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

DANIELA LESCOANO MARTINS ULIANA

**Os receptores CB1 e TRPV1 da porção ventral do córtex pré-frontal
medial modulam a resposta emocional condicionada: participação das
neurotransmissões colinérgica, glutamatérgica e nitrérgica.**

Ribeirão Preto

2018

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

DANIELA LESCOANO MARTINS ULIANA

**Os receptores CB1 e TRPV1 da porção ventral do córtex pré-frontal
medial modulam a resposta emocional condicionada: participação das
neurotransmissões colinérgica, glutamatérgica e nitrérgica.**

*Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências,
Área de concentração: Farmacologia*
ORIENTADOR: Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes
Coorientadora: Sabrina Francesca de Souza Lisboa

Ribeirão Preto

2018

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

Uliana, Daniela Lescano Martins

Os receptores CB1 e TRPV1 da porção ventral do córtex pré-frontal medial modulam a resposta emocional condicionada: participação das neurotransmissões colinérgica, glutamatérgica e nitrérgica. / Daniela Lescano Martins Uliana; orientador: Leonardo Resstel Barbosa Moraes. – Ribeirão Preto, 2018

206f.

Tese (Doutorado)--Universidade de São Paulo, 2018.

1.. Resposta emocional condicionada 2. Córtex Pré-frontal medial. 3. Receptor CB1. 4. Receptor TRPV1 5. Óxido nítrico. 6.Receptor NMDA.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniela Lescano Martins Uliana

Os receptores CB1 e TRPV1 da porção ventral do córtex pré-frontal medial modulam a resposta emocional condicionada: participação das neurotransmissões colinérgica, glutamatérgica e nitrérgica.

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Farmacologia**

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Assinatura:

Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Assinatura:

Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Assinatura:

Prof. Dr. Leandro José Bertoglio

Instituição: Centro de Ciências Biológicas – UFSC

Assinatura:

Prof. Dr. Antonio de Pádua Carobrez

Instituição: Centro de Ciências Biológicas – UFSC

Assinatura:

Trabalho realizado no laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”

Isaac Newton

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Celso Antonio e Kenia, que sempre me apoiaram em minhas escolhas.

A minha Vó Evanir, meu irmão Celso e toda minha família pelo suporte incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leonardo Resstel por toda orientação e ensinamentos nesses anos de mestrado e doutorado. Agradeço todas as oportunidades que me proporcionou e por sempre me incetivar nesse período. Obrigado também pela formação humanizada que sempre nos dedicou e por nos ensinar indiretamente mesmo nos períodos mais difíceis.

A Sabrina, pela coorientação, e por sempre estar disposta a me ajudar e pelo apoio intelectual excepcional. Obrigado por ter contribuído de forma presente e dedicada em minha formação científica e pessoal. Aprendi muito com você.

Ao professor da banca examinadora, Dr. Fernando Morgan pela disponibilidade e participação na banca. Obrigado por todas as sugestões ao meu projeto de Doutorado, como meu acessor contribuiu para o desenvolvimento de nosso estudo. Você com certeza é um grande exemplo de profissional.

Ao professor da banca examinadora, Dr. Francisco Silveira Guimarães, agradeço por sua disponibilidade e participação na banca. Agradeço também toda a contribuição científica, desde o mestrado, que contribuíram para minha formação.

Ao professor da banca examinadora, Dr. Leandro José Bertoglio, agradeço por sua disponibilidade e participação na banca.

Ao professor da banca examinadora, Dr. Antonio de Pádua Carobrez agradeço por sua disponibilidade e participação na banca.

Aos meus colaboradores diretos durante meu doutorado, Leandrinho, Anna B., Sabrina e Carla pela auxilio experimental e intelectual.

A todos meus amigos e colegas de laboratório Jessica, Laura, Davis, May, Anna B., Ana Terzian, Luana, Teo, Leadrinho, Lu, Gabis e Sara, obrigada pelo convívio

diário e por tornar esta caminhada mais leve e engraçada, mesmo frente a tantos problemas.

A Laura, pelo seu auxílio técnico e experimental, como também pela sua amizade durante esses 6 anos que convivi contigo no laboratório. Você é uma pessoa muito especial.

A todos do laboratório do Prof. Morgan, Prof. Francisco, Prof. Samia e Prof. Rita Tostes por me proporcionarem momentos agradáveis e me ajudarem sempre que necessitei.

Aos Professores do departamento de Farmacologia por contribuírem para meu desenvolvimento científico.

A Prof. Dr. Monica Cristina Toffoli Kadri da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul por ser minha primeira grande incentivadora em seguir na pós-graduação e por ser um excepcional exemplo profissional. A conclusão desta etapa só foi possível decorrentes de toda sua atenção e incentivo durante minha graduação e iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Anthony Grace pela oportunidade e disponibilidade em me receber em seu laboratório na Universidade de Pittsburgh. E o apoio financeiro da CAPES, no Programa de Doutorado Sadiuiche no Exterior (PDSE) que possibilitou esta incrível experiência durante meu período de doutorado.

Ao mais recente Professor Dr. Felipe Gomes, que desde a época de pós-graduação sempre se mostrou disposto a ajudar e tirar dúvidas.

A Sara, por todo apoio desde o início de meu mestrado, pela paciência e amizade durante períodos alegres, bem como nas dificuldades.

A Mayara, por toda amizade e convivência no laboratório e em casa nesse período onde além de dividir contas, dividimos alegrias.

A todos meus amigos pós-graduandos e demais amigos de Ribeirão Preto, Campo Grande e Pittsburgh, pela amizade neste período.

Aos Funcionários José Waldik Ramon e Gislaine Pedroso de Moraes Marques, por toda competência, disponibilidade e atenção com que atendem nossas necessidades burocráticas. Bem como as ex-funcionárias Fatima Petea e Sônia Stefanelli pela atenção e auxílio durante parte de nosso período de formação.

Aos Funcionários do Biotério do departamento de Farmacologia e Fisiologia da FMRP pelo cuidado e respeito que dedicaram aos animais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) e Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

RESUMO

ULIANA, DL. **Os receptores CB1 e TRPV1 da porção ventral do córtex pré-frontal medial modulam a resposta emocional condicionada: participação das neurotransmissões colinérgica, glutamatérgica e nitrérgica.** 2018. 206 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Os receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) e vaniloides de potencial transitório 1 (TRPV1) presentes no córtex pré-frontal medial ventral (CPFMv) modulam de maneira oposta a resposta emocional condicionada (REC) no modelo do medo condicionado contextual (MCC). Enquanto a ativação de receptores CB1 reduz as respostas comportamental e cardiovascular da REC, a ativação de TRPV1 aumenta tais parâmetros. Além destes receptores, receptores de glutamato do tipo NMDA e o sistema nitrérgico no CPFMv estão envolvidos na modulação da REC. Possivelmente, tanto a resposta modulada pelo receptor CB1 quanto pelo TRPV1 estão ligadas à modulação da liberação de glutamato e produção de óxido nítrico (NO). Outro neurotransmissor que também possui papel importante na REC é a acetilcolina (ACh) e que provavelmente atua via NO e eCBs. O favorecimento desta neurotransmissão no CPFMv aumenta a REC por meio da ativação de receptores muscarínicos M3. É descrito que a ativação de receptores muscarínicos induz a produção de NO, o qual pode aumentar a liberação de glutamato e, assim, aumentar a REC. Além disso, a ativação de receptores muscarínicos também podem induzir a produção de endocanabinoides (eCBs), como a anandamida (AEA), neuromoduladores que podem influenciar a liberação de glutamato, via CB1 ou TRPV1 e, conseqüentemente, podem afetar a REC. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar se um antagonista CB1 (NIDA41020) e um agonista TRPV1 (capsaicina) atuam através da via NMDA/NO e se o aumento dos níveis de ACh modula a neurotransmissão glutamatérgica

por meio de eCBs e NO. Ratos wistars com cânulas direcionadas para o CPFMV foram submetidos ao protocolo de medo condicionado ao contexto. No dia seguinte, cateter de polietileno foi implantado na artéria femoral para posterior registro cardiovascular. 24h após, as drogas foram administradas no CPFMV e o tempo de congelamento e a resposta autonômica foram avaliados durante a re-exposição ao contexto. Tanto o NIDA quanto a capsaicina aumentaram a expressão da REC, independentemente de a administração ser na porção PL ou IL. A resposta do antagonismo de CB1 parece depender da ativação de TRPV1 e a resposta do antagonismo TRPV1 depende da ativação de CB1. O aumento da REC induzida por antagonista CB1 ou agonista TRPV1 foi prevenida com a administração prévia de antagonista NMDA ou inibidor da enzima nNOS. A administração de um sequestrador de NO ou de um inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) preveniu apenas a resposta do antagonismo CB1. O aumento da REC evocado pelo agonista TRPV1 foi prevenido com a microinjeção de antioxidante/sequestrador de radicais livres. Desta maneira, os resultados demonstram que no CPFMV o receptor CB1 modula a expressão da REC através da via NMDA/NO/GCs e o receptor TRPV1 através da via NMDA/NO/Estresse nitrosativo. Além disso, a administração de um inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE) aumentou a REC, sendo este efeito prevenido com a administração prévia de antagonista NMDA, inibidor da nNOS, sequestrador de NO, inibidor da GCs e antagonista de receptores TRPV1. O aumento da REC evocado pelo antagonista CB1 e agonista TRPV1 não foi prevenido pela administração local prévia de antagonista de receptores M3. Este resultado indica que a resposta promovida pela ACh modula a neurotransmissão glutamatérgica possivelmente através da produção de NO e ativação de TRPV1

pela AEA e que os eCBs não modulam a transmissão colinérgica no CPFMV. Portanto, podemos sugerir que a re-exposição ao contexto aversivo aumenta os níveis de ACh no CPFMV e, assim, ativa receptores M3 que, por sua vez, induzem a produção de eCBs, possivelmente AEA, e NO. O NO atuaria pré-sinápticamente aumentando a liberação de glutamato, e a AEA ativaria receptores TRPV1 pós-sinápticos que ativaria mecanismos de estresse nitrosativo decorrentes da produção do NO.

Palavras chaves: córtex pré-frontal medial, receptor CB1, receptor TRPV1, glutamato, óxido nítrico, acetilcolina, receptores M3.

ABSTRACT

ULIANA, DL. **The medial prefrontal cortex TRPV1 and CB1 receptors modulate the conditioned emotional response: involment of cholinergic, glutamatergic and nitreergic neurontransmissions.** 2018. 206 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

CB1 and TRPV1 receptors present in the ventromedial prefrontal cortex (vmPFC) have been related in the modulation of defensive behavior, as fear conditioning response. In contextual fear conditioning, CB1 and TRPV1 antagonism increase and decrease, respectively, the behavior and autonomic response during the re-exposure to aversive context. CB1 and TRPV1 activation lead to decrease and increase of glutamate release, respectively. Glutamate is an important neurotransmitter in vmPFC involve in cardiovascular and behavioral response. NMDA activation can promote nitric oxide (NO) production, and this mediator could regulate the pre-synaptic and post-synaptic signaling. Another important neurotransmission related to REC and eCBs/NO is Acetylcholine (ACh). AChE inhibitor in vmPFC increase conditioned response expression through M3 receptor activation. Muscarinic activation leads to NO production and this event can increase the glutamate release. Moreover, muscarinic activation also can induce endocannabinoid (eCBs) production and modulation of glutamatergic neurotransmission by CB1 and TRPV1 receptors. Thus, NO and eCBs production by muscarinic activation probably affect conditioned response through glutamate release. Our aim in this study was to investigate if CB1 antagonism and TRPV1 agonism promote an increase in conditioned response by NMDA/NO pathway. In addition, AChE inhibitor inject in vmPFC modulate glutamatergic neurotransmission by NO and eCBs. Male wistars rats with guide cannulas in

vmPFC were submitted to contextual fear conditioning. 1 day after conditioning, a polyethylene catheter was implanted in the femoral artery for cardiovascular recording. Following 24h, drugs were administered in vmPFC and freezing behavior and autonomic response was recorded during context reexposure. CB1 antagonism and TRPV1 agonism increased the expression of conditioned emotional response and the response was not different when injected in PL or IL subareas. The response of CB1 antagonism depends on TRPV1 activation and response of TRPV1 antagonism depends on CB1 activation, demonstrating the relation of these receptors. The effect induced by CB1 antagonism and TRPV1 agonism were prevented by an NMDA antagonism and preferential neuronal NO synthase inhibitor. In case of CB1 antagonism, NO scavenger and a soluble guanylate cyclase inhibitor (sGC) also prevented this response, but not response induced by TRPV1 agonism. Effect of TRPV1 agonism was prevented by administration of antioxidant/free radical scavenger. In addition, inhibition of AChE in vmPFC increased the conditioned response and this effect was prevented by NMDA antagonist, nNOS inhibitor, NO scavenger, sGC inhibitor and TRPV1 antagonist. CB1 antagonist and TRPV1 agonist increased conditioned response and M3 antagonist was not able to prevent this effect. Our results demonstrated that the response promoted by ACh modulate glutamatergic neurotransmission through NO and TRPV1 activation (by AEA). Moreover, endocannabinoid system did not affect cholinergic neurotransmission. Therefore, we suggest that reexposure to aversive context increase ACh concentration in vmPFC and thus induce activation of the M3 receptor. M3 receptor promote NO and eCBs production. NO act in pre-synaptic terminal

enhancing glutamate release and AEA activate the TRPV1 receptor in the post-synaptic terminal that act by nitrosative stress in NO pathway.

Keywords: prefrontal cortex, CB1 receptor, TRPV1 receptor, glutamate, nitric oxide, acetylcholine, M3 receptor.

LISTA DE ABREVIATURAS

Δ^9 -THC: Δ^9 -tetraidrocanabinol

2-AG: 2-araquidonoiglicerol

ACh: acetilcolina

AChE: acetilcolinesterase

AEA: anandamida

ANOVA: análise de variância

CB1: receptor canabinoide do tipo 1

CC: córtex cingulado

CPFM: córtex pré-frontal medial

CPFMv: córtex pré-frontal medial ventral

DP: dorso penduncular

eCB: endocanabinoide

EPM: erro padrão da média

FC: frequência cardíaca

GABA: ácido gama-aminobutírico (Inglês: *gama-aminobutyric acid*)

GCs: enzima guanilato ciclase solúvel

HD: hipocampo dorsal

IL: córtex pré-frontal medial infra-límbico

LCE: labirinto em cruz elevado

LTD: depressão de longo-prazo (inglês: *long-term depression*)

LTP: potenciação de longo-prazo (inglês: *-long-term potentiation*)

M1: receptor muscarínico do tipo 1

M3: receptor muscarínico do tipo 3

MC: medo condicionado

MCC: medo condicionado ao contexto

NMDA: N-metil-D-aspartato

nNOS: isoforma neuronal da enzima sintase do NO

NO: óxido nítrico

NOS: enzima sintase do NO

NTS: núcleo do trato solitário

PAM: pressão arterial média

PL: córtex pré-frontal medial pré-límbico

REC: resposta emocional condicionada

SCP: substância cinzenta periaqueductal

SCPdl: substância cinzenta periaqueductal dorsolateral

SNC: sistema nervoso central

TC: temperatura cutânea

TRPV1: receptor vanilóide de potencial transitório

Vei: Veículo

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito da administração de doses crescentes de antagonista CB1 (NIDA) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 2 - Efeito da administração de uma dose efetiva de 55pmol do antagonista CB1 (NIDA) nas porções PL e IL do CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 3 - Efeito da administração de uma dose efetiva de 100pmol do antagonista CB1 (NIDA) nas porções PL e IL do CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 4 - Efeito da administração prévia de um antagonista de receptores NMDA (LY) sobre a resposta da dose efetiva de 55pmol do antagonista CB1 (NIDA) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 5 - Efeito da administração prévia de um inibidor da enzima nNOS (NPLA) sobre a resposta da dose efetiva de 55pmol do antagonista CB1 (NIDA) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 6 - Efeito da administração prévia de um sequestrador extracelular de NO (c-PTIO) sobre a resposta da dose efetiva de 55pmol do antagonista CB1 (NIDA) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 7 - Efeito da administração prévia de um inibidor da enzima GCs (ODQ) sobre a resposta da dose efetiva de 55pmol do antagonista CB1 (NIDA) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 8 - Efeito da administração de doses crescentes de agonista TRPV1 (CPS) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 9 - Efeito da administração da dose efetiva de 1nmol do agonista TRPV1 (CPS) nas porções PL e IL do CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 10 - Efeito da administração prévia de um antagonista de receptores NMDA (LY) sobre a resposta da dose efetiva de 1nmol do agonista TRPV1 (CPS) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 11 - Efeito da administração prévia de um inibidor da enzima nNOS (NPLA) sobre a resposta da dose efetiva de 1nmol do agonista TRPV1 (CPS) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 12 - Efeito da administração prévia de um sequestrador extracelular de NO (c-PTIO) sobre a resposta da dose efetiva de 1nmol do agonista TRPV1 (CPS) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 13 - Efeito da administração prévia de um inibidor da enzima CGs (ODQ) sobre a resposta da dose efetiva de 1nmol do agonista TRPV1 (CPS) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 14 - Efeito da administração prévia de um antioxidante/sequestrador de radicais livres (NAC) sobre a resposta da dose efetiva de 1nmol do agonista TRPV1 (CPS) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 15 - Efeito da administração prévia de um antagonista de receptores TRPV1 (6-Iodo) sobre a resposta da dose efetiva de 55 pmol do antagonista CB1 (NIDA) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 16 - Efeito da administração prévia de um antagonista de receptores CB1 (NIDA) sobre a resposta da dose efetiva de 3nmol do antagonista TRPV1 (6-Iodo) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada em protocolo de alta intensidade.

Figura 17 - Efeito da administração prévia de um antagonista de receptores NMDA (LY) sobre a resposta da dose efetiva de 1nmol do inibidor da AChE (NEO) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 18 - Efeito da administração prévia de um inibidor da enzima nNOS (NPLA) sobre a resposta da dose efetiva de 1nmol do inibidor da AChE (NEO) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 19 - Efeito da administração prévia de um sequestrador extracelular de NO (c-PTIO) sobre a resposta da dose efetiva de 1nmol do inibidor da AChE (NEO) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 20 - Efeito da administração prévia de um inibidor da enzima CGs (ODQ) sobre a resposta da dose efetiva de 1nmol do inibidor da AChE (NEO) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 21 - Efeito da administração prévia de um antagonista de receptores TRPV1 (6-Iodo) sobre a resposta da dose efetiva de 1nmol do inibidor da AChE (NEO) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 22 - Efeito da administração prévia de um antagonista de receptores M3 (Fumarate) sobre a resposta da dose efetiva de 55pmol do antagonista CB1 (NIDA) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 24 - Efeito da administração prévia de um antagonista de receptores M3 (Fumarate) sobre a resposta da dose efetiva de 1nmol do agonista TRPV1 (CPS) no CPFMV sobre a resposta emocional condicionada.

