

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto**  
**Departamento de Psicologia e Educação**  
**Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia**

**Mediação do medo condicionado contextual por mecanismos  
serotoninérgicos do circuito núcleo mediano da rafe-hipocampo dorsal**

**Rafael Carvalho Almada**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, como  
parte das exigências para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências.  
Área de Psicobiologia.**

**Ribeirão Preto**

**– 2009 –**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto**  
**Departamento de Psicologia e Educação**  
**Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia**

**Mediação do medo condicionado contextual por mecanismos  
serotoninérgicos do circuito núcleo mediano da rafe-hipocampo dorsal**

**Rafael Carvalho Almada**

**Dissertação apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto –  
USP, como parte das exigências para a obtenção  
do título de Mestre em Ciências.  
Área de Psicobiologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão**

**Ribeirão Preto**

**– 2009 –**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

### FICHA CATALOGRÁFICA

Almada, Rafael Carvalho

**73** p.; il.; 30 cm.

Tese de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Brandão, Marcus Lira.

1.Núcleo mediano da rafe; 2. Hipocampo dorsal; 3.Serotonina ;  
4.Medo condicionado contextual.

*À minha Vó (in memoriam), por estar presente em momentos os quais nem imagino.*

*Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Marcus Lira Brandão, pela orientação, confiança e apoio.

Ao Professor Ricardo Luis Nunes de Souza, pela colaboração na revisão dos relatórios.

À banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura desse trabalho.

Aos meus pais, Abranches e Roseli, pelo carinho e o amor sempre concedido. Tenho muito orgulho de vocês.

Ao meu irmão, Gabriel, pela sua maneira exclusiva de apoiar. Mesmo com a distância estaremos sempre próximos.

A toda minha família, em especial, meu vô José, meu tio Ricardo e minha tia Nirley e minha prima Maria Júlia, pela força enviada.

À Marina e sua família, pelo auxílio no início desta etapa.

Ao Lucas, pela disposição de ajudar e conversar sobre todos os assuntos. Valeu garoto pela amizade que foi construída nesse período.

À Karina, pelo jeito carinhoso de ajudar, corrigir e discutir. Sobretudo, pelas longas conversas e a amizade.

À Helene, pela grande amizade em todos os momentos. Uma pessoa muito especial.

Ao Nikito, pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos e colegas da Psicobiologia, Jana, Luzinha, Milene, Adriano, Amanda, Júlia, Guto, Joice, Renato, Carlos Eduardo, Jorge, Luís Fernando, Carol, Gabriel, Alicia, Lucão, pelo convívio, o apoio direto, e indireto que me ofereceram durante a realização deste trabalho.

Aos amigos de casa, Guilherme e Bruno, pela amizade e o ótimo convívio.

Aos amigos do futebol, em especial Márcio, Zé, pela paciência e amizade na vitória e na derrota.

À Renata, secretária da Psicobiologia, pelo auxílio e as brincadeiras.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ao senhor.

## RESUMO

Vários estudos mostram que o núcleo mediano da rafe (NMR) e o hipocampo dorsal (HD) estão envolvidos no medo condicionado Pavloviano. Além disso, mecanismos serotoninérgicos do NMR parecem participar da expressão da resposta de medo condicionado contextual. Entretanto, ainda não existe uma abordagem experimental que integre os mecanismos do circuito NMR-HD. Neste trabalho, o paradigma do medo condicionado foi utilizado para testar a influência dos mecanismos serotoninérgicos do circuito NMR-HD no medo condicionado contextual. As respostas de sobressalto e congelamento foram avaliadas após a administração de drogas serotoninérgicas intra-NMR e intra-HD, 6 h depois a sessões treino, nas quais os ratos eram condicionados com choques nas patas. A redução da transmissão serotoninérgica no NMR é devido a microinjeção do 8-hidroxi-2(di-*n*-propilamino)-tetralin (8-OH-DPAT), um agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, no NMR promoveu redução das respostas de congelamento, mas não alterou a resposta de sobressalto. Estes resultados são consistentes com a ideia de que mecanismos serotoninérgicos no NMR regulam as respostas de congelamento a um contexto aversivo. A diminuição pós-sináptica da serotonina nas áreas de projeção do NMR ocorre devido a ativação de autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub> nesta estrutura. Com relação ao hipocampo, a microinjeção de cetanserina, um antagonista de receptores 5-HT<sub>2</sub>, não promoveu alteração nas respostas de congelamento e sobressalto potencializado pelo medo, porém a ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pela injeção de 8-OH-DPAT 6 h após o treino inibiu essas respostas. De acordo com esses resultados, um mecanismo inibitório deva se interpor entre os processos associados à chegada de informação aversiva e os associados à saída delas no HD. As projeções HD-amígdala e córtex pré-frontal medial podem constituir a porta de saída dos processos neurais subjacentes a expressão do medo condicionado contextual, conforme foi observado no experimento em que estudou a imunorreatividade destas estruturas à proteína Fos em ratos submetidos ao mesmo procedimento experimental de medo condicionado contextual.

## ABSTRACT

Several studies have shown that the median raphe nucleus (MRN) and dorsal hippocampus (DH) are involved in Pavlovian conditioned fear. Moreover, previous findings have also implicated serotonergic mechanisms of the MRN in the retrieval of contextual conditioned fear. However, studies that examine the integrated involvement of serotonergic mechanisms of the MRN-DH are lacking. This study, a fear conditioning paradigm was used to test whether the serotonergic projections from the MRN to DH can influence contextual fear conditioning. Startle and freezing responses were evaluated after administration of serotonergic drugs into the MRN or DH, 6 h previously rats received footshocks in the training session. A reduction of serotonergic transmission in the MRN by local infusions of the 5-HT<sub>1A</sub> agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT) decreased freezing response but did not reduce fear-potentiated startle. This pattern of results is consistent with the hypothesis that MRN serotonergic mechanisms selectively modulate the freezing response to the aversive context. A decrease in postsynaptic 5-HT receptor activity at projection areas has been proposed to be the main consequence of 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation in the MRN. As for the DH, infusions of the 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist ketanserin into the DH had no effect, but activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors through intra-DH injections of 8-OH-DPAT inhibited both the freezing and fear-potentiated startle response. To reconcile these findings, an inhibitory mechanism may exist between the incoming DH 5-HT pathway from the MRN and the presynaptic 5-HT neurons that are part of the DH output to other structures. The DH-amygdala and medial prefrontal cortex projections could well be this output circuit modulating the expression of contextual fear conditioning as revealed by measurements of Fos immunoreactivity in these areas.

## **Sumário**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
1.1. Medo condicionado contextual	14
1.1.1. Sobressalto potencializado pelo medo	14
1.1.2. Congelamento	16
1.2. Serotonina	16
1.3. Substrato neural	18
1.3.1. Núcleo mediano da rafe	19
1.3.2. Hipocampo	20
1.4. Distribuição da proteína Fos no medo contextual	23
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>EXPERIMENTO I</b>	<b>27</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
3.1. Animais	28
3.2. Cirurgia	28
3.3. Drogas	29
3.4. Microinjeções de drogas	30

3.5. Medo contextual	30
3.5.1. Equipamentos	30
3.5.2. Procedimento	31
3.6. Histologia	32
3.7. Análise Estatística	33
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>34</b>
4.1. Localização dos sítios de injeção no NMR	35
4.2. Efeitos das microinjeções de 8-OH-DPAT no NMR	35
4.3. Localização dos sítios de injeção no HD	36
4.4. Efeitos das microinjeções de 8-OH-DPAT no HD	37
4.5. Efeitos das microinjeção de cetanserina no HD	38
<b>EXPERIMENTO II</b>	<b>40</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>41</b>
5.1 Animais	41
5.2. Medo contextual	41
5.2.1. Equipamentos	41
5.2.2. Procedimento	42

5.3. Histologia	43
5.4. Protocolo de imunistoquímica para detecção da proteína Fos	43
5.5. Montagem das lâminas	47
5.6. Análise quantitativa da expressão da proteína Fos	45
5.7. Análise estatística	45
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>47</b>
6.1. Expressão da proteína Fos	48
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>51</b>
<b>8. CONCLUSÕES</b>	<b>58</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>60</b>

## INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

O medo pode originar-se pela exposição de um animal a estímulos naturalmente ameaçadores, que são reconhecidos de maneira inata, e estímulos de perigo condicionados, adquiridos através de processos de aprendizagem. O reconhecimento de um estímulo inato de perigo independe de qualquer processo prévio de aprendizagem e está presente em todos os indivíduos de uma mesma espécie. Um gato, ou simplesmente o odor deste animal sinaliza perigo em roedores que jamais tiveram contato prévio com felinos. O mesmo ocorre em macacos diante de cobras e em bebês humanos expostos a altura ou ruídos intensos. Outros estímulos, chamados estímulos aprendidos, podem passar a sinalizar perigo através de um processo de aprendizagem chamado medo condicionado. Isto ocorre quando estímulos aparentemente inócuos ou neutros são associados a estímulos aversivos, particularmente aqueles que deflagram dor. Por exemplo, um animal passará a expressar medo diante de um contexto que tenha sido previamente associado com a apresentação de choques elétricos. Similarmente, crianças podem tornar-se amedrontadas quando confrontadas com estímulos que anteriormente lhe infligiram dor ou extremo desconforto. Podemos também adquirir novos medos, ao longo da nossa história particular, através de determinadas relações sociais também envolvendo aprendizagem do tipo associativa (LANDEIRA-FERNANDEZ, 1996).

O estudo da neurobiologia do medo foi bem descrito nos relatos de Darwin sobre o caráter evolutivo do comportamento emocional no homem, a primeira tentativa importante nesse sentido foi no seu escrito *A expressão das emoções no homem e nos animais*, em 1872. Seus trabalhos na segunda metade do século XIX indicavam que o estudo do comportamento de outros animais era o caminho para a compreensão das emoções no homem. O comportamento humano de defesa parece remontar ao distante passado evolutivo. Por

consequente, estudando as reações de medo em animais, podemos clarificar os mecanismos do medo nos homens (LEDOUX, 2001).

Em roedores, o comportamento em situações de perigo é organizado de acordo com a viabilidade de fuga e da distância entre a presa e o predador. A fuga, quando possível, é a resposta predominante. Por outro lado, se não houver uma distância segura para a presa, a ausência completa de seus movimentos (congelamento) reduz a probabilidade de ser reconhecido pelo predador. A intensidade da reação aumenta quando a distância entre os animais diminui. Na situação de confronto real, ocorrem respostas de ameaça defensiva (vocalizações e exposição dos dentes) e ataque explosivo (saltos e mordida na área do focinho do predador) seguido, imediatamente, pela fuga (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988).

A reação de defesa é caracterizada por alterações do padrão comportamental e fisiológico frente a estímulos ameaçadores ou estressantes (BANDLER; CARRIVE, 1988). Um animal quando é confrontado com uma ameaça à sua integridade física ou à própria sobrevivência, seja esta representada por um predador ou um agressor da mesma espécie, seja por uma simples mudança do ambiente, ele apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de medo. Esse conjunto de respostas, características da espécie, foi chamado de reações de defesa espécie-específica (BOLLES, 1970).

## **1.1. Medo condicionado contextual**

### **1.1.1. Sobressalto potencializado pelo medo**

A importância dos estímulos contextuais na expressão do medo condicionado e nos distúrbios de ansiedade é amplamente investigada em diversos modelos animais,

particularmente no sobressalto potencializado pelo medo (BROWN; KALISH; FABER, 1951; CASSELLA; DAVIS, 1986; DAVIS; HITCHCOCK; ROSEN, 1991). Define-se a resposta de sobressalto como uma ativação reflexa e estereotipada de músculos antagônicos do corpo, induzida pela aplicação súbita de um estímulo auditivo, visual ou somatossensorial de grande intensidade (FLESHLER, 1965; KOCH, 1999). Essa resposta tem um alto valor adaptativo de proteção contra eventuais danos causados por um predador (KOCH, 1999). Geralmente, em vertebrados, ferimentos na região dorsal do pescoço pode ocasionar a morte. Deste modo, a contração dos músculos dorsais do pescoço, torna-se fundamental para a redução da exposição desta área a um ataque pelas costas. A resposta de sobressalto também é encontrada em humanos com características bastante similares (YEOMANS; FRANKLAND, 1996).

Em roedores, a resposta de sobressalto pode ser amplificada por meio da apresentação de um estímulo condicionado explícito (luz ou som) ou contexto associado a um estímulo aversivo incondicionado, tal como choque nas patas (FENDT; FANSELOW, 1999). Nessas condições, o aumento da resposta do sobressalto é devido ao estado de medo que o animal exibe após o pareamento dos estímulos condicionados ao choque. Esse fenômeno é denominado “potencialização da resposta de sobressalto pelo medo” (BROWN; KALISH; FABER, 1951; HITCHCOCK; DAVIS, 1987). No modelo da potencialização da resposta de sobressalto, o estado de medo é considerado como uma resposta condicionada (DAVIS; FALLS; CAMPEAU; KIM, 1993). O pareamento dos estímulos leva ao desenvolvimento de um estado condicionado de medo que age facilitando a reação de sobressalto ao som (BROWN; KALISH; FABER, 1951).

