UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

O sistema noradrenérgico do núcleo leito da estria terminal modula a resposta emocional condicionada contextual: envolvimento dos receptores CRF1 e da via NMDA/NO

Sara Cristina Hott

RIBEIRÃO PRETO

2015

Sara Cristina Hott

O sistema noradrenérgico do núcleo leito da estria terminal modula a resposta emocional condicionada contextual: envolvimento dos receptores CRF1 e da via NMDA/NO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em Ciências.
Área de concentração: Farmacologia

**Orientador: Prof. Dr. Leonardo Resstel
Barbosa Moraes**

RIBEIRÃO PRETO

2015

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Hott, Sara Cristina.

O sistema noradrenérgico no núcleo leito da estria terminal modula a resposta emocional condicionada contextual: envolvimento dos receptores CRF1 e da via NMDA/NO. Ribeirão Preto, 2015.

153 p.: il

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Resstel, Leonardo Barbosa Moraes

1. sistema noradrenérgico. 2. sistema glutamatérgico. 3. CRF. 4. resposta emocional condicionada. 5. respostas autonômicas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Sara Cristina Hott

O sistema noradrenérgico do núcleo leito da estria terminal modula a resposta emocional condicionada contextual: envolvimento dos receptores CRF1 e da via NMDA/NO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: __/__/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Instituição: FMRP-USP

Assinatura:_____

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior

Instituição: FMRP-USP

Assinatura:_____

Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco

Instituição: FMRP-USP

Assinatura:_____

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Instituição: UNESP

Assinatura:_____

Prof. Dr. Antonio de Pádua Carobrez

Instituição: UFSC

Assinatura:_____

Apoio Financeiro:

FAPESP (processo: 2011/13299-9)

*“Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e
conhecesse todos os mistérios e toda a ciência,
sem amor eu nada sou.”*

Corintios I (13.2)

DEDICATÓRIA

Dedico,

**Aos meus pais, Nilza e Hott, pelos ensinamentos,
amor incondicional e por não medirem esforços para
que os meus sonhos se realizem.**

**Aos meus irmãos Mara, Rodrigo e Renato pelo apoio,
conselhos, incentivo e amizade.**

**Aos meus sobrinhos Igor, Gabriela, Isabela e Lucas
por me presentearem com tanta alegria.**

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, pela força e por abençoar a minha vida com a presença de pessoas maravilhosas.

Ao apoio incondicional da minha família. Por tanta paciência em todos os momentos. Pelas intermináveis conversas ao telefone e por me receberem sempre com tanto carinho.

Ao Prof. Leonardo Resstel, em primeiro lugar pelo “sim” que me permitiu entrar na vida acadêmica. Por ser um exemplo de determinação e sempre manter viva a chama do entusiasmo. Por todos os ensinamentos e confiança. Obrigada, também, por não medir esforços para que nossos anos de convivência fossem muito agradáveis.

Aos Prof. Hélio Zangrossi, Norberto Cairasco, Ricardo Nunes de Souza e Antônio de Pádua por aceitarem participar desta banca e pelas sugestões que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Aos Prof. Morgan e Francisco Guimarães por abrirem as portas dos seus laboratórios e pela imensa contribuição na minha formação.

Ao Felipe Gomes pela tutoria, pelos ensinamentos que muito tem contribuído para a minha formação, pelas colaborações, conselhos, incentivo, paciência e amizade. Muito obrigada!

À Denise Fabri, ao Daniel Reis e à Daniela Lescano pela imensa colaboração nos experimentos e pela amizade.

Aos amigos de laboratório, Teo, Júnior, Alessandra, Cassiano, Davi, Gabi, Luciana, Mayara, Jéssica e Anna pelos ensinamentos, colaborações, mas acima de tudo, pelo companheirismo e momentos de descontração.

À Luana e ao João pela confiança, paciência e amizade.

Aos amigos do Laboratório de controle central da pressão arterial, América, Eduardo, Fernando, Carlos Crestani, Milena, Cris e Silvana. Obrigada pelos ensinamentos e pelos momentos agradáveis vividos no laboratório.

Aos amigos do Laboratório do Prof. Guimarães e da Prof. Sâmia pelos momentos agradáveis dentro e fora do laboratório.

Aos amigos do departamento de Farmacologia.

À amiga Laura Léon pela amizade incondicional. Muito obrigada pela cumplicidade e companhia.

Aos amigos Gabriel, Santa Cecília e Daniela Lescano pelas orações, companhia e apoio.

Ao Pedro pelo carinho, momentos de descontração, companheirismo e incentivo.

Aos amigos de Minas Gerais que mesmo de longe compartilharam todos os momentos de dificuldade e alegria.

Aos técnicos Laura e Orlando pela assistência técnica, paciência, amizade e pelos lanchinhos.

À Diva por cuidar bem das nossas vidrarias.

Ao Victor Santos pela gentileza e disponibilidade para ajudar nos experimentos de imunofluorescência.

Ao Waldik, Soninha e Fátima pela disposição em atender prontamente nossas questões burocráticas, pelos momentos de risada e pelas broncas quando necessário.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AP7 – 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid

BVLc – bulbo ventrolateral caudal

BVLr – bulbo ventrolateral rostral

CPFm – córtex pré-frontal medial

CRF – fator liberador de corticotrofina

EPM – erro padrão da média

FC – frequência cardíaca

GABA – ácido gama-aminobutírico

HD – hipocampo dorsal

HPA – hipotálamo-hipófise-adrenal

PAM – pressão arterial média

PAP – pressão arterial pulsátil

NLET – Núcleo leito da estria terminal

NOSn – oxido nítrico sintase neuronal

NMDA – N-metil-D-aspartato

NPLA – N-propyl-L-arginina

NPV – núcleo paraventricular do hipotálamo

MCC – medo condicionado ao contexto

REC – resposta emocional condicionada

SBNeC – Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento

SCPdl – substância cinzenta periaquedutal dorsolateral

SNC – Sistema Nervoso Central

TC – temperatura cutânea

RESUMO

Hott, S. C. **O sistema noradrenérgico do núcleo leito da estria terminal modula a resposta emocional condicionada contextual: envolvimento dos receptores CRF1 e da via NMDA/NO.** 2015. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O núcleo leito da estria terminal (NLET) é uma estrutura límbica envolvida na expressão de respostas relacionadas à ansiedade. O NLET é um dos principais alvos de inervação noradrenérgica no sistema nervoso central e evidências sugerem uma ativação desta neurotransmissão em situações aversivas, em particular aquelas associadas ao medo condicionado. Assim, o presente estudo investigou o envolvimento do sistema noradrenérgico do NLET na modulação de respostas comportamentais e autonômicas induzidas pelo medo condicionado contextual (MCC) em ratos. Animais condicionados apresentaram resposta comportamental (congelamento) e alterações autonômicas, como aumento da pressão arterial média e da frequência cardíaca e queda da temperatura cutânea após serem re-expostos ao contexto previamente pareado com choques nas patas. Esses efeitos foram atenuados pela injeção de L-propranolol e fentolamina, antagonistas não seletivos dos adrenoreceptores β e α , respectivamente, no NLET. Adicionalmente, também foi observado que a administração de WB4101, antagonista seletivo de adrenoreceptores α_1 , e de CGP20712, antagonista seletivo de adrenoreceptores β_1 , no NLET, reduziu a resposta emocional condicionada (REC) contextual, sugerindo que a neurotransmissão noradrenérgica no NLET, através da ativação dos receptores α_1 e β_1 adrenérgicos estaria envolvida na expressão das respostas induzidas pelo MCC. Além disso, dados da literatura indicam que a ativação dos receptores adrenérgicos β_1 no NLET aumenta a liberação de glutamato de forma dependente da ativação de receptores CRF1. Portanto, o presente estudo também investigou uma possível

interação entre a neurotransmissão noradrenérgica e os sistemas CRFérgico, glutamatérgico e nitrérgico no NLET sobre a modulação da REC contextual. A administração de reboxetina, um inibidor da recaptação de noradrenalina, aumentou o tempo de congelamento e as respostas autonômicas após reexposição ao contexto aversivo. Esses efeitos foram bloqueados pela administração prévia de antagonista dos adrenoreceptores $\alpha 1$ e $\beta 1$, WB4101 e CGP20712 respectivamente, do antagonista dos receptores CRF1, CP376395, do antagonista de receptores NMDA, AP7 e do inibidor da óxido nítrico sintase neuronal, NPLA. Similar à reboxetina, a urocortina, um agonista de receptores CRF, aumentou a REC após a re-exposição ao contexto aversivo. Esses efeitos foram bloqueados pelo CP376395 e também pelo AP7 e NPLA, mas não pelo WB4101 e CGP20712. O presente estudo demonstra que o sistema noradrenérgico no NLET está envolvido na REC observada no modelo do MCC de forma dependente da ativação de receptores CRF1 e dos sistemas glutamatérgico e nitrérgico.

Palavras-chave: sistema noradrenérgico; sistema glutamatérgico; CRF; resposta emocional condicionada; respostas autonômicas.

ABSTRACT

Hott, S. C. Bed nucleus of the stria terminalis noradrenergic system modulates contextual conditioned emotional response: involvement of CRF1 receptors and NMDA-NO pathway. 2015. School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

The bed nucleus of the stria terminalis (BNST) is a limbic structure that has been associated to the expression of anxiety responses. BNST is one of the main targets of noradrenergic innervation in the central nervous system and evidence suggests an activation of this neurotransmission in aversive situations, particularly fear conditioning. Thus, the present study investigated the involvement of BNST noradrenergic system in modulating of behavioral and autonomic responses induced by contextual fear conditioning (CFC) in rats. The conditioned animals showed significant behavioral response (freezing) and autonomic changes such as increased in mean arterial pressure, heart rate and decreased in the tail temperature after re-exposure to context. These effects were attenuated by intra-BNST injection of L-propranolol and phentolamine, non-selective antagonists of β and α -adrenoceptors, respectively. Additionally, it was also observed that the administration of WB4101, a selective α_1 adrenoceptor antagonist, and CGP20712, selective β_1 adrenoceptor antagonist, in the BNST reduced conditioned emotional response (CER), suggesting that the BNST noradrenergic neurotransmission through the activation of adrenergic receptors, especially α_1 and β_1 -adrenergic receptors, is involved in the expression of CER. Moreover, evidence shows that activation of β_1 adrenoreceptor increases the release of glutamate by CRF1 receptor activation. Therefore, this study also investigated the involvement of CRF, glutamatergic and nitrgergic systems in the noradrenergic neurotransmission modulation of CER induced by CFC. Administration of reboxetine, a norepinephrine reuptake inhibitor, significantly increased freezing behavior and induced autonomic responses after re-exposure to aversive context.

These effects were blocked by previous administration of the antagonist of $\alpha 1$ and $\beta 1$ -adrenoceptor, WB4101 and CGP20712 respectively, CRF1 antagonist, CP376395, an NMDA receptor antagonist, AP7, and inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, NPLA. Similar to reboxetine, urocortin significantly induced CER. These effects induced by urocortin were blocked by CP376395, NPLA and AP7, but not by CGP20712 and WB4101. The present study demonstrates that BNST noradrenergic system is involved in CER observed in CFC model, possibly interacting with CRF, nitrenergic and glutamatergic systems.

Keywords: noradrenergic system; glutamatergic system; CRF; conditioned emotional response; autonomic responses.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1. Animais	38
3.2. Técnica de implante de cânula-guia no NLET	38
3.3. Condicionamento ao contexto	39
3.4. Canulação da artéria femoral.....	40
3.5. Registro da pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura cutânea.....	41
3.6. Técnica para microinjeção de drogas no cérebro	42
3.7. Determinação anatômica do local de injeção	43
3.8) Detecção de nitrito e nitrato.....	43
3.9. Drogas utilizadas	44
4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	47
4.1. Efeito da administração bilateral de antagonistas não seletivos dos adrenoreceptores α e β no NLET sobre a REC contextual	47
4.2. Efeito da administração bilateral da combinação de antagonistas não seletivos dos adrenoreceptores α e β no NLET sobre a REC contextual	48
4.3. Efeito da administração bilateral de antagonistas seletivos dos adrenoreceptores α_1 , α_2 , β_1 ou β_2 no NLET sobre a REC contextual	48
4.4. Efeito da administração bilateral da combinação de antagonistas seletivos dos adrenoreceptores α_1 e β_1 no NLET sobre a REC contextual.....	49

4.5. Efeito da administração bilateral de inibidor da recaptação de noradrenalina sobre a REC contextual	49
4.6. Caracterização da participação do CRF no NLET sobre a REC contextual	50
4.7. Avaliação da participação da neurotransmissão noradrenérgica do NLET na modulação da REC contextual dependente da ativação dos receptores CRF1	50
4.8. Caracterização da participação de receptores NMDA e do NO no NLET sobre a REC contextual.....	51
4.9. Quantificação de nitrito e nitrato (NOx) após administração de reboxetina no NLET de animais expostos ao MCC	51
4.10. Avaliação da participação da neurotransmissão noradrenérgica do NLET na modulação da REC contextual dependente do sistema glutamatérgico e nitrérgico.....	51
4.11. Avaliação da interação entre CRF, glutamato e NO no NLET na modulação da REC contextual	52
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
6. RESULTADOS.....	56
6.1. Localização dos sítios de injeção.....	56
6.2. Registros representativos das respostas autonômicas	57
6.3. Envolvimento de adrenoreceptores β do NLET na REC contextual...	59
6.4. Envolvimento de adrenoreceptores α do NLET na REC contextual...	63
6.5. Efeito da administração bilateral de antagonistas não seletivos dos adrenoreceptores α e β no NLET sobre a REC contextual	67
6.6. Efeito da administração bilateral de antagonistas seletivos dos adrenoreceptores β_1 e β_2 no NLET sobre a REC contextual	70

6.7. Efeito da administração bilateral de antagonistas seletivos dos adrenocetores $\alpha 1$ e $\alpha 2$ no NLET sobre REC contextual	71
6.8. Efeito da administração bilateral da combinação de antagonistas seletivos dos adrenocetores $\alpha 1$ e $\beta 1$ no NLET sobre a REC contextual	73
6.9. Efeito da administração de inibidor da recaptção de noradrenalina sobre a REC contextual	75
6.10. Efeito da administração de um agonista dos receptores de CRF sobre a REC contextual	79
6.11. Caracterização da participação dos receptores de CRF no NLET sobre a REC contextual	81
6.12. Participação da neurotransmissão noradrenérgica do NLET na modulação da REC contextual dependente da ativação de receptores CRF1	88
6.13. Caracterização da participação de receptores NMDA e do NO no NLET sobre a REC contextual	92
6.14. Participação dos receptores NMDA e do NO na modulação da REC contextual dependente do aumento da neurotransmissão noradrenérgica do NLET	95
6.15. Interação entre CRF, glutamato e NO no NLET na modulação da REC contextual	100
7. DISCUSSÃO	105
8. CONCLUSÃO	123
9. REFERÊNCIAS	125
APÊNDICES	135

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O núcleo leito da estria terminal (NLET) é uma estrutura límbica complexa e altamente heterogênea que forma um contínuo rostralmente à amígdala (Weller e Smith, 1982). O NLET foi inicialmente dividido em duas regiões (medial e lateral), com base principalmente em projeções amigdalares (Krettek e Price, 1978, Weller e Smith, 1982, Alheid, 2003). A divisão medial que é amplamente conectada com várias estruturas envolvidas na regulação neuroendócrina e comportamento sexual (Krettek e Price, 1978), como núcleo medial da amígdala (MeA), área pré-óptica medial e hipotálamo ventromedial. Por outro lado, a subdivisão lateral do NLET conecta-se com estruturas que coordenam respostas autonômicas e neuroendócrinas ao estresse e a estímulos nocivos, como núcleo central da amígdala (CeA), núcleo parabraquial, núcleo do trato solitário, substância cinzenta periaquedutal, área tegmental ventral e núcleos hipotálamicos (Moga et al., 1989, Moga e Saper, 1994, Dong et al., 2001b). No entanto, alguns autores baseando-se em evidências químic e citoarquitetônicas dividem o NLET em divisões anterior e posterior (Ju e Swanson, 1989). Adicionalmente, a divisão anterior do NLET foi subdividida em áreas dorsal, lateral e ventral, e dentro delas 12 subnúcleos foram identificados (Ju e Swanson, 1989).

O NLET parece servir como um relé entre estruturas límbicas e núcleos relacionados com a recompensa, o estresse e a ansiedade, uma vez que apresenta recíprocas conexões com os núcleos medial e central da amígdala (Shammah-Lagnado et al., 2000, Dong et al., 2001a), além de receber projeções do hipocampo (Dong et al., 2001b), do complexo basolateral da amígdala (Dong et al., 2001a) e do córtex pré-frontal medial (CPFm) (Vertes, 2006) e enviar projeções para o

hipotálamo e áreas do tronco encefálico (Herman et al., 1994, Davis et al., 1997a, b, Herman and Cullinan, 1997, Alheid, 2003). Assim, o NLET desempenha um importante papel no controle de funções comportamentais, neuroendócrinas e autonômicas (Holstege et al., 1985, Dunn, 1987, Casada e Dafny, 1991, Ciriello e Janssen, 1993, Dunn e Williams, 1995, Walker et al., 2003, Dong e Swanson, 2004, Spencer et al., 2005, Resstel et al., 2008a) e parece estar criticamente envolvido na expressão de respostas relacionadas à ansiedade (Walker et al., 2003, Resstel et al., 2008a, Davis et al., 2010).

A ansiedade é um estado emocional de apreensão que modifica o quadro fisiológico, resultando em, por exemplo, aumento da pressão arterial, sudorese, tensão muscular, irritabilidade e inquietação (Brandao, 2004), como por exemplo, as respostas observadas no modelo do medo condicionado ao contexto (MCC).

O MCC é um modelo de medo aprendido que induz respostas comportamentais e autonômicas quando se associa um estímulo inicialmente neutro (contexto) a um estímulo aversivo (incondicionado), usualmente choques elétricos nas patas (Fendt e Fanselow, 1999). Em seguida, a apresentação isolada do estímulo neutro (agora estímulo condicionado, uma vez que foi previamente pareado ao estímulo aversivo) irá provocar uma reação comportamental característica de congelamento (imobilidade), bem como alterações autonômicas diversas, como aumento da pressão arterial (PA), da frequência cardíaca (FC) e da temperatura corporal e queda da temperatura cutânea. O conjunto dessas respostas é denominado de resposta emocional condicionada (REC) (Fendt e Fanselow, 1999, LeDoux, 2000, Carrive, 2002, Resstel et al., 2006).

A REC ocorre a fim de auxiliar o organismo a responder potenciais ameaças externas à sua sobrevivência (Fendt e Fanselow, 1999). No

comportamento de congelamento os roedores assumem uma postura imóvel que é acompanhada por aumento do tônus muscular e preparação do corpo para uma resposta de defesa ativa como luta ou fuga (Walker e Carrive, 2003). As alterações autonômicas são um bom exemplo dessa preparação: aumento da FC, contração dos vasos sanguíneos e diminuição do fluxo sanguíneo nas extremidades da pele presumivelmente para aumentar a pressão de perfusão e redirecionar o fluxo sanguíneo para onde pode ser mais necessário, por exemplo, para a musculatura esquelética (Vianna e Carrive, 2005).

Foi descrito que a re-exposição a um contexto aversivo promoveu o aumento da expressão da proteína c-Fos, um marcador de ativação neuronal, no NLET (Beck e Fibiger, 1995). Além disso, a lesão bilateral do NLET atenuou a REC observada no modelo do MCC (Sullivan et al., 2004) e a inibição reversível do NLET através da injeção bilateral de CoCl_2 , um bloqueador sináptico não seletivo, atenuou as respostas comportamentais e cardiovasculares induzidas pela re-exposição ao contexto onde os animais foram previamente condicionados (Resstel et al., 2008a). Esses dados sugerem o envolvimento do NLET na modulação das respostas comportamentais e cardiovasculares induzidas pelo MCC, porém, os neurotransmissores envolvidos nesses efeitos ainda não estão elucidados.

O NLET é um dos principais alvos de inervação noradrenérgica no cérebro de ratos (Swanson e Hartman, 1975, Moore, 1978). Estudos neuroanatômicos mostram que a maioria dessas terminações noradrenérgicas tem origem nos grupos de células A1 e A2 através do feixe noradrenérgico ventral (Aston-Jones et al., 1999, Delfs et al., 2000). Vários estímulos estressantes são conhecidos por ativar os neurônios noradrenérgicos centrais (Morilak et al., 2005, Stone et al., 2011) e aumentar a liberação de noradrenalina no NLET (Pacak et al., 1995, Fuentealba et

al., 2000, Cecchi et al., 2002, Fendt et al., 2005, Deyama et al., 2011). Neste contexto, evidências apontam para um importante papel da sinalização noradrenérgica presente no NLET na modulação de respostas aversivas (Forray e Gysling, 2004).

Estudos mostram que a administração local de antagonistas de receptores adrenérgicos ou a destruição de terminais noradrenérgicos no NLET de ratos inibe a resposta neuroendócrina induzida pelo estresse (Onaka e Yagi, 1998, Cecchi et al., 2002), sugerindo uma importante função da neurotransmissão noradrenérgica no NLET na modulação de respostas associadas à situações de defesa. Além disso, Crestani e colaboradores (2008) observaram que o antagonismo dos receptores adrenérgicos α_1 no NLET, em animais submetidos ao estresse por restrição, potencializou o aumento da FC sem afetar o aumento da PA, ou seja, a neurotransmissão noradrenérgica no NLET tem um importante papel inibitório na modulação da taquicardia evocada pelo estresse de restrição, via ativação de receptores adrenérgicos α_1 . Finalmente, foi descrito que em ratos re-expostos ao contexto onde foram previamente condicionados, os níveis de noradrenalina no NLET estavam aumentados e a lesão de terminações noradrenérgicas no NLET foi capaz de reduzir a REC (Onaka e Yagi, 1998). Além disso, a ativação de adrenoceptores α_2 no NLET atenuou a expressão do medo condicionado e reduziu a ansiedade em ratos submetidos aos modelos do sobressalto potencializado pelo medo e sobressalto aumentado pela luz (Schweimer et al., 2005). É interessante destacar que a ativação de adrenoceptores α_2 promove inibição da liberação de noradrenalina (Starke, 2001). Esses dados indicam que a noradrenalina no NLET possivelmente está envolvida com a REC induzida pelo MCC.

Interessantemente, a sinalização noradrenérgica parece mediar a liberação de CRF dentro do NLET (McElligott et al., 2010, Nobis et al., 2011b). O CRF é um neuropeptídeo essencial para a coordenação de respostas adaptativas do organismo a situações de estresse (Vale et al., 1981). O CRF é produzido principalmente por neurônios da divisão parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo onde apresenta um importante papel na regulação do eixo hipotálamo-hipofise-adrenal (HPA) e desencadeia a clássica reposta endócrina ao estresse (Vale et al., 1981, Rivier e Vale, 1983, Swanson et al., 1983, Herman et al., 2002). No entanto, o CRF é também produzido em neurônios de estruturas límbicas extra-hipotalâmicas como o NLET, o núcleo central da amígdala e também no locus coeruleus e o núcleo dorsal da rafe (Cummings et al., 1983, Curtis e Valentino, 1994, Snyder et al., 2012). O CRF produzido nessas estruturas atua como um modulador da transmissão pré e pós-sináptica dentro de circuitos neuronais específicos (Lowry e Moore, 2006, Orozco-Cabal et al., 2006).

Neste contexto, terminações noradrenérgicas fazem sinapses com os dendritos de neurônios contendo CRF no NLET que podem afetar a contribuição dos neurônios do CRF do NLET na resposta ao estresse (Phelix et al., 1994) e este efeito do CRF é mediado por ações no sistema nervoso central (SNC) independente do eixo HPA (Koob, 1999). De fato, há evidências para o envolvimento do NLET nas respostas ao estresse mediadas pelo CRF e que os efeitos ansiogênicos do CRF no NLET são mediados por receptores CRF1 (Lee e Davis, 1997, Nijssen et al., 2001, Sahuque et al., 2006).

Além disso, há evidências consideráveis de que o sistema noradrenérgico presente no NLET modula a liberação de glutamato através da ativação dos receptores adrenérgicos α_1 , α_2 e β_1 (Forray et al., 1997, Egli et al., 2005, McElligott

e Winder, 2008, Nobis et al., 2011b). Nobis e colaboradores (2011a) mostraram que a ativação de receptores adrenérgicos $\beta 1$ aumenta a liberação de glutamato no NLET de uma maneira dependente da ativação de receptor do fator liberador de corticotropina 1 (CRF1) (Nobis et al., 2011a). Enquanto McElligott et al. (2010) observaram que o aumento da transmissão glutamatérgica através da ativação de receptores CRF1 era desencadeada pela ativação de receptores adrenérgicos $\alpha 1$. De fato, alguns terminais glutamatérgicos parecem expressar receptores pré-sinápticos do tipo CRF1 que aumentam a liberação de glutamato (Kash et al., 2015). Logo, a modulação da REC poderia envolver tanto o sistema noradrenérgico quanto o CRF e o glutamato.

O glutamato é um importante neurotransmissor (Fleck et al., 1993, Khodorov, 2004) que atua em receptores metabotrópicos e ionotrópicos (Hollmann e Heinemann, 1994, Kemp e McKernan, 2002, Jingami et al., 2003). Os receptores ionotrópicos são canais não-seletivos permeáveis a cátions classificados como receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) ou receptores AMPA/cainato (receptores não-NMDA) (Hollmann e Heinemann, 1994). O sistema glutamatérgico e receptores ionotrópicos do tipo NMDA estão presente no NLET (Alves et al., 2009, McElligott e Winder, 2009).

O NLET recebe projeções glutamatérgicas de regiões do cérebro envolvidas em processos cognitivos e emocionais, além de enviar projeções glutamatérgicas para regiões envolvidas com a resposta ao estresse (Dong et al., 2001a, Dong e Swanson, 2004).

Além disso, exposição a situações aversivas pode levar ao aumento da liberação de glutamato (Paul e Skolnick, 2003), da expressão de de sintase de óxido nítrico (NOS) (Oliveira et al., 2000) e da síntese de de óxido nítrico (NO) no cérebro

(Masood et al., 2004, Harvey et al., 2005), sugerindo que os sistemas glutamatérgico e nitrérgico estão ativos durante reações defensivas.

Sabe-se que a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, aumenta a síntese de NO (Garthwaite et al., 1989). Esse neuromodulador é um radical livre envolvido em um amplo número de processos biológicos (Lourenco et al., 2010) que pode influenciar a função celular modulando a excitabilidade neuronal (Garthwaite et al., 1988) bem como influenciar a liberação do próprio glutamato e outros neurotransmissores. O NO é produzido pela NOS, família de enzimas que catalizam a oxidação da L-arginina em L-citrulina com formação de NO (Fanselow, 1980, Garthwaite et al., 1988, Garthwaite et al., 1989). No SNC, a principal isoforma destas enzimas é a neuronal (nNOS) a qual está presente em neurônios do NLET (Guimaraes et al., 2005). Dados da literatura mostram que a administração sistêmica de inibidor de NOS, promove efeito tipo ansiolítico no modelo do labirinto em cruz elevado (Volke et al., 1995). Além disso, camundongos com deleção de nNOS mostraram significativa deficiência na expressão da resposta comportamental (Kelley et al., 2009), sugerindo o envolvimento do sistema nitrérgico na REC. Confirmando essa ideia estudos anteriores mostraram que a administração intra-CPFm, hipocampo dorsal (HD) e substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl) de antagonista de receptores NMDA e do inibidor da NOSn, reduziu o congelamento e as respostas autonômicas evocadas pela re-exposição ao contexto aversivo (Resstel et al., 2008b, Fabri, 2012, Aguiar et al., 2013).

Uma vez que os dados acima mostram que o NLET está envolvido com a expressão da REC, que o sistema noradrenérgico presente no NLET modula respostas aversivas e que existem evidências para a interação entre a neurotransmissão noradrenérgica, o CRF e os sistemas glutamatérgico e nitrérgico

presentes no NLET, a hipótese desse estudo é que a neurotransmissão noradrenérgica no NLET promove um aumento da REC gerada pela re-exposição ao contexto aversivo de forma dependente da ativação dos receptores CRF1 e de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e de NO.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Investigar o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do NLET na modulação das respostas autonômicas e comportamentais induzidas pelo medo condicionado ao contexto em ratos e a sua possível interação com o CRF e as neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica.

Objetivos específicos:

- 1) Avaliar a participação dos receptores adrenérgicos α e β presentes no NLET na modulação da REC contextual.
- 2) Avaliar se o provável aumento dos níveis de noradrenalina no NLET induzidos pela injeção local do inibidor de recaptção de noradrenalina reboxetina induziria efeitos pró-aversivos na REC contextual.
- 3) Avaliar a participação dos receptores de CRF no NLET na modulação da REC contextual.
- 4) Avaliar o envolvimento dos receptores de CRF na modulação dos efeitos mediados pelo aumento dos níveis de noradrenalina no NLET na modulação da REC contextual.
- 5) Avaliar a participação do sistema glutamatérgico no NLET na modulação da REC.

- 6)** Avaliar a participação da neurotransmissão glutamatérgica do NLET na modulação da REC contextual pelo sistema noradrenérgico.
- 7)** Avaliar a participação do sistema nitrérgico presente no NLET na modulação da REC.
- 8)** Avaliar a participação do sistema nitrérgico do NLET na modulação da REC contextual pelo sistema noradrenérgico.
- 9)** Verificar uma possível interação entre CRF e a neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica no MCC.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Durante os experimentos foram utilizados ratos Wistar pesando entre 240-270g (n= 555) provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto. Os animais permaneceram no biotério do próprio laboratório sob condições laboratoriais padrões, com temperatura controlada ($24 \pm 1^{\circ}\text{C}$), livre acesso à água e comida e ciclo claro/escuro de 12 h (com as luzes ligadas às 06:30). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as orientações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) para o cuidado e uso de animais de laboratório. As condições de acondicionamento e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da instituição (número do processo: 119/2010).