Figura 25 – Representação esquemática dos mecanismos envolvidos na modulação da resposta emocional condicionada no CPFMV.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	30
2. OBJETIVO	41
1.1 Objetivo Geral.....	41
1.2 Objetivos Específicos.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Animais.....	43
3.2 Drogas Utilizadas.....	43
3.3 Técnica de implante de cânula-guia no CPFMV.....	44
3.4 Condicionamento ao contexto.....	45
3.5 Canulação da artéria femoral.....	46
3.6 Registros da PAM, FC e TC.....	46
3.7 Técnica para microinjeção de drogas no vCPFM.....	47
3.8 Determinação anatômica do local de injeção.....	47
3.9 Procedimentos experimentais.....	48
3.9.1 Avaliação da participação dos receptores NMDA e da via do NO no efeito de antagonista de receptores CB1 no CPFMV na REC contextual..	48
3.9.2 Avaliação do envolvimento dos receptores NMDA e da via do NO no efeito de agonista TRPV1 no CPFMV na REC contextual.....	49
3.9.3 Avaliação da interação dos receptores CB1 e TRPV1 do CPFMV na modulação da REC contextual.....	49
3.9.4 Avaliação do envolvimento dos receptores NMDA e da via do NO no efeito de inibidor de AChE na REC contextual.....	50
3.9.5 Avaliação da interação do sistema colinérgico e dos receptores CB1 e TRPV1 no CPFMV sobre a REC contextual.....	50
3.10 Análise Estatística.....	51
4. RESULTADOS.....	53

4.1	Participação dos receptores NMDA e da via do NO no efeito do antagonista de receptores CB1 no CPFMv na REC contextual.....	53
4.1.1	Efeito da administração de doses crescentes de antagonista de receptores CB1 no CPFMv na REC contextual.....	53
4.1.2	Efeito da injeção das doses efetivas de antagonista CB1 nas porções PL e IL do CPFMv na REC.	56
4.1.3	Participação dos receptores NMDA na REC evocada pelo antagonista de receptores CB1 intra-CFPMv.	60
4.1.4	Participação da enzima nNOS na REC evocada pelo antagonista de receptores CB1 intra-CFPMv.	62
4.1.5	Participação do NO extracelular na REC evocada pelo antagonista de receptores CB1 intra-CFPMv.	64
4.1.6	Participação da enzima GCs na REC evocada pelo antagonista de receptores CB1 intra-CFPMv.	66
4.2	Participação dos receptores NMDA e da via do NO no efeito do agonista de receptores TRPV1 no CPFMv na REC contextual.....	68
4.2.1	Efeito da administração de doses crescentes de agonista de receptores TRPV1 no CPFMv na REC contextual.	68
4.2.2	Participação das porções PL e IL do CPFMv na REC evocada pela dose efetiva de agonista de receptores TRPV1.	70
4.2.3	Participação dos receptores NMDA na REC evocada pelo agonista de receptores TRPV1 intra-CFPMv.....	72
4.2.4	Participação da enzima nNOS na REC evocada pelo agonista de receptores TRPV1 intra-CFPMv.....	74
4.2.5	Participação do NO extracelular na REC evocada pelo agonista de receptores TRPV1 intra-CFPMv.....	76
4.2.6	Participação da enzima GCs na REC evocada pelo agonista de receptores TRPV1 intra-CFPMv.....	79
4.2.7	Participação do estresse oxidativo na REC evocada pelo agonista de receptores TRPV1 intra-CFPMv.....	82

4.3	Avaliação da interação dos receptores CB1 e TRPV1 do CPFMV na modulação da REC contextual.	86
4.3.1	Participação do receptor TRPV1 na REC evocada pelo antagonista de receptores CB1 intra-CFPMv.	86
4.3.2	Participação do receptor CB1 na REC evocada pelo antagonista de receptores TRPV1 intra-CFPMv.	88
4.4	Participação dos receptores NMDA e da via do NO no efeito de um inibidor de AChE administrado no CPFMV na REC contextual.	90
4.4.1	Participação dos receptores NMDA na REC evocada pelo inibidor da AChE intra-CFPMv.	90
4.4.2	Participação da enzima nNOS na REC evocada pelo inibidor da AChE intra-CFPMv.	92
4.4.3	Participação do NO extracelular na REC evocada pelo inibidor da AChE intra-CFPMv.	94
4.4.4	Participação da enzima GCs na REC evocada pelo inibidor da AChE intra-CFPMv.	96
4.5	Interação do sistema colinérgico e dos receptores CB1 e TRPV1 do CPFMV sobre a REC contextual.	98
4.5.1	Participação dos receptores TRPV1 na REC evocada pelo inibidor da AChE intra-CFPMv.	98
4.5.2	Participação dos receptores M3 na REC evocada pelo antagonista de receptores CB1 intra-CFPMv.	100
4.5.3	Participação dos receptores M3 na REC evocada pelo agonista de receptores TRPV1 intra-CFPMv.	102
5.	DISCUSSÃO	105
6.	CONCLUSÃO	130
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

1. INTRODUÇÃO

Os endocanabinoides (eCBs), como a N-araquidonoiletanolamina (anandamida, AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), são substâncias endógenas produzidas a partir dos fosfolipídios de membrana frente a um estímulo sináptico, ou seja, sob demanda, e atuam de forma retrógrada em receptores canabinoides (CB), como o CB1 (Wilson and Nicoll, 2002; Di Marzo and Petrosino, 2007; Kendall and Yudowski, 2016). Os receptores CB1 pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G e são os receptores mais expressos no sistema nervoso central (SNC) (Herkenham *et al*, 1991). Estes receptores em particular são acoplados à proteína G inibitória (Gi) (Childers and Deadwyler, 1996) e se localizam preferencialmente na membrana pré-sináptica (Egertová *et al*, 1998). A ativação do receptor CB1 promove inibição sináptica, ocasionada essencialmente pela redução dos níveis de AMPc, ativação de canais retificadores de K⁺ e inibição de canais de Ca⁺² voltagem dependente (Kano *et al*, 2009). Nesse sentido, a sinalização eCB representa um dos mecanismos neuromodulatórios mais importantes no SNC. Além disso, estes receptores estão amplamente expressos em estruturas cerebrais envolvidas com ansiedade e medo, como o córtex pré-frontal medial (CPFM), hipocampo, amígdala, hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal (SCP) (Herkenham *et al*, 1991; Tsou *et al*, 1998; Svízenská *et al*, 2008).

Vários estudos indicam que os receptores CB1 são importantes alvos para a modulação de respostas defensivas e de ansiedade (Patel and Hillard, 2006; Varvel *et al*, 2007; Moreira *et al*, 2012). Foi demonstrado, por exemplo, que a administração sistêmica de agonista CB1 em camundongos induziu efeito do tipo-ansiolítico no modelo do labirinto em cruz elevado (LCE), enquanto o

bloqueio de tais receptores induziu efeito oposto (Patel and Hillard, 2006). A participação de CB1 também já foi mostrada no modelo do medo condicionado (Marsicano *et al*, 2002; Pamplona *et al*, 2006; Kamprath *et al*, 2006; Niyuhire *et al*, 2007), um modelo animal preditivo de drogas ansiolíticas baseado em aprendizado associativo (Millan, 2003).

O medo condicionado consiste na associação de um estímulo neutro com um estímulo aversivo (choque nas patas), de forma que o estímulo neutro passa a ser o estímulo condicionado, pois prediz a ocorrência do estímulo aversivo. A natureza do estímulo neutro é diversa, entretanto os mais comumente utilizados são o contexto e o som (Fendt and Fanselow, 1999). A re-exposição ao contexto previamente pareado com um estímulo aversivo (choques nas patas), por exemplo, desencadeia respostas características de aumento da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e queda da temperatura cutânea caudal (TC) (Carrive, 2000; Vianna and Carrive, 2005; Resstel *et al*, 2006a) e comportamento de congelamento (Fanselow, 1980, 2000), que conjuntamente são denominados de resposta emocional condicionada (REC). A importância dos receptores CB1 no medo condicionado ao som foi primeiramente demonstrada por Marsicano e colaboradores (2002). Estes autores demonstraram que tanto a deleção genética de CB1 ou a administração sistêmica de antagonista CB1 em camundongos promoveu prejuízo da extinção da resposta condicionada. Efeito similar também foi demonstrado no medo condicionado ao contexto (MCC) após administração sistêmica de antagonista CB1 (Pamplona *et al*, 2006). Desta forma, os receptores CB1 parecem estar envolvidos na modulação da REC.

A ativação de receptores CB1 por agonistas, como a AEA, usualmente induzem efeitos tipo-ansiolítico em doses baixas; entretanto, o aumento da dose

produz uma resposta bifásica, levando à perda do efeito ou mesmo induzindo efeito oposto em doses altas (Moreira *et al*, 2007, 2012). Isto é atribuído à capacidade da AEA de ativar receptores vaniloides de potencial transitório do tipo 1 (TRPV1) (Zygmunt *et al*, 1999). O TRPV1 é um canal iônico permeável ao Ca^{+2} (Owsianik *et al*, 2006; Wu *et al*, 2010), cuja ativação facilita a liberação de neurotransmissores, como o glutamato (Starowicz *et al*, 2007; Xing and Li, 2007; Kawahara *et al*, 2011). Sua localização no terminal sináptico ainda é muito discutida e, diferentemente do receptor CB1, o receptor TRPV1 pode estar localizado tanto no terminal pré- quanto no pós-sináptico (Aguiar *et al*, 2014b). O papel do receptor TRPV1 nas respostas relacionadas à ansiedade em animais parece ser oposto ao do receptor CB1. Por exemplo, a administração sistêmica de um antagonista de receptores TRPV1 promove efeito do tipo-ansiolítico no LCE (Kasckow *et al*, 2004). Além disso, estudos utilizando camundongos com deleção do gene que codifica TRPV1 mostraram efeito do tipo-ansiolítico nos modelos do LCE e MCC (Marsch *et al*, 2007). A relação CB1 e TRPV1 é amplamente estudada na literatura, sendo o balanço entre excitação/inibição proporcionado por eles importante na modulação de respostas relacionadas à ansiedade (Casarotto *et al*, 2012; Moreira *et al*, 2012; Aguiar *et al*, 2014b; Uliana *et al*, 2016; Patel, *et al*, 2017). Assim como os receptores CB1, os receptores TRPV1 também são encontrados em estruturas cerebrais envolvidas com o controle de respostas defensivas, como o CPFM, hipotálamo e SCP (Mezey *et al*, 2000; Tóth *et al*, 2005).

Uma importante estrutura cerebral envolvida com a modulação de respostas cardiovasculares e comportamentais relacionadas à ansiedade e na qual ambos os receptores CB1 e TRPV1 possuem importante papel, é o CPFM

(Resstel *et al*, 2006a; Lisboa *et al*, 2010b; Fogaça *et al*, 2012; Aguiar *et al*, 2014b; Worley *et al*, 2017). Esta região é uma estrutura límbica envolvida na regulação de respostas neuroendócrinas, autonômicas e comportamentais (Fryszak and Neafsey, 1994; Verberne and Owens, 1998; Schulkin *et al*, 2005; Resstel *et al*, 2008b; Radley *et al*, 2009). O CPFM é subdividido em córtex pré-límbico (PL), infra-límbico (IL), córtex cingulado (CC) e dorso peduncular (DP) (Leonard, 1969; Groenewegen, 1988). O PL e IL constituem a porção ventral do CPFM (CPFMv) (Neafsey, 1990).

Evidências demonstram que a exposição de ratos ao contexto previamente pareado com choques aumentou a expressão de uma proteína que indica ativação neuronal, a c-FOS, no CPFMv (Beck and Fibiger, 1995), sugerindo que tal estrutura é ativada durante a expressão da REC. Estudos de lesão no CPFMv demonstraram redução no comportamento de congelamento, bem como da taquicardia associados a estímulo auditório (Fryszak and Neafsey, 1991, 1994). De forma similar, foi observada que a inibição seletiva reversível do CPFMv no MCC atenuou as respostas comportamental e autonômica durante a re-exposição ao contexto aversivo (Resstel *et al*, 2006a; Lisboa *et al*, 2010b). Assim, o CPFMv parece exercer importante papel na expressão do MCC. Nesse sentido, resultados de nosso grupo já demonstraram que os receptores CB1 e TRPV1 presentes no CPFMv modulam resposta relacionadas a ansiedade. O favorecimento da sinalização dos eCBs via receptores CB1 bem como o antagonismo de receptores TRPV1 no CPFMv promovem efeito do tipo-ansiolítico no LCE (Aguiar *et al*, 2009; Lisboa *et al*, 2015) e reduzem a REC no MCC (Lisboa *et al*, 2010a; Terzian *et al*, 2014). Entretanto não se sabe ao certo quais mecanismos estariam envolvidos nessas respostas mediadas pelos

receptores CB1 e TRPV1 no CPFMV, mas acredita-se que a neurotransmissão glutamatergica possa representar uma das possibilidades, uma vez que esta transmissão modula a REC no CPFMV (Resstel *et al*, 2008). Resultados também já demonstraram que a neurotransmissão glutamatergica é uma das principais neurotransmissões moduladas pelos receptores CB1 e TRPV1 no CPFMV e em outras áreas cerebrais (Vaughan *et al*, 2000; Auclair *et al*, 2000; Xing and Li, 2007; Starowicz *et al*, 2007; Pava and Woodward, 2014).

O glutamato parecer ser um importante mediador das respostas moduladas pelo CPFMV. A administração de L-glutamato no CPFMV, por exemplo, induz aumento da PAM e FC em ratos acordados (Resstel and Corrêa, 2005), enquanto o antagonismo de receptores NMDA previne tal resposta (Resstel and Corrêa, 2006). Tais resultados refletem o papel do receptor NMDA de glutamato na modulação da resposta cardiovascular. Posteriormente, resultados do grupo demonstraram que o antagonismo de receptores NMDA foi capaz de atenuar a resposta comportamental e cardiovascular durante a re-exposição ao contexto aversivo (Resstel *et al*, 2008), o que evidencia que os receptores NMDA de glutamato são essenciais na modulação destas respostas no modelo do MCC.

Outro sistema relacionado à ativação de receptores NMDA é o sistema nitrérgico (Garthwaite *et al*, 1989). O óxido nítrico (NO) é produzido intracelularmente pela enzima sintase do NO (NOS), particularmente no SNC pela isoforma neuronal (nNOS), a partir do aminoácido L-arginina (Andrew and Mayer, 1999). O influxo de Ca^{+2} decorrente da ativação de receptores NMDA ativa a nNOS, levando à produção de NO (Garthwaite, 1991). O NO por sua vez pode modular a excitabilidade neuronal após estímulo de receptores NMDA

(Garthwaite *et al*, 1988) e influenciar a liberação do glutamato e outros neurotransmissores decorrente de sua capacidade, por ser um gás, de se difundir na fenda sináptica (Meulemans, 1994). A modulação da atividade sináptica pelo NO é essencialmente devida à ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), presente no terminal sináptico (Bredt and Snyder, 1989; Koesling *et al*, 2016). A ativação desta enzima promove aumento dos níveis de GMPc no terminal pré-sináptico, promovendo o aumento da liberação de neurotransmissores (Garthwaite and Boulton, 1995; Philippu, 2016). Entretanto, O NO pode também atuar no local de sua produção, isto é, no terminal pós-sináptico, e desencadear seus efeitos através da formação de espécies reativas, como de peroxinitrito (ONOO^-) ou do próprio NO ($\text{NO}^\bullet$). Ambos são capazes de modular a função proteica e modular a atividade sináptica por meio de S-nitrosilação, no caso do $\text{NO}^\bullet$, e nitrotirosinação pelo ONOO^- (Bradley and Steinert, 2016).

Além disso, o NO possui importante papel na modulação de resposta defensiva em diversas estruturas cerebrais (Guimarães *et al*, 2005). A inibição da nNOS no CPFMV, por exemplo, é capaz de reverter os aumentos de PAM e FC induzidos pela microinjeção de L-glutamato e diminuir a resposta comportamental e cardiovascular no MCC (Resstel and Corrêa, 2006; Resstel *et al*, 2008). Tais resultados demonstram a importância da sinalização NMDA/NO na modulação de respostas cardiovasculares e comportamentais no CPFMV. Esta via ainda parece estar intimamente relacionada com os receptores CB1 e TRPV1 na modulação da resposta condicionada. Resultados prévios do laboratório mostraram que o aumento da REC contextual ocasionada por antagonista CB1 ou por agonista TRPV1 na SCPdl dependem da ativação de

receptores NMDA, produção/liberação de NO e ativação da enzima GCs (Uliana *et al*, 2016). Esta via foi descrita também no efeito do antagonista CB1 administrado no hipocampo dorsal (HD) também no modelo do MCC (Spiacci *et al*, 2016).

Outro importante neurotransmissor que parece modular as respostas defensivas no CPFMV (Fedoce *et al*, 2016) e que leva à produção de NO e eCBs é a acetilcolina (ACh) (Cuadra and El-Fakahany, 1997; Borda *et al*, 1998; Cuadra and El-Fakahany, 1998; Carriere and El-Fakahany, 2000; Kim *et al*, 2002). Resultados demonstraram que a administração de ACh na porção PL do CPFMV em animais acordados reduziu a PAM e aumentou a FC através da ativação de receptores muscarínicos do tipo 3 (M3) (Fassini *et al*, 2015), indicando sua importância na modulação da resposta cardiovascular. A ACh também parece ter um papel importante na modulação de respostas comportamentais (Robinson *et al*, 2011). A administração de um inibidor da acetilcolinesterase (AChE) no porção PL do CPFMV promove efeito do tipo-ansiossígeno no LCE, sendo esta resposta prevenida por antagonista de receptores muscarínicos do tipo 1 (M1) (Fogaça *et al*, 2016). Além disso, a re-exposição ao contexto aversivo aumenta os níveis de ACh no CPFMV (Acquas *et al*, 1996). Nesse sentido, resultados do grupo demonstraram que o bloqueio de receptores muscarínicos no CPFMV reduz a REC, enquanto a administração de um inibidor de AChE a aumenta via ativação de receptores M3 (Fedoce *et al*, 2016). É reportado, ainda, que camundongos com deleção de receptores M3 apresentam deficiência no aprendizado da memória aversiva no medo condicionado (Poulin *et al*, 2010). Desta forma, essas evidências também refletem o papel do sistema colinérgico

e receptores M3 do CPFMV na modulação de respostas comportamentais e cardiovasculares associadas a situações aversivas.

No CPFMV, a ACh apresenta um papel importante na modulação da atividade sináptica e se acredita que este evento seja mediado pela produção de NO e eCBs (Huang and Hsu, 2010; Martin *et al*, 2015). Evidências sugerem que o aumento de Ca^{+2} intracelular decorrente da ativação de receptores muscarínicos leva a aumento da produção de NO via ativação de nNOS (Borda *et al*, 1998; Cuadra and El-Fakahany, 1997, 1998; Carriere and El-Fakahany, 2000). No CPFMV, dados mostram que a ativação de receptores muscarínicos é capaz de induzir depressão sináptica de longo prazo (inglês: *long-term depression*, LTD) através de mecanismo pré-sináptico mediado pelo NO (Huang and Hsu, 2010). Além disso, a resposta cardiovascular decorrente da administração do inibidor de AChE no CPFMV também depende da produção de NO, difusão na fenda sináptica e ativação da enzima CGs (Fassini *et al*, 2015). Portanto, visto que o NO pode modular a excitabilidade celular, bem como influenciar a liberação de glutamato (Garthwaite *et al*, 1988), o NO pode ser um importante mediador da resposta desencadeada pela ativação de receptores muscarínicos, resultando em ativação de receptores NMDA e aumento da REC.

Além do NO, foi demonstrado que a ativação de M1 e M3 no hipocampo também leva à liberação de eCBs (Kim *et al*, 2002; Ohno-Shosaku *et al*, 2003), como a AEA, que pode ativar tanto receptores CB1 quanto TRPV1. Na SCP, também foi mostrado que a modulação pré-sináptica exercida pelo sistema colinérgico é via sinalização eCB (Lau and Vaughan, 2008). Estudos eletrofisiológicos *in vitro* demonstram que a ativação de receptores muscarínicos induzem LTD em fatias do CPFMV PL, sendo este efeito dependente da

produção de eCBs e ativação de receptores CB1 (Martin *et al*, 2015). Portanto, uma sugestão é que a ativação de receptores muscarínicos no CPFMV poderia induzir a produção de eCBs que por sua vez modulariam a liberação de glutamato e NO, via receptores CB1 e TRPV1.

Estudos eletrofisiológicos na amígdala lateral demonstraram que em baixas concentrações a ativação de TRPV1 induz a síntese de AEA, que por sua vez ativa CB1, reduz a liberação de glutamato e a ativação da NOS, inibindo a potenciação a longo-prazo (LTP-*long-term potentiation*). Entretanto, a ativação de receptores TRPV1 pós-sinápticos induzidos por altos níveis de AEA poderiam ativar a nNOS neste terminal por aumentar o cálcio intracelular, levando ao aumento da liberação de glutamato e aumento na LTP (Zschenderlein *et al*, 2011). Dessa forma, embora não tenha sido ainda investigado se esse mecanismo ocorre no CPFMV, baixos e altos níveis de eCBs produzidos após ativação de receptores muscarínicos poderiam levar à modulação da produção de glutamato, reduzindo-a via CB1 e a aumentando via ativação de TRPV1 e nNOS. De acordo com tal proposta e como descrito previamente, a ativação de CB1 ou bloqueio de TRPV1 no CPFMV atenuou a REC no MCC, enquanto o bloqueio de CB1 ou ativação de TRPV1 aumenta tal resposta (Lisboa *et al*, 2010a; Terzian *et al*, 2014), sendo desconhecido até então a relação da neurotransmissão colinérgica com os eCBs na modulação da REC.

Portanto, considerando que os receptores CB1 e TRPV1 presentes no CPFMV modulam a REC e que o glutamato e o NO são importantes neurotransmissores para evocação desta resposta, nossa hipótese foi de que o aumento da REC observado após o antagonismo de CB1 ou ativação de TRPV1 no CPFMV é revertida pela inibição da via NMDA/NO. Além disso, levando em

consideração que o favorecimento da transmissão colinérgica via receptores M3 aumenta a REC e que ativação destes receptores desencadeia a produção de eCBs e NO, a outra hipótese foi de que a inibição da via do NO ou bloqueio de TRPV1 atenuaria a REC ocasionada pelo favorecimento da neurotransmissão colinérgica, por modular a liberação de glutamato.

Objetivos

2. OBJETIVO

1.1 Objetivo Geral

Avaliar no modelo do MCC a participação de receptores NMDA e da via do NO na alteração da REC induzida pelo antagonismo de receptores CB1, ativação de TRPV1 e ativação de receptores muscarínicos, e suas interações no CPFMV.

1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar se a REC evocada pelo antagonismo de receptores CB1 no CPFMV depende da ativação de receptores NMDA, produção/liberação de NO e ativação da enzima GCs.
- Avaliar se a REC evocada pela ativação de receptores TRPV1 no CPFMV depende da ativação de receptores NMDA, produção/liberação de NO, ativação da enzima GCs e/ou estresse oxidativo/nitrosativo.
- Investigar se o aumento da REC por antagonista de CB1 depende da ativação de TRPV1 ou se a redução na REC decorrente do antagonismo de TRPV1 depende da ativação de CB1 no CPFMV.
- Avaliar se o aumento da REC induzida pelo aumento da neurotransmissão colinérgica no CPFMV depende da ativação de receptores NMDA, produção/liberação de NO, ativação da enzima GCs e ativação de receptores TRPV1.
- Avaliar se a REC evocada pelo antagonista CB1 e agonista TRPV1 no CPFMV depende da ativação de receptores M3.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos Wistar (240 – 260 g), provenientes do Biotério Central do Campus da USP – Ribeirão Preto foram alojados no biotério do próprio laboratório em caixa de polipropileno (39x32x17cm), em ambiente monitorado, com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura ambiente $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, com água e comida *ad libitum*.

Os procedimentos experimentais estavam em concordância com o guia de uso e cuidados de animais de laboratório da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento. As condições de habitação e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal institucional (número do processo: 171/2014, Anexo VI)

3.2 Drogas Utilizadas

- N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-methoxyphenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (NIDA41020, antagonista de receptores CB1; Tocris) diluído em DMSO 10%;
- (S)-3-Carboxy-4-hydroxyphenylglycine (c-PTIO, seqüestrador de NO; RBI); N^ω-propyl-L-arginine (NPLA, inibidor de nNOS; Tocris) diluído em Salina;
- [3S-(3 α ,4 α ,6 β ,8 α)]-Decahydro-6-(phosphonomethyl)-3-isoquinolinecarboxylic acid) (LY 235959, antagonista de receptores NMDA; Tocris) diluído em Salina;
- Neostigmina (NEO, inibidor de acetilcolinesterase, Sigma), J104129 fumarate (J-Fumarate, antagonista M3, TOCRIS) diluído em Salina;

- 6-iodonordiidrocapsaicina (6-Iodo, antagonista TRPV1, Tocris) diluído em DMSO 10%
- Capsaicina (CPS, agonista TRPV1, Tocris) diluído em DMSO 10%;
- N-Acetyl-L-cysteine (NAC, antioxidante e sequestrador de radicais livres, Sigma) diluído em Salina;
- Cloridrato de ketamina (Ketamina, Anestésico geral injetável, DOPALEN, Ceva);
- Cloridrato de xilazina 2% (Xilazina; Analgésico, anestésico, Miorrelaxante e sedativo; XILAZIN, Syntec);
- Uretana (Sigma) diluído em água destilada;

As drogas foram preparadas no dia do teste.

