utilizadas: muscimol (0,5 µg/ 0,5 µl, por lado; Sigma) dissolvido em solução salina estéril e lidocaína (cloridrato de lidocaína à 2%; Cristália), num volume de 1 µl por lado.

### ***Procedimento de Microinjeção***

As soluções de muscimol, lidocaína ou salina foram injetadas através de agulhas de microinjeção (30 gauge) que se estendem 2 mm abaixo da cânula-guia. Para a microinjeção cada animal foi cuidadosamente imobilizado, o mandril era retirado e a agulha de microinjeção colocada dentro da cânula-guia. A agulha estava afixada à extremidade de uma seringa Hamilton de 5 µl por meio de um tubo de polietileno (PE-10). As injeções foram controladas por uma bomba de infusão (Modelo Bi2000 – Insight

Equipamentos LTDA), programada para infundir um volume de 0,5  $\mu$ l da solução de Muscimol na velocidade constante de 0,25  $\mu$ l /min e 1,0  $\mu$ l da solução de Lidocaína na velocidade de 0,5  $\mu$ l/ min. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno, antes, durante e após a injeção, confirmava o fluxo da solução. Após o término da injeção, a agulha de microinjeção era deixada dentro da cânula-guia por um minuto adicional, antes de recolocar o mandril. Durante o procedimento de injeção, os animais podiam movimentar-se livremente.

### ***Aparelhos***

Para a tarefa de condicionamento clássico de medo ao som, foram utilizadas a caixa de condicionamento e a câmara de teste descritas na ETAPA 1.

### ***Procedimento Experimental***

#### ***Condicionamento Clássico de Medo ao Som***

No dia 1, **Treino**, após o período de recuperação, cada animal foi colocado, individualmente e por 5 minutos, na caixa de condicionamento e, após este período, recebeu cinco pareamentos som-choque. O treino da tarefa comportamental foi idêntico ao descrito para os experimentos realizados na ETAPA 1.

No dia 2, **Teste**, 24 horas após o treino, cada animal foi colocado na câmara cilíndrica de teste (novo contexto) por 6 minutos, sendo que o procedimento de teste também foi idêntico ao realizado na ETAPA 1.

#### ***Sacrifício dos animais e Histologia***

Para verificar se as cânulas foram implantadas corretamente, após o término dos testes comportamentais os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (10%) e receberam microinjeções de corante azul de metileno (1%), de acordo com o procedimento de injeção descrito anteriormente. Ao final da injeção os animais foram sacrificados, e o cérebro foi removido e congelado a -80°C.

O procedimento histológico foi realizado utilizando-se criostato de congelamento (temperatura interior mantida em torno de -18°C). Para cada cérebro, foram realizados 15-20 cortes com 40 $\mu$ m de espessura cada. As regiões incluíram os núcleos da

amígdala e/ou o estriado dorsal e adjacências, com suficiente margem de segurança. Depois de realizados os cortes, as lâminas foram analisadas a fresco para a visualização do corante e posteriormente submetidas à coloração com violeta de cresil, para localização do traço da cânula.

### **Análise Estatística**

Os parâmetros utilizados para a análise estatística do teste comportamental foram a média do tempo de congelamento por minuto na tarefa de Condicionamento Clássico de Medo ao Som. Os resultados foram analisados através de uma ANOVA de duas vias com um dos fatores repetidos (Grupo x Minuto) e seguidos de teste *a posteriori* de Tukey ( $p < 0,05$ ), quando necessário. Os animais que não apresentaram a localização adequada da cânula, de acordo com o objetivo de cada experimento, foram descartados da análise estatística.

### **EXPERIMENTO 1 - Efeitos da administração pré-treino intra-estriatal de muscimol no condicionamento clássico de medo ao som.**

O objetivo deste experimento foi verificar os efeitos da inativação temporária bilateral do estriado dorsal, antes do treino do animal na tarefa de condicionamento clássico de medo ao som.

### **Procedimento experimental**

Para verificar os efeitos da inativação temporária de estriado dorsal nesta tarefa, dois grupos de animais foram utilizados: animais que receberam a infusão de salina na região do estriado dorsal (grupo salina) e animais que receberam a infusão de muscimol na região do estriado dorsal (grupo muscimol).

Após dois minutos do término do procedimento de microinjeção, os animais foram treinados e, depois de vinte quatro horas, foram testados na tarefa de condicionamento de medo ao som, como descrito nos MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS. O delineamento experimental utilizado pode ser visualizado na Figura 14.

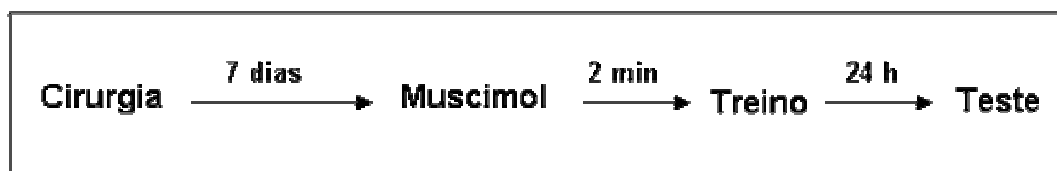
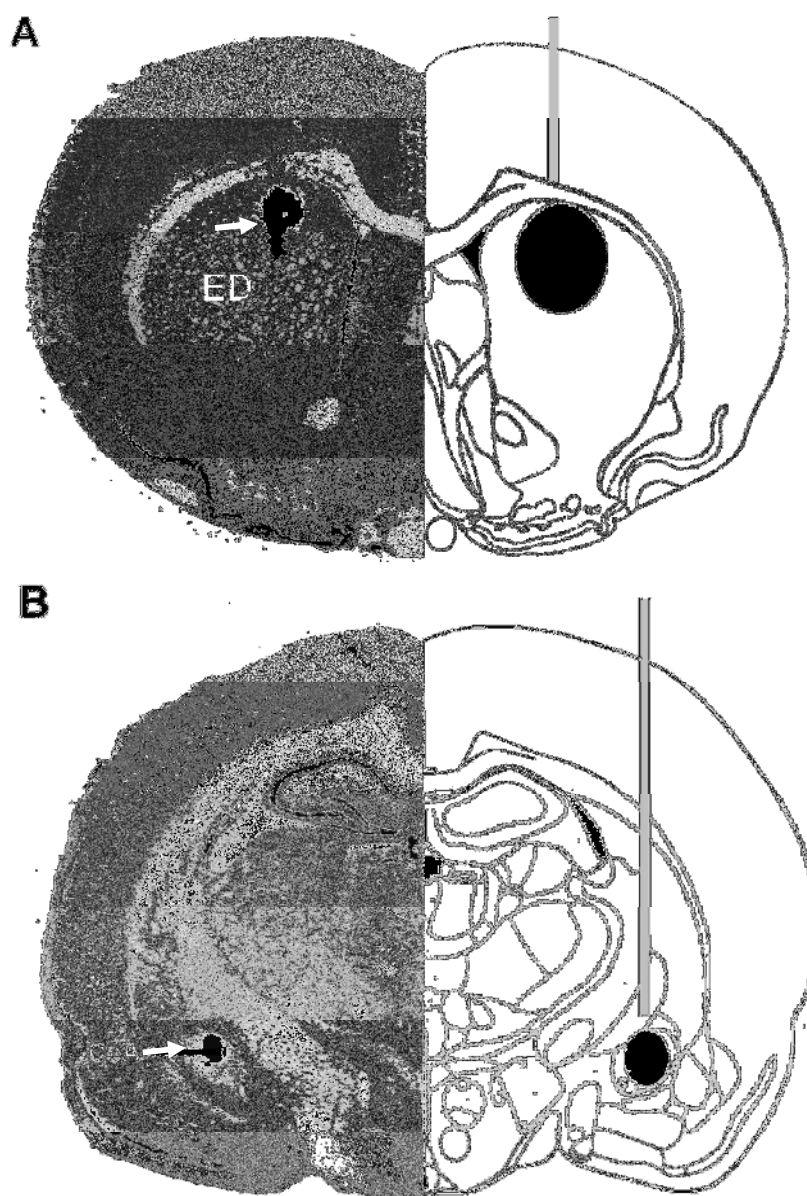


Figura 14 – Delineamento experimental dos Experimentos 1 e 2 da ETAPA 3.

## **Resultados**

### **Histologia**

Os resultados histológicos estão representados na Figura 15A. O traço da cânula-guia estava localizado exatamente acima da porção dorsal do estriado, no corpo caloso. Levando-se em consideração o fato de que a agulha de micro-injeção se estendia por 2 mm além da cânula-guia, a administração de muscimol atingiu uma região bastante similar às regiões atingidas pela lesão eletrolítica de estriado dorsal. Esses dados foram confirmados pela análise da distribuição do corante azul de metileno pela região do estriado dorsal. Neste experimento, apenas um animal foi descartado após a análise histológica, por apresentar a distribuição do corante azul de metileno na região do corpo caloso, não incluindo a região do estriado dorsal.



**Figura 15 – Representações dos resultados histológicos da ETAPA 3.**

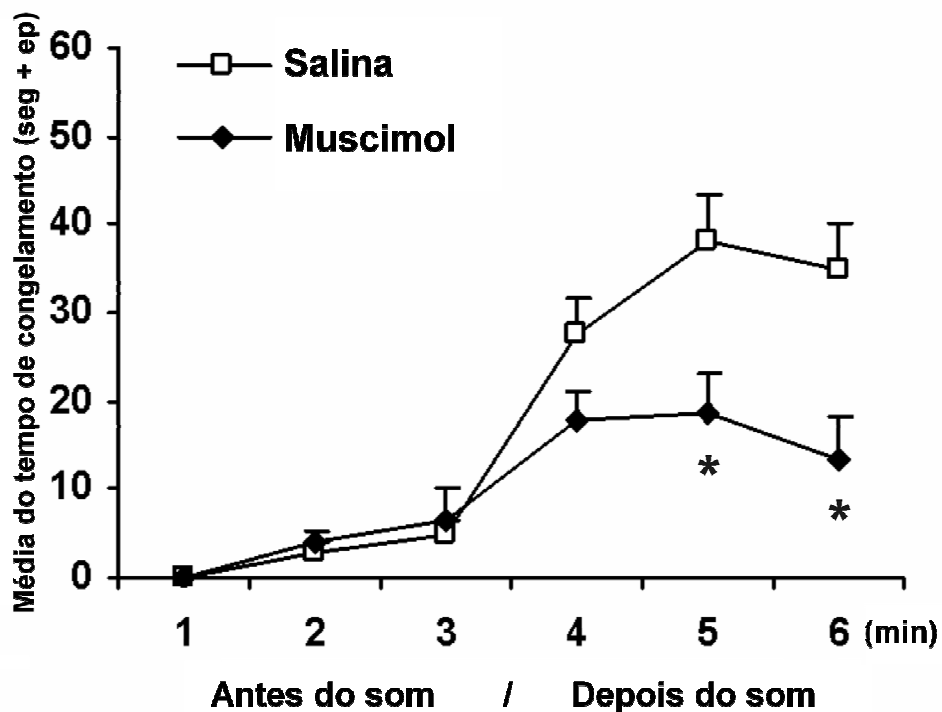
Fotografia de secções coronais do encéfalo do rato, coradas com cresil violeta, mostrando a dispersão do corante azul de metileno (seta). Do lado direito, a área em preto representa o local das microinjeções no estriado dorsal - ED (A) e CeA (B). (adaptado de Paxinos e Watson, 1997b).

### ***Resultado comportamental***

Como pode ser observado na Figura 16, a administração pré-treino de muscimol no estriado dorsal prejudicou o desempenho dos animais no teste de condicionamento de medo ao som. A ANOVA de duas vias revelou que houve efeito Grupo estatisticamente significativo [ $F_{(1,18)} = 5,23$ ;  $p=0,034$ ], o mesmo ocorrendo com o efeito Minuto [ $F_{(5,90)} = 36,45$ ;  $p<0,0001$ ]. O efeito Interação (Grupo x Minuto) também foi significativo [ $F_{(5,90)} = 6,57$ ;  $p<0,001$ ]. O teste a posteriori de Tukey para o efeito Interação mostrou que os animais que receberam muscimol bilateral no estriado dorsal (grupo Muscimol;  $n= 8$ ) imediatamente antes da sessão de treino apresentaram menos tempo de congelamento no quinto e no sexto minutos da sessão de teste, quando comparados ao grupo salina –  $n= 12$  ( $p<0,05$ ).



## Condicionamento de medo ao som



**Figura 16 – Efeitos da administração intra-estriatal de muscimol no condicionamento clássico de medo ao som.**

Tempo de congelamento por minuto (média + erro padrão) dos animais que receberam administração de muscimol (muscimol; n=8) ou salina (salina; n=12) no teste da tarefa de condicionamento de medo ao som.

\* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo salina (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey).

## **EXPERIMENTO 2 - Efeitos da administração pré-treino de muscimol no CeA e no estriado dorsal no condicionamento clássico de medo ao som.**

Este experimento teve como objetivo verificar os efeitos da inativação temporária do CeA combinada com a inativação temporária do estriado dorsal, antes do treino da tarefa de condicionamento clássico de medo ao som.

### ***Procedimento experimental***

Foram utilizados dois grupos de animais neste experimento: grupo contralateral, que recebeu administração de muscimol na amígdala e muscimol no estriado dorsal no hemisfério contralateral, e grupo ipsilateral, que recebeu muscimol na amígdala e muscimol no estriado dorsal no mesmo hemisfério cerebral.

Passados dois minutos do término do procedimento de microinjeção, cada animal recebeu o treino do condicionamento de medo ao som e, 24 horas após, foi testado nesta tarefa, de acordo com o procedimento descrito nos MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS.

O delineamento experimental utilizado pode ser visualizado na Figura 14.

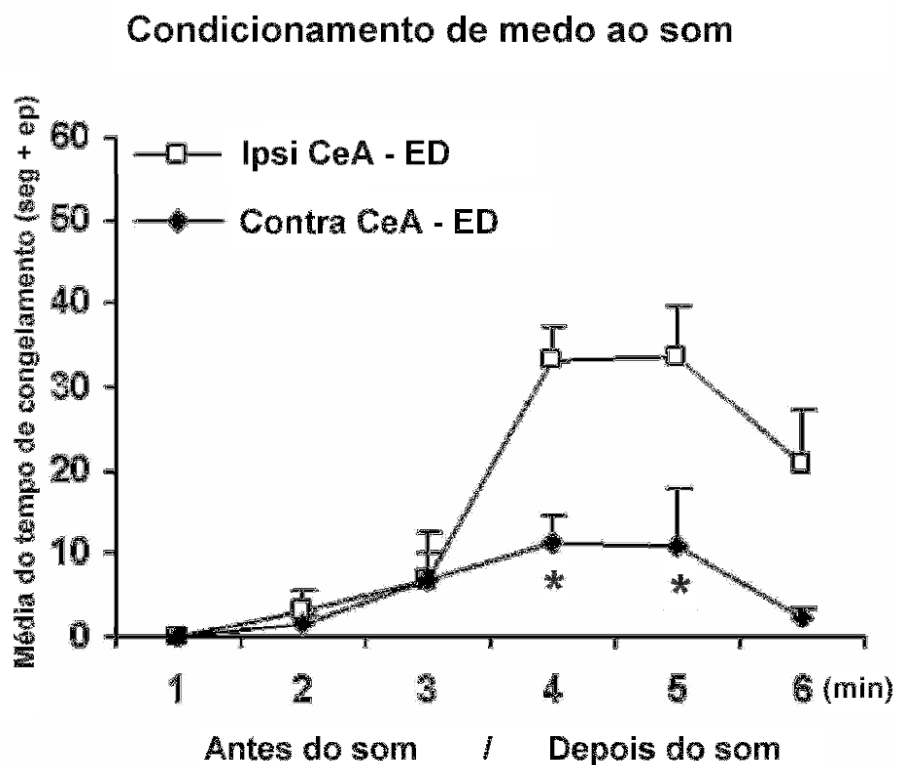
### ***Resultados***

#### ***Histologia***

Os resultados histológicos estão representados na Figura 15. Apenas os animais que apresentaram localização correta da cânula e distribuição do corante azul de metileno nas regiões do estriado dorsal e núcleo central da amígdala foram incluídos na análise estatística. Neste experimento, oito animais foram descartados da análise comportamental: alguns apresentaram distribuição do corante azul de metileno em uma região dorsal ao núcleo central da amígdala, não atingindo este núcleo. Outros ainda apresentaram uma distribuição do corante e localização do traço da cânula na região do núcleo medial da amígdala. Um animal, apesar de ter apresentado localização correta da cânula no núcleo central da amígdala, não apresentou uma localização adequada da cânula na região do estriado dorsal.