### 1.1.2. Congelamento

Além da resposta de sobressalto avaliada no modelo do sobressalto, também é possível analisar a resposta de congelamento do animal. Esta resposta deve-se ao estado de medo que o animal exhibe em consequência do pareamento do estímulo condicionado ao choque nas patas (BOLLES, 1970).

O congelamento é uma resposta de defesa comum em roedores. Este comportamento complexo e coordenado é definido como a ausência de todos os movimentos corporais, exceto os respiratórios, com um alto nível de alerta e considerável tonicidade muscular (BOLLES, 1970; FENDT; FANSELOW, 1999). Blanchard et al. (1969) observaram que animais quando recebiam choque apresentavam um aumento de *crouching*, comportamento caracterizado por uma postura agachada. Este comportamento posteriormente começou a ser utilizado com índice de medo e foi classificado como resposta de congelamento (BLANCHARD; BLANCHARD, 1969).

O comportamento de congelamento é uma maneira efetiva de evitar um provável perigo, quando a fuga e a esquiva são impossíveis. Modificações inesperadas são suficientes para promover o congelamento em situações novas (HOFFER, 1970). A medida de congelamento pode oferecer um método bastante conveniente e sensível para o estudo do medo condicionado (BOUTON; BOLLES, 1980; FANSELOW; BAACKES, 1982).

## 1.2. Serotonina

Desde a sua descoberta em 1948 por Rapport e colaboradores, a serotonina (5-hidroxi-triptamina, 5-HT) tem sido relacionada a uma variedade de modificações fisiológicas, sensorio-motoras e comportamentais (BARNES; SHARP, 1999; JACOBS; AZMITIA, 1992).

As primeiras hipóteses relacionando a serotonina a doenças mentais surgiram no início da década de cinquenta. Entretanto, apenas na década seguinte com a utilização da técnica de fluorescência histoquímica foi possível identificar a distribuição da serotonina no sistema nervoso central (FALCK et al., 1962).

Numerosos estudos salientam o papel fundamental da serotonina e dos seus diversos receptores nos diversos aspectos funcionais e cognitivos, incluindo aprendizagem e memória (ORGEN et al., 2008). A complexa ação fisiológica da 5-HT é mediada por uma ampla família de receptores (HOYER; MARTIN, 1997; HOYER et al. 2002). Essa descoberta impulsionou uma intensa pesquisa, que resultou na identificação dos subtipos de receptores serotoninérgicos e suas funções. São 14 tipos de receptores para a 5-HT na classe dos mamíferos, classificados em 7 famílias conforme as características farmacológicas, transduccionais e estruturais. A família 5-HT<sub>1</sub> (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub>, 5-HT<sub>1F</sub>), 5-HT<sub>2</sub> (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>), 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub> (5-HT<sub>5A</sub>, 5-HT<sub>5B</sub>), 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub> (HOYER; MARTIN, 1997; HOYER et al. 2002). Desta maneira, a 5-HT pode apresentar diferentes funções nos diversos sistemas encefálicos, dependendo do subtipo do receptor serotoninérgico (PAZOS; PALACIOS, 1985).

Em humanos e roedores, o receptor 5-HT<sub>1A</sub> está amplamente concentrado em áreas corticais e límbicas, como o hipocampo, associadas com funções de memória, (ORGEN et al., 2008). O desenvolvimento de ligantes seletivos, tais como o 8-hidroxi-2(di-*n*-propilamino)-tetalin (8-OH-DPAT) (GOZLAN, 1983) e cetanserina (LEYSEN, 1982), proporcionou a caracterização e a localização dos subtipos de receptores de 5-HT no sistema nervoso central. Além disso, possibilitou verificar a participação dos diferentes receptores nas diversas respostas comportamentais estudadas (YOUNG; KUHAR, 1980).

### 1.3. Substrato neural

Muitos estudos têm investigado o substrato neural e os mecanismos neuroquímicos envolvidos na aquisição das informações aversivas e na expressão do medo condicionado a estímulos explícitos e contextuais. A amígdala, o hipocampo e o núcleo mediano da rafe estão criticamente envolvidos na regulação das respostas de medo condicionado contextual (MCNISH, 1997; AVANZI; BRANDÃO, 2003; SILVA; GARGARO; BRANDÃO, 2004). Desta forma, as projeções serotoninérgicas que saem do NMR, principal fonte de transmissão serotoninérgica no encéfalo, em direção à amígdala e ao septo-hipocampo são de grande importância na modulação do medo contextual (AZMITIA; SEGAL, 1978; GRAY; MCNAUGHTON, 2000; SILVA et al., 2002).

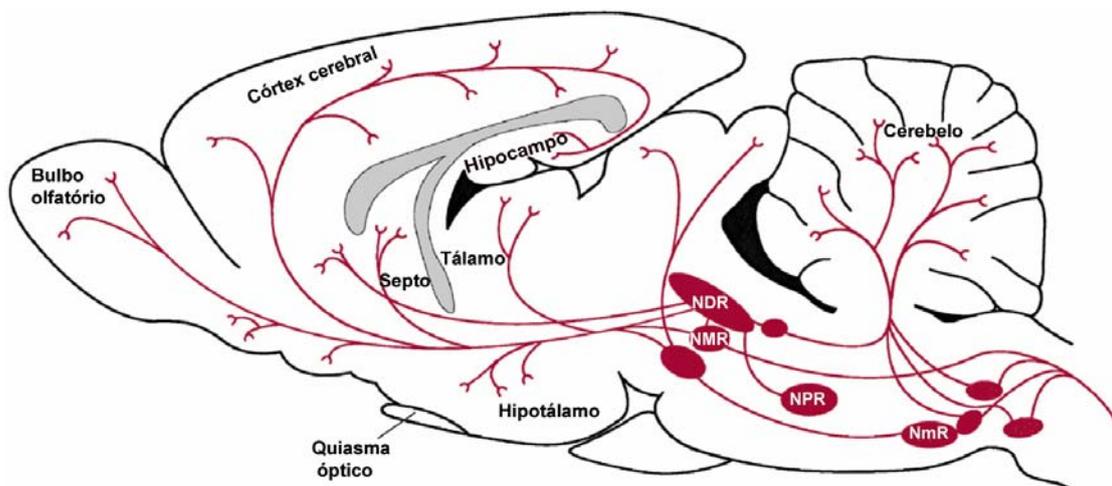
Lesões da amígdala bloqueiam a resposta de congelamento a um contexto aversivo ou a um estímulo condicionado explícito. Este dado ressalta o papel fundamental desta estrutura na mediação das respostas condicionadas ao medo (KAPP et al., 1982; DAVIS, 1992; LEDOUX, 1992). Por outro lado, lesões do hipocampo afetam somente o congelamento contextual sem alterar a resposta de medo condicionado a estímulos explícitos (KIM; FANSELOW, 1992; PHILLIPS; LEDOUX, 1992). Dessa maneira, pode-se considerar o hipocampo como uma estrutura que desempenha um papel crucial na organização do medo condicionado contextual (WILTGEN; FANSELOW, 2003; FENDT et al., 2005). Sabe-se também que o processamento da memória recente é prejudicado quando o hipocampo sofre algum tipo de lesão. Portanto, torna-se claro o envolvimento do hipocampo na função de armazenamento de informações (FANSELOW, 2000). O hipocampo estabelece diversas conexões com estruturas encefálicas, o que lhe confere um papel importante na transmissão dos mais complexos sinais envolvidos no processamento das informações aversivas. Nesse

sentido, as projeções hipocámpais para a amígdala desatacam-se nessa circuitaria (LEDOUX et al., 1987).

### 1.3.1. Núcleo mediano da rafe

Através da técnica de histofluorescência Dahlström e Fuxe (1964) verificaram a existência de grupos de núcleos celulares contendo serotonina, sendo estes concentrados nos núcleos da rafe. Dentre os núcleos da rafe, NMR e o núcleo dorsal da rafe são os que apresentam o maior número de neurônios serotoninérgicos.

A principal fonte de neurônios serotoninérgicos no mesencéfalo, o NMR envia projeções para amígdala, septo e hipocampo (AZMITIA; SEGAL, 1978; GRAY; MCNAUGHTON, 2000; SILVA et al., 2002). As principais conexões serotoninérgicas estão ilustradas na Figura 1.



**Figura 1.** Ilustração esquemática das principais conexões serotoninérgicas ascendentes e descendentes no rato (modificado de ÖRGEN et al., 2008). NDR, núcleo dorsal da rafe; NMR, núcleo mediano da rafe; NPR, núcleo pontino da rafe; NmR, núcleo magno da rafe.

O NMR e suas projeções serotoninérgicas parecem estar envolvidos na aquisição e expressão de informações contextuais do medo condicionado contextual (AVANZI et al.,

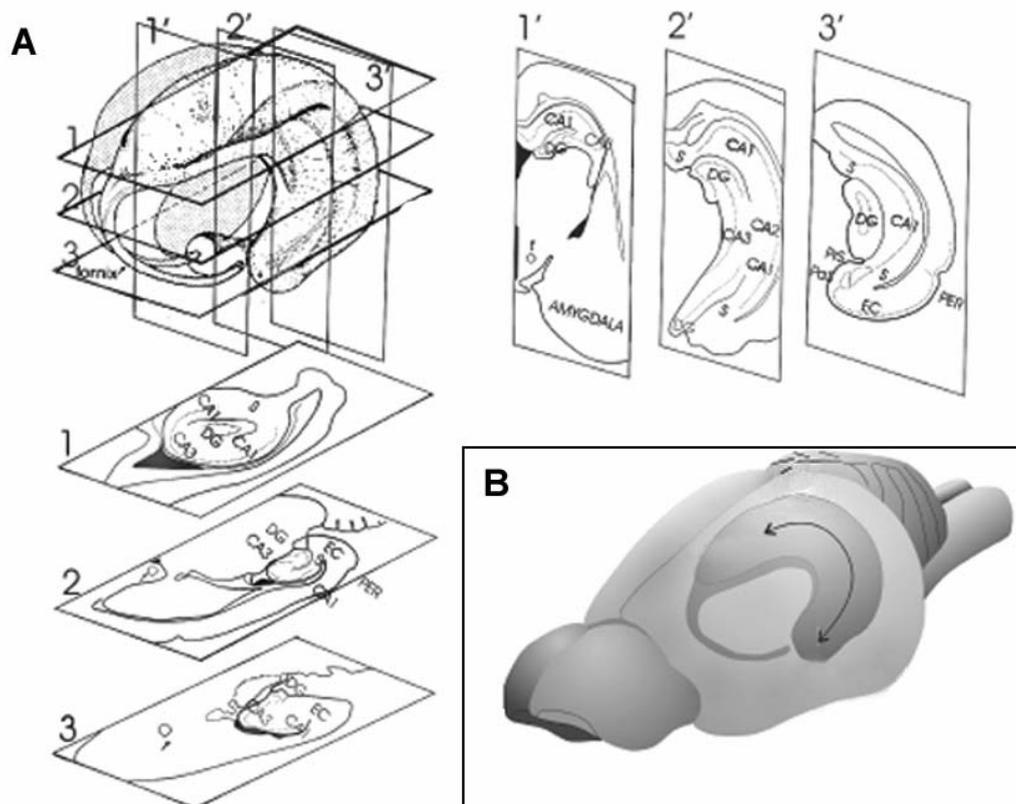
1998; AVANZI; BRANDAO 2001; SANTOS et al., 2005; BORELLI et al., 2005). A microinjeção de 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralin (8-OH-DPAT) no NMR causou uma redução significativa das respostas de congelamento em ratos submetidos ao paradigma de medo condicionado contextual, reproduzindo os efeitos da lesão eletrolítica ou neurotóxica com NMDA deste núcleo (AVANZI et al., 1998; AVANZI; BRANDAO, 2001; SANTOS et al., 2005; BORELLI et al., 2005). Porém, observou-se que o congelamento induzido por estímulos explícitos previamente pareados ao choque elétrico nas patas, tal como o som, não foi afetado pela microinjeção do 8-OH-DPAT (AVANZI; BRANDAO, 2001).

O agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OH-DPAT, bloqueia a atividade serotoninérgica através de uma ação pré-sináptica em autoreceptores somatodendríticos nos núcleos da rafe determinado uma redução na condução de estímulos até as terminações desses neurônios serotoninérgicos (BLIER; MONTIGNY, 1987). Recentemente, observou-se que a injeção pré-treino de 8-OH-DPAT no NMR também atenua o sobressalto potencializado pelo medo, mas a inativação dos neurônios 5-HT pós-treino não afeta esta resposta. Em ambos os casos, há uma redução da resposta de congelamento a estímulos aversivos contextuais (BORELLI et al., 2005). Esses resultados apontam para uma clara dissociação entre os mecanismos neurais responsáveis pela aquisição e expressão da resposta de medo condicionado contextual medida pelo sobressalto, enquanto a resposta de congelamento ao medo contextual é invariavelmente inibido pela redução da neurotransmissão serotoninérgica no NMR.