3.3 Técnica de implante de cânula-guia no CPFMV.

Após período de aclimação de no mínimo de 2 dias os animais foram induzidos à anestesia por uma solução composta cloridrato de ketamina (12mg/Kg) e cloridrato de xilazina (20mg/Kg) na proporção de 5:1 (0,1 mL/100g, i.p.), seguido por adaptação ao aparelho estereotático (Stoelting, USA). Foi administrado anestésico local cloridrato de lidocaína 2% contendo o vasoconstritor norepinefrina (Novocol 100, S.S. White-Brasil, 0,3 mL, s.c.) seguido por pequena incisão longitudinal de aproximadamente 1,5 cm para exposição da calota craniana. A limpeza da região foi feita utilizando-se solução salina e água oxigenada 10%. As coordenadas para implante bilateral de cânulas guia (11 mm) no CPFMV tiveram como referência o atlas The Rat Brain Atlas of Paxinos e Watson (6ªed), e ajustada ao peso corporal dos animais. Coordenadas do CPFMV: Ântero-posterior: +3,3 mm em relação ao bregma; Lateral: + 2,5 mm

a partir da sutura média; Vertical: -3,2 mm em relação à cúpula do crânio, -3.1 mm para porção PL e -3.3 mm para porção IL nos experimentos de diferenciação; Inclinação: 23°; Incisivo = -3,2 (Paxinos and Watson, 2007). A fim de prevenir infecção decorrente do procedimento cirúrgico, o animal recebeu Pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, BR), 0,3 mL, por via intramuscular e por sua vez foi administrado 0,3 mL de analgésico Banamine (Schering-Plough S/A-Brasil, 2,5 mg/mL/Kg, s.c.) por via subcutânea, para reduzir a dor pós-cirúrgica.

3.4 Condicionamento ao contexto

Quatro dias após a realização da cirurgia estereotáxica os animais foram submetidos à sessão de condicionamento de baixa ou alta intensidade de choques. Primeiramente os animais foram separados e acomodados em caixas individuais. Os mesmos foram habituados por 10 minutos em uma caixa teste com assoalho capaz de deflagrar choques, ressaltando que nesta sessão nenhum choque foi deflagrado (23 x 20 x 2 cm Insight Insight Instruments Ribeirão Preto, Brasil). Em uma segunda exposição à caixa, os animais foram condicionados de acordo com protocolo de baixa intensidade de choques padronizado em nosso laboratório (3 choques inescapáveis de 0,85 mA/ 2s, com intervalo randomizado variando de 20 a 60 segundos) ou de alta intensidade (6 choques inescapáveis de 1,5mA/3s, com intervalos randomizados variando de 20 a 60s)(Lisboa *et al*, 2010a).

48h após o condicionamento, os animais foram re-expostos a caixa de condicionamento, sessão teste, sendo continuamente registrado a PAM, FC e TC durante todo período. Juntamente com a resposta autonômica foi registrado manualmente o tempo de congelamento como medida comportamental

associada à REC. O congelamento foi considerado como a ausência total de movimentos, exceto aqueles relacionados à respiração (Fanselow, 1980).

3.5 Canulação da artéria femoral

Um dia antes da sessão teste os animais passaram por novo procedimento cirúrgico para canulação da artéria femoral. Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (12mg/Kg) e cloridrato de xilazina (20mg/Kg) na proporção de 5:1 (0,1 mL/100g, i.p.) para o implante de uma cânula na artéria femoral que foi introduzida até a artéria aorta abdominal inferior. A cânula foi constituída por segmento de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldado a segmento de polietileno PE-50 (2-13 cm), sendo preenchida com uma solução de salina e anticoagulante (heparina) e obstruída com pino de metal. A cânula foi exteriorizada no dorso do animal por meio de um trocater e fixada à pele por sutura cirúrgica. A fim de reduzir a dor pós-cirúrgica foi administrado por via subcutânea 0,3 mL de analgésico Banamine (Schering-Plough S/A-Brasil, 2,5 mg/mL/Kg, s.c.). Os animais foram mantidos em caixas individuais até a realização do experimento.

3.6 Registros da PAM, FC e TC.

O registro da PAM e FC foi obtido após a conexão do cateter arterial anteriormente heparinizado a um transdutor de pressão acoplado a um amplificador de sinais (AECAD E 04P) integrado a um sistema de aquisição de dados computadorizados (Power Lab, USA). A variação da TC foi registrada manualmente utilizando uma câmera térmica Termovisor Modelo NV 384 (THERMOCOM®, Nashua, NH 03062, USA). No dia do teste, valores

autonômicos basais foram avaliados antes do tratamento e da re-exposição ao contexto aversivo, por aproximadamente 10 minutos.

3.7 Técnica para microinjeção de drogas no vCPFM.

As microinjeções foram realizadas com seringa de 1 µL, modelo KH7001 (Hamilton, USA) conectada a uma agulha microinjetora de metal (33 G) através de um tubo de polietileno PE-10. A agulha microinjetora 1,0 mm mais longa do que a cânula guia. As microinjeções foram dadas em um volume de 100 nL, bilateralmente no CPFMv. Após as microinjeções as agulhas foram mantidas por um período de 30 segundos na cânula para evitar refluxo. O intervalo entre as microinjeções foi de 5 minutos, quando da administração de mais de uma droga no CPFMv. O teste teve início 10 minutos após a administração da última injeção.

3.8 Determinação anatômica do local de injeção

Ao final do teste, os animais foram anestesiados com uretana 25% (10mL/Kg). A seguir o animal foi submetido à perfusão transcardíaca, 20 mL de solução salina (NaCl 0,9%) seguida por 20 mL de formalina a 10%. O procedimento consiste na abertura da caixa torácica para exposição do coração, bloqueio da aorta descendente com uma pinça hemostática a fim de facilitar a perfusão cerebral. A seguir, foi introduzida no ventrículo esquerdo uma agulha para perfusão e realizado uma pequena incisão no átrio direito para o escoamento do sangue e do perfusato. Após a perfusão o cérebro foi retirado da caixa craniana e mantido em solução de formalina a 10% para fixação, os cérebros foram seccionados (cortes frontais), após 48 horas, com auxílio de um criostato. Os cortes histológicos foram analisados utilizando o Atlas de Paxinos e Watson (2007) como referência.

3.9 Procedimentos experimentais

O protocolo experimental utilizado é demonstrado no esquema geral abaixo.

Para todos os protocolos descritos a seguir, cada animal foi conectado ao sistema de registro de atividade cardiovascular para obtenção de valores basais dos parâmetros cardiovasculares e temperatura cutânea em suas caixas durante 5 minutos. Após 10 minutos da administração da (s) droga (s) ou veículo no CPFMV, os animais ainda conectados ao sistema de registro de atividade cardiovascular, foram re-expostos a caixa de condicionamento, onde permanecerão por 10 minutos.

3.9.1 Avaliação da participação dos receptores NMDA e da via do NO no efeito de antagonista de receptores CB1 no CPFMV na REC contextual.

Primeiramente, para obtenção da dose efetiva do antagonista CB1 (NIDA) foi investigado o efeito da administração de doses crescentes (25, 55, 100 pmol) no CPFMV, sendo posteriormente utilizada nos protocolos seguinte (Lisboa *et al*, 2010a). A fim de verificar o envolvimento dos receptores de glutamato do tipo NMDA, foi administrado previamente no CPFMV dose inefetiva de 2 nmol do antagonista de receptores NMDA o LY 235959 (Resstel *et al*, 2008) 5 minutos antes ao NIDA. A participação do sistema nitrérgico foi investigada através da pré-administração de doses inefetivas do inibidor da nNOS 0.04 nmol (NPLA), do sequestrador extracelular de NO 1 nmol (c-PTIO) e inibidor da enzima GCs 1 nmol (ODQ) (Resstel *et al*, 2008) 5 minutos antes ao antagonista CB1. O

protocolo utilizado foi o de baixa intensidade. O teste teve início 10 minutos após a administração da última droga.

3.9.2 Avaliação do envolvimento dos receptores NMDA e da via do NO no efeito de agonista TRPV1 no CPFMV na REC contextual.

A fim de investigar se os receptores TRPV1 produzem seus efeitos via ativação de receptores de glutamato e da via do NO, foi administrado agonista de receptores TRPV1 em dose efetiva 1 nmol (Terzian *et al*, 2014), em protocolo de baixa intensidade, 5 minutos após a microinjeção de LY 235959 2 nmol (antagonista NMDA), NPLA 0.04 nmol (inibidor da nNOS), c-PTIO 1 nmol (sequestrador de NO) e ODQ 1 nmol (inibidor da GCs) em doses inefetivas (Resstel *et al*, 2008). Além disso, neste protocolo foi realizada a administração prévia de dose inefetiva de NAC 10 nmol (antioxidante e sequestrador de radicais livres). O efeito de doses crescentes administrada no CPFMV de NAC foi previamente investigada para obtenção da dose inefetiva. Os animais foram re-expostos ao contexto 5 min após a administração do agonista TRPV1.

3.9.3 Avaliação da interação dos receptores CB1 e TRPV1 do CPFMV na modulação da REC contextual.

Com objetivo de verificar se a resposta de aumento da REC observada após bloqueio de CB1 no CPFM é dependente da ativação de receptores TRPV1, foi administrado o antagonista TRPV1 6-lodo em dose inefetiva 3 nmol (Terzian *et al*, 2014) 5 minutos antes da microinjeção da dose efetiva de NIDA 55 pmol, em protocolo de baixa intensidade. Ainda, para verificar se a resposta produzida pelo bloqueio de TRPV1 depende da ativação de receptores CB1, dose inefetiva 25 pmol de NIDA foi administrada previamente ao 6-lodo na dose

efetiva de 3 nmol (Terzian *et al*, 2014) no protocolo de alta intensidade. O intervalo entre as microinjeções foi de 5 minutos. Os animais foram re-expostos ao contexto 10 minutos após a administração da última droga.

3.9.4 Avaliação do envolvimento dos receptores NMDA e da via do NO no efeito de inibidor de AChE na REC contextual.

O protocolo teve como objetivo estudar se o efeito sobre a REC contextual observado após administração de Neostigmina (NEO; inibidor da AChE) no CPFMV é dependente da ativação de receptores NMDA, produção/liberação de NO e ativação da GCs. Desta maneira, a NEO foi administrada intra-CPFMV na dose de 1 nmol (Fedoce *et al*, 2016) 5 minutos antes da administração do antagonista NMDA 2 nmol (LY 235959), do inibidor da nNOS 0.04 nmol (NPLA), do sequestrador de NO 1 nmol (c-PTIO), inibidor da GCs 1 nmol (DQ) em doses inefetivas (Resstel *et al*, 2008), utilizando o protocolo de baixa intensidade. O teste teve início após 10 minutos a última injeção de droga.

3.9.5 Avaliação da interação do sistema colinérgico e dos receptores CB1 e TRPV1 no CPFMV sobre a REC contextual.

Para investigar a participação dos receptores TRPV1 no aumento da REC induzida pela NEO, dose inefetiva de 6-Iodo 3 nmol (Terzian *et al*, 2014) foi administrada previamente à dose efetiva de NEO 1 nmol (Fedoce *et al*, 2016), em protocolo de baixa intensidade. O intervalo entre as administrações das drogas foi de 5 minutos, sendo que o teste teve início após 10 minutos da administração da última droga.

A fim de investigar a interação entre o sistema endocanabinoide e colinérgico, foi realizado a administração prévia de antagonista de receptores M3 em dose inefetiva 0.06 nmol (Fumarate), sendo o receptor responsável pelos efeitos da NEO no CPFMv sobre a REC (Fedoce *et al*, 2016). Administração de antagonista CB1 (NIDA 55 pmol) e agonista TRPV1 (CPS 1 nmol) em suas doses efetivas foi realizada 5 min após a primeira injeção. O protocolo utilizado foi o de baixa intensidade e a re-exposição ao contexto aversivo ocorreu 5 minutos (protocolo com agonista TRPV1) ou 10 minutos (protocolo com antagonista CB1) após a administração da última droga.

3.10 Análise Estatística

Os dados coletados foram expressos como média $\pm$ EPM. As variações da PAM (Δ PAM, mmHg), FC (Δ FC, bpm) e TC (Δ °C) foram medidas simultaneamente minuto a minuto por animal durante os 10 minutos de exposição ao contexto. A média de variação desses parâmetros para cada grupo experimental foi calculada. A análise dos dados foi realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, sendo o tempo o fator repetido, o tratamento a variável independente (veículo ou drogas) e as medidas autonômicas as variáveis dependentes. O comportamento de congelamento dos animais foi expresso como percentual do tempo total de exposição à caixa e foi analisado por análise de variância (ANOVA) de uma via, sendo o tratamento a variável independente e a porcentagem de tempo de congelamento a variável dependente. O pós-teste de Duncan foi aplicado em caso de interação significativa entre os fatores. O nível de significância assumido foi $p < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Participação dos receptores NMDA e da via do NO no efeito do antagonista de receptores CB1 no CPFMV na REC contextual.

4.1.1 Efeito da administração de doses crescentes de antagonista de receptores CB1 no CPFMV na REC contextual.

O efeito da administração de doses crescentes de uma antagonista de receptores CB1 no CPFMV sobre a REC e os sítios de injeção dos tratamentos são demonstrados na Figura 1. Houve diferença significativa no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,28}=17,29$; $p<0,05$), sendo que as doses de 55 pmol ($n=9$) e 100 pmol ($n=8$), mas não a de 25 pmol ($n=7$), aumentaram a porcentagem de tempo de congelamento em relação grupo veículo ($n=8$), mas não entre si (Duncan, $p<0,05$).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos, demonstrados na Tabela 1 (Anexo I). Durante o período de re-exposição, houve efeito do tempo nos parâmetros autônomicos (PAM, $F_{14,392}=157,55$, $p<0,05$; FC, $F_{14,392}=107,33$, $p<0,05$; TC, $F_{4,392}=139,53$, $p<0,05$), bem como efeito do tratamento (PAM, $F_{3,28}=8,68$, $p<0,05$; FC, $F_{3,28}=6,09$, $p<0,05$; TC, $F_{3,28}=6,54$, $p<0,05$) e interação entre estes fatores (PAM, $F_{42,392}=4,31$, $p<0,05$; FC, $F_{42,392}=3,69$, $p<0,05$; TC, $F_{42,392}=4,98$, $p<0,05$). O NIDA na dose de 55 e 100 pmol aumentou significamente os parâmetros autônomicos em relação ao grupo veículo (Duncan $p<0,05$). As diferenças significativas desta análise ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 1C-E).

Considerando os resultados deste protocolo, a menor dose efetiva de 55 pmol de antagonista de receptores CB1 foi utilizada nos protocolos seguintes de combinação de drogas, com objetivo de investigar os mecanismos envolvidos na resposta do NIDA injetado no CPFMv sobre a REC.

Figura 1. Efeitos da injeção intra-CPFMv de veículo (DMSO 10%) ou NIDA nas doses de 25, 55 e 100 pmol ($n=7-9$) sobre a REC. Os sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais veículos e NIDA em suas diferentes doses são observados em (A). O efeito do tratamento com antagonista CB1 sobre porcentagem de tempo de congelamento durante a re-exposição ao contexto aversivo é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $p<0,05$ em relação ao grupo veículo, pós-teste de Duncan. Efeitos ao longo do tempo sobre a (C) temperatura cutânea (ΔTC), (D) a pressão arterial média (ΔPAM) e (E) frequência cardíaca (ΔFC). Os símbolos representam à média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento (* $p<0,05$, pós teste de Duncan) em relação aos animais tratados com veículo.

4.1.2 Efeito da injeção das doses efetivas de antagonista CB1 nas porções PL e IL do CPFMV na REC.

A REC desencadeada pelo antagonista CB1 não foi diferente quando a droga foi administrada na porção PL ou IL do CPFMV em ambas doses efetivas de 55 pmol (Figura 2) e 100 pmol (Figura 3). No protocolo com a dose de 55 pmol de antagonista CB1, houve diferença significativa no tempo de congelamento ($F_{2,16}=49,01$, $p<0,05$). A dose de 55 pmol injetada nas porções PL ($n=6$) e IL ($n=6$) aumentou a porcentagem do tempo de congelamento em relação ao grupo veículo ($n=7$; $p<0,05$), mas não foram diferentes entre si (Duncan, $p>0,05$). No protocolo utilizando a dose de 100 pmol, houve diferença significativa no tempo de congelamento ($F_{2,16}=33,68$, $p<0,05$). Da mesma maneira que no protocolo com a dose de 55 pmol, a dose de 100 pmol administrada nas porções PL ($n=7$) e IL ($n=6$) do CPFMV aumentou a porcentagem do tempo de congelamento em relação ao grupo veículo ($n=6$; Duncan, $p>0,05$), mas não se diferiram (Duncan, $p>0,05$).

Não houve diferença nos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos que receberam as doses de 55 e 100 pmol quando administradas nas porções PL ou IL do CPFMV, indicadas na Tabela 1 (Anexo I). Durante o período de re-exposição com o grupo da dose de 55 pmol, houve efeito do tempo (PAM, $F_{14,224}=111,10$, $p<0,05$; FC, $F_{14,224}=69,61$, $p<0,05$; TC, $F_{14,224}=91,23$, $p<0,05$), do tratamento (PAM, $F_{2,16}=10,36$, $p<0,05$; FC, $F_{2,16}=10,24$, $p<0,05$; TC, $F_{2,16}=4,00$, $p<0,05$) e interação entre os fatores tempo e tratamento (PAM, $F_{28,224}=5,24$, $p<0,05$; FC, $F_{28,224}=4,13$, $p<0,05$; TC, $F_{28,224}=3,68$, $p<0,05$). O NIDA na dose de 55 pmol aumentou significativamente os parâmetros autônomicos em relação ao grupo veículo quando administrada nas

porções PL ou IL do vCPFM ($p < 0,05$, Duncan), sendo que a resposta não foi diferente entre as porções ($p > 0,05$). A diferença significativa da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representados nos gráficos (Figura 2C-E). Durante a re-exposição com o grupo da dose de 100 pmol também houve efeito do tempo (PAM, $F_{14,224}=98,46$, $p < 0,05$; FC, $F_{14,224}=75,11$, $p < 0,05$; TC, $F_{14,224}=97,23$, $p < 0,05$), do tratamento (PAM, $F_{2,16}=11,33$, $p < 0,05$; FC, $F_{2,16}=9,61$, $p < 0,05$; TC, $F_{2,16}=4,68$, $p < 0,05$) e interação entre os fatores tempo e tratamento (PAM, $F_{28,224}=5,23$, $p < 0,05$; FC, $F_{28,224}=4,59$, $p < 0,05$; TC, $F_{28,224}=3,41$, $p < 0,05$). A dose de 100 pmol aumentou significamente os parâmetros autônomicos em relação ao grupo veículo quando administrada nas porções PL ou IL do vCPFM ($p < 0,05$, Duncan), sendo que a resposta não foi diferente entre as porções ($p > 0,05$). As diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representados nos gráficos (Figura 3C-E).

Figura 2. Efeitos da injeção de veículo (DMSO 10%) ou NIDA na dose de 55 pmol nas porções PL ou IL do CPFMV (n=6-7) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMV dos grupos experimentais veículo e NIDA são representados em (A). Os efeitos do tratamento com antagonista CB1 nas porções PL ou IL do CPFMV sobre porcentagem de tempo de congelamento são demonstrados em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo, pós-teste de Duncan. Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (ΔTC), a pressão arterial média (ΔPAM) (D) e (E) frequência cardíaca (ΔFC). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento (* $p < 0,05$, pós teste de Duncan) em relação aos animais tratados com veículo. A linha sólida representa os pontos do grupo NIDA 55pmol IL e a linha tracejada os pontos do grupo NIDA 55pmol PL que são diferentes do grupo veículo.

Figura 3. Efeitos da injeção de veículo (DMSO 10%) ou NIDA na dose de 100 pmol nas porções PL ou IL do CPFMV (n=6-7) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMV dos grupos experimentais veículo e NIDA são representados em (A). Os efeitos do tratamento com antagonista CB1 nas porções PL e IL do CPFMV sobre porcentagem de tempo de congelamento são demonstrados em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo, pós- teste de Duncan. Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (ΔTC), (D) a pressão arterial média (ΔPAM) e (E) frequência cardíaca (ΔFC). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento (* $p < 0,05$, pós teste de Duncan) em relação aos animais tratados com veículo. A linha sólida representa os pontos do grupo NIDA 55pmol IL e a linha tracejada os pontos do grupo NIDA 55pmol PL que são diferentes do grupo veículo.