3.2. Técnica de implante de cânula-guia no NLET

Utilizou-se como anestésico o tribromo-cloro-etanol (Adrich Chemical Co., EUA) na dose de 250 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.). Após tricotomia da cabeça, os animais foram imobilizados em um estereotáxico (Stoelting, EUA) e receberam injeção subcutânea de lidocaína 2% (contendo epinefrina 2% para promover vasoconstrição local), como anestésico local. A calota foi exposta após incisão na pele, de aproximadamente 1,5 cm, e afastamento completo do periósteo. A limpeza da região foi feita utilizando-se solução salina e água oxigenada a 10%. Todas as coordenadas tiveram como referência o Atlas de Paxinos e Watson (1997),

ajustadas ao peso corporal do animal (Borges, 1999). O bregma foi utilizado como referência anatômica para a coordenada lateral.

Núcleo Leito da Estria Terminal (NLET)

Antero-posterior: +7,7 mm em relação à interaural;

Lateral: +4 mm a partir da sutura média;

Ventral: -5,5 mm em relação ao osso;

Incisivo: -3,2.

Com o auxílio de uma broca odontológica foi feita à trepanação do crânio e através de dois orifícios se introduziram as cânulas guias, bilateralmente, no NLET. A cânula guia, constituída por um segmento de agulha hipodérmica (20 x 0,5 mm, 23G), com 13 mm de comprimento, foi fixada ao crânio com uma resina acrílica autopolimerizável e por um parafuso, previamente fixado na calota craniana. Um mandril de 0,2 mm de diâmetro externo foi colocado no interior da cânula para evitar uma possível obstrução durante o período de recuperação do rato. Como medida profilática, ao final da cirurgia o animal recebeu 0,3 mL de Pentabiótico veterinário (Fort Dodge, Brasil) por via intramuscular para prevenir infecção, bem como 0,3 mL do analgésico Banamine (Schering-Plough, Brasil), por via subcutânea, para minimizar a nocicepção pós-cirúrgica.

3.3. Condicionamento ao contexto

Quatro dias após o implante das cânulas guia no NLET, separados em caixas individuais, os ratos foram colocados em uma caixa com assoalho capaz de

deflagrar choque (23x20x21cm; Insight, Ribeirão Preto, Brasil) por 10 min, como forma de habituação. Em uma segunda exposição os animais puderam explorar a caixa por um período de 2 minutos (Fanselow, 2000) antes de serem submetidos a uma sessão de condicionamento. Dependendo do objetivo do protocolo, esses animais receberam 3 choques inescapáveis nas patas de 0,85 mA 3s (condicionamento de menor intensidade) (Lisboa et al., 2010) ou 6 choques inescapáveis de 1,5 mA 3s (condicionamento de maior intensidade) (Resstel et al., 2008a) em intervalos randomizados (variando de 20 a 60s). Dois dias após o condicionamento, a PAM, FC e a temperatura cutânea foram registradas continuamente por um período de permanência na caixa de condicionamento de 10 min, porém, nenhum choque foi aplicado. A variação na intensidade do condicionamento baseia-se em resultados prévios do nosso grupo que demonstraram que o aumento da REC induzido farmacologicamente (efeito pró-aversivo na REC) é detectado com a utilização de um protocolo de condicionamento com número menor de choques de menor intensidade, uma vez que protocolos com número e intensidade maiores de choque geram uma REC máxima, sugerindo um efeito teto (Lisboa et al., 2010).

3.4. Canulação da artéria femoral

Vinte e quatro horas antes da re-exposição ao contexto aversivo, os animais foram anestesiados com tribromo-cloro-etanol (Adrich Chemical Co. Inc., EUA) na dose de 250 mg/kg por via intraperitoneal, e foi implantada uma cânula na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) durante a re-exposição ao contexto aversivo. A cânula, constituída por segmento de polietileno

PE-10 (4-5 cm) soldado a segmento de polietileno PE-50 (12-13 cm), previamente preenchida por solução salina e anticoagulante (15U/mL de heparina em solução salina), e obstruída com um pino de metal, foi introduzida até a artéria aorta abdominal inferior. Após implantação da cânula, a mesma foi exteriorizada na região dorsal do animal através de um trocater e fixada à pele por sutura cirúrgica. Ao final da cirurgia o animal recebeu 0,3 mL do analgésico Banamine (Schering-Plough, Brasil), por via subcutânea, para minimizar a nocicepção pós-cirúrgica. Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo período pós-operatório e de realização dos experimentos.

3.5. Registro da pressão arterial, frequência cardíaca, temperatura cutânea e comportamento de congelamento

Em uma sala para registro de atividade cardiovascular o catéter arterial, previamente heparinizado, foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um amplificador de sinais (AECAD 04P), sendo conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizados (Power Lab, USA). A pressão arterial (PA) e a frequência cardíaca (FC) foram continuamente registradas em um computador, para análises posteriores.

A PAM e FC foram extraídas automaticamente a partir do sinal de pressão arterial pulsátil (PAP) usando o software LabChart7 (ADInstruments), minuto a minuto durante 15 min.

Além dos parâmetros cardiovasculares, as variações de temperatura cutânea da cauda também foram registradas. A temperatura da cauda foi registrada manualmente com uma câmera térmica Multi-Purpose Thermal Imager IRI 4010

(InfraRed Integrated Systems Ltd Park Circle, EUA) a uma distância de 50 cm a cada minuto, durante os 5 minutos anteriores a re-exposição à caixa de condicionamento, e durante o período de 10 minutos de exposição ao contexto aversivo.

As imagens foram analisadas utilizando o software IRAnalyser Guide (Infrared Co. Ltd. Wuhan, China) que calcula a emissão de radiação infravermelha a partir da medida de um único pixel representaivo e converte em °C por uma escala colorimétrica. Como os valores térmicos dependem da emissividade do objeto a ser fotografado (a propensão para irradiar no espectro infravermelho), a emissividade foi fixada em 0,98, que é a emissividade da pele (conforme indicado no manual de instruções fornecido pelo fabricante). Foi utilizado como medida da temperatura da cauda a média de 10 pontos equidistantes marcados entre a base e a ponta da cauda do animal.

Além dos parâmetros autonômicos, foi registrado manualmente durante os 10 min de re-exposição ao contexto aversivo, a uma distância de 50 cm, o tempo de congelamento o qual foi utilizado como medida comportamental associada à REC. Foi considerado congelamento a ausência total de movimentos, exceto aqueles relacionados à respiração, enquanto o animal assumiu uma postura tensa característica desencadeada pelo aumento do tônus muscular (Fanselow, 1980).

3.6. Técnica para microinjeção de drogas no cérebro

As drogas foram dissolvidas em solução fisiológica (NaCl 0,9%) estéril, e administradas diretamente no NLET. Para as microinjeções foi usada uma seringa de 2 µL (Hamilton, EUA) conectada, por um tubo de polietileno PE-10, a uma agulha

microinjetora de metal (33G) 1 mm mais longa do que a cânula guia fixada ao crânio. Todas as microinjeções foram realizadas no volume de 100 nL.

3.7. Determinação anatômica do local de injeção

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg i.p.) e no local da microinjeção das drogas no NLET, foi administrado, o corante Azul de Evans a 1%. Em seguida, foi feita a abertura da caixa torácica para exposição do coração. Foi introduzida no ventrículo esquerdo uma agulha para perfusão e foi feita uma incisão no átrio direito para o escoamento do sangue e do perfusado. A perfusão foi realizada inicialmente com 20 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%), seguida por 20 mL de solução tamponada de formalina a 10%.

Após o procedimento, os cérebros foram retirados da caixa craniana e colocados em solução de formalina a 10% para fixação. Após 48 h, os cérebros foram seccionados (em cortes coronais) com auxílio de um criostato. As várias secções foram coradas com vermelho neutro a 1% e analisadas utilizando-se o Atlas de Paxinos e Watson (1997) como referência.

3.8) Detecção de nitrito e nitrato

O NO é um gás que se difunde facilmente, sendo convertido em nitrito e nitrato em segundos. Estas características dificultam as determinações diretas das mudanças de suas concentrações em sistemas biológicos. No entanto, medidas das formas mais estáveis dos produtos do NO, nitrito e nitrato (NOx), podem ser utilizadas como uma medida qualitativa da atividade da NOS e da produção de NO

(Marzinzig et al., 1997). Neste estudo a determinação das concentrações de NOx foram realizadas pelo método de Bories e Bories (Bories and Bories, 1995) modificado, que utiliza a reação de redução do nitrato em nitrito na presença da nitrato redutase (E.C. 1.6.6.2) de *Aspergillus* sp e NADPH, associada a determinação das concentrações de nitrito pelo reagente de Griess, modificado de Guevara et al (Guevara et al., 1998). Os tecidos foram macerados em tampão fosfato, seguido por centrifugação a 15.000 g por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi incubado “overnight” com a enzima nitrato redutase (Sigma) e NADPH (Sigma) a 37°C em estufa de CO₂. As concentrações de NOx foram obtidas incubando-se 50 µL de cada amostra com 50 µL do reagente de Greiss. Após período de incubação de 10 min em temperatura ambiente, foi realizada a leitura de absorbância a 540 nm, estabelecendo-se a concentração por meio de curva-padrão de nitrito de sódio (Sigma). As leituras foram realizadas em triplicatas, sendo que os valores obtidos foram normalizados pela concentração de proteínas totais quantificada pelo método de Bradford (BioRad). Os valores foram expressos em µM de NOx/mg proteína.

3.9. Drogas utilizadas

- Banamine®** (Flunixin meglumina): anti-inflamatório não esteroide (Schering-Plough S/A., Brasil);
- CGP20712**: antagonista seletivo dos adrenoreceptores β_1 (Sigma-Aldrich Co., EUA).
- CP376395**: antagonista seletivo de receptores CRF1 (Tocris, EUA);
- DL-AP7**: antagonista seletivo de receptores NMDA (Tocris, EUA);

- Fentolamina**: antagonista não seletivo de adrenocetores α (Sigma-Aldrich Co., EUA).
- ICI188,511**: antagonista seletivo dos adrenocetores β_2 (Sigma-Aldrich Co., EUA).
- K41498**: antagonista seletivo de receptores CRF2 (Tocris, EUA);
- N-propyl-L-arginina**: inibidor seletivo da enzima nNOS (Tocris, EUA);
- Pentabiótico®** (benzilpenicilina, diidroestreptomicina e estreptomicina): poliantibiótico veterinário (Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Brasil);
- Propranolol**: antagonista não seletivo de adrenocetores β (Sigma-Aldrich Co., EUA).
- Reboxetina**: inibidor da recaptação de noradrenalina (Tocris, EUA);
- Solução fisiológica** (NaCl 0,9%): veículo;
- Tribromoetanol**: anestésico cirúrgico (Sigma-Aldrich Co., EUA).
- Uretana**: anestésico (Sigma-Aldrich Co., EUA).
- Urocortina**: agonista não seletivo de receptores CRF (Tocris, EUA);
- RX821002**: antagonista seletivo de adrenocetores α_2 (Sigma-Aldrich Co., EUA).
- WB4101**: antagonista seletivo dos adrenocetores α_1 (Sigma-Aldrich Co., EUA).

PROTÓCOLOS EXPERIMENTAIS

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Em todos os protocolos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de cânulas guias direcionadas ao NLET e mantidos em recuperação por 72 h. Os experimentos foram realizados 24 h após a cirurgia para o implante do cateter na artéria femoral. Os animais foram levados, em suas respectivas caixas, à sala de experimentação e foram mantidos por cerca de 30 min antes do início do experimento, para ambientação à sala e estabilização da PA e da FC. Em seguida, cada animal foi conectado ao sistema de registro de atividade cardiovascular, em sua respectiva caixa, durante 5 minutos e foi administrado o tratamento no NLET. Ainda conectado ao sistema de registro da atividade cardiovascular, os animais foram transferidos para a caixa de condicionamento. A PAM, a FC e a temperatura cutânea foram registradas durante todo o período de exposição ao contexto. Além dos parâmetros autonômicos, foi registrado manualmente o tempo de congelamento o qual foi utilizado como medida comportamental associada à REC.

4.1. Efeito da administração bilateral de antagonistas não seletivos dos adrenoreceptores α e β no NLET sobre a REC contextual

Os animais não condicionados, assim como os animais condicionados, receberam microinjeções bilaterais de 100 nL de veículo ou de antagonistas não seletivos dos adrenoreceptores α , fentolamina (10 e 20 nmol), e β , propranolol (7,5 e 12,5 nmol). As drogas foram administradas 10 min antes da re-exposição ao contexto aversivo, com o objetivo de determinar se receptores α e β presentes no

NLET estariam envolvidos na REC associada ao MCC. As doses foram baseadas em trabalho prévio (Crestani et al., 2008b).

4.2. Efeito da administração bilateral da combinação de antagonistas não seletivos dos adrenoreceptores α e β no NLET sobre a REC contextual

Os animais não condicionados, assim como os animais condicionados foram tratados randomicamente com 100 nL de veículo ou L-propranolol (7,5 nmol) + fentolamina (10 nmol). As drogas foram administradas 10 e 5 min antes do experimento, com o objetivo de determinar uma possível interação entre os receptores α e β presentes no NLET associadas às alterações cardiovasculares e comportamentais durante o MCC.

4.3. Efeito da administração bilateral de antagonistas seletivos dos adrenoreceptores α_1 , α_2 , β_1 ou β_2 no NLET sobre a REC contextual

Animais condicionados receberam microinjeções bilaterais de 100 nL de veículo, 1,7 nmol de antagonista seletivo de adrenoreceptores α_1 , WB4101 (Bylund et al., 1994), 2,3 nmol de RX821002 (Miralles et al., 1993), antagonista seletivo de adrenoreceptores α_2 , 4,5 nmol de antagonista seletivo de adrenoreceptores β_1 , CGP20712 (Bylund et al., 1994) ou 34,5 nmol de antagonista seletivo de adrenoreceptores β_2 , ICI188,551 (Bylund et al., 1994). As drogas foram administradas 10 min antes da re-exposição ao contexto aversivo, com o objetivo de avaliar o envolvimento dos adrenoreceptores presentes no NLET na resposta emocional condicionada associada ao MCC. Foram utilizadas doses equipotentes dos antagonistas seletivos dos α - e β -adrenoreceptores com base na relação de valores de

Ki (constante de inibição) entre as drogas não seletivas e as seletivas (Miralles et al., 1993, Bylund et al., 1994).

4.4. Efeito da administração bilateral da combinação de antagonistas seletivos dos adrenoreceptores $\alpha 1$ e $\beta 1$ no NLET sobre a REC contextual

Animais condicionados foram tratados randomicamente com 100nL veículo ou CGP20712 (4,5 nmol) + WB4101 (1,7 nmol), As drogas foram administradas 10 e 5 min. antes do experimento, com o objetivo de determinar uma possível interação entre os receptores $\alpha 1$ e $\beta 1$ presentes no NLET nas alterações cardiovasculares e comportamentais durante o MCC.

4.5. Efeito da administração bilateral de inibidor da recaptação de noradrenalina sobre a REC contextual

Os animais condicionados em protocolo de condicionamento de baixa intensidade, receberam microinjeções bilaterais de veículo, 0,2 ou 2 nmol de reboxetina, um inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina (Wong et al., 2000, Molina-Hernandez et al., 2006) 15 min antes da re-exposição ao contexto aversivo, com o objetivo de induzir um aumento da REC associada ao MCC. Além disso, outro grupo de animais foi previamente tratado com veículo ou antagonistas seletivos de adrenoreceptores $\alpha 1$ e $\beta 1$, WB4101 ou CGP20712, com o objetivo de confirmar o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica na REC. O condicionamento de baixa intensidade foi utilizado com o intuito de possibilitar a observação de aumento da expressão da REC contextual.

4.6. Caracterização da participação do CRF no NLET sobre a REC contextual

A fim de determinar o envolvimento dos receptores CRF no NLET na modulação da REC, animais condicionados no protocolo de alta intensidade receberam injeções bilaterais de veículo ou de antagonista seletivo de receptores CRF1, CP376395, nas doses de 2,7 e 4,5 nmol (Myers e Greenwood-Van Meerveld, 2010), ou 0,5 e 1 nmol de K41498 (Nakamura et al., 2009), um antagonista seletivo de receptores CRF2. Além disso, para confirmar a participação do CRF na REC, avaliou-se o efeito ansiogênico do agonista não seletivo de receptores de CRF, urocortina (0,001, 0,003 e 0,01 nmol) (Nakamura et al., 2009), em animais que foram submetidos ao protocolo de condicionamento de baixa intensidade. Em seguida os animais foram pré-tratados com os antagonistas de CRF1R e CRF2R 5 min antes de receberem veículo ou urocortina (0,01 nmol) a fim de verificar quais desses receptores estariam envolvidos nessa resposta. Os animais foram re-expostos ao contexto 10 min após a administração de urocortina.

4.7. Avaliação da participação da neurotransmissão noradrenérgica do NLET na modulação da REC contextual dependente da ativação dos receptores CRF1

Animais condicionados foram pré-tratados com salina ou CP376395, antagonista de receptores CRF1, na dose de 2,7 nmol. Em seguida os animais receberam salina ou reboxetina. Os antagonistas foram administrados 5 min antes da administração de reboxetina e após 15 minutos os animais foram re-expostos ao contexto. Além disso, foi avaliado se os antagonistas seletivos de adrenoreceptores $\alpha 1$ e $\beta 1$, WB4101 ou CGP20712, bloqueiam a REC promovida pela urocortina.

4.8. Caracterização da participação de receptores NMDA e do NO no NLET sobre a REC contextual

Os animais condicionados submetidos ao protocolo de condicionamento de alta intensidade, foram tratados com veículo, 0,1 ou 1 nmol de AP7, antagonista NMDA (Kangussu et al., 2013) ou 0,04 e 0,4 nmol de NPLA, inibidor da nNOS (Alves et al., 2009). As drogas foram administradas 10 min antes do experimento, com o objetivo de determinar se a neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica presentes no NLET estão envolvidos na REC.

4.9. Quantificação de nitrito e nitrato (NOx) após administração de reboxetina no NLET de animais expostos ao MCC

A dosagem de nitrito e nitrato foi realizada com o objetivo de avaliar se a REC contextual altera as concentrações de NOx no NLET de ratos tratados com reboxetina, submetidos ao condicionamento de baixa intensidade.

4.10. Avaliação da participação da neurotransmissão noradrenérgica do NLET na modulação da REC contextual dependente do sistema glutamatérgico e nitrérgico.

Animais condicionados submetidos ao protocolo de baixa intensidade receberam veículo ou um inibidor da recaptação de noradrenalina, reboxetina (2 nmol), 5 min após a administração de veículo ou AP7 (1 nmol) ou NPLA (0,4 nmol). Após 15 minutos os animais foram re-expostos ao contexto, com o objetivo de

determinar se a neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica presentes no NLET estão envolvidos nas alterações cardiovasculares e comportamentais moduladas pela noradrenalina durante o MCC.

4.11. Avaliação da interação entre CRF, glutamato e NO no NLET na modulação da REC contextual

Animais condicionados foram pré-tratados com veículo, AP7 (1 nmol), antagonista de receptores NMDA ou NPLA (0,4 nmol), inibidor da nNOS (Alves et al., 2009). Em seguida os animais receberam salina ou urocortina, agonista do receptor CRF (0,01 nmol). Os antagonistas foram injetados 5 min antes da administração de urocortina e após 10 minutos os animais foram re-expostos ao contexto, com o objetivo de determinar uma possível interação entre o CRF e a neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica no NLET sobre a modulação da REC.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na REC contextual, o comportamento de congelamento dos animais foi expresso como percentual do tempo total de exposição à caixa, sendo analisado utilizando ANOVA de um ou dois fatores, tendo como fatores o tratamento e a condição (condicionado ou não-condicionado). Nos casos em que foi comparado o comportamento de animais condicionados tratados com veículo ou com uma dose de uma determinada droga, foi utilizado o teste *t* de Student. O grupo “OUT” foi comparado com veículo não condicionado ou condicionado pelo teste *t* de Student. Já para as respostas autonômicas, as variações de PAM (Δ PAM), FC (Δ FC) e temperatura cutânea (Δ Temperatura) foram medidas simultaneamente minuto a minuto em cada animal 5 min antes e durante os 10 min de re-exposição ao contexto. Os valores registrados por um período de 5 min antes da re-exposição foram usados como valores basais. As variações nos parâmetros basais foram analisadas utilizando a ANOVA de um fator (tratamento). Nos casos em que foi utilizada apenas uma dose de uma determinada droga os dados foram analisados através do teste *t* de Student. Os dados de PAM, FC e TC foram analisados utilizando ANOVA de dois fatores, sendo o tratamento como o fator independente e o tempo como medida repetida. Em caso de interação significativa entre os fatores foi realizado o pós-teste de Bonferroni para comparar a variação em cada condição. As variações do NOx foram analisadas através do teste *t* de Student. Os dados foram expressos como a média $\pm$ o EPM. O nível de significância assumido foi $P < 0,05$.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Localização dos sítios de injeção

A Figura 1 mostra uma fotomicrografia e representações diagramáticas do NLET (modificada do Atlas de Paxinos e Watson, 1997), indicando os sítios de injeção de drogas no NLET de todos os animais utilizados nos experimentos.

Figura 1. A) Fotomicrografia representativa de uma secção coronal do cérebro de um rato mostrando o sítio de injeção no NLET. B) Diagramas representativos modificados do Atlas de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de injeção no cérebro dos ratos utilizados na REC contextual. Os círculos representam os sítios de injeção no NLET (círculos pretos) e fora do NLET (círculos brancos; grupo “out”) de todos os animais usados nos experimentos. IA- coordenada interaural; ac- comissura anterior; cc- corpo caloso; f- fornix; ic- capsula interna; LV- ventrículo lateral; LSV- área septal lateral ventral; st- stria terminal.

6.2. Registros representativos das respostas autonômicas

A Figura 2 mostra registros representativos da pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de animais não-

condicionados (que não receberam choques) e animais condicionados (que receberam choques), durante a sessão de re-exposição à caixa de condicionamento.

A

B

Figura 2. Registros representativos de PAM, PAP e FC de um rato não-condicionado (A) e outro condicionado (B), que receberam injeção de salina no NLET antes (-5 a 0 min) e após (0 a 10 min) a re-exposição ao contexto aversivo.

A Figura 3 mostra a temperatura da cauda de um animal condicionado antes e após re-exposição ao contexto aversivo.

Figura 3. Imagens infravermelhas representativas registradas manualmente de um animal condicionado antes, após o primeiro minuto e após o último minuto de re-exposição ao contexto aversivo, registradas pela câmera térmica, a uma distância de 50 cm. Todas as imagens usam a mesma cor codificada para a temperatura.

6.3. Envolvimento de adrenoreceptores β do NLET na REC contextual

Animais condicionados, utilizando o protocolo de alta intensidade (6 choques 1,5 mA/3s), tratados com veículo ($n=8$) apresentaram um aumento no tempo de congelamento durante a re-exposição ao contexto aversivo quando comparados aos animais que não receberam choques nas patas (grupo não condicionado; $n=6$) (fator condição: $F_{1,36}=66,1$, $P<0,001$), como pode ser observado na Figura 4. Além disso, efeitos significativos também foram observados para o fator tratamento ($F_{2,36}=8,5$, $P<0,001$) e para interação entre condição e tratamento ($F_{2,36}=8,4$, $P<0,001$).

A injeção do antagonista não seletivo de adrenoreceptores β , L-propranolol (7,5 e 12,5 nmol) no NLET reduziu significativamente o tempo de congelamento dos

animais condicionados em comparação com o grupo condicionado tratado com veículo ($n= 8/\text{grupo}$) ($F_{2,21}= 13,3$, $P<0,001$; Figura 4). No entanto, a injeção de L-propranolol no NLET de ratos não-condicionados ($n= 6/\text{grupo}$) não produziu qualquer efeito sobre o tempo de congelamento ($F_{2,15}= 0,2$, $P>0,05$, Figura 4).

Figura 4. Efeitos da injeção bilateral de veículo (VEI) ou L-propranolol (L-PROP, 7,5 e 12,5 nmol) em animais não-condicionados ($n= 6/\text{grupo}$) e condicionados ($n= 8/\text{grupo}$) sobre a porcentagem de tempo de congelamento. Animais condicionados que receberam injeções de L-propranolol fora do NLET foram reunidos em um grupo adicional ($n= 5$, “OUT”). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P<0,05$ em relação ao grupo não-condicionado tratado com veículo e # $P<0,05$ em relação ao grupo condicionado tratado com veículo, ANOVA de 2 vias seguida do teste de Bonferroni, exceto o grupo “OUT” que foi comparado com veículo não condicionado ou condicionado, pelo teste t de Student.

Em relação às alterações autonômicas, a injeção de L-propranolol no NLET não afetou os valores basais de PAM, FC e TC de animais condicionados uma vez que não foram observadas diferenças nos valores basais desses parâmetros imediatamente antes da re-exposição ao contexto aversivo entre os grupos (Apêndice 1).

A re-exposição ao contexto previamente pareado com choque nas patas induziu aumento tanto na PAM quanto na FC (fator tempo: PAM: $F_{14,315} = 22,1$, $P < 0,001$ e FC: $F_{14,315} = 26,6$, $P < 0,001$; Figura 5) e diminuição da TC (fator tempo: PAM: $F_{14,315} = 29,3$, $P < 0,001$; Figura 5). No grupo não-condicionado, a re-exposição ao contexto também aumentou a PAM e FC e diminuiu a TC, no entanto, essas alterações foram significativamente menores do que aquelas observadas nos grupos condicionados (PAM: $F_{1,180} = 79,2$, $P < 0,001$; FC: $F_{1,180} = 83,9$, $P < 0,001$; TC: $F_{1,180} = 37,3$, $P < 0,001$).

Similar aos efeitos observados na resposta comportamental, o L-propranolol (7,5 e 12,5 nmol) atenuou o aumento da PAM e FC e a queda na TC no grupo condicionado (fator tratamento: PAM: $F_{2,315} = 56,5$, $P < 0,001$; FC: $F_{2,315} = 80,6$, $P < 0,001$ e TC: $F_{2,315} = 104,7$, $P < 0,001$), mas não teve nenhum efeito em animais não-condicionados (fator tratamento: PAM: $F_{2,225} = 1,6$, $P > 0,05$; FC: $F_{2,225} = 1,9$, $P > 0,05$; TC: $F_{2,225} = 1,1$, $P > 0,05$; Figura 5).

Não foram observadas alterações nas respostas cardiovasculares (PAM: $t = 0,2$, $P > 0,05$ e FC: $t = 2,7$, $P < 0,05$) e comportamental ($t = 0,1$, $P > 0,05$) quando o L-propranolol foi injetado em estruturas próximas ao NLET de animais condicionados (grupo “OUT”, $n = 5$).

Figura 5. Efeitos ao longo do tempo da injeção bilateral de veículo (VEI) ou L-propranolol (L-PROP; 7,5 e 12,5 nmol) no NLET sobre o aumento de pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea (Δ Temperatura) em animais não-condicionados (A-C) ($n= 6$ /grupo) e condicionados (D-F) ($n= 8$ /grupo). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P<0,05$, teste de Bonferroni) em relação aos animais tratados com veículo, em todo o período de exposição à caixa de condicionamento.

6.4. Envolvimento de adrenocetores α do NLET na REC contextual

Animais condicionados, utilizando o protocolo de alta intensidade, tratados com veículo (n= 7) apresentaram um aumento no tempo de congelamento durante a re-exposição ao contexto aversivo comparado aos animais que não receberam choques nas patas (grupo não-condicionado; n= 5) (fator condição: $F_{1,36}= 65,4$, $P<0,001$). Além disso, os fatores tratamento ($F_{2,36}= 11,8$, $P<0,01$) e interação ($F_{2,36}= 7,4$, $P<0,01$) apresentaram efeitos significativos, como pode ser observado na Figura 6.

A injeção de fentolamina (10 e 20 nmol; n= 8/grupo) no NLET reduziu significativamente o tempo de congelamento dos animais condicionados em comparação com os animais condicionados tratados com veículo (n= 7; $F_{2,20}= 16,6$, $P<0,01$). No entanto, a injeção de fentolamina no NLET de ratos não-condicionados (n= 7/grupo) não produziu qualquer efeito sobre o tempo de congelamento ($F_{2,16}= 0,7$, $P>0,05$, Figura 6).

Figura 6. Efeitos da injeção bilateral de veículo (VEI) ou fentolamina (FENTO, 10 e 20 nmol) em animais não-condicionados (n= 5-7/grupo) e condicionados (n= 7-8/grupo) sobre a porcentagem de tempo de congelamento. Animais condicionados que receberam injeções de fentolamina fora do NLET foram reunidos em um grupo adicional (n= 4, "OUT"). As colunas representam a média e as barras o EPM. *P<0,05 em relação ao grupo não-condicionado tratado com veículo e #P<0,05 em relação ao grupo condicionado tratado com veículo, ANOVA de 2 vias seguida do teste de Bonferroni, exceto o grupo "OUT" que foi comparado com veículo não-condicionado ou condicionado pelo teste *t* de Student.

Em relação às respostas autonômicas, não foram observadas diferenças nos valores basais de PAM, FC e TC, imediatamente antes da re-exposição ao contexto aversivo, entre os grupos. Além disso, a injeção de fentolamina no NLET não afetou os valores basais de PAM, FC e TC (Apêndice 1).

Nos grupos não-condicionados, a re-exposição ao contexto aumentou a FC e a PAM e diminuiu a TC, no entanto, essas alterações foram significativamente menores do que aquelas observadas nos grupos condicionados (PAM: $F_{1,165} = 136,1$, $P < 0,001$; FC: $F_{1,165} = 145,7$, $P < 0,001$; TC: $F_{1,165} = 71,7$, $P < 0,001$).

O tratamento do NLET com fentolamina (10 e 20 nmol) atenuou as respostas cardiovasculares e a diminuição da TC durante a re-exposição à caixa de condicionamento (fator tratamento: PAM: $F_{2,315} = 36,9$, $P < 0,001$; FC: $F_{2,315} = 90,1$,

$P < 0,001$; TC: $F_{2,315} = 64,9$, $P < 0,001$), mas não houve efeito em animais não-condicionados (fator tratamento: PAM: $F_{2,240} = 2,3$, $P > 0,05$; FC: $F_{2,240} = 1,1$, $P > 0,05$; TC: $F_{2,240} = 2,5$, $P > 0,05$; Figura 7).