### **1.3.2. Hipocampo**

A formação hipocampal desperta a atenção dos neuroanatomistas desde os primeiros estudos envolvendo o sistema nervoso. Nos trabalhos clássicos de Golgi, Ramón e Cajal (1911), já era evidente o interesse em esclarecer a organização celular e as conexões da

formação hipocampal. Este termo compreende seis regiões distintas; giro denteado, hipocampo (o qual é subdividido em três camadas, CA1, CA2 e CA3), subículo, pré-subículo, para-subículo e córtex entorrinal (AMARAL; WITTER, 1995). No cérebro do rato a formação hipocampal segue o eixo rostro-caudal disposto em três dimensões, neste eixo podemos classificar o hipocampo em dorsal e ventral (AMARAL; WITTER, 1995). A Figura 2 ilustra a formação hipocampal disposta em três dimensões.

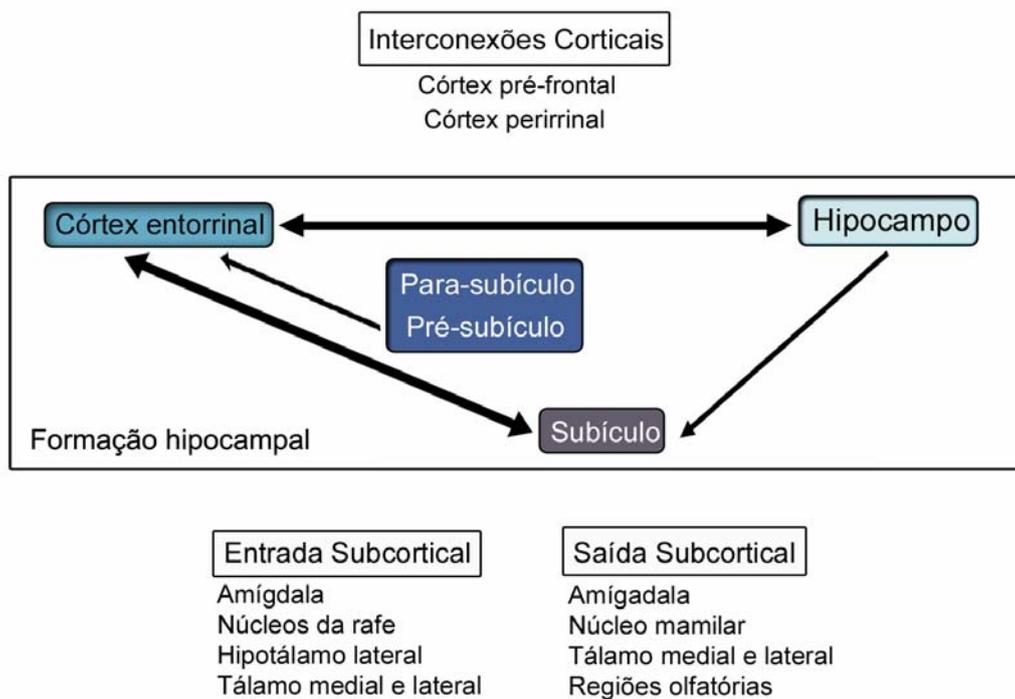


**Figura 2.** Representação esquemática mostrando a disposição em três dimensões da formação hipocampal de ratos. (A) Três seções horizontais e três seções verticais da formação hipocampal em diferentes níveis. (B) Ilustração da formação hipocampal no encéfalo de rato em transparência. CA1, CA2 e CA3 camadas do hipocampo; DG, giro denteado; EC, córtex entorrinal; PER córtex perirrinal; S, subículo; f, fornix. (modificado de AMARAL; WITTER, 1995).

Na camada CA1 do hipocampo de ratos, neurônios piramidais e interneurônios inibitórios GABAérgicos são densamente inervados por neurônios serotoninérgicos,

originados do núcleo mediano da rafe (AZMITA; SEGAL, 1978; KATSURABAYASHI et al., 2003). A ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>3</sub> localizados no corpo de interneurônios GABAérgicos promovem, respectivamente, redução e aumento da transmissão sináptica inibitória (SHMITZ et al., 1995; MCMAHON; KAUER, 1997). Sabe-se também que há receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>3</sub> pré-sinápticos em terminações de interneurônios GABAérgicos, sendo esses com característica inibitória e excitatória, respectivamente (KATSURAVAYASHI et al., 2003).

A formação hipocampal apresenta uma ampla rede de interconexões corticais, além das entradas e saídas subcorticais. Algumas conexões da formação hipocampal estão representadas na Figura 3.



**Figura 3.** Esquema das principais conexões da formação hipocampal em ratos (modificado de AMARAL; WITTER, 1995).

O hipocampo dorsal (HD) participa da formação e consolidação da memória no medo contextual, porém parece não contribuir na organização da resposta de medo condicionado a

estímulos explícitos. Esta estrutura apresenta um papel central na integração de processos emocionais e mnemônicos (QUINN et al., 2008).

#### **1.4. Distribuição da proteína fos no medo condicionado contextual**

A neurobiologia molecular permite a possibilidade de investigar a relação entre drogas, comportamentos e circuitos neurais ativados. A maioria das evidências neuroanatômicas associadas a neurobiologia do medo é originária de estudos comportamentais que utilizam técnicas de lesão, estimulação ou manipulação farmacológica de estruturas específicas. Embora sejam de grande utilidade, esses métodos não avaliam o funcionamento integrado do neuroeixo em situações de ameaça, apenas indicam o envolvimento de áreas encefálicas isoladas envolvidas na mediação das respostas de medo e possibilitam, portanto, uma identificação parcial do substrato neural do medo. Parte da dificuldade em analisar as redes sensoriais envolvidas nas respostas de medo consiste no fato de que muitas vias sensoriais ascendentes são multissinápticas e esses caminhos neurais são relativamente difíceis de serem traçados por técnicas de investigação tradicional (PESCHANSKI; BESSON, 1984; MCMAHON; WALL, 1985; BULLITT, 1990).

O desenvolvimento de técnicas de marcação que possibilitam a identificação da atividade neural em preparações histológicas tem sido útil na identificação de estruturas que organizam o comportamento em resposta a estímulos aversivos, assim como permitem a identificação de focos de atividade anormal em estados patológicos (DRAGUNOW; FAULL, 1989; MORGAN; CURRAN, 1991; BULLITT, 1990). Estas técnicas têm como característica básica a detecção de um marcador de ação neural. Desta forma, áreas que são excitadas por estímulos definidos podem ser identificadas por sua atividade celular ao longo do neuroeixo.

A expressão do gene c-fos e seu produto protéico possibilitam este tipo de marcação (HERDEGEN; LEAH, 1998)

Dentre as técnicas de biologia molecular, a hibridização *in situ* e a imunistoquímica para detecção do RNAm c-fos e da proteína Fos são as mais utilizadas por fornecerem melhor localização neuroanatômicas do substrato neural ativado por estímulos específicos (CURRAN; MORGAN, 1995; CAMPEAU et al., 1997). A técnica de imunistoquímica para detecção da proteína Fos é baseada na interação entre antígeno e anticorpo e utiliza-se de anticorpos capazes de reconhecerem e de se ligarem especificamente a substâncias neuroativas. O intervalo necessário para síntese e acúmulo da proteína Fos no SNC é de aproximadamente duas horas após a excitação neural e desaparece depois de 4 a 16 horas. A marcação da imunorreatividade à proteína Fos é restrita ao núcleo celular (BULLITT, 1990).

O estudo do medo condicionado em diversos testes comportamentais associados a diferentes técnicas de imunistoquímica possibilitou um mapeamento das estruturas envolvidas no estudo dos diversos tipos de medo e como consequência, tem contribuído de maneira significativa no entendimento atual da neurobiologia da ansiedade.

## **OBJETIVOS**

---

## **2. OBJETIVOS**

O presente trabalho teve como proposta avaliar a participação de mecanismos serotoninérgicos no medo condicionado contextual. O experimento I consistiu em um estudo farmacológico do envolvimento do NMR e HD na expressão do medo condicionado contextual em uma janela temporal de 6 h após a sessão de condicionamento.

O experimento II avaliou a distribuição da proteína Fos em estruturas telencefálicas com importante conexão anatômica com HD e que podem estar envolvidas no processo de transferência das informações associadas ao medo condicionado contextual.

## **EXPERIMENTO I**

Estudo dos mecanismos serotoninérgicos do NMR e HD no medo condicionado contextual

---

---

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso médio de 250 g, agrupados (cinco animais por caixa) em gaiolas de polipropileno (30 x 32 x 18 cm), forradas com serragem, com livre acesso a água e alimento. Os animais foram mantidos em um biotério com temperatura controlada a  $23^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$  e um programa de iluminação artificial com ciclo claro/escuro 12 h x 12 h, com início do período de claro às 7:00 horas. O trabalho compõe um projeto temático aprovado pela comissão de ética no uso de animais, CEUA (protocolo 06.1.123.8.53.9).

#### 3.2. Cirurgia

Os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com tribromoetanol (Aldrich, USA), na concentração de 250 mg/Kg. Após a tricotomia do campo cirúrgico, foram levados a um aparelho estereotáxico (David-Kopf, USA) onde o crânio foi fixado pelo rochedo temporal e incisivos superiores, sendo a barra dos incisivos colocada a 2,5 mm abaixo da linha interaural. Em seguida, foi realizada a limpeza do campo cirúrgico com iodo a 1% em solução alcoólica e uma injeção subcutânea de 0,2 mL de cloridrato de lidocaína 2% (Harvey-Brasil) foi aplicada no local da incisão. Com uma incisão longitudinal na pele, o perióstio foi removido por raspagem, com o auxílio de uma pinça e algodão. Dois orifícios foram feitos nos ossos parietais com a utilização de uma broca elétrica (Freedom-USA), para fixação de parafusos de aço inoxidável que ancoram a prótese ao crânio do animal. Logo após, um outro orifício foi feito para implante da cânula 26 G (gauge) – de aço inoxidável, com 15 mm (NMR) ou 10mm de comprimento (HD), 0,6 mm de diâmetro externo, 0,4 mm de

diâmetro interno – colocada na haste do estereotáxico e dirigida para o NMR do animal, com uma angulação de 20° ou para o HD sem angulação. Importante ressaltar que no HD alternaram-se os lados da implantação da cânula. Considerando o bregma como referência foram utilizadas as seguintes coordenadas, NMR: antero-posterior = - 7,8 mm do bregma, médio-lateral =  $\pm$  2,5 mm, dorso-ventral = - 6,8 mm; e HD: antero-posterior = - 4,20 mm do bregma, médio-lateral =  $\pm$  2,6 mm, dorso-ventral = - 2,8 mm (PAXINOS; WATSON, 2007). Em seguida, o crânio foi revestido com acrílico dental (JET, Brasil) para fixação da cânula-guia, que foi selada com fio de aço inoxidável para protegê-la de obstrução. Ao término da cirurgia cada animal recebeu, por via intramuscular, uma injeção (0,2 mL) de pentabiótico (Fort Dodge, Brasil) 60.000 UI, com o intuito de prevenir possíveis infecções e, por via subcutânea, uma injeção do analgésico banamine (0,2 mL). Os animais, após serem retirados do estereotáxico, foram recolocados em suas gaiolas no biotério para recuperação pós-cirúrgica durante 5 dias.

### 3.3. Drogas

As drogas utilizadas foram o agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OH-DPAT (8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralin, Sigma, EUA), e o antagonista de receptores 5HT<sub>2A/2C</sub>, a cetanserina (ketanserin tartrate, RBI, EUA). O 8-OH-DPAT (1 µg/0,2 µL) foi solubilizado somente em solução salina, a cetanserina (5,5 µg/0,2 µL) foi solubilizada em 2% de Tween 80 e solução salina (0,9%). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume do veículo utilizado para dissolução das drogas. As concentrações das drogas e o tempo de espera foram baseados em alguns estudos (CASTILHO; BRANDAO, 2001; AVANZI; BRANDAO, 2001; AVANZI et al., 2003; BORELLI et al., 2005).

### **3.4. Microinjeções de drogas**

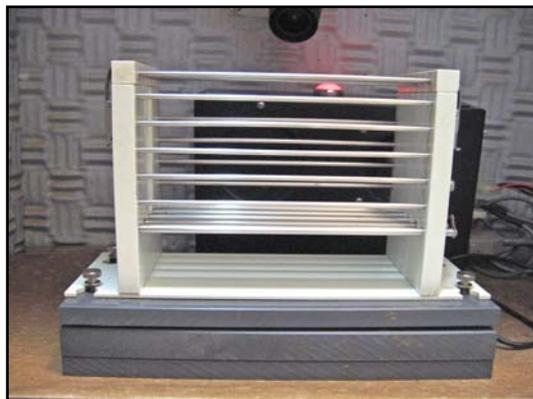
Os animais receberam uma injeção intra-NMR ou HD de veículo ou droga, através de uma agulha odontológica 30 G – com 16 mm (NMR) e 11 mm (HD) de comprimento, 0,3 mm de diâmetro externo introduzida na cânula e ultrapassando-a em 1 mm.. A agulha para injeção foi conectada a uma seringa Hamilton, de 5  $\mu$ L, por meio de um tubo de polietileno (PE-10). Um volume de 0,2  $\mu$ L foi injetado durante 1 min, por meio de uma bomba de microinfusão (Harvard, EUA), e a agulha foi mantida no lugar por 1 minuto adicional para evitar o refluxo da solução. O deslocamento de uma bolha de ar no tubo de polietileno foi utilizado para monitorar a microinjeção. Após 10 minutos do procedimento de microinjeção os animais foram colocados na caixa de sobressalto para o registro das respostas comportamentais na sessão teste.