4.1.3 Participação dos receptores NMDA na REC evocada pelo antagonista de receptores CB1 intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação dos receptores NMDA na REC evocada pela menor dose efetiva de NIDA (55 pmol), foi utilizado um antagonista de receptores NMDA, o LY, em uma dose inefetiva de 2 nmol. O LY foi administrado 5 minutos antes do NIDA. A Figura 4 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,28}=15,72$; $p<0,05$). O NIDA (Vei+NIDA; $n=8$) aumentou a porcentagem do tempo de congelamento dos animais, efeito esse que foi revertido com a administração prévia de LY (LY+NIDA; $n=9$) ($p<0,05$, Duncan). O LY (LY+Vei; $n=7$) foi inefetivo em aumentar o tempo de congelamento em relação ao grupo controle (Vei+Vei; $n=8$) ($p>0,05$).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos. Estes dados estão representados na Tabela 1 (Anexo I). Durante a re-exposição ao contexto, nos parâmetros autonômicos houve efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,392}=122,79$, $p<0,05$; FC, $F_{14,392}=117,05$, $p<0,05$; TC, $F_{14,392}=76,98$, $p<0,05$), do tratamento (PAM, $F_{3,28}=6,69$, $p<0,05$; FC, $F_{3,28}=8,98$, $p<0,05$; TC, $F_{3,28}=3,06$, $p<0,05$) e interação tempo e tratamento (PAM, $F_{42,392}=3,27$, $p<0,05$; FC, $F_{42,392}=3,02$, $p<0,05$; TC, $F_{42,392}=2,48$, $p<0,05$). O grupo NIDA teve aumento da PAM, FC e redução da TC ($p<0,05$, Duncan) e a administração prévia de LY foi capaz de reverter estas alterações autonômicas ($p>0,05$). As diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figure 4C-E).

Figura 4. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, Salina + DMSO 10% ou Salina + NIDA 55pmol, LY 2nmol + DMSO 10%, LY 2nmol + NIDA 55pmol (n=7-9) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Vei + NIDA (pós-teste de Duncan). Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (Δ TC), (D) pressão arterial média (Δ PAM) e (E) frequência cardíaca (Δ HR). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os * indicam diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículos e os # indicam diferença do grupo Vei + NIDA.

4.1.4 Participação da enzima nNOS na REC evocada pelo antagonista de receptores CB1 intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação da produção de NO na REC evocada pela menor dose efetiva de NIDA (55 pmol), foi utilizado um inibidor de nNOS, o NPLA, em uma dose inefetiva de 0,04 nmol. O NPLA foi administrado 5 minutos antes do NIDA. A Figura 5 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,22}=7,81$; $p<0,05$). O NIDA (Vei+NIDA; $n=7$) aumentou a porcentagem do tempo de congelamento dos animais ($p<0,05$, Duncan), sendo esse efeito revertido com a administração prévia de NPLA (NPLA+NIDA; $n=6$) ($p>0,05$). O NPLA (NPLA+Vei; $n=7$) não alterou o tempo de congelamento em relação ao grupo controle (Vei+Vei; $n=6$).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, representado na Tabela 1 (Anexo I). Durante a re-exposição ao contexto, nos parâmetros autonômicos houve efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,308}=54,96$, $p<0,05$; FC, $F_{14,308}=63,52$, $p<0,05$; TC, $F_{14,308}=69,16$, $p<0,05$), tratamento (PAM, $F_{3,22}=3,14$, $p<0,05$; FC, $F_{3,22}=3,88$, $p<0,05$; TC, $F_{3,22}=3,48$, $p<0,05$) e interação tempo e tratamento (PAM, $F_{42,308}=2,22$, $p<0,05$; FC, $F_{42,308}=2,26$, $p<0,05$; TC, $F_{42,308}=2,71$, $p<0,05$). O NIDA aumentou a PAM, FC e reduziu a TC ($p<0,05$, Duncan), sendo que a administração prévia de NPLA foi capaz de reverter estas alterações autonômicas ($p>0,05$). As diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 5C-E).

Figura 5. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, Salina + DMSO 10% ou Salina + NIDA 55pmol, NPLA 0,04nmol + DMSO 10%, NPLA 0,04nmol + NIDA 55pmol (n=6-7) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Vei + NIDA (pós-teste de Duncan). Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (Δ TC), (D) pressão arterial média (Δ PAM) e (E) frequência cardíaca (Δ HR). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os * indicam diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículos e os # indicam diferença do grupo Vei + NIDA.

4.1.5 Participação do NO extracelular na REC evocada pelo antagonista de receptores CB1 intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação do NO extracelular na REC evocada pela menor dose efetiva de NIDA (55 pmol), foi utilizado um sequestrador de NO, o c-PTIO, em uma dose inefetiva de 1 nmol. O c-PTIO foi administrado 5 minutos antes da administração de NIDA. A Figura 6 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,23}=20,23$; $p<0,05$). O NIDA (Vei+NIDA; $n=8$) aumentou a porcentagem do tempo de congelamento dos animais ($p<0,05$, Duncan), efeito esse que foi revertido com a administração prévia de c-PTIO (c-PTIO+NIDA; $n=6$) ($p>0,05$). O c-PTIO (c-PTIO+Vei; $n=7$) não promoveu alteração da resposta em relação ao grupo controle (Vei+Vei; $n=6$).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, demonstrado na Tabela 1 (Anexo I). Durante a re-exposição ao contexto, nos parâmetros autonômicos houve efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,322}=101,57$, $p<0,05$; FC, $F_{14,322}=51,70$, $p<0,05$; TC, $F_{14,322}=105,25$, $p<0,05$), tratamento (PAM, $F_{3,23}=10,54$, $p<0,05$; FC, $F_{3,23}=3,23$, $p<0,05$; TC, $F_{3,23}=3,12$, $p<0,05$) e interação tempo/tratamento (PAM, $F_{42,322}=5,50$, $p<0,05$; FC, $F_{42,322}=2,28$, $p<0,05$; TC, $F_{42,322}=2,26$, $p<0,05$). O grupo NIDA teve aumento da PAM, da FC e redução da TC ($p<0,05$, Duncan). A administração prévia de c-PTIO foi capaz de reverter estas alterações autonômicas ($p>0,05$). As diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 6C-E).

Figura 6. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, Salina + DMSO 10% ou Salina + NIDA 55pmol, c-PTIO 1nmol + DMSO 10%, c-PTIO 1nmol + NIDA 55pmol (n=6-8) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Vei + NIDA (pós-teste de Duncan). Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (ΔTC), (D) pressão arterial média (ΔPAM) e (E) frequência cardíaca (ΔHR). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os * indicam diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículos e os # indicam diferença do grupo Vei + NIDA.

4.1.6 Participação da enzima GCs na REC evocada pelo antagonista de receptores CB1 intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação da enzima GCs na REC evocada pela menor dose efetiva de NIDA (55 pmol), foi utilizado um inibidor de GCs, o ODQ, em uma dose inefetiva de 1 nmol, 5 minutos antes da administração de NIDA. A Figura 7 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,24}=17,48$; $p<0,05$). O tratamento com NIDA (Vei+NIDA; $n=8$) aumentou a porcentagem do tempo de congelamento dos animais ($p<0,05$, Duncan), efeito esse que foi revertido com a administração prévia de ODQ (ODQ+NIDA; $n=6$) ($p>0,05$). O ODQ (ODQ+Vei; $n=6$) não alterou o tempo de congelamento em relação ao grupo controle (Vei+Vei; $n=8$) ($p>0,05$).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, demonstrado na Tabela 1 (Anexo I). Nos parâmetros autonômicos durante a re-exposição ao contexto, houve efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,336}=96,98$, $p<0,05$; FC, $F_{14,336}=62,07$, $p<0,05$; TC, $F_{14,336}=68,53$, $p<0,05$), tratamento (PAM, $F_{3,24}=4,86$, $p<0,05$; FC, $F_{3,24}=6,94$, $p<0,05$; TC, $F_{3,24}=3,89$, $p<0,05$) e interação tempo/tratamento (PAM, $F_{42,336}=2,79$, $p<0,05$; FC, $F_{42,336}=2,51$, $p<0,05$; TC, $F_{42,336}=2,40$, $p<0,05$). O grupo NIDA apresentou aumento da PAM, da FC e redução da TC em relação ao grupo veículo ($p<0,05$, Duncan) e a administração prévia de ODQ foi capaz de reverter estas alterações autonômicas ($p>0,05$). As diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 7 C-E).

Figura 7. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, Salina + DMSO 10% ou Salina + NIDA 55pmol, ODQ 1nmol + DMSO 10%, ODQ 1nmol + NIDA 55pmol (n=6-8) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. *p<0,05 em relação ao grupo veículo e # p<0.05 em relação ao grupo Vei + NIDA (pós-teste de Duncan). (C) Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (Δ TC), (D) pressão arterial média (Δ PAM) e (E) frequência cardíaca (Δ HR). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os * indicam diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículos e os # indicam diferença do grupo Vei + NIDA.

4.2 Participação dos receptores NMDA e da via do NO no efeito do agonista de receptores TRPV1 no CPFMV na REC contextual.

4.2.1 Efeito da administração de doses crescentes de agonista de receptores TRPV1 no CPFMV na REC contextual.

O efeito da administração de doses crescentes de um agonista de receptores TRPV1, CPS, no CPFMV sobre a REC são mostrados na Figura 8. Houve diferença significativa no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,21}=13,25$; $p<0,05$). A dose de 1 nmol ($n=7$), mas não as doses de 0,1 nmol ($n=6$) e 10 nmol ($n=6$), aumentou a porcentagem de tempo de congelamento em relação grupo veículo ($n=6$) ($p<0,05$, Duncan).

Não houve diferença nos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos, o que é demonstrado na Tabela 2 (Anexo II). Durante o período de re-exposição, nos parâmetros autônomicos houve efeito do tempo (PAM, $F_{14,294}=178,45$, $p<0,05$; FC, $F_{14,294}=71,55$, $p<0,05$; TC, $F_{14,294}=55,69$, $p<0,05$), do tratamento (PAM, $F_{3,21}=16,01$, $p<0,05$; FC, $F_{3,21}=9,84$, $p<0,05$; TC, $F_{3,21}=5,77$, $p<0,05$) e interação entre os fatores tempo e tratamento (PAM, $F_{42,294}=4,53$, $p<0,05$; FC, $F_{42,294}=6,39$, $p<0,05$; TC, $F_{42,294}=4,17$, $p<0,05$). A CPS na dose de 1 nmol aumentou significamente os parâmetros autônomicos em relação ao grupo veículo ($p<0,05$, Duncan). As diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 8C-E).

Figura 8. Efeitos da injeção intra-CPFMv de veículo (DMSO 10%) ou CPS nas doses de 0.1; 1 e 10 pmol (n=6-7) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais veículos e CPS em suas diferentes doses (A). Os efeitos do tratamento com agonista TRPV1 sobre porcentagem de tempo de congelamento são demonstrados em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo, pós- teste de Duncan. Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (ΔTC), (D) a pressão arterial média (ΔPAM) e (E) frequência cardíaca (ΔFC). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento (* $p < 0,05$, pós teste de Duncan) em relação aos animais tratados com veículo.

4.2.2 Participação das porções PL e IL do CPFMV na REC evocada pela dose efetiva de agonista de receptores TRPV1.

A REC desencadeada pelo agonista TRPV1 em sua dose efetiva de 1nmol não mostrou ser diferente quando a droga foi administrada nas porções PL ou IL do CPFMV, demonstrada na Figura 9. Houve diferença significativa no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{2,16}=21,65$, $p<0,05$). A dose de 1nmol quando injetada nas porções PL ($n=7$) ou IL ($n=6$) foi capaz de aumentar a porcentagem do tempo de congelamento em relação ao grupo veículo ($n=6$; $p<0,05$, Duncan). Além disso, não houve diferença da resposta evocada da administração de CPS na porção PL ou IL ($p>0,05$, Duncan).

Não houve diferença nos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos que receberam a dose de 1 nmol de CPS nas porções PL ou IL do CPFMV, representado na Tabela 2 (Anexo II). Durante o período de re-exposição ao contexto aversivo do grupo da dose de 1 nmol de CPS, nos parâmetros autonômicos houve efeito do tempo (PAM, $F_{14,224}=124,66$, $p<0,05$; FC, $F_{14,224}=64,85$, $p<0,05$; TC, $F_{14,224}=84,19$, $p<0,05$), do tratamento (PAM, $F_{2,16}=8,96$, $p<0,05$; FC, $F_{2,16}=3,91$, $p<0,05$; TC, $F_{2,16}=5,07$, $p<0,05$) e interação entre os fatores tempo e tratamento (PAM, $F_{28,224}=2,85$, $p<0,05$; FC, $F_{28,224}=2,51$, $p<0,05$; TC, $F_{28,224}=3,27$, $p<0,05$). A CPS na dose de 1 nmol aumentou significativamente os parâmetros autonômicos em relação ao grupo veículo ($p<0,05$, Duncan) quando administrada nas porções PL ou IL do CPFMV, sendo que a resposta não foi diferente entre as porções ($p>0,05$). As diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 9C-E).

Figura 9. Efeitos da injeção de veículo (DMSO 10%) ou CPS na dose de 1nmol nas porções PL ou IL do CPFMv (n=6-7) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais veículo e CPS são representados em (A). Os efeitos do tratamento com agonista TRPV1 nas porções PL e IL do CPFMv sobre porcentagem de tempo de congelamento são demonstrados em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo, pós-teste de Duncan. Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (ΔTC), (D) a pressão arterial média (ΔPAM) e (E) frequência cardíaca (ΔFC). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento (* $p < 0,05$, pós teste de Duncan) em relação aos animais tratados com veículo. A linha sólida representa os pontos do grupo CPS 1nmol PL e a linha tracejada os pontos do grupo CPS 1nmol IL que são diferentes do grupo veículo.

4.2.3 Participação dos receptores NMDA na REC evocada pelo agonista de receptores TRPV1 intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação dos receptores NMDA na REC evocada pela dose efetiva de CPS (1 nmol), foi utilizado um antagonista de receptores NMDA, o LY, em uma dose inefetiva de 2 nmol, 5 minutos antes da administração de CPS. A Figura 10 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,22}=20,81$; $p<0,05$). Houve efeito do tratamento com CPS (Vei+CPS; $n=7$) no aumento da porcentagem do tempo de congelamento dos animais ($p<0,05$, Duncan), sendo este efeito revertido pela administração prévia de LY (LY+CPS; $n=6$). O LY (LY+Vei; $n=6$) não alterou o tempo de congelamento em relação ao grupo controle (Vei+Vei; $n=7$; $p>0,05$).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, demonstrado na Tabela 2 (Anexo II). Durante a re-exposição ao contexto, nos parâmetros autonômicos houve efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,308}=126,05$, $p<0,05$; FC, $F_{14,308}=96,38$, $p<0,05$; TC, $F_{14,308}=55,26$, $p<0,05$), tratamento (PAM, $F_{3,22}=5,01$, $p<0,05$; FC, $F_{3,22}=2,51$, $p<0,05$; TC, $F_{3,22}=3,28$, $p<0,05$) e interação tempo/tratamento (PAM, $F_{42,308}=3,38$, $p<0,05$; FC, $F_{42,308}=2,51$, $p<0,05$; TC, $F_{42,308}=2,19$, $p<0,05$). A administração de CPS no CPFMv aumentou a PAM, a FC e reduziu a TC ($p<0,05$, Duncan) e a administração prévia de LY foi capaz de reverter estas alterações autonômicas ($p>0,05$). As diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 10C-E).

Figura 10. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, Salina + DMSO 10% ou Salina + CPS 1nmol, LY 2nmol + DMSO 10%, LY 2nmol + CPS 1nmol (n=6-7) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Vei + CPS (pós-teste de Duncan). Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (ΔTC), (D) pressão arterial média (ΔPAM) e (E) frequência cardíaca (ΔHR). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os * indicam diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículos e os # indicam diferença do grupo Vei + CPS.

4.2.4 Participação da enzima nNOS na REC evocada pelo agonista de receptores TRPV1 intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação da produção de NO na REC evocada pela dose efetiva de CPS (1 nmol), foi utilizado um inibidor de nNOS, o NPLA, em uma dose inefetiva de 0,04 nmol. O NPLA foi administrado 5 minutos antes da administração de CPS. A Figura 11 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,22}=9,11$; $p<0,05$). O tratamento com CPS (Vei+CPS; $n=7$) aumentou da porcentagem do tempo de congelamento dos animais ($p<0,05$, Duncan), efeito esse que foi revertido com a administração prévia de NPLA (NPLA+CPS; $n=6$) ($p>0,05$). A administração de NPLA no CPFMv (NPLA+Vei; $n=6$) não promoveu efeito sobre a resposta comportamental em relação ao grupo controle (Vei+Vei; $n=7$).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, demonstrado na Tabela 2 (Anexo II). Nos parâmetros autonômicos, durante a re-exposição ao contexto, houve efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,308}=129,59$, $p<0,05$; FC, $F_{14,308}=80,97$, $p<0,05$; TC, $F_{14,308}=93,50$, $p<0,05$), tratamento (PAM, $F_{3,22}=6,95$, $p<0,05$; FC, $F_{3,22}=5,98$, $p<0,05$; TC, $F_{3,22}=4,54$, $p<0,05$) e interação tempo/tratamento (PAM, $F_{42,308}=4,41$, $p<0,05$; FC, $F_{42,308}=3,31$, $p<0,05$; TC, $F_{42,308}=3,16$, $p<0,05$). A administração de CPS no CPFMv promoveu aumento da PAM, da FC e redução da TC ($p<0,05$, Duncan) em relação ao grupo Veículo. A administração prévia de NPLA foi capaz de reverter estas alterações autonômicas, se igualando a resposta do grupo controle ($p>0,05$). As diferenças significativas da análise de

ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 11 C-E).

Figura 11. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, Salina + DMSO 10% ou Salina + CPS 1nmol, NPLA 0.04nmol + DMSO 10%, NPLA 0.04nmol + CPS 1nmol (n=6-7) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. *p<0,05 em relação ao grupo veículo e # p<0,05 em relação ao grupo Vei + CPS (pós-teste de Duncan). (C) Efeitos ao longo do tempo sobre a temperatura cutânea (Δ TC), (D) pressão arterial média (Δ PAM) e (E) frequência cardíaca (Δ HR). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os * indicam diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículos e os # indicam diferença do grupo Vei + CPS.

4.2.5 Participação do NO extracelular na REC evocada pelo agonista de receptores TRPV1 intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação do NO extracelular na REC evocada pela dose efetiva de CPS (1 nmol) foi utilizado um sequestrador de NO (c-PTIO) em uma dose inefetiva de 1 nmol, 5 minutos antes da administração de CPS. A Figura 12 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,22}=26,23$; $p<0,05$). A administração de CPS no CPFMv (Vei+CPS; $n=6$) aumentou da porcentagem do tempo de congelamento dos animais no teste ($p<0,05$, Duncan), entretanto este efeito não foi revertido com a administração prévia de c-PTIO (c-PTIO+NIDA; $n=7$). O c-PTIO (c-PTIO+Vei; $n=6$) foi inefetivo em aumentar o tempo de congelamento em relação ao grupo controle (Vei+Vei; $n=7$). O grupo tratado com CPS e o grupo c-PTIO+CPS não se mostraram significativamente diferentes ($p>0,05$, Duncan).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, demonstrado na Tabela 2 (Anexo II). Nos parâmetros autonômicos, durante a re-exposição ao contexto, houve efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,308}=113,66$, $p<0,05$; FC, $F_{14,308}=77,41$, $p<0,05$; TC, $F_{14,308}=140,93$, $p<0,05$), tratamento (PAM, $F_{3,22}=4,75$, $p<0,05$; FC, $F_{3,22}=5,01$, $p<0,05$; TC, $F_{3,22}=5,12$, $p<0,05$) e interação tempo/tratamento (PAM, $F_{42,308}=3,11$, $p<0,05$; FC, $F_{42,308}=2,89$, $p<0,05$; TC, $F_{42,308}=2,88$, $p<0,05$). Os grupos CPS e c-PTIO+CPS aumentaram a PAM, a FC e reduziram a TC ($p<0,05$, Duncan) em relação à resposta do grupo controle, demonstrando que a administração prévia de c-PTIO não foi capaz de prevenir o efeito de aumento da REC evocado pelo agonista TRPV1. Os grupos CPS e c-PTIO+CPS não se

diferiram em nenhum dos pontos das respostas de PAM, FC e TC durante a re-exposição ao contexto ($p>0.05$). As diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 12 C-E).

Figura 12. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, Salina + DMSO 10% ou Salina + CPS 1nmol, c-PTIO 1nmol + DMSO 10%, c-PTIO 1nmol + CPS 1nmol (n=6-7) sobre a REC. Sítios de injeção no CPMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (pós-teste de Duncan). Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (ΔTC), (D) pressão arterial média (ΔPAM) e (E) frequência cardíaca (ΔHR). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. A linha sólida representa os pontos do grupo Vei + CPS e a linha tracejada os pontos do grupo c-PTIO + CPS que são diferentes do grupo veículo.

4.2.6 Participação da enzima GCs na REC evocada pelo agonista de receptores TRPV1 intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação da enzima GCs na REC evocada pela dose efetiva de CPS (1 nmol), foi utilizado um inibidor da GCs (ODQ) em uma dose inefetiva de 1 nmol, 5 minutos antes da administração de CPS. A Figura 13 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,23}=16,41$; $p<0,05$). O tratamento com CPS (Vei+CPS; $n=7$) aumentou a porcentagem do tempo de congelamento dos animais ($p<0,05$, Duncan), o que não foi alterado pela administração prévia de ODQ (ODQ+NIDA; $n=8$) em relação ao grupo controle (Vei+Vei; $n=6$). Além disso, a administração de ODQ no CFPMv (ODQ+Vei; $n=6$) não alterou a resposta comportamental em relação ao grupo que recebeu veículo durante a re-exposição ao contexto aversivo ($p>0,05$). Os grupos tratados com CPS e ODQ+CPS não se mostraram significativamente diferentes ($p>0,05$).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, representado na Tabela 2 (Anexo II). Nos parâmetros autonômicos, durante a re-exposição ao contexto, houve efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,322}=89,41$, $p<0,05$; FC, $F_{14,322}=69,60$, $p<0,05$; TC, $F_{14,322}=70,54$, $p<0,05$), tratamento (PAM, $F_{3,23}=10,67$, $p<0,05$; FC, $F_{3,23}=8,26$, $p<0,05$; TC, $F_{3,23}=3,84$, $p<0,05$) e interação tempo/tratamento (PAM, $F_{42,322}=2,84$, $p<0,05$; FC, $F_{42,322}=3,03$, $p<0,05$; TC, $F_{42,322}=2,35$, $p<0,05$). Os grupos CPS e ODQ+CPS aumentaram a PAM, a FC e reduziram a TC ($p<0,05$, Duncan) em relação a resposta do grupo controle durante o teste, demonstrando que a administração prévia de ODQ não foi capaz de prevenir o efeito de

aumento da REC evocado pelo agonista TRPV1. Os grupos CPS e ODQ+CPS não se diferiram em nenhum dos pontos das respostas de PAM, FC e TC durante a re-exposição ao contexto ($p>0.05$). As diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 13C-E).