A fentolamina quando injetada em estruturas próximas ao NLET de animais condicionados (grupo “OUT”) não foi capaz de atenuar o tempo de congelamento ($t = 0,1$, $P > 0,05$) ou as respostas autonômicas, induzidas pela re-exposição ao contexto aversivo (PAM: $t = 2,1$, $P < 0,05$ e FC: $t = 0,7$, $P > 0,05$).

Figura 7. Efeito ao longo do tempo da injeção bilateral de veículo (VEI) ou fentolamina (FENTO; 10 e 20 nmol) no NLET sobre o aumento de pressão arterial média (Δ PAM) e a frequência cardíaca (Δ FC) e a diminuição da temperatura cutânea (Δ Temperatura) em animais não-condicionados ($n= 5-7/\text{grupo}$) e condicionados ($n= 7-8/\text{grupo}$). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P<0,05$, teste de Bonferroni) em todo o período de exposição à caixa de condicionamento em relação aos animais tratados com veículo.

6.5. Efeito da administração bilateral de antagonistas não seletivos dos adrenoreceptores α e β no NLET sobre a REC contextual

Utilizando o protocolo de alta intensidade, animais condicionados, tratados com veículo (n= 6) apresentaram aumento no tempo de congelamento durante a re-exposição ao contexto aversivo comparado aos animais que não receberam choques (grupo não-condicionado; n= 5-6/grupo) (fator condição: $F_{1,19}= 48,0$, $P<0,001$). Além disso, os fatores tratamento ($F_{1,19}= 49,4$, $P<0,001$) e interação ($F_{1,19}= 37,2$, $P<0,001$) apresentaram efeitos significativos, como pode ser observado na Figura 8.

O tratamento dos animais com a combinação de fentolamina (10 nmol) e L-propranolol (7,5 nmol) reduziu significativamente o tempo de congelamento dos animais condicionados em comparação com os animais condicionados tratados com veículo ($t= 4,4$, $P<0,001$; n= 6/grupo, Figura 8). Adicionalmente, a associação dos dois compostos, L-propranolol e fentolamina, potencializou significativamente a atenuação do tempo de congelamento quando comparado aos tratamentos isolados (L-propranolol: $t= 2,3$, $P<0,05$ e fentolamina: $t= 2,9$, $P<0,05$). A injeção de fentolamina e L-propranolol no NLET de ratos não-condicionados não produziu qualquer efeito sobre o tempo de congelamento (n= 5-6/grupo; $t= 0,8$, $P>0,05$, Figura 8).

Figura 8. Efeitos da injeção bilateral de veículo (VEI) ou da combinação de fentolamina (Fento; 10 nmol) e L-propranolol (L-PROP; 7,5 nmol) em animais não-condicionados (n= 5-6/grupo) e condicionados (n= 6/grupo) sobre a porcentagem de tempo de congelamento. As colunas representam a média e as barras o EPM. *P<0,05 em relação ao grupo não-condicionado tratado com veículo e #P<0,05 em relação ao grupo condicionado tratado com veículo, ANOVA de 2 vias seguida do teste de Bonferroni.

As análises da resposta cardiovascular não mostraram diferenças nos valores basais de PAM, FC ou TC entre os grupos (Apêndice 1).

Similar às respostas comportamentais, a combinação de fentolamina (10 nmol) e L-propranolol (7,5 nmol) atenuou o aumento da PAM e da FC e a queda da temperatura cutânea nos grupos condicionados (fator tratamento: PAM: $F_{1,150}= 105,5$, $P<0,001$; FC: $F_{1,150}= 101,8$, $P<0,001$; TC: $F_{1,150}= 44,1$, $P<0,001$), mas não teve nenhum efeito em animais não-condicionados (PAM: $F_{1,135}= 0,1$, $P>0,05$; FC: $F_{1,135}= 0,3$, $P>0,05$; TC: $F_{1,135}= 0,1$, $P>0,05$; Figura 9). Ademais, a atenuação das respostas autonômicas promovidas pela associação dos dois compostos (L-propranolol e fentolamina) foi significativamente mais efetiva quando comparada aos tratamentos isolados, somente para a atenuação da queda da TC quando comparada com o efeito do propranolol e para a atenuação da PAM e TC quando comparada com o efeito da fentolamina somente (L-propranolol: PAM: $F_{1,180}= 0,4$,

$P > 0,05$; FC: $F_{1,180} = 0,9$, $P > 0,05$; CT: $F_{1,180} = 3,9$, $P < 0,001$; fentolamina: PAM: $F_{1,180} = 6,6$, $P < 0,05$; FC: $F_{1,180} = 1,7$, $P > 0,05$; TC: $F_{1,180} = 11,7$, $P < 0,001$).

Figura 9. Efeitos ao longo do tempo da injeção bilateral de veículo (VEI) ou da combinação de fentolamina (FENTO; 10 nmol) e L-propranolol (L-PROP; 7,5 nmol) no NLET sobre o aumento de pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) e a queda da temperatura cutânea (Δ Temperatura) em (A-C) animais não-condicionados ($n = 5-6$ /grupo) e (D-F) condicionados ($n = 6$ /grupo). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P < 0,05$, teste de Bonferroni) em todo o período de exposição à caixa de condicionamento em relação aos animais tratados com veículo.

6.6. Efeito da administração bilateral de antagonistas seletivos dos adrenoceptores $\beta 1$ e $\beta 2$ no NLET sobre a REC contextual

A fim de avaliar quais receptores adrenérgicos estão envolvidos na REC, animais condicionados, utilizando o protocolo de condicionamento de alta intensidade, foram tratados com veículo (n= 6) ou com antagonistas seletivos dos adrenoceptores $\beta 1$ (CGP20702; 4,5 nmol; n= 5) ou $\beta 2$ (ICI118,551; 34,5 nmol; n= 7).

Animais condicionados tratados com CGP20702 no NLET apresentaram redução significativa do tempo de congelamento ($F_{2,15}= 18,3$, $P<0,001$; teste de Bonferroni, $P<0,05$) quando comparados a animais condicionados tratados com veículo. Por outro lado, a injeção de ICI118,551 não foi capaz de atenuar o aumento no tempo de congelamento, quando comparado com os animais do grupo controle, durante re-exposição ao contexto aversivo (teste de Bonferroni, $P>0,05$) (Figura 10).

Com relação às alterações autonômicas, não foram observadas diferenças nos valores basais de PAM, FC e TC imediatamente antes da re-exposição ao contexto aversivo entre os grupos. Além disso, a injeção de CGP20702 no NLET (4,5 nmol; n= 5) ou ICI118,551 (34,5 nmol; n= 7) não afetou os valores basais de PAM, FC e TC (Apêndice 1).

Animais condicionados tratados com CGP20702 no NLET apresentaram atenuação das respostas autonômicas (PAM: $F_{2,225}= 106,3$, $P<0,001$; FC: $F_{2,225}= 37,6$, $P<0,001$; TC: $F_{2,225}= 61,3$, $P<0,001$) durante a re-exposição à caixa de condicionamento. No entanto, similar à resposta comportamental, o tratamento com ICI118,551 não afetou as respostas autonômicas durante a re-exposição à caixa de condicionamento em relação ao grupo controle ($P>0,05$ para todos os parâmetros) como pode ser observado na Figura 10.

Figura 10. Efeitos da injeção bilateral de veículo (VEI; $n = 6$), CGP20702 (4,5 nmol, $n = 5$) ou ICI118,551 (34,5 nmol, $n = 7$) em animais condicionados sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo condicionado tratado com veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) a pressão arterial média (Δ PAM) e (D) a frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P < 0,05$, teste de Bonferroni) em todo o período de exposição à caixa de condicionamento em relação aos animais tratados com veículo.

6.7. Efeito da administração bilateral de antagonistas seletivos dos adrenoreceptores $\alpha 1$ e $\alpha 2$ no NLET sobre REC contextual

Para avaliar a participação dos receptores adrenérgicos α na REC, animais condicionados, utilizando o protocolo de condicionamento de alta

intensidade, foram tratados com veículo (n= 5) ou com antagonistas seletivos dos adrenoreceptores $\alpha 1$ (WB4101; 1,7 nmol; n= 5) ou $\alpha 2$ (RX821002; 2,3 nmol; n= 6).

A injeção de WB4101 no NLET reduziu significativamente o tempo de congelamento dos animais condicionados em comparação com os animais condicionados tratados com veículo ($F_{2,12}= 18,4$, $P<0,001$). No entanto, não foi observado efeito após a administração de RX821002 (n= 6; $P>0,05$) como pode ser observado na Figura 11.

Não foram observadas diferenças nos valores basais de PAM e FC imediatamente antes da re-exposição ao contexto aversivo entre os grupos. Adicionalmente, a injeção no NLET de WB4101 ou RX821002 não afetou os valores basais de PAM e FC (Apêndice 1).

As análises das respostas autonômicas durante a re-exposição à caixa de condicionamento mostraram um efeito significativo do tratamento do NLET com WB4101 quando comparado ao grupo controle (fator tratamento: PAM: $F_{2,210}= 28,7$, $P<0,001$; FC: $F_{2,210}= 27,9$, $P<0,001$; CT: $F_{2,210}= 10,7$, $P<0,001$), durante os 10 min de teste (fator tempo: PAM: $F_{14,165}= 18,3$, $P<0,001$; FC: $F_{14,165}= 20,3$, $P<0,001$; TC: $F_{14,165}= 28,6$, $P<0,001$; Figura 11).

Similar à resposta comportamental, o RX821002 não foi capaz de atenuar as respostas autonômicas, dos animais condicionados, observadas durante a re-exposição à caixa de condicionamento ($P>0,05$, para todos os parâmetros), como mostrado na Figura 11.

Figura 11. Efeitos da injeção bilateral de veículo (VEI), WB4101 (1,7 nmol, $n=5$) ou RX821002 (2,3 nmol, $n=6$) em animais condicionados sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P<0,05$ em relação ao grupo condicionado tratado com veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) a pressão arterial média (Δ PAM) e (D) a frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P<0,05$, teste de Bonferroni) em todo o período de exposição à caixa de condicionamento em relação aos animais tratados com veículo.

6.8. Efeito da administração bilateral da combinação de antagonistas seletivos dos adrenoreceptores α_1 e β_1 no NLET sobre a REC contextual

Para avaliar se a combinação de antagonistas dos receptores adrenérgicos α_1 e β_1 potencializariam a atenuação da REC promovida pela re-exposição ao contexto aversivo, animais condicionados, utilizando o protocolo de condicionamento de alta intensidade, foram tratados com veículo ($n=6$) ou

antagonistas seletivos para adrenocetores α_1 (WB4101; 1,7 nmol) e β_1 (CGP20702; 4,5 nmol) (n= 6). No entanto, não houve redução significativa do tempo de congelamento entre a associação dos dois compostos quando comparado aos tratamentos isolados (WB4101: $t= 0,6$, $P>0,05$ e CGP20712: $t= 0,2$, $P>0,05$).

No estudo das alterações autonômicas, não foram observadas diferenças nos valores basais de PAM, FC e TC, imediatamente antes da re-exposição ao contexto aversivo, entre os grupos. Além disso, a injeção da combinação de WB4101 e CGP20712 no NLET, não afetou os valores basais de PAM, FC e TC (Apêndice 1).

Como observado na resposta comportamental, a combinação de WB4101 e CGP20712 significativamente atenuou as respostas autonômicas de animais condicionados durante re-exposição ao contexto aversivo quando comparado ao grupo controle (fator tratamento: PAM: $F_{1,135}= 45,9$, $P<0,001$; FC: $F_{1,135}= 73,5$, $P<0,001$; TC: $F_{1,135}= 22,6$, $P<0,001$), durante os 10 min de teste (fator tempo: PAM: $F_{14,165}= 11,1$, $P<0,001$; FC: $F_{14,165}= 7,3$, $P<0,001$; TC: $F_{14,165}= 18,9$, $P<0,001$; Figura 12).

A FC e TC após injeção da combinação foram significativamente diferentes quando comparadas com injeções apenas de WB4101 ou de CGP20712 (WB4101: PAM: $F_{1,135}= 1,6$, $P>0,05$; FC: $F_{1,135}= 31,6$, $P<0,001$; TC: $F_{1,135}= 26,9$, $P<0,001$ e CGP20712: PAM: $F_{1,135}= 1,8$, $P>0,05$; FC: $F_{1,135}= 4,6$, $P<0,05$; TC: $F_{1,135}= 2,3$, $P<0,05$).

Figura 12. Efeito da injeção bilateral de veículo (VEI; $n=6$) ou da combinação de WB4101 (1,7 nmol) e CGP20712 (4,5 nmol) ($n=6$) em animais condicionados sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P<0,05$ em relação ao grupo condicionado tratado com veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) a pressão arterial média (Δ PAM) e (D) a frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P<0,05$, teste de Bonferroni) em todo o período de exposição à caixa de condicionamento em relação aos animais tratados com veículo.

6.9. Efeito da administração de inibidor da recaptação de noradrenalina sobre a REC contextual

Animais condicionados, no protocolo de baixa intensidade, receberam veículo ($n=10$) ou reboxetina (0,5, 1 e 2 nmol; $n=6-7$ /grupo) antes de serem re-expostos ao contexto aversivo. A reboxetina, inibidor da recaptação de noradrenalina, na dose de 2 nmol, promoveu um aumento significativo do tempo de

congelamento dos animais condicionados durante o teste ($F_{3,25}= 14,5$, $P<0,001$) quando comparados com o grupo que recebeu salina (Figura 13A).

A re-exposição a um contexto previamente pareado com choque nas patas induziu um aumento acentuado e sustentado da PAM e FC. A dose de 2 nmol de reboxetina potencializou o aumento da PAM e FC (fator tratamento: PAM: $F_{3,375}= 49,8$, $P<0,001$ e FC: $F_{3,375}= 23,3$, $P<0,001$) durante o período do teste (fator tempo: PAM: $F_{14,375}= 83,9$, $P<0,001$ e FC: $F_{14,375}= 20,1$, $P<0,001$) como mostrado na Figura 13C e 13D.

Quanto à temperatura cutânea, observou-se que a re-exposição ao contexto aversivo induziu uma diminuição da temperatura cutânea ($F_{14,315}= 29,3$, $P<0,001$, Figura 13B). Similar às respostas comportamental e cardiovasculares, a reboxetina na dose de 2 nmol potencializou a queda da temperatura cutânea induzida pela re-exposição ao contexto aversivo (fator tratamento: TC: $F_{3,375}= 39,9$, $P>0,001$) e essa resposta permaneceu durante os 10 min de teste (fator tempo: TC: $F_{14,375}= 35,0$, $P<0,001$).

A reboxetina nas doses de 0,5 e 1 nmol não alterou a REC ($P>0,05$). A injeção no NLET de reboxetina não afetou os valores basais de PAM, FC e TC de animais condicionados uma vez que não foram observadas diferenças nos valores basais desses parâmetros imediatamente antes da re-exposição ao contexto aversivo entre os grupos (tabela 2). Além disso, não foram observadas alterações autonômicas e comportamental quando a reboxetina foi injetada em estruturas próximas ao NLET de animais condicionados.

Figura 13. Efeitos da injeção bilateral de veículo (VEI; $n = 10$) ou reboxetina ($n = 6-7/\text{grupo}$) nas doses de 0,5 (RBX0,5), 1 (RBX1) e 2 nmol (RBX2), em animais condicionados, sobre a percentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) a pressão arterial média (Δ PAM) e (D) a frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P < 0,05$, teste de Bonferroni) em relação aos animais tratados com veículo, em todo o período de exposição à caixa de condicionamento.

Com o objetivo de avaliar se o aumento da expressão do MCC observado após a administração de reboxetina no NLET envolveria a participação dos adrenoreceptores $\alpha 1$ e $\beta 1$, animais condicionados, utilizando o protocolo de baixa intensidade, foram tratados com veículo-veículo ($n = 6$) ou veículo-reboxetina (2 nmol; $n = 6$), o antagonista de adrenoreceptores $\alpha 1$ (WB4101; 1,7 nmol) e veículo ($n = 5$), o antagonista de adrenoreceptores $\beta 1$ (CGP20712; 4,5 nmol) e veículo ($n = 6$) ou

reboxetina (2 nmol) em animais previamente tratados com WB4101 (1,7 nmol) (n= 6) ou CGP20712 (4,5 nmol) (n= 6). A injeção de reboxetina, em animais tratados com veículo, promoveu aumento do tempo de congelamento ($F_{5,29}= 4,7$, $P<0,01$), um efeito que foi bloqueado pela administração prévia dos antagonistas de receptores adrenérgicos α_1 e β_1 ($P>0,05$; Figura 14A).

Com relação às alterações autonômicas, a administração de WB4101, CGP20712 e/ou reboxetina no NLET não afetou os valores basais de PAM, FC e TC. A re-exposição ao contexto previamente pareado com choques nas patas induziu um aumento acentuado e sustentado das respostas cardiovasculares e uma queda da temperatura cutânea.

A reboxetina quando administrada no NLET aumentou o efeito pressor e taquicardico, além de potencializar a queda da temperatura cutânea induzida pela re-exposição ao contexto aversivo (fator tratamento: PAM: $F_{5,435}= 30,8$, $P<0,001$; FC: $F_{5,435}= 56,8$, $P<0,001$; TC: $F_{5,435}= 29,9$ $P<0,001$) durante os 10 min de teste (fator tempo: PAM: $F_{14,435}= 103,8$, $P<0,001$; FC: $F_{14,435}= 56,1$, $P<0,001$ e TC: $F_{14,435}= 63,7$, $P<0,001$). O efeito da reboxetina sobre as respostas autonômicas foi atenuado pela administração de prévia de WB4101 ou CGP20712 ($P>0,05$), como mostrado na Figura 14B-D.

Figura 14. Efeitos da injeção bilateral de veículo + veículo (VEI/VEI; $n=6$) ou veículo + reboxetina (2 nmol) (VEI/RBX; $n=6$), CGP20712 (4,5 nmol) + veículo (CGP/VEI; $n=6$), CGP20712 (4,5 nmol) + reboxetina (2 nmol) (CGP/RBX; $n=6$), WB4101 (1,7 nmol) + veículo (WB/VEI; $n=5$) ou WB4101 (1,7 nmol) + reboxetina (2 nmol) (WB/RBX; $n=6$), em animais condicionados, sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P<0,05$ em relação ao grupo veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) a pressão arterial média (Δ PAM) e (D) a frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P<0,05$, teste de Bonferroni) em relação aos animais tratados com veículo, em todo o período de exposição à caixa de condicionamento. O # indicam diferença significativa do tratamento em relação ao grupo reboxetina ($P<0,05$, teste de Bonferroni).

6.10. Efeito da administração de um agonista dos receptores de CRF sobre a REC contextual

Animais condicionados, no protocolo de baixa intensidade, receberam veículo ($n=12$) ou injeção de urocortina, um agonista não seletivo dos receptores de

CRF, nas doses de 0,001, 0,003 e 0,01 nmol ($n = 7-9/\text{grupo}$), antes de serem re-expostos ao contexto previamente pareado com choques nas patas. O grupo tratado com urocortina na dose de 0,01 nmol apresentou um aumento significativo do tempo congelamento em relação ao controle ($F_{3,33} = 7,0$, $P < 0,001$; Figura 15A).

Quanto às respostas cardiovasculares, as análises mostraram que a re-exposição ao contexto previamente pareado com choque nas patas induziu um aumento acentuado e sustentado da PAM e FC. Além disso, foi possível observar efeito significativo do tratamento do NLET com 0,01 nmol de urocortina (PAM: $F_{3,495} = 24,9$, $P < 0,001$ e FC: $F_{3,495} = 15,6$, $P < 0,001$), como mostrado na Figura 15C e 15D.

Durante a re-exposição à caixa de condicionamento observou-se redução da temperatura cutânea em animais condicionados. Similar às respostas comportamentais e cardiovasculares, animais tratados com urocortina no NLET apresentaram redução significativamente maior da temperatura cutânea durante a re-exposição ao contexto aversivo quando comparado ao grupo veículo (TC: $F_{3,495} = 66,6$, $P > 0,001$). Como mostrado na Figura 15B, a re-exposição ao contexto previamente pareado com choques nas patas induziu uma queda acentuada e sustentada da temperatura da cauda durante os 10 min de teste (TC: $F_{14,495} = 81,6$, $P < 0,001$).

A injeção de urocortina no NLET não afetou os valores basais de PAM, FC e TC (tabela 2). Além disso, não foram observadas diferenças nos valores basais de PAM e FC imediatamente antes da re-exposição ao contexto aversivo entre os grupos.

Figura 15. Efeitos da injeção bilateral de veículo (VEI; $n = 12$) ou urocortina ($n = 7-9$) nas doses de 0,001 (URO 0,001), 0,003 (URO 0,003) e 0,01 nmol (URO 0,01), em animais condicionados, sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) a pressão arterial média (Δ PAM) e (D) a frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P < 0,05$, teste de Bonferroni) em relação aos animais tratados com veículo, em todo o período de exposição à caixa de condicionamento.

6.11. Caracterização da participação dos receptores de CRF no NLET sobre a REC contextual

Para avaliar se receptores CRF presentes no NLET estão envolvidos na REC, animais condicionados, utilizando o protocolo de alta intensidade, foram tratados com veículo ($n = 7-8$ /grupo) ou um antagonista seletivo dos receptores CRF1 (CP376395) nas doses de 2,7 e 4,5 nmol ($n = 5-6$ /grupo) ou um antagonista

dos receptores CRF2 (K41498) nas doses de 0,5 e 1 nmol (n= 6-7/grupo). Animais tratados com CP376395 apresentaram uma diminuição significativa do tempo de imobilidade ao longo do tempo ($F_{2,15} = 31,8$, $P < 0,001$) (Figura 16A). Já o K41498 não foi capaz de atenuar o aumento do tempo de imobilidade quando comparado com os animais do grupo controle durante re-exposição ao contexto aversivo ($F_{2,18} = 0,6$, $P > 0,05$; Figura 17A).

Com relação às alterações autonômicas, a administração de CP376395 ou K41498 no NLET não afetou os valores basais de PAM, FC e TC (tabela 2). A re-exposição ao contexto previamente pareado com choques nas patas induziu um aumento acentuado e sustentado das respostas cardiovasculares e uma queda da temperatura cutânea.

O tratamento do NLET com diferentes doses de CP376395 (2,7 e 4,5 nmol) foi capaz de reduzir as respostas autonômicas (fator tratamento: PAM: $F_{2,225} = 69,1$, $P < 0,001$; FC: $F_{2,225} = 49,6$, $P < 0,001$ e TC: $F_{2,225} = 20,3$, $P > 0,001$) durante os 10 min de teste (fator tempo: PAM: $F_{14,225} = 43,9$, $P < 0,001$; FC: $F_{14,225} = 18,6$, $P < 0,001$ e TC: $F_{14,225} = 29,5$, $P < 0,001$), como mostrado na Figura 16B-D. Similar à resposta comportamental, a administração de K41498 (0,5 e 1 nmol) não alterou as respostas autonômicas dos animais condicionados re-expostos ao contexto aversivo (PAM: $F_{2,270} = 2,3$, $P > 0,05$; FC: $F_{2,270} = 1,0$, $P > 0,05$ e TC: $F_{2,270} = 0,9$, $P > 0,05$) quando comparados ao grupo controle (Figura 17B-D).

Não foram observadas alterações autonômicas e comportamental quando o CP376395 foi injetado em estruturas próximas ao NLET de animais condicionados antes do teste (dados não mostrados).

Figura 16. Efeitos da injeção bilateral de veículo (VEI; $n = 7$) ou CP376395 ($n = 5-6/\text{grupo}$) nas doses de 2,7 (CP2,7) e 4,5 (CP4,5) nmol em animais condicionados, sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) a pressão arterial média (Δ PAM) e (D) a frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P < 0,05$, teste de Bonferroni) em relação aos animais tratados com veículo, em todo o período de exposição à caixa de condicionamento.

Figura 17. Efeito da injeção bilateral de veículo (VEI; $n = 8$) ou K41498 (K41; $n = 6-7/\text{grupo}$) nas doses de 0,5 e 1 nmol, em animais condicionados, sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) a pressão arterial média (Δ PAM) e (D) a frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P < 0,05$, teste de Bonferroni) em relação aos animais tratados com veículo, em todo o período de exposição à caixa de condicionamento.

Ainda avaliando a participação dos receptores CRF presentes no NLET, animais condicionados, utilizando o protocolo de baixa intensidade, foram tratados com veículo-veículo ($n = 7$) ou veículo-agonista dos receptores CRF (urocortina 0,01 nmol) ($n = 9$), o antagonista dos receptores CRF1 (CP376395 2,7 nmol) e veículo ($n = 5$), ou urocortina (0,01 nmol; $n = 9$) em animais tratados com CP376395 nas doses de 2,7 ($n = 8$) e 4,5 nmol ($n = 6$). A injeção de urocortina promoveu aumento do tempo de congelamento ($F_{4,30} = 8,2$, $P < 0,001$). O CP376395 na dose de 4,5 nmol atenuou o

aumento do tempo de imobilidade em animais tratados com urocortina ($P>0,05$). O CP376395 na dose de 2,7 nmol não foi capaz de reverter os efeitos promovidos pela urocortina na dose de 0,01 nmol ($P<0,05$) (Figura 18A).

Com relação às alterações autonômicas, a administração de CP376395 e/ou urocortina no NLET não afetou os valores basais de PAM, FC e TC (Apêndice 2). A re-exposição ao contexto previamente pareado com choques nas patas induziu um aumento acentuado e sustentado das respostas cardiovasculares e uma queda da temperatura cutânea.

A urocortina causou efeito pressor e taquicardico, além de queda da temperatura cutânea, quando administrada no NLET (fator tratamento: PAM: $F_{4,450}=34,2$, $P<0,001$; FC: $F_{4,450}=8,8$, $P<0,001$; TC: $F_{4,450}=20,5$, $P<0,001$) durante os 10 min de teste (fator tempo: PAM: $F_{14,450}=72,11$, $P<0,001$; FC: $F_{14,450}=52,8$, $P<0,001$ e TC: $F_{14,450}=51,0$, $P<0,001$). Os efeitos observados após a injeção de urocortina foram atenuados pela administração prévia de CP376395 na dose de 4,5 nmol ($P>0,05$), como mostrado na Figura 18B-D.

Figura 18. Efeitos da injeção bilateral de veículo + veículo (VEI/VEI; $n = 7$) ou veículo + urocortina (0,01 nmol) (VEI/URO; $n = 9$), CP376395 + veículo (CP2,7/VEI e CP4,5/VEI; $n = 5$ /grupo) e CP376395 nas doses de 2,7 nmol (CP/URO 2,7; $n = 8$) e 4,5 nmol (CP/URO 4,5; $n = 6$) + urocortina (0,01 nmol), em animais condicionados, sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) a pressão arterial média (Δ PAM) e (D) a frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P < 0,05$, teste de Bonferroni) em relação aos animais tratados com veículo, em todo o período de exposição à caixa de condicionamento. O # indicam diferença significativa do tratamento em relação ao grupo urocortina ($P < 0,05$, teste de Bonferroni).

Para avaliar se os receptores CRF2 estão envolvidos na REC promovida pela urocortina na dose de 0,01 nmol, animais condicionados, utilizando o protocolo de baixa intensidade, foram tratados com veículo-veículo ($n = 5$) ou veículo-agonista dos receptores CRF (urocortina 0,01 nmol) ($n = 6$), o antagonista dos receptores CRF2 (K41498 0,5 nmol) e veículo ($n = 5$), ou urocortina (0,01 nmol; $n = 9$) em

animais tratados com K41498 na dose de 0,5 nmol (n=5). A injeção de urocortina promoveu aumento do tempo de congelamento durante re-exposição ao contexto aversivo ($F_{3,17} = 5,1$, $P < 0,05$). O tratamento prévio com K41498 atenuou os efeitos observados após injeção de urocortina ($P > 0,05$; Figura 19A).

Em relação às alterações autonômicas, a administração de K41498 e/ou urocortina no NLET não afetou os valores basais de PAM, FC e TC (Apêndice 2). A re-exposição ao contexto previamente pareado com choques nas patas induziu um aumento acentuado e sustentado das respostas cardiovasculares e uma queda da temperatura cutânea.

A urocortina causou efeito pressor e taquicardico, além de queda da temperatura cutânea, quando administrada no NLET (fator tratamento: PAM: $F_{3,255} = 20,1$, $P < 0,001$; FC: $F_{3,255} = 12,9$, $P < 0,001$; TC: $F_{3,255} = 24,3$, $P < 0,001$), durante os 10 min de teste (fator tempo: PAM: $F_{14,255} = 31,7$, $P < 0,001$; FC: $F_{14,255} = 23,5$, $P < 0,001$ e TC: $F_{14,255} = 41,1$, $P < 0,001$). Os efeitos observados após a injeção de urocortina foram atenuados pela administração prévia de K41498 ($P > 0,05$), como mostrado na Figura 19B-D.

Figura 19. Efeitos da injeção bilateral de veículo + veículo (VEI/VEI; $n = 5$) ou veículo + urocortina (0,01 nmol) (VEI/URO; $n = 6$), K41498 (0,5 nmol) + veículo (K41/VEI; $n = 5$) e K41498 (0,5 nmol) + urocortina (0,01 nmol) na dose de 0,5 nmol (K41/URO; $n = 5$), em animais condicionados, sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) a pressão arterial média (Δ PAM) e (D) a frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P < 0,05$, teste de Bonferroni) em relação aos animais tratados com veículo, em todo o período de exposição à caixa de condicionamento. O # indicam diferença significativa do tratamento em relação ao grupo urocortina ($P < 0,05$, teste de Bonferroni).