### **3.5. Medo contextual**

#### **3.5.1. Equipamentos**

Caixa de Sobressalto: Durante as sessões de balanceamento e teste foram utilizadas duas caixas de restrição idênticas, construídas em aço inoxidável e suspensas em uma armação de PVC, medindo internamente 16,5 x 7,5 x 7,5 cm. Elas foram abrigadas em duas câmaras de atenuação sonora (64 x 60 x 40 cm), fabricadas em madeira, com revestimento acústico de espuma (ENV-018S, Med Associates). A resposta de sobressalto foi registrada por meio de uma plataforma sensível à pressão (estabilímetro, PHM250-60, Med Associates). O sobressalto do animal gera movimentos nesta plataforma que são captados por sensores com o deslocamento de corrente e então amplificados, gerando um sinal analógico que é digitalizado

e analisado por um programa computacional (*Startle Reflex*, versão 4.10, Med Associates). A apresentação dos estímulos, o tipo, a duração, a intensidade e a amplitude dos mesmos também foram computadorizadas por meio de uma interface (Dig 729, Med Associates). A resposta de sobressalto foi medida durante os primeiros 100 ms após a apresentação do estímulo sonoro, que consiste em um ruído branco de intensidade de 100 dB e duração de 50 ms, com *rise-decay* de 5 ms, sendo liberado por um alto-falante localizado a 10 cm de distância da caixa contendo o animal. O ruído de fundo foi apresentado pelo mesmo alto-falante e consiste em um ruído branco de 55 dB. Uma lâmpada vermelha de 6 W e uma câmera de vídeo, instaladas no interior das câmaras de isolamento acústico, permitem a observação do animal durante as sessões de balanceamento e teste. As plataformas foram calibradas no início de cada sessão para garantir igual nível de sensibilidade ao longo dos experimentos.



**Figura 4.** Caixa de medida do sobressalto.

### 3.5.2. Procedimento

*Sessões de Balanceamento:* Foram realizadas duas sessões de balanceamento nas quais os animais foram colocados na caixa de medida do sobressalto e, após 5 min, recebem 30 estímulos sonoros de intensidade de 100 dB com um intervalo fixo de 30 s entre cada

estímulo. A amplitude média do sobressalto ao longo das 30 tentativas de estímulos sonoros da última sessão de balanceamento foi utilizada para alocar os animais aos diversos grupos dos experimentos. Após as sessões de balanceamento foi realizada a cirurgia para o implante de cânula guia ao NMR ou HD.

*Sessão Treino:* Cinco dias após a cirurgia foi iniciado o condicionamento aversivo. Os animais foram colocados na caixa de medida do sobressalto e após cinco minutos foram submetidos a 10 associações da caixa experimental (contexto) com choque nas patas. A intensidade do choque foi de 0,3 mA e duração de 1 s e o intervalo entre os pareamentos foi variável em 120 s. (faixa de 60-180 s.). Os choques foram liberados por meio de uma interface controlada por um software instalado em um computador em uma sala adjacente.

*Sessão Teste:* Após o treino de 6 h, os animais foram avaliados no teste do sobressalto potencializado pelo medo. Cada animal foi então colocado na caixa de medida de sobressalto, onde recebem um total de 30 estímulos sonoros na intensidade de 100 dB. As amplitudes das respostas de sobressalto de cada animal foram registradas e armazenadas para uma posterior análise dos dados. A resposta de congelamento foi registrada por câmeras de vídeo (Everfocus, EUA) posicionadas em frente às caixas de observação, permitindo assim a discriminação de todos os comportamentos exibidos pelos animais, com os sinais enviados a um monitor em uma sala adjacente através de um circuito interno de TV. O congelamento foi operacionalmente definido neste trabalho como a ausência total de movimentos do corpo e das vibrissas por um período de, no mínimo, 6 segundos.

### **3.6. Histologia**

Ao final dos experimentos, os animais receberam 1 mL de hidrato de cloral (0,54 g/mL). Em seguida, os animais foram perfundidos por via intracardíaca com solução salina e

formalina 10%, para fixação do tecido. Os encéfalos foram removidos das caixas cranianas, mantidos em frascos contendo solução de formalina por 3 h e, posteriormente, transferidos para uma solução de sacarose 30%, onde permanecerão por 48 h a 4 °C para crioproteção. Os encéfalos foram, então, congelados e seguiram para o criostato (Cryocut 1800, Reichert-Jung) para realização de cortes histológicos em secções coronais de 60 µm. Os cortes foram colocados em lâminas previamente gelatinizadas e, depois de secos, receberam a coloração de Nissl para que os sítios das microinjeções pudessem ser localizados, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007).

### **3.7. Análise Estatística**

Os dados são apresentados como média + EPM, sendo analisados pelo programa computacional SigmaStat 3.11. Para análise do tempo de congelamento foi utilizado o teste-*t* de *Student* e para a resposta de sobressalto potencializado pelo medo foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, onde o fator 1 refere aos tratamentos (controle, 8-OH-DPAT, cetanserina) e o fator 2 as condições (linha de base e teste). No caso de significância estatística, utilizou-se o teste de *Newman-Keuls*. Um valor de *p* inferior a 0,05 foi considerado significativo.

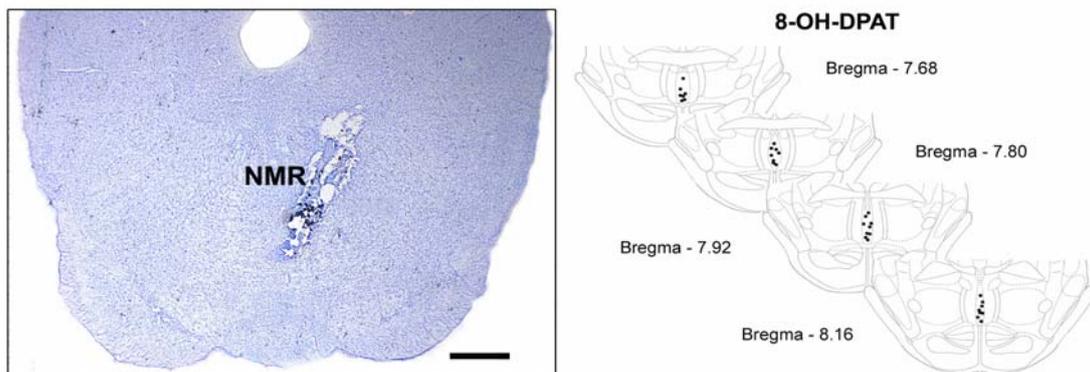
## **RESULTADOS**

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Localização dos sítios de estimulação química no NMR

A análise histológica indicou que os sítios de estimulação química dos animais utilizados nesse estudo estavam localizados no NMR. Uma fotomicrografia representativa do ponto de microinjeção e os sítios identificados e assinalados em diagramas modificados do Atlas de Paxinos e Watson (2007) podem ser vistos na Figura 5.

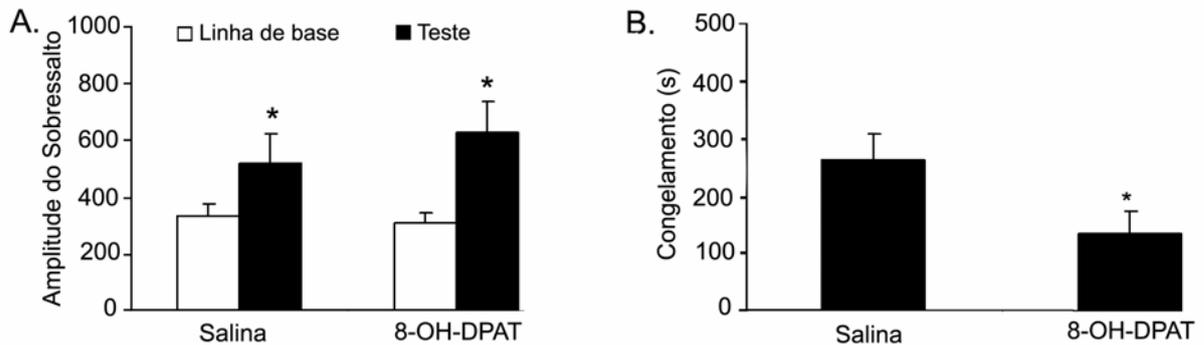


**Figura 5.** À esquerda, fotomicrografia de um sítio de microinjeção no núcleo mediano da rafe (NMR). À direita, representação esquemática dos pontos de microinjeção no NMR tendo como referência o Atlas Paxinos e Watson (2007), os pontos não representam o número total de animais no estudo devido as sobreposições dos sítios de microinjeções. O símbolo (●) indica os animais que receberam microinjeção de salina e 8-OH-DPAT. Barra = 350  $\mu$ m.

### 4.2. Efeitos das microinjeções de 8-OH-DPAT no NMR

A Figura 6A apresenta a amplitude da resposta de sobressalto do grupo que recebeu microinjeções de salina ou de 8-OH-DPAT no NMR 6 h antes sessão teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo na condição ( $F_{1,28} = 17,13$ ;  $p < 0,05$ ), porém não houve efeito significativo do tratamento ( $F_{1,28} = 0,20$ ;  $p > 0,05$ ) e na interação entre o tratamento e condição ( $F_{1,59} = 1,29$ ;  $p > 0,05$ ). A análise *post-hoc* de

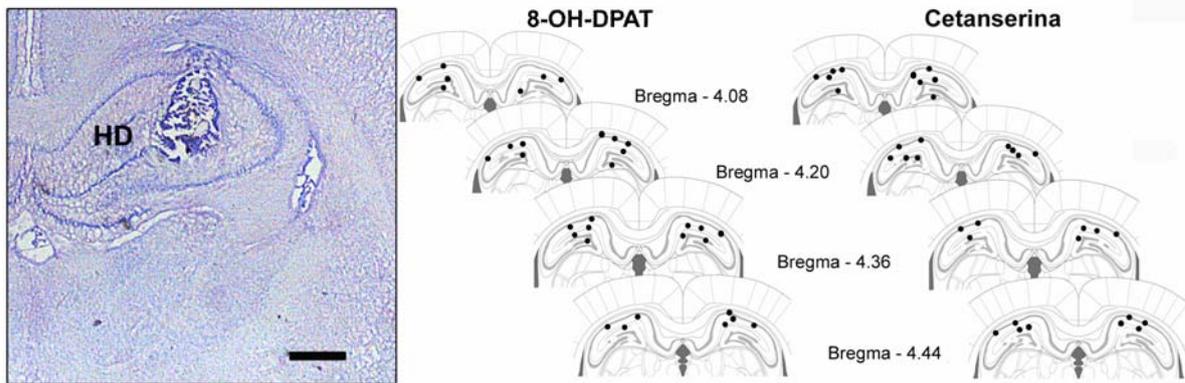
*Newman-Keuls* mostrou um aumento da resposta de sobressalto em ambos grupos. Já a figura 6B ilustra o tempo de congelamento dos mesmos animais na sessão teste. O teste-*t* de *Student* revelou uma redução significativa no tempo de congelamento nos animais que receberam a injeção de 8-OH-DAPT comparados com os animais que receberam salina ( $t = 2,17$   $p < 0,05$ ).



**Figura 6.** (A) Efeitos da microinjeção de salina (controle) ou 8-OH-DPAT (1 µg/0,2 µL) no NMR sobre amplitude da resposta de sobressalto de ratos que receberam choques (0,3 mA, 1s) 6 h antes do teste. \*  $p < 0,05$ , diferente da linha de base, N = 15 animais. (B) Efeitos da microinjeção de salina ou 8-OH-DPAT no NMR sobre o tempo (s) de congelamento de ratos. \*  $p < 0,05$ , diferente do grupo salina, N = 12-14 animais.

### 4.3. Localização dos sítios de estimulação química no HD

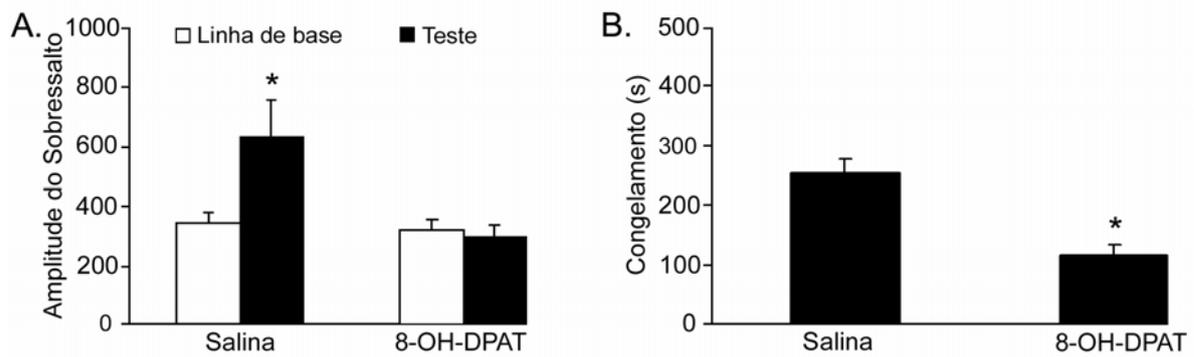
A análise histológica indicou que os sítios de estimulação química dos animais utilizados nesse estudo estavam localizados no HD. Uma fotomicrografia representativa do ponto de microinjeção e os sítios identificados e assinalados em diagramas modificados do Atlas de Paxinos e Watson (2007) podem ser vistos na Figura 7.