Figura 13. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, Salina + DMSO 10% ou Salina + CPS 1nmol, ODQ 1nmol + DMSO 10%, ODQ 1nmol + CPS 1nmol (n=6-7) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre a porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (pós-teste de Duncan). Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (ΔTC), (D) pressão arterial média (ΔPAM) e (E) frequência cardíaca (ΔHR). Os símbolos representam à média e as barras o EPM. A linha sólida representa os pontos do grupo Vei + CPS e a linha tracejada os pontos do grupo ODQ + CPS que são diferentes do grupo veículo ($p < 0,05$).

4.2.7 Participação do estresse oxidativo na REC evocada pelo agonista de receptores TRPV1 intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação do estresse oxidativo/nitrosativo na REC evocada pela dose efetiva de CPS (1 nmol), foi utilizado um antioxidante/sequestrador de radicais livres, a N-acetilcisteína (NAC), em uma dose inefetiva de 10 nmol, determinada previamente por meio da realização de um protocolo adicional. A NAC foi administrada 5 minutos antes da administração de CPS. O efeito deste antioxidante ainda não havia sido investigado em nosso protocolo de baixa intensidade no MCC. Desta forma, com a finalidade de determinar uma dose inefetiva de NAC, administramos doses crescentes (1, 5 e 10 nmol) no CPFMv e avaliamos seu efeito sobre as respostas comportamental e autonômica durante o teste. A Figura 14 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Não demonstrou efeito significativo dos tratamentos no tempo de congelamento entre os grupos ($p>0,05$). Nenhuma das doses (NAC 1nmol, $n=6$; NAC 5nmol, $n=6$; NAC 10nmol, $n=8$) se diferenciou do grupo veículo ($n=8$, $p>0,05$).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, representado na Tabela 2 (Anexo II). Nos parâmetros autonômicos, durante a re-exposição ao contexto, houve efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,336}=87,39$, $p<0,05$; FC, $F_{14,336}=53,32$, $p<0,05$; TC, $F_{14,336}=55,30$, $p<0,05$), mas não do tratamento (PAM, $p>0,05$; FC, $p>0,05$; TC, $p>0,05$) ou interação tempo/tratamento (PAM, $p>0,05$; FC, $p>0,05$; TC, $p>0,05$) (Figura 14C,D,E).

Desta maneira, como nenhuma das doses de NAC administradas no CPFMv não apresentaram efeito sobre a REC, a maior dose inefetiva foi

escolhida para o estudo de interação com o agonista de receptores TRPV1 (CPS 1nmol).

Figura 14. Efeitos da injeção intra-CPFMv de veículo (Salina) ou NAC nas doses de 1; 5 e 10nmol (n=6-8) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais veículo e NAC em suas diferentes doses (A). Os efeitos do tratamento com antioxidante sobre porcentagem de tempo de congelamento são demonstrados em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (ΔTC), (D) a pressão arterial média (ΔPAM) e (E) frequência cardíaca (ΔFC). Os símbolos representam a média e as barras o EPM.

No protocolo seguinte, a dose inefetiva de NAC foi administrada previamente à dose efetiva de CPS 1nmol no CPFMv, com a finalidade de investigar se a via oxidativa/nitrosativa do NO é necessário para o efeito do agonista TRPV1. A figura 15 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,25}=20,76$; $p<0,05$). A CPS (Vei+CPS; $n=6$) aumentou a porcentagem do tempo de congelamento dos animais ($p<0,05$, Duncan). A administração prévia de NAC (NAC+Vei, $n=7$) no CPFMv não alterou a resposta comportamental no teste em relação ao grupo veículo (Vei+Vei, $n=8$) ($p>0,05$), entretanto foi capaz de prevenir o aumento do tempo de congelamento induzido pela CPS (NAC+CPS, $n=8$).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, representado na Tabela 2 (Anexo II). Nos parâmetros autonômicos, durante a re-exposição ao contexto, houve efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,350}=100,91$, $p<0,05$; FC, $F_{14,350}=116,66$, $p<0,05$; TC, $F_{14,350}=59,51$, $p<0,05$), tratamento (PAM, $F_{3,25}=7,77$, $p<0,05$; FC, $F_{3,25}=12,86$, $p<0,05$; TC, $F_{3,25}=3,22$, $p<0,05$) e interação tempo/tratamento (PAM, $F_{42,350}=4,01$, $p<0,05$; FC, $F_{42,350}=6,69$, $p<0,05$; TC, $F_{42,350}=2,53$, $p<0,05$). O grupo CPS aumentou a PAM, a FC e reduziu a TC ($p<0,05$, Duncan) em relação a resposta do grupo controle durante a re-exposição ao contexto. Além disso, a administração prévia de NAC no CPFMv foi capaz de prevenir as alterações autonômicas induzidas pelo agonista TRPV1, se igualando a resposta do grupo controle no teste (Duncan, $p>0,05$). As diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 15C,D,E).

Figura 15. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, Salina + DMSO 10% ou Salina + CPS 1nmol, NAC 10nmol+ DMSO 10%, NAC 10nmol + CPS 1nmol (n=6-8) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. *p<0,05 em relação ao grupo veículo e # p<0,05 em relação ao grupo Vei + CPS (pós-teste de Duncan). Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (Δ TC), (D) pressão arterial média (Δ PAM) e (E) frequência cardíaca (Δ HR). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os * indicam diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículos e os # indicam diferença do grupo Vei + CPS.

4.3 Avaliação da interação dos receptores CB1 e TRPV1 do CPFMv na modulação da REC contextual.

4.3.1 Participação do receptor TRPV1 na REC evocada pelo antagonista de receptores CB1 intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação do receptor TRPV1 na REC evocada pela dose efetiva de NIDA (55 pmol) em protocolo de baixa intensidade, foi utilizado um antagonista de receptores TRPV1, o 6-lodo, em uma dose inefetiva de 3 nmol. O 6-lodo foi administrado 5 minutos antes da administração de NIDA. A Figura 16 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,23}=11,52$; $p<0,05$). O tratamento com NIDA (Vei+NIDA; $n=7$) aumentou a porcentagem do tempo de congelamento dos animais ($p<0,05$, Duncan), efeito este que foi revertido com a administração prévia de 6-lodo (6-lodo+NIDA; $n=7$). O 6-lodo (6-lodo+Vei; $n=6$) não alterou o tempo de congelamento em relação ao grupo controle (Vei+Vei; $n=7$; $p>0,05$).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, demonstrado na Tabela 3 (Anexo III). Nos parâmetros autonômicos, durante a re-exposição ao contexto, houve efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,322}=85,68$, $p<0,05$; FC, $F_{14,322}=54,67$, $p<0,05$; TC, $F_{14,322}=54,69$, $p<0,05$), tratamento (PAM, $F_{3,23}=3,25$, $p<0,05$; FC, $F_{3,23}=4,44$, $p<0,05$; TC, $F_{3,23}=3,39$, $p<0,05$) e interação tempo/tratamento (PAM, $F_{42,322}=2,35$, $p<0,05$; FC, $F_{42,322}=1,91$, $p<0,05$; TC, $F_{42,322}=2,47$, $p<0,05$). O grupo NIDA aumentou a PAM, a FC e reduziu a TC em relação ao grupo veículo ($p<0,05$, Duncan) e a administração prévia de 6-lodo foi capaz de prevenir estas alterações autonômicas. As diferenças significativas da análise de ponto a ponto

dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 16C-E).

Figura 16. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, DMSO 10% + DMSO 10% ou DMSO 10% + NIDA 55pmol, 6-lodo 3nmol + DMSO 10%, 6-lodo 3nmol + NIDA 55pmol (n=6-7) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. *p<0,05 em relação ao grupo veículo e # p<0.05 em relação ao grupo Vei + NIDA (pós-teste de Duncan). Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (Δ TC), (D) pressão arterial média (Δ PAM) e (E) frequência cardíaca (Δ HR). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os * indicam diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículos e os # indicam diferença do grupo Vei + NIDA.

4.3.2 Participação do receptor CB1 na REC evocada pelo antagonista de receptores TRPV1 intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação do receptor CB1 na REC evocada por uma dose efetiva de 6-lodo (3 nmol) em protocolo de alta intensidade, foi utilizado um antagonista de receptores CB1, o NIDA, em uma dose inefetiva de 25pmol. O NIDA foi administrado 5 minutos antes da administração de 6-lodo. A Figura 17 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,19}=5,02$; $p<0,05$). O tratamento com 6-lodo (Vei+6-lodo; $n=6$) diminuiu a porcentagem do tempo de congelamento dos animais ($p<0,05$, Duncan), efeito esse que foi prevenido com a administração prévia de NIDA (NIDA+6-lodo; $n=6$). O NIDA (NIDA+Vei; $n=5$) foi inefetivo em diminuir o tempo de congelamento em relação ao grupo controle (Vei+Vei; $n=6$).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, demonstrado na Tabela 3 (Anexo III). Nos parâmetros autonômicos, durante a re-exposição ao contexto, houve efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,266}=115,74$, $p<0,05$; FC, $F_{14,266}=125,51$, $p<0,05$; TC, $F_{14,266}=80,90$, $p<0,05$), tratamento (PAM, $F_{3,19}=3,25$, $p<0,05$; FC, $F_{3,19}=4,20$, $p<0,05$; TC, $F_{3,19}=3,44$, $p<0,05$) e interação tempo/tratamento (PAM, $F_{42,266}=2,20$, $p<0,05$; FC, $F_{42,266}=2,58$, $p<0,05$; TC, $F_{42,266}=2,17$, $p<0,05$). O grupo 6-lodo diminuiu a PAM, a FC e atenuou a redução da TC em relação ao grupo veículo ($p<0,05$, Duncan) e a administração prévia de NIDA foi capaz de prevenir estas alterações autonômicas. As diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 17C,D,E).

Figura 17. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, DMSO 10% + DMSO 10% ou DMSO 10% + 6-Iodo 3nmol, NIDA 25pmol + DMSO 10%, NIDA 25 pmol + 6-Iodo 3nmol (n=5-6) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. *p<0,05 em relação ao grupo veículo e # p<0.05 em relação ao grupo Vei + 6-Iodo (pós-teste de Duncan). Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (Δ TC), (D) pressão arterial média (Δ PAM) e (E) frequência cardíaca (Δ HR). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os * indicam diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículos e os # indicam diferença do grupo Vei + 6-Iodo.

4.4 Participação dos receptores NMDA e da via do NO no efeito de um inibidor de AChE administrado no CPFMV na REC contextual.

4.4.1 Participação dos receptores NMDA na REC evocada pelo inibidor da AChE intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação dos receptores NMDA na REC evocada pela dose efetiva de Neostigmina (NEO, 1nmol), foi utilizado um antagonista de receptores NMDA, o LY, em uma dose inefetiva de 2 nmol, 5 minutos antes da administração de NEO. A Figura 18 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,21}=10,18$; $p<0,05$). O tratamento com NEO (Vei+NEO; $n=6$) aumentou a porcentagem do tempo de congelamento dos animais ($p<0,05$, Duncan), efeito esse que foi prevenido pela administração anterior de LY (LY+NEO; $n=6$). O LY (LY+Vei; $n=6$) foi inefetivo em aumentar o tempo de congelamento em relação ao grupo controle (Vei+Vei; $n=7$).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, demonstrado na Tabela 4 (Anexo IV). Nos parâmetros autonômicos, durante a re-exposição ao contexto, houve efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,294}=76,42$, $p<0,05$; FC, $F_{14,294}=61,81$, $p<0,05$; TC, $F_{14,294}=71,89$, $p<0,05$), tratamento (PAM, $F_{3,21}=4,37$, $p<0,05$; FC, $F_{3,21}=4,50$, $p<0,05$; TC, $F_{3,21}=3,15$, $p<0,05$) e interação tempo/tratamento (PAM, $F_{42,294}=2,53$, $p<0,05$; FC, $F_{42,294}=1,54$, $p<0,05$; TC, $F_{42,294}=2,09$, $p<0,05$). A administração de NEO no CPFMV aumentou a PAM, a FC e reduziu a TC em relação ao grupo veículo ($p<0,5$, Duncanc) e a administração prévia de LY foi capaz de prevenir estas alterações autonômicas ($p>0,05$). As diferenças

significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 18 C,D,E).

Figura 18. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, Salina + Salina ou Salina + NEO 1nmol, LY 2nmol + Salina, LY 2nmol + NEO 1nmol (n=6-7) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Vei + NEO (pós-teste de Duncan). Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (ΔTC), (D) pressão arterial média (ΔPAM) e (E) frequência cardíaca (ΔHR). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os * indicam diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículos e os # indicam diferença do grupo Vei + NEO.

4.4.2 Participação da enzima nNOS na REC evocada pelo inibidor da AChE intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação da produção de NO na REC evocada pela dose efetiva de Neostigmina (NEO 1nmol), foi utilizado um inibidor da enzima nNOS, o NPLA, em uma dose inefetiva de 0.04nmol, 5 minutos antes da administração de NEO. A Figura 19 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,23}=6,31$; $p<0,05$). O tratamento com NEO (Vei+NEO; $n=6$) aumentou a porcentagem do tempo de congelamento dos animais ($p<0,05$, Duncan), efeito esse que foi prevenido com a administração prévia de NPLA (NPLA+NEO; $n=7$) ($p>0,05$). O NPLA (NPLA+Vei; $n=7$) foi inefetivo em aumentar o tempo de congelamento em relação ao grupo controle (Vei+Vei; $n=7$).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, demonstrado na Tabela 4 (Anexo IV). Nos parâmetros autonômicos, durante a re-exposição ao contexto, mostrou efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,322}=87,32$, $p<0,05$; FC, $F_{14,322}=62,94$, $p<0,05$; TC, $F_{14,322}=44,09$, $p<0,05$), tratamento (PAM, $F_{3,23}=4,30$, $p<0,05$; FC, $F_{3,23}=4,69$, $p<0,05$; TC, $F_{3,23}=3,04$, $p<0,05$) e interação tempo/tratamento (PAM, $F_{42,322}=2,45$, $p<0,05$; FC, $F_{42,322}=3,10$, $p<0,05$; TC, $F_{42,322}=2,72$, $p<0,05$). A administração de NEO no CPFMv aumentou a PAM, a FC e reduziu a TC em relação ao grupo veículo ($p<0,05$, Duncan), o que foi preveido pela administração anterior de NPLA. As diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 19C-E).

Figura 19. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, Salina + Salina ou Salina + NEO 1nmol, NPLA 0.04nmol + Salina, NPLA 0.04nmol+ NEO 1nmol (n=6-7) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. *p<0,05 em relação ao grupo veículo e # p<0.05 em relação ao grupo Vei + NEO (pós-teste de Duncan). Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (ΔTC), (D) pressão arterial média (ΔPAM) e (E) frequência cardíaca (ΔHR). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os * indicam diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículos e os # indicam diferença do grupo Vei + NEO.

4.4.3 Participação do NO extracelular na REC evocada pelo inibidor da AChE intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação do NO extracelular na REC evocada pela dose efetiva de Neostigmina (NEO 1nmol), foi utilizado um sequestrador de NO, o c-PTIO, em uma dose inefetiva de 1 nmol, 5 minutos antes da administração de NEO. A Figura 20 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,21}=6,97$; $p<0,05$). O tratamento com NEO (Vei+NEO; $n=6$) aumentou a porcentagem do tempo de congelamento dos animais ($p<0,05$, Duncan), efeito esse que foi preveido pela administração prévia de c-PTIO (c-PTIO+NEO; $n=6$) ($p>0,05$). O c-PTIO (c-PTIO+Vei; $n=6$) não alterou o tempo de congelamento em relação ao grupo controle (Vei+Vei; $n=7$).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, demonstrado na Tabela 4 (Anexo IV). Nos parâmetros autonômicos, durante a re-exposição ao contexto, houve efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,294}=104,50$, $p<0,05$; FC, $F_{14,294}=76,04$, $p<0,05$; TC, $F_{14,294}=75,02$, $p<0,05$), tratamento (PAM, $F_{3,21}=6,65$, $p<0,05$; FC, $F_{3,21}=7,73$, $p<0,05$; TC, $F_{3,21}=3,49$, $p<0,05$) e interação tempo/tratamento (PAM, $F_{42,294}=3,42$, $p<0,05$; FC, $F_{42,294}=3,18$, $p<0,05$; TC, $F_{42,294}=2,23$, $p<0,05$). A administração de NEO no CPFMv aumentou a PAM, a FC e reduziu a TC em relação ao grupo veículo ($p>0,04$, Duncan), sendo que a administração prévia de c-PTIO foi capaz de prevenir estas alterações autonômicas. As diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 20C-E).

Figura 20. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, Salina + Salina ou Salina + NEO 1nmol, c-PTIO 1nmol+ Salina, c-PTIO 1nmol + NEO 1nmol (n=6-7) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. *p<0,05 em relação ao grupo veículo e # p<0.05 em relação ao grupo Vei + NEO (pós-teste de Duncan). Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (Δ TC), (D) pressão arterial média (Δ PAM) e (E) frequência cardíaca (Δ HR). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os * indicam diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículos e os # indicam diferença do grupo Vei + NEO.

4.4.4 Participação da enzima GCs na REC evocada pelo inibidor da AChE intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação da enzima GCs NO na REC evocada pela dose efetiva de Neostigmina (NEO 1nmol), foi utilizado um inibidor da enzima GCs, o ODQ, em uma dose inefetiva de 1 nmol. O ODQ foi administrado 5 minutos antes da administração de NEO. A Figura 21 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,23}=12,35$; $p<0,05$). O tratamento com NEO (Vei+NEO; $n=6$) aumentou a porcentagem do tempo de congelamento dos animais ($p<0,05$, Duncan), efeito esse que foi prevenido com a administração prévia de ODQ (ODQ+NEO; $n=7$) ($p>0,05$). O ODQ (ODQ+Vei; $n=7$) não alterou o tempo de congelamento em relação ao grupo controle (Vei+Vei; $n=7$).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, demonstrado na Tabela 4 (Anexo IV). Nos parâmetros autonômicos, durante a re-exposição ao contexto, houve efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,322}=95,61$, $p<0,05$; FC, $F_{14,322}=97,23$, $p<0,05$; TC, $F_{14,322}=41,16$, $p<0,05$), tratamento (PAM, $F_{3,23}=3,39$, $p<0,05$; FC, $F_{3,23}=6,65$, $p<0,05$; TC, $F_{3,23}=3,41$, $p<0,05$) e interação tempo/tratamento (PAM, $F_{42,322}=3,08$, $p<0,05$; FC, $F_{42,322}=3,45$, $p<0,05$; TC, $F_{42,322}=2,82$, $p<0,05$). A administração de NEO no CPFMv aumentou a PAM, a FC e reduziu a TC em relação ao grupo veículo ($p<0,05$, Duncan) e a administração prévia de ODQ foi capaz de prevenir estas alterações autonômicas ($p>0,05$). As diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 21C-E).

Figura 21. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, Salina + Salina ou Salina + NEO 1nmol, ODQ 1nmol+ Salina, ODQ 1nmol + NEO 1nmol (n=6-7) sobre a REC. Sítios de injeção no CPMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. *p<0,05 em relação ao grupo veículo e # p<0.05 em relação ao grupo Vei + NEO (pós-teste de Duncan). Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (Δ TC), (D) pressão arterial média (Δ PAM) e (E) frequência cardíaca (Δ HR). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os * indicam diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículos e os # indicam diferença do grupo Vei + NEO.

4.5 Interação do sistema colinérgico e dos receptores CB1 e TRPV1 do CPFMV sobre a REC contextual.

4.5.1 Participação dos receptores TRPV1 na REC evocada pelo inibidor da AChE intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação do receptor TRPV1 na REC evocada pela dose efetiva de Neostigmina (NEO 1nmol), foi utilizado um antagonista de receptores TRPV1, o 6-lodo, em uma dose inefetiva de 3 nmol, 5 minutos antes da administração de NEO. A Figura 22 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,24}=10,96$; $p<0,05$). O tratamento com NEO (Vei+NEO; $n=7$) aumentou a porcentagem do tempo de congelamento dos animais ($p<0,05$, Duncan), efeito este que foi prevenido pela administração anterior de 6-lodo (6-lodo+NEO; $n=9$) ($p>0,05$). O 6-lodo (6-lodo+Vei; $n=6$) não alterou o tempo de congelamento em relação ao grupo controle (Vei+Vei; $n=6$) ($p>0,05$).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, demonstrado na Tabela 5 (Anexo V). Nos parâmetros autonômicos, durante a re-exposição ao contexto, mostrou efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,336}=107,19$, $p<0,05$; FC, $F_{14,336}=61,31$, $p<0,05$; TC, $F_{14,336}=79,51$, $p<0,05$), tratamento (PAM, $F_{3,24}=11,01$, $p<0,05$; FC, $F_{3,24}=8,69$, $p<0,05$; TC, $F_{3,24}=3,68$, $p<0,05$) e interação tempo/tratamento (PAM, $F_{42,336}=4,60$, $p<0,05$; FC, $F_{42,336}=3,72$, $p<0,05$; TC, $F_{42,336}=2,73$, $p<0,05$). A administração de NEO no CPFMV aumentou a PAM, a FC e reduziu a TC em relação ao grupo veículo ($p<0,05$, Duncan), sendo que a administração prévia de 6-lodo foi capaz de prevenir estas alterações autonômicas ($p>0,05$). As

diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 22C-E).