**Resultado comportamental**

Como pode ser observado na Figura 17, a administração pré-treino contralateral de muscimol no núcleo central da amígdala e estriado dorsal prejudicou o desempenho dos animais no teste de condicionamento de medo ao som. A ANOVA de duas vias revelou que houve efeito Grupo [ $F_{(1,6)} = 10,59$ ;  $p=0,017$ ] e efeito Minuto [ $F_{(5,30)} = 12,90$ ;  $p<0,0001$ ] significativos. O efeito Interação (Grupo x Minuto) também foi significativo [ $F_{(5,30)} = 4,39$ ;  $p<0,01$ ]. O teste a posteriori de Tukey ( $p<0,05$ ) para a interação mostrou que os animais que receberam administração pré-treino de muscimol contralateral no estriado dorsal e núcleo central da amígdala (grupo contra CeA-ED;  $n= 4$ ) apresentaram menos tempo de congelamento nos minutos 4 e 5 do teste da tarefa de condicionamento de medo ao som, quando comparados a animais que receberam esta mesma manipulação no estriado dorsal e amígdala no mesmo hemisfério cerebral (grupo ipsi CeA-ED;  $n= 4$ ).



**Figura 17 – Efeitos da administração de muscimol no CeA e no ED no condicionamento clássico de medo ao som.**

ED = estriado dorsal. Tempo de congelamento por minuto (média + erro padrão) dos animais que receberam administração de muscimol no CeA combinada a administração contralateral no ED (contra; n=4) ou que receberam administração de muscimol no CeA combinada a administração ipsilateral no ED (ipsilateral; n=4) no teste da tarefa de condicionamento de medo ao som.

\* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo ipsilateral (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey).

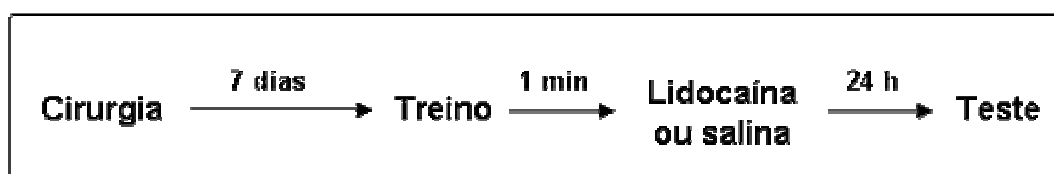
### **EXPERIMENTO 3 - Efeitos da administração pós-treino de lidocaína no estriado dorsal associada à lesão contralateral de CeA na tarefa de condicionamento clássico de medo ao som.**

Este experimento teve como objetivo verificar o efeito da lesão de núcleo central da amígdala associada à inativação temporária de estriado dorsal no hemisfério contralateral e ipsilateral, durante a consolidação da tarefa de condicionamento de medo ao som.

#### ***Procedimento experimental***

Neste experimento foram utilizados três grupos de animais: grupo controle, que recebeu cirurgia controle do núcleo central da amígdala e administração de salina no estriado dorsal no hemisfério contralateral; grupo contralateral, que recebeu lesão eletrolítica unilateral de CeA combinada com a administração de lidocaína no estriado dorsal do hemisfério contralateral; e grupo ipsilateral, que recebeu lesão eletrolítica unilateral de CeA combinada com a administração de lidocaína no estriado dorsal no mesmo hemisfério cerebral. A cirurgia estereotáxica para lesão eletrolítica unilateral do núcleo central da amígdala foi realizada de acordo com os procedimentos cirúrgicos descritos na ETAPA 1.

Imediatamente após o treino do animal na tarefa de condicionamento de medo ao som, foi realizado o procedimento de microinjeção de salina ou lidocaína, como descrito anteriormente. Após 24 horas os animais foram testados na tarefa de condicionamento de medo ao som. O delineamento experimental está resumido na Figura 18.



**Figura 18 – Delineamento experimental do Experimento 3 (ETAPA 3).**

#### ***Resultados***

### **Histologia**

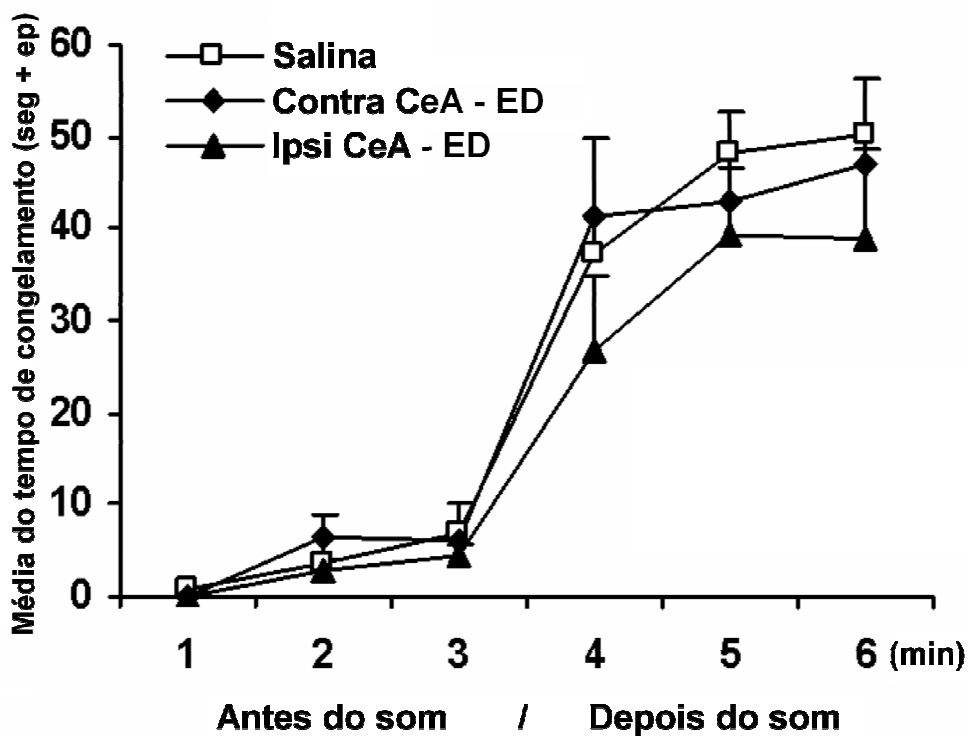
Em geral, os animais apresentaram lesão eletrolítica unilateral do núcleo central da amígdala, como descrito nos resultados histológicos das ETAPAS 1 e 2. Contralateral ou ipsilateral à lesão de CeA, os animais apresentaram localização adequada da cânula-guia e da distribuição do corante azul de metileno na região do estriado dorsal. Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 5 (para lesão eletrolítica de CeA) e 15A (para a posição da cânula e corante no estriado dorsal).

Após a análise histológica do encéfalo, quatro animais foram descartados da análise comportamental, por não apresentarem lesão adequada do CeA.

### **Resultado comportamental**

Como pode ser visto na Figura 19, os animais que receberam lesão do núcleo central da amígdala e administração de lidocaína no estriado dorsal no hemisfério contralateral (grupo contra CeA-ED; n= 6) ou no hemisfério ipsilateral (grupo ipsi CeA-ED; n=6) não foram diferentes entre si e também não apresentaram diferenças quando comparados aos animais controles (grupo salina; n= 11), no teste de condicionamento de medo ao som. A ANOVA de duas vias revelou que neste experimento não foi encontrado efeito Grupo estatisticamente significativo [ $F_{(2,20)} = 0,89$ ;  $p=0,42$ ], o mesmo ocorrendo com o efeito Interação (Grupo x Minuto) [ $F_{(10,100)} = 0,64$ ;  $p=0,77$ ]. O efeito Minuto foi significativo [ $F_{(5,100)} = 80,50$ ;  $p < 0,0001$ ]. O teste a posteriori para este efeito mostrou que, de uma forma geral, os animais aumentaram o tempo de congelamento após a apresentação do som.

## Condicionamento de medo ao som



**Figura 19 – Efeitos da administração de lidocaína no estriado dorsal associada à lesão contralateral de CeA na consolidação do condicionamento clássico de medo ao som.**

ED = estriado dorsal. Tempo de congelamento por minuto (média + erro padrão) de animais com lesão de CeA combinada a administração de lidocaína no ED contralateral (Contra CeA-ED; n=6), ipsilateral (Ipsi CeA-ED); n=6) e de animais que receberam cirurgia controle de CeA e administração de salina no ED contralateral (salina; n=11) no teste da tarefa de condicionamento de medo ao som.

Em resumo os resultados obtidos na ETAPA 3 revelaram que:

- 1) A administração de muscimol bilateral na região do estriado dorsal imediatamente antes do treino prejudicou o desempenho dos animais na tarefa de condicionamento de medo ao som.
  
- 2) A inativação temporária pré-treino de estriado dorsal combinada com a inativação da amígdala no hemisfério contralateral prejudicou o desempenho dos animais na tarefa de condicionamento de medo ao som.
  
- 3) A lesão do núcleo central da amígdala combinada com a inativação de estriado dorsal, imediatamente após o treino da tarefa de condicionamento de medo ao som, não afetou o desempenho dos animais nesta tarefa.

Na tabela a seguir pode ser observado um resumo dos resultados encontrados nos experimentos de todas as etapas realizadas.



**QUADRO 1. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NAS ETAPAS 1, 2 E 3**

Etapa	Experimento	Objetivo	Grupo	Resultado		Conclusão
				CMS	CMC	
1	1.1	Verificar os efeitos de lesões pré-treino de CeA nas tarefas de CMS e CMC	Bi-CeA Uni-CeA	↓ =	↓ =	A lesão bilateral de CeA prejudicou o CMS e o CMC. Os animais com lesão unilateral não foram diferentes dos controles nestas mesmas tarefas.
	1.2	Verificar os efeitos de lesões pré-treino de ED nas tarefas de CMS e CMC	Bi-ED Uni-ED	↓ =	= =	A lesão bilateral de ED prejudicou o CMS, mas não o CMC. Os animais com lesão unilateral não foram diferentes dos controles nestas mesmas tarefas.
	2.1 e 2.2	Verificar os efeitos de lesões pré-treino assimétricas de CeA-ED nas tarefas de CMS e CMC	Contra CeA-ED Ipsi CeA-ED	↓ =	= -	A lesão contralateral de CeA-ED prejudicou o desempenho dos animais na tarefa de CMS, mas não no CMC. A lesão ipsilateral de CeA-ED não afetou o CMS.
2	1.1 e 1.2	Verificar os efeitos de lesões pré-teste de ED nas tarefas de CMS e CMC	Bi-ED Bi-ED (ACTH)	↓ =	= =	A lesão bilateral de ED realizada antes do teste prejudicou a resposta somatomotora de congelamento ao som, mas na ao contexto. Os níveis de ACTH não foram afetados por esta lesão.
	2	Verificar os efeitos de lesões assimétricas pré-teste de CeA-ED na tarefa de CMS	Contra CeA-ED Ipsi CeA-ED	= =	- -	As lesões contralateral e ipsilateral de CeA-ED realizada antes do teste não afetaram a tarefa de CMS.
3	1	Verificar os efeitos da inativação temporária pré-treino de ED na tarefa de CMS	Muscimol Bi-ED	↓	-	A administração de muscimol no ED antes do treino prejudicou a aquisição/ consolidação da tarefa de CMS.
	2	Verificar os efeitos da inativação temporária pré-treino de CeA-ED na tarefa de CMS	Muscimol Contra CeA-ED Muscimol Ipsi CeA=ED	↓ =	- -	A administração de muscimol contralateral de CeA-ED antes do treino afetou a tarefa de CMS. A inativação destas estruturas no mesmo hemisfério cerebral não teve efeito.
	3	Verificar os efeitos da lesão de CeA combinada a inativação de ED após o treino na tarefa de CMS	Lidocaína Contra CeA-ED Lidocaína Ipsi CeA-ED	= =	- -	A administração de lidocaína no ED combinada à lesão de CeA no hemisfério contralateral ou ipsilateral não afetou a consolidação do CMS.

Bi: lesão bilateral; Uni: lesão unilateral; Contra: lesão contralateral; Ipsi: lesão ipsilateral; ED: estriado dorsal; CMS: condicionamento de medo ao som; CMC: condicionamento de medo ao contexto; “↓” : prejuízo; “=” : sem efeito; “-” : teste não realizado

# DISCUSSÃO

## DISCUSSÃO

O presente trabalho pretendeu consolidar a idéia já levantada anteriormente em nosso laboratório de que o estriado dorsal estaria envolvido no processamento de alguns aspectos da memória emocional, especificamente na expressão de uma resposta somatomotora comportamental eliciada por um estímulo condicionado a um evento aversivo. O condicionamento clássico de medo é um dos paradigmas mais utilizados na literatura para se investigar a memória emocional, e mais especificamente a memória do medo, com mais de 1800 trabalhos publicados nos últimos 10 anos (ISI Web of Knowledge, 2007) . O aprendizado acerca de estímulos que sinalizam a vinda de um evento aversivo apresenta importância biológica que pode ser inferida por exemplo, pela conservação deste tipo de condicionamento ao longo da escala filogenética – de invertebrados a mamíferos. São bem conhecidos os trabalhos de Eric R. Kandel caracterizando os circuitos neuronais que participam do condicionamento clássico aversivo em invertebrados, bem como os processos bioquímicos e moleculares envolvidos nesta forma de aprendizado. Em mamíferos, os circuitos neurais são complexos e, apesar dos muitos estudos existentes, várias lacunas ainda permanecem.

Há algum tempo acredita-se que a amígdala esteja envolvida com o condicionamento clássico de medo em animais de laboratório (Blanchard & Blanchard, 1972; Davis, 1992; Phillips & LeDoux, 1992; Hitchcock & Davis, 1991; Kim et al., 1993; Lavond et al., 1993; LeDoux, 1995). Alguns estudos em seres humanos também têm revelado o papel da amígdala nessa forma de aprendizagem (para revisão ver, LaBar & Cabeza, 2006). Pacientes portadores da doença genética de Urbach-Wiethe (que apresentam patologia bilateral de amígdala) apresentam déficits no condicionamento de medo (Bechara et al., 1995). Esses resultados sugerem que os mecanismos neurais do medo condicionado partilhem semelhanças entre roedores e primatas.