**Figura 7.** À esquerda, fotomicrografia de um sítio de microinjeção no hipocampo dorsal (HD). À direita, representação esquemática dos pontos de microinjeção no HD tendo como referência o Atlas Paxinos e Watson (2007), os pontos não representam o número total de animais no estudo devido sobreposições dos sítios de microinjeções. O símbolo (●) indica os animais que receberam microinjeção de salina, 8-OH-DPAT, veículo e cetanserina. Barra = 1000  $\mu$ m.

#### 4.4. Efeitos das microinjeções de 8-OH-DPAT no HD

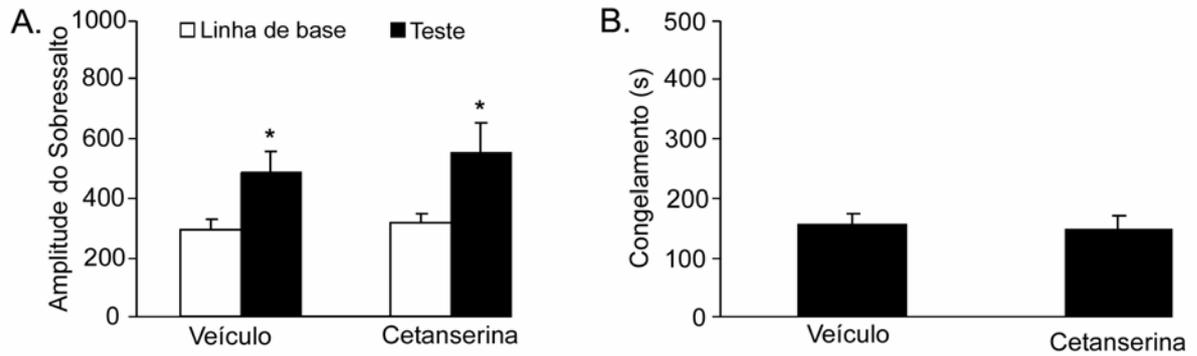
A Figura 8A representa a amplitude da resposta de sobressalto do grupo que recebeu microinjeções de salina ou 8-OH-DPAT no HD 6 h antes da sessão teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo na condição ( $F_{1,28} = 4,67; p < 0,05$ ) e também houve efeito significativo no tratamento, ( $F_{1,28} = 6,77; p < 0,05$ ) e na interação entre o fatores tratamento e condição, ( $F_{1,59} = 6,28; p < 0,05$ ). A análise *post-hoc* de *Newman-Keuls* mostrou um aumento da resposta de sobressalto apenas no grupo salina. Já a figura 8B ilustra o tempo de congelamento dos mesmos animais na sessão teste. O teste-*t* de *Student* revelou uma redução significativa no tempo de congelamento nos animais que receberam a injeção de 8-OH-DAPT comparados com os animais que receberam salina ( $t = 4,81 p < 0,05$ ).



**Figura 8.** (A) Efeitos da microinjeção de salina (controle) e 8-OH-DPAT (1  $\mu$ g/0,2  $\mu$ L) no HD sobre amplitude da resposta de sobressalto de ratos que receberam choques (0,3 mA, 1s) 6 h antes do teste. \*  $p < 0,05$ , diferente da linha de base, N =15 animais. (B) Efeitos da microinjeção de salina ou 8-OH-DPAT no NMR sobre o tempo (s) de congelamento de ratos. \*  $p < 0,05$ , diferente do grupo salina, N =15 animais.

#### 4.5. Efeitos das microinjeções de cetanserina no HD

A Figura 9A mostra a amplitude da resposta de sobressalto do grupo que recebeu microinjeções de veículo (solução salina e 2% de Tween 80) e de cetanserina no HD 6 h antes da sessão teste. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo na condição ( $F_{1,27} = 11,54$ ;  $p < 0,05$ ), porém não houve efeito significativo do tratamento ( $F_{1,27} = 0,39$ ;  $p > 0,05$ ) e na interação entre os fatores tratamento e condição ( $F_{1,57} = 0,10$ ;  $p > 0,05$ ). A análise *post-hoc* de *Newman-Keuls* mostrou um aumento da resposta de sobressalto em ambos grupos. A figura 9B ilustra o tempo de congelamento dos mesmos animais na sessão teste. O teste-*t* de *Student* não revelou alteração significativa no tempo de congelamento nos animais que receberam a injeção de cetanserina comparados com os animais que receberam veículo ( $t = 11,54$   $p > 0,05$ ).



**Figura 9.** (A) Efeitos da microinjeção de veículo (controle) e cetanserina (5,5  $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ ) no HD sobre amplitude da resposta de sobressalto de ratos que receberam choques (0,3 mA, 1s) 6 h antes do teste. \*  $p < 0,05$ , diferente da linha de base, N = 15 animais. Efeitos da microinjeção de veículo e cetanserina no HD sobre o tempo (s) de congelamento de ratos (teste-*t* de Student), N =14- 15 animais.

## **EXPERIMENTO II**

Análise da distribuição da proteína Fos no medo condicionado contextual

---

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1. Animais**

Os animais utilizados neste experimento foram alojados de maneira semelhante aos animais do experimento I.

### **5.2. Medo contextual**

#### **5.2.1. Equipamentos**

O paradigma de condicionamento contextual aversivo usado neste experimento foi o pareamento de choque elétrico nas patas na caixa experimental. Para isto, foram utilizadas duas caixas distintas, caixa A e B. Caixa A denominada de mesmo contexto, consiste de uma caixa experimental com dimensões internas de 45 x 25 x 25 cm, feita com paredes de acrílico branco. A caixa B denominada contexto diferente, tem 50 x 30 x 25 de dimensões internas, com paredes de acrílico preto. Ambas apresentam o teto e parede frontal composto de acrílico transparente. Os pisos das caixas são feitos com 36 barras de aço inoxidável de 2 mm de diâmetro espaçadas por 1,2 cm umas das outras. Além disso, as caixas possuem uma fonte de choque AC (Albarsh Instruments, Brasil) com regulador de intensidade, que permite a apresentação dos choques elétricos nas patas dos animais, sendo que os choques foram controlados por um microprocessador e uma placa I/O (Insight Equipamentos, Brasil).

As caixas estavam localizadas dentro de uma câmara de atenuação acústica feita de compensado de madeira e revestida por Eucatex. Possuem uma lâmpada vermelha de 15 W

em seu interior, um sistema de ruído de fundo de 57 dB e uma janela de 15,5 x 15,5 cm na porta que permite a visualização dos animais.



**Figura 10.** À esquerda, fotografia da caixa experimental A usada na treino do condicionamento contextual aversivo ao mesmo contexto. À direita, caixa experimental B utilizada no teste do condicionamento ao contexto diferente.

### 5.2.2. Procedimento

*Sessão Treino:* Os animais foram colocados na caixa treino (caixa A) e após cinco minutos foram submetidos a 10 associações da caixa experimental (contexto) com choque. A intensidade do choque foi de 0,6 mA e duração de 1 s e o intervalo entre os pareamentos foi variável em 30 s e 120 s. Cada animal era removido cinco min após o último choque e as sessões tinham duração aproximadamente de 15 min. O grupo não condicionado (pseudocondicionado) passou pelo mesmo procedimento experimental, porém não recebeu choques nas patas.

*Sessão teste:* Conduzida igualmente a sessão treino, porém sem apresentação dos choques nas patas. O grupo Mesmo Contexto foi testado na caixa A, já o grupo Contexto Diferente na caixa B. O grupo pseudocondicionado foi testado na caixa A. O critério utilizado para avaliar o condicionamento contextual foi a resposta de congelamento apresentada pelos animais durante os 15 min da sessão teste.

### 5.3. Histologia

Duas horas após o teste, os animais receberam 1 mL de hidrato de cloral (0,54 g/ mL). Em seguida, os animais foram perfundidos por via intracardíaca com salina tamponada (PBS 0,1M; pH = 7,3), seguida de solução de paraformaldeído 4% (PFA, Sigma) em tampão fosfato (PB 0,2M), por aproximadamente 10 minutos. Os encéfalos foram removidos da caixa craniana, guardados em frascos com PFA 4% por duas horas e, depois, transferidos para solução de sacarose 30% em PBS 0,1M a 4°C, durante cerca de 48 horas. Os encéfalos foram imersos em isopentana (Sigma) e congelados, em gelo seco, à temperatura de aproximadamente -40°C, durante 30 segundos. Após o congelamento, os encéfalos foram seccionados em um criostato (Cryocut 1800, Reichert-Jung).

Para cada região, foram coletados dois cortes histológicos coronais, seriados, com espessura de 40 µm. Um corte foi coletado em cubetas com PBS 0,1M, para o ensaio de imunistoquímica; o segundo corte foi colocado em ependorf com solução anti-congelante e armazenado no freezer a -20°C, para uma eventual necessidade. Os cortes tiveram como referência as seguintes coordenadas: bregma 3,24 mm (PrL), 2,28 mm (Cg2), - 2,76 mm (HD), - 3,12 mm (BLA) segundo Atlas de Paxinos e Watson (2007).

### 5.4. Imunistoquímica para detecção da proteína Fos

A solução salina tamponada com fosfato de molaridade 0,1 (PBS 0,1M) foi utilizada para todas as incubações e lavagens da imunistoquímica, realizadas em agitadora orbital à temperatura de aproximadamente 25°C. As trocas do tampão foram feitas, por aspiração, com pipetas plásticas (Falcon).

Com a finalidade de diminuir a marcação não específica os cortes foram tratados em uma solução de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$  1% em PBS 0,1M) para diminuir a atividade da peroxidase endógena durante 10 minutos e submetidos, a seguir, a quatro lavagens com PBS 0,1M (5 min cada). Ao final desse processo, os cortes foram incubados *overnight* com anticorpo primário policlonal anti-fos, produzido em coelho (Santa Cruz, EUA, SC-52), na concentração de 1:2000 em PBS+ (PBS 0,1M acrescido de soro albumina bovina, 1 mg/mL e do detergente triton X-100, 2  $\mu$ L/mL).

Após a retirada do anticorpo primário, as seções foram lavadas três vezes (5 min cada) e incubadas com o anticorpo secundário (anticorpo policlonal anticoelho biotilado, Kit ABC Elite, Vectastain), na concentração 1:400 em PBS+, durante 1 hora. Depois da incubação do anticorpo secundário, o tecido foi novamente lavado por três vezes (5 min cada) e incubado por 1 hora com o complexo de peroxidase avidina-biotina (reagentes A e B; Kit ABC Elite, Vectastain) em PBS 0,1M, na concentração de 1:250 cada, para formação dos complexos entre a avidina e a peroxidase-biotinilada. Os cortes foram novamente lavados em PBS 0,1M por três vezes (5 min cada). Posteriormente, foi revelada a reação, com tetracloreto de 3,3'-di-amino-benzidina (DAB, Sigma) acrescido de peróxido de hidrogênio 0,02% em PBS 0,1M. Os cortes foram incubados durante 5 a 15 minutos para revelação da atividade da peroxidase; e em seguida, foram lavados duas vezes consecutivas, com PBS 0,1M. A di-amino-benzidina é um cromógeno que, na presença de  $H_2O_2$ , propicia a formação de um precipitado de cor marrom que pode ser visualizado no interior dos núcleos neuroniais contendo proteína Fos.

### **5.5. Montagem das lâminas**

As seções foram distribuídas, uma a uma, sobre lâminas de vidro previamente gelatinizadas. Os cortes foram dispostos em seqüência antero-posterior. Após a secagem, as

lâminas foram desidratadas por imersão em gradiente alcoólico, clareadas em xilol e cobertas com Permount e lamínulas.

### **5.6. Análise quantitativa da expressão da proteína Fos**

A imunorreatividade à proteína Fos (Fos-IR) foi visualizada como um produto marrom depositado no interior dos núcleos neuronais. Objetos escuros com áreas entre 10 e 80  $\mu\text{m}^2$  foram identificados como células Fos-positivas (ALBRECHET-SOUZA et al., 2008). A contagem de células Fos-positivas foi realizada com o auxílio de um microscópio (Olympus BX-50) acoplado a uma videocâmara (Hamatsu Photonics C2400) que enviou, a um microcomputador, a imagem digitalizada da estrutura selecionada e, depois, foi processada por um programa de análise de imagem (Image Pro-Plus 6.0, Media Cybernetics, EUA). A contagem de células Fos-IR foi realizada em ambos os hemisférios cerebrais, em uma área pré-delimitada pelo experimentador, com uma magnificação x 100. Todas as estruturas foram bilateralmente quantificadas em cada rato. O número total de objetos que correspondiam aos sinais positivos da Fos-IR foi dividido pela área previamente delimitada, e obteve-se a densidade das células que apresentam imunorreatividade Fos positiva. Os núcleos foram contados individualmente e expressos como número de células por 0,1  $\text{mm}^2$  (BORELLI; 2006, ALBRECHET-SOUZA et al., 2008). A nomenclatura e os planos analisados basearam-se no Atlas de Paxinos e Watson (2007).