Figura 22. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, DMSO 10 % + Salina ou DMSO 10% + NEO 1nmol, 6-lodo 3nmol + Salina, 6-lodo 3nmol + NEO 1nmol (n=6-9) sobre a REC. Sítios de injeção no CPMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. *p<0,05 em relação ao grupo veículo e # p<0.05 em relação ao grupo Vei + NEO (pós-teste de Duncan). Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (ΔTC), (D) pressão arterial média (ΔPAM) e (E) frequência cardíaca (ΔHR). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os * indicam diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículos e os # indicam diferença do grupo Vei + NEO.

4.5.2 Participação dos receptores M3 na REC evocada pelo antagonista de receptores CB1 intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação do receptor M3 na REC evocada pela dose efetiva do antagonista de receptores CB1 (NIDA 55pmol), foi utilizado um antagonista de receptores M3, o Fumarate, em uma dose inefetiva de 0.06 nmol, 5 minutos antes da administração de NIDA. A Figura 23 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,21}=12,20$; $p<0,05$). O tratamento com NIDA (Vei+NIDA; $n=6$) aumentou a porcentagem do tempo de congelamento dos animais em relação ao grupo controle (Vei+Vei; $n=7$) ($p<0,05$, Duncan), e a administração prévia de Fumarate (Fumarate+NIDA, $n=6$) não foi capaz de prevenir o aumento do tempo de congelamento ($p>0,05$). A administração de Fumarate no CFPMv (Fumarate+Vei, $n=6$) não alterou a resposta comportamental em relação do grupo controle ($p>0,05$, Duncan).

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, demonstrado na Tabela 5 (Anexo V). Nos parâmetros autonômicos, durante a re-exposição ao contexto, houve efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,294}=125,71$, $p<0,05$; FC, $F_{14,294}=74,35$, $p<0,05$; TC, $F_{14,294}=178,00$, $p<0,05$), tratamento (PAM, $F_{3,21}=9,80$, $p<0,05$; FC, $F_{3,21}=6,21$, $p<0,05$; TC, $F_{3,21}=6,10$, $p<0,05$) e interação tempo/tratamento (PAM, $F_{42,294}=3,89$, $p<0,05$; FC, $F_{42,294}=2,84$, $p<0,05$; TC, $F_{42,294}=3,90$, $p<0,05$). Os grupos NIDA e Fumarate+NIDA aumentaram a PAM, a FC e reduziram a TC ($p<0,05$) em relação à resposta do grupo controle durante o teste, demonstrando que a administração prévia de Fumarate não foi capaz de prevenir o efeito de aumento da REC evocado pelo antagonista CB1. Os grupos NIDA e

Fumarate+NIDA não se diferiram em nenhum dos pontos das respostas de PAM, FC e TC durante a re-exposição ao contexto ($p>0.05$). As diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 23C-E).

Figura 23. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, Salina + DMSO 10% ou Salina + NIDA 55pmol, Fumarate 0.06nmol + DMSO 10%, Fumarate 0.06nmol + NIDA 55pmol ($n=6-7$) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $p<0,05$ em relação ao grupo veículo (pós-teste de Duncan). Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (ΔTC), (D) pressão arterial média (ΔPAM) e (E) frequência cardíaca (ΔHR). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os * indicam diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículos. A linha sólida representa os pontos do grupo NIDA 55pmol e a linha tracejada os pontos do grupo Fumarate+NIDA que são diferentes do grupo veículo.

4.5.3 Participação dos receptores M3 na REC evocada pelo agonista de receptores TRPV1 intra-CFPMv.

Com o objetivo de avaliar a participação do receptor M3 na REC evocada pela dose efetiva do agonista TRPV1 (CPS 1nmol), foi utilizado um antagonista de receptores M3, o Fumarate, em uma dose inefetiva de 0.06 nmol, 5 minutos antes da administração de CPS. A Figura 24 demonstra graficamente os resultados do protocolo. Houve efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{3,23}=15,71$; $p<0,05$). O tratamento com CPS (Vei+CPS; $n=6$) aumentou a porcentagem do tempo de congelamento dos animais em relação ao grupo controle (Vei+Vei; $n=8$) ($p<0,05$, Duncan), e a administração prévia de Fumarate (Fumarate+CPS, $n=7$) não foi capaz de prevenir o aumento do tempo de congelamento ($p>0,05$). A administração de Fumarate no CPFMv (Fumarate+Vei, $n=6$) não alterou a resposta comportamental em relação do grupo controle ($p>0,05$, Duncan)

Não houve diferença dos valores basais de PAM ($p>0,05$), FC ($p>0,05$) e TC ($p>0,05$) entre os grupos dos protocolos, demonstrado na Tabela 5 (Anexo V). Nos parâmetros autonômicos, durante a re-exposição ao contexto, houve efeito significativo do tempo (PAM, $F_{14,322}=121,80$, $p<0,05$; FC, $F_{14,322}=95,53$, $p<0,05$; TC, $F_{14,322}=168,50$, $p<0,05$), tratamento (PAM, $F_{3,23}=5,73$, $p<0,05$; FC, $F_{3,23}=11,05$, $p<0,05$; TC, $F_{3,23}=5,46$, $p<0,05$) e interação tempo/tratamento (PAM, $F_{42,322}=3,14$, $p<0,05$; FC, $F_{42,322}=5,21$, $p<0,05$; TC, $F_{42,322}=3,82$, $p<0,05$). Os grupos CPS e Fumarate+CPS aumentaram a PAM, a FC e reduziram a TC ($p<0,05$) em relação à resposta do grupo controle durante o teste, demonstrando que a administração prévia de Fumarate não foi capaz de prevenir o efeito de aumento da REC evocado pelo agonista TRPV1. Os grupos CPS e

Fumarate+CPS não se diferiram em nenhum dos pontos das respostas de PAM, FC e TC durante a re-exposição ao contexto ($p>0.05$). As diferenças significativas da análise de ponto a ponto dos parâmetros de PAM, FC e TC estão representadas nos gráficos (Figura 24C-E).

Figura 24. Efeitos da injeção intra-CPFMv dos veículos, Salina + DMSO10% ou Salina + CPS 1nmol, Fumarate 0.06nmol + DMSO10%, Fumarate 0.06nmol + CPS 1nmol ($n=6-8$) sobre a REC. Sítios de injeção no CPFMv dos grupos experimentais são representados em (A). O efeito da administração das drogas sobre porcentagem do tempo de congelamento é demonstrado em (B). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $p<0,05$ em relação ao grupo veículo (pós-teste de Duncan). Efeitos ao longo do tempo sobre (C) a temperatura cutânea (ΔTC), (D) pressão arterial média (ΔPAM) e (E) frequência cardíaca (ΔHR). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os * indicam diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículos. A linha sólida representa os pontos do grupo CPS 1nmol e a linha tracejada os pontos do grupo Fumarate+CPS que são diferentes do grupo veículo.

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados demonstraram que os receptores CB1 e TRPV1 presentes no CPFMV desempenham importante papel na modulação da REC no MCC. Foi demonstrado que o antagonista de receptores CB1 e o agonista de receptores TRPV1 no CPFMV aumentam a REC durante a re-exposição ao contexto aversivo, sendo esta resposta dependente de ativação de receptores NMDA de glutamato e produção de NO através da nNOS. Entretanto, enquanto a resposta evocada pelo antagonista CB1 envolve difusão do NO na fenda sináptica e ativação da GCs, a ativação de TRPV1 promove sua resposta possivelmente por mecanismo pós-sináptico do NO, através de indução de estresse oxidativo/nitrosativo. Foi demonstrado também a interação de ambos os receptores CB1 e TRPV1 nas respostas observadas. O aumento da REC promovido pelo antagonista CB1 no CPFMV depende da ativação de receptores TRPV1 e a diminuição da REC evocada pelo tratamento com antagonista TRPV1 depende da ativação dos receptores CB1.

O papel dos receptores CB1 na modulação de resposta de ansiedade é bem descrita na literatura, no qual sua ativação promove tipicamente respostas do tipo ansiolíticas (Pamplona *et al*, 2006; Patel and Hillard, 2006; Patel *et al*, 2017). O resultado observado no presente trabalho mostrou que a administração de um antagonista de receptores CB1 no CPFMV acentuou tanto a resposta comportamental quanto a autonômica frente a re-exposição a um contexto previamente pareado com choque nas patas. Este dado corrobora evidências do papel pró-aversivo do antagonismo de receptores CB1 da literatura, tanto nos modelos animais de ansiedade baseadas no medo inato, como o LCE (Patel and Hillard, 2006; Lisboa *et al*, 2015), quanto modelos de aprendizado associativo, como o MCC (Pamplona *et al*, 2006; Lisboa *et al*, 2010a). Trabalhos do grupo

com CPFMV demonstraram que o efeito tipo-ansiolítico no LCE mediado pelos eCBs nesta estrutura é via ativação dos receptores CB1 locais (Lisboa *et al*, 2015). No MCC também já foi demonstrado esta mesma relação do receptor CB1 mediando as respostas tipo-ansiolíticas dos eCBs (Lisboa *et al*, 2010a). Estes trabalhos suportam os dados apresentados em nosso estudo, no qual os receptores CB1 presentes no CPFMV possuem um papel importante na modulação de resposta aversivas.

Trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa já haviam demonstrado que o antagonismo de receptores CB1 com o AM251 aumenta a resposta comportamental e cardiovascular durante a re-exposição ao contexto aversivo quando administrado no HD (Spiacci *et al*, 2016), SCPdl (Uliana *et al*, 2016) ou CPFMV (Lisboa *et al*, 2010a). Entretanto, evidências indicam que o AM251 pode também atuar como antagonista de receptores μ -opioides (Seely *et al*, 2012), os quais também estão envolvidos na modulação de resposta de ansiedade e expressão/extinção da resposta condicionada (Sanders *et al*, 2005; Halladay and Blair, 2012; Bowers *et al*, 2012). O receptor μ -opioide é ligado à proteína $G_{i/o}$ (Waldhoer *et al*, 2004) e modula a liberação de neurotransmissores no CPFM (Steketee, 2003), como o glutamato e o GABA (Nicol *et al*, 1996; Giacchino and Henriksen, 1998; Sbrenna *et al*, 1999; Yang *et al*, 2004; Witkowski and Szulczyk, 2006), de forma semelhante à ativação de receptores CB1. Resultados ainda não publicados do grupo mostram que estes receptores podem estar envolvidos na modulação da resposta comportamental no MCC. A administração de antagonista de receptores μ -opioides no CPFMV aumenta o tempo de congelamento dos animais durante re-exposição ao contexto aversivo (Antero, Fassini, Resstel dados não publicados), possivelmente por aumentar a liberação

de glutamato. Este resultado, em partes, poderia justificar o aumento do tempo de congelamento observado nos resultados de Lisboa (2010a) utilizando o AM251 no CPFMV. Desta forma, o AM251 administrado no CPFMV poderia mediar o aumento da resposta comportamental e autonômica no MCC através do antagonismo de receptores CB1 e μ -opioides. Nesse sentido, com finalidade de verificar a participação dos receptores CB1 no CPFMV na modulação da REC, utilizamos um antagonista mais seletivo para receptores CB1 em nosso estudo, o NIDA41020. Resultados demonstraram que esta droga, de maneira semelhante a outros antagonista CB1, bloqueou a resposta de inibição da neurotransmissão glutamatérgica induzido por agonista de receptores CB1 (Katoch-Rouse *et al*, 2003). O NIDA41020 apresenta um K_i de 4,1 nM (Katoch-Rouse *et al*, 2003) para o receptor CB1, enquanto o AM251 apresenta um K_i de 7,49 nM (Lan *et al*, 1999), o que demonstra a maior afinidade do NIDA41020 para o receptor CB1 quando comparado ao AM251. A partir desta informação, fizemos uma relação entre o K_i do NIDA com o do AM251 e a partir deste valor calculamos a dose de NIDA equipotente à dose de AM251 (100 pmol). Esta dose de AM251 foi capaz de aumentar a REC quando administrada no CPFMV em trabalho prévio do grupo (Lisboa *et al*, 2010a). A dose de NIDA obtida foi de 55 pmol. De forma similar ao anteriormente observado com o AM251, a administração da dose de 55pmol de NIDA no CPFMV foi capaz de aumentar a resposta comportamental e autonômica durante a re-exposição ao contexto aversivo. Desta maneira, nossos dados utilizando um antagonista mais seletivo de receptores CB1 podem, portanto, reforçar a ideia que este receptor possuiu um importante papel na modulação de respostas aversivas e, em particular

atribuir o efeito do AM251 visto por Lisboa em 2010 ao receptor CB1 e não ao receptor μ -opioide.

A dose do NIDA de 100 pmol também foi capaz de aumentar a REC de forma semelhante a dose de 55 pmol, não refletindo assim o efeito bifásico comumente observado em estudos que empregam antagonista de receptores CB1, bem como outras drogas que interferem com o sistema endocanabinoide (Moreira *et al*, 2012; Spiacci *et al*, 2016; Uliana *et al*, 2016). A maior seletividade para receptores CB1 pode explicar a manutenção do efeito do NIDA. Neste caso, o aumento da dose de NIDA na faixa utilizada poderia não promover a atuação em outros alvos e consequente perda de seu efeito. Existem evidências de que a resposta ansiolítica mediada por CB1 seja decorrente essencialmente de sua localização em terminais glutamatérgicos (Rey *et al*, 2012). Sendo assim, estes receptores estariam envolvidos nas respostas anti- e pró-aversiva de agonistas e antagonistas CB1, respectivamente. Entretanto, evidências demonstram a capacidade do receptor CB1 de modular as neurotransmissões glutamatérgica e GABAérgicas no CPFM e outras estruturas (Marsicano and Lutz, 1999; Auclair *et al*, 2000; Lafourcade *et al*, 2007; Wedzony and Chocyk, 2009; Katona and Freund, 2012), então o efeito observado poderia ser resultado do balanço destas neurotransmissões mediadas por CB1. Neste sentido, resultados utilizando o antagonista CB1 AM251 na SCPdl e no HD demonstraram que a ausência de efeito da maior dose de AM251 foi prevenida pela administração anterior de um antagonista de receptores GABA_A, ou seja, o aumento da dose do antagonista CB1 possivelmente promoveria sua atuação em terminais GABAérgicos (Spiacci *et al*, 2016; Uliana *et al*, 2016). Estes resultados nos permitem especular que a dose de NIDA utilizada não tenha sido alta o suficiente para promover perda da

resposta e assim gerar um efeito bifásico. Desta maneira, a manutenção do efeito do NIDA em sua maior dose utilizada, cerca de metade da dose do AM251, reflete sua possível característica superior em relação ao AM251 na utilização em estudos comportamentais.

Como abordado na introdução, sabe-se que a AEA pode atuar também em receptores TRPV1 (Zygmunt *et al*, 1999). A AEA, bem como outros agonistas canabinoides, frequentemente produzem resposta bifásica (Rubino *et al*, 2007; Moreira *et al*, 2007, 2012). Além da possível modulação das neurotransmissões glutamatérgica e GABAérgica, como discutido acima, esse efeito dual pode ser explicado pelo fato da AEA ser capaz de ativar receptores TRPV1, além de ativar receptores CB1, sendo que o receptor TRPV1 possui papel oposto ao CB1 na modulação da atividade sináptica (De Petrocellis and Di Marzo, 2009; Kano *et al*, 2009; Araque *et al*, 2017). Os receptores CB1 e TRPV1 estão co-expressos no CPFMV (Fogaça *et al*, 2012), o que nos permite sugerir que são importantes para o balanço da modulação de respostas aversivas pela AEA, uma vez que exercem efeitos opostos. Desta forma, o efeito de aumento da REC observado com a administração de antagonista CB1 no CPFMV durante a re-exposição ao contexto aversivo poderia ser decorrente do favorecimento da ativação de receptores TRPV1 pela AEA. Dessa forma, uma vez que CB1 encontra-se bloqueado, haveria favorecimento da liberação de glutamato via TRPV1. A fim de verificar essa possibilidade, administramos previamente ao antagonista de receptores CB1 um antagonista de receptores TRPV1, o 6-Iodo, no CPFMV e observamos que a resposta de aumento da REC foi prevenida. Este resultado corrobora nossa hipótese de que o antagonismo de receptores CB1 favorece a

sinalização por TRPV1 no CPFMV, refletindo o papel pró-aversivo deste receptor.

Para confirmar a relação entre CB1 e TRPV1 nas respostas observadas, investigamos também se a resposta mediada pelos receptores TRPV1 no CPFMV sobre a REC é dependente a ativação de receptores CB1. Para investigar essa possibilidade, utilizamos um protocolo de condicionamento mais aversivo. Evidências mostram que a magnitude da resposta condicionada é dependente da intensidade do estímulo aversivo no medo condicionado (Baldi *et al*, 2004; Lisboa *et al*, 2010a). Nesse sentido, um protocolo mais aversivo, com alta intensidade de choques, 1,5 mA, e maior número e duração dos mesmos, geram respostas comportamentais e autonômicas mais intensas (Resstel *et al*, 2006b; Lisboa *et al*, 2010a), permitindo assim a observação de efeitos tipo-ansiolíticos. O protocolo de menor aversividade, menor intensidade de choques, 0,85 mA, e menor número/duração induz respostas comportamentais e autonômicas intermediárias, fato esse que possibilita a obtenção de efeitos que acentuam a REC (Lisboa *et al*, 2010a). Desta forma, administramos um antagonista de receptores TRPV1, o 6-Iodo, no CPFMV em protocolo de alta intensidade e observamos a redução nas respostas de congelamento e autonômica durante a re-exposição ao contexto.

A deleção genética do receptor TRPV1 em camundongo promove redução da resposta de ansiedade no LCE e MCC (Marsch *et al*, 2007). Além disso, já foi demonstrado que um antagonista TRPV1 no CPFMV induz efeito tipo-ansiolítico no LCE (Aguiar *et al*, 2009), evidências que suportam o papel do receptor TRPV1. Além disso, já foi demonstrado que administração de antagonista TRPV1 no CPFMV produziu efeito tipo-ansiolítico no LCE via

ativação de receptores CB1 (Fogaça *et al*, 2012). Nesse sentido, em nosso estudo o efeito do antagonista TRPV1 no CPFMV foi prevenido com a administração prévia de uma dose inefetiva de antagonista CB1 no MCC. Assim, demonstramos que a diminuição da REC observada com antagonista TRPV1 depende da ativação de receptores CB1. Estes resultados nos permitem sugerir que o efeito tipo-ansiolítico observado com antagonista TRPV1 pode ser decorrente da ativação dos receptores CB1, pela AEA, uma vez que os receptores TRPV1 se encontram bloqueados. Esta possibilidade foi recentemente testada no HD, onde foi observado que administração de uma droga que inibe a degradação da AEA e também bloqueia receptores TRPV1 atenuou a expressão do MCC, sendo este efeito prevenido por antagonista CB1 (Gobira *et al*, 2017). Portanto, estes estudos mostram a íntima relação entre os receptores TRPV1 e CB1 na modulação de respostas relacionadas à ansiedade.

Utilizando uma outra abordagem farmacológica, administramos um agonista de receptores TRPV1 (CPS 1nmol) no CPFMV antes da re-exposição ao contexto e observamos aumento dos parâmetros comportamental e autonômico no teste. Estes resultados já foram demonstrados previamente pelo nosso grupo de pesquisa no estudo de Terzian e colaboradores (2014). Entretanto, a dose maior de CPS (10 nmol) não foi capaz de aumentar a REC no CPFMV, diferentemente da dose efetiva de 1 nmol. Uma possibilidade é que a ativação de receptores TRPV1 promova produção excessiva de NO, decorrente do aumento de cálcio intracelular no terminal pós-sináptico (Aguiar *et al*, 2014b; Lipina and Hundal, 2017). Uma vez produzido, O NO pode se difundir e assim modular a liberação de outros neurotransmissores, como o GABA (Li *et al*, 2004; Wang *et al*, 2007; Garthwaite, 2008), o que poderia balancear os efeitos

excitatórios do glutamato. Resultados no núcleo do trato solitário (NTS) demonstraram que níveis baixos de NO promovem potenciação da neurotransmissão glutamatérgica e altos níveis de NO levam ao aumento da transmissão GABAérgica (Wang *et al*, 2007). Assim, podemos especular que a maior dose de CPS promove aumento da neurotransmissão GABAérgica, contrabalanceando seus efeitos sobre a neurotransmissão glutamatérgica, por modular o NO. Além disso, a ativação de receptores TRPV1 presentes em células da glia, como os astrócitos e micróglia, pode também promover aumento da liberação de NO, além da liberação glutamato, (Doly *et al*, 2004; Schilling and Eder, 2009; Bari *et al*, 2011; Benito *et al*, 2012). Assim, a maior dose de agonista TRPV1 em nosso estudo pode desencadear um aporte maior de NO através das células da glia. De forma geral, podemos sugerir que altos níveis de NO desencadeados pela ativação excessiva de TRPV1 aumentariam a liberação de GABA e contrabalanceariam os níveis de glutamato no CPFMV com a maior dose de CPS.

O efeito da administração no CPFMV do agonista de receptores TRPV1, CPS, em sua dose efetiva de 1 nmol é semelhante à REC observada com a administração do antagonista CB1, NIDA. Estes dados apoiam o papel oposto exercido pelos receptores CB1 e TRPV1 na modulação de respostas comportamental e autonômica no MCC. Visto que tanto o receptor CB1 quanto o TRPV1 presentes no CPFMV são importante na modulação de resposta de ansiedade e que o CPFMV é subdividido em porções PL e IL (Leonard, 1969; Neafsey, 1990), as quais podem apresentar papéis distintos em alguns modelos animais de ansiedade (Quirk *et al*, 2006; Senn *et al*, 2014), nós investigamos se a resposta induzida pelo antagonista CB1 ou agonista TRPV1 seria diferente

dependendo da porção em que a droga foi injetada. Nossos resultados mostraram que as respostas de aumento do parâmetro comportamental e autonômico não se diferiram quando o antagonista CB1, tanto na dose de 55 quanto de 100 pmol, foi administrado na porção PL ou IL do CPFMV. No mesmo sentido, a microinjeção de agonista TRPV1, em sua dose efetiva de 1 nmol, tanto na porção PL quanto na IL do CPFMV aumentou a resposta comportamental e autonômica durante a re-exposição ao contexto aversivo, não apresentando diferença entre si. Estes resultados demonstram que o efeito de aumento da REC tanto para o antagonista CB1 quanto para o agonista TRPV1 não são diferentes quando administrados nas diferentes porções do CPFMV no MCC. Nossos dados estão de acordo com trabalho prévio do grupo que verificou que inibição reversível das porções PL ou IL do CPFMV com cloreto de cobalto modulou a REC de forma similar (Resstel *et al*, 2006a).