Em roedores, os núcleos da amígdala relevantes para o medo condicionado são o LA, o BLA, o BMA e o CeA. Os três primeiros núcleos formam o complexo basolateral da amígdala (cBLA), que é considerado um sistema responsável pela interface sensorial na amígdala (LeDoux et al., 1990a; Price, 2003). Assim, lesões dos núcleos que compõem o cBLA provocam prejuízo na aquisição e expressão do medo condicionado, independente do tipo de estímulo sensorial usado como estímulo condicionado (LeDoux et al., 1990b; Campeau & Davis, 1995; Maren et al., 1996a;

Phillips & LeDoux, 1992). O LA recebe informações sobre estímulos discretos (de uma única modalidade sensorial) provenientes dos relés talâmicos, e lesão desta estrutura afeta o condicionamento de medo ao som e à luz (LeDoux et al., 1990b; Campeau & Davis, 1995). Já o BLA recebe informações da formação hipocampal, via subiculum, o que estaria de acordo com o envolvimento do BLA no condicionamento de medo ao contexto, mas não ao som (Nader et al., 2001; Anglada-Figueroa & Quirk, 2005; Onishi, 2005). Ou seja, o perfil de resultados observados após a lesão de BLA é semelhante ao observado após a lesão de hipocampo (Kim & Fanselow, 1992; Phillips & LeDoux, 1992; Anagnostaras et al., 1999). Esses dados permitem incluir a amígdala no contexto de sistemas múltiplos de memória, sendo que o BLA estaria relacionado ao hipocampo e portanto envolvido na associação de informações espaciais com estímulos aversivos.

As informações processadas pelo BLA e LA são direcionadas para o CeA (indiretamente, no caso do LA), que pode ser considerado como uma interface da amígdala com os sistemas responsáveis pela elaboração das respostas de medo (para revisões ver, Maren, 2001; LeDoux, 2000; Price, 2003). Desta forma, foi verificado que a lesão deste núcleo interfere com as diversas respostas de medo condicionado tanto ao som quanto ao contexto (Kapp et al., 1979; Hitchcock & Davis, 1986; Sananes & Campbell, 1989; Kim et al., 1993; Sullivan et al., 2004). Já as lesões de diferentes estruturas aferentadas pelo CeA, como por exemplo o hipotálamo lateral, a PAG e núcleo reticular pontino prejudicam seletivamente as respostas autonômicas ou comportamentais de medo mediadas por cada estrutura (Iwata et al., 1986; LeDoux et al., 1988; Hitchcock & Davis, 1991). Recentemente, foi proposto que além do papel já descrito na expressão da resposta condicionada aversiva, o CeA poderia também participar da aquisição do condicionamento de medo (para revisão ver Paré et al., 2004; Wilensky et al., 2006).

Na primeira etapa deste trabalho foram realizadas lesões eletrolíticas antes do treino do animal nas tarefas de condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto. Os resultados observados no Experimento 1.1 (Etapa 1) mostraram que a lesão bilateral do CeA prejudicou o desempenho dos animais em ambas as tarefas. Esses resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que mostraram que a lesão seletiva deste núcleo prejudica o desempenho dos animais nos dois tipos de condicionamento (Campeau & Davis, 1995; Nader et al., 2001; Sullivan et al., 2004; Wilensky et al., 2006), sugerindo o envolvimento do CeA na mediação da memória emocional. No primeiro experimento deste estudo também foi observado que os

animais com lesão unilateral do CeA não tiveram prejuízo nas tarefas comportamentais estudadas.

Este último resultado é bastante relevante ao considerarmos que um dos objetivos do presente estudo foi verificar uma possível interação entre a amígdala e o estriado dorsal na mediação do condicionamento de medo ao som usando a técnica de lesões assimétricas, também conhecida como desconexão funcional. A técnica de lesão assimétrica é baseada no princípio de que lesões unilaterais de duas estruturas que apresentam conexões predominantemente ipsilaterais, como as projeções indiretas entre o CeA e o estriado dorsal, quando realizadas em hemisférios cerebrais opostos, permitem avaliar o papel funcional desta via. Antes de realizar o experimento para testar esta hipótese, também foi necessário confirmar os efeitos da lesão bilateral de estriado e verificar o efeito de lesões unilaterais desta estrutura nas tarefas utilizadas.

No Experimento 1.2 (Etapa 1) foi verificado que a lesão bilateral de estriado dorsal prejudicou o desempenho dos animais na tarefa de condicionamento de medo ao som, mas não interferiu no desempenho da tarefa de condicionamento de medo ao contexto. Estes resultados confirmam os resultados prévios encontrados pelo grupo (Ferreira et al., 2003) e mostram que a lesão unilateral desta estrutura, da mesma forma como a lesão unilateral de CeA, não interferiu com o desempenho em nenhuma das tarefas utilizadas.

O estriado dorsal é uma estrutura considerada classicamente como envolvida em processos motores, mas há algum tempo foi sugerido o seu envolvimento também em processos de aprendizagem e memória (Mishikin & Petri, 1984; Potegal, 1969; 1972). Pacientes portadores da doença de Parkinson e Huntington, que sabidamente apresentam déficits de motricidade relacionados a disfunções estriatais, também apresentam prejuízos cognitivos em uma série de testes neuropsicológicos utilizados para avaliar processos de aprendizagem e memória (Martone et al., 1984; Saint-Cyr et al., 1988; Knowlton et al., 1996; Butters et al., 1985). Também já foi observado o envolvimento do estriado em tarefas de aprendizagem e memória em animais de laboratório. A maioria desses estudos utilizaram tarefas de labirinto, como o labirinto aquático, o labirinto em T e o labirinto radial, e os animais com lesão de estriado dorsal apresentaram prejuízo na aquisição de versões destas tarefa que avaliavam aprendizagem do tipo S-R (Packard et al, 1989; Packard & McGaugh, 1992; 1996; Packard & White, 1990). Este tipo de aprendizado não é afetado pela lesão de hipocampo (Oliveira et al., 1997; Packard et al, 1989; Packard & McGaugh, 1992;

1996). Portanto, tais dados estão de acordo com a idéia lançada na literatura de que essas estruturas seriam parte de sistemas múltiplos e distintos de memória (White & McDonald, 2002).

O paradigma utilizado no presente estudo - condicionamento clássico de medo – é uma tarefa do tipo S-S e não do tipo S-R e, ainda assim, de acordo com os presentes resultados, a lesão de estriado dorsal provocou um prejuízo no desempenho dos animais. Apesar da maioria dos estudos encontrados na literatura atribuírem um papel para o estriado dorsal nas tarefas de aprendizagem e memória que envolvem componentes S-R (White & McDonald, 2002), também existem trabalhos antigos que mostram que o estriado dorsal poderia mediar o condicionamento clássico de medo a um estímulo discreto (Powel et al., 1978; Kao & Powell, 1988). Em particular, Powel et al. (1978) mostraram que a lesão desta estrutura cerebral prejudica a resposta condicionada de piscar o olho em coelhos. Nesse trabalho, um estímulo discreto (som) foi pareado a um estímulo aversivo - choque no olho do animal - e, após alguns pareamentos, o som eliciava a resposta condicionada de piscar. Esta resposta somatomotora condicionada foi afetada pela lesão estriatal, que não interferiu com a resposta de batimento cardíaco eliciada pelo som, assim como com outras respostas motoras, sugerindo que a lesão não interferia com a atividade motora de forma generalizada (Powell et al., 1978).

Em um trabalho recente, foi verificado que tanto a porção dorsomedial quanto a porção dorsolateral do estriado estão envolvidas (embora de formas diferentes) na mediação do paradigma de transferência pavloviana-instrumental (PIT, do inglês “pavlovian-instrumental transfer paradigm”; Corbit & Janak, 2007). Neste tipo de tarefa, o animal recebe um treino pavloviano (onde um estímulo discreto é pareado a uma recompensa) e um treino instrumental (onde uma resposta, como por exemplo pressionar uma barra, é também reforçada pela mesma recompensa), em sessões de treino independentes. Em geral, no teste comportamental é observado que a apresentação do estímulo condicionado aumenta o número de respostas instrumentais (pressionar a barra). A inativação de estriado dorsolateral prejudicou esse aumento no teste de transferência. Por outro lado, a inativação de estriado dorsomedial não afetou o aumento da transferência, mas prejudicou a seletividade do estímulo em provocar esse aumento. Em outras palavras, o animal também respondeu a um estímulo não pareado (Corbit & Janak, 2007). Em conjunto com os resultados observados na

literatura, os dados obtidos no presente estudo sugerem que o estriado dorsal pode estar envolvido com outros tipos de tarefas de aprendizagem e memória, como o condicionamento clássico, além do papel descrito nos processos de aprendizagem do tipo S-R.

Há algum tempo foi sugerido na literatura que o estriado dorsal possa estar envolvido na elaboração ou coordenação de uma resposta condicionada adequada, frente a um estímulo sensorial que foi pareado a um evento biologicamente importante (para revisão ver Schultz et al., 2003). Na Etapa 2 (Experimento 1), foi verificado o envolvimento do estriado dorsal na expressão da resposta condicionada de congelamento ao som e ao contexto. O desenho experimental utilizado foi baseado no trabalho de Kim e Fanselow, 1992, no qual foram realizadas lesões de hipocampo em vários momentos, após o treino do animal na tarefa de condicionamento de medo ao contexto (lesões pré-teste). Ao utilizar este protocolo, é possível criar um intervalo entre o treino e o teste, e manipulações realizadas neste intervalo permitem interferir em processos específicos do condicionamento. Por exemplo, na segunda etapa deste estudo, a lesão realizada 14 dias após o treino permitiu verificar o papel do estriado durante a expressão comportamental e evitar que o efeito desta manipulação fosse devido a interferências nos processos de aquisição e consolidação recente da tarefa de memória. Nos resultados do Experimento 1 (Etapa 2) foi observado que a lesão pré-teste de estriado dorsal, realizada após o treino do animal, prejudicou o desempenho dos mesmos apenas no condicionamento de medo ao som, sem interferir com o condicionamento de medo ao contexto. Estes achados sugerem que o estriado dorsal está envolvido na expressão do comportamento de congelamento durante a evocação da tarefa de condicionamento de medo ao som. A dissociação de desempenho observada tanto após a lesão pré-treino de estriado (Experimento 1.2 - Etapa 1), quanto após a lesão pré-teste (Experimento 1 - Etapa 2) nas tarefas de condicionamento de medo, permite supor que a lesão não prejudicou de forma generalizada a expressão do comportamento motor, já que os animais foram capazes de expressar a resposta de congelamento quando expostos, no dia do teste da tarefa, ao mesmo ambiente do treino. Em conjunto, esses resultados podem sugerir que a lesão de estriado não prejudica a habilidade do animal de aprender a associação estímulo condicionado-estímulo incondicionado, uma função usualmente atribuída à amígdala (Fanselow & LeDoux, 1999), mas pode interferir com o comportamento somatomotor em resposta a um estímulo condicionado explícito e discreto como um

som. É importante ressaltar que o estriado dorsal parece não estar envolvido neste comportamento somatomotor quando o estímulo condicionado utilizado é complexo e envolve múltiplas modalidades sensoriais, como no caso do contexto. De fato, muitos estudos não verificaram efeito da lesão estriatal em tarefas de aprendizagem e memória espaciais (Packard & McGaugh, 1992; Packard et al., 1989; Oliveira et al., 1997).

No trabalho de Kim e Fanselow, 1992, foi verificado que apenas a lesão de hipocampo, realizada um dia após o treino, prejudicou o desempenho dos animais na tarefa de condicionamento contextual de medo. Este efeito não foi observado quando a lesão foi realizada 7, 14 ou 28 dias após a sessão de treino. Esses resultados sugerem que o hipocampo tem uma função limitada temporalmente neste tipo de tarefa e que esta estrutura não parece ser essencial para a expressão da resposta comportamental aprendida relativa a associações contextuais adquiridas muito tempo antes. Os resultados encontrados no Experimento 1 da Etapa 2 sugerem que a natureza do prejuízo de memória provocado pela lesão do estriado dorsal no condicionamento clássico de medo é diferente daquela atribuída ao prejuízo provocado pela lesão de hipocampo, pois a lesão estriatal realizada 14 dias após o treino também interferiu no desempenho do condicionamento de medo ao som.

O congelamento, medida usada como resposta condicionada no presente estudo, é uma das respostas de medo que podem ser eliciadas após a apresentação de um estímulo que foi previamente pareado a um estímulo incondicionado aversivo. Contudo, após a apresentação do estímulo condicionado, também são observadas outras respostas de medo como, por exemplo, aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial e alterações neuroendócrinas, como liberação de ACTH e glicocorticóides (Cohen & Randall, 1984; LeDoux, 1993, Iwata & LeDoux, 1988; Van de Kar et al., 1991; Sullivan et al., 2004). Alguns autores utilizaram também essas respostas de medo como medida de condicionamento (Sullivan et al., 2004; LeDoux et al., 1983; 1988; Iwata & LeDoux, 1988). No Experimento 1 (Etapa 2) também foram avaliados os níveis de ACTH plasmático, vinte minutos após o teste das tarefas comportamentais, nos animais controles e animais que receberam lesão bilateral de estriado. Os resultados mostraram que a lesão de estriado dorsal não interferiu com a resposta neuroendócrina (ACTH) induzida pelo teste das tarefas de condicionamento de medo ao som e ao contexto. Assim, foi observado que, apesar da lesão de estriado dorsal prejudicar o desempenho dos animais no condicionamento de medo ao som,



avaliado pela resposta de congelamento, essa mesma lesão não afetou a liberação de ACTH após o teste da tarefa aversiva. Esses achados fortalecem a hipótese de que o estriado não seria responsável pela associação do estímulo condicionado-estímulo incondicionado, pois neste caso a lesão desta estrutura deveria também afetar a resposta neuroendócrina, como acontece, por exemplo, após a lesão de CeA (Sullivan et al., 2004). Os resultados do presente experimento estão de acordo com o que foi relatado por Powell et al. (1978) que observaram que a lesão de estriado prejudicou o desempenho da resposta condicionada de piscar, enquanto que o batimento cardíaco não foi afetado. Também Reyes-Vazquez et al., em 1979, mostraram que uma lesão eletrolítica quase total do estriado, incluindo parte do núcleo accumbens, não interferiu com a resposta autonômica de batimento cardíaco. Em conjunto com os dados do presente trabalho, esses resultados sugerem que as alterações autonômicas e neuroendócrinas induzidas pela apresentação de um estímulo condicionado aversivo não são mediadas pela região do estriado dorsal. Por outro lado, as respostas condicionadas somatomotoras, de piscar em coelhos e de congelamento em roedores, parecem ser de alguma forma mediadas por esta região.

Deve ser citado que algumas respostas de medo podem não refletir as características associativas do condicionamento clássico aversivo. Por exemplo, Iwata e Ledoux (1988) verificaram que as respostas de congelamento e de aumento da pressão arterial que são observadas em animais que receberam apresentação pareada de som e choque são diferentes das respostas observadas em animais que receberam apresentações randômicas destes estímulos (pseudo-condicionamento). Contudo, a resposta de aumento do batimento cardíaco frente a um estímulo condicionado não foi diferente entre os animais condicionados e pseudo-condicionados, o que levanta a hipótese de que o batimento cardíaco pode não ser uma resposta adequada para avaliar o condicionamento de medo em animais. Assim, outros estudos seriam necessários para estabelecer se a resposta de liberação de ACTH é decorrente ou não das propriedades associativas do condicionamento utilizado no presente estudo. Independentemente disso, a mesma lesão de estriado dorsal que diminui o tempo de congelamento dos animais durante o teste de condicionamento de medo ao som não interferiu com a liberação de ACTH após o teste desta mesma tarefa.

As alterações neuroendócrinas, comportamentais e autonômicas, provocadas pela apresentação de um estímulo condicionado previamente pareado a uma experiência aversiva, são mediadas pelo CeA (para revisões ver LeDoux, 2000; Davis,

1992;2000). Projeções desta estrutura para regiões do tronco encefálico e hipotálamo parecem mediar separadamente as diversas respostas de medo (Iwata et al., 1986; LeDoux et al., 1988). Por exemplo, a lesão da PAG interferiu com a resposta condicionada de congelamento, mas não com a resposta de aumento da pressão arterial a um estímulo previamente pareado com choque (LeDoux et al., 1988). Como a lesão de estriado dorsal prejudicou a resposta de congelamento no condicionamento clássico de medo ao som, pode-se esperar que a interação entre o CeA e o estriado dorsal seja importante para este tipo de tarefa.