### **5.7. Análise estatística**

Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM, e foram analisados pelo programa computacional SigmaStat 3.11. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via para

a análise do tempo de congelamento e a marcação à proteína Fos. No caso de significância estatística, utilizou-se o teste de *Newman-Keuls*. Um valor de p inferior a 0,05 é considerado significativo.

## **RESULTADOS**

---

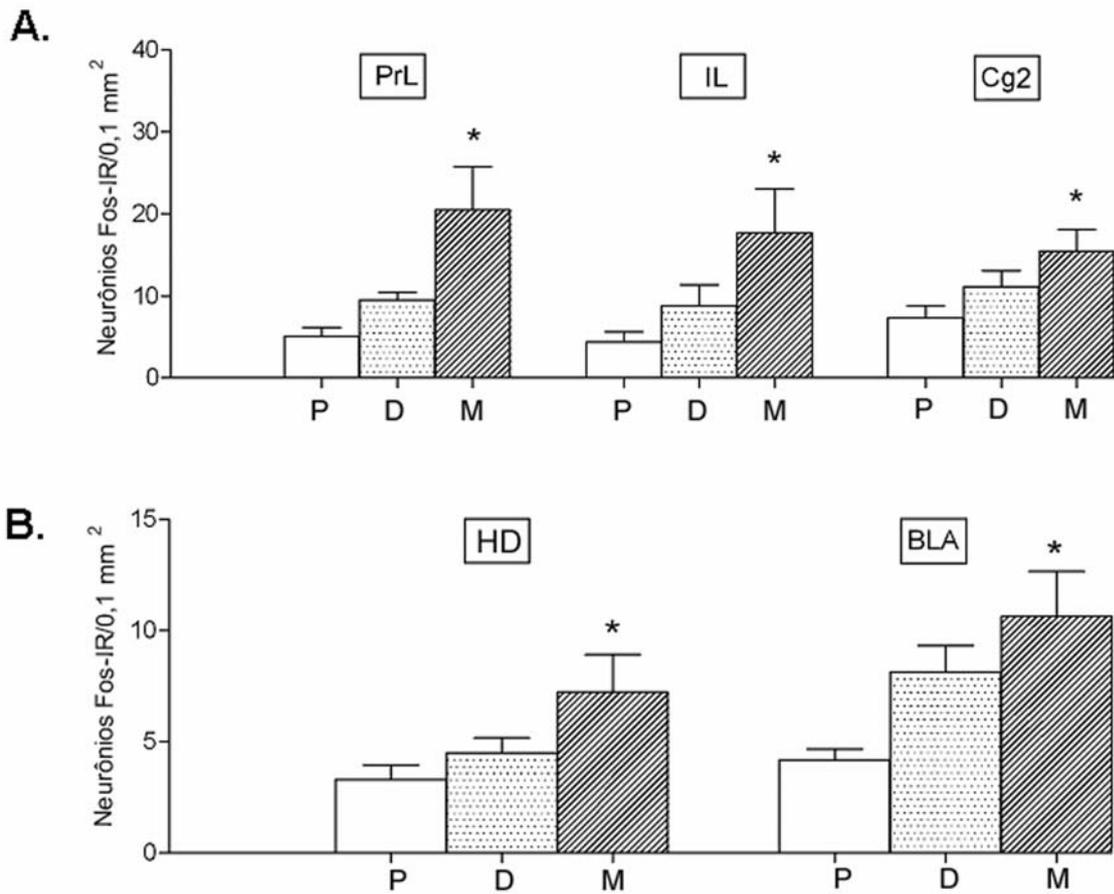
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Expressão da proteína Fos

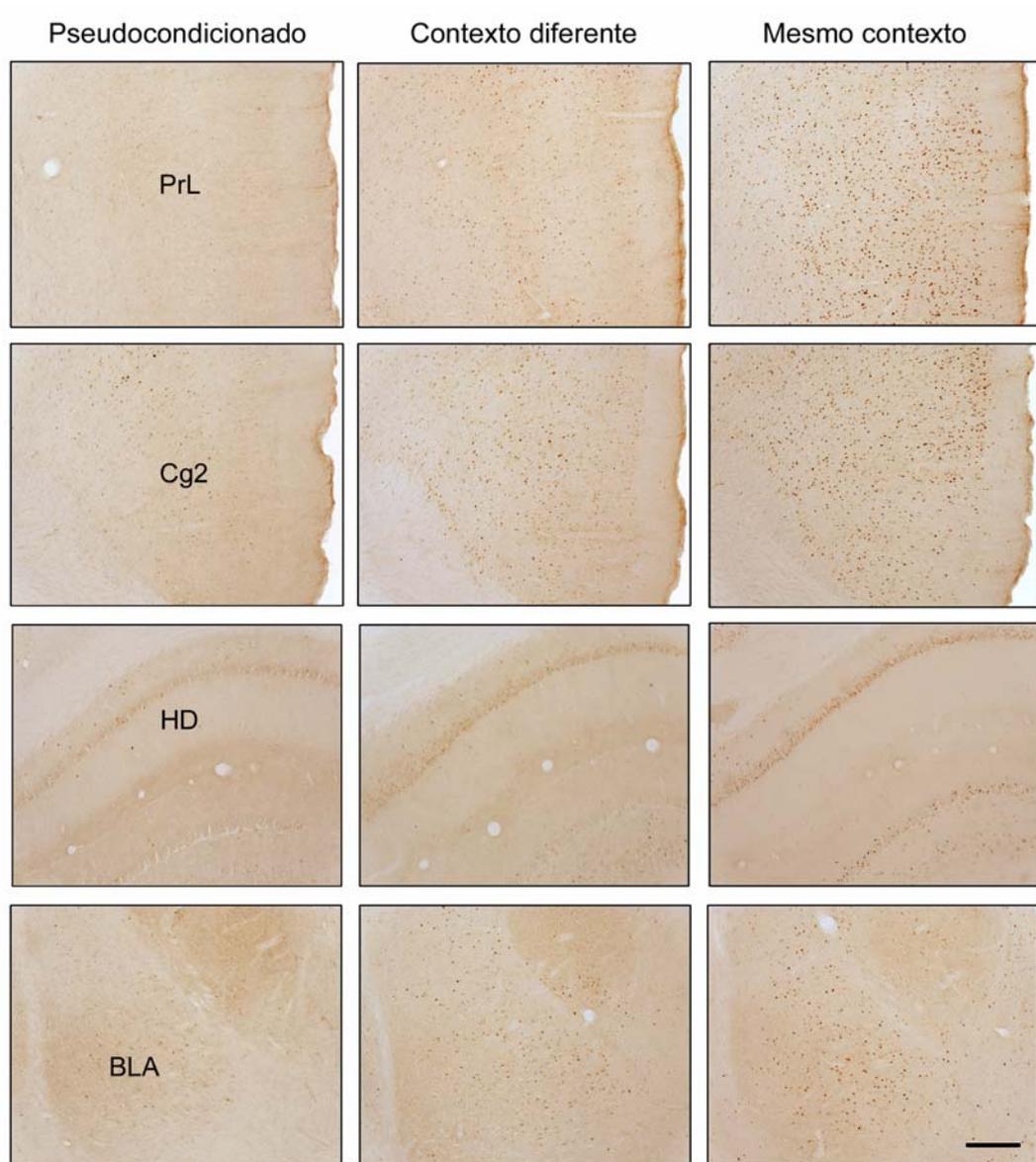
A média do tempo de congelamento (s)  $\pm$  e o erro padrão da média (EPM) dos animais que foram pseudocondicionados, condicionados e testados ao contexto diferente e ao mesmo contexto foram  $50.63 \pm 9.5$ ;  $95.50 \pm 25.85$ ;  $414.00 \pm 35.08$ , respectivamente. A ANOVA de uma via revelou efeito significativo entre os grupos ( $F_{2,21} = 52,22$ ,  $p < 0,0001$ ). A análise *post-hoc* de *Newman-Keuls* mostrou que animais do grupo mesmo contexto tiveram um aumento do tempo de congelamento quando comparados com os grupos controle (grupo pseudocondicionado e grupo contexto diferente).

Os resultados obtidos com a análise quantitativa da imunorreatividade à proteína Fos nas estruturas encefálicas estudadas; PrL, córtex pré-limbico; Cg1, córtex cingulado 1; Cg2, córtex cingulado 2; HD, hipocampo dorsal; BLA, núcleo basolateral da amígdala estão apresentados nas Figuras 11, 12.

A Figura 11 apresenta as médias de células Fos imunorreativas nos grupos pseudocondicionado, diferente contexto e mesmo contexto. O condicionamento contextual promoveu um aumento significativo da imunorreatividade à proteína Fos nas estruturas estudadas do grupo avaliado no mesmo contexto, (PrL:  $F_{2,21} = 5,64$ ;  $p < 0,05$ ), (IL:  $F_{2,21} = 3,65$ ;  $p < 0,05$ ), (Cg2:  $F_{2,21} = 4,04$ ;  $p < 0,05$ ), (BLA:  $F_{2,21} = 5,49$ ;  $p < 0,05$ ), (HD:  $F_{2,21} = 3,45$ ;  $p < 0,05$ ), porém não houve efeito significativo no Cg1 ( $F_{2,19} = 3.21$ ,  $p > 0.05$ ) A Figura 12 ilustra as fotomicrografias das regiões estudadas.



**Figura 11.** Número médio de neurônios Fos-imunoreativos (Fos-IR) nas estruturas telencefálicas de ratos submetidos ao condicionamento contextual. As colunas representam as médias e as barras o EPM, P: pseudocondicionado, D: diferente contexto, M: mesmo contexto. O número de célula Fos-IR foi obtido de áreas pré-fixadas de 0,1 mm<sup>2</sup>. \* p < 0,05 quando comparado com o grupo controle, de acordo com o teste de *Newman-Keuls*. N= 8 grupos pseudocondicionado e mesmo contexto (grupo controle), N= 6 contexto diferente.



**Figura 12.** Fotomicrografias representativas de sessões coronais de encéfalos de ratos que ilustram a imunorreatividade à proteína Fos após o teste. PrL, córtex pré-límbico; Cg2 córtex cingulado 2; HD, hipocampo dorsal; BLA, núcleo basolateral da amígdala basolateral de ratos previamente condicionados ao contexto aversivo. N= 8 grupos pseudocondicionado e mesmo contexto, N= 6 contexto diferente.

## **DISCUSSÃO**

---

## 7. DISCUSSÃO

Resultados obtidos no experimento I mostraram que a injeção pós-treino de 8-OH-DPAT no NMR promoveu a dissociação farmacológica da resposta de sobressalto e congelamento. Animais que receberam injeção de 8-OH-DPAT no NMR 6 h depois da sessão de treino tiveram uma diminuição da expressão da resposta de congelamento sem, no entanto, alterar a resposta de sobressalto ao contexto. Borelli et al. (2005) demonstraram que animais, os quais receberam injeção de 8-OH-DPAT no NMR 2h ou 24h depois da sessão de treino tiveram a mesma dissociação farmacológica das respostas de sobressalto e congelamento. Assim, sugere-se que substratos neurais diferentes parecem coordenar as repostas de congelamento e sobressalto.

Vários estudos mostraram que o NMR está envolvido na regulação das respostas comportamentais e autonômicas ao medo condicionado (AVANZI et al., 1998; AVANZI et al., 2005; ANDRADE et al., 2005; SILVA; GARGARO; BRANDAO, 2005). Além disso, sabe-se que os efeitos comportamentais produzidos pela lesão eletrolítica ou neurotóxica do NMR são similares a inibição serotoninérgica desta estrutura por meio da ativação de autoreceptores pré-sinápticos somatodendríticos (AVANZI; BRANDÃO, 2001; MELIK et al., 2000; THOMAZ et al., 2000; SILVA et al., 2002, 2004; BORELLI et al., 2005). Portanto, a redução da resposta de congelamento observada no experimento I parece ocorrer pelo prejuízo dos mecanismos neurais responsáveis pela aquisição da informação contextual aversiva, já que o 8-OH-DPAT atua inibindo a atividade serotoninérgica pré-sináptica nos núcleos da rafe (BLIER; MONTIGNY, 1987). A redução desta resposta não pode ser atribuída à diminuição da sensibilidade ao choque, uma vez que animais, os quais receberam injeções de 8-OH-DPAT no NMR apresentaram respostas similares de congelamento em experimentos de condicionamento usando som (AVANZI et. al., 2003).