6.12. Participação da neurotransmissão noradrenérgica do NLET na modulação da REC contextual dependente da ativação de receptores CRF1

Para avaliar se os receptores de CRF presente no NLET estariam envolvidos nas alterações autonômicas e comportamental moduladas pela

noradrenalina durante o MCC, animais condicionados, utilizando o protocolo de baixa intensidade, foram tratados com veículo-veículo (n= 5) ou veículo e o inibidor da recaptação de noradrenalina (reboxetina 2 nmol) (n= 5), o antagonista dos receptores de CRF1 (CP376395 2,7 nmol) e veículo (n= 5), ou CP376395 (2,7 nmol) e reboxetina (2 nmol, n= 7).

A injeção de reboxetina promoveu aumento do tempo de congelamento ($F_{3,18} = 13,0$, $P < 0,001$) durante re-exposição ao contexto aversivo. O tratamento prévio com CP376395 atenuou os efeitos induzidos pela reboxetina ($P > 0,05$; Figura 20A).

Em relação às alterações autonômicas, a administração de CP376395 e/ou urocortina no NLET não afetou os valores basais de PAM, FC e TC (Apêndice 2). A re-exposição ao contexto previamente pareado com choques nas patas induziu um aumento acentuado e sustentado das respostas cardiovasculares e uma queda da temperatura cutânea.

A administração de reboxetina no NLET promoveu aumento das respostas cardiovasculares, além de queda da temperatura cutânea, em animais submetidos ao contexto aversivo (fator tratamento: PAM: $F_{3,270} = 46,4$, $P < 0,001$; FC: $F_{3,270} = 69,5$, $P < 0,001$; TC: $F_{3,270} = 18,4$, $P < 0,001$), durante os 10 min de teste (fator tempo: PAM: $F_{14,270} = 74,3$, $P < 0,001$; FC: $F_{14,270} = 56,6$, $P < 0,001$ e TC: $F_{14,270} = 24,2$, $P < 0,001$). Os efeitos promovidos pela reboxetina foram atenuados pela administração prévia de CP376395 ($P > 0,05$), como mostrado na Figura 20B-D.

Figura 20. Efeitos da injeção bilateral de veículo + veículo (VEI/VEI; $n = 5$) ou veículo + reboxetina (2 nmol) (RBX/VEI; $n = 5$), CP376395 (2,7 nmol) + veículo (VEI/CP; $n = 5$) e CP376395 (2,7 nmol) + reboxetina (2 nmol) (RBX/CP; $n = 7$), em animais condicionados, sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) a pressão arterial média (Δ PAM) e (D) a frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P < 0,05$, teste de Bonferroni) em relação aos animais tratados com veículo, em todo o período de exposição à caixa de condicionamento. O # indicam diferença significativa do tratamento em relação ao grupo reboxetina ($P < 0,05$, teste de Bonferroni).

A fim de confirmar o envolvimento dos adrenoreceptores α_1 e β_1 na REC potencializada pela administração de urocortina os animais foram tratados com veículo-veículo ($n = 7$) ou veículo-urocortina (0,01 nmol; $n = 7$), o antagonista de adrenoreceptores α_1 (WB4101; 1,7 nmol) e veículo ($n = 5$), o antagonista de adrenoreceptores β_1 (CGP20712; 4,5 nmol) e veículo ($n = 5$) ou urocortina (0,01 nmol)

em animais tratados com WB4101 (1,7 nmol) (n= 6) ou CGP20712 (4,5 nmol) (n= 6). A injeção de urocortina desencadeou o aumento do tempo de congelamento ($F_{5,32} = 14,8$, $P < 0,001$) e das respostas autonômicas (fator tratamento: PAM: $F_{5,450} = 65,3$, $P < 0,001$; FC: $F_{5,450} = 42,2$, $P < 0,001$; TC: $F_{5,450} = 38,9$, $P < 0,001$), durante todo período de re-exposição ao contexto aversivo (fator tempo: PAM: $F_{14,450} = 91,2$, $P < 0,001$; FC: $F_{14,450} = 69,8$, $P < 0,001$; TC: $F_{14,450} = 89,8$, $P < 0,001$). Tanto o WB4101 quanto o CGP20712 não bloquearam os efeitos observados após a injeção de urocortina ($P > 0,05$), como mostrado na Figura 21.

Figura 21. Efeitos da injeção bilateral de veículo + veículo (VEI/VEI; $n = 7$) ou veículo + urocortina (0,01 nmol) (VEI/URO; $n = 7$), CGP20712 (4,5 nmol) + veículo (CGP/VEI; $n = 5$), CGP20712 (4,5 nmol) + urocortina (0,01 nmol) (CGP/URO; $n = 6$), WB4101 (1,7 nmol) + veículo (WB/VEI; $n = 5$) ou WB4101 (1,7 nmol) + urocortina (0,01 nmol) (WB/URO; $n = 6$), em animais condicionados, sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) a pressão arterial média (Δ PAM) e (D) a frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P < 0,05$, teste de Bonferroni) em relação aos animais tratados com veículo, em todo o período de exposição à caixa de condicionamento. O # indicam diferença significativa do tratamento em relação ao grupo urocortina ($P < 0,05$, teste de Bonferroni).

6.13. Caracterização da participação de receptores NMDA e do NO no NLET sobre a REC contextual

Para avaliar se receptores NMDA e o sistema nitrérgico presentes no NLET estariam envolvidos na REC, animais condicionados, utilizando o protocolo de

alta intensidade, foram tratados com veículo (n= 5-6/grupo), um antagonista seletivo dos receptores NMDA, AP7 (n= 6; 1 ou 0,1 nmol) ou um inibidor da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), N-propyl-L-arginina (NPLA), na dose de 0,4 ou 0,04 nmol (n= 5).

Animais tratados com AP7 na dose de 1 nmol ($F_{2,16} = 11,6$, $P < 0,001$; Figura 22A) apresentaram uma diminuição significativa do tempo de imobilidade quando comparado com os animais do grupo controle durante re-exposição ao contexto aversivo. Resultados similares foram observados após a administração de NPLA na dose de 0,4 nmol ($F_{2,14} = 5,3$, $P < 0,05$; Figura 23A).

Em relação às alterações autonômicas, a administração de AP7 e NPLA no NLET, não afetou os valores basais de PAM, FC e TC (Apêndice 2). A re-exposição ao contexto previamente pareado com choques nas patas induziu um aumento acentuado e sustentado das respostas cardiovasculares e uma queda da temperatura cutânea.

O tratamento do NLET com 1 nmol de AP7 foi capaz de reduzir as respostas autonômicas (PAM: $F_{2,225} = 37,7$, $P < 0,001$; FC: $F_{2,225} = 55,2$, $P < 0,001$ e TC: $F_{2,225} = 48,8$, $P < 0,001$) durante os 10 min de teste (PAM: $F_{14,225} = 31,6$, $P < 0,001$; FC: $F_{14,225} = 64,9$, $P < 0,001$ e TC: $F_{14,225} = 36,9$, $P < 0,001$), como mostrado na Figura 22B-D.

No mesmo sentido, animais que receberam 0,4 nmol de NPLA apresentaram atenuação das respostas autonômicas (PAM: $F_{2,210} = 30,6$, $P < 0,001$; FC: $F_{2,210} = 41,4$, $P < 0,001$ e TC: $F_{2,210} = 84,9$, $P < 0,001$) durante os 10 min de teste (PAM: $F_{14,210} = 34,9$, $P < 0,001$; FC: $F_{14,210} = 23,3$, $P < 0,001$ e TC: $F_{14,210} = 59,5$, $P < 0,001$; Figura 23B-D).

Tanto o AP7 na dose de 0,1 nmol quanto o NPLA 0,04 nmol não foram capazes de alterar a REC ($P>0,05$).

Não foram observadas alterações autonômicas e comportamental quando o AP7 e NPLA foram injetados em estruturas próximas ao NLET de animais condicionados (dados não mostrados).

Figura 22. Efeitos da injeção bilateral de veículo (VEI; $n = 7$) ou AP7 (0,1 e 1 nmol; $n = 5-6$ /grupo), em animais condicionados, sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) pressão arterial média (Δ PAM) e (D) frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P < 0,05$, teste de Bonferroni) em relação aos animais tratados com veículo, em todo o período de exposição à caixa de condicionamento.

Figura 23. Efeito da injeção bilateral de veículo (VEI; $n=6$), 0,4 nmol de NPLA ($n=5$) ou 0,04 nmol de NPLA ($n=6$), em animais condicionados, sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P<0,05$ em relação ao grupo veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) pressão arterial média (Δ PAM) e (D) frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P<0,05$, teste de Bonferroni) em relação aos animais tratados com veículo, em todo o período de exposição à caixa de condicionamento.

6.14. Participação dos receptores NMDA e do NO na modulação da REC contextual dependente do aumento da neurotransmissão noradrenérgica do NLET

Para avaliar se os receptores NMDA presentes no NLET estariam envolvidos nas alterações autonômicas e comportamental moduladas pela noradrenalina durante o MCC, animais condicionados, utilizando o protocolo de baixa intensidade, foram tratados com veículo-veículo ($n=6$) ou veículo e inibidor da

recaptação de noradrenalina (reboxetina 2 nmol) (n= 6), o antagonista de receptores NMDA (AP7 1 nmol) e veículo (n= 6), ou reboxetina (2 nmol) em animais tratados com AP7 (1 nmol, n= 6).

A administração de reboxetina no NLET promoveu aumento do tempo de congelamento ($F_{3,20} = 5,4$, $P < 0,01$; Figura 24A) e das respostas cardiovasculares, além de queda da temperatura cutânea, em animais re-expostos ao contexto aversivo (fator tratamento: PAM: $F_{3,300} = 81,9$, $P < 0,001$; FC: $F_{3,300} = 63,4$, $P < 0,001$; TC: $F_{3,300} = 57,7$, $P < 0,001$) durante os 10 min de teste (fator tempo: PAM: $F_{14,300} = 66,2$, $P < 0,001$; FC: $F_{14,300} = 63,9$, $P < 0,001$ e TC: $F_{14,300} = 44,4$, $P < 0,001$). O tratamento prévio com AP7 atenuou os efeitos observados após a injeção de reboxetina ($P > 0,05$), como mostrado na Figura 24B-D.

Figura 24. Efeitos da injeção bilateral de veículo + veículo (VEI/VEI; $n=5$) ou veículo + reboxetina (2 nmol) (VEI/RBX; $n=5$), AP7 (1 nmol) + veículo (AP7/VEI; $n=6$) e AP7 (1 nmol) + reboxetina (2 nmol) (AP7/RBX; $n=6$), em animais condicionados, sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P<0,05$ em relação ao grupo veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) pressão arterial média (Δ PAM) e (D) frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P<0,05$, teste de Bonferroni) em relação aos animais tratados com veículo, em todo o período de exposição à caixa de condicionamento. O # indicam diferença significativa do tratamento em relação ao grupo reboxetina ($P<0,05$, teste de Bonferroni).

Uma vez que os receptores NMDA participam da REC promovida pela administração de reboxetina, avaliou-se então o envolvimento do NO nessas respostas. Animais condicionados, utilizando o protocolo de baixa intensidade, tratados com reboxetina (2 nmol; $n=9$) apresentaram um aumento na porcentagem do tempo de congelamento ($t=4,1$, $P<0,001$) e uma maior quantidade de NO

($\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteínas) ($t= 3,5$, $P<0,01$) após a re-exposição ao contexto aversivo comparado aos animais que receberam veículo ($n= 8$), como mostrado na Figura 25.

Figura 25. Efeito da injeção bilateral de veículo ($n= 8$) ou 2 nmol de reboxetina (RBX; $n= 9$) em animais condicionados, sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A) e a (B) quantidade de NO ($\mu\text{M}/\text{mg}$ proteínas) no NLET após a re-exposição à caixa de condicionamento. As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P<0,05$ em relação ao grupo veículo.

A fim de confirmar a participação do NO na REC promovida pela administração de reboxetina, os animais receberam injeções intra-NLET de veículo-veículo ($n= 5$) ou veículo e inibidor da recaptação de noradrenalina (reboxetina 2 nmol; $n= 6$), o inibidor da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (NPLA 0,4 nmol) e veículo ($n= 5$), ou reboxetina (2 nmol) em animais tratados com NPLA (0,4 nmol; $n= 5$). A injeção de reboxetina no NLET promoveu aumento do tempo de congelamento ($F_{3,17}= 19,2$, $P<0,001$; Figura 26A) e das respostas cardiovasculares, além de queda da temperatura cutânea (PAM: $F_{3,255}= 51,5$, $P<0,001$; FC: $F_{3,255}= 71,2$, $P<0,001$; TC: $F_{3,255}= 81,5$, $P<0,001$) durante os 10 minutos de re-exposição ao contexto aversivo

(PAM: $F_{14,255} = 65,2$, $P < 0,001$; FC: $F_{14,255} = 66,4$, $P < 0,001$ e TC: $F_{14,255} = 84,5$, $P < 0,001$; Figura 26B-D). O tratamento prévio do NLET com NPLA atenuou as alterações induzidas pela reboxetina ($P > 0,05$).

Em relação às alterações autonômicas, a administração de AP7, NPLA e/ou reboxetina no NLET não afetou os valores basais de PAM, FC e TC (Apêndice 2).

Figura 26. Efeitos da injeção bilateral de veículo + veículo (VEI/VEI; $n = 5$) ou veículo + reboxetina (2 nmol) (VEI/RBX; $n = 6$), NPLA (0,4 nmol) + veículo (NPLA/VEI; $n = 5$) e NPLA (0,4 nmol) + reboxetina (2 nmol) (NPLA/RBX; $n = 5$), em animais condicionados, sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) pressão arterial média (Δ PAM) e (D) frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P < 0,05$, teste de Bonferroni) em relação aos animais tratados com veículo, em todo o período de exposição à caixa de condicionamento. O # indicam diferença significativa do tratamento em relação ao grupo reboxetina ($P < 0,05$, teste de Bonferroni).

6.15. Interação entre CRF, glutamato e NO no NLET na modulação da REC contextual

Para avaliar se o sistema CRFérgico presente no NLET interage com a neurotransmissão glutamatérgica na modulação das alterações autonômicas e comportamental durante o MCC, animais condicionados, utilizando o protocolo de baixa intensidade, foram tratados com veículo-veículo (n= 7) ou veículo e um agonista de receptores CRF (urocortina 0,01 nmol) (n= 7), o antagonista de receptores NMDA (AP7 1 nmol) e veículo (n= 7), ou urocortina (0,01 nmol) em animais tratados com AP7 (1 nmol; n= 6).

A injeção de urocortina no NLET promoveu aumento do tempo de congelamento ($F_{3,22} = 18,3$, $P < 0,001$; Figura 27) e das respostas autonômicas (PAM: $F_{3,330} = 53,4$, $P < 0,001$; FC: $F_{3,330} = 23,2$, $P < 0,001$; TC: $F_{3,330} = 46,1$, $P < 0,001$) durante os 10 min de re-exposição ao contexto aversivo (PAM: $F_{14,330} = 57,7$, $P < 0,001$; FC: $F_{14,330} = 49,8$, $P < 0,001$ e TC: $F_{14,330} = 60,2$, $P < 0,001$; Figura 27B-D). O tratamento prévio do NLET com AP7 atenuou os efeitos da administração de urocortina em relação à resposta comportamental e às respostas autonômicas ($P > 0,05$).

Figura 27. Efeitos da injeção bilateral de veículo + veículo (VEI/VEI; $n = 7$) ou veículo + urocortina (0,01 nmol) (VEI/URO; $n = 7$), AP7 (1 nmol) + veículo (AP7/VEI; $n = 7$) e AP7 (1 nmol) + urocortina (0,01 nmol) (AP7/URO; $n = 6$), em animais condicionados, sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) pressão arterial média (Δ PAM) e (D) frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P < 0,05$, teste de Bonferroni) em relação aos animais tratados com veículo, em todo o período de exposição à caixa de condicionamento. O # indicam diferença significativa do tratamento em relação ao grupo urocortina ($P < 0,05$, teste de Bonferroni).

Para avaliar se o sistema CRFérgico presente no NLET interage com a neurotransmissão nitrérgica na modulação das alterações autonômicas e comportamental durante o MCC, animais condicionados, utilizando o protocolo de baixa intensidade, foram tratados com veículo-veículo ($n = 5$) ou veículo e um

agonista de receptores CRF (urocortina 0,01 nmol) (n= 5), o inibidor da nNOS (NPLA 0,4 nmol) e veículo (n= 4), ou urocortina (0,01 nmol) em animais tratados com NPLA (0,4 nmol; n= 6).

A injeção de urocortina no NLET promoveu aumento do tempo de congelamento ($F_{3,18} = 11,3$, $P < 0,001$; Figura 28A) e das respostas autonômicas (PAM: $F_{3,255} = 24,2$, $P < 0,001$; FC: $F_{3,255} = 88,8$, $P < 0,001$; TC: $F_{3,255} = 23,9$, $P < 0,001$) durante o período de re-exposição à caixa de condicionamento (PAM: $F_{14,255} = 40,6$, $P < 0,001$; FC: $F_{14,255} = 61,2$, $P < 0,001$ e TC: $F_{14,255} = 40,4$, $P < 0,001$). Similar ao tratamento com AP7, a injeção prévia de NPLA atenuou os efeitos da administração de urocortina em relação à resposta comportamental e às respostas autonômicas ($P > 0,05$), como mostrado na Figura 28B-D.

Em relação às alterações autonômicas, a administração de AP7, NPLA e/ou urocortina no NLET não afetou os valores basais de PAM, FC e TC (Apêndice 2).

Figura 28. Efeitos da injeção bilateral de veículo + veículo (VEI/VEI; $n = 5$) ou veículo + urocortina (0,01 nmol) (VEI/URO; $n = 5$), NPLA (0,4 nmol) + veículo (NPLA/VEI; $n = 4$) e NPLA (0,4 nmol) + urocortina (0,01 nmol) (NPLA/URO; $n = 6$), em animais condicionados, sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ Temperatura), (C) pressão arterial média (Δ PAM) e (D) frequência cardíaca (Δ FC) em animais condicionados. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P < 0,05$, teste de Bonferroni) em relação aos animais tratados com veículo, em todo o período de exposição à caixa de condicionamento. O # indicam diferença significativa do tratamento em relação ao grupo urocortina ($P < 0,05$, teste de Bonferroni).

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que o sistema noradrenérgico presente no NLET está envolvido na expressão de respostas comportamentais e autonômicas, induzidas pelo modelo do MCC, de forma dependente da ativação de receptores CRF e dos sistemas glutamatérgico e nitrérgico.

Foi observado que a injeção intra-NLET de antagonistas não seletivos de adrenoceptores α e β atenuou as respostas autonômicas e comportamental induzidas pela re-exposição ao contexto aversivo. Nossos resultados também mostraram que os adrenoceptores $\alpha 1$ e $\beta 1$ estão especificamente envolvidos nessas respostas. Além disso, a administração de reboxetina, um inibidor da recaptação de noradrenalina, promoveu um aumento da REC e esse efeito é atenuado pela administração de WB4101, um antagonista seletivo de adrenoceptores $\alpha 1$, CGP20712, um antagonista seletivo de adrenoceptores $\beta 1$, CP154526, um antagonista dos receptores de CRF1, AP7, um antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e também pelo NPLA, um inibidor da nNOS.

Em nosso estudo, o tratamento do NLET com os antagonistas adrenérgicos, o inibidor da recaptação de noradrenalina reboxetina, o agonista de receptores CRF urocortina, o antagonista dos receptores NMDA AP7 ou o inibidor da nNOS NPLA *per se* não afetou valores basais de PAM, FC e TC. Portanto, embora o presente estudo suporte a hipótese de que a neurotransmissão noradrenérgica, o CRF e os sistemas glutamatérgico e nitrérgico presentes no NLET apresentem um importante papel na modulação das respostas autonômicas no MCC, estas neurotransmissões não parecem estar envolvidas na manutenção tônica da PAM, FC e TC. É provável, portanto, que a atenuação das respostas cardiovasculares ao

contexto aversivo não dependam dos efeitos cardiovasculares diretos, mas sim da atenuação da resposta emocional.

A extensão da difusão das drogas utilizadas a partir do local da injeção não pode ser estabelecida precisamente, porém, a ausência de qualquer efeito quando as drogas utilizadas no presente estudo foram administradas em estruturas vizinhas sugere que os efeitos foram mediados por uma ação das drogas no NLET.

A REC contextual é produzida pela re-exposição do animal a um contexto que tenha sido anteriormente pareado com um estímulo aversivo ou desagradável, como choque elétrico nas patas no modelo do MCC (Fanselow, 1980, Antoniadis e McDonald, 1999). De acordo com o descrito na literatura, a magnitude da resposta condicionada é dependente da intensidade do estímulo aversivo em modelos de condicionamento, sendo que a deflagração de choques de alta intensidade, como 1,2 mA e 1,5 mA, gera respostas comportamentais e autonômicas mais intensas (Baldi et al., 2004, Resstel et al., 2006), dificultando a observação de efeitos que potencializariam essas alterações. Por sua vez, choques de menor intensidade (0,85 mA) induzem respostas intermediárias de congelamento e aumentos menores de respostas autonômicas (Baldi et al., 2004, Lisboa et al., 2010). Sendo assim, foram utilizados dois protocolos experimentais. O primeiro protocolo, denominado protocolo de alta intensidade (6 choques, 1,5 mA/3s), permite avaliar efeitos tipo-ansiolíticos e, no presente estudo, foi utilizado para avaliar o efeito ansiolítico das drogas sob a liberação sistêmica dos neurotransmissores em estudo. O segundo protocolo, menos aversivo, denominado de baixa intensidade (3 choques, 0,85 mA/2s), consiste de um número menor de choques com uma menor intensidade e duração. Esse protocolo permite observar os efeitos induzidos por drogas com propriedades ansiogênicas (Lisboa et al., 2010).

Confirmando estudos anteriores (Blanchard et al., 1993, Carrive, 2000, Zhang et al., 2004, Vianna e Carrive, 2005, Resstel et al., 2008a), foi observado que os animais condicionados apresentaram alterações autonômicas (aumento da FC e PAM e diminuição da temperatura cutânea) e resposta comportamental (congelamento) após serem re-expostos ao contexto aversivo. Animais não-condicionados também apresentaram aumento da PAM, FC e queda da TC durante o teste. No entanto, esses aumentos foram menores do que aqueles observados nos grupos condicionados.

As respostas autonômicas desencadeadas pelo contexto aversivo estão relacionadas com a resposta comportamental, assim como observado em estudos anteriores (Carrive, 2000, Vianna e Carrive, 2005). Ratos condicionados permanecem um período prolongado em congelamento o que, conseqüentemente, resulta em baixa atividade locomotora. Esse longo período de resposta comportamental, que reflete uma maior expressão do medo condicionado ao contexto, foi associado com a ativação do sistema nervoso simpático (McCarty e Kopin, 1978, Carrive, 2002).

Animais não-condicionados apresentam menor resposta de congelamento do que os ratos condicionados, resultando em um aumento da atividade locomotora associada com um aumento concomitante da resposta cardiovascular. A atividade somatomotora é positivamente correlacionada com a PAM e FC, de modo que uma maior atividade locomotora leva a uma maior resposta cardiovascular (Yancey e Overton, 1993, Nijssen et al., 1998). Conseqüentemente, as respostas autonômicas observadas em ratos condicionados são principalmente devidas a um aumento da ativação simpática, em decorrência da aversão ao contexto (Carrive, 2002), enquanto as respostas autonômicas dos ratos não-condicionados podem derivar de

uma combinação de menor aversão em relação ao contexto e um maior aumento da resposta cardiovascular mediado por maior atividade. No entanto, de acordo com trabalhos anteriores (Carrive, 2000, Vianna e Carrive, 2005), nossos resultados reforçam a proposta de que PAM, FC e TC da cauda são índices úteis para avaliar a intensidade da resposta a um estímulo de medo condicionado contextual.

Quanto à temperatura cutânea, nós observamos que a re-exposição ao contexto aversivo induziu uma queda na temperatura da cauda (-3 a -4°C a partir dos valores basais). Na verdade, tem sido relatado que os ratos submetidos ao medo condicionado apresentam um aumento na temperatura do corpo e uma acentuada diminuição na temperatura cutânea da cauda, que é atribuído a uma intensa vasoconstrição cutânea (Vianna e Carrive, 2005). Assim, a queda na temperatura da cauda pode refletir uma diminuição do fluxo de sangue da cauda causada por uma vasoconstrição cutânea. De fato, a resposta de medo relaciona-se a uma resposta preparatória para uma reação mais ativa, como a luta ou fuga e, como apontado por Blessing (2003), a vasoconstrição da pele pode ser um mecanismo de proteção para reduzir a perda de sangue em caso de lesão ou mesmo redirecionar o fluxo sanguíneo para onde pode ser mais necessário, por exemplo, para a musculatura esquelética (Vianna e Carrive, 2005).

Interessantemente, as alterações autonômicas e comportamental evocadas pela re-exposição ao contexto aversivo foram atenuadas pela injeção intra-NLET de L-propranolol ou fentolamina, antagonistas não-seletivos dos receptores adrenérgicos β e α , respectivamente. No entanto, após os tratamentos individuais com estas drogas as respostas comportamentais e autonômicas foram apenas parcialmente reduzidas. Assim, nós investigamos se a combinação de L-propranolol e fentolamina potencializa a atenuação das respostas induzidas pelo

MCC. Apesar da redução das respostas autonômicas e comportamental, após administração da combinação das drogas, o efeito sinérgico foi evidente apenas na atenuação da resposta comportamental e TC. Adicionalmente, a combinação das drogas foi mais efetiva para atenuar alterações observadas na PAM quando comparada com injeção apenas de fentolamina. Nos animais não-condicionados, como esperado, nenhum efeito foi observado nas respostas comportamentais e autonômicas após a administração de L-propranolol ou fentolamina. Estes dados mostram o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica presente no NLET na modulação de REC evocada pelo MCC.

Com base nestes dados, foram realizados experimentos adicionais com antagonistas adrenérgicos seletivos para avaliar quais subtipos de receptores adrenérgicos estariam envolvidos nessas respostas. Para isso, utilizamos doses equipotentes dos antagonistas seletivos dos adrenoreceptores α - e β com base na relação de valores de K_i (constante de inibição) entre as drogas não seletivas e as seletivas (Miralles et al., 1993, Bylund et al., 1994).

Assim como o L-propranolol ou a fentolamina, os antagonistas seletivos dos receptores adrenérgico α_1 e β_1 , WB4101 e CGP20712, respectivamente, quando injetados no NLET também reduziram o tempo de congelamento e as respostas autonômicas induzidas pelo MCC. Por outro lado, os antagonistas seletivos para adrenoreceptores α_2 e β_2 , RX821002 e ICI118551, respectivamente, não atenuaram a REC, sugerindo então que os efeitos do L-propranolol e da fentolamina no NLET foram mediados, respectivamente, pelo antagonismo dos receptores adrenérgicos α_1 e β_1 . Estes resultados estendem descobertas anteriores que sugerem o envolvimento do NLET no paradigma do MCC (Sullivan et al, 2004; Resstel et al, 2008), e, de nosso conhecimento, este estudo é o primeiro a fornecer

evidências sobre o papel do adrenoceptores α_1 e β_1 presentes no NLET na expressão do MCC.

Posteriormente, nós também investigamos os efeitos da combinação dos antagonistas dos receptores adrenérgicos α_1 e β_1 . A combinação de WB4101 e CGP20712 foi mais efetiva na atenuação do aumento da FC quando comparado com as drogas administradas individualmente, indicando um possível sinergismo entre o bloqueio dos adrenoceptores α_1 e β_1 no NLET para esse efeito. No entanto, a combinação não foi capaz de potencializar os efeitos sobre o tempo de congelamento, a PAM e a TC, induzidos pelos tratamentos quando administrados separadamente. As razões para estes resultados não são claras. Mas, não podemos descartar a possibilidade de que CGP20712 e WB4101 sozinhos produzam efeito teto para a atenuação do tempo de congelamento, PAM e TC e que a neurotransmissão noradrenérgica do NLET possa ter uma influência direta sobre o sistema nervoso autônomo, de forma segregada das respostas comportamentais.

Tem sido demonstrado que a neurotransmissão noradrenérgica no NLET está envolvida no controle cardiovascular. O NLET envia projeções diretas para estruturas medulares que modulam a atividade autonômica, como o núcleo do trato solitário (NTS), núcleo motor dorsal do vago, núcleo ambíguo e a medula ventrolateral (Dong e Swanson, 2004). Além disso, a ablação do bulbo ventrolateral caudal (BVLc) atenuou a PAM e a FC em resposta à estimulação do NLET (Giancola et al., 1993). O BVLc projeta e inibe neurônios pré-motores simpáticos no bulbo ventrolateral rostral (BVLr), diminuindo assim a saída neuronal simpática pré-ganglionar (Sved et al., 2000).

Estudo prévio mostrou que adrenoceptores α_1 no NLET exercem uma influência tônica sobre o componente parassimpático do baroreflexo em ratos, de

uma maneira semelhante à observada durante situações aversivas (Crestani et al., 2008a), sugerindo assim que uma ativação dos adrenocetores $\alpha 1$ no NLET poderia facilitar as respostas cardiovasculares durante a re-exposição ao contexto aversivo. O NLET modula a atividade do baroreflexo de forma semelhante à observada durante situações aversivas (Crestani et al., 2008a, Crestani et al., 2009), o que sugere que a influência do NLET nas respostas autonômicas ao medo contextual podem depender da modulação do baroreflexo pelos receptores adrenérgicos $\alpha 1$ do NLET. No entanto, em contraste com os nossos resultados, Crestani et al. (2009) observaram que o antagonismo de receptores $\alpha 1$ facilitou o aumento da FC, sem afetar o aumento da PAM provocados pelo estresse por restrição, ao passo que o antagonismo de receptores $\alpha 2$ ou β não afetou as respostas cardiovasculares. As razões para estes resultados contraditórios não são claras, mas podem envolver o recrutamento de substratos neurais distintos em decorrência da utilização de diferentes estressores.