O Experimento 2 da Etapa 1 teve como objetivo avaliar o papel das conexões entre a amígdala e o estriado dorsal na memória emocional. Para isso, foi realizada uma lesão unilateral do CeA, combinada a uma lesão unilateral do estriado dorsal no hemisfério contralateral ou ipsilateral. Os resultados obtidos no Experimento 2.1 (Etapa 1) mostraram que a lesão assimétrica contralateral pré-treino de CeA e estriado dorsal prejudicou o desempenho dos animais na tarefa de condicionamento de medo ao som, ao passo que a lesão destas estruturas no mesmo hemisfério cerebral (grupo ipsilateral) não interferiu com o desempenho da tarefa. A ausência de prejuízo no desempenho dos animais com lesão ipsilateral, permite descartar a possibilidade do prejuízo observado após a lesão contralateral ser decorrente da soma dos efeitos individuais de cada lesão unilateral. Além disso, essa mesma lesão assimétrica contralateral, que prejudicou o desempenho do condicionamento auditivo, não afetou o desempenho da tarefa de condicionamento de medo ao contexto (Experimento 2.2, Etapa1), o que indica que o prejuízo observado não foi devido a alterações motoras ou motivacionais dos animais lesados. Esses achados sugerem que existe uma interação cooperativa entre a amígdala e o estriado na mediação do condicionamento de medo ao som.

Embora não existam projeções diretas entre o CeA e o estriado dorsal, o CeA envia densas projeções para a porção lateral da substância negra compacta (SNc) e para o núcleo retrorubral (RR) (Gonzales & Chesselet, 1990; Fudge & Haber, 2000; Shammah-Lagnado et al., 2001; Lee et al., 2005), os quais, por sua vez, enviam substanciais eferências dopaminérgicas ao estriado dorsal (Beckstead et al., 1979; Deutch et al., 1988). Estas projeções amigdalofugais se originam primariamente na porção medial do CeA, região considerada como a via de saída do medo condicionado pavloviano (Fendt & Fanselow, 1999; Maren, 2001; Paré et al., 2004) e um dos alvos lesados no presente estudo. Como as projeções do CeA para a SNc e para o RR e as

projeções da SNc e RR para o estriado dorsal são ipsilaterais, a lesão assimétrica realizada no presente estudo permite verificar a função da via ascendente amígdalo-estriatal no medo condicionado. Os resultados do Experimento 2 (Etapa 1) sugerem que o condicionamento clássico de medo ao som depende de uma comunicação indireta entre a amígdala e o estriado. Em conjunto, esses dados indicam ainda que, além da PAG e outras estruturas do tronco encefálico responsáveis pelas respostas condicionadas de medo (LeDoux, et al., 1988), o estriado - uma estrutura prosencefálica - está envolvida nas respostas condicionadas somatomotoras aversivas.

Muitos trabalhos indicaram que a PAG ventrolateral é uma estrutura crítica para a expressão da resposta de congelamento no condicionamento clássico de medo (LeDoux et al., 1988; Carrive et al., 1997; 2000; Vianna et al., 2001). O prejuízo observado na resposta condicionada de congelamento após lesão bilateral do CeA (Goosens & Maren, 2001; Nader et al., 2001; Zimmerman et al., 2007; Experimento 1-Etapa 1) é atribuído às projeções diretas e ipsilaterais do CeA para a PAG (Rizvi et al., 1991; Pitkänen, 2000). Por exemplo, a inativação temporária do CeA ou da via amígdalofugal com lidocaína reduziu a resposta condicionada de congelamento em ratos, e esta redução no congelamento se correlacionou com uma diminuição na expressão da proteína Fos na PAG ventrolateral, do mesmo lado de onde ocorreu a administração da droga (Carrive et al., 2000). Esses resultados estão de acordo com a hipótese encontrada na literatura de que as projeções do CeA para a região da PAG estão envolvidas na mediação da resposta condicionada de congelamento (Ledoux, 2000; Fendt & Fanselow, 1999).

Os resultados observados no presente trabalho sugerem que o estriado dorsal está envolvido na mediação da resposta condicionada de congelamento ao som. Existe a possibilidade de que o envolvimento do estriado dorsal esteja relacionado à função da PAG em mediar a resposta de congelamento. Dados provenientes de estudos anatômicos sugerem que o estriado poderia influenciar a atividade da PAG de forma indireta, através de uma via oligosináptica. A substância negra reticulata (SNr) - considerada uma das principais vias de saída do estriado dorsal - envia projeções diretas, embora modestas, para a região da PAG (Beckstead et al., 1979; Beitz, 1982; Kirouac et al., 2004; Cebrian et al., 2005). Por outro lado, as informações processadas pelos núcleos da base, e mais precisamente pelo estriado dorsal, podem ser direcionadas à PAG através de uma estação sináptica em um distrito da formação reticular mesencefálica, conhecido como núcleo mesencefálico profundo (Spann &

Grofová, 1991; Rodriguez et al., 2001; Cebrian et al., 2005). Este núcleo compartilha muitas características com a SNr (Rodriguez et al., 2001), mas, diferente desta, envia consideráveis projeções para a PAG ventrolateral (Kirouac et al., 2004).

De acordo com o modelo de funcionamento dos gânglios da base, proposto por Alexander et al., 1986, o estriado participa de um circuito neural baseado em alças paralelas córtico - núcleos da base – tálamo - cortical (ver figura 1). Contudo, além de se projetar para o tálamo e, de forma indireta, para o córtex, as estruturas da via de saída dos núcleos da base se projetam também para as regiões do tronco encefálico, como citado anteriormente. Estudos neuroanatômicos recentes sugeriram que o axônio principal do neurônio da via de saída dos núcleos da base se direciona para o tronco encefálico, e não para os núcleos talâmicos (Parent et al., 2001). Isto poderia indicar que o papel do estriado na expressão da resposta de congelamento possa estar mais relacionado à interação desta estrutura subcortical com estruturas do tronco encefálico, como por exemplo a PAG, do que com estruturas talâmicas e corticais. De fato, LeDoux et al. (1983) não observaram efeitos da lesão do córtex auditivo no condicionamento de medo ao som, e sugeriram que estruturas subcortical, como o colículo inferior, o CGM e a amígdala são suficientes para o desempenho desta tarefa. No mesmo sentido, o condicionamento de piscar em coelhos também não é afetado após a remoção do córtex cerebral (Thompson & Krupa, 1994).

A lesão assimétrica contralateral realizada antes do treino, que prejudicou o desempenho da tarefa de condicionamento de medo ao som, não interferiu no desempenho dos animais na tarefa de condicionamento de medo ao contexto. Estes resultados estão de acordo com os previamente obtidos (Experimento 1.2 - Etapa 1; Ferreira et al., 2003), nos quais não foi observado um efeito da lesão de estriado no condicionamento contextual - uma tarefa hipocampo-dependente. Usando o desenho experimental de lesão assimétrica, Everitt et al., em 1991, verificaram o efeito de lesão bilateral do BLA, do estriado ventral, do estriado dorsolateral e lesão assimétrica (unilateral do BLA e contralateral do estriado ventral) no desempenho dos animais durante o teste de preferência condicionada ao lugar. Neste paradigma um reforço é geralmente pareado a um determinado ambiente, e este pareamento elicia o comportamento de aproximação deste contexto, mesmo na ausência do estímulo reforçador. Eles observaram que a lesão bilateral da amígdala ou bilateral do estriado ventral, feita após a aquisição do condicionamento, aboliu o mesmo. A lesão bilateral de estriado dorsal não interferiu com a tarefa, mas a lesão unilateral da amígdala,

combinada com a contralateral do estriado ventral, também prejudicou a tarefa (Everitt et al., 1991), demonstrando a participação desta circuitaria cerebral na preferência condicionada ao lugar. O teste de preferência condicionada ao lugar, assim como o condicionamento clássico de medo ao contexto, é também afetado por lesão de hipocampo, pois o processamento de informações espaciais também é essencial nessa tarefa (Meyers et al., 2003), mas não é afetado pela lesão de estriado dorsal (Everitt et al., 1991). Em conjunto, esses resultados sugerem que as conexões entre a amígdala e o estriado dorsal não são importantes para as memórias associativas evocadas por estímulos sensoriais polimodais e complexos, como um determinado ambiente.

Em resumo, os resultados discutidos até o momento mostraram que o estriado dorsal e a interação entre esta estrutura e o CeA estão envolvidos na mediação do condicionamento de medo ao som. Embora a lesão assimétrica contralateral realizada antes do treino tenha prejudicado a resposta condicionada de congelamento ao som, esta mesma lesão realizada após o treino (antes do teste) não interferiu com o desempenho dos animais (Experimento 2 - Etapa 2). Estes resultados indicam que a interação CeA-estriado dorsal é necessária para a aquisição/consolidação da tarefa de condicionamento de medo ao som, mas não para a expressão da resposta condicionada. Contudo, ao considerarmos os resultados do Experimento 1 (da Etapa 2), a lesão bilateral de estriado dorsal, realizada 14 dias após o treino do animal na tarefa, prejudicou este tipo de condicionamento. Embora o CeA tenha sido implicado na aquisição, consolidação e expressão das memórias emocionais (Wilensky et al., 2006), os resultados do presente trabalho sugerem que, uma vez que a tarefa de condicionamento de medo ao som tenha sido adquirida, o estriado dorsal torna-se independente do CeA para a expressão do comportamento somatomotor aprendido. Esses resultados, como mencionado anteriormente, estão em concordância com trabalhos prévios que sugeriram uma função para o estriado dorsal na expressão da resposta condicionada somatomotora (Powel et al., 1978; Han et al., 1997).

O CeA, além de enviar projeções para múltiplos alvos localizados no tronco encefálico relacionados às funções efetoras viscerais e somáticas no medo condicionado, também poderia influenciar estruturas prosencefálicas, como o estriado dorsal, através de projeções a diferentes sistemas modulatórios como dopaminérgico, serotoninérgico, noradrenérgico e colinérgico (Gonzales & Chesselet, 1990; Van Bockstaele et al., 1996; Peyron et al., 1998; Gastard et al., 2002; Loopuijt & Zahm, 2006; Pitkänen et al., 2000). Contudo, o fato de as fibras provenientes de núcleos

serotoninérgicos terminarem em porções caudoventrais e serem bastante esparsas nas porções antero-dorsais do estriado dorsal (Vertes, 1991; Steinbusch, 1981), aliado ao fato de que o estriado dorsal é desprovido de inervação noradrenérgica (Aston-Jones, 2004), indicam a possibilidade dessas projeções monoaminérgicas não subsidiarem os efeitos principais verificados no presente trabalho. O sistema colinérgico exerce uma influência crucial na atividade estriatal e em processos de aprendizagem e memória dependentes do estriado (Prado-Alcalá et al., 1978; 1980; Gold, 2003), mas esse aporte é derivado essencialmente de interneurônios estriatais (Heimer et al., 1995), sendo que as fibras colinérgicas extrínsecas são bastante modestas. Além disso, recentemente tem sido proposto que as eferências do CeA para os distritos colinérgicos do prosencéfalo basal modulam, em última instância, a atividade do próprio CeA (Gastard et al., 2002; Loopuijt & Zahm, 2006). Portanto, entre esses sistemas modulatórios, as projeções dopaminérgicas apresentam, sem dúvida, uma maior função regulatória sobre os neurônios de projeção estriatal, em comparação com outros sistemas. A SNc e o RR, estruturas receptoras de densas eferências enviadas pelo CeA (Gonzales & Chesselet, 1990), enviam projeções dopaminérgicas e não-dopaminérgicas ao estriado dorsal, compreendendo a porção anterodorsal lesada no presente estudo (Gerfen et al., 1987; Deutch et al., 1988). Apesar do presente trabalho não ter realizado lesões na SNc e no RR, existem indícios na literatura de que as projeções dopaminérgicas destas estruturas para o estriado dorsal possam estar relacionadas à função do estriado em processos de aprendizagem e memória (Da Cunha et al., 2001; 2003; Faure et al., 2005).

Algumas tarefas de aprendizagem e memória que são estriado-dependentes também são afetadas por lesão da SNc (para revisão ver, Da Cunha et al., 2002; Faure et al., 2005; Kao & Powell, 1988). Utilizando um modelo desenvolvido para mimetizar os prejuízos cognitivos encontrados em estágios recentes da doença de Parkinson, alguns estudos observaram que a administração de MPTP (uma toxina que destrói neurônios dopaminérgicos) na SNc, afetou o desempenho de animais na versão de pista da tarefa realizada no labirinto aquático de Morris. Contudo, esta mesma lesão não prejudicou o desempenho dos animais na versão espacial da tarefa, a qual é dependente do hipocampo (Da Cunha et al., 2003). Os estudos sugerem que a via nigro-estriatal é um componente essencial do sistema de memória estriado-dependente envolvido no processamento da aprendizagem estímulo-resposta e do hábito (Da Cunha et al., 2002; Faure et al., 2005).

O sistema dopaminérgico também influencia a atividade estriatal em outros tipos de tarefas de aprendizagem e memória, como por exemplo as tarefas associativas. Neurônios tonicamente ativos do estriado (TAN, do inglês, “tonically active neurons”) (Aosaki et al., 1994b; Ravel et al., 1999; 2003; Blazquez et al., 2002) e neurônios mesencefálicos dopaminérgicos (Ljungberg et al., 1992; Mirenowicz & Schultz, 1996) respondem eletrofisiologicamente a estímulos condicionados que predizem a ocorrência de um evento aversivo. Além disso, neurônios do estriado apresentam mudanças eletrofisiológicas quando animais aprendem o significado de um estímulo que prediz um evento biologicamente importante e induz o preparo do movimento (Schultz et al., 2003; Yamada et al., 2004; Barnes et al., 2005). Ljungberg et al., 1992, observaram que, no início de uma tarefa de aprendizagem, neurônios dopaminérgicos mostram aumento de atividade eletrofisiológica em resposta a uma recompensa. Com o passar do treino, estas respostas eletrofisiológicas são transferidas progressivamente para os estímulos que predizem a recompensa (Ljungberg et al., 1992). Não existindo modificações na tarefa aprendida e o desempenho do animal apresentando-se estável, os neurônios respondem apenas à apresentação do estímulo condicionado e não mais à recompensa (Schulz & Romo, 1990). Seria interessante verificar se o papel da SNc e do estriado dorsal nas tarefas associativas citadas anteriormente dependem de influências da amígdala sobre estas estruturas.

Alguns trabalhos sugerem que as mudanças observadas na atividade neuronal do estriado, durante tarefas de aprendizagem e memória, podem ser influenciadas por manipulações dopaminérgicas. Aosaki et al. (1994a) observaram que a lesão unilateral dos neurônios dopaminérgicos reduziu a responsividade sensorial adquirida de neurônios estriatais, no condicionamento clássico em primatas. Este efeito foi revertido pela administração de apomorfina (um agonista dopaminérgico), confirmando a influência do sistema dopaminérgico sobre o estriado no condicionamento clássico (Aosaki et al., 1994a).