Entretanto, é importante ressaltar que as porções PL e IL possuem papéis diferenciais na extinção da resposta condicionada, principalmente no condicionamento auditório. A porção PL estaria mais relacionada à expressão da resposta condicionada, enquanto a porção IL seria importante para a extinção desta resposta (Quirk *et al*, 2006). Protocolos que envolvem extinção da resposta condicionada exigem um tempo maior de re-exposição, usualmente 30 minutos no MCC, sendo que nosso estudo visou apenas o estudo da expressão da REC (10 minutos de teste). Desta forma, não podemos afirmar ao certo que estas porções estariam modulando a extinção da memória aversiva de maneira diferencial. Porém, dados não publicados do laboratório já mostraram prejuízo na extinção da resposta condicionada com administração de antagonista CB1 no CPFMV, sendo que as resposta não se diferiram quando administradas nas

porções PL e IL no MCC (Reis, dados não publicados). Esta evidência reforça a ideia que as porções do CPFMv não possuem papéis opostos tanto na modulação da expressão quanto da extinção da REC no MCC, particularmente para o antagonista CB1.

Estes papéis diferenciais exercidos pelo CPFMv (PL e IL) no condicionamento ao contexto e auditório na extinção provavelmente são decorrentes da diferença de substratos neurais envolvidos (Quirk and Mueller, 2008). Sabe-se, por exemplo, que no condicionamento ao som a amígdala juntamente com o CPFMv representam substratos essenciais para uma boa resposta de extinção. Ao passo que no MCC, além dessas estruturas, o hipocampo exerce um papel crucial na modulação da extinção, no sentido de ser uma estrutura importante na identificação contextual (Corcoran and Quirk, 2007; Quirk and Mueller, 2008). Portanto, considerando que os efeitos do antagonista CB1 e agonista TRPV1 não foram diferentes quando administradas nas porções PL e IL do CPFMv, as porções do CPFMv nos próximos protocolos não foram diferenciadas.

O objetivo dos próximos protocolos foi investigar os possíveis mecanismos pelos quais a manipulação dos receptores CB1 e TRPV1 no CPFMv desencadeiam seus efeitos sobre a REC. Os receptores CB1, por serem acoplados à proteína Gi (Childers and Deadwyler, 1996) e estarem presentes no terminal pre-sináptico (Egertová *et al*, 1998), possuem papel modulatório sobre a excitabilidade sináptica, sendo que sua ativação influencia a liberação de diversos neurotransmissores como o glutamato e o GABA (Marsicano and Lutz, 1999; Auclair *et al*, 2000; Lafourcade *et al*, 2007; Wedzony and Chocyk, 2009; Katona and Freund, 2012). Experimentos eletrofisiológicos demonstraram que a

ativação de receptores CB1 diminuiu correntes pós-sinápticas excitatórias no CPFM (Auclair *et al*, 2000), refletindo seu papel inibitório sobre a neurotransmissão glutamatérgica. De maneira oposta, a ativação de TRPV1, por ser um canal não seletivo para cátions (Owsianik *et al*, 2006; Wu *et al*, 2010), mostrou facilitar a liberação de glutamato (Starowicz *et al*, 2007; Xing and Li, 2007; Kawahara *et al*, 2011). Nesse sentido, a fim de testar se o aumento da REC observado pela administração de antagonista CB1 ou agonista TRPV1 era dependente de glutamato, nos pré-administramos intra-CPFMv um antagonista de receptores NMDA de glutamato. A administração prévia de antagonista NMDA foi capaz de prevenir o aumento da REC evocado tanto pela administração de antagonista CB1 quanto de agonista TRPV1, resultado este que sugere que ambas respostas dependem da ativação de receptores NMDA. Portanto, o antagonismo de receptor CB1 ou ativação de TRPV1 possivelmente promove aumento na liberação de glutamato, o que gera assim consequências na expressão da REC.

O antagonismo de receptores CB1 pode induzir desinibição da neurotransmissão glutamatérgica, uma vez que se acredita que o receptor CB1 apresente atividade constitutiva e, assim, o antagonista CB1 pode atuar como agonista inverso (Pertwee, 2005). Isto é, o antagonista diminui a atividade constitutiva do receptor que, no caso do receptor CB1, é representada pela diminuição da liberação de glutamato; assim, seu bloqueio pode acarretar no aumento de glutamato. Já a ativação direta de TRPV1 possivelmente aumenta a liberação de glutamato pelo aumento dos níveis de Ca^{+2} no terminal pré-sináptico (Owsianik *et al*, 2006; Kano *et al*, 2009; Aguiar *et al*, 2014b). Estes

eventos podem culminar no aumento da resposta comportamental e autonômica durante a re-exposição ao contexto, como observado em nosso estudo.

Nossos dados corroboram com dados já descritos na literatura que demonstram que a modulação da resposta condicionada propiciada pelos eCBs envolve a neurotransmissão glutamatérgica. A deleção de receptores CB1 em neurônios glutamatérgicos aumenta a resposta comportamental durante a re-exposição ao estímulo aversivo no MC (Kamprath *et al*, 2009; Metna-Laurent *et al*, 2012). No LCE, foi demonstrado também que o efeito tipo-ansiolítico desencadeado por dose baixa de agonista CB1 em animais selvagens não é observado em animais que apresentam deleção do receptor CB1 em neurônios glutamatérgicos (Rey *et al*, 2012). Esta neurotransmissão mostrou ser responsável também pelos efeitos comportamentais e autonômicos da alta dose de Δ^9 -tetraidrocannabinol (Δ^9 -THC - agonista CB1), uma vez que camundongos com deleção condicional de receptores CB1 em neurônios glutamatérgicos não apresentaram esses efeitos (Monory *et al*, 2007). Tais resultados demonstram a modulação da neurotransmissão glutamatérgica por receptores CB1 e suas consequências em respostas comportamentais. Entretanto, estudos envolvendo esta abordagem para os receptores TRPV1 não são descritos na literatura. Mas acredita-se também que os receptores TRPV1 modulem respostas comportamentais através da neurotransmissão glutamatérgica, considerando diversos estudos eletrofisiológicos que mostram sua capacidade em aumentar as correntes excitatórias pós-sinápticas em diversas estruturas cerebrais (Starowicz *et al*, 2007; Xing and Li, 2007; Kawahara *et al*, 2011; Araque *et al*, 2017).

Considerando a importância do sistema glutamatérgico nas respostas promovidas pelo antagonista CB1 e agonista TRPV1 no CPFMV, outro sistema importante relacionado a este sistema é o nitrérgico (Garthwaite, 2008; Lipina and Hundal, 2017). A ativação de receptores NMDA está diretamente ligada à ativação de nNOS (Garthwaite and Boulton, 1995). O receptor NMDA fica conectado à enzima nNOS na face interna do receptor pela proteína PSD95 (*postsynaptic domain*-domínio pós-sináptico)(Esplugues, 2002). A ativação de NMDA acarreta assim aumento do Ca^{2+} intracelular, que promove a ativação da nNOS com consequente produção de NO (Garthwaite, 1991). Estudos mostraram que a resposta defensiva evocada por um doador de NO na SCP de ratos é prevenida com administração local de antagonista NMDA (Moreira *et al*, 2004). Outra evidência, ainda, mostra que a resposta gerada por injeção de NMDA na SCP em camundongos é atenuada por inibidor de nNOS (Miguel and Nunes-de-Souza, 2008). No CPFMV, a administração de um inibidor da nNOS foi capaz de prevenir a resposta pressórica e taquicárdica da injeção de l-glutamato (Resstel and Corrêa, 2006). Estes resultados refletem a íntima ligação da via NMDA-NO na modulação da resposta cardiovascular e comportamental. Desta maneira, sabendo que o aumento da REC observado com antagonista CB1 e agonista TRPV1 no vCPFM é dependente de ativação de receptores NMDA, a participação do sistema nitrérgico foi estudada. A administração de inibidor da nNOS preveniu o aumento da REC evocado pelo antagonista CB1 e agonista TRPV1, o que mostra que a produção de NO é uma etapa essencial para promover a resposta no CPFMV.

Corroborando ao nossos dados que mostram a importância do sistema nitrérgico no CPFMV na REC, resultados demonstram que camundongos com

deleção da enzima nNOS apresentam deficiência significativa na expressão da resposta condicionada (Kelley *et al*, 2009; Zoubovsky *et al*, 2011). No MCC, a microinjeção de inibidor da enzima nNOS no CPFMV reduziu a resposta comportamental e autonômica na re-exposição ao contexto aversivo (Resstel *et al*, 2008). Além disso, resultados de crevem que camundongos com deleção genética de CB1 apresentam uma maior atividade total da nNOS no cortex cerebral (Kim *et al*, 2006). Esta evidência nos permite sugerir que o antagonismo de CB1 no CPFMV poderia aumentar a atividade da nNOS e promover produção de NO, uma vez que o papel modulatório do receptor CB1 não estaria presente e, assim, aumentar a REC.

Além disso, evidências demonstram que as respostas mediadas pelo NO podem ser dependentes de sua difusão para fenda sináptica, atuando em nível pré-sináptico, e promovendo aumento da liberação de glutamato (Schmidt *et al*, 1992; Garthwaite, 2008). Nesse sentido, um sequestrado extracelular de NO, o c-PTIO, que reconhecidamente é impermeável à membrana celular e, assim apenas sequestra moléculas extracelulares de NO, foi administrado no CPFMV (Ko and Kelly, 1999). O c-PTIO preveniu o aumento da REC ocasionado pela administração de antagonista de receptores CB1 no CPFMV, mas não a resposta do agonista TRPV1. Este resultado nos sugere que o efeito do antagonista CB1 é dependente da difusão do NO para fenda e que o NO estaria atuando em local diferente de sua produção. Por outro lado, apenas a ativação e produção de NO pela nNOs é importante para resposta produzida pelo agonista TRPV1, sugerindo que o NO atue por algum mecanismo pós-sináptico para desencadear o aumento da REC.

Considerando que a produção de NO é essencial para a REC desencadeada pelo antagonista CB1 e agonista TRPV1 no CPFMV, diferindo possivelmente apenas no local de ação do NO, investigamos para ambas as drogas a participação da enzima GCs nestas respostas. Evidências descrevem que a GCs representa um dos alvos mais importantes do NO e está presente tanto no terminal pré- quanto no pós-sináptico (Russwurm *et al*, 2001; Burette *et al*, 2002; Bellamy *et al*, 2002; Garthwaite, 2008; Koesling *et al*, 2016). Estudos prévios demonstraram que a enzima GCs localizada no terminal pré-sináptico no hipocampo e córtex somatosensorial facilitam a liberação de glutamato (Neitz *et al*, 2011; Wang *et al*, 2017), refletindo o importante papel modulatório do NO em nível pré-sináptico pela GCs. Já foi descrito também no hipocampo que a enzima GCs no terminal pós-sináptico possivelmente aumenta as correntes dos receptores NMDA através da formação de GPMc (Neitz *et al*, 2014). Assim, a GCs poderia modular a resposta promovidas pelo antagonista CB1 e agonista TRPV1, no terminal pré- e pós-sináptico respectivamente. A administração prévia do inibidor da GCs no CPFMV foi capaz de reverter a REC induzida pelo antagonista CB1, mas não pelo agonista TRPV1. Esses resultados demonstram que o antagonista CB1 modula a REC no CPFMV através do mecanismo pré-sináptico do NO pela ativação de GCs, ao passo que o agonista TRPV1 possivelmente por algum mecanismo pós-sináptico, que não a ativação de GCs.

Resultados usualmente apontam para o papel pré-sináptico da GCs modulado pelo NO, acarretando no aumento de GPMc e, assim, favorecendo a liberação de glutamato (Hall and Behbehani, 1998; Garthwaite, 2008; Feil and Kleppisch, 2008; Wang *et al*, 2017) e possivelmente modulando respostas defensivas e de ansiedade. Estudos comportamentais reforçam esta ideia. Por

exemplo, a administração de um inibidor da GCs na SCP previne a resposta defensiva evocada por doador de NO (Braga *et al*, 2009). Já foi descrito em estruturas cerebrais, como HD e SCP, que a administração de inibidor da GCs é capaz de promover resposta tipo-ansiolíticas em diversos modelos comportamentais, como LCE e MCC (Guimarães *et al*, 2005; Spolidório *et al*, 2007; Tonetto *et al*, 2009; Lisboa *et al*, 2013; Aguiar *et al*, 2014a). Estes dados refletem a importância desta enzima GCs na via de sinalização do NO na modulação de resposta defensivas e de ansiedade, corroborando assim nossos achados com antagonista CB1 na expressão da REC. Além disso, o antagonismo de receptores CB1 no HD e SCPdl também aumenta a REC de forma dependente da ativação da nNOS, difusão do NO e ativação da CG (Spiacci *et al*, 2016; Uliana *et al*, 2016). Desta forma, sugere-se que a ativação de NMDA decorrente do aumento da liberação de glutamato induzido pelo antagonista CB1 leva à ativação da nNOS e formação de NO, que se difunde para o terminal pré-sináptico, onde ativa a GCs e aumenta os níveis de GMPc, induzindo a liberação de glutamato. Em conjunto estes eventos culminam no aumento da REC, observado pela microinjeção de antagonista CB1 no CPFMV.

Em relação à resposta desencadeada pelo agonista TRPV1, o inibidor da CGs não foi capaz de prevenir a resposta de aumento da REC no CPFMV, de maneira semelhante ao resultado que foi observado com o sequestrador de NO. Os resultados obtidos com agonista TRPV1 demonstram que a REC depende da ativação de receptores NMDA e produção de NO, mas não da liberação de NO e ativação da GCs. Nossos resultados com agonista TRPV1 no CPFMV se diferem com dados do grupo demonstrando que o agonismo de TRPV1 no HD e SCPdl aumenta a REC de maneira dependente da difusão do NO e ativação da

enzima CGs (Uliana *et al*, 2016; Spiacci, dados não publicados). Este dado nos demonstra que algum mecanismo particular pode estar envolvido no efeito do agonista TRPV1 no CPFMV na modulação da REC. Nesse sentido, algum mecanismo intracelular do NO pode estar mediando a resposta produzida pela microinjeção de agonista TRPV1 no CPFMV.

Evidências da literatura apontam que o NO pode atuar no terminal pós-sináptico através da produção de espécies reativas, como peroxinitrito (ONOO^-) ou o próprio NO ($\text{NO}^\bullet$). Estas espécies podem alterar a função de proteínas através de modificações pós-translacionais, S-nitrosilação pelo $\text{NO}^\bullet$ e nitrotirosinação pelo ONOO^- , e assim alterar a atividade sináptica (Quijano *et al*, 1997; Bradley and Steinert, 2016). A produção de NO no terminal pós-sináptico, decorrente da ativação de receptores TRPV1, pode aumentar a REC pelo mecanismo de S-nitrosilação e nitrotirosinação de proteínas. Considerando essas evidências, nos pré-administramos um antioxidante/sequestrador de espécies reativas no CPFMV com a finalidade de testar esta hipótese. Nos utilizamos a n-acetilcisteína (NAC), que já demonstrou reduzir a formação de peroxinitrito em situações de produção excessiva (Kumar and Sitasawad, 2009). Foi observado que a administração de NAC no CPFMV preveniu o aumento da REC evocada pelo agonista de receptores TRPV1. Este resultado nos demonstra que no CPFMV a ativação de TRPV1 modula a REC através da formação de espécies reativas que possivelmente estariam desencadeando modificações pós-translacionais (S-nitrosilação e nitrotirosinação) sobre a função proteica.

Os mecanismos de S-nitrosilação e nitrotirosinação na pós-sinapse ainda necessitam de ampla investigação. Não são conhecidos muito alvos proteicos

pelo qual este evento possa modular a atividade sináptica. Acredita-se que mecanismo pós-sinápticos representem importantes mecanismos envolvidos na modulação da atividade sináptica, podendo desencadear alterações na densidade de receptores na membrana e sua excitabilidade (Pozo and Goda, 2010). Alguns mecanismos pós-sinápticos de S-nitrosilação são descritos, como por exemplo, sobre a função dos receptores NMDA. Resultados mostram que a subunidade NR2 do receptor NMDA pode ser s-nitrosilada, culminando na sua inibição (Choi *et al*, 2000). Por outro lado, modificações pós-translacionais já foram descritas também para o receptor AMPA de glutamato, no qual a s-nitrosilação de uma proteína que regula sua expressão na membrana promove aumento da disponibilidade destes receptores na membrana de maneira dependente de receptores NMDA (Selvakumar *et al*, 2009). Desta maneira, uma possibilidade é de que o balanço promovido entre a função dos dois receptores pode ser determinante para desencadear o efeito do agonista TRPV1 no CPFMV sobre a REC. Entretanto, mais estudos são necessários a fim de determinar se a S-nitrosilação seria importante para o efeito do agonista TRPV1 no CPFMV, bem como quais alvos estariam envolvidos particularmente nesta resposta.

Desta maneira, os receptores CB1 e TRPV1 no CPFMV modulam opostamente a REC através da regulação principalmente da liberação de glutamato. Considerando estes dados, a ACh representa um importante neurotransmissor importante tanto na produção de eCBs quanto de NO (Wang *et al*, 1996; Cuadra and El-Fakahany, 1997, 1998; Borda *et al*, 1998; Carriere and El-Fakahany, 2000; Kim *et al*, 2002) e possivelmente modularia a neurotransmissão glutamatérgica. Utilizamos um inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE), a NEO, com a finalidade de aumentar os níveis de

ACh na fenda sináptica e promover aumento da REC. A administração da NEO no CPFMV foi capaz de aumentar a REC durante a re-exposição ao contexto aversivo, resultado esse já demonstrado previamente pelo nosso grupo de pesquisa (Fedoce *et al*, 2016). De fato, o sistema colinérgico representa uma importante neurotransmissão envolvida da modulação da resposta condicionada (Wilson and Fadel, 2017). A re-exposição do animal ao contexto aversivo promove aumento dos níveis de ACh no CPFMV (Acquas *et al*, 1996), provavelmente através da ativação de aferências colinérgicas provenientes do procérebro (Mesulam *et al*, 1983a, 1983b; Woolf *et al*, 1983) que são importantes no controle do medo condicionado (LeDoux, 1992; Weinberger, 1998; Weinberger and Bakin, 1998; Knox, 2016). De acordo com isso, nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que o possível aumento dos níveis de ACh no CPFMV-PL através da inibição da AChE promoveu efeito tipo-ansiolítico através de receptores M1 no LCE (Fogaça *et al*, 2016). Além disso, o inibidor da AChE no CPFMV desencadeia aumento da REC (Fedoce *et al*, 2016) e alterações cardiovasculares (Fassini *et al*, 2015) através da ativação de receptores M3. Corroborando com o papel dos receptores M3 no MCC, já foi descrito também que camundongos com deleção genética de M3 apresentam deficiência no aprendizado da memória aversiva (Poulin *et al*, 2010). Tais resultados demonstram o importante papel dos receptores M3 no MCC mediando os efeitos da ACh.

Resultados apótam para a localização pós-sináptica dos receptores M1 e M3 (Levey, 1993; Quirion, 1993), predominantemente em neurônios piramidais em áreas corticais (Rouse *et al*, 1998, 1999; Volpicelli and Levey, 2004). É descrito também que a ACh modula a atividade de neurônios piramidais no

córtex cerebral (McCormick, 1993; Metherate and Ashe, 1993), possivelmente pela ativação de receptores M1 ou M3. Além disso, a ativação de receptores muscarínicos aumenta a excitabilidade de neurônios no CPFMV-IL através da diminuição da condutância de canais de potássio, bem como o bloqueio de receptores muscarínicos prejudica a aquisição e consolidação da memória de extinção (Santini and Porter, 2010; Santini *et al*, 2012). Estes dados nos permitem sugerir que a ACh por meio da ativação de receptores M3, no MCC, representa um importante modulador de neurônios glutamatérgicos no CPFMV. Assim, acreditamos que a ACh modularia a REC no CPFMV através do aumento da liberação de glutamato. Investigamos se a diminuição da metabolização da ACh por um inibidor da AChE dependeria da ativação de receptores NMDA no CPFMV sobre a REC. A administração prévia de antagonista de receptores de NMDA no CPFMV foi capaz de prevenir a resposta comportamental e autonômica evocada pelo inibidor da AChE. Este resultado apoia a ideia de que a ACh promove seu efeito na modulação de respostas defensivas no CPFMV através de glutamato.

Além disso, o aumento dos níveis de ACh no CPFMV promovido pelo inibidor da AChE poderia também favorecer a ligação da ACh aos receptores nicotínicos. Existem poucas evidências na literatura demonstrando o papel destes receptores na modulação da resposta condicionada no CPFMV (Wilson and Fadel, 2017). A injeção sistêmica de nicotina em camundongos antes da re-exposição ao contexto aversivo aumenta a resposta condicionada (Gould and Higgins, 2003). Outro trabalho demonstra que administração de nicotina no CPFM antes do teste não foi capaz de modificar a resposta condicionada, entretanto a microinjeção de antagonistas seletivos $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$ diminuíram a

resposta condicionada (Raybuck and Gould, 2010). Acredita-se que estes receptores atuem principalmente modulando a liberação de neurotransmissores no CPFV, em nível pré-sináptico e, assim, sua ativação promoveria aumento da liberação de neurotransmissores, como glutamato e GABA (dos Santos Coura and Granon, 2012). Nesse sentido, a ativação dos receptores nicotínicos $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$ no CPFV poderia favorecer a REC conjuntamente com a ativação de receptores M3. Desta forma, não podemos descartar a possibilidade da ativação de receptores nicotínicos pela ACh e esta ideia ainda necessita ser melhor investigada em nosso modelo.