A desregulação da neurotransmissão noradrenérgica tem sido implicada em desordens neuropsiquiátricas, como depressão e ansiedade (Ressler e Nemeroff, 2000). Em concordância com nossos achados, os antagonistas adrenérgicos reduzem a ansiedade e o medo. Por exemplo, a administração sistêmica de propranolol reduziu o medo contextual em roedores e humanos (Grillon et al., 2004, Ouyang e Thomas, 2005). Além disso, dados de estudos clínicos demonstraram que a prazosina, um antagonista dos receptores adrenérgico $\alpha 1$, aliviou os sintomas do transtorno de estresse pós-traumático (Peskind et al., 2003). Assim, nossos resultados sugerem que o NLET pode estar envolvido nos efeitos da administração sistêmica de antagonistas adrenérgicos sobre a modulação do medo condicionado. Além disso, outras estruturas do cérebro que estão diretamente

relacionadas com o NLET também parecem estar envolvidas nos efeitos dos antagonistas adrenérgicos sobre o medo condicionado, como hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal medial (Do-Monte et al., 2010, Lazzaro et al., 2010, Murchison et al., 2011).

Além disso, evidências indicam a importância do sistema noradrenérgico presente no NLET na expressão de respostas ao estresse (Forray e Gysling, 2004). Como por exemplo, o antagonismo dos receptores adrenérgicos $\alpha 1$ atenuou os aumentos nos níveis do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) induzidos pelo estresse (Morilak et al., 2005). A infusão de betaxolol, um antagonista seletivo dos receptores adrenérgicos $\beta 1$, no NLET atenuou a aversão induzida pela retirada da morfina (Aston-Jones et al., 1999, Delfs et al., 2000, Cecchi et al., 2007). Nagai e colaboradores (2013) observaram que a administração dos antagonistas seletivos dos receptores adrenérgicos $\alpha 1$, $\beta 1$ e $\beta 2$, reduziu o tempo de imobilidade em ratos submetidos ao teste do nado forçado. Já Deyama et al. (2008) relataram que a injeção no NLET do antagonista dos receptores $\beta 2$ ICI118551 atenuou a aversão induzida pela dor, sugerindo o envolvimento dos receptores adrenérgicos $\beta 2$ do NLET no componente afetivo negativo da dor. No presente estudo o antagonismo de receptores adrenérgicos $\beta 2$ no NLET não atenuou a REC contextual. Entretanto, em conjunto, nossos resultados são consistentes com a ideia geral de que a neurotransmissão noradrenérgica no NLET pode mediar a integração dos diferentes componentes da resposta ao estresse.

No entanto, os mecanismos neuroquímicos que contribuem para os efeitos induzidos pela noradrenalina no NLET não são claros e podem envolver a modulação de diversos sistemas de neurotransmissores. Interessantemente, vários estudos sugerem que a neurotransmissão noradrenérgica no NLET modula a

liberação de glutamato, através da ativação de adrenoceptores $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (Forray et al., 1997, Egli et al., 2005, McElligott e Winder, 2008). Também tem sido observado que a ativação de adrenoceptores $\alpha 1$ e $\beta 1$ no NLET aumenta a transmissão sináptica excitatória através da ativação de receptores CRF1 (McElligott et al., 2010, Nobis et al., 2011a).

A noradrenalina é capaz de despolarizar neurônios contendo CRF (Silberman et al., 2013) e a sinalização mediada pelo CRF no NLET também modula respostas comportamentais induzidas pelo estresse (Nijssen et al., 2001; Sahuque et al., 2006), sugerindo uma via comum entre a noradrenalina e o CRF no NLET.

A partir dessas evidências foi utilizado um inibidor da recaptação de noradrenalina, a reboxetina, como uma estratégia farmacológica para potencializar a neurotransmissão noradrenérgica presente no NLET de animais submetidos ao protocolo de baixa intensidade, para mimetizar a liberação de noradrenalina no NLET que é aumentada em situações aversivas (Pacak et al., 1995, Fuentealba et al., 2000, Cecchi et al., 2002, Fendt et al., 2005, Deyama et al., 2011).

A microinjeção bilateral de reboxetina no NLET promoveu um aumento da REC, similar ao observado em animais submetidos ao protocolo de alta intensidade. Esses resultados estão de acordo com os estudos de Onur e colaboradores (2009) que observaram que uma dose única de reboxetina administrada por via oral aumentou as respostas da amígdala basolateral relacionadas à ansiedade em pacientes submetidos ao paradigma de reconhecimento facial. Ademais, nós observamos que os efeitos promovidos pela reboxetina foram atenuados pelo pré-tratamento dos animais com os antagonistas seletivos dos adrenoceptores $\alpha 1$ e $\beta 1$, confirmando a participação do sistema noradrenérgico nas respostas induzidas pelo MCC. Assim, os resultados obtidos nos permitiram utilizar a reboxetina como

ferramenta farmacológica para avaliar se os efeitos induzidos pelo aumento da neurotransmissão noradrenérgica no NLET durante o MCC envolveriam uma interação com o CRF e as neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica.

Resultados similares aos obtidos com reboxetina foram observados com a administração bilateral de urocortina, um agonista não seletivo de receptores CRF, confirmando assim, a participação dos receptores CRF presentes no NLET na REC. No mesmo sentido, dados da literatura mostram que a administração de CRF no NLET induz respostas tipo-ansiosas (Sahuque et al., 2006). Neurônios contendo CRF no NLET estão envolvidos na modulação do sobressalto potencializado pelo medo em ratos (Sink et al., 2012) e a administração de agonista dos receptores CRF aumenta o sobressalto, um efeito atenuado por drogas com propriedades ansiolíticas (Swerdlow et al., 1989).

O CRF parece participar de maneira importante como regulador de circuitos neurais que controlam as respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais ao estresse (Dunn e Berridge, 1990). E de fato, vários trabalhos mostram que o NLET contém fibras e terminais CRF-positivos e numerosos corpos celulares que sintetizam CRF (Cummings et al., 1983). Além disso, assim como a noradrenalina, os níveis de CRF no NLET estão aumentados durante situações de estresse (Funk et al., 2006, Kim et al., 2006).

Uma vez que os receptores de CRF parecem participar da REC, foram administrados antagonistas dos receptores CRF1 e CRF2 tanto nos animais submetidos ao protocolo de alta intensidade quanto nos animais submetidos ao protocolo de baixa intensidade que receberam urocortina. Os resultados mostraram o envolvimento dos receptores CRF1 na REC, uma vez que o antagonista de receptores CRF1 administrado intra-NLET atenuou as repostas induzidas pela re-

exposição ao contexto aversivo no protocolo de alta intensidade e também no protocolo de baixa intensidade quando os animais foram tratados com urocortina. Por outro lado, o antagonista de receptores CRF2 atenuou a resposta induzida pela administração de urocortina, porém, efeito similar não foi observado quando os animais foram submetidos ao protocolo de alta intensidade, ou seja, quando ocorre um aumento da liberação de CRF endógeno, sugerindo que os receptores CRF2 não participam da REC evocada pelo MCC no NLET. Apesar de possuírem mecanismos de transdução de sinal comuns, os receptores CRF1 e CRF2 no NLET tem função oposta sobre a ansiedade induzida por estresse, resposta neuroendócrina e nocicepção (Takahashi, 2001, Fu and Neugebauer, 2008, Tran et al., 2014). Dados da literatura indicam o envolvimento dos receptores CRF1 do NLET nas alterações tipo-ansiosas induzidas pelo estresse (Sink et al., 2012), porém, a participação dos receptores CRF2 não é clara (Risbrough et al., 2003, Hauger et al., 2006). Risbrough e colaboradores mostraram que camundongos que não expressam o receptor CRF1 não exibem sobressalto potencializado pelo medo. Em contraste, camundongos que não expressam o receptor CRF2 apresentam apenas uma redução parcial da resposta de sobressalto (Risbrough et al., 2009). No mesmo sentido Schulz et al. (1996) bloquearam a resposta de sobressalto potencializado pelo medo utilizando o CP154526, um antagonista seletivo de receptores CRF1. Em concordância com esses resultados, estudos sugerem que a ativação de receptores CRF1 é importante para iniciar as respostas ao estresse, enquanto que os receptores CRF2 estariam envolvidos na restauração da homeostase (de Kloet et al., 2005, Hauger et al., 2006, Hauger et al., 2009). Uma vez que a manifestação comportamental de ratos expostos a estímulos relacionados ao predador foi correlacionada com elevação na expressão de receptores CRF1 e

diminuição na expressão de receptores CRF2. No entanto a superexpressão de receptores CRF2 atenuou a resposta comportamental desses animais (Elharrar et al., 2013).

No presente estudo, após confirmar a participação dos receptores de CRF1, foi administrado reboxetina no NLET de animais previamente tratados com o antagonista dos receptores CRF1 CP376345 a fim de avaliar a participação desses receptores na modulação da REC pelo sistema noradrenérgico. O CP376395 atenuou a REC potencializada pela administração de reboxetina. Estes dados sugerem que a noradrenalina pode atuar, em parte, através do recrutamento da sinalização mediada pelo receptor CRF1 no NLET, na modulação da REC como observado por Nobis e colaboradores (2011b) em estudo que mostra que a ativação de receptores β_1 no NLET aumenta a transmissão sináptica excitatória de forma dependente de CRF1. Além disso, os antagonistas dos adrenoreceptores α_1 e β_1 não foram capazes de bloquear o aumento da REC observado nos animais que receberam urocortina, indicando que os receptores para CRF são ativados posteriormente aos receptores noradrenérgicos.

Apesar da maioria dos neurônios dentro do NLET serem GABAérgicos (Sakanaka et al., 1986), o NLET recebe projeções glutamatérgicas de regiões do cérebro que modulam vários tipos de comportamento, além de enviar projeções para regiões envolvidas com a resposta ao estresse (Dong et al., 2001b, Dong and Swanson, 2004). Além disso, uma população distinta de neurônios glutamatérgicos expressa uma variedade de neuropéptidos, incluindo o CRF (Malsbury e McKay, 1987, Arluison et al., 1990, Georges e Aston-Jones, 2002). Uma vez que existem evidências indicando que a ativação de receptores adrenérgicos modula a transmissão sináptica excitatória no NLET (Egli et al., 2005) de forma dependente

dos receptores CRF1 (McElligott e Winder, 2009, Nobis et al., 2011b) e que os receptores CRF1 que medeiam o aumento da liberação de glutamato estariam localizados em terminais glutamatérgicos pré-sinápticos na porção dorsolateral do NLET (Nobis et al., 2011b), foi administrado o AP7, um antagonista dos receptores glutamatérgicos NMDA, em animais submetidos ao protocolo de alta intensidade para avaliar a participação do sistema glutamatérgico na REC. O AP7 foi capaz de atenuar as respostas comportamental e autonômicas induzidas pela re-exposição ao contexto aversivo, sugerindo a participação dos receptores NMDA do NLET na REC contextual.

Os receptores NMDA parecem ter uma função essencial no medo e em comportamentos relacionados com a ansiedade (Carobrez et al., 2001). A administração sistêmica de antagonistas de receptores NMDA produz efeito do tipo-ansiolítico em vários modelos animais (Dunn et al., 1989, Willner, 1990, Zapata et al., 1997, Wiley et al., 1998). Porém, o envolvimento dos receptores NMDA no NLET nas respostas de medo condicionado não tem sido descrito na literatura. Entretanto, Resstel e colaboradores (2008b) mostraram que o antagonismo de receptores NMDA no córtex pré-frontal ventromedial (CPFvm) promove uma redução da REC durante re-exposição ao contexto aversivo.

Como é descrito na literatura, a ativação de receptores NMDA esta diretamente ligada à ativação da nNOS (Garthwaite e Boulton, 1995), pois como se trata de um canal iônico, sua abertura acarreta no aumento do Ca^{2+} intracelular que promove ativação da nNOS com consequente produção de NO (Garthwaite, 1991). Estudos em animais mostraram que a resposta defensiva induzida por doador de NO em ratos é revertida com administração de antagonista NMDA na SCPdl (Moreira et al., 2004), como também a resposta gerada por injeção de NMDA em

camundongos é atenuada por inibidor de nNOS (Miguel e Nunes-de-Souza, 2008). Resultados estes que refletem a íntima ligação dos sistemas para expressão da resposta defensiva.

Com base em nossos resultados, animais tratados com reboxetina apresentaram aumento no tempo de congelamento, seguido por aumento da formação de NO. Assim, poderíamos sugerir uma relação direta entre a expressão da REC e a quantidade de NO formada no NLET.

Sendo assim, animais submetidos ao protocolo de condicionamento de alta intensidade foram tratados com NPLA, um inibidor da nNOS. O NPLA atenuou as respostas comportamental e autonômicas observadas durante a re-exposição ao contexto aversivo, indicando a participação do NO presente no NLET nas respostas evocadas pelo modelo do MCC, corroborando estudo que apontou que a neurotransmissão nitrérgica está envolvida com a resposta condicionada, visto que camundongos com deleção de nNOS, mostraram significativa deficiência na expressão da resposta comportamental (Kelley et al., 2009). Além disso, a administração sistêmica de inibidor de NOS, promove efeito tipo-ansiolítico no modelo do labirinto em cruz elevado (Volke et al., 1995) e como observado anteriormente com o antagonista de receptores NMDA, a administração intra-CPFvm, hipocampo dorsal (HD) e na porção dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal (SCPdl) de inibidor da nNOS, reduziu o congelamento e as respostas autonômicas evocadas pela re-exposição ao contexto aversivo (Resstel et al., 2008b, Fabri, 2012, Aguiar et al., 2013). Tais evidências sugerem que a ativação da nNOS, em regiões do cérebro responsáveis pela expressão de respostas de medo contextual, está envolvida com a REC, mostrando a importância do sistema nitrérgico no MCC.

Além disso, nossos resultados sugerem uma interação entre os receptores NMDA e o NO na expressão do MCC e um papel tônico da via receptor NMDA/NO no NLET na modulação da REC. Resultados similares foram observados quando essas drogas foram administradas no HD (Fabri, 2012) e na SCPdl (Aguiar et al., 2013).

Após observar a participação do sistema glutamatérgico e do NO, foi administrado o antagonista dos receptores NMDA ou inibidor da nNOS em animais que receberam injeção intra-NLET de reboxetina ou urocortina. Tanto o AP7 quanto o NPLA atenuaram o aumento da REC potencializada pelo inibidor da recaptação de noradrenalina, reboxetina, ou pelo agonista de receptores CRF1, urocortina. Tais resultados sugerem a existência de uma interação entre o sistema glutamatérgico e o CRF, bem como entre o sistemas noradrenérgico e a ativação de receptores NMDA no NLET na modulação da REC. Adicionalmente, a lesão do NLET por NMDA bloqueou completamente a resposta de sobressalto induzida pelo CRF (Lee e Davis, 1997). Em conjunto, esses resultados sugerem a existência de uma via noradrenalina-CRF-glutamato-NO no NLET envolvida na expressão da REC contextual.

Com base em nossos achados, possivelmente o estresse causado pela re-exposição ao contexto aversivo aumenta a liberação de noradrenalina que, ao atuar em adrenoceptores promove a despolarização de neurônios contendo CRF no NLET, resultando na liberação de CRF destes neurônios. O aumento dos níveis extracelulares de CRF, por sua vez, levaria a uma facilitação da ativação da via NMDA/NO no NLET levando à expressão da REC (Figura 29), corroborando os dados de McElligott e Winder (2009) que sugerem que o aumento de catecolaminas

no NLET sob condições estressantes pode envolver alterações na transmissão glutamatérgica que alterariam respostas comportamentais.

De fato, estudos mostram que a estimulação de adrenocetores β , resulta em um aumento transitório na sinalização glutamatérgica (Forray et al., 1997, Egli et al., 2005, McElligott e Winder, 2008). No entanto, em relação aos receptores $\alpha 1$, estudos mostram que a ativação de adrenocetores $\alpha 1$ pode aumentar a transmissão GABAérgica (Dumont e Williams, 2004) e deprimir a transmissão glutamatérgica (Sawada e Yamamoto, 1981), enquanto McElligott et al. (2010) observaram que a ativação de receptores adrenérgicos $\alpha 1$ aumenta a transmissão glutamatérgica. A sinalização noradrenérgica no NLET, através da ativação dos receptores adrenérgicos $\alpha 1$, ativa potencialmente circuitos neuronais envolvidos na regulação do eixo HPA frente a situações aversivas (Cecchi et al., 2002). Portanto, os efeitos induzidos pelo bloqueio de receptores adrenérgicos $\alpha 1$ no NLET podem ser decorrentes, pelo menos em parte, da atenuação da ativação do eixo HPA, através da ativação de receptores CRF1.

Interessantemente, outros estudos mostram que o CRF no NLET pode modular tanto a transmissão inibitória quanto a excitatória por meio de mecanismos de sinalização distintos (Dumont e Williams, 2004, McElligott e Winder, 2009). Uma vez que os neurônios CRF no NLET são predominantemente GABAérgicos (Dabrowska et al., 2013), o CRF liberado a partir desse mesmo neurônio poderia aumentar respostas inibitórias via ativação de receptores CRF1 pós-sináptico. Por outro lado, terminais glutamatérgicos podem expressar receptores CRF1 pré-sinápticos que melhoram a liberação de glutamato. Se a sinalização dependente de receptores CRF1 no NLET é estritamente ansiogênica, possivelmente o CRF aumenta a

transmissão GABAérgica em circuitos ansiolíticos e a transmissão glutamatérgica em circuitos ansiogênicos (Kash et al., 2015).

Possivelmente a ativação de receptores $\beta 1$ promove a liberação de CRF que atuando em receptores CRF1 pré-sinápticos presentes em neurônios glutamatérgicos enviam projeções excitatórias para o PVN. No entanto, os dados da literatura são controversos quanto a participação dos receptores $\alpha 1$ na modulação das transmissões inibitória e excitatória. A ativação de receptores $\alpha 1$ poderia tanto levar a uma ativação de neurônios CRF GABAérgicos promovendo a inibição de vias inibitórias para o PVN quanto atuar de forma semelhante a ativação de receptores $\beta 1$. No entanto, são necessários mais estudos para avaliar a participação dos receptores $\alpha 1$ e $\beta 1$ nestas vias.

Curiosamente, o glutamato exerce uma regulação excitatória sobre os níveis extracelulares de noradrenalina através da ativação de receptores NMDA (Forray et al., 1995). Neste contexto, evidências neuroanatômicas mostram que corpos celulares de neurônios noradrenérgicos de A1 e A2 que inervam o NLET expressam o RNAm que codifica a subunidade obrigatória NR1 dos receptores NMDA (Forray et al., 2000).

Figura 29. Esquema representativo de uma provável via noradrenalina-CRF-Glutamato-óxido nítrico (NO) no Nucleo Leito da Estria Terminal (NLET) envolvida na modulação da Resposta Emocional Condicionada (REC). O aumento de noradrenalina promovido pela re-exposição ao contexto aversivo levaria a ativação de adrenoceptores $\alpha 1$ e $\beta 1$, promovendo uma despolarização direta de neurônios contendo CRF no NLET. O aumento dos níveis extracelulares de CRF levaria a uma facilitação da via NMDA-NO no NLET, sugerindo a existência no NLET de uma via noradrenalina-CRF-Glutamato-NO modulando a expressão do medo condicionado ao contexto em ratos.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho permitem concluir que:

- A neurotransmissão noradrenérgica presente no NLET participa da modulação da REC contextual, através da ativação de adrenocetores $\alpha 1$ e $\beta 1$.
- O CRF presente no NLET participa da modulação da REC contextual, através da ativação de receptores do tipo CRF1.
- Existe interação entre os receptores para CRF e o sistema noradrenérgico no NLET sobre a modulação da REC evocada pelo MCC.
- A neurotransmissão glutamatérgica, através do receptor NMDA, e o sistema nitrérgico presentes no NLET participam da modulação da REC contextual.
- Existe interação entre os receptores para CRF e os sistema glutamatérgico e nitrérgico no NLET na modulação da REC evocada pelo MCC.
- Existe interação entre os receptores NMDA, o NO e o sistema noradrenérgico no NLET na modulação da REC evocada pelo MCC.

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

- Aguiar DC, Hott SC, Deolindo MV, Guimaraes FS, Resstel LB (The dorsolateral periaqueductal grey N-methyl-D-aspartate/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway modulates the expression of contextual fear conditioning in rats. *J Psychopharmacol*.2013).
- Alheid GF (Extended amygdala and basal forebrain. *Ann N Y Acad Sci* 985:185-205.2003).
- Alves FH, Crestani CC, Resstel LB, Correa FM (Bed nucleus of the stria terminalis N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide modulate the baroreflex cardiac component in unanesthetized rats. *J Neurosci Res* 87:1703-1711.2009).
- Antoniadis EA, McDonald RJ (Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. *Behav Brain Res* 101:1-13.1999).
- Arluison M, Behzadi G, Vankova M (Mapping neuropeptide-containing pathways in the brain with special reference to data obtained from the rat limbic system. *Int Rev Cytol* 123:1-38.1990).
- Aston-Jones G, Rajkowski J, Cohen J (Role of locus coeruleus in attention and behavioral flexibility. *Biol Psychiatry* 46:1309-1320.1999).
- Baldi E, Lorenzini CA, Bucherelli C (Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 81:162-166.2004).
- Beck CH, Fibiger HC (Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. *J Neurosci* 15:709-720.1995).
- Blanchard RJ, Yudko EB, Rodgers RJ, Blanchard DC (Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav Brain Res* 58:155-165.1993).
- Blessing WW (Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. *Cell Mol Neurobiol* 23:527-538.2003).
- Borges RFB (1999) Ajuste de coordenadas extereotáticas para ratos com pesos variáveis. . In: FMRP Ribeirão Preto: USP.
- Bories PN, Bories C (Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem* 41:904-907.1995).
- Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Jr., Trendelenburg U (International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev* 46:121-136.1994).
- Carobrez AP, Teixeira KV, Graeff FG (Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neurosci Biobehav Rev* 25:697-709.2001).
- Carrive P (Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. *Brain Res* 858:440-445.2000).
- Carrive P (Cardiovascular and behavioural components of conditioned fear to context after ganglionic and alpha-adrenergic blockade. *Auton Neurosci* 98:90-93.2002).
- Casada JH, Dafny N (Restraint and stimulation of bed nucleus of the stria terminalis produce similar stress-like behaviors. *Brain research bulletin* 27:207-212.1991).
- Cecchi M, Capriles N, Watson SJ, Akil H (Beta1 adrenergic receptors in the bed nucleus of stria terminalis mediate differential responses to opiate withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 32:589-599.2007).
- Cecchi M, Khoshbouei H, Morilak DA (Modulatory effects of norepinephrine, acting on alpha 1 receptors in the central nucleus of the amygdala, on behavioral and

- neuroendocrine responses to acute immobilization stress. *Neuropharmacology* 43:1139-1147.2002).
- Ciriello J, Janssen SA (Effect of glutamate stimulation of bed nucleus of the stria terminalis on arterial pressure and heart rate. *Am J Physiol* 265:H1516-1522.1993).
- Crestani CC, Alves FH, Resstel LB, Correa FM (Bed nucleus of the stria terminalis alpha(1)-adrenoceptor modulates baroreflex cardiac component in unanesthetized rats. *Brain Res* 1245:108-115.2008a).
- Crestani CC, Alves FH, Resstel LB, Correa FM (Both alpha1 and alpha2-adrenoceptors mediate the cardiovascular responses to noradrenaline microinjected into the bed nucleus of the stria terminal of rats. *Br J Pharmacol* 153:583-590.2008b).
- Crestani CC, Alves FH, Tavares RF, Correa FM (Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Stress* 12:268-278.2009).
- Cummings S, Elde R, Ells J, Lindall A (Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study. *J Neurosci* 3:1355-1368.1983).
- Curtis AL, Valentino RJ (Corticotropin-releasing factor neurotransmission in locus coeruleus: a possible site of antidepressant action. *Brain research bulletin* 35:581-587.1994).
- Dabrowska J, Hazra R, Guo JD, Dewitt S, Rainnie DG (Central CRF neurons are not created equal: phenotypic differences in CRF-containing neurons of the rat paraventricular hypothalamus and the bed nucleus of the stria terminalis. *Front Neurosci* 7:156.2013).
- Davis M, Walker DL, Lee Y (Amygdala and bed nucleus of the stria terminalis: differential roles in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352:1675-1687.1997a).
- Davis M, Walker DL, Lee Y (Roles of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. Possible relevance to PTSD. *Ann N Y Acad Sci* 821:305-331.1997b).
- Davis M, Walker DL, Miles L, Grillon C (Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology* 35:105-135.2010).
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463-475.2005).
- Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones G (Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. *Nature* 403:430-434.2000).
- Deyama S, Ide S, Kondoh N, Yamaguchi T, Yoshioka M, Minami M (Inhibition of noradrenaline release by clonidine in the ventral bed nucleus of the stria terminalis attenuates pain-induced aversion in rats. *Neuropharmacology* 61:156-160.2011).
- Deyama S, Katayama T, Ohno A, Nakagawa T, Kaneko S, Yamaguchi T, Yoshioka M, Minami M (Activation of the beta-adrenoceptor-protein kinase A signaling pathway within the ventral bed nucleus of the stria terminalis mediates the negative affective component of pain in rats. *J Neurosci* 28:7728-7736.2008).
- Do-Monte FH, Allensworth M, Carobrez AP (Impairment of contextual conditioned fear extinction after microinjection of alpha-1-adrenergic blocker prazosin into the medial prefrontal cortex. *Behav Brain Res* 211:89-95.2010).
- Dong HW, Petrovich GD, Swanson LW (Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Brain Res Rev* 38:192-246.2001a).
- Dong HW, Petrovich GD, Watts AG, Swanson LW (Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. *J Comp Neurol* 436:430-455.2001b).

- Dong HW, Swanson LW (Projections from bed nuclei of the stria terminalis, posterior division: implications for cerebral hemisphere regulation of defensive and reproductive behaviors. *J Comp Neurol* 471:396-433.2004).
- Dumont EC, Williams JT (Noradrenaline triggers GABAA inhibition of bed nucleus of the stria terminalis neurons projecting to the ventral tegmental area. *J Neurosci* 24:8198-8204.2004).
- Dunn AJ, Berridge CW (Is corticotropin-releasing factor a mediator of stress responses? *Ann N Y Acad Sci* 579:183-191.1990).
- Dunn JD (Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 407:327-331.1987).
- Dunn JD, Williams TJ (Cardiovascular responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 352:227-234.1995).
- Dunn RW, Corbett R, Fielding S (Effects of 5-HT1A receptor agonists and NMDA receptor antagonists in the social interaction test and the elevated plus maze. *Eur J Pharmacol* 169:1-10.1989).
- Egli RE, Kash TL, Choo K, Savchenko V, Matthews RT, Blakely RD, Winder DG (Norepinephrine modulates glutamatergic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuropsychopharmacology* 30:657-668.2005).
- Elharrar E, Warhaftig G, Issler O, Sztainberg Y, Dikshtein Y, Zahut R, Redlus L, Chen A, Yadid G (Overexpression of Corticotropin-Releasing Factor Receptor Type 2 in the Bed Nucleus of Stria Terminalis Improves Posttraumatic Stress Disorder-like Symptoms in a Model of Incubation of Fear. *Biol Psychiatry* 74:827-836.2013).
- Fabri DRS (2012) Envolvimento dos sistemas glutamatérgico, nitrérgico e da via GMPc/NO na expressão da resposta emocional condicionada contextual em ratos submetidos ao modelo do medo condicionado contextual In: *Farmacologia*, vol. Mestre Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo.
- Fanselow MS (Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci* 15:177-182.1980).
- Fanselow MS (Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res* 110:73-81.2000).
- Fendt M, Fanselow MS (The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23:743-760.1999).
- Fendt M, Siegl S, Steiniger-Brach B (Noradrenaline transmission within the ventral bed nucleus of the stria terminalis is critical for fear behavior induced by trimethylthiazoline, a component of fox odor. *J Neurosci* 25:5998-6004.2005).
- Fleck MW, Henze DA, Barrionuevo G, Palmer AM (Aspartate and glutamate mediate excitatory synaptic transmission in area CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 13:3944-3955.1993).
- Forray MI, Andres ME, Bustos G, Gysling K (Regulation of endogenous noradrenaline release from the bed nucleus of stria terminalis. *Biochem Pharmacol* 49:687-692.1995).
- Forray MI, Bustos G, Gysling K (Regulation of norepinephrine release from the rat bed nucleus of the stria terminalis: in vivo microdialysis studies. *J Neurosci Res* 50:1040-1046.1997).
- Forray MI, Gysling K (Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res Brain Res Rev* 47:145-160.2004).
- Forray MI, Gysling K, Andres ME, Bustos G, Araneda S (Medullary noradrenergic neurons projecting to the bed nucleus of the stria terminalis express mRNA for the NMDA-NR1 receptor. *Brain Res Bull* 52:163-169.2000).

- Fu Y, Neugebauer V (Differential mechanisms of CRF1 and CRF2 receptor functions in the amygdala in pain-related synaptic facilitation and behavior. *J Neurosci* 28:3861-3876.2008).
- Fuentealba JA, Forray MI, Gysling K (Chronic morphine treatment and withdrawal increase extracellular levels of norepinephrine in the rat bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurochem* 75:741-748.2000).
- Funk D, Li Z, Le AD (Effects of environmental and pharmacological stressors on c-fos and corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain: Relationship to the reinstatement of alcohol seeking. *Neuroscience* 138:235-243.2006).
- Garthwaite J (Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 14:60-67.1991).
- Garthwaite J, Boulton CL (Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 57:683-706.1995).
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336:385-388.1988).
- Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S (NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 172:413-416.1989).
- Georges F, Aston-Jones G (Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: a novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 22:5173-5187.2002).
- Giancola SB, Roder S, Ciriello J (Contribution of caudal ventrolateral medulla to the cardiovascular responses elicited by activation of bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 606:162-166.1993).
- Grillon C, Cordova J, Morgan CA, Charney DS, Davis M (Effects of the beta-blocker propranolol on cued and contextual fear conditioning in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 175:342-352.2004).
- Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kiec A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Golabek I, Bartus S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A (Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* 274:177-188.1998).
- Guimaraes FS, Beijamini V, Moreira FA, Aguiar DC, de Lucca AC (Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1313-1322.2005).
- Harvey BH, Bothma T, Nel A, Wegener G, Stein DJ (Involvement of the NMDA receptor, NO-cyclic GMP and nuclear factor K-beta in an animal model of repeated trauma. *Hum Psychopharmacol* 20:367-373.2005).
- Hauger RL, Risbrough V, Brauns O, Dautzenberg FM (Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:453-479.2006).
- Hauger RL, Risbrough V, Oakley RH, Olivares-Reyes JA, Dautzenberg FM (Role of CRF receptor signaling in stress vulnerability, anxiety, and depression. *Ann N Y Acad Sci* 1179:120-143.2009).
- Herman JP, Cullinan WE (Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20:78-84.1997).
- Herman JP, Cullinan WE, Watson SJ (Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. *J Neuroendocrinol* 6:433-442.1994).