Existem muitas evidências na literatura que atribuem uma importante função ao sistema dopaminérgico no condicionamento clássico de medo em roedores (para revisão ver, Pezze & Feldon, 2004). A administração de agonistas e antagonistas do sistema dopaminérgico interfere na aquisição e expressão do condicionamento de medo (Inoue et al., 1996; 2000; Davis et al., 1993; Guarraci et al., 1999). Como o estriado é uma estrutura que recebe um considerável aporte dopaminérgico cerebral, seria esperado que a administração de agonistas e antagonistas do sistema

dopaminérgico nesta região interferisse com o condicionamento de medo ao som. De fato, White e Salinas (2003) mostraram que animais que receberam administração de anfetamina no estriado dorsal, imediatamente após o treino, apresentaram melhor desempenho nas tarefas de condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto. Este resultado, entretanto, não está de acordo com os resultados observados tanto no presente estudo como em um estudo anterior (Ferreira et al., 2003), os quais mostraram que a lesão de estriado dorsal não afetou o condicionamento de medo ao contexto. No estudo de White e Salinas (2003), o efeito produzido pela administração intra-estriatal de anfetamina foi verificado apenas na segunda sessão de teste do condicionamento, e os animais foram testados para o condicionamento de medo ao som e ao contexto no mesmo ambiente. Sendo assim, existe a possibilidade de que a resposta de congelamento analisada no segundo dia de teste não era seletiva para o condicionamento contextual. Um trabalho recente verificou os efeitos da administração de glicocorticóide no estriado dorsal no desempenho da tarefa de esquiva inibitória (Medina et al., 2007). Os autores observaram que a administração intra-estriatal do glicocorticoide melhorou o desempenho da tarefa de forma dose-dependente. Contudo, em uma versão modificada desta tarefa, esta mesma manipulação não interferiu no desempenho dos animais (Medina et al., 2007). Durante o treino dessa versão modificada, o animal era colocado diretamente no compartimento escuro da caixa de esquiva e recebia o choque nas patas. No dia do teste ele era colocado no compartimento claro e foi verificado a latência de passagem para o compartimento escuro. Assim, o componente contextual da tarefa pôde ser isolado do componente instrumental, o que não ocorre na versão tradicional. Esses resultados, em conjunto com os dados obtidos no presente trabalho, estão de acordo com a idéia de que o estriado dorsal não está envolvido com a aprendizagem contextual.

Portanto, considerando as regiões que recebem projeções do CeA e modulam a atividade estriatal que poderiam mediar os efeitos encontrados no presente estudo após a lesão assimétrica contralateral de CeA e estriado dorsal, a possibilidade mais plausível é de que essa atuação seja modulada via SNc/RR. Além disso, várias evidências citadas anteriormente sugerem o envolvimento do sistema dopaminérgico no condicionamento clássico. No mesmo sentido, um estudo mostrou que projeções do CeA para o estriado dorsal (via SNc) estão relacionadas com aprendizagem associativa apetitiva. Han et al., (1997) mostraram que a aquisição da resposta de orientação condicionada a um estímulo visual pareado com comida depende da integridade de um



circuito neural que envolve o CeA e o estriado dorsal. Usando também o modelo de lesão assimétrica, os autores realizaram uma lesão neurotóxica de CeA, combinada a uma lesão com 6-OHDA no estriado dorsal contralateral. Os animais lesados tiveram prejuízo em adquirir a resposta de orientação condicionada a um estímulo visual que foi previamente pareado com comida (Han et al., 1997). Os achados sugerem que os efeitos observados foram mediados por projeções do CeA à SNc, a qual envia projeções dopaminérgicas ao estriado dorsal (Fudge & Haber, 2000; Beckstead et al., 1979). Similarmente, Lee et al. (2005) observaram que a expressão da proteína Fos nos neurônios da porção medial do CeA foi intensa em ratos que receberam pareamentos do estímulo condicionado-estímulo incondicionado e que a maioria dos neurônios marcados para a proteína Fos nessa região eram neurônios que projetavam para a SNc (Lee et al., 2005). Em conjunto, os resultados observados com o modelo de lesão assimétrica sugerem que a informação adquirida sobre o estímulo discreto pareado com um estímulo incondicionado apetitivo (Han et al., 1997) ou aversivo (presente estudo) deve ser direcionado ao estriado dorsal, o qual seria capaz de eliciar ou coordenar uma resposta somatomotora adequada. Além disso, é provável que o prejuízo observado no desempenho da tarefa de condicionamento de medo ao som, após a lesão assimétrica de CeA e estriado, seja provocado por uma diminuição do aporte dopaminérgico à região do estriado dorsal em decorrência da lesão do CeA.

Os resultados discutidos até o momento foram observados após a lesão eletrolítica de estriado dorsal e do núcleo central da amígdala. Este tipo de lesão é um método que foi muito utilizado na literatura da área e tem como vantagem a produção de lesões pequenas e localizadas. Por outro lado, o maior problema deste tipo de abordagem é o fato de que neste método ocorre destruição dos corpos celulares localizados na região alvo e também de fibras de passagem que atravessam a área lesionada. Ou seja, seria possível que os efeitos observados no presente estudo fossem decorrentes da lesão de fibras que passam pelo CeA e pelo estriado dorsal e não pela lesão destas estruturas propriamente ditas. Especificamente, lesões eletrolíticas do CeA podem destruir também projeções do BLA para o núcleo intersticial da estria terminal (BNST) e para o estriado dorsal. Assim, os efeitos observados seriam decorrentes das projeções diretas do BLA para a região do estriado que apenas trafegam pelo CeA. Contudo, de acordo com recentes estudos (Nader et al., 2001; Sullivan et al., 2004; Anglada-Figueroa & Quirk, 2005), nem a lesão do BLA nem a do BNST afetaram a resposta de congelamento no condicionamento de medo ao som. Logo, lesar as fibras

do BLA que passam pelo CeA não deveria produzir os efeitos observados no presente estudo. Além disso, os resultados observados após a lesão eletrolítica de CeA e estriado dorsal são comparáveis aos resultados obtidos em outros estudos que utilizaram lesões neurotóxicas destas estruturas no paradigma de condicionamento clássico de medo (Ferreira et al., 2003; Goosens & Maren, 2001).

A Etapa 3 do presente trabalho teve como objetivo confirmar os principais achados observados após a lesão eletrolítica de CeA e estriado dorsal e também estender esses achados, já que a inativação temporária do CeA e do estriado dorsal permitiu verificar o papel destas estruturas e da via CeA-estriado dorsal em etapas específicas do condicionamento, como a aquisição e a consolidação do condicionamento de medo ao som.

Os resultados do Experimento 1 da Etapa 3 mostraram que a inativação temporária de estriado dorsal provocada pela administração de muscimol, antes do treino do condicionamento de medo ao som, prejudicou o desempenho dos animais no teste desta tarefa, realizada 24 horas após a administração da droga. Esses achados confirmam os resultados anteriores, após a lesão eletrolítica pré-treino de estriado dorsal, e indicam que os efeitos observados não foram devidos à destruição de fibras de passagem pela região do estriado. Contudo, como a lesão eletrolítica naquele experimento foi realizada antes do treino, não é possível saber se os efeitos observados foram devido a um papel do estriado na aquisição, consolidação ou expressão da informação aprendida. Deste modo, os resultados obtidos após a inativação temporária de estriado dorsal, antes do treino, indicam também que essa estrutura está envolvida na aquisição do medo condicionado ao som, além do envolvimento já observado na expressão desta resposta condicionada de medo (Experimento1 - Etapa 2). Como a droga também estava presente nos estágios iniciais da consolidação desta tarefa, não é possível descartar a possibilidade de que o estriado dorsal possa também estar envolvido na consolidação da tarefa de condicionamento de medo ao som. Estudos de inativação do estriado dorsal, imediatamente após o treino desta tarefa, poderiam verificar essa possibilidade.

O envolvimento das projeções do CeA para o estriado dorsal no condicionamento de medo ao som também foi confirmado no segundo experimento da Etapa 3. Microinjeção de muscimol no CeA, combinada à administração desta droga no estriado dorsal contralateral, antes da sessão de treino, prejudicou o desempenho dos animais

no teste, quando comparados aos animais que receberam esta manipulação no mesmo hemisfério cerebral. Mais uma vez estes resultados descartam a possibilidade dos efeitos observados na Etapa 1 serem decorrentes da lesão de fibras de passagem. Além disso, esses resultados indicam que a comunicação entre essas regiões está envolvida na aquisição do condicionamento de medo ao som. Este experimento não descarta a possibilidade destes efeitos serem devidos à participação desta via na consolidação da memória deste tipo de condicionamento. O Experimento 3 da Etapa 3 teve como objetivo verificar essa possibilidade. Os resultados obtidos mostraram que a lesão do CeA, combinada com a administração de lidocaína (um bloqueador de canais de sódio) no estriado contralateral, não afetou a expressão da resposta condicionada de medo ao som. Assim, parece que a via indireta CeA-SNc/RR-estriado está envolvida na aquisição, mas não na consolidação da tarefa de medo condicionada ao som. Essa possibilidade está de acordo com um dado recente encontrado na literatura, que observou que a inativação temporária da SNc não prejudicou a consolidação desta mesma tarefa de memória emocional (Baldi et al., 2007). Em conjunto, os resultados dos Experimentos 2 e 3 da Etapa 3 e do Experimento 2 da Etapa 2 levantam a possibilidade de que a interação entre o CeA e o estriado dorsal (provavelmente via SNc), na mediação do condicionamento de medo ao som, seja importante durante a aquisição, mas não na consolidação e evocação/expressão desta tarefa.

De forma geral, as lesões realizadas no presente estudo produziram um prejuízo significativo na tarefa de condicionamento de medo ao som, contudo as mesmas não aboliram completamente a resposta condicionada de medo. Os efeitos parciais observados após a lesão eletrolítica e neurotóxica de estriado dorsal foram previamente descritos em outro trabalho do grupo (Ferreira et al., 2003). Embora não existam dúvidas de que a manipulação do estriado alterou a resposta condicionada de medo ao som, a natureza deste prejuízo necessita ainda ser elucidada. Uma observação qualitativa do congelamento apresentado pelos animais com lesão de estriado dorsal durante o teste do condicionamento de medo ao som indicou que esta resposta é diferente da observadas nos animais controles (dados não mostrados). O congelamento nos animais lesados é frequentemente interrompido por outros comportamentos, como por exemplo o ato de cheirar, possivelmente indicando que os animais lesados não conseguem manter a resposta de congelamento por muito tempo. O controle da organização da seqüência de ações observadas no comportamento de autolimpeza ou “grooming” foi uma função há pouco tempo atribuída ao estriado dorsal

(Cromwell & Berridge, 1996). Recentemente, um trabalho verificou que a inativação do estriado ventrolateral pela administração de lidocaína prejudicou a organização do comportamento predatório em ratos (dos Santos et al., 2007). No mesmo sentido, a lesão de estriado no presente experimento poderia prejudicar a organização do comportamento de congelamento sob um estímulo sensorial discreto. Apesar dos condicionamentos de medo ao som e ao contexto apresentarem muitas características semelhantes, esses tipos de tarefas apresentam uma diferença marcante: os estímulos contextuais estão continuamente presentes e não são apresentados ao animal de maneira precisa, sendo assim, predizem uma situação geral na qual o estímulo incondicionado pode ocorrer, mas não predizem o início de nenhum estímulo incondicionado particular. Já no condicionamento ao som, o estímulo condicionado está temporalmente relacionado ao estímulo incondicionado e prediz a ocorrência do mesmo. Poder-se-ia supor, portanto, que o estriado dorsal esteja envolvido na elaboração/organização do comportamento de congelamento, somente frente a um estímulo explicitamente pareado com um evento importante. Outros estudos seriam necessários para avaliar o papel do estriado dorsal na organização da resposta de congelamento.

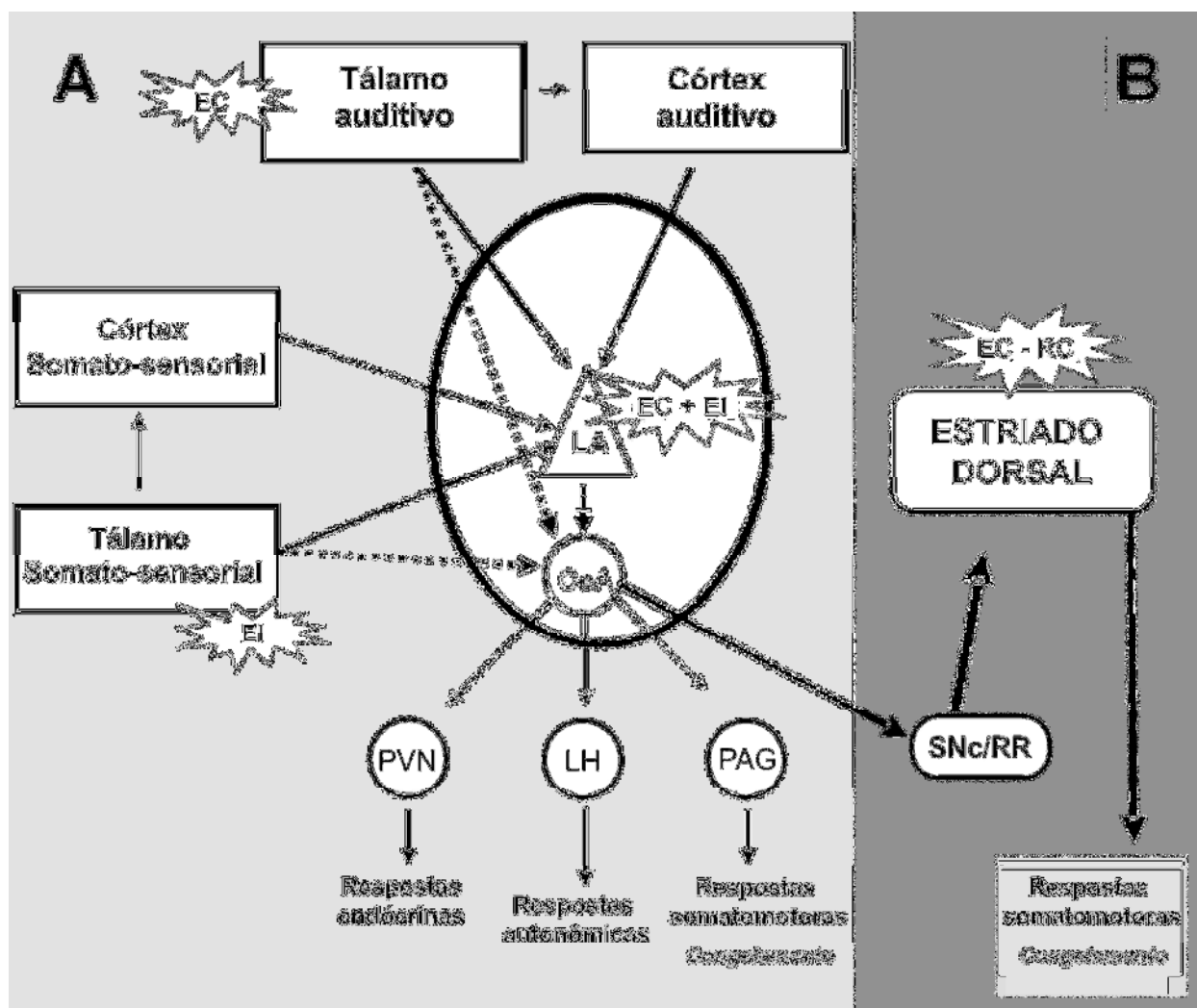
Uma segunda explicação para os efeitos parciais observados no presente estudo é que o número de pareamentos usados poderia ter aumentado a força de associação entre os estímulos condicionado e incondicionado. Trabalhos anteriores têm mostrado que a intensidade ou a quantidade de apresentação do estímulo incondicionado durante o treino pode interferir com os efeitos amnésicos de fármacos ou lesões (Cruz-Morales et al., 1992; Maren, 1999; Solana-Figueroa et al., 2002). Seria interessante verificar o efeito da lesão de estriado dorsal no condicionamento de medo ao som, utilizando-se apenas um ou dois pareamentos entre os estímulos condicionado e incondicionado, já que trabalhos anteriores apontam um papel desta estrutura na formação lenta e gradual do hábito (Yin & Knowlton, 2006) e que o número de sessões de treino de uma tarefa comportamental pode influenciar o resultado observado em tarefas de aprendizagem dependentes do estriado (Packard & McGaugh, 1996; Oliveira et al., 1997). Além disso, uma terceira possibilidade é baseada no fato de que nem todo o estriado dorsal, bem como o CeA, encontraram-se lesados no presente estudo, e o tecido adjacente restante poderia ser responsável pela expressão residual da resposta de congelamento. Essa explicação é possível se observamos que nos resultados dos Experimentos 1 e 2 da Etapa 3 foi observada uma redução mais significativa do

congelamento em comparação aos estudos de lesão. Isso pode significar que o muscimol se espalhou e atuou por uma região mais abrangente do que a área atingida pela lesão eletrolítica, induzindo um prejuízo maior de desempenho na tarefa.