A possível explicação para os resultados obtidos nesse estudo é que no espaço de tempo de 6 h tenha ocorrido um prejuízo na transferência da informação contextual aversiva, através da via NMR-hipocampo. Dessa forma, os animais não foram capazes de reconhecer o contexto da caixa onde haviam recebido o choque nas patas 6 h antes, resultando em uma redução significativa na resposta de congelamento em relação ao grupo controle. Uma explicação provável para a ausência de efeitos do 8-OH-DPAT sobre a resposta de sobressalto potencializada pelo medo seria que o condicionamento ao contexto ocorreria através de uma transferência rápida da informação nas conexões NMR-amígdala, enquanto a resposta de congelamento contextual que ativaria as fibras NMR-hipocampo estaria associada a uma transferência mais lenta da informação aversiva a outras estruturas prosencefálicas. De fato, estudos mostraram que a resposta de congelamento contextual foi abolida quando lesões hipocámpais foram feitas um dia após, mas não 28 dias após o condicionamento (KIM; FANSELOW, 1992). Em animais condicionados a um estímulo explícito, o som, essa resposta não foi alterada (KIM; FANSELOW, 1992). Esses resultados indicam que o medo condicionado não é um processo único e o hipocampo pode participar por certo período de tempo na formação de memórias associativas de medo evocadas por estímulos contextuais, mas não explícitos (som). Especificamente, a memória de medo associada ao pareamento contexto-choque requer o hipocampo intacto. Portanto, diferentes circuitos neurais podem ser recrutados no NMR durante a expressão do congelamento e do sobressalto (BORELLI et. al., 2005). As projeções serotoninérgicas do NMR que ascendem pelo feixe prosencefálico medial até o septo e o hipocampo podem estar implicadas na mediação da resposta de congelamento aos estímulos contextuais aversivos (VERTES; FORTINI; CRANE, 1999; GRAY; MCNAUGHTON, 2000).

O hipocampo e amígdala são considerados estruturas fundamentais no medo condicionado ao contexto ou a estímulos explícitos (PHILLIPS; LEDOUX, 1992). Sabe-se

que lesões da amígdala prejudicam o medo condicionado ao contexto, avaliado tanto pelo congelamento quanto pela resposta de sobressalto. Por outro lado, lesões do hipocampo dorsal inibem apenas o medo condicionado contextual (PHILLIPS; LEDOUX, 1992). Muitos estudos procuraram esclarecer o papel do NMR e HD no comportamento emocional, porém poucos trabalhos estudam a participação dos mecanismos serotoninérgicos nessas estruturas associados ao medo condicionado contextual. Com base unicamente em estudos com lesão ou inativação do NMR tem sido proposto que as vias ascendentes do NMR para o hipocampo poderiam modular a resposta de congelamento ao estímulo condicionado contextual.

Em razão do exposto acima, o experimento I também investigou o envolvimento dos mecanismos serotoninérgicos do HD na regulação das respostas de medo condicionado contextual 6 h após o condicionamento, já que existem poucos trabalhos que estudam o curso temporal na formação da memória aversiva do medo condicionado contextual. Nessa condição, os resultados mostraram que a injeção de 8-OH-DPAT no HD causou uma redução da resposta de congelamento contextual e inibição da resposta de sobressalto potencializado pelo medo. Portanto, não ocorreu a dissociação farmacológica dessas respostas como observado no NMR, confirmando a importância do hipocampo na expressão das respostas de congelamento e sobressalto.

Existe um grande interesse no estudo da participação de mecanismos serotoninérgicos do HD no medo condicionado. Já se sabe que a diminuição da neurotransmissão serotoninérgica em receptores pós-sinápticos nas áreas de projeção do NMR é consequência da ativação dos receptores somatodendríticos 5-HT<sub>1A</sub> desta estrutura. Nessa condição, como foi visto anteriormente, ocorre um decréscimo do congelamento, mas não do sobressalto, em resposta aos estímulos aversivos contextuais. Assim, o aumento da neurotransmissão serotoninérgica em sítios pós-sinápticos no HD deveria promover um aumento na aprendizagem associativa entre o estímulo condicionado e incondicionado dado que, a

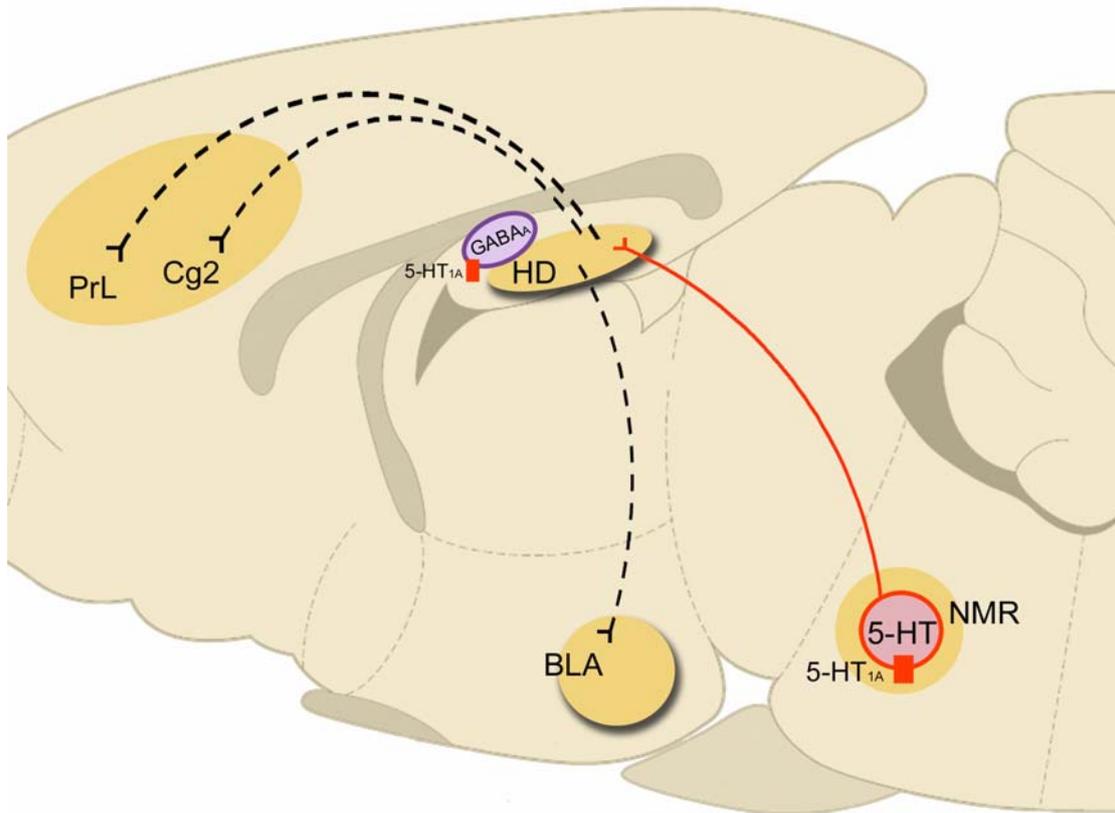
inibição da neurotransmissão serotoninérgica no circuito NMR-HD teve como consequência a redução do medo condicionado contextual. Porém, ao contrário das expectativas, a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> por meio das injeções de 8-OH-DPAT após 6 h de treino replicou os efeitos das injeções no NMR. De acordo com este resultado, uma possível explicação seria a existência de um mecanismo inibitório interposto entre o NMR e o HD, composto por receptores 5-HT<sub>1A</sub> localizados em corpos celulares de neurônios GABAérgicos hipocampais. A ativação destes receptores 5-HT<sub>1A</sub> pelo 8-OH-DPAT pode ter produzido uma ativação dos neurônios GABAérgicos com consequente redução da transmissão sináptica inibitória determinando com isso a redução da resposta aversiva contextual.

Dados da literatura salientam a importância do hipocampo para a formação das informações espaciais, contextuais e memórias episódicas, necessárias para a formação das respostas de congelamento e sobressalto (O'KEEFE; NADEL, 1978; SQUIRE, 1992; FANSELOW, 2000). A participação do HD no condicionamento contextual é evidente, dado que a lesão desta estrutura promove considerável prejuízo neste tipo condicionamento (SUTHERLAND; O'BRIEN; HUGO LEHMANN, 2008; QUINN ET AL., 2008). Entretanto não está claro de que maneira o HD participa na organização das respostas de medo condicionado contextual.

A última etapa do experimento de medo condicionado contextual I foi investigar a participação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>2A/2C</sub> na mediação das respostas de medo condicionado contextual. Os efeitos da injeção de cetanserina no HD 6 h após o treino mostraram que as respostas de sobressalto e de congelamento não foram alteradas por essa droga. A cetanserina, apesar de atuar em receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>, bloqueia preferencialmente receptores 5-HT<sub>2A</sub>. É importante salientar que os receptores do tipo 5-HT<sub>2A/2C</sub> estão presentes em células piramidais e granulares no hipocampo dorsal e também no giro denteado,

entretanto, os receptores do tipo 5-HT<sub>2C</sub> são mais encontrados na região CA3 (LÜTTGEN; ÖRGEN; MEISTER, 2004; PASQUALETTI et al., 1999).

O experimento II avaliou a participação do córtex pré-límbico, (PrL); córtex cingulado 1, (Cg1); córtex cingulado 2, (Cg2); HD e núcleo basolateral da amígdala, (BLA), no medo condicionado contextual através da marcação da proteína Fos. Essas estruturas têm uma importante conexão com o HD (NIEUWENHUYS, 1985; QUIRK et al., 2003). Os animais do grupo mesmo contexto tiveram uma marcação expressiva da proteína Fos no PrL, Cg2, HD e BLA quando comparados aos animais dos grupos pseudocondicionado e contexto diferente. Esses resultados corroboram aos dados da literatura que mostram o possível envolvimento do PrL, Cg2 (córtex pré-frontal medial) e amígdala no processamento das respostas aversivas ao contexto. O córtex pré-frontal medial parece ser necessário para expressão e extinção da resposta de congelamento contextual (MORGAN; LEDOUX, 1995; VOUIMBA et al., 2000; MILAD; QUIRK, 2002; MILAD et al., 2004) e a amígdala é o componente central na aquisição e expressão do comportamento emocional. A inativação funcional do BLA promove prejuízo no condicionamento a um estímulo explícito e ao contexto (MORRIS et al., 1986; MAREN, 1999). Essa estrutura parece ser fundamental nos processos de aprendizagem e memória associados ao medo condicionado (GOOSENS et al., 2003). Assim, de acordo com os resultados obtidos no experimento II, pode-se sugerir que as projeções HD-amígdala e HD-córtex pré-frontal medial podem constituir a porta de saída do circuito responsável pela expressão do medo condicionado contextual.



**Figura 14.** Prováveis circuitos responsáveis pela modulação do medo condicionado contextual. PrL, córtex pré-límbico; Cg2, córtex cingulado 2; HD, hipocampo dorsal; BLA, núcleo basolateral da amígdala; NMR, núcleo mediano da rafe; GABA, interneurônio GABAérgico.

## **CONCLUSÕES**

---

## 8. CONCLUSÕES

- Microinjeções de 8-OH-DPAT no NMR 6 h antes da sessão teste promoveram somente uma redução da resposta de congelamento contextual sem alteração da resposta de sobressalto potencializado pelo medo.
- Circuitos neurais responsáveis pelo congelamento e resposta de sobressalto potencializado pelo medo estão dissociados no NMR.
- Microinjeções de 8-OH-DPAT no HD 6 h antes da sessão teste promoveram redução de ambas as respostas, indicando um papel integrativo do HD no medo condicionado contextual.
- Mecanismos inibitórios no HD parecem se interpor entre as projeções serotoninérgicas proveniente do NMR e as vias de saída do HD.
- Microinjeções de cetanserina no HD 6 h não alteraram as respostas de sobressalto potencializado pelo medo e congelamento. A mediação serotoninérgica por meio de receptores 5-HT<sub>2A</sub> parece não participar diretamente da modulação destas respostas.
- O medo condicionado contextual causou uma marcação expressiva de proteína Fos no PrL, Cg2, HD e BLA.
- Projeções HD-amígdala e HD-córtex pré-frontal medial podem constituir a porta de saída do circuito modulador do medo condicionado contextual.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRECHET-SOUZA, L., BORELLI, K.G., BRANDÃO, M. Activity of medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. **Journal of Neuroscience and Methods**, v. 169, p. 109-98, 2008.
- AMARAL, G.A.; WITTER, M.P. Hippocampal formation. In: PAXINOS, G. **The rat nervous system**. 3<sup>a</sup> ed. New York: Academic Press, 1995., p. 443- 493.
- ANDRADE, T.G.C.S.; MACEDO, C.E.A.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 153, p. 55-60, 2004.
- ARVIDSSON L.E.; HACKSELL U.; NILSSON J.L; HJORTH S.; CARLSSON A. et al. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a new centrally acting 5-hydroxytryptamine receptor agonist. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 921-923, 1981.
- AVANZI, V.; CASTILHO, V.M.; ANDRADE, T.G.C.S.; BRANDÃO, M.L. Regulation of contextual conditioning by the median raphe nucleus. **Brain Research**, v. 790, p.178-184, 1998.
- AVANZI, V.; BRANDÃO, M.L. Activation of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors of the median raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 126, p. 175-184, 2001.
- AVANZI, V.; SILVA, R.C.B.; MACEDO, C.E.; BRANDÃO, M.L. 5-HT mechanisms of median raphe nucleus in the conditioned freezing caused by light/foot-shock association. **Physiology and Behavior**, v. 78, p. 471–477, 2003.
- AZMITA, E.; SEGAL, M. Na autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 179, p. 641-668, 1978.