- Herman JP, Tasker JG, Ziegler DR, Cullinan WE (Local circuit regulation of paraventricular nucleus stress integration: glutamate-GABA connections. *Pharmacol Biochem Behav* 71:457-468.2002).
- Hollmann M, Heinemann S (Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.1994).
- Holstege G, Meiners L, Tan K (Projections of the bed nucleus of the stria terminalis to the mesencephalon, pons, and medulla oblongata in the cat. *Exp Brain Res* 58:379-391.1985).
- Jingami H, Nakanishi S, Morikawa K (Structure of the metabotropic glutamate receptor. *Curr Opin Neurobiol* 13:271-278.2003).
- Ju G, Swanson LW (Studies on the cellular architecture of the bed nuclei of the stria terminalis in the rat: I. Cytoarchitecture. *J Comp Neurol* 280:587-602.1989).
- Kangussu LM, Almeida-Santos AF, Bader M, Alenina N, Fontes MA, Santos RA, Aguiar DC, Campagnole-Santos MJ (Angiotensin-(1-7) attenuates the anxiety and depression-like behaviors in transgenic rats with low brain angiotensinogen. *Behav Brain Res* 257:25-30.2013).
- Kash TL, Pleil KE, Marcinkiewicz CA, Lowery-Gionta EG, Crowley N, Mazzone C, Sugam J, Hardaway JA, McElligott ZA (Neuropeptide Regulation of Signaling and Behavior in the BNST. *Mol Cells* 38:1-13.2015).
- Kelley JB, Balda MA, Anderson KL, Itzhak Y (Impairments in fear conditioning in mice lacking the nNOS gene. *Learn Mem* 16:371-378.2009).
- Kemp JA, McKernan RM (NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci* 5 Suppl:1039-1042.2002).
- Khodorov B (Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Prog Biophys Mol Biol* 86:279-351.2004).
- Kim SJ, Park SH, Choi SH, Moon BH, Lee KJ, Kang SW, Lee MS, Chun BG, Shin KH (Effects of repeated tianeptine treatment on CRF mRNA expression in non-stressed and chronic mild stress-exposed rats. *Neuropharmacology* 50:824-833.2006).
- Koob GF (Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. *Biol Psychiatry* 46:1167-1180.1999).
- Krettek JE, Price JL (Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J Comp Neurol* 178:225-254.1978).
- Lazzaro SC, Hou M, Cunha C, LeDoux JE, Cain CK (Antagonism of lateral amygdala α 1-adrenergic receptors facilitates fear conditioning and long-term potentiation. *Learn Mem* 17:489-493.2010).
- LeDoux JE (Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.2000).
- Lee Y, Davis M (Role of the hippocampus, the bed nucleus of the stria terminalis, and the amygdala in the excitatory effect of corticotropin-releasing hormone on the acoustic startle reflex. *J Neurosci* 17:6434-6446.1997).
- Lisboa SF, Reis DG, da Silva AL, Correa FM, Guimaraes FS, Resstel LB (Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:1163-1173.2010).
- Lourenco CF, Santos R, Barbosa RM, Gerhardt G, Cadenas E, Laranjinha J (In vivo modulation of nitric oxide concentration dynamics upon glutamatergic neuronal activation in the hippocampus. *Hippocampus*.2010).
- Lowry CA, Moore FL (Regulation of behavioral responses by corticotropin-releasing factor. *Gen Comp Endocrinol* 146:19-27.2006).

- Malsbury CW, McKay K (A sex difference in the pattern of substance P-like immunoreactivity in the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 420:365-370.1987).
- Marzinzig M, Nussler AK, Stadler J, Marzinzig E, Barthlen W, Nussler NC, Beger HG, Morris SM, Jr., Bruckner UB (Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and S-nitrosothiols. *Nitric Oxide* 1:177-189.1997).
- Masood A, Banerji B, Vijayan VK, Ray A (Pharmacological and biochemical studies on the possible role of nitric oxide in stress adaptation in rats. *Eur J Pharmacol* 493:111-115.2004).
- McCarty R, Kopin IJ (Alterations in plasma catecholamines and behavior during acute stress in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats. *Life Sci* 22:997-1005.1978).
- McElligott ZA, Klug JR, Nobis WP, Patel S, Grueter BA, Kash TL, Winder DG (Distinct forms of Gq-receptor-dependent plasticity of excitatory transmission in the BNST are differentially affected by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2271-2276.2010).
- McElligott ZA, Winder DG (Alpha1-adrenergic receptor-induced heterosynaptic long-term depression in the bed nucleus of the stria terminalis is disrupted in mouse models of affective disorders. *Neuropsychopharmacology* 33:2313-2323.2008).
- McElligott ZA, Winder DG (Modulation of glutamatergic synaptic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33:1329-1335.2009).
- Miguel TT, Nunes-de-Souza RL (Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice. *Brain Res* 1240:39-46.2008).
- Miralles A, Olmos G, Sastre M, Barturen F, Martin I, Garcia-Sevilla JA (Discrimination and pharmacological characterization of I2-imidazoline sites with [3H]idazoxan and alpha-2 adrenoceptors with [3H]RX821002 (2-methoxy idazoxan) in the human and rat brains. *J Pharmacol Exp Ther* 264:1187-1197.1993).
- Moga MM, Saper CB (Neuropeptide-immunoreactive neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 346:137-150.1994).
- Moga MM, Saper CB, Gray TS (Bed nucleus of the stria terminalis: cytoarchitecture, immunohistochemistry, and projection to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 283:315-332.1989).
- Molina-Hernandez M, Tellez-Alcantara NP, Perez-Garcia J, Olivera-Lopez JI, Jaramillo MT (Antidepressant-like and anxiolytic-like actions of the mGlu5 receptor antagonist MTEP, microinjected into lateral septal nuclei of male Wistar rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30:1129-1135.2006).
- Moore RY (Catecholamin innervation of the basal forebrain. I. The septal area. *J Comp Neurol* 177:665-684.1978).
- Moreira FA, Molchanov ML, Guimaraes FS (Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 171:199-203.2004).
- Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, Ma S, Petre CO (Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:1214-1224.2005).
- Murchison CF, Schutsky K, Jin SH, Thomas SA (Norepinephrine and ss(1)-adrenergic signaling facilitate activation of hippocampal CA1 pyramidal neurons during contextual memory retrieval. *Neuroscience* 181:109-116.2011).

- Myers B, Greenwood-Van Meerveld B (Elevated corticosterone in the amygdala leads to persistent increases in anxiety-like behavior and pain sensitivity. *Behav Brain Res* 214:465-469.2010).
- Nagai MM, Gomes FV, Crestani CC, Resstel LB, Joca SR (Noradrenergic neurotransmission within the bed nucleus of the stria terminalis modulates the retention of immobility in the rat forced swimming test. *Behav Pharmacol* 24:214-221.2013).
- Nakamura T, Kawabe K, Sapru HN (Cardiovascular responses to microinjections of urocortin 3 into the nucleus tractus solitarius of the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296:H325-332.2009).
- Nijssen MJ, Croiset G, Diamant M, De Wied D, Wiegant VM (CRH signalling in the bed nucleus of the stria terminalis is involved in stress-induced cardiac vagal activation in conscious rats. *Neuropsychopharmacology* 24:1-10.2001).
- Nijssen MJ, Croiset G, Diamant M, Stam R, Delsing D, de Wied D, Wiegant VM (Conditioned fear-induced tachycardia in the rat: vagal involvement. *Eur J Pharmacol* 350:211-222.1998).
- Nobis WP, Kash TL, Silberman Y, Winder DG (beta-Adrenergic Receptors Enhance Excitatory Transmission in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis Through a Corticotrophin-Releasing Factor Receptor-Dependent and Cocaine-Regulated Mechanism. *Biol Psychiatry*.2011a).
- Nobis WP, Kash TL, Silberman Y, Winder DG (beta-Adrenergic receptors enhance excitatory transmission in the bed nucleus of the stria terminalis through a corticotrophin-releasing factor receptor-dependent and cocaine-regulated mechanism. *Biol Psychiatry* 69:1083-1090.2011b).
- Oliveira RMWD, Deakin JF, Guimarães FS (Neuronal nitric oxide synthase (NOS) expression in the hippocampal formation of patients with schizophrenia and affective disorder. *J Psychopharmacology* 14:8 (suppl).2000).
- Onaka T, Yagi K (Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in neuroendocrine and behavioral responses to fear-related stimuli in rats. *Brain Res* 788:287-293.1998).
- Onur OA, Walter H, Schlaepfer TE, Rehme AK, Schmidt C, Keyzers C, Maier W, Hurlemann R (Noradrenergic enhancement of amygdala responses to fear. *Soc Cogn Affect Neurosci* 4:119-126.2009).
- Orozco-Cabal L, Pollandt S, Liu J, Shinnick-Gallagher P, Gallagher JP (Regulation of synaptic transmission by CRF receptors. *Rev Neurosci* 17:279-307.2006).
- Ouyang M, Thomas SA (A requirement for memory retrieval during and after long-term extinction learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9347-9352.2005).
- Pacak K, McCarty R, Palkovits M, Kopin IJ, Goldstein DS (Effects of immobilization on in vivo release of norepinephrine in the bed nucleus of the stria terminalis in conscious rats. *Brain Res* 688:242-246.1995).
- Paul IA, Skolnick P (Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. *Ann N Y Acad Sci* 1003:250-272.2003).
- Phelix CF, Liposits Z, Paull WK (Catecholamine-CRF synaptic interaction in a septal bed nucleus: afferents of neurons in the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res Bull* 33:109-119.1994).
- Ressler KJ, Nemeroff CB (Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress Anxiety* 12 Suppl 1:2-19.2000).
- Resstel LB, Alves FH, Reis DG, Crestani CC, Correa FM, Guimaraes FS (Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. *Neuroscience* 154:869-876.2008a).

- Resstel LB, Correa FM, Guimaraes FS (The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 18:2027-2035.2008b).
- Resstel LB, Joca SR, Moreira FA, Correa FM, Guimaraes FS (Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res* 172:294-298.2006).
- Risbrough VB, Geyer MA, Hauger RL, Coste S, Stenzel-Poore M, Wurst W, Holsboer F (CRF1 and CRF2 receptors are required for potentiated startle to contextual but not discrete cues. *Neuropsychopharmacology* 34:1494-1503.2009).
- Risbrough VB, Hauger RL, Pellemounter MA, Geyer MA (Role of corticotropin releasing factor (CRF) receptors 1 and 2 in CRF-potentiated acoustic startle in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 170:178-187.2003).
- Rivier C, Vale W (Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* 305:325-327.1983).
- Sahuque LL, Kullberg EF, McGeehan AJ, Kinder JR, Hicks MP, Blanton MG, Janak PH, Olive MF (Anxiogenic and aversive effects of corticotropin-releasing factor (CRF) in the bed nucleus of the stria terminalis in the rat: role of CRF receptor subtypes. *Psychopharmacology (Berl)* 186:122-132.2006).
- Sakanaka M, Shibasaki T, Lederis K (Distribution and efferent projections of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *Brain Res* 382:213-238.1986).
- Sawada S, Yamamoto C (Postsynaptic inhibitory actions of catecholamines and opioid peptides in the bed nucleus of the stria terminalis. *Exp Brain Res* 41:264-270.1981).
- Schweimer J, Fendt M, Schnitzler HU (Effects of clonidine injections into the bed nucleus of the stria terminalis on fear and anxiety behavior in rats. *Eur J Pharmacol* 507:117-124.2005).
- Shammah-Lagnado SJ, Beltramino CA, McDonald AJ, Miselis RR, Yang M, de Olmos J, Heimer L, Alheid GF (Supracapsular bed nucleus of the stria terminalis contains central and medial extended amygdala elements: evidence from anterograde and retrograde tracing experiments in the rat. *J Comp Neurol* 422:533-555.2000).
- Silberman Y, Matthews RT, Winder DG (A corticotropin releasing factor pathway for ethanol regulation of the ventral tegmental area in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci* 33:950-960.2013).
- Sink KS, Walker DL, Freeman SM, Flandreau EI, Ressler KJ, Davis M (Effects of continuously enhanced corticotropin releasing factor expression within the bed nucleus of the stria terminalis on conditioned and unconditioned anxiety. *Mol Psychiatry*.2012).
- Snyder K, Wang WW, Han R, McFadden K, Valentino RJ (Corticotropin-releasing factor in the norepinephrine nucleus, locus coeruleus, facilitates behavioral flexibility. *Neuropsychopharmacology* 37:520-530.2012).
- Spencer SJ, Buller KM, Day TA (Medial prefrontal cortex control of the paraventricular hypothalamic nucleus response to psychological stress: possible role of the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 481:363-376.2005).
- Starke K (Presynaptic autoreceptors in the third decade: focus on alpha2-adrenoceptors. *J Neurochem* 78:685-693.2001).
- Stone EA, Lin Y, Sarfraz Y, Quartermain D (The role of the central noradrenergic system in behavioral inhibition. *Brain Res Rev* 67:193-208.2011).
- 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* 128:7-14.2004).
- Sved AF, Ito S, Madden CJ (Baroreflex dependent and independent roles of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular regulation. *Brain research bulletin* 51:129-133.2000).
- Swanson LW, Hartman BK (The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *J Comp Neurol* 163:467-505.1975).
- Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW (Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36:165-186.1983).
- Swerdlow NR, Britton KT, Koob GF (Potentiation of acoustic startle by corticotropin-releasing factor (CRF) and by fear are both reversed by alpha-helical CRF (9-41). *Neuropsychopharmacology* 2:285-292.1989).
- Takahashi LK (Role of CRF(1) and CRF(2) receptors in fear and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 25:627-636.2001).
- Tran L, Schulkin J, Greenwood-Van Meerveld B (Importance of CRF receptor-mediated mechanisms of the bed nucleus of the stria terminalis in the processing of anxiety and pain. *Neuropsychopharmacology* 39:2633-2645.2014).
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J (Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213:1394-1397.1981).
- Vertes RP (Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142:1-20.2006).
- Vianna DM, Carrive P (Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *Eur J Neurosci* 21:2505-2512.2005).
- Volke V, Koks S, Vasar E, Bourin M, Bradwejn J, Mannisto PT (Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behaviour in an elevated plus-maze. *Neuroreport* 6:1413-1416.1995).
- Walker DL, Toufexis DJ, Davis M (Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur J Pharmacol* 463:199-216.2003).
- Walker P, Carrive P (Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery. *Neuroscience* 116:897-912.2003).
- Weller KL, Smith DA (Afferent connections to the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 232:255-270.1982).
- Wiley JL, Compton AD, Holcomb JD, McCallum SE, Varvel SA, Porter JH, Balster RL (Effects of modulation of NMDA neurotransmission on response rate and duration in a conflict procedure in rats. *Neuropharmacology* 37:1527-1534.1998).
- Willner P (Animal models of depression: an overview. *Pharmacol Ther* 45:425±455.1990).
- Wong EH, Sonders MS, Amara SG, Tinholt PM, Piercey MF, Hoffmann WP, Hyslop DK, Franklin S, Porsolt RD, Bonsignori A, Carfagna N, McArthur RA (Reboxetine: a pharmacologically potent, selective, and specific norepinephrine reuptake inhibitor. *Biol Psychiatry* 47:818-829.2000).
- Yancey SL, Overton JM (Cardiovascular responses to voluntary and treadmill exercise in rats. *J Appl Physiol* (1985) 75:1334-1340.1993).
- Zapata A, Capdevila JL, Tarrason G, Adan J, Martinez JM, Piulats J, Trullas R (Effects of NMDA-R1 antisense oligodeoxynucleotide administration: behavioral and radioligand binding studies. *Brain Res* 745:114-120.1997).

Zhang WN, Murphy CA, Feldon J (Behavioural and cardiovascular responses during latent inhibition of conditioned fear: measurement by telemetry and conditioned freezing. *Behav Brain Res* 154:199-209.2004).

APÉNDICE

Apêndice 1 – Valores basais de pressão arterial media (PAM) e frequência cardíaca (FC) de animais não condicionados e condicionados.

Grupo	n (animais)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Temperatura (°C)
Não condicionado				
Veículo	6	93 ± 2	344 ± 13	31,9 ± 1,3
L-prop 7,5 nmol	6	98 ± 3	349 ± 18	31,2 ± 0,9
L-prop 12,5 nmol	6	97 ± 4	387 ± 16	31,7 ± 1,1
		F _{2,12} = 0,8	F _{2,12} = 1,9	F _{2,12} = 0,1
Veículo	5	102 ± 5	360 ± 24	30,8 ± 2,3
Fento 10 nmol	7	109 ± 6	366 ± 18	31,5 ± 1,2
Fento 20 nmol	7	104 ± 2	357 ± 22	30,6 ± 0,6
		F _{2,12} = 0,5	F _{2,12} = 0,1	F _{2,12} = 0,1
Veículo	5	102 ± 5	360 ± 24	32 ± 0,6
L-prop 7,5 nmol + Fento 10 nmol	7	107 ± 6	359 ± 23	31,8 ± 0,8
		t = 0,7	t = 0,1	t = 0,2
Condicionado				
Veículo	8	94 ± 2	328 ± 9	31,1 ± 0,4
L-prop 7,5 nmol	8	110 ± 8	351 ± 7	31,8 ± 1,1
L-prop 12,5 nmol	8	105 ± 3	350 ± 10	30,5 ± 0,7
OUT	5	95 ± 2	318 ± 11	31,5 ± 0,9
		F _{3,18} = 2,8	F _{3,18} = 2,9	F _{3,18} = 0,5
Veículo	7	95 ± 2	324 ± 9	31,7 ± 1
Fento 10 nmol	8	102 ± 2	371 ± 15	32,1 ± 0,7
Fento 20 nmol	8	99 ± 3	348 ± 11	31 ± 1,1
OUT	4	96 ± 2	342 ± 10	31,5 ± 0,9
		F _{3,19} = 1,5	F _{3,19} = 2,5	F _{3,19} = 0,3
Veículo	7	98 ± 2	349 ± 6	32 ± 0,4
L-prop 7.5 nmol + Fento 10 nmol	8	99 ± 5	377 ± 9	31,6 ± 0,8
		t = 0,15	t = 2,6	t = 0,4
Veículo	6	96.1 ± 1	335.6 ± 13	30,3 ± 1,2
CGP 4,5 nmol	5	103.3 ± 7	342.6 ± 19	30,1 ± 1,4
ICI 34,5 nmol	7	86.8 ± 8	354.7 ± 10	31,1 ± 0,9
		F _{2,15} = 1,5	F _{2,15} = 0,4	F _{2,15} = 1,3
Veículo	5	101,2 ± 3,7	371,0 ± 22,5	29,5 ± 1,6
RX 2,3 nmol	5	94,9 ± 9,5	361,0 ± 8,5	30,8 ± 0,8
WB 1,7 nmol	6	99,2 ± 2,9	382,6 ± 7,9	30,3 ± 3,4
		F _{2,13} = 0,2	F _{2,13} = 0,6	F _{2,13} = 0,5
Veículo	5	99,5 ± 2,8	366,9 ± 18,7	31,1 ± 2,6
WB 1,7 nmol + CGP 4,5 nmol	6	106,2 ± 4,2	369,0 ± 21,3	30,4 ± 2,4
		t = 1,2	t = 0,1	t = 0,5

Os valores da tabela representam a média ± SEM, one-way ANOVA. CGP: CGP20712, FC: frequência cardíaca, L-prop: L-propranolol, ICI: ICI118,551, PAM: pressão arterial media, RX: RX821002, Fento: fentolamina, WB: WB4101.

Apêndice 2 – Valores basais de pressão arterial media (PAM) e frequência cardíaca (FC) de animais não condicionados e condicionados.

Grupo	n (animais)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Temperatura (°C)
Condicionado				
Veículo	10	101,5 ± 4,9	348 ± 19	30,4 ± 2,1
Reboxetina 0,5 nmol	6	102,5 ± 3,4	357 ± 16	30,5 ± 2,1
Reboxetina 1 nmol	6	102,1 ± 6,2	350 ± 10	32,0 ± 1,7
Reboxetina 2 nmol	7	101,4 ± 4,0	366 ± 17	30,0 ± 1,1
		F _{3,25} = 0,87	F _{3,25} = 1,84	F _{3,25} = 1,4
Veículo	6	102,2 ± 2	350 ± 12	30,9 ± 0,4
RBX 2 nmol	6	102,6 ± 4	360 ± 9,0	30,4 ± 0,7
CGP 4,5 nmol	6	102,9 ± 2	361 ± 18	31,3 ± 0,7
CGP 4,5 nmol+RBX 2nmol	6	102,6 ± 2	366 ± 15	30,9 ± 0,7
WB 1,7 nmol	5	102,5 ± 2	362 ± 20	30,4 ± 1,1
WB 1,7 nmol+RBX 2nmol	6	102,0 ± 2	353 ± 9,0	30,8 ± 0,4
		F _{5,29} = 0,1	F _{5,29} = 1,0	F _{5,29} = 1,3
Veículo	12	104 ± 4,3	366 ± 18	30,7 ± 1,1
Urocortina 0,001	9	103 ± 2,9	371 ± 14	32,0 ± 1,0
Urocortina 0,003	7	100 ± 4,6	364 ± 17	31,6 ± 1,4
Urocortina 0,01	9	104 ± 4,7	377 ± 07	31,3 ± 0,9
		F _{3,33} = 1,8	F _{3,33} = 1,2	F _{3,33} = 2,8
Veículo	7	103,3 ± 2,6	362 ± 22	31,6 ± 1,3
CP 2,7 nmol	6	101,1 ± 5,7	359 ± 19	31,3 ± 1,6
CP 4,5 nmol	5	104,5 ± 7,1	370 ± 11	32,0 ± 1,2
		F _{2,15} = 0,6	F _{2,15} = 0,5	F _{2,15} = 0,3
Veículo	8	101,5 ± 2,9	365 ± 13	31,4 ± 1,0
K41 0,5 nmol	8	103,5 ± 5,5	377 ± 15	32,2 ± 1,0
K41 1,0 nmol	8	101,0 ± 3	367 ± 15	31,3 ± 1,3
		F _{2,18} = 0,8	F _{2,18} = 1,4	F _{2,18} = 1,2
Veículo	7	103 ± 2	362 ± 16	31,0 ± 1,1
URO 0,01 nmol	9	102 ± 2	367 ± 9,0	32,7 ± 1,0
CP 2,7 nmol	5	100 ± 1	357 ± 6,0	32,5 ± 1,3
CP 4,5 nmol	5	102 ± 1	356 ± 10	31,9 ± 1,2
CP 2,7 nmol +URO 0,01nmol	8	102 ± 2	354 ± 10	31,2 ± 0,8
CP 4,5 nmol +URO 0,01nmol	6	103 ± 2	360 ± 11	31,3 ± 1,0
		F _{5,34} = 2,3	F _{5,34} = 1,4	F _{5,34} = 1,6
Veículo	5	100 ± 1	357 ± 7,0	31,4 ± 0,6
URO 0,01 nmol	6	102 ± 1	368 ± 10	32,0 ± 0,8
K41 1,0 nmol	5	102 ± 2	357 ± 6,0	31,7 ± 0,9
K41 1,0 nmol+URO 0,01nmol	5	100 ± 4	352 ± 13	31,2 ± 0,6
		F _{3,17} = 1,2	F _{3,17} = 3,1	F _{3,17} = 1,2
Veículo	7	100,7 ± 1	358 ± 14	31,1 ± 1,0
URO 0,01 nmol	7	101,8 ± 2	356 ± 19	31,7 ± 1,3
CGP 4,5 nmol	5	101,9 ± 1	366 ± 15	30,6 ± 0,7
CGP 4,5 nmol+URO 0,01 nmol	6	104,0 ± 3	361 ± 10	30,5 ± 1,2
WB 1,7 nmol	5	102,9 ± 2	358 ± 13	30,2 ± 0,9
WB 1,7 nmol+URO 0,01 nmol	6	102,0 ± 1	369 ± 8,7	31,0 ± 1,3
		F _{5,30} = 1,8	F _{5,30} = 0,8	F _{5,30} = 1,3

Grupo	n (animais)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Temperatura (°C)
Veículo	5	100,7 ± 2	352,6 ± 8,1	30,6 ± 1,2
RBX 2 nmol	5	101,1 ± 2	351,9 ± 9,9	30,6 ± 1,0
CP 2,7 nmol	5	102,1 ± 2	346,9 ± 6,5	31,5 ± 0,8
CP 2,7 nmol+RBX 2 nmol	7	99,3 ± 3	360,1 ± 19	31,8 ± 0,7
		F _{3,18} = 1,2	F _{3,18} = 1,1	F _{3,18} = 2,4
Veículo	7	101,9 ± 1,3	354,0 ± 12	31,3 ± 0,4
AP7 1,0 nmol	7	102,0 ± 1,5	367,4 ± 17	30,6 ± 1,1
AP7 0,1 nmol	5	100,5 ± 0,4	363,8 ± 8,9	31,4 ± 0,9
		F _{2,16} = 2,5	F _{2,16} = 1,8	F _{2,16} = 1,4
Veículo	6	101,5 ± 1,3	353,1 ± 13	31,8 ± 0,7
NPLA 0,04 nmol	6	101,7 ± 2,7	357,5 ± 9,7	32,4 ± 2,8
NPLA 0,4 nmol	5	100,8 ± 0,4	360,0 ± 15	32,6 ± 0,2
		F _{2,14} = 0,3	F _{2,14} = 0,4	F _{2,14} = 0,5
Veículo	5	101,8 ± 2	349,8 ± 7,5	30,8 ± 1,5
RBX 2 nmol	7	99,8 ± 2	354,0 ± 9,6	30,4 ± 0,7
AP7 1 nmol	6	99,9 ± 3	350,2 ± 10	31,4 ± 0,6
AP7 1 nmol+RBX 2 nmol	6	102,5 ± 2	360,4 ± 15	31,6 ± 0,8
		F _{3,20} = 1,8	F _{3,20} = 1,1	F _{3,20} = 2,2
Veículo	6	100,3 ± 1	352,5 ± 19	30,2 ± 1,5
RBX 2 nmol	5	101,2 ± 1	369,2 ± 19	29,7 ± 1,2
NPLA 0,4 nmol	5	102,5 ± 2	370,5 ± 13	30,8 ± 0,7
NPLA 0,4 nmol+RBX 2 nmol	5	102,1 ± 2	360,1 ± 17	31,2 ± 0,6
		F _{3,17} = 2,2	F _{3,17} = 1,3	F _{3,17} = 1,7
Veículo	7	102,4 ± 1	363,3 ± 16	31,0 ± 1,1
URO 0,01 nmol	7	102,0 ± 2	355,9 ± 9,2	32,0 ± 0,9
AP7 1 nmol	6	101,8 ± 3	360,8 ± 15	30,9 ± 0,4
AP7 1 nmol + URO 0,01 nmol	6	101,0 ± 2	354,2 ± 15	31,5 ± 1,5
		F _{3,22} = 0,3	F _{3,22} = 0,6	F _{3,22} = 1,5
Veículo	5	103,4 ± 2	362,4 ± 16	31,1 ± 1,2
URO 0,01 nmol	5	101,2 ± 2	366,7 ± 8,0	31,4 ± 0,4
NPLA 0,4 nmol	5	101,2 ± 1	375,5 ± 7,8	31,9 ± 1,2
NPLA 0,4 nmol+URO 0,01 nmol	6	101,9 ± 2	359,7 ± 17	30,3 ± 1,0
		F _{3,17} = 2,3	F _{3,17} = 1,4	F _{3,17} = 2,4

Os valores da tabela representam a média ± SEM, one-way ANOVA. CGP: CGP20712, FC: frequência cardíaca, L-prop: L-propranolol, ICI: ICI118,551, PAM: pressão arterial média, RX: RX821002, Fento: fentolamina, WB: WB4101.

RESEARCH PAPER

Both α_1 - and β_1 -adrenoceptors in the bed nucleus of the stria terminalis are involved in the expression of conditioned contextual fear

Sara C Hott^{1*}, Felipe V Gomes^{1*}, Denise RS Fabri¹, Daniel G Reis¹, Carlos C Crestani², Fernando MA Côrrea¹ and Leonardo BM Resstel¹

¹Department of Pharmacology, School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, and ²Department of Natural Active Principles and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil

Correspondence

Dr Leonardo BM Resstel,
Department of Pharmacology,
School of Medicine, University of
São Paulo, Bandeirantes Avenue
3900, Ribeirão Preto, São Paulo
14049-900, Brazil. E-mail:
leoresstel@yahoo.com.br

*These authors contributed
equally to this work.

Keywords

noradrenergic system;
adrenoceptor antagonists;
autonomic responses;
cardiovascular system;
conditioned emotional responses

Received

24 August 2011

Revised

16 March 2012

Accepted

1 April 2012

BACKGROUND AND PURPOSE

The bed nucleus of the stria terminalis (BNST) is a limbic structure that is involved in the expression of conditioned contextual fear. Among the numerous neural inputs to the BNST, noradrenergic synaptic terminals are prominent and some evidence suggests an activation of this noradrenergic neurotransmission in the BNST during aversive situations. Here, we have investigated the involvement of the BNST noradrenergic system in the modulation of behavioural and autonomic responses induced by conditioned contextual fear in rats.

EXPERIMENTAL APPROACH

Male Wistar rats with cannulae bilaterally implanted into the BNST were submitted to a 10 min conditioning session (6 footshocks, 1.5 ma/ 3 s). Twenty-four hours later freezing and autonomic responses (mean arterial pressure, heart rate and cutaneous temperature) to the conditioning box were measured for 10 min. The adrenoceptor antagonists were administered 10 min before the re-exposure to the aversive context.