Em resumo, os resultados observados no presente estudo sugerem que o estriado dorsal está envolvido na aquisição/consolidação da tarefa de condicionamento ao som. Além disso, esta estrutura também parece estar envolvida na expressão da resposta condicionada somatomotora de congelamento a um estímulo condicionado explicitamente pareado a um evento aversivo. Esta idéia está de acordo com trabalhos que verificaram efeitos da lesão de estriado no desempenho da resposta condicionada de piscar em coelhos (Powel, et al., 1978). Esse tipo de condicionamento também é afetado após a lesão de SN, indicando que a atividade dopaminérgica estriatal é importante para a expressão desta resposta condicionada aversiva (Kao & Powell, 1988). Estas lesões, no entanto, não afetam as respostas autonômicas de batimento cardíaco (Powell et al., 1978; Kao & Powell, 1988) e de liberação de ACTH (presente estudo), frente à apresentação de um estímulo pareado a um estímulo incondicionado aversivo. Esses achados levantam a possibilidade de que o estriado dorsal possa estar envolvido na mediação de diferentes tipos de respostas somatomotoras condicionadas: o congelamento e a resposta de piscar. Seria interessante verificar o efeito da lesão de estriado em outras respostas somatomotoras condicionadas de medo, como por exemplo a potenciação do sobressalto.

Por outro lado, a comunicação entre o CeA e o estriado estaria envolvida somente durante a aquisição desta tarefa, mas não durante a consolidação ou expressão da tarefa aprendida. A hipótese mais provável é de que a atuação do CeA sobre o estriado dorsal ocorra de forma indireta, através das conexões desta estrutura com a SNc e com o núcleo RR, que, por sua vez, enviam projeções dopaminérgicas para o estriado dorsal. De fato, Han et al., 1997, mostraram que esta circuitaria neural está envolvida no condicionamento pavloviano apetitivo.

O presente estudo, portanto, propõe que uma via indireta entre o CeA-estriado dorsal poderia mediar a aprendizagem de respostas condicionadas somatomotoras a um estímulo emocionalmente relevante. Os resultados encontrados sugerem um importante papel das projeções indiretas do CeA para o estriado (provavelmente via SNc/RR) no condicionamento clássico de medo ao um estímulo discreto e acrescentam a região do estriado dorsal à circuito neural do medo condicionado (ver figura 20).



**Figura 20 – Representação esquemática do circuito neural responsável pelo medo condicionado.**

(A) No condicionamento de medo ao som, a associação entre um estímulo condicionado (EC) e o estímulo incondicionado (EI) é mediada por uma convergência das informações sensoriais sobre estes estímulos ao LA, o qual projeta indiretamente para o CeA. Mais recentemente foi sugerido que o CeA também pode mediar a associação EC-EI (linhas tracejadas; Paré et al., 2004). Projeções do CeA para a substância cinzenta periaquedutal (PAG), para a área hipotalâmica lateral (LH) e para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), são responsáveis pela expressão das respostas comportamentais (RC), autonômicas e endócrinas de medo, respectivamente (adaptado de Phelps e LeDoux, 2005). (B) O presente estudo mostrou que, as conexões indiretas entre o CeA e o ED - provavelmente via substância negra compacta (SNc) e núcleo retrorubral (RR) - também podem mediar aquisição da resposta somatomotora de congelamento eliciada pelo EC.

# CONCLUSÕES

## **CONCLUSÕES**

Os resultados do presente trabalho sugerem que o estriado dorsal está envolvido na aquisição/consolidação e na expressão da tarefa de condicionamento de medo ao som, mas não ao contexto. Este envolvimento ocorre na mediação da resposta somatomotora condicionada, avaliada pelo tempo de congelamento, mas não da resposta neuroendócrina, avaliada pelos níveis plasmáticos de ACTH. Além disso, os resultados estão de acordo com outros trabalhos da literatura, que verificaram que o núcleo central da amígdala está envolvido na mediação das tarefas de condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto.

A comunicação indireta entre o núcleo central da amígdala e o estriado dorsal (provavelmente via substância negra compacta e núcleo retrorubral) é importante para a aquisição, mas não para a consolidação e expressão da resposta de medo condicionado ao som. Esses resultados sugerem que uma vez que a informação é adquirida o estriado dorsal torna-se independente da amígdala para a expressão do comportamento somatomotor aprendido.

Baseados nestes achados, o presente trabalho propõe que o estriado dorsal e a via indireta entre a amígdala e o estriado sejam considerados na circuitaria neural que medeia o condicionamento clássico de medo ao som.



REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aggleton JP, Brown MW. Integratin systems for event memory: testing the contribution of the fornix. In: Squire LR, Schacter DL, editors. *Neuropsychology of memory*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: The Guildford Press; 2002.p.377-94.
- Akirav I, Richter-Levin G. Mechanisms of amygdala modulation of hippocampal plasticity. *J Neurosci*. 2002;22(22):9912-21.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci*. 1986;9:357-81.
- Alheid GF, Heimer L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience*. 1988;27(1):1-39.
- Alheid GF, Olmos JS, Beltramino CA. Amygdala and extended amygdala. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous systems*. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press; 1995. p. 495-578.
- Amaral DG, Pnce JL, Pitkanen A., Carmichael ST. Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. In: Aggleton JP, editor. *The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction*. New York: Wiley-Liss; 1992. p. 1-66.
- Anagnostaras SG, Maren S, Fanselow MS. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J Neurosci*. 1999;19(3):1106-14.
- Anglada-Figueroa D, Quirk GJ. Lesions of the basal amygdala block expression of conditioned fear but not extinction. *J Neurosci*. 2005;25(42):9680-5.
- Aosaki T, Graybiel AM, Kimura M. Effect of the nigrostriatal dopamine system on acquired neural responses in the striatum of behaving monkeys. *Science*. 1994a;265:412-5.
- Aosaki T, Tsubokawa H, Ishida A, Watanabe K, Graybiel AM, Kimura M. Responses of tonically active neurons in the primate's striatum undergo systematic changes during behavioral sensorimotor conditioning. *J Neurosci*. 1994b;14:3969-84.

- Aston-Jones G. Locus coeruleus, A5 and A7 noradrenergic cell groups. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. 3<sup>rd</sup> ed. Amsterdam: Elsevier; 2004. p.259-294
- Aylward EH, Sparks BF, Field KM, Yallapragada V, Shpritz BD, Rosenblatt A, Brandt J, Gourley LM, Liang K, Zhou H, Margolis RL, Ross CA. Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease. *Neurology*. 2004;63(1):66-72.
- Baddeley AD, Warrington EK. Amnesia and the distinction between long and short-term memory. *J Verbal Learn Verbal Behav*. 1970;9:176-89.
- Baldi E, Mariottini C, Bucherelli C. Substantia nigra role in fear conditioning consolidation. *Neurobiol Learn Mem*. 2007;87(1):133-9.
- Barnes TD, Kubota Y, Hu D, Jin DZ, Graybiel AM. Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. *Nature* 2005;437:1158-61.
- Bauer EP, Schafe GE, LeDoux JE. NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *J Neurosci*. 2002;22(12):5239-49.
- Bechara A, Tranel D, Damasio H, Adolphs R, Rockland C, Damasio AR. Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science*. 1995; 25;269(5227):1115-8.
- Beckstead RM, Domesick VB, Nauta WJ. Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res*.1979;175(2):191-217.
- Beitz AJ. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience* 1982;7(1):133-59.
- Blanchard DC, Blanchard RJ. Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol*. 1969;67(3):370-5.
- Blanchard DC, Blanchard RJ. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol*. 1972;81(2):281-90.
- Blazquez PM, Fujii N, Kojima J, Graybiel AM. A network representation of response probability in the striatum. *Neuron*. 2002;33:973-82.

- Butters N, Wolfe J, Martone M, Granholm E, Cermak LS. Memory disorders associated with Huntington's disease: verbal recall, verbal recognition and procedural memory. *Neuropsychologia*. 1985;23(6):729-43.
- Cahill L, McGaugh JL. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci*. 1998;21:294-9.
- Cahill L, McGaugh JL. The functional anatomy of amygdala efferent pathways. *Society for Neuroscience Abstracts* 1993;19:1226.
- Campeau S, Davis M. Involvement of subcortical and cortical afferents to the lateral nucleus of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *J Neurosci*. 1995;15:2312-27.
- Carrive P, Lee J, Su A. Lidocaine blockade of amygdala output in fear-conditioned rats reduces Fos expression in the ventrolateral periaqueductal gray. *Neuroscience*. 2000;95:1071-80.
- Carrive P, Leung P, Harris J, Paxinos G. Conditioned fear to context is associated with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. *Neuroscience*. 1997;78(1):165-77.
- Cave CB, Squire LR. Intact verbal and nonverbal short-term memory following damage to the human hippocampus. *Hippocampus*. 1992;2(2):151-63.
- Cebrian C, Parent A, Prensa L. Patterns of axonal branching of neurons of the substantia nigra pars reticulata and pars lateralis in the rat. *J Comp Neurol*. 2005;492(3):349-69.
- Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G, Calabresi P. Dopamine, acetylcholine and nitric oxide systems interact to induce corticostriatal synaptic plasticity. *Rev Neurosci*. 2003;14(3):207-16.
- Clark RE, Squire LR. Classical conditioning and brain systems: the role of awareness. *Science*. 1998;280(5360):77-81.
- Clugnet MC, LeDoux JE. Synaptic plasticity in fear conditioning circuits: induction of LTP in the lateral nucleus of the amygdala by stimulation of the medial geniculate body. *J Neurosci*. 1990;10(8):2818-24.

- Cohen DH, Randall DC. Classical conditioning of cardiovascular responses. *Annu Rev Physiol.* 1984;46:187-97.
- Cohen NJ, Squire LR. Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: Dissociation of knowing how and knowing that. *Science.* 1980;210(4466):207-10.
- Cohen NJ. Preserved learning capacity in amnesia: evidence for multiple memory systems. In: Squire LR, Butters N, editors. *Neuropsychology of memory.* New York: Guilford Press; 1984.
- Collins DR, Paré D. Differential fear conditioning induces reciprocal changes in the sensory responses of lateral amygdala neurons to the CS(+) and CS(-). *Learn Mem.* 2000;7:97-103.
- Cook D, Kesner RP. Caudate nucleus and memory for egocentric localization. *Behav Neural Biol.* 1988;49(3):332-43.
- Corbit LH, Janak PH. Inactivation of the lateral but not medial dorsal striatum eliminates the excitatory impact of Pavlovian stimuli on instrumental responding. *J Neurosci.* 2007;27(51):13977-81.
- Corkin S. Acquisition of motor skill after bilateral medial temporal-lobe excision. *Neuropsychologia* 1968;6:225–64.
- Corkin S. What's new with the amnesic patient H.M.? *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(2):153-60.
- Cromwell HC, Berridge KC. Implementation of action sequences by a neostriatal site: a lesion mapping study of grooming syntax. *J Neurosci.* 1996;16(10):3444-58.
- Cruz-Morales SE, Duran-Arevalo M, Diaz Del Guante MA, Quirarte G, Prado-Alcala RA. A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behav Neural Biol.* 1992;57(3):256-9.
- Da Cunha C, Angelucci ME, Canteras NS, Wonnacott S, Takahashi RN. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. *Cell Mol Neurobiol.* 2002;22(3):227-37.

- Da Cunha C, Gevaerd MS, Vital MA, Miyoshi E, Andreatini R, Silveira R, Takahashi RN, Canteras NS. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav Brain Res.* 2001;124(1):9-18.
- Da Cunha C, Wietzikoski S, Wietzikoski EC, Miyoshi E, Ferro MM, Anselmo-Franci JA, Canteras NS. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. *Neurobiol Learn Mem.* 2003;79(3):236-42.
- Dalgleish T. The emotional brain. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(7):583-9.
- Davis M, Falls WA, Campeau S, Kim M. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav Brain Res.* 1993;58(1-2):175-98.
- Davis M, Myers KM. The role of glutamate and gamma-aminobutyric acid in fear extinction: clinical implications for exposure therapy. *Biol Psychiatry.* 2002;52(10):998-1007.
- Davis M. The role of the amygdala in conditioned and unconditioned fear and anxiety. In: Aggleton JP, editor. *The Amygdala*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Oxford University Press; 2000. p. 213-88.
- Davis M. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci.* 1992;15:353-75.
- De Oca BM, DeCola JP, Maren S, Fanselow MS. Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. *J Neurosci.* 1998;18:3426-32.
- DeBoer P, Abercrombie ED. Physiological release of striatal acetylcholine in vivo: modulation by D1 and D2 dopamine receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;277(2):775-83.
- Deutch AY, Goldstein M, Baldino F Jr, Roth RH. Telencephalic projections of the A8 dopamine cell group. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;537:27-50.
- Devan BD, Goad EH, Petri HL. Dissociation of hippocampal and striatal contributions to spatial navigation in the water maze. *Neurobiol Learn Mem.* 1996;66(3):305-23.

- Di Ciano P, Everitt BJ. Direct interactions between the basolateral amygdala and nucleus accumbens core underlie cocaine-seeking behavior by rats. *J Neurosci.* 2004;24(32):7167-73.
- dos Santos LM, Ferro MM, Mota-Ortiz SR, Baldo MV, da Cunha C, Canteras NS. Effects of ventrolateral striatal inactivation on predatory hunting. *Physiol Behav.* 2007;90(4):669-73.
- Eichenbaum H. Declarative memory: insights from cognitive neurobiology. *Annu Rev Psychol.* 1997;48:547-72.
- Everitt BJ, Cardinal RN, Parkinson JA, Robbins TW. Appetitive behavior: impact of amygdala-dependent mechanisms of emotional learning. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;985:233-50.
- Everitt BJ, Morris KA, O'Brien A, Robbins TW. The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. *Neuroscience.* 1991;42(1):1-18.
- Fanselow MS, Bolles RC. Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1979 Aug;93(4):736-44.
- Fanselow MS, LeDoux JE. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron.* 1999;23(2):229-32.
- Faure A, Haberland U, Condé F, El Massioui N. Lesion to the nigrostriatal dopamine system disrupts stimulus-response habit formation. *J Neurosci.* 2005;25(11):2771-80.
- Fendt M, Fanselow MS. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev.* 1999;23(5):743-60.
- Ferreira TL, Moreira KM, Ikeda DC, Bueno OF, Oliveira MG. Effects of dorsal striatum lesions in tone fear conditioning and contextual fear conditioning. *Brain Res.* 2003;987(1):17-24.
- Ferry B, McGaugh JL. Clenbuterol administration into the basolateral amygdala post-training enhances retention in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Mem.* 1999;72(1):8-12.