- BARNES, N.M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 1083-152, 1999.
- BICKMEYER U.; HEINE M.; MANZKE C.; RICHTER D.W. Differential modulation of 1(h) by 5-HT receptors in mouse CA1 hippocampal neurons. **European Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 209-218, 2002
- BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Crouching as an index of fear. **Journal of Comparative Physiology and Psychology**, v. 37, p. 370-375, 1969.
- BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Review of Psychology**, v. 39, p. 43-68, 1998.
- BLIER, P.; MONTIGNY, C. Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT<sub>1A</sub> agonist gepirone: electrophysiological studies in the rat brain. **Synapse**, v. 1, p. 470-480, 1987.
- BORELLI, K.G.; GARGARO, A.C.; SANTOS, J.M.; BRANDÃO, M.L. Effects of inactivation of serotonergic neurons of the median raphe nucleus on learning and performance of contextual fear conditioning. **Neuroscience Letters**, v. 387, p.105-110, 2005.
- BORRELI, K.G. **Distribuição da proteína Fos no encéfalo durante estados aversivos induzidos pela inibição GABAérgica na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral e no colículo inferior de ratos**. 2006. p. 101. Dissertação (Doutorado em Psicobiologia) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- BOLLES, R.C. Species-specific defensive reactions and avoidance learning. **Psychological Review**, v. 71, p. 32-48, 1970.

- BOUTON, M.E.; BOLLES, R.C. Conditioned fear assessed by freezing and by the suppression of three different baselines. **Animal Learning and Behavior**, v. 8, p. 429-434, 1980.
- BRANDÃO, M.L.; ANSELONI, V.Z.; PANDÓSSIO, J.E.; DE ARAÚJO, J.E; CASTILHO V.M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 863-875, 1999.
- BRANDÃO, M.L., VIANNA, D.H., MASSON, S., SANTOS, J. organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, p. 36-41, 2003.
- BRANDÃO, M.L., ZANOVELI, J.M., RUIZ-MARTINEZ, R.C., OLIVEIRA, L.C., LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. **Behavioral Brain Research**, v. 188, p. 1-13, 2008.
- BULLITT, E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 22, p. 517-530, 1990.
- CAMPEAU, S.; FALLS, W.A.; CULLINAN, W.E.; HELMREICH, D.L.; DAVIS, M.; WATSON, S.J. Elicitation and reduction of fear: behavioural and neuroendocrine indices and brain induction of the immediate-early gene c-fos. **Neuroscience**, v. 78, p. 1087-1104, 1997.
- CASSELLA, J.M.; DAVIS, M. The design and calibration of a startle measurement system. **Physiology and Behavior**, v. 36, p. 377-383, 1986.
- CASTILHO, V.M.; BRANDAO, M.L. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT<sub>2A</sub> receptors in rats. **Psychopharmacology**, v.155, p. 154-162, 2001.

- CURRAN, T.; MORGAN, J.I. Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. **Journal of Neurobiology**, v. 26, p. 403-412, 1995.
- DAHLSTRÖM, A.; FÜXE, K. Evidence for existence of monoamine neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 62, p. 1-55, 1964.
- DARWIN, C. **A expressão das emoções nos homens e nos animais**. São Paulo: Companhia das letras, 2000, 384p.
- DAVIS, M. The role of the amygdala in fear-potentiated startle implications for animal model of anxiety. **Trends Pharmacology Science**, v. 13, p. 35-41, 1992.
- DAVIS, M.; FALLS, W.; CAMPEAU, S.; KIM, M. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. **Behavioral Brain Research**, v. 58, p.175-198, 1993.
- DAVIS, M.; HITCHCOCK, M.; ROSEN, J. Neural mechanisms of fear conditioning measured with the acoustic startle reflex. In: MADDEN, J. **Neurobiology of learning, emotion and affect**. New York: Raven Press, 1991. p. 67-95.
- DRAGUNOW, M.; FAULL, R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 29, p. 261-265, 1989.
- FALCK, B.; HILLIARP, N.A.; THIEME, G.; TORP, A. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. **Journal of Histochemistry and Citochemistry**, v. 10, p. 348-254, 1962.
- FANSELOW, M.S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behavioral Brain Research**, v. 110, p. 73–81, 2000.
- FANSELOW, M.S.; BAACKES, M.P. Conditioned fear-induced opiate analgesia on the formalin test: evidence two aversive motivational systems. **Learning and Motivation**, v. 13, p. 200-221, 1982.

- FLESHLER, M. Adequate acoustic stimulus for startle reaction in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 60, p. 200-207, 1965.
- FENDT, M.; FANSELOW, M.S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p.743-760, 1999.
- FENDT, M.; FANSELOW, M.S.; KOCH. Lesions of the dorsal hippocampus block trace fear conditioned potentiation of startle. **Behavior Neuroscience**, v. 119, p. 834-838, 2005.
- GOZLAN, H.; MESTIKAWY, S.; PICHAT. L.; GLOWINSKI, J. HAMON, M. identification of pre synaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: 8-OH-DPAT. **Nature**, v. 305, p. 140-142, 1983
- GOOSENS, K.A., HOBIN, J.A., MAREN, S. Auditory-evoked spike firing in the lateral amygdala and Pavlovian fear conditioning: mnemonic code or fear bias? **Neuron**, v. 40, p. 1013-1022, 2003.
- HERDEGEN, T.; LEAH, J.D. Inducible and constructive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Knox, and CREB/ATF proteins. **Brain Research Reviews**, v. 28, p. 370-490, 1998.
- HOFFER, M.A. Cardiac and respiratory function during sudden prolonged immobility in wild rodents. **Psychosomatic Medicine**, p. 633-647, 1970.
- HOYER, D.; MARTIN, G. 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with human genome. **Neuropharmacology**, v. 36, p. 419-28, 1997.
- HOYER, D.; HANNON, J.P. MARTIN, G. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 71, p. 33-54, 2002.

- HITCHCOCK, J.M.; DAVIS, M. Fear-potentiated startle using an auditory conditioned stimulus: effect of lesions of the amygdale. **Physiology and Behavior**, v. 39, p.403-408, 1987.
- JACOB, B.L.; AZIMITA, E.C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiology Reviews**, v. 72, p. 165-229, 1999.
- KAPP, B.S.; GALLAGHER, M.; UNDERWOOD, M.D.; MCNALL, C.L.; WHITEHORN, D. Cardiovascular responses elicited by electrical stimulation of the amygdala central nucleus in the rabbit. **Brain Research**, v. 234, p. 251-262, 1982.
- KATSURABAYASHI, S.; KUBOTA, H.; TOKUTOMI, N.; AKAIKE, N. A distinct distribution of functional presynaptic 5-HT receptor subtypes on GABAergic nerve terminals projecting to single hippocampal CA1 pyramidal neurons. **Neuropharmacology**, v. 44, p. 10022-1030, 2003.
- KIM, J.J.; FANSELOW, M.S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v. 256, p. 675-677, 1992.
- KOCH, M. The neurobiology of startle. **Progress in Neurobiology**, v.59, p.107-128, 1999.
- LANDEIRA-FERNDANEZ, J. Context and Pavlovian conditioning. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 149-173, 1996.
- LEDOUX, J.E. Brain mechanisms of emotion and emotional learning. **Current Opinion in Neurobiology**, v.2, p.191-198, 1992.
- LEDOUX, J.E. **O cérebro emocional: os misteriosos alicerces da vida emocional**. Rio de Janeiro: Objetiva, 2001. p. 94-125.

- LEYSEN, J.E.; NIEMEGEREERS, C.J.; VAN NUETEN, J.M.; LAURON, P.M. (3H) Ketanserin (R 41468), a selective 3H-ligand for serotonin<sub>2</sub> receptor bindings sites: Binding properties, brain distribution, and function role. **Molecular Pharmacology**, v.21, p.301-314, 1982.
- LÜTTGEN, M.; ÖRGEN, S.O; MEISTER B. Chemical identity of 5-HT<sub>2A</sub> receptor immunoreactive neurons of the rat septal complex and dorsal hippocampus. **Brain Research**, v.1010, p. 156-165, 2004.
- MAREN, S. Neurotoxic basolateral amygdala lesions impair learning and memory but not the performance of conditional fear in rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 8696-8703, 1999.
- MCNISH, K.A.; GEWIRTZ, J.C.; DAVIS, M. Evidence of contextual fear after lesions of the hippocampus: a disruption of freezing but not fear-potentiated startle. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 9353-9360, 1997.
- MCCMAHON, S.B.; WALL, P.D. Electrophysiological mapping of brainstem projections of spinal cord lamina I cells in the rat. **Brain Research**, v. 29, p.19-26, 1985.
- MCCMAHON, L.; KAUER, J. Hippocampal interneurons are excited via serotonin-gated ion channels. **The Journal of Neurophysiology**, v. 78, p. 2493-2502, 1997.
- MILAD, M.R., QUIRK, G.J. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. **Nature**, v. 420, p. 70-74, 2002.
- MILAD, M.R., VIDAL-GONZALEZ, I., QUIRK, G.J. Electrical stimulation of medial prefrontal cortex reduces conditioned fear in a temporally specific manner. **Behavioral Neuroscience**, v. 118, p. 389-394, 2004.
- MORGAN J.I.; CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. **Annual Review of Neuroscience**, v.14, p. 421-451, 1991.

- MORGAN, M.A., LEDOUX, J.E. Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 109, p. 681-688, 1995.
- MORRIS, R.G., ANDERSON, E., LYNCH, G.S., BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor agonist, AP5. **Nature**, v. 319, p. 774-776, 1986.
- NIEUWENHUYNS, R. 1985. **Chemoarchitecture of the Brain**. Springer-Verlag, Berlin, 1985.
- ÖRGEN, S.O; ERIKSSON, T.M.; ELVANDER-TOTTIE, E. D`ADDARIO, C. et al. The role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in learning and memory. **Behavioral Brain Research**, v.195, p. 54-77, 2008.
- O`KEEFE, J.; NADEL L. **The hippocampus as cognitive map**. Oxford, England: Oxford University Press, 1978.
- PASQUALETTI, M.; ORI, M.; CASTAGNA, M.; D. MARAZZITI, D., G. B. CASSANO, G.B.; NARDI, I. Distribution and cellular localization of the serotonin type 2C receptor messenger RNA in human brain. **Neuroscience**, v. 92, p. 601-611, 1999.
- PAZOS, A.; PALACIOS, J.M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain I. serotonin-1 receptors. **Brain Research**, v. 346, p. 205-230, 1985.
- PESCHANSKI, M.; BESSON, J.M. A spino-reticulo-thalamic pathway in the rat: an anatomical study with reference to pain transmission. **Neuroscience**, v. 12, p.165-178, 1984.
- PHILLIPS, R.G.; LEDOUX, J.E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, p. 274-285, 1992.

- QUINN J.J.; HEATHER M.W.; QUANG D.M.; TINSLEY M.R., FANSELOW M.S. Dorsal hippocampus involvement in delay conditioning depends upon the strength of tone-footshock association. **Hippocampus**, v. 18, p. 640-654, 2008.
- QUIRK, G.J., LIKHTIK, E., PELLETIER, J.G., PARE, D. Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 8800-8807, 2003.
- RAPPORT, M.M.; GRENN, A.A.; PAGE, I.H. serum vasoconstrictor (serotonin). Isolation and characterization. **Journal of Biology Chemistry**, v. 176, p.1243-1251, 1948.
- SANTOS, J.M.; GARGARO, A.C.; OLIVEIRA, A.R.; MASSON, S.; BRANDÃO, M.L. Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing behavior and fear-potentiated startle. **The European Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 15, p. 239-246, 2005.
- SCHMITZ, D.; EMPSON, R.; HEINEMANN, U. Serotonin reduces inhibition via 5-HT<sub>1A</sub> receptors in area CA1 of rat hippocampal slices in vitro. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 7217-7225, 1995.
- SILVA, R.C.B.; AVANZI, V.; LANDEIRA, J.F.; CRUZ, A.P.M.; BRANDÃO, M.L. Distinct contributions of the median raphe nucleus on conditioned fear, as evaluated by freezing and fear-potentiated startle. **Neural Plasticity**, v. 9, p. 233–247, 2002.
- SILVA, R.C.B.; GARGARO, A.C.; BRANDÃO, M.L. Differential regulation of the expression of contextual freezing and fear-potentiated startle by 5-HT mechanisms of the median raphe nucleus. **Behavioral Brain Research**, v. 151, p. 93-101, 2004.
- SQUIRE L.R. Memory and the hippocampus. A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychology Reviews**, v. 99, p. 195-231, 1992.

- SUTHERLAND R.J.; O'BRIEN J.; LEHMANN H. Absence of systems consolidation of fear memories after dorsal, ventral, or complete hippocampal damage. **Hippocampus**, v. 18, p. 710-718, 2008.
- VERTES, R.P.; FORTIN, W.J.; CRANE, A.M. Projections of the median raphe nucleus in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 407, p. 555-582, 1999.
- VOUIMBA, R.M., GARCIA, R., BAUDRY, M., THOMPSON, R.F. Potentiation of conditioned freezing following dorsomedial prefrontal cortex lesions does not interfere with fear reduction in mice. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, p. 720-724, 2000.
- WILTGEN, B.J.; FANSELOW, M. S. A model of hippocampal-cortical-amygdala interactions based on contextual fear conditioning. In: K. J. JEFRIES. **The neurobiology of spatial behavior**, Oxford, England: Oxford University Press, 2003. p. 83-103.



# 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](#)