KEY RESULTS

L-propranolol, a non-selective β -adrenoceptor antagonist, and phentolamine, a non-selective α -adrenoceptor antagonist, reduced both freezing and autonomic responses induced by aversive context. Similar results were observed with CGP20712, a selective β_1 -adrenoceptor antagonist, and WB4101, a selective α_1 -antagonist, but not with ICI118,551, a selective β_2 -adrenoceptor antagonist or RX821002, a selective α_2 -antagonist.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

These findings support the idea that noradrenergic neurotransmission in the BNST via α_1 - and β_1 -adrenoceptors is involved in the expression of conditioned contextual fear.

Abbreviations

ACTH, adrenocorticotrophic hormone; BNST, bed nucleus of the stria terminalis; CeA, central nucleus of the amygdala; CER, conditioned emotional responses; CVLM, caudal ventrolateral medulla; HPA, hypothalamo–pituitary–adrenal axis; HR, heart rate; MAP, mean arterial pressure; NTS, nucleus of the solitary tract

Introduction

The bed nucleus of the stria terminalis (BNST) is a highly heterogeneous and complex limbic structure that is associated with autonomic, neuroendocrine and behavioural functions (Dunn, 1987; Casada and Dafny, 1991; Dunn and Williams, 1995). It has reciprocal connections with the medial and central nuclei of the amygdala (Dong *et al.*, 2001a). Moreover, the BNST receives projections from the hippocampus, the basolateral complex of amygdala and the medial prefrontal cortex (Dong *et al.*, 2001b; Vertes, 2006) and sends projections to the hypothalamus and brainstem areas (Herman *et al.*, 1994; Alheid, 2003), supporting the idea of its regulatory role for defensive responses.

Several studies have shown that the BNST is critically involved in the expression of anxiety-like responses (Walker *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2010), including conditioned emotional responses (CER) and cardiovascular responses to aversive situations (Resstel *et al.*, 2008; Crestani *et al.*, 2009). In terms of the CER, re-exposure to aversively conditioned context induced in the BNST an increase in the expression of the Fos-protein, a marker for neuronal activation (Beck and Fibiger, 1995). Moreover, lesion of the BNST mitigates the conditioned responses observed in the conditioned contextual fear model (Sullivan *et al.*, 2004). Furthermore, our group reported that reversible inactivation of the BNST neurotransmission using cobalt chloride (CoCl₂), a non-selective synaptic blocker, attenuated both cardiovascular and behavioural responses induced by conditioned contextual fear (Resstel *et al.*, 2008). However, the neurotransmitters involved in these responses are not yet entirely known.

The BNST is considered a major target for noradrenergic innervation in the brain (Swanson and Hartman, 1975; Moore, 1978). Neuroanatomical studies showed that most of the noradrenergic fibre input to BNST arises from the A1 and A2 medullary cell groups crossing through the ventral noradrenergic bundle (Aston-Jones *et al.*, 1999; Delfs *et al.*, 2000). Several stressful stimuli are known to activate central noradrenergic neurons (Morilak *et al.*, 2005). In this context, evidence points to an important role of the BNST noradrenergic signalling in the modulation of aversive responses (Forray and Gysling, 2004). In fact, noradrenaline release in the BNST is increased under aversive situations (Pacak *et al.*, 1995; Fuentealba *et al.*, 2000; Cecchi *et al.*, 2002; Fendt *et al.*, 2005). In addition, the exposure to the conditioned fear paradigm increased the activity of noradrenergic projections to the BNST and noradrenaline depletion in this structure prevented neuroendocrine and behavioural responses induced by fear stimuli (Onaka and Yagi, 1998).

Finally, although these data show that the BNST was involved in the expression of the CERs and that BNST noradrenergic system was involved in the modulation of aversive responses, which adrenoceptors could be involved in CERs has not been investigated yet. Hence, the objective of this study was to test the hypothesis that noradrenergic neurotransmission in the BNST is involved in the modulation of autonomic and behavioural responses induced by conditioned contextual fear, and to evaluate the participation of α - and β -adrenoceptors in these responses.

Methods

Animals

All animal care and experimental procedures conformed to the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior guidelines for the care and use of laboratory animals, which are in compliance with UK animal regulation, and were approved by the Institution's Animal Ethics Committee (process number: 119/2010). The experiments were performed using male Wistar rats weighing 230–270 g (total of 164 animals). Animals were kept in the Animal Care Unit of the Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Rats were housed individually 3 days before experimental manipulations (habituation, conditioning and testing) in plastic cages with free access to food and water under a 12 h light/dark cycle (lights on at 06:30 h). All experimental protocols are reported in accordance with the ARRIVE guidelines for reporting experiments involving animals (McGrath *et al.*, 2010).

Stereotaxic surgery

Seven days before the experiment, the rats were anaesthetized with 2,2,2-tribromoethanol (250 mg·kg⁻¹ i.p.; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and fixed in a stereotaxic frame (Stoelting, Kiel, WI, USA). After scalp anaesthesia with 2% lidocaine, the skull was surgically exposed, and stainless steel guide cannulae (26G) were implanted bilaterally into the BNST (anteroposterior = +8.6 mm from interaural; lateral = +4.0 mm from the medial suture, vertical = -5.5 mm from the skull with a lateral inclination of 23°) (Paxinos and Watson, 1997). Cannulae were fixed to the skull with dental cement and a metal screw. An obturator inside the guide cannulae prevented obstruction. After surgery, the animals received a polyantibiotic (0.27 g·kg⁻¹ i.m.; Pentabiotico®, Fort Dodge, Campinas, Brazil) to prevent infection and a non-steroidal anti-inflammatory agent (0.025 g·kg⁻¹ s.c.; Banamine®, Schering Plough, Rio de Janeiro, Brazil) for post-operative analgesia.

Fear conditioning and testing

Habituation, conditioning and testing were carried out in 23 × 20 × 21 cm footshock chambers. The chambers had a grid floor composed of 18 stainless steel rods (2 mm in diameter), spaced 1.5 cm apart and wired to a shock generator (Insight, Ribeirão Preto, Brazil). They were cleaned with 70% ethanol before and after use. Habituation session started 7 days after the stereotaxic surgery and consisted of one 10 min-long pre-exposure to the footshock chamber. No shock was given during the pre-exposure. In the conditioning shock session, performed 4 h after the habituation session, animals were divided into two experimental groups: non-conditioned and conditioned. The non-conditioned group was exposed to the footshock chamber for 10 min, but no shock was delivered. The conditioned group was subjected to a shock session consisting of six electrical 1.5 mA/3 s footshocks delivered at pseudorandom intervals (ranging from 20 to 60 s) (Resstel *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2012). The animals were allowed to explore the chamber prior to shock delivery for 2 min. Twenty-four hours after the conditioning session, the rats were anaesthetized with 2,2,2-tribromoethanol (250 mg·kg⁻¹ i.p.), and a catheter (a 4 cm PE-10 segment heat-bound to a 13 cm PE-50 segment, Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) was

implanted into the femoral artery for blood pressure and heart rate recording. The catheters were tunnelled under the skin and exteriorized on the animal's dorsum.

Autonomic and behavioural responses evoked by re-exposure to aversively conditioned context were evaluated 48 h after conditioning. The test session consisted of a 10 min-long re-exposure to the footshock chamber without shock delivery. Animals were transferred from the animal room to the procedure room in their home cage. Cardiovascular recordings were initiated after a 60 min room adaptation period. Because animals can associate environmental cues with conditioning (Frank *et al.*, 2004), testing was performed in a different room from that used during the conditioning procedure. Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were recorded using an HP-7754A amplifier (Hewlett Packard, Chicago, IL, USA) connected to a signal acquisition board (Biopac M-100, Goleta, CA, USA) and computer processed. Rats were tested one at a time. Five minutes after the BNST local microinjection, 5 min of baseline recording were recorded before animals were placed in the centre of the footshock chamber to record conditioned cardiovascular and behavioural responses that are evoked when animals are re-exposed to the context. Additionally, variations in the cutaneous temperature were also recorded. The cutaneous temperature of the tail was recorded with a thermal camera (Multi-Purpose Thermal Imager IRI 4010, InfraRed Integrated Systems Ltd. Northampton, UK) at a distance of 50 cm every minute for 5 min period before the beginning of the experiment and during the 10 min of exposure to the aversive context. The testing was conducted in a room kept at $26 \pm 1^\circ\text{C}$, which is the thermoneutral zone for rats (Gordon, 1990).

Behavioural responses (freezing) were evaluated during the test by an experimenter who was unaware of the experimental groups, sitting 45 cm away from the footshock chamber. Freezing was defined as the complete absence of movement, except that of the flanks related to respiration, while the animal assumed a characteristic tense posture (Fanselow, 1980).

Drugs

The following drugs were used: L-propranolol (a non-selective β -adrenoceptor antagonist; Sigma-Aldrich), phentolamine (a non-selective α -adrenoceptor antagonist; Sigma-Aldrich), WB4101 (a selective α_1 -adrenoceptor antagonist; Tocris Bristol, UK), RX821002 (a selective α_2 -adrenoceptor antagonist; Tocris), CGP20712 (a selective β_1 -adrenoceptor antagonist; Tocris) and ICI118,551 (a selective β_2 -adrenoceptor antagonist; Tocris); receptor nomenclature follows Alexander *et al.*, (2011). All drugs were dissolved in sterile saline (vehicle). The solutions were prepared immediately before the tests and protected from the light during the experimental sessions.

Intra-BNST injection

Intra-BNST injections were performed with a thin dental needle (30 G, 0.3 mm OD; Terumo Dental Needle®, São Paulo, Brazil) introduced through the guide cannula until its tip was 1 mm below the cannula end, connected to a 2 μL syringe (7001 KH, Hamilton Co., Reno, NV, USA) through a PE-10 tubing. The needles were carefully inserted into the guide cannulae, and a volume of 100 nL was injected over a 30 s

period with a rate of 200 nL·min⁻¹ with the help of an infusion pump (Kd Scientific Inc., Holliston, MA, USA). In order to prevent reflux, the needles were left in place for a 30–45 s period after the end of each injection.

Experimental protocols

Experiment 1: Involvement of BNST adrenoceptors in the expression of conditioned contextual fear.

In independent experiments, non-conditioned and conditioned animals received bilateral injections of L-propranolol (7.5 or 12.5 nmol) or phentolamine (10 or 20 nmol) into the BNST before re-exposure to the conditioning chamber. Additionally, we also investigated if the combination of L-propranolol (7.5 nmol) and phentolamine (10 nmol) would potentiate the effect of the drugs alone in conditioned animals. For this experiment, the animals received intra-BNST injections of L-propranolol followed 5 min later by an injection of phentolamine, or vice versa. The doses were based on previous results from the literature (Crestani *et al.*, 2008a; Zhou *et al.*, 2010).

Experiment 2: Effects of the selective β_1 -adrenoceptor antagonist CGP20712 and the selective β_2 -adrenoceptor antagonist ICI118,551 injected into the BNST on conditioned contextual fear.

Based on the results obtained in the experiment 1, we performed this experiment to investigate the participation of BNST β_1 - and β_2 -adrenoceptors on expression of conditioned contextual fear. Conditioned animals received bilateral injections of vehicle, the β_1 -adrenoceptor antagonist CGP20712 (4.5 nmol) or the β_2 -adrenoceptor antagonist ICI118,551 (34.5 nmol) into the BNST before re-exposure to the conditioning chamber. Drugs doses were chosen based on the ratio of K_i values for L-propranolol (based on the dose of 7.5 nmol) to β_1 - and β_2 -adrenoceptors ($K_i = 1$ nM, both β -adrenoceptors), CGP20712 to the β_1 -adrenoceptors ($K_i = 0.6$ nM) and ICI118,551 to the β_2 -adrenoceptors ($K_i = 4.6$ nM) (Bylund *et al.*, 1994). Therefore, each one of the selective antagonists produced a similar, but selective, blockade of β -adrenoceptors, as did L-propranolol.

Experiment 3: Effects of the selective α_1 -adrenoceptor antagonist WB4101 and the selective α_2 -adrenoceptor antagonist RX821002 injected into the BNST on conditioned contextual fear.

Based on the results obtained in the experiment 1, we performed this experiment to investigate the participation of BNST α_1 - and α_2 -adrenoceptors on the expression of conditioned contextual fear. Conditioned animals received bilateral injections of vehicle, α_1 -adrenoceptor antagonist WB4101 (1.7 nmol) or α_2 -adrenoceptor antagonist RX821002 (2.3 nmol) into the BNST before re-exposure to the conditioning chamber. Drug doses were chosen based on the ratio of K_i values for phentolamine (based on the dose of 10 nmol) to α_1 ($K_i = 3.6$ nM) and α_2 -adrenoceptors ($K_i = 4.4$ nM), WB4101 to the α_1 -adrenoceptors ($K_i = 0.6$ nM) and RX821002 to the α_2 -adrenoceptors ($K_i = 1$ nM) (Bylund *et al.*, 1994; Miralles *et al.*, 1993). Therefore, each one of the selective antagonists produced a similar, but selective, blockade of α -adrenoceptors, as did phentolamine.

Experiment 4: Effects of a combination of the CGP20712 and WB4101 injected into the BNST on conditioned contextual fear.

Figure 1

Representative photomicrograph of a coronal brain section from a rat showing bilateral microinjection sites in the BNST, and diagrammatic representation based on the rat brain atlas of Paxinos and Watson (1997), indicating the injection sites into and outside the BNST of all the animals used in the experiments. IA, interaural coordinate; ac, anterior commissure; cc, corpus callosum; f, fornix; ic, internal capsule; LV, lateral ventricle; LSV, lateral septal ventral; st, stria terminalis.

Based on the results obtained in experiments 2 and 3, we performed this experiment to investigate if the combination of CGP20712 and WB4101 would potentiate the effect of the drugs alone. The animals were divided into two groups: vehicle or CGP20712 + WB4101. The latter received intra-BNST injections of CGP20712 followed 5 min later by a second injection of WB4101, or vice versa. Five minutes after the last injection, the animals were placed in the centre of the footshock chamber.

Histological determination of the injection sites

At the end of the experiments, the rats were anaesthetized with urethane (1.25 g·kg⁻¹ i.p., Sigma-Aldrich) and 200 nL of 1% Evan's Blue dye was bilaterally injected into the BNST as an injection site marker. The chest was surgically opened, the descending aorta was occluded, the right atrium was severed and the brain was perfused with 10% formalin through the left ventricle. Brains were post-fixed for 24 h at 4°C, and 40 µm sections were cut using a cryostat (CM-1900, Leica, Wetzlar, Germany). Serial brain sections were stained with 1% Neutral Red, and injection sites were determined using the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1997) as reference. As histological control, the animals subjected to the conditioned contextual fear that received L-propranolol (7.5 nmol) or phentolamine (10 nmol) outside the BNST were joined together in an additional group ('OUT').

Statistical analysis

Freezing was represented as percentage of the test period. Freezing was expressed as mean ± SEM and analysed using a two-way ANOVA with condition (conditioned or non-conditioned rats) and treatment as the two factors in the experiment 1; using one-way ANOVA for the analysis of experiments 2 and 3 and Student's *t*-test for the experiment 4. Animals that received L-propranolol (7.5 nmol) or phentolamine (10 nmol) outside the BNST were compared with vehicle non-conditioned or conditioned groups using Student's *t*-test.

MAP, HR and cutaneous temperature values were continuously recorded during the 5 min period prior and the 10 min

period after the exposure to the footshock chamber. Data were expressed as mean ± SEM of MAP, HR or cutaneous temperature changes (respectively, Δ MAP, Δ HR and Δ Temperature) sampled at 1 min intervals. Points sampled during the 5 min prior to the exposure were used as control baseline values. The baseline values of MAP, HR and cutaneous temperature of the animals recorded before chamber re-exposure were compared by one-way ANOVA. In experiment 1, MAP, HR and cutaneous temperature changes were analysed separately to non-conditioned and conditioned groups using a two-way ANOVA, with treatment as the main independent factor and time as a repeated measurement. Additionally, two-way ANOVA was performed to compare these changes between non-conditioned and conditioned vehicle-treated animals. In experiments 2–4, the MAP, HR and cutaneous temperature changes were analysed using a two-way ANOVA, with treatment as the main independent factor and time as a repeated measurement. The results of experiments with the combination of either L-propranolol + phentolamine or CGP20712 + WB4101 were compared with the effect of isolated treatments on the freezing using Student's *t*-test and a two-way ANOVA to compare MAP, HR or cutaneous temperature changes, with treatment as the main independent factors and time as a repeated measurement. Results of statistical tests with *P* < 0.05 were considered significant.

Results

Diagrammatic representations showing BNST injection sites and a representative photomicrograph are presented in Figure 1.

Experiment 1: Involvement of BNST adrenoceptors in the expression of conditioned contextual fear

L-propranolol. Rats in the conditioned vehicle-treated group (*n* = 8) spent more time in freezing during the re-exposure to aversive context (condition factor: $F_{1,36} = 66.1$, *P* < 0.001, two-way ANOVA) when compared with non-conditioned

Figure 2

Effects of bilateral injection of saline (Veh) or L-propranolol (L-prop; 7.5 and 12.5 nmol) in non-conditioned ($n = 6$ per group) and conditioned animals ($n = 8$ per group) on the percentage of time spent in freezing behaviour. Values from rats with L-propranolol (7.5 nmol) injections outside the BNST were combined in an additional group ($n = 5$; OUT). Data shown are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ compared with vehicle non-conditioned group. # $P < 0.05$ compared with vehicle conditioning group, Bonferroni's *post hoc* test, except the 'OUT' group that was compared with vehicle non-conditioned or conditioned groups by Student's *t*-test.

groups ($n = 6$ per group; Figure 2). Moreover, there were significant effects of treatment ($F_{2,36} = 8.5$, $P < 0.001$, two-way ANOVA) and interaction ($F_{2,36} = 8.4$, $P < 0.001$, two-way ANOVA). L-propranolol (7.5 and 12.5 nmol, $n = 8$ per group) injections significantly reduced freezing of conditioned animals ($F_{2,21} = 13.3$, $P < 0.001$, one-way ANOVA) as compared with vehicle-treated conditioned animals (Figure 2). L-propranolol injection into the BNST of non-conditioned animals did not affect freezing behaviour ($F_{2,15} = 0.2$, $P > 0.05$, one-way ANOVA; Figure 2).

In terms of the autonomic responses, no differences were observed on baseline values of MAP, HR and cutaneous temperature among the groups recorded immediately before re-exposure to the chamber (Table 1). The analyses of the cardiovascular responses showed that re-exposure to a context previously paired with footshock induced a marked and sustained increase in both HR and MAP (time factor: MAP: $F_{14,315} = 22.1$, $P < 0.001$ and HR: $F_{14,315} = 26.6$, $P < 0.001$, two-way ANOVA; Figure 3). In the non-conditioned vehicle-treated group, re-exposure to the context increased both HR and MAP. However, these increases were significantly lower than those observed in the conditioned vehicle-treated group (MAP: $F_{1,180} = 79.2$, $P < 0.001$ and HR: $F_{1,180} = 83.9$, $P < 0.001$, two-way ANOVA). Similar to its effect on behavioural responses, L-propranolol (7.5 and 12.5 nmol) attenuated the MAP and HR increases in conditioned groups (treatment factor: MAP: $F_{2,315} = 56.5$, $P < 0.001$ and HR: $F_{2,315} = 80.6$, $P < 0.001$, two-way ANOVA) but had no effect on non-conditioned animals (treatment factor: MAP: $F_{2,225} = 1.6$, $P > 0.05$ and HR: $F_{2,225} = 1.9$, $P > 0.05$, two-way ANOVA; Figure 3). Regarding the cutaneous temperature, it was observed that the re-exposure to the aversive context induced a decrease in the cutaneous temperature (time factor: $F_{14,315} = 29.3$, $P < 0.001$, two-way ANOVA; Figure 3). In the non-conditioned vehicle-treated

group, re-exposure to the context decreased the cutaneous temperature. However, this decrease was significantly lower than that observed in the conditioned vehicle-treated group ($F_{1,180} = 37.3$, $P < 0.001$, two-way ANOVA). L-propranolol (7.5 and 12.5 nmol) attenuated cutaneous temperature decreases in conditioned groups (treatment factor: $F_{2,315} = 104.7$, $P < 0.001$, two-way ANOVA) but had no effect on non-conditioned animals (treatment factor: $F_{2,225} = 1.1$, $P > 0.05$, two-way ANOVA; Figure 3).

Phentolamine. Animals in the conditioned vehicle-treated group ($n = 7$) spent more time freezing during the re-exposure to the aversive context (conditioned factor: $F_{1,36} = 65.4$, $P < 0.001$, two-way ANOVA) when compared with those from the non-conditioned group ($n = 5$ – 7 per group; Figure 4). Moreover, there were significant effects of treatment ($F_{2,36} = 11.8$, $P < 0.01$, two-way ANOVA) and interaction ($F_{2,36} = 7.4$, $P < 0.01$, two-way ANOVA). Phentolamine (10 and 20 nmol; $n = 8$ per group) injections significantly reduced the freezing of conditioned animals ($F_{2,20} = 14.6$, $P < 0.01$, one-way ANOVA) when compared with vehicle-treated conditioned animals (Figure 4). In non-conditioned animals, the injection of phentolamine did not produce any effect on the freezing behaviour ($F_{2,16} = 0.7$, $P > 0.05$, one-way ANOVA; Figure 4). Regarding the autonomic responses to fear conditioning, phentolamine did not affect baseline values of MAP, HR or cutaneous temperature (Table 1). In the non-conditioned vehicle-treated group, re-exposure to the context increased both HR and MAP. However, these increases were significantly lower than those observed in the conditioned vehicle-treated group (MAP: $F_{1,165} = 136.1$, $P < 0.001$ and HR: $F_{1,165} = 145.7$, $P < 0.001$, two-way ANOVA). Phentolamine (10 and 20 nmol) attenuated the cardiovascular responses observed during the re-exposure to the aversive context (treatment factor: MAP: $F_{2,315} = 36.9$, $P < 0.001$ and HR: $F_{2,315} = 90.1$, $P < 0.001$, two-way ANOVA), but no effect was observed in non-conditioned animals (treatment factor: MAP: $F_{2,240} = 2.3$, $P > 0.05$ and HR: $F_{2,240} = 1.1$, $P > 0.05$, two-way ANOVA; Figure 5). Moreover, re-exposure to aversive context induced a decrease in the cutaneous temperature (time factor: $F_{14,315} = 65.5$, $P < 0.001$, two-way ANOVA; Figure 5). In the non-conditioned vehicle-treated group, re-exposure to the context decreased the cutaneous temperature. However, this decrease was significantly lower than that observed in the conditioned vehicle-treated group ($F_{1,165} = 71.7$, $P < 0.001$, two-way ANOVA). Phentolamine (10 and 20 nmol) attenuated cutaneous temperature decreases in conditioned groups (treatment factor: $F_{2,315} = 64.9$, $P < 0.001$, two-way ANOVA), but had no effect on non-conditioned animals (treatment factor: $F_{2,240} = 2.5$, $P > 0.05$, two-way ANOVA; Figure 5).

Additionally, the injection of L-propranolol or phentolamine into structures surrounding the BNST was unable to prevent freezing (Figures 2 and 4) and autonomic changes (data not shown) induced in conditioned animals by aversive re-exposure to the context.

L-propranolol + phentolamine. Animals in the conditioned vehicle-treated group ($n = 6$) spent more time freezing during the re-exposure to the aversive context (condition factor: $F_{1,19} = 48.0$, $P < 0.001$, two-way ANOVA) when compared with those in the non-conditioned group ($n = 5$ – 6 per group;

Table 1

Basal values of MAP and HR of non-conditioned and conditioned animals after treatment with adrenoceptor antagonists or vehicle

Group	N (animals)	MAP (mmHg)	HR (bpm)	Temperature (°C)
Non-conditioned				
Vehicle	6	93 ± 2	344 ± 13	31.9 ± 1.3
L-prop, 7.5 nmol	6	98 ± 3	349 ± 18	31.2 ± 0.9
L-prop, 12.5 nmol	6	97 ± 4	387 ± 16	31.7 ± 1.1
		$F_{2,12} = 0.8$	$F_{2,12} = 1.9$	$F_{2,17} = 0.1$
Vehicle	5	102 ± 5	360 ± 24	30.8 ± 2.3
Phento, 10 nmol	7	109 ± 6	366 ± 18	31.5 ± 1.2
Phento, 20 nmol	7	104 ± 2	357 ± 22	30.6 ± 0.6
		$F_{2,12} = 0.5$	$F_{2,12} = 0.03$	$F_{2,18} = 0.13$
Vehicle	5	102 ± 5	360 ± 24	32 ± 0.6
L-prop, 7.5 nmol + Phento, 10 nmol	7	107 ± 6	359 ± 23	31.8 ± 0.8
		$t = 0.67$	$t = 0.05$	$t = 0.18$
Conditioned				
Vehicle	8	94 ± 2	328 ± 9	31.1 ± 0.4
L-prop, 7.5 nmol	8	110 ± 8	351 ± 7	31.8 ± 1.1
L-prop, 12.5 nmol	8	105 ± 3	350 ± 10	30.5 ± 0.7
OUT	5	95 ± 2	318 ± 11	31.5 ± 0.9
		$F_{3,18} = 2.8$	$F_{3,18} = 2.9$	$F_{3,27} = 0.5$
Vehicle	7	95 ± 2	324 ± 9	31.7 ± 1
Phento, 10 nmol	8	102 ± 2	371 ± 15	32.1 ± 0.7
Phento, 20 nmol	8	99 ± 3	348 ± 11	31 ± 1.1
OUT	4	96 ± 2	342 ± 10	31.5 ± 0.9
		$F_{3,19} = 1.5$	$F_{3,19} = 2.5$	$F_{3,26} = 0.25$
Vehicle	7	98 ± 2	349 ± 6	32 ± 0.4
L-prop, 7.5 nmol + Phento, 10 nmol	8	99 ± 5	377 ± 9	31.6 ± 0.8
		$t = 0.15$	$t = 2.6$	$t = 0.42$

The values in the table represent the means ± SEM. No significant difference in the values within each group was observed; one-way ANOVA. L-prop, L-propranolol; Phento, phentolamine.

Figure 6). Moreover, there were significant effects of treatment ($F_{1,19} = 49.4$, $P < 0.001$, two-way ANOVA) and interaction ($F_{1,19} = 37.2$, $P < 0.001$, two-way ANOVA). The combination of phentolamine (10 nmol) and L-propranolol (7.5 nmol) significantly reduced the freezing ($n = 6$, $t = 4.4$, $P < 0.01$) when compared with vehicle-treated conditioned animals (Figure 6). Moreover, this treatment potentiated the attenuation of freezing when compared with isolated treatments (L-propranolol: $t = 2.3$, $P < 0.05$ and phentolamine: $t = 2.9$, $P < 0.05$). In non-conditioned animals, the combination of phentolamine and L-propranolol did not produce any effect on the freezing behaviour ($t = 0.8$, $P > 0.05$; Figure 6).

There were no differences among the groups in baseline values of MAP, HR or cutaneous temperature (Table 1). Similarly to behavioural responses, the combination of phentolamine and L-propranolol attenuated autonomic changes in conditioned groups (treatment factor: MAP: $F_{1,150} = 105.5$, $P < 0.001$; HR: $F_{1,150} = 101.8$, $P < 0.001$, cutaneous temperature: $F_{1,150} = 44.1$, $P < 0.001$, two-way ANOVA; Figure 7).

Moreover, the attenuation of autonomic responses evoked by the combination of both drugs was more effective than that observed with isolated treatments with L-propranolol or phentolamine, except for the potentiated attenuation of the cutaneous temperature induced by the combination when compared with the effect of phentolamine alone (L-prop: MAP: $F_{1,180} = 0.4$, $P > 0.05$, HR: $F_{1,180} = 0.9$, $P > 0.05$, cutaneous temperature: $F_{1,165} = 1.2$, $P > 0.05$; Phento: MAP: $F_{1,180} = 0.2$, $P > 0.05$ and HR: $F_{1,180} = 1.7$, $P > 0.05$, cutaneous temperature: $F_{1,165} = 8.7$, $P > 0.05$).

Experiment 2: Effects of the selective β_1 -adrenoceptor antagonist CGP20712 and the selective β_2 -adrenoceptor antagonist ICI118,551 injected into the BNST on conditioned contextual fear

Injection of CGP20712 ($n = 5$) into the BNST significantly reduced the freezing of conditioned animals ($F_{2,15} = 18.3$, $P < 0.001$; Bonferroni test, $P < 0.05$) compared with

Figure 3

Time course of the bilateral injection of saline (Veh) or L-propranolol (L-prop; 7.5 and 12.5 nmol) into the BNST on mean arterial pressure (Δ MAP) and heart rate (Δ HR) increases and cutaneous temperature (Δ Temperature) decrease in non-conditioned ($n = 6$ per group) and conditioned animals ($n = 8$ per group). Data shown are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ over the whole footshock chamber exposure period compared with vehicle-treated animals, Bonferroni's *post hoc* test.

Figure 4

Effects of bilateral injection of saline (Veh) or phentolamine (Phento; 10 and 20 nmol) in non-conditioned ($n = 5$ – 7 per group) and conditioned animals ($n = 8$ per group) on the percentage of time spent in freezing behaviour. Values from rats with phentolamine (10 nmol) injections outside the BNST were combined in an additional group ($n = 4$; OUT). Data shown are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ compared with vehicle non-conditioned group. # $P < 0.05$ compared with vehicle conditioning group, Bonferroni's *post hoc* test, except the 'OUT' group that was compared with vehicle non-conditioned or conditioned groups by Student's *t*-test.

vehicle-treated conditioned animals ($n = 6$; Figure 8). No effect was observed after ICI118,551 ($n = 7$; Bonferroni test, $P > 0.05$). Concerning autonomic changes, the injection of either CGP20712 or ICI118,551 into the BNST did not affect baseline values of MAP, HR and cutaneous temperature (data not shown). Re-exposure to the context previously paired with footshock induced a sharp and sustained drop in the tail temperature during the test (time factor: $F_{14,225} = 31.4$, $P < 0.001$, two-way ANOVA). There was a significant reduction in autonomic responses evoked after treatment with CGP20712 (treatment factor: MAP: $F_{2,225} = 106.3$, $P < 0.001$; HR: $F_{2,225} = 37.6$, $P < 0.001$; cutaneous temperature: $F_{2,225} = 61.3$, $P < 0.001$, two-way ANOVA) during re-exposure to the conditioning box (Figure 8). However, ICI118,551 did not affect autonomic responses during re-exposure to aversive context ($P > 0.05$ for all parameters; Figure 8).