- Finger S. *Origins of neuroscience: a history of explorations into brain function*. Oxford: Oxford University Press; 1994.
- Fudge JL, Haber SN. The central nucleus of the amygdala projection to dopamine subpopulations in primates. *Neuroscience* 2000;97:479-94.
- Fuster JM, Uyeda AA. Reactivity of limbic neurons of the monkey to appetitive and aversive signals. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1971;30(4):281-93.
- Gallagher M, Chiba AA. The amygdala and emotion. *Curr Opin Neurobiol*. 1996;6:221-7.
- Gallagher M, Graham PW, Holland PC. The amygdala central nucleus and appetitive Pavlovian conditioning: lesions impair one class of conditioned behavior. *J Neurosci*. 1990;10:1906-11.
- Gastard M, Jensen SL, Martin JR 3rd, Williams EA, Zahm DS. The caudal sublentiform region/anterior amygdaloid area is the only part of the rat forebrain and mesopontine tegmentum occupied by magnocellular cholinergic neurons that receives outputs from the central division of extended amygdala. *Brain Res*. 2002;957(2):207-22.
- Gerfen CR, Herkenham M, Thibault J. The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J Neurosci*. 1987;7:3917-3914.
- Glick SD, Greenstein S. Comparative learning and memory deficits following hippocampal and caudate lesions in mice. *J Comp Physiol Psychol*. 1973;82(2):188-94.
- Glick SD, Marsanico RG, Greenstein S. Differential recovery of function following caudate, hippocampal, and septal lesions in mice. *J Comp Physiol Psychol*. 1974 ;86(5):787-92.
- Gold JJ, Squire LR. The anatomy of amnesia: neurohistological analysis of three new cases. *Learn Mem*. 2006;13(6):699-710.
- Gold PE. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2003;80(3):194-210.



- Gonzales C, Chesselet MF. Amygdalonigral pathway: an anterograde study in the rat with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *J Comp Neurol.* 1990;297:182-200.
- Goosens KA, Maren S. Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. *Learn Mem.* 2001;8:148-55.
- Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science.* 1994;265(5180):1826-31.
- Graybiel AM. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 1990;13(7):244-54.
- Graybiel AM. The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiol Learn Mem.* 1998;70(1-2):119-36.
- Groenewegen HJ, Berendse HW, Wolters JG, Lohman AH. The anatomical relationship of the prefrontal cortex with the striatopallidal system, the thalamus and the amygdala: evidence for a parallel organization. *Prog Brain Res.* 1990;85:95-116.
- Guarraci FA, Frohardt RJ, Kapp BS. Amygdaloid D1 dopamine receptor involvement in Pavlovian fear conditioning. *Brain Res.* 1999;827(1-2):28-40.
- Guijarro JZ, Tiba PA, Ferreira TL, Kawakami SE, Oliveira MG, Suchecki D. Effects of brief and long maternal separations on the HPA axis activity and the performance of rats on context and tone fear conditioning. *Behav Brain Res.* 2007;184(2):101-8.
- Haber SN, Kim KS, Maily P, Calzavara R. Reward-related cortical inputs define a large striatal region in primates that interface with associative cortical connections, providing a substrate for incentive-based learning. *J Neurosci.* 2006;26(32):8368-76.
- Han JH, Kushner SA, Yiu AP, Cole CJ, Matynia A, Brown RA, Neve RL, Guzowski JF, Silva AJ, Josselyn SA. Neuronal competition and selection during memory formation. *Science.* 2007;316(5823):457-60.
- Han JS, McMahan RW, Holland P, Gallagher M. The role of an amygdalo-nigrostriatal pathway in associative learning. *J Neurosci.* 1997;17(10):3913-9.

- Hatfield T, McGaugh JL. Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. *Neurobiol Learn Mem.* 1999;71(2):232-9.
- Heimer L, Van Hoesen GW. The limbic lobe and its output channels: implications for emotional functions and adaptive behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006;30(2):126-47.
- Heimer L, Zahm DS, Alheid GF. Basal Ganglia. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous systems.* 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press; 1995. p.579-628.
- Hitchcock J, Davis M. Lesions of the amygdala, but not of the cerebellum or red nucleus, block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. *Behav Neurosci.* 1986;100(1):11-22.
- Hitchcock JM, Davis M. Efferent pathway of the amygdala involved in conditioned fear as measured with the fear-potentiated startle paradigm. *Behav Neurosci.* 1991;105:826-42.
- Holland PC, Gallagher M. Amygdala circuitry in attentional and representational processes. *Trends Cogn Sci.* 1999;3(2):65-73.
- Huff NC, Frank M, Wright-Hardesty K, Sprunger D, Matus-Amat P, Higgins E, Rudy JW. Amygdala regulation of immediate-early gene expression in the hippocampus induced by contextual fear conditioning. *J Neurosci.* 2006;26(5):1616-23.
- Hull EM, Dominguez JM. Sexual behavior in male rodents. *Horm Behav.* 2007;52(1):45-55.
- Impey S, Smith DM, Obrietan K, Donahue R, Wade C, Storm DR. Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nat Neurosci.* 1998;1(7):595-601.
- Inoue T, Izumi T, Maki Y, Muraki I, Koyama T. Effect of the dopamine D(1/5) antagonist SCH 23390 on the acquisition of conditioned fear. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000;66(3):573-8.
- Inoue T, Tsuchiya K, Koyama T. Effects of typical and atypical antipsychotic drugs on freezing behavior induced by conditioned fear. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996;55(2):195-201.

- ISI Web of Knowledge [home page on the Internet]. 2008. Available from: <http://portal.isiknowledge.com/portal.cgi>
- Iwata J, LeDoux JE, Reis DJ. Destruction of intrinsic neurons in the lateral hypothalamus disrupts the classical conditioning of autonomic but not behavioral emotional responses in the rat. *Brain Res.* 1986;368(1):161-6.
- Iwata J, LeDoux JE. Dissociation of associative and nonassociative concomitants of classical fear conditioning in the freely behaving rat. *Behav Neurosci.* 1988;102(1):66-76.
- Izquierdo I, Medina JH. Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. *Braz J Med Biol Res.* 1993;26(6):573-89.
- Kao KT, Powell DA. Lesions of the substantia nigra retard Pavlovian eye-blink but not heart rate conditioning in the rabbit. *Behav Neurosci.* 1988;102(4):515-25.
- Kapp BS, Frysinger RC, Gallagher M, Haselton JR. Amygdala central nucleus lesions: effect on heart rate conditioning in the rabbit. *Physiol Behav.* 1979;23:1109-17.
- Kelley AE, Domesick VB, Nauta WJ. The amygdalostriatal projection in the rat--an anatomical study by anterograde and retrograde tracing methods. *Neuroscience* 1982;7:615-30.
- Kim JJ, Fanselow MS. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 1992;256(5057):675-7.
- Kim JJ, Jung MW. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006;30(2):188-202.
- Kim JJ, Rison RA, Fanselow MS. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behav Neurosci.* 1993;107:1093-8.
- Kim JJ, Lee HJ, Han JS, Packard MG. Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *J Neurosci.* 2001;21(14):5222-8.
- King BM. Amygdaloid lesion-induced obesity: relation to sexual behavior, olfaction, and the ventromedial hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;291(5):R1201-14.

- Kirouac GJ, Li S, Mabrouk G. GABAergic projection from the ventral tegmental area and substantia nigra to the periaqueductal gray region and the dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol.* 2004;469(2):170-84.
- Klüver H, Bucy PC. "Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy. *Am J Physiol.* 1937;119:254-84.
- Knowlton BJ, Mangels JA, Squire LR. A neostriatal habit learning system in humans. *Science.* 1996;273:1399-402.
- Knowlton BJ, Ramus SJ, Squire LR. Intact artificial grammar learning in amnesia: dissociation of classification learning and explicit memory for specific instances. *Psychol Sci.* 1992;3:172-9.
- Knowlton BJ. The Role of the basal ganglia in learning and memory. In: Squire LR, Schacter DL, editors. *Neuropsychology of memory.* 3<sup>rd</sup> ed. New York: Guilford Press; 2002. p.143-53.
- Kudernatsch M, Sutor B. Cholinergic modulation of dopamine overflow in the rat neostriatum: a fast cyclic voltammetric study in vitro. *Neurosci Lett.* 1994;181(1-2):107-12.
- LaBar KS, Cabeza R. Cognitive neuroscience of emotional memory. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(1):54-64.
- Lavond DG, Kim JJ, Thompson RF. Mammalian brain substrates of aversive classical conditioning. *Annu Rev Psychol.* 1993;44:317-42.
- LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci.* 1990b;10(4):1062-9.
- LeDoux JE, Farb C, Ruggiero DA. Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *J Neurosci.* 1990a;10(4):1043-54.
- LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci.* 1988;8:2517-29.

- LeDoux JE, Sakaguchi A, Reis DJ. Subcortical efferents projections of the medial geniculate nucleus mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. *J Neurosci.* 1983;4:683-98.
- LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 2000;23:155-84.
- LeDoux JE. Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol.* 1995 ;46:209-35.
- LeDoux JE. Emotional memory systems in the brain. *Behav Brain Res.* 1993;58(1-1):69-79.
- LeDoux JE. The amygdala. *Curr Biol.* 2007;17(20):R868.
- Lee HJ, Groshek F, Petrovich GD, Cantalini JP, Gallagher M, Holland PC. Role of amygdalo-nigral circuitry in conditioning of a visual stimulus paired with food. *J Neurosci.* 2005;25:3881-8.
- Lewis SJ, Dove A, Robbins TW, Barker RA, Owen AM. Cognitive impairments in early Parkinson's disease are accompanied by reductions in activity in frontostriatal neural circuitry. *J Neurosci.* 2003;23(15):6351-6.
- Linke R, Braune G, Schwegler H. Differential projection of the posterior paralaminar thalamic nuclei to the amygdaloid complex in the rat. *Exp Brain Res.* 2000;134(4):520-32.
- Ljungberg T, Apicella P, Schultz W. Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *J Neurophysiol.* 1992;67:145-63.
- Loopuijt LD, Zahm DS. Synaptologic and fine structural features distinguishing a subset of basal forebrain cholinergic neurons embedded in the dense intrinsic fiber network of the caudal extended amygdala. *J Comp Neurol.* 2006;498(1):93-111.
- Magila, MC, Xavier GF. Modelos de memória de longa duração em humanos. *Psicol Teor Pesq.* 1999;15:37-44.
- Maren S, Aharonov G, Fanselow MS. Retrograde abolition of conditional fear after excitotoxic lesions in the basolateral amygdala of rats: absence of a temporal gradient. *Behav Neurosci.* 1996a;110:718-26.
- Maren S, Aharonov G, Stote DL, Fanselow MS. N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. *Behav Neurosci.* 1996b;110(6):1365-74.

- Maren S, Fanselow MS. Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal hippocampus, or entorhinal cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 1997;67(2):142-9.
- Maren S, Fanselow MS. Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J Neurosci.* 1995;15(11):7548-64.
- Maren S. Auditory fear conditioning increases CS-elicited spike firing in lateral amygdala neurons even after extensive overtraining. *Eur J Neurosci.* 2000;12:4047-54.
- Maren S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:897-931.
- Maren S. Neurotoxic basolateral amygdala lesions impair learning and memory but not the performance of conditional fear in rats. *J Neurosci.* 1999;19(19):8696-703.
- Martone M, Butters N, Payne P, Becker JT, Sax DS. Dissociation between skill learning and verbal recognition in amnesia and dementia. *Arch Neurol.* 1984;41(9):965-70.
- McDonald AJ. Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. *Neuroscience.* 1991;44:15-33.
- McGaugh JL, McIntyre CK, Power AE. Amygdala modulation of memory consolidation: interaction with other brain systems. *Neurobiol Learn Mem.* 2002;78(3):539-52.
- McGaugh JL. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci.* 2004;27:1-28.
- McGeorge AJ, Faull RL. The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 1989;29(3):503-37.
- McLean PD. Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (visceral brain). *Eletroencephalogr Clin Neurophysiol* 1952;4 407-18.
- Medina AC, Charles JR, Espinoza-González V, Sánchez-Resendis O, Prado-Alcalá RA, Roozendaal B, Quirarte GL. Glucocorticoid administration into the dorsal striatum facilitates memory consolidation of inhibitory avoidance training but not of the context or footshock components. *Learn Mem.* 2007;14(10):673-7

- Meyers RA, Zavala AR, Neisewander JL. Dorsal, but not ventral, hippocampal lesions disrupt cocaine place conditioning. *Neuroreport*. 2003;14(16):2127-31.
- Milner B, Squire LR, Kandel ER. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*. 1998;20(3):445-68.
- Mirenowicz J, Schultz W. Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli. *Nature*. 1996 Feb;379(6564):449-51.
- Mishkin M, Petri HL. Memories and habits: some implications for the analysis of learning retention. In: Squire LR, Butters N, editors. *The Neuropsychology of memory*. New York: Guilford Press; 1984. p. 287-96.
- Mishkin M. Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. *Nature*. 1978;273:297-8.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 1982;297(5868):681-3.
- Musen G, Squire LR. Normal acquisition of novel verbal information in amnesia. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn*. 1991;17(6):1095-104.
- Nader K, Majidishad P, Amorapanth P, LeDoux JE. Damage to the lateral and central, but not other, amygdaloid nuclei prevents the acquisition of auditory fear conditioning. *Learn Mem*. 2001;8:156-63.
- O'Keefe J, Nadel L. Précis of the hippocampus as a cognitive map. *Behav. Brain Sci*. 1979;2:485-533.
- O'Keefe J, Nadel L. *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Clarendon Press; 1978.
- Oliveira MGM, Bueno OFA, Pomarico AC, Gugliano EB. Strategies used by hippocampal and caudate-putamen-lesioned rats in a learning task. *Neurobiol Learn Mem*. 1997;68(1):32-41.
- Oliveira MGM, Bueno OFA. Neuropsicologia da memória humana. *Psicologia USP*. 1993;4:117-38.
- Oliveira MGM. Estratégias utilizadas por ratos com lesões cerebrais no desempenho de uma tarefa de discriminação [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1994.

- Olton DS, Becker JT, Handelmann GE. Hippocampus, space and memory. *Behav. Brain Sci.* 1979;2:313-65.
- Onishi BKA. Desempenho de ratos nas tarefas de medo condicionado e de contraste antecipatório de incentivo: efeitos de lesões seletivas do núcleo basal da amígdala [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2005.
- Packard MG, Hirsh R, White NM. Differential effects of fornix and caudate nucleus on two radial maze tasks: Evidence for multiple memory systems. *J Neurosci.* 1989;9(5):1465-72.
- Packard MG, McGaugh JL. Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. *Behav Neurosci.* 1992;106(3):439-46.
- Packard MG, McGaugh JL. Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem.* 1996;65(1):65-72.
- Packard MG, Teather LA. Amygdala modulation of multiple memory systems: hippocampus and caudate-putamen. *Neurobiol Learn Mem.* 1998;69(2):163-203.
- Packard MG, White NM. Dissociation of hippocampus and caudate nucleus memory systems by posttraining intracerebral injection of dopamine agonists. *Behav Neurosci.* 1991;105(2):295-306.
- Packard MG, White NM. Lesions of the caudate nucleus selectively impair "reference memory" acquisition in the radial maze. *Behav. Neural Biol.* 1990;53:39-50.
- Papez J. A proposed mechanism of emotion. *Arch Neurol Psychiatry.* 1937;38:725-43.
- Paré D, Quirk GJ, Ledoux JE. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiol.* 2004;92:1-9.
- Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Rev.* 1995;20(1):91-127.
- Parent A. Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 1990;13(7):254-8.



- Parent M, Lévesque M, Parent A. Two types of projection neurons in the internal pallidum of primates: single-axon tracing and three-dimensional reconstruction. *J Comp Neurol.* 2001;439(2):162-75.
- Parkinson JA, Willoughby PJ, Robbins TW, Everitt BJ. Disconnection of the anterior cingulate cortex and nucleus accumbens core impairs Pavlovian approach behavior: further evidence for limbic cortical-ventral striatopallidal systems. *Behav Neurosci.* 2000;114(1):42-63.
- Pascoe JP, Kapp BS. Electrophysiological characteristics of amygdaloid central nucleus neurons during Pavlovian fear conditioning in the rabbit. *Behav Brain Res.* 1985;16:117-33.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* San Diego: Academic Press; 1997a.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates: computer graphic files (compact Ed 3).* San Diego: Academic Publishers, 1997b.
- Pelletier JG, Paré D. Role of amygdala oscillations in the consolidation of emotional memories. *Biol Psychiatry.* 2004;55(6):559-62.
- Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvét M, Luppi PH. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience.* 1998;82(2):443-68.
- Pezze MA, Feldon J. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Prog Neurobiol.* 2004;74(5):301-20.
- Phelps EA, LeDoux JE. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron.* 2005;48(2):175-87.
- Phillips RG, LeDoux JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci.* 1992;106(2):274-85.
- Phillips RG, LeDoux JE. Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. *Learn Mem.* 1994;1(1):34-44.

- Pisa M, Cyr J. Regionally selective roles of the rat's striatum in modality-specific discrimination learning and forelimb reaching. *Behav Brain Res.* 1990;37(3):281-92.
- Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Calabresi P, Bernardi G. Activation of D2-like dopamine receptors reduces synaptic inputs to striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci.* 2000;20(7):RC69.
- Pitkänen A, Savander V, LeDoux JE. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci.* 1997;20(11):517-23.
- Pitkänen A. Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: Aggleton JP, editor. *The amygdala: a functional analysis*, 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Oxford University Press; 2000. p. 31-115.
- Ponnusamy R, Poulos AM, Fanselow MS. Amygdala-dependent and amygdala-independent pathways for contextual fear conditioning. *Neuroscience.* 2007;147(4):919-27.
- Popescu AT, Saghyan AA, Paré D. NMDA-dependent facilitation of corticostriatal plasticity by the amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(1):341-6.
- Potegal M. Role of the caudate nucleus in spatial orientation of rats. *J Com Physiol Psychol.* 1969;69(4):756-64.
- Potegal M. The caudate nucleus egocentric localization system. *Acta Neurobiol Exp.* 1972;32(2):479-94.
- Powell DA, Mankowski D, Buchanan S. Concomitant heart rate and corneoretinal potential conditioning in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): effects of caudate lesions. *Physiol Behav.* 1978;20(2):143-50.
- Prado-Alcala RA, Bermudez-Rattoni F, Velazquez-Martinez DN, Bacha GM. Cholinergic blockade of the caudate nucleus and spatial alternation performance in rats; overtraining induced protection against behavioural deficits. *Life Sci.* 1978;23:889-96.
- Prado-Alcala RA, Cruz-Morales SE, Lopez-Miro FA. Differential effects of cholinergic blockade of anterior and posterior caudate nucleus on avoidance behaviors. *Neurosci. Lett.* 1980;18:339-45.

- Price JL. Comparative aspects of amygdala connectivity. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;985:50-8.
- Quirk GJ, Armony JL, LeDoux JE. Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron.* 1997;19(3):613-24.
- Quirk GJ, Repa C, LeDoux JE. Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron.* 1995;15:1029-39
- Ravel S, Legallet E, Apicella P. Responses of tonically active neurons in the monkey striatum discriminate between motivationally opposing stimuli. *J Neurosci.* 2003;23:8489-97.
- Ravel S, Legallet E, Apicella P. Tonically active neurons in the monkey striatum do not preferentially respond to appetitive stimuli. *Exp Brain Res.* 1999;28:531-4.
- Rawlins JNP. Associations across time: The hippocampus as a temporary memory store. *Behav. Brain Sci.* 1985;8:479-96.
- Repa JC, Muller J, Apergis J, Desrochers TM, Zhou Y, LeDoux JE. Two different lateral amygdala cell populations contribute to the initiation and storage of memory. *Nat Neurosci.* 2001;4:724-31.
- Reyes-Vazquez C, Ibarra T, Brust-Carmona H. Persistence of classical conditioned heart rate after extensive lesions of the striatum in rats. *Physiol Behav.* 1979;22:1101-5.
- Rizvi TA, Ennis M, Behbehani MM, Shipley MT. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. *J Comp Neurol.* 1991;303:121-131
- Robbins TW, Everitt BJ. Limbic-striatal memory systems and drug addiction. *Neurobiol Learn Mem.* 2002;78(3):625-36.
- Rodriguez M, Abdala P, Barroso-Chinea P, Gonzalez-Hernandez T. The deep mesencephalic nucleus as an output center of basal ganglia: morphological and electrophysiological similarities with the substantia nigra. *J Comp Neurol.* 2001;438(1):12-31.

- Rogan MT, Stäubli UV, LeDoux JE. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*. 1997;390(6660):604-7.
- Romanski LM, LeDoux JE. Equipotentiality of thalamo-amygdala and thalamo-cortico-amygdala circuits in auditory fear conditioning. *J Neurosci*. 1992;12:4501-9.
- Roosendaal B, McGaugh JL. Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. *Eur J Neurosci*. 1997;9(1):76-83.
- Roosendaal B, Nguyen BT, Power AE, McGaugh JL. Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(20):11642-7
- Saint-Cyr JA, Taylor AE, Lang AE. Procedural learning and neostriatal dysfunction in man. *Brain* 1988;111(Pt 4):941-59.
- Sananes CB, Campbell BA. Role of the central nucleus of the amygdala in olfactory heart rate conditioning. *Behav Neurosci*. 1989;103:519-25.
- Schacter DL. Implicit expressions of memory in organic amnesia: learning of new facts and associations. *Hum Neurobiol*. 1987;6(2):107-18.
- Schultz W, Romo R. Dopamine neurons of the monkey midbrain: contingencies of responses to stimuli eliciting immediate behavioral reactions. *J Neurophysiol*. 1990;63(3):607-24.
- Schultz W, Tremblay L, Hollerman JR. Changes in behavior-related neuronal activity in the striatum during learning. *Trends Neurosci*. 2003;26:321-8.
- Scicli AP, Petrovich GD, Swanson LW, Thompson RF. Contextual fear conditioning is associated with lateralized expression of the immediate early gene c-fos in the central and basolateral amygdalar nuclei. *Behav Neurosci*. 2004;118(1):5-14.
- Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 1957;20(1):11-21.
- Shammah-Lagnado SJ, Alheid G, Heimer L. Striatal and central extended amygdala parts of the interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure:

- evidence from tract-tracing techniques in the rat. *J Comp Neurol.* 2001; 439(1):104-126.
- Sherry DF, Schacter DL. The evolution of multiple memory systems. *Psychol. Rev.* 1987;94:439-54.
- Shuhama R, Del-Ben CM, Loureiro SR, Graeff FG. Animal defense strategies and anxiety disorders. *An Acad Bras Cienc.* 2007;79(1):97-109.
- Solana-Figueroa R, Salado-Castillo R, Quirarte GL, Galindo LE, Prado-Alcalá RA. Enhanced inhibitory avoidance training protects against the amnesic effect of p-chloroamphetamine. *Life Sci.* 2002;71(4):391-9.
- Spann BM, Grofova I. Nigropedunculo-pontine projection in the rat: an anterograde tracing study with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L). *J Comp Neurol.* 1991;311(3):375-88.
- Squire LR, Cohen NJ, Zoukounis JA. Preserved memory in retrograde amnesia: sparing of a recently acquired skill. *Neuropsychologia.* 1984;22(2):145-52.
- Squire LR, Knowlton B, Musen G. The structure and organization of memory. *Annu Rev Psychol.* 1993;44:453-95.
- Squire LR. Mechanisms of memory. *Science.* 1986;232(4758):1612-9.
- Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev.* 1992;99(2):195-231.
- Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem.* 2004;82(3):171-7.
- Steinbusch HW. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience.* 1981;6(4):557-618.
- Sullivan GM, Apergis J, Bush DE, Johnson LR, Hou M, Ledoux JE. Lesions in the bed nucleus of the stria terminalis disrupt corticosterone and freezing responses elicited by a contextual but not by a specific cue-conditioned fear stimulus. *Neuroscience.* 2004;128(1):7-14.
- Swanson LW, Petrovich GD. What is the amygdala? *Trends Neurosci.* 1998;21:323-31.
- Swanson LW. The amygdala and its place in the cerebral hemisphere. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;985:174-84.

- Thomas B, Beal MF. Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 2007;16 Spec No. 2:R183-94.
- Thompson RF, Krupa DJ Organization of memory traces in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci* 1994;17:519-49.
- Tulving E, Schacter DL. Priming and human memory systems. *Science.* 1990; 247(4940):301-6.
- Turner BH, Herkenham M. Thalamoamygdaloid projections in the rat: a test of the amygdala's role in sensory processing. *J Comp Neurol.* 1991;313(2):295-325.
- Van Bockstaele EJ, Chan J, Pickel VM. Input from central nucleus of the amygdala efferents to pericoerulear dendrites, some of which contain tyrosine hydroxylase immunoreactivity. *J Neurosci Res.* 1996;45(3):289-302.
- Van de Kar LD, Piechowski RA, Rittenhouse PA, Gray TS. Amygdaloid lesions: differential effect on conditioned stress and immobilization-induced increases in corticosterone and renin secretion. *Neuroendocrinology* 1991;54(2):89-95.
- Vazdarjanova A, McGaugh JL. Basolateral amygdala is involved in modulating consolidation of memory for classical fear conditioning. *J Neurosci.* 1999; 19(15):6615-22.
- Vazdarjanova A, McGaugh JL. Basolateral amygdala is not critical for cognitive memory of contextual fear conditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(25):15003-7.
- Vertes RP. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 1991;313(4):643-68.
- Vianna DM, Landeira-Fernandez J, Brandão ML. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. *Neurosci Biobehav Rev.* 2001;25(7-8):711-9.
- Walker DL, Davis M. Involvement of NMDA receptors within the amygdala in short-versus long-term memory for fear conditioning as assessed with fear-potentiated startle. *Behav Neurosci.* 2000;114:1019-33.
- Warburton EC, Baird A, Morgan A, Muir JL, Aggleton JP. The conjoint importance of the hippocampus and anterior thalamic nuclei for allocentric spatial learning: evidence from a disconnection study in the rat. *J Neurosci.* 2001;21(18):7323-30.

- Warburton EC, Baird AL, Morgan A, Muir JL, Aggleton JP. Disconnecting hippocampal projections to the anterior thalamus produces deficits on tests of spatial memory in rats. *Eur J Neurosci.* 2000;12(5):1714-26.
- Warrington EK, Weiskrantz L. New method of testing long-term retention with special reference to amnesic patients. *Nature.* 1968;217(5132):972-4.
- Weiskrantz L. Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *J Comp Physiol Psychol.* 1956;49:381-91.
- Weiskrantz L, Warrington EK. Conditioning in amnesic patients. *Neuropsychologia.* 1979;17(2):187-94.
- White NM, McDonald RJ. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem.* 2002;77(2):125-84.
- White NM, Salinas JA. Mnemonic functions of dorsal striatum and hippocampus in aversive conditioning. *Behav Brain Res.* 2003;142:99-107.
- White NM. A functional hypothesis concerning the striatal matrix and patches: mediation of S-R memory and reward. *Life Sci.* 1989;45:1943-57.
- Wilensky AE, Schafe GE, Kristensen MP, LeDoux JE. Rethinking the fear circuit: the central nucleus of the amygdala is required for the acquisition, consolidation, and expression of Pavlovian fear conditioning. *J Neurosci.* 2006;26(48):12387-96.
- Wilensky AE, Schafe GE, LeDoux JE. Functional inactivation of the amygdala before but not after auditory fear conditioning prevents memory formation. *J Neurosci.* 1999;19(24):RC48.
- Wilensky AE, Schafe GE, LeDoux JE. The amygdala modulates memory consolidation of fear-motivated inhibitory avoidance learning but not classical fear conditioning. *J Neurosci.* 2000;20(18):7059-66.
- Yamada H, Matsumoto N, Kimura M. Tonically active neurons in the primate caudate nucleus and putamen differentially encode instructed motivational outcomes of action. *J Neurosci.* 2004;24:3500-10.
- Yin HH, Knowlton BJ. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(6):464-76.

Zimmerman JM, Rabinak CA, McLachlan IG, Maren S. The central nucleus of the amygdala is essential for acquiring and expressing conditional fear after overtraining. *Learn Mem.* 2007;14(9):634-44.

Zola-Morgan S, Squire LR. Medial temporal lesions in monkeys impair memory on a variety of tasks sensitive to human amnesia. *Behav Neurosci.* 1985;99(1):22-34.

Zola-Morgan S, Squire LR. Memory impairment in monkeys following lesions limited to the hippocampus. *Behav Neurosci.* 1986;100(2):155-60.

Zola-Morgan S, Squire LR. Preserved learning in monkeys with medial temporal lesions: sparing of motor and cognitive skills. *J Neurosci.* 1984;4(4):1072-85.



ANEXOS

## **ANEXOS**

ANEXO 1 - Carta de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP.



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 6 de abril de 2005.  
CEP 0089/05

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) TATIANA LIMA FERREIRA  
Co-Investigadores: José Bernardes da Costa; Maria Gabriela Menezes de Oliveira  
Disciplina/Departamento: Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador: Recursos Próprios.

#### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "**Efeitos da lesão assimétrica de estriado dorsal, estriado ventral e amígdala nas tarefas de condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto**".

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Estudo experimental para entendimento de fisiologia ou outras condições não terapêuticas ou diagnósticas.

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** não se aplica.

**OBJETIVOS:** Verificar se existe interação entre duas estruturas cerebrais(estriado e amígdala) no processamento das tarefas de condicionamento clássico de medo ao som e ao contexto.

**RESUMO:** Utilizando o modelo de lesão assimétrica será realizada uma lesão unilateral de amígdala em um hemisfério cerebral e uma lesão contralateral de estriado dorsal ou ventral no hemisfério oposto.Como as projeções amígdala-estriatais são ipsilaterais, este modelo permite verificar o papel desta circuitaria cerebral nestas tarefas comportamentais.Serão realizados 3 experimentos em ratos wistar, machos com 3 meses de idade e pesando 350 grs.No primeiro experimento será observado o efeito das lesões unilaterais de estriado dorsal, ventral e amígdala nas tarefas de condicionamento clássico do medo ao som e ao contexto.No segundo experimento será realizada uma lesão assimétrica de estriado ventral e amígdala e estriado dorsal e amígdala e os animais serão submetidos a tarefa de condicionamento clássico de medo ao contexto.E no terceiro experimento será realizada uma lesão assimétrica de estriado ventral e amígdala e de estriado dorsal e amígdala e os animais serão submetidos a tarefa de condicionamento classico de medo ao som..

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** Estudo de diferentes estruturas cerebrais podem trabalhar cooperativamente para o processamento de uma tarefa cognitiva em particular.

**MATERIAL E MÉTODO:** Descritos todas as fases dos experimentos(animais utilizados, técnicas utilizadas nas cirurgias, anestésicos, aparelhos, sacrifício dos animais(hidrato de cloral) e exames histológicos.

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** AFIP e FAPESP (R\$ 6880,00).

**CRONOGRAMA:** adequado( período estimado de 01/02/05 até 01/02/08).

**OBJETIVO ACADÊMICO:** Doutorado.

**ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:** 03/04/2006 e 29/03/2007.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)