Experiment 3: Effects of the selective α_1 -adrenoceptor antagonist WB4101 and the selective α_2 -adrenoceptor antagonist RX821002 injected into the BNST on conditioned contextual fear

Injection of WB4101 ($n = 5$) into the BNST significantly reduced the freezing of conditioned animals ($F_{2,12} = 18.4$, $P < 0.001$, one-way ANOVA) compared with vehicle-treated conditioned animals ($n = 5$; Figure 8). No effect was observed after RX821002 ($n = 6$, $P > 0.05$). Injection of either WB4101 or RX821002 into the BNST did not affect baseline values of MAP, HR and cutaneous temperature (data not shown). Re-exposure to the context previously paired with the footshock induced a marked drop in the cutaneous temperature, which lasted for the entire duration of the test (time factor: $F_{14,210} = 12.1$, $P < 0.001$, two-way ANOVA). Analysis of the autonomic responses

during the re-exposure to the conditioning box showed significant decreases after the treatment with WB4101 (treatment factor: MAP: $F_{2,210} = 28.7$, $P < 0.001$; HR: $F_{2,210} = 27.9$, $P < 0.001$; cutaneous temperature: $F_{2,210} = 10.7$, $P < 0.001$, two-way ANOVA). RX821002 was unable to attenuate autonomic changes observed during the re-exposure to the aversive context ($P > 0.05$ for all parameters; Figure 8).

Experiment 4: Effects of a combination of the CGP20712 and WB4101 injected into the BNST on conditioned contextual fear

The combination of CGP20712 + WB4101 into the BNST significantly reduced the freezing of conditioned animals ($n = 6$, $t = 7.8$, $P < 0.001$) when compared with vehicle-treated conditioned animals ($n = 6$; Figure 8). However, there was no difference when compared with individual treatments (CGP20712: $t = 0.2$, $P > 0.05$ and WB4101: $t = 0.6$, $P > 0.05$). As observed with the behavioural responses, the combination of the CGP20712 and WB4101 attenuated the changes in MAP, HR and cutaneous temperature observed during re-exposure to the aversive context (treatment factor: MAP: $F_{1,135} = 45.9$, $P < 0.001$; HR: $F_{1,135} = 73.5$, $P < 0.001$; cutaneous temperature: $F_{1,135} = 22.6$, $P < 0.001$; two-way ANOVA; Figure 8). Moreover, HR and cutaneous temperature results after the combination were significantly different when compared with those of the injection of CGP20712 or WB4101 alone (CGP20712–MAP: $F_{1,135} = 1.8$, $P > 0.05$; HR: $F_{1,135} = 4.6$, $P < 0.05$; cutaneous temperature: $F_{1,135} = 2.3$, $P < 0.05$ and WB4101–MAP: $F_{1,135} = 1.6$, $P > 0.05$; HR: $F_{1,135} = 31.6$, $P < 0.001$; cutaneous temperature: $F_{1,135} = 26.9$, $P < 0.001$).

Discussion

The present study investigated the involvement of the noradrenergic neurotransmission in the BNST in the expression of behavioural and autonomic responses induced by conditioned contextual fear. We observed that intra-BNST injection of non-selective α - or β -adrenoceptor antagonists attenuated freezing and autonomic responses induced by aversive context. Our results also showed that α_1 - and β_1 -adrenoceptors were specifically involved in these responses. These results extend previous findings suggesting the involvement of the BNST in the contextual fear paradigm (Sullivan *et al.*, 2004; Resstel *et al.*, 2008); and, to our knowledge, this study is the first to provide evidence on the role of α_1 - and β_1 -adrenoceptors within the BNST in the expression of conditioned contextual fear.

Conditioned fear to context is evoked when re-exposing the animal to a context that has been previously paired with an aversive or unpleasant stimulus such as an electrical footshock (Fanselow, 1980; Antoniadis and McDonald, 1999). Animals subjected to this model show freezing behaviour and autonomic changes such as an increase in MAP and HR and a decrease in the cutaneous temperature (Blanchard and Blanchard, 1969; Carrive, 2000; Vianna and Carrive, 2005). We also observed that conditioned animals showed significant behavioural response (freezing), a marked increase in HR and MAP and a decrease in the cutaneous temperature, which remained stable throughout re-exposure to the context

Figure 5

Time course of bilateral injection of vehicle or phentolamine (Phento; 10 and 20 nmol) into the BNST on Δ MAP and Δ HR increases and Δ Temperature decrease in non-conditioned ($n = 5-7$ per group) and conditioned animals ($n = 8$ per group). Data shown are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ over the whole footshock chamber exposure period compared with vehicle-treated animals, Bonferroni's *post hoc* test.

Figure 6

Effects of bilateral injection of saline (Veh) or phentolamine (Phento; 10 nmol) + L-propranolol (L-prop; 7.5 nmol) in non-conditioned ($n = 5-6$ per group) and conditioned animals ($n = 6$ per group) on the percentage of time spent in freezing behaviour. Data shown are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ compared with vehicle non-conditioned group. # $P < 0.05$ compared with vehicle conditioning group, Bonferroni's *post hoc* test.

that was previously paired with footshock. Furthermore, in non-conditioned animals, re-exposure to the chamber also increased the MAP and HR and decreased the cutaneous temperature. However, these changes were lower than those observed in conditioned vehicle-treated animals.

The observation that conditioned autonomic responses to the aversive conditioned context are associated with the conditioned freezing agrees with previous reports on behaviour-related autonomic responses (Carrive, 2000; Vianna and Carrive, 2005). Conditioned rats displayed prolonged freezing that consequently result in low locomotor activity. Longer freezing, reflecting increased conditioned fear of the context, was associated with activation of the sympathetic nervous system (McCarty and Kopin, 1978; Carrive, 2002). Non-conditioned animals showed significantly less freezing response than rats conditioned to the context, resulting in an increased locomotor activity associated with a concurrent increase of cardiovascular output. Somatomotor activity is positively correlated with MAP and HR, so that a greater locomotor activity leads to a higher cardiovascular response (Yancey and Overton, 1993; Nijssen *et al.*, 1998). Consequently, the autonomic responses observed in conditioned rats are mainly due to an increased sympathetic activation due to fear of the context (Carrive, 2002), while the autonomic responses of non-conditioned rats may derive from a combined lesser fear of the context and a greater activity-mediated increase of cardiovascular output. Nevertheless, our results support the contention that MAP, HR and tail cutaneous temperature are useful indices to evaluate the intensity of the response to a conditioned contextual fear stimulus, in agreement with previous papers.

Regarding the cutaneous temperature, we observed that re-exposure to aversive context induced a fall in the tail temperature down to room temperature ($-3-4^{\circ}\text{C}$ from baseline). Indeed, it has been reported that rats subjected to fear conditioning show an elevation in the body temperature and a marked decreases in the cutaneous temperature of the tail which is attributed to strong cutaneous vasoconstriction

(Vianna and Carrive, 2005). In fact, the fear response includes a preparatory response to a more active reaction such as fight or flight and, as pointed out by Blessing (2003), vasoconstriction of the skin could be a protective mechanism to reduce blood loss in case of injury. Thus, the drop in the tail temperature observed by us may reflect a reduction in the tail blood flow caused by a cutaneous vasoconstriction.

Interestingly, behavioural and autonomic changes induced by the re-exposure to the aversive context were attenuated by the injection of L-propranolol or phentolamine, a non-selective β - and α -adrenoceptor antagonist, respectively, into the BNST, in conditioned animals. However, after individual treatments with these drugs the behaviour and autonomic responses were only partly reduced. Therefore, we investigated if the combination of L-propranolol and phentolamine would potentiate the attenuation of responses induced by the conditioned contextual fear. Although the combination reduced both autonomic and behavioural responses, the synergistic effect was only evident on the attenuation of the behavioural response. Additionally, the drug combination was more effective to attenuate changes observed in the cutaneous temperature when compared with the treatment with phentolamine alone. Concerning non-conditioned animals, as expected, no effect was observed in behavioural and autonomic responses after the administration of either L-propranolol or phentolamine. These data support an involvement of the BNST noradrenergic neurotransmission in the modulation of CER evoked by conditioned contextual fear. Based on these data, we performed additional experiments with selective adrenoceptor antagonists to evaluate which subtype of adrenoceptors was involved in these responses. For that, we used equipotent doses of selective α - and β -adrenoceptor antagonists based on the ratio of K_i values between non-selective and selective drugs (Miralles *et al.*, 1993; Bylund *et al.*, 1994). In addition to behavioural and cardiovascular responses, variations in cutaneous temperature were also recorded in the experiments using selective adrenoceptor antagonists.

As observed after L-propranolol or phentolamine, we also observed that the selective β_1 -adrenoceptor antagonist CGP20712 and the selective α_1 -adrenoceptor antagonist WB4101 when injected into the BNST also reduced the freezing time and the cardiovascular responses induced by conditioned contextual fear. Additionally, both CGP20712 and WB4101 attenuated the decrease in the tail temperature induced by aversive context. On the other hand, neither the selective β_2 -adrenoceptor antagonist ICI118,551 nor the selective α_2 -adrenoceptor antagonist RX821002 caused any effect, further reinforcing the idea that effects of both L-propranolol and phentolamine were mediated by respectively an antagonism of β_1 - and α_1 -adrenoceptors in the BNST. We also investigated if the combination of CGP20712 and WB4101 could potentiate the effect when compared with the treatment with these drugs alone and found that the combination was more effective in attenuating the increase in HR, compared with CGP20712 and WB4101 given individually, indicating a possible synergism between β_1 - and α_1 -adrenoceptors in the BNST for this effect. However, the combination did not potentiate the effects on the freezing time, the MAP and the cutaneous temperature that were induced by the treatments given separately. Although the

Figure 7

Time course of bilateral injection of saline (Veh) or phentolamine (Phento; 10 nmol) + L-propranolol (L-prop.; 7.5 nmol) on Δ MAP and Δ HR increases and Δ Temperature decrease in non-conditioned ($n = 5-6$ per group) and conditioned animals ($n = 6$ per group). Data shown are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ over the whole footshock chamber exposure period compared to vehicle-treated animals, Bonferroni's *post hoc* test.

Figure 8

(A) Effects of bilateral injection of saline (Veh), CGP20712 (CGP, 4.5 nmol) or ICI118,551 (ICI, 34.5 nmol); saline (Veh), WB4101 (WB, 1.7 nmol) or RX821002 (RX, 2.3 nmol); and saline (Veh) or WB4101 (1.7 nmol) + CGP20712 (CGP, 4.5 nmol) in conditioned animals ($n = 5-7/\text{group}$) on the percentage of time spent in freezing behavior. Data shown are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ compared with vehicle conditioning group, Bonferroni's post hoc test. (B) Time course of mean arterial pressure (Δ MAP), (C) heart rate (Δ HR) and (D) cutaneous temperature (Δ Temperature) changes in conditioned animals. Data shown are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ over the whole footshock chamber exposure period compared to vehicle-treated animals, Bonferroni's post hoc test.

reasons for these results are not clear, we cannot rule out the possibility that CGP20712 and WB4101 alone produced a ceiling effect on the attenuation of freezing and MAP and that the BNST noradrenergic neurotransmission could have a direct influence on the autonomic nervous system, which is segregated from behavioural responses.

It has been previously shown that a noradrenergic neurotransmission in the BNST is involved in the cardiovascular control. The BNST sends direct projections to medullary structures with autonomic activity, such as the nucleus of the solitary tract (NTS), dorsal motor nucleus of the vagus, nucleus ambiguus and the ventrolateral medulla (Dong and Swanson, 2004). Furthermore, ablation of the caudal ventrolateral medulla (CVLM) attenuated MAP and HR decreases elicited by a BNST stimulation (Giancola *et al.*, 1993). The CVLM projects to and inhibits sympathetic premotor neurons in the rostral ventrolateral medulla, thus decreasing sympathetic preganglionic neuronal outflow (Sved *et al.*, 2000). A previous study from our group showed that α_1 -adrenoceptors in the BNST exert a tonic influence on the parasympathetic component of the baroreflex in rats, in a similar manner to that observed during aversive situations, thus suggesting that an activation of BNST α_1 -adrenoceptors could facilitate cardiovascular responses during the re-exposure to aversive context. The BNST modulation of

baroreflex activity is similar to that observed during aversive situations (Crestani *et al.*, 2008a), thus suggesting that the BNST influence on the autonomic responses to contextual fear could depend on the baroreflex modulation by BNST α_1 -adrenoceptors. However, in contrast to our results, Crestani *et al.* (2009) observed that the microinjection of WB14041 enhanced HR increase without affecting the blood pressure increase evoked by acute restraint stress, whereas RX821002 or propranolol did not affect restraint stress-related cardiovascular responses. Furthermore, we observed that treatment of the BNST with adrenoceptor antagonists did not induce any significant change in baseline values of both MAP and HR, in agreement with other reports indicating that the BNST noradrenergic neurotransmission is not involved in the tonic maintenance of cardiovascular responses (Crestani *et al.*, 2008b; 2009; Alves *et al.*, 2011). Therefore, although the noradrenergic neurotransmission within BNST is involved in cardiovascular control, the attenuation of the cardiovascular responses to aversive context could not depend only on direct cardiovascular effects but also on the attenuation of the emotional response.

A deregulation of noradrenergic transmission has been implicated in neuropsychiatric disorders such as depression and anxiety (Ressler and Nemeroff, 2000). Corroborating our findings, adrenoceptor antagonists reduce anxiety and fear.

For example, systemic administration of propranolol reduced contextual fear in rodents and humans (Grillon *et al.*, 2004; Ouyang and Thomas, 2005). Moreover, data from clinical studies have demonstrated that prazosin, a α_1 -adrenoceptor antagonist, alleviated symptoms of post-traumatic stress disorder (Peskind *et al.*, 2003). Thus, our results suggest that the BNST could be involved in the effects of adrenoceptor antagonists after systemic administration, on fear conditioning. Furthermore, other brain structures that are directly connected with the BNST also seems to be involved in the adrenoceptor antagonists effects on fear conditioning, such as hippocampus, amygdala and medial prefrontal cortex (Lazzaro *et al.*, 2010; Do-Monte *et al.*, 2010a,b; Murchison *et al.*, 2011). Additionally, it is conceivable that adrenoceptors in the BNST could regulate the expression of contextual fear through the central nucleus of the amygdala (CeA), because this structure receives marked innervation from the BNST (Dong *et al.*, 2001a), and it is implicated in fear conditioning (Zimmerman *et al.*, 2007). Although the BNST and CeA are anatomically and neurochemically related and possess several functional similarities, Davis and co-workers have suggested a different role of the BNST and CeA in 'fear' versus 'anxiety' (Walker *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2010). From a biological view, 'anxiety' refers to an increased alertness due to a potential threat and needs cognitive appraisal, whereas 'fear' is elicited by an explicit threat (MacNaughton and Corr, 2004). There is much experimental evidence that the BNST is essential for sustained and potential threats (e.g. conditioned contextual fear), which are followed by long-duration responses, whereas the BNST is not necessary for short-duration responses that occur in response to threats with a clear offset (e.g. conditioned response to short-duration acoustic or luminous stimuli) (Walker *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2010). Based on such evidence, a role of the BNST has been proposed in anxiety, as opposed to fear, with a major involvement of the amygdala (Walker *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2010).

Several studies show a marked release of noradrenaline in the BNST induced by aversive situations, such as restraint stress (Pacak *et al.*, 1995; Cecchi *et al.*, 2002), opiate withdrawal (Fuentealba *et al.*, 2000), somatic and visceral pain-induce aversion (Deyama *et al.*, 2008; 2009) and exposure to predator odour (Fendt *et al.*, 2005). There is also considerable evidence that noradrenergic inputs to the BNST modulate the expression of neuroendocrine responses associated with stress, particularly those related to the activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis (HPA) (Forray and Gysling, 2004). Cecchi *et al.* (2002) observed that pretreatment of the BNST with a α_1 -adrenoceptor antagonist, but not with a mixture of β_1 - and β_2 -adrenoceptor antagonists, attenuated stress-induced rises in adrenocorticotrophic hormone (ACTH), whereas both treatments were able to reduce the stress-induced anxiety-like behaviours on the elevated plus-maze (Cecchi *et al.*, 2002). Moreover, the infusion of the non-selective β -adrenoceptor antagonist L-propranolol or the selective β_1 -adrenoceptor antagonist betaxolol into the BNST attenuated the morphine withdrawal-induced conditioned place aversion (Aston-Jones *et al.*, 1999; Delfs *et al.*, 2000; Cecchi *et al.*, 2007). In addition, whereas we did not observe effects with the injection of β_2 -adrenoceptor antagonist ICI118,551, Deyama *et al.* (2008) showed that this drug microinjected into the BNST was able

to attenuate the pain-induced aversion, suggesting the involvement of the BNST β_2 -adrenoceptors in the negative affective component of pain.

Interestingly, several findings suggest that noradrenergic neurotransmission in the BNST exerts an inhibitory effect upon glutamate release through the activation of both α_1 - and α_2 -adrenoceptors (Forray *et al.*, 1997; Egli *et al.*, 2005; McElligott and Winder, 2008), whereas the β_1 -adrenoceptor activation enhances the BNST glutamatergic neurotransmission (Nobis *et al.*, 2011), suggesting that these receptors could induce opposing effects on BNST glutamate release. On the other hand, Dumont and Williams (2004) observed that noradrenaline depolarized BNST GABAergic neurons to trigger an increase in the GABAergic inhibition during the acute opiate withdrawal, through α_1 - and β -adrenoceptors. Although Dumont and Williams (2004) did not distinguish between β_1 - and β_2 -adrenoceptors, a similar mechanism could contribute to the aversive responses induced by conditioned contextual fear and to explain our results, thus suggesting that α_1 - and β_1 -adrenoceptors are specifically involved in the conditioned contextual fear. Indeed, Radley *et al.* (2009) found that a selective ablation of GABAergic neurons in the BNST produced exaggerated emotional stress-induced HPA responses. Thus, it is possible to suggest an interaction between BNST noradrenergic neurotransmission and others neurotransmitters in the expression of conditioned contextual fear. However, this possibility remains to be tested.

In conclusion, the results of the present study showed that noradrenergic neurotransmission in the BNST, specifically the α_1 - and β_1 -adrenoceptors, are involved in the expression of responses induced by conditioned contextual fear.

Acknowledgements

The authors wish to thank Laura HA de Camargo, Ivanilda AC Fortunato and Simone Guilhaume for technical support. Sara C Hott and Felipe V Gomes have FAPESP fellowships (2011/13299-9 and 2010/17343-0). Research was supported by grants from FAPESP (2009/03187-9 and 2011/07332-3), CNPq (305996/2008-8 and 470042/2009-5), CAPES and FAEPA.

Statement of interest

None.

References

- Alexander SP, Mathie A, Peters JA (2011). Guide to receptors and channels (GRAC), 5th edition. *Br J Pharmacol* 164 (Suppl 1): S1–S324.
- Alheid GF (2003). Extended amygdala and basal forebrain. *Ann N Y Acad Sci* 985: 185–205.
- Alves FH, Resstel LB, Correa FM, Crestani CC (2011). Bed nucleus of the stria terminalis α_1 - and α_2 -adrenoceptors differentially modulate the cardiovascular responses to exercise in rats. *Neuroscience* 177: 74–83.

- Antoniadis EA, McDonald RJ (1999). Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. *Behav Brain Res* 101: 1–13.
- Aston-Jones G, Rajkowski J, Cohen J (1999). Role of locus coeruleus in attention and behavioral flexibility. *Biol Psychiatry* 46: 1309–1320.
- Beck CH, Fibiger HC (1995). Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene *c-fos*: with and without diazepam pretreatment. *J Neurosci* 15: 709–720.
- Blanchard RJ, Blanchard DC (1969). Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol* 67: 370–375.
- Blessing WW (2003). Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. *Cell Mol Neurobiol* 23: 527–538.
- Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP *et al.* (1994). International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev* 46: 121–136.
- Carrive P (2000). Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. *Brain Res* 858: 440–445.
- Carrive P (2002). Cardiovascular and behavioural components of conditioned fear to context after ganglionic and alpha-adrenergic blockade. *Auton Neurosci* 98: 90–93.
- Casada JH, Dafny N (1991). Restraint and stimulation of bed nucleus of the stria terminalis produce similar stress-like behaviors. *Brain Res Bull* 27: 207–212.
- Cecchi M, Khoshbouei H, Javors M, Morilak DA (2002). Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. *Neuroscience* 112: 13–21.
- Cecchi M, Capriles N, Watson SJ, Akil H (2007). Beta1 adrenergic receptors in the bed nucleus of stria terminalis mediate differential responses to opiate withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 32: 589–599.
- Crestani CC, Alves FH, Resstel LB, Correa FM (2008a). Bed nucleus of the stria terminalis alpha(1)-adrenoceptor modulates baroreflex cardiac component in unanesthetized rats. *Brain Res* 1245: 108–115.
- Crestani CC, Alves FH, Resstel LB, Correa FM (2008b). Both alpha1 and alpha2-adrenoceptors mediate the cardiovascular responses to noradrenaline microinjected into the bed nucleus of the stria terminalis of rats. *Br J Pharmacol* 153: 583–590.
- Crestani CC, Alves FH, Tavares RF, Correa FM (2009). Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Stress* 12: 268–278.
- Davis M, Walker DL, Miles L, Grillon C (2010). Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology* 35: 105–135.
- Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones G (2000). Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. *Nature* 403: 430–434.
- Deyama S, Katayama T, Ohno A, Nakagawa T, Kaneno S, Yamaguchi T *et al.* (2008). Activation of the beta-adrenoceptor-protein kinase A signaling pathway within the ventral bed nucleus of the stria terminalis mediates the negative affective component of pain in rats. *J Neurosci* 28: 7728–7736.
- Deyama S, Katayama T, Kondoh N, Nakagawa T, Kaneno S, Yamaguchi T *et al.* (2009). Role of enhanced noradrenergic transmission within the ventral bed nucleus of the stria terminalis in visceral pain-induced aversion in rats. *Behav Brain Res* 197: 279–283.
- Do-Monte FH, Allensworth M, Carobrez AP (2010a). Impairment of contextual conditioned fear extinction after microinjection of alpha-1-adrenergic blocker prazosin into the medial prefrontal cortex. *Behav Brain Res* 211: 89–95.
- Do-Monte FH, Kincheski GC, Pavesi E, Sordi R, Assreuy J, Carobrez AP (2010b). Role of beta-adrenergic receptors in the ventromedial prefrontal cortex during contextual fear extinction in rats. *Neurobiol Learn Mem* 94: 318–328.
- Dong HW, Swanson LW (2004). Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 468: 277–298.
- Dong HW, Petrovich GD, Swanson LW (2001a). Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Brain Res Rev* 38: 192–246.
- Dong HW, Petrovich GD, Watts AG, Swanson LW (2001b). Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. *J Comp Neurol* 436: 430–455.
- Dumont EC, Williams JT (2004). Noradrenaline triggers GABAA inhibition of bed nucleus of the stria terminalis neurons projecting to the ventral tegmental area. *J Neurosci* 24: 8198–8204.
- Dunn JD (1987). Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 407: 327–331.
- Dunn JD, Williams TJ (1995). Cardiovascular responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 352: 227–234.
- Egli RE, Kash TL, Choo K, Savchenko V, Matthews RT, Blakely RD *et al.* (2005). Norepinephrine modulates glutamatergic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuropsychopharmacology* 30: 657–668.
- Fanselow MS (1980). Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci* 15: 177–182.
- Fendt M, Siegl S, Steiniger-Brach B (2005). Noradrenaline transmission within the ventral bed nucleus of the stria terminalis is critical for fear behavior induced by trimethylthiazoline, a component of fox odor. *J Neurosci* 25: 5998–6004.
- Forray MI, Gysling K (2004). Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res Brain Res Rev* 47: 145–160.
- Forray MI, Bustos G, Gysling K (1997). Regulation of norepinephrine release from the rat bed nucleus of the stria terminalis: *in vivo* microdialysis studies. *J Neurosci Res* 50: 1040–1046.
- Frank J, Witte K, Schrodli W, Schutt C (2004). Chronic alcoholism causes deleterious conditioning of innate immunity. *Alcohol* 39: 386–392.
- Fuentealba JA, Forray MI, Gysling K (2000). Chronic morphine treatment and withdrawal increase extracellular levels of norepinephrine in the rat bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurochem* 75: 741–748.
- Giancola SB, Roder S, Ciriello J (1993). Contribution of caudal ventrolateral medulla to the cardiovascular responses elicited by activation of bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 606: 162–166.
- Gomes FV, Reis DG, Alves FH, Correa FM, Guimarães FS, Resstel LB (2012). Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis reduces the expression of contextual fear conditioning via 5-HT1A receptors. *J Psychopharmacol* 26: 104–113.

- Gordon CJ (1990). Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav* 47: 963–991.
- Grillon C, Cordova J, Morgan CA, Charney DS, Davis M (2004). Effects of the beta-blocker propranolol on cued and contextual fear conditioning in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 175: 342–352.
- Herman JP, Cullinan WE, Watson SJ (1994). Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. *J Neuroendocrinol* 6: 433–442.
- Lazzaro SC, Hou M, Cunha C, LeDoux JE, Cain CK (2010). Antagonism of lateral amygdala alpha1-adrenergic receptors facilitates fear conditioning and long-term potentiation. *Learn Mem* 17: 489–493.
- MacNaughton N, Corr PJ (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 285–305.
- Mccarty R, Kopin IJ (1978). Alterations in plasma catecholamines and behavior during acute stress in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats. *Life Sci* 22: 997–1005.
- McElligott ZA, Winder DG (2008). Alpha1-adrenergic receptor-induced heterosynaptic long-term depression in the bed nucleus of the stria terminalis is disrupted in mouse models of affective disorders. *Neuropsychopharmacology* 33: 2313–2323.
- McGrath J, Drummond G, Kilkenny C, Wainwright C (2010). Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1573–1576.
- Miralles A, Olmos G, Sastre M, Barturen F, Martin I, Garcia-Sevilla JA (1993). Discrimination and pharmacological characterization of I2-imidazoline sites with [3H]idazoxan and alpha-2 adrenoceptors with [3H]RX821002 (2-methoxy idazoxan) in the human and rat brains. *J Pharmacol Exp Ther* 264: 1187–1197.
- Moore RY (1978). Catecholamin innervation of the basal forebrain. I. The septal area. *J Comp Neurol* 177: 665–684.
- Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, Ma S *et al.* (2005). Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 1214–1224.
- Murchison CF, Schutsky K, Jin SH, Thomas SA (2011). Norepinephrine and ss-adrenergic signaling facilitate activation of hippocampal CA1 pyramidal neurons during contextual memory retrieval. *Neuroscience* 181: 109–116.
- Nijssen MJ, Croiset G, Diamant M, Stam R, Delsing D, de Wied D *et al.* (1998). Conditioned fear-induced tachycardia in the rat: vagal involvement. *Eur J Pharmacol* 350: 211–222.
- Nobis WP, Kash TL, Silberman Y, Winder DG (2011). beta-Adrenergic receptors enhance excitatory transmission in the bed nucleus of the stria terminalis through a corticotrophin-releasing factor receptor-dependent and cocaine-regulated mechanism. *Biol Psychiatry* 69: 1083–1090.
- Onaka T, Yagi K (1998). Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in neuroendocrine and behavioral responses to fear-related stimuli in rats. *Brain Res* 788: 287–293.
- Ouyang M, Thomas SA (2005). A requirement for memory retrieval during and after long-term extinction learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9347–9352.
- Pacak K, McCarty R, Palkovits M, Kopin IJ, Goldstein DS (1995). Effects of immobilization on *in vivo* release of norepinephrine in the bed nucleus of the stria terminalis in conscious rats. *Brain Res* 688: 242–246.
- Paxinos G, Watson C (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd edn. Academic Press: Sydney.
- Peskind ER, Bonner LT, Hoff DJ, Raskind MA (2003). Prazosin reduces trauma-related nightmares in older men with chronic posttraumatic stress disorder. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 16: 165–171.
- Radley JJ, Gosselink KL, Sawchenko PE (2009). A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci* 29: 7330–7340.
- Ressler KJ, Nemeroff CB (2000). Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress Anxiety* 12 (Suppl 1): 2–19.
- Resstel LB, Alves FH, Reis DG, Crestani CC, Correa FM, Guimaraes FS (2008). Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. *Neuroscience* 154: 869–876.
- Sullivan GM, Apergis J, Bush DE, Johnson LR, Hou M, Ledoux JE (2004). 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* 128: 7–14.
- Sved AF, Ito S, Madden CJ (2000). Baroreflex dependent and independent roles of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular regulation. *Brain Res Bull* 51: 129–133.
- Swanson LW, Hartman BK (1975). The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *J Comp Neurol* 163: 467–505.
- Vertes RP (2006). Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142: 1–20.
- Vianna DM, Carrive P (2005). Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *Eur J Neurosci* 21: 2505–2512.
- Walker DL, Toufexis DJ, Davis M (2003). Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur J Pharmacol* 463: 199–216.
- Yancey SL, Overton JM (1993). Cardiovascular responses to voluntary and treadmill exercise in rats. *J Appl Physiol* 75: 1334–1340.
- Zhou XJ, Yang J, Yan FL, Wang DX, Li XY, Fan XQ *et al.* (2010). Norepinephrine plays an important role in antinociceptive modulation of hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Int J Neurosci* 120: 428–438.
- Zimmerman JM, Rabinak CA, McLachlan IG, Maren S (2007). The central nucleus of the amygdala is essential for acquiring and expressing conditional fear after overtraining. *Learn Mem* 14: 634–644.