A modulação da liberação de glutamato promovida pela ACh provavelmente é decorrente da produção de NO e eCBs (Huang and Hsu, 2010; Martin *et al*, 2015). Como descrito na introdução, a ativação de receptores muscarínicos desencadeia produção de NO por aumentar a concentração de Ca^{+2} intracelular (Wang *et al*, 1996; Cuadra and El-Fakahany, 1998, 1997; Borda *et al*, 1998; Christopoulos and El-Fakahany, 1999; Carriere and El-Fakahany, 2000). Desta maneira, a ativação de receptores M3 pela ACh poderia ser um estímulo para produção de NO no CPFV e assim promover aumento da REC. Nós investigamos o papel da enzima nNOS no efeito da administração do inibidor da AChE na REC e observamos que o inibidor da enzima nNOS foi capaz de prevenir o aumento da REC. Este resultado demonstra a importância da produção de NO no efeito da ACh no CPFV.

Entretanto, os efeitos promovidos pela ACh que são mediados pelo NO parecem atuar por mecanismo pré-sináptico no CPFV (Fukudome *et al*, 2004; Narushima *et al*, 2007; Huang and Hsu, 2010; Rinaldo and Hansel, 2013). Nesse sentido, administramos o sequestrador de NO extracelular e o inibidor da enzima

GCs previamente ao inibidor da AChE no CPFMV e observamos que ambos os tratamentos foram capazes de prevenir o aumento da REC. Tais resultados nos permitem sugerir que possivelmente o NO é produzido no terminal pós-sináptico em resposta à ativação de M3 e se difunde para a fenda sináptica e desencadeia ativação da enzima GCs no terminal pré-sináptico, aumentando a liberação de glutamato no CPFMV. Além disso, o estímulo decorrente da ativação de M3 pode também atuar conjuntamente com a ativação de receptores NMDA para promover aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular e assim levar a produção de NO durante a re-exposição ao contexto aversivo.

Evidências eletrofisiológicas demonstram que a ativação de receptores muscarínicos, particularmente M1, promove LTD no CPFMV através de mecanismo pré-sináptico mediado pelo NO (Huang and Hsu, 2010), diferentemente da nossa proposta. Nós acreditamos que a ativação das aferências colinérgicas frente a re-exposição ao contexto aversivo libera ACh no CPFMV, ativa receptores M3 pós-sinápticos e induz aumento da neurotransmissão glutamatérgica através da produção de NO. Desta forma, atribuímos essa diferença à condição experimental empregada. Estudos eletrofisiológicos usualmente empregam abordagens *in vitro* que podem não refletir atividade da estrutura cerebral frente a uma condição experimental, como a re-exposição ao contexto aversivo.

Além disso, outros neuromoduladores podem também atuar mediando a resposta da ACh juntamente com o NO, como os eCBs (Kim *et al*, 2002; Martin *et al*, 2015). Como descrito na literatura, a ativação de receptores M1 e M3 promovem a liberação de eCBs (Kim *et al*, 2002; Ohno-Shosaku *et al*, 2003) quem desencadeiam efeito sobre a transmissão glutamatérgica através da

ativação de receptores CB1 e TRPV1, no caso particular da AEA (Zygmunt *et al*, 1999; Xing and Li, 2007; Auclair *et al*, 2000). A produção de eCBs é provavelmente desencadeada pelo aumento dos níveis de Ca^{+2} intracelular decorrentes da ativação dos receptores muscarínicos (Musella *et al*, 2010; Zhao and Tzounopoulos, 2011; Rinaldo and Hansel, 2013). Estudos investigam extensivamente o papel dos receptores CB1 na depressão sináptica induzida pela ativação de receptores muscarínicos na SCP e CPFMv (Lau and Vaughan, 2008; Martin *et al*, 2015). Outros resultados também demonstram que possivelmente a ativação de receptores M3 bloqueia a indução de LTP através da produção de eCBs e ativação de receptores CB1 no cerebelo (Rinaldo and Hansel, 2013). A ativação de receptores M1 também pode promover supressão de sinapses inibitórias através da ativação de receptores CB1 no hipocampo e estriado (Fukudome *et al*, 2004; Narushima *et al*, 2007). Desta maneira, a ativação de receptores muscarínicos pode ocasionar a produção de eCBs que, via CB1, podem modular tanto neurotransmissões excitatórias quanto inibitórias, sendo esse balanço no CPFMv possivelmente essencial para determinar a REC promovida frente a re-exposição do animal ao contexto aversivo.

Entretanto, pouco se sabe da participação dos receptores TRPV1 na resposta promovida pela ACh ou agonistas de receptores muscarínicos. Evidência eletrofisiológica mostra que a ativação de receptores M1 no estriado induz diminuição da transmissão inibitória decorrente da produção de 2-AG e ativação de receptores CB1, sendo este evento revertido com administração de agonista TRPV1 ou com um inibidor da degradação de AEA (Musella *et al*, 2010). Este dado reflete que os eCBs produzidos em resposta à ativação de receptores muscarínicos podem atuar tanto via receptores CB1 quanto TRPV1. Um outro

estudo na amígdala lateral demonstra que os receptores TRPV1 possivelmente são os mediadores da LTP em situações em que há altos níveis de AEA (Zschenderlein *et al*, 2011). Nesse sentido, uma possibilidade é que o aumento da REC ocasionada pelo inibidor da AChE possa promover uma grande produção de AEA e assim ativar receptores TRPV1, levando ao aumento da resposta comportamental e autonômica na re-exposição ao contexto. Assim, nós administramos um antagonista de receptores TRPV1 anteriormente ao inibidor de AChE no CPFMV e observamos que o bloqueio de TRPV1 foi capaz de prevenir o aumento da REC. Este resultado demonstra o importante envolvimento do receptor TRPV1 na resposta da ACh, reforçando nossa ideia.

Resultados anteriores já descreviam que a resposta mediada pela ACh no CPFMV sobre REC é mediado pelo receptor M3 (Fedoce *et al*, 2016). Assim investigamos o envolvimento deste receptor na REC evocada pelo antagonista CB1 e agonista TRPV1. Foi utilizado um antagonista de receptores M3 na dose inefetiva no protocolo de baixa intensidade capaz de prevenir os efeitos do inibidor da AChE no CPFMV. Ambas as drogas (antagonista CB1 e agonista TRPV1) quando microinjetados no CPFMV aumentaram a REC, como já demonstrado. Porém, a administração prévia de antagonista M3 não preveniu o aumento da REC. Estas evidências nos demonstram que os eCBs não modulam a neurotransmissão colinérgica no CPFMV. Podemos sugerir que a via colinérgica do CPFMV na modulação da REC pode representar a etapa inicial e, assim, a ativação de M3 promove mobilização dos eCBs. Os eCBs, por sua vez, modulariam a liberação de glutamato, mediando a REC. Esta proposta poderia explicar a falta de efeito do antagonista M3 nas respostas moduladas pelos receptores CB1 e TRPV1.

6. CONCLUSÃO

A Figura 25 representa esquematicamente a possível via no CPFMV envolvida na modulação da REC no MCC.

Os resultados deste trabalho nos permitem sugerir que a re-exposição do animal ao contexto previamente pareado com choque nas patas possivelmente induz aumento dos níveis de ACh no CPFMV. A ACh ativaria receptores M3 que, por sua vez, promoveria aumento dos níveis de cálcio no terminal pós-sináptico, induzindo a produção de NO e eCBs. O NO aumentaria a liberação de glutamato através de mecanismos pré-sinápticos e ativação de receptores TRPV1 pela AEA através de mecanismo pós-sináptico. Desta forma, os receptores CB1 representam importantes moduladores da liberação de glutamato frente a liberação de eCBs, enquanto o receptor TRPV1 no CPFMV modula a excitabilidade do terminal pós-sináptico. O antagonista de receptores CB1, da mesma forma que o agonista TRPV1, aumenta a REC de forma dependente da produção de NO no CPFMV. Entretanto, a via do NO envolvida na resposta do antagonista CB1 ocorre possivelmente através de mecanismos pré-sinápticos, como ativação da enzima GCs. A resposta do agonista de receptores TRPV1, entretanto, parece envolver um mecanismo pós-sináptico do NO por meio de estresse nitrosativo, mecanismos que ainda precisam ser investigados.

Figura 25. Esquema representativo de uma possível via ACh-NO/eCBs-Glutamato no córtex pré-frontal medial ventral (CPFMv) envolvida na modulação da resposta emocional condicionada (REC). O aumento de acetilcolina (ACh) promovido pela re-exposição ao contexto levaria a produção de NO e eCBs, decorrentes do aumento intracelular de cálcio. Os eCBs atuariam nos receptores CB1 modulando pré-sinápticamente a liberação de glutamato conjuntamente com o NO produzido e o receptor TRPV1 modularia mecanismos pós-sinápticos. A ativação de receptores TRPV1 promoveria formação de espécies reativas no terminal pós-sináptico para evocar o aumento da REC, conjuntamente à ativação de receptores NMDA pelo glutamato.

Referências bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acquas E, Wilson C, Fibiger HC (1996). Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **16**: 3089–3096.
- Aguiar DC, Hott SC, Deolindo MV, Guimarães FS, Resstel LB (2014a). 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 Oxf Engl* **28**: 479–485.
- Aguiar DC, Moreira FA, Terzian AL, Fogaça MV, Lisboa SF, Wotjak CT, *et al* (2014b). Modulation of defensive behavior by Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 (TRPV1) channels. *Neurosci Biobehav Rev* **46 Pt 3**: 418–428.
- Aguiar DC, Terzian ALB, Guimarães FS, Moreira FA (2009). Anxiolytic-like effects induced by blockade of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the medial prefrontal cortex of rats. *Psychopharmacology (Berl)* **205**: 217–225.
- Andrew PJ, Mayer B (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* **43**: 521–531.
- Araque A, Castillo PE, Manzoni OJ, Tonini R (2017). Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. *Neuropharmacology* **124**: 13–24.
- Auclair N, Otani S, Soubrie P, Crepel F (2000). Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **83**: 3287–3293.
- Baldi E, Lorenzini CA, Bucherelli C (2004). Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. *Neurobiol Learn Mem* **81**: 162–166.
- Bari M, Bonifacino T, Milanese M, Spagnuolo P, Zappettini S, Battista N, *et al* (2011). The endocannabinoid system in rat gliosomes and its role in the modulation of glutamate release. *Cell Mol Life Sci CMLS* **68**: 833–845.
- 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 Off J Soc Neurosci* **15**: 709–720.
- Bellamy TC, Wood J, Garthwaite J (2002). On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 507–510.
- Benito C, Tolón RM, Castillo AI, Ruiz-Valdepeñas L, Martínez-Orgado JA, Fernández-Sánchez FJ, *et al* (2012). β -Amyloid exacerbates inflammation in astrocytes lacking fatty acid amide hydrolase through a mechanism involving PPAR- α , PPAR- γ and TRPV1, but not CB₁ or CB₂ receptors. *Br J Pharmacol* **166**:

1474–1489.

Borda T, Genaro A, Sterin-Borda L, Cremaschi G (1998). Involvement of endogenous nitric oxide signalling system in brain muscarinic acetylcholine receptor activation. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996 **105**: 193–204.

Bowers ME, Choi DC, Ressler KJ (2012). Neuropeptide regulation of fear and anxiety: Implications of cholecystokinin, endogenous opioids, and neuropeptide Y. *Physiol Behav* **107**: 699–710.

Bradley SA, Steinert JR (2016). Nitric Oxide-Mediated Posttranslational Modifications: Impacts at the Synapse. *Oxid Med Cell Longev* **2016**: 5681036.

Braga AA, Aguiar DC, Guimarães FS (2009). NOC-9, a selective nitric oxide donor, induces flight reactions in the dorsolateral periaqueductal gray of rats by activating soluble guanylate cyclase. *Neurosci Lett* **459**: 79–83.

Bredt DS, Snyder SH (1989). Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 9030–9033.

Burette A, Zabel U, Weinberg RJ, Schmidt HHHW, Valtschanoff JG (2002). Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **22**: 8961–8970.

Carriere JL, El-Fakahany EE (2000). Choline is a full agonist in inducing activation of neuronal nitric oxide synthase via the muscarinic M1 receptor. *Pharmacology* **60**: 82–89.

Carrive P (2000). Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. *Brain Res* **858**: 440–445.

Casarotto PC, Terzian ALB, Aguiar DC, Zangrossi H, Guimarães FS, Wotjak CT, *et al* (2012). Opposing roles for cannabinoid receptor type-1 (CB₁) and transient receptor potential vanilloid type-1 channel (TRPV1) on the modulation of panic-like responses in rats. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* **37**: 478–486.

Childers SR, Deadwyler SA (1996). Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* **52**: 819–827.

Choi YB, Tenneti L, Le DA, Ortiz J, Bai G, Chen HS, *et al* (2000). Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci* **3**: 15–21.

Christopoulos A, El-Fakahany EE (1999). The generation of nitric oxide by G protein-coupled receptors. *Life Sci* **64**: 1–15.

Corcoran KA, Quirk GJ (2007). Recalling safety: cooperative functions of the ventromedial prefrontal cortex and the hippocampus in extinction. *CNS Spectr*

12: 200–206.

Cuadra AE, El-Fakahany EE (1997). Enhancement of maximal activation of neuronal nitric oxide synthase at muscarinic M1 receptors following prolonged agonist treatment. *Eur J Pharmacol* **334**: 107–110.

Cuadra AE, El-Fakahany EE (1998). Up-regulation of the neuronal form of nitric oxide synthase in response to prolonged muscarinic M1 receptor stimulation. *J Neurochem* **71**: 571–579.

De Petrocellis L, Di Marzo V (2009). Role of endocannabinoids and endovanilloids in Ca²⁺ signalling. *Cell Calcium* **45**: 611–624.

Di Marzo V, Petrosino S (2007). Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol* **18**: 129–140.

Doly S, Fischer J, Salio C, Conrath M (2004). The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal dorsal horn astrocytes. *Neurosci Lett* **357**: 123–126.

Santos Coura R dos, Granon S (2012). Prefrontal neuromodulation by nicotinic receptors for cognitive processes. *Psychopharmacology (Berl)* **221**: 1–18.

Egertová M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR (1998). A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci* **265**: 2081–2085.

Esplugues JV (2002). NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol* **135**: 1079–1095.

Fanselow MS (1980). Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci* **15**: 177–182.

Fanselow MS (2000). Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res* **110**: 73–81.

Fassini A, Antero LS, Corrêa FMA, Joca SR, Resstel LBM (2015). The prelimbic cortex muscarinic M₃ receptor-nitric oxide-guanylyl cyclase pathway modulates cardiovascular responses in rats. *J Neurosci Res* **93**: 830–838.

Fedoce AG, Ferreira-Junior NC, Reis DG, Corrêa FMA, Resstel LBM (2016). M3 muscarinic receptor in the ventral medial prefrontal cortex modulating the expression of contextual fear conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **233**: 267–280.

Feil R, Kleppisch T (2008). NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission. *Handb Exp Pharmacol* 529–560doi:10.1007/978-3-540-74805-2_16.

Fendt M, Fanselow MS (1999). The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* **23**: 743–760.

Fogaça MV, Aguiar DC, Moreira FA, Guimarães FS (2012). The endocannabinoid and endovanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior. *Neuropharmacology* **63**: 202–210.

Fogaça MV, Fedoce AG, Ferreira-Junior NC, Guimarães FS, Resstel LB (2016). Involvement of M1 and CB₁ receptors in the anxiogenic-like effects induced by neostigmine injected into the rat prelimbic medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* **233**: 1377–1385.

Fryszak RJ, Neafsey EJ (1991). The effect of medial frontal cortex lesions on respiration, “freezing,” and ultrasonic vocalizations during conditioned emotional responses in rats. *Cereb Cortex N Y N* 1991 **1**: 418–425.

Fryszak RJ, Neafsey EJ (1994). The effect of medial frontal cortex lesions on cardiovascular conditioned emotional responses in the rat. *Brain Res* **643**: 181–193.

Fukudome Y, Ohno-Shosaku T, Matsui M, Omori Y, Fukaya M, Tsubokawa H, *et al* (2004). Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling. *Eur J Neurosci* **19**: 2682–2692.

Garthwaite J (1991). Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* **14**: 60–67.

Garthwaite J (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* **27**: 2783–2802.

Garthwaite J, Boulton CL (1995). Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* **57**: 683–706.

Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* **336**: 385–388.

Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S (1989). NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* **172**: 413–416.

Giacchino JL, Henriksen SJ (1998). Opioid effects on activation of neurons in the medial prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **22**: 1157–1178.

Gobira PH, Lima IV, Batista LA, de Oliveira AC, Resstel LB, Wotjak CT, Aguiar DC, Moreira FA. 2017. N-arachidonoyl-serotonin, a dual FAAH and TRPV1 blocker, inhibits the retrieval of contextual fear memory: Role of the cannabinoid CB1 receptor in the dorsal hippocampus. *J Psychopharmacol (Oxford)*. 31:750–756.

Gould TJ, Higgins JS (2003). Nicotine enhances contextual fear conditioning in C57BL/6J mice at 1 and 7 days post-training. *Neurobiol Learn Mem* **80**: 147–157.

Groenewegen HJ (1988). Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. *Neuroscience* **24**: 379–431.

Guimarães FS, Beijamini V, Moreira FA, Aguiar DC, Lucca ACB de (2005). Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosci Biobehav Rev* **29**: 1313–1322.

Hall CW, Behbehani MM (1998). Synaptic effects of nitric oxide on enkephalinergic, GABAergic, and glutamatergic networks of the rat periaqueductal gray. *Brain Res* **805**: 69–87.

Halladay LR, Blair HT (2012). The role of mu-opioid receptor signaling in the dorsolateral periaqueductal gray on conditional and unconditional responding to threatening and aversive stimuli. *Neuroscience* **216**: 82–93.

Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, Costa BR de, Rice KC (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **11**: 563–583.

Huang C-C, Hsu K-S (2010). Activation of muscarinic acetylcholine receptors induces a nitric oxide-dependent long-term depression in rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex N Y N 1991* **20**: 982–996.

Kamprath K, Marsicano G, Tang J, Monory K, Bisogno T, Di Marzo V, *et al* (2006). Cannabinoid CB1 receptor mediates fear extinction via habituation-like processes. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **26**: 6677–6686.

Kamprath K, Plendl W, Marsicano G, Deussing JM, Wurst W, Lutz B, *et al* (2009). Endocannabinoids mediate acute fear adaptation via glutamatergic neurons independently of corticotropin-releasing hormone signaling. *Genes Brain Behav* **8**: 203–211.

Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* **89**: 309–380.

Kasckow JW, Mulchahey JJ, Geraciotti TD (2004). Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behaviors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **28**: 291–295.

Katoch-Rouse R, Pavlova OA, Caulder T, Hoffman AF, Mukhin AG, Horti AG (2003). Synthesis, structure-activity relationship, and evaluation of SR141716 analogues: development of central cannabinoid receptor ligands with lower lipophilicity. *J Med Chem* **46**: 642–645.

Katona I, Freund TF (2012). Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci* **35**: 529–558.

Kawahara H, Drew GM, Christie MJ, Vaughan CW (2011). Inhibition of fatty acid amide hydrolase unmasks CB1 receptor and TRPV1 channel-mediated modulation of glutamatergic synaptic transmission in midbrain periaqueductal grey. *Br J Pharmacol* **163**: 1214–1222.

Kelley JB, Balda MA, Anderson KL, Itzhak Y (2009). Impairments in fear conditioning in mice lacking the nNOS gene. *Learn Mem Cold Spring Harb N* **16**: 371–378.

Kendall DA, Yudowski GA (2016). Cannabinoid Receptors in the Central Nervous System: Their Signaling and Roles in Disease. *Front Cell Neurosci* **10**: 294.

Kim J, Isokawa M, Ledent C, Alger BE (2002). Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **22**: 10182–10191.

Kim SH, Won SJ, Mao XO, Ledent C, Jin K, Greenberg DA (2006). Role for neuronal nitric-oxide synthase in cannabinoid-induced neurogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* **319**: 150–154.

Knox D (2016). The role of basal forebrain cholinergic neurons in fear and extinction memory. *Neurobiol Learn Mem* **133**: 39–52.

Ko GY, Kelly PT (1999). Nitric oxide acts as a postsynaptic signaling molecule in calcium/calmodulin-induced synaptic potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **19**: 6784–6794.

Koesling D, Mergia E, Russwurm M (2016). Physiological Functions of NO-Sensitive Guanylyl Cyclase Isoforms. *Curr Med Chem* **23**: 2653–2665.

Kumar S, Sitasawad SL (2009). N-acetylcysteine prevents glucose/glucose oxidase-induced oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in H9c2 cells. *Life Sci* **84**: 328–336.

Lafourcade M, Elezgarai I, Mato S, Bakiri Y, Grandes P, Manzoni OJ (2007). Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PLoS One* **2**: e709.

Lan R, Liu Q, Fan P, Lin S, Fernando SR, McCallion D, *et al* (1999). Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. *J Med Chem* **42**: 769–776.

Lau BK, Vaughan CW (2008). Muscarinic modulation of synaptic transmission via endocannabinoid signalling in the rat midbrain periaqueductal gray. *Mol Pharmacol* **74**: 1392–1398.

LeDoux JE (1992). Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Curr Opin Neurobiol* **2**: 191–197.

Leonard CM (1969). The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections. *Brain Res* **12**: 321–343.

Levey AI (1993). Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci* **52**: 441–448.

Li D-P, Chen S-R, Finnegan TF, Pan H-L (2004). Signalling pathway of nitric oxide in synaptic GABA release in the rat paraventricular nucleus. *J Physiol* **554**: 100–110.

Lipina C, Hundal HS (2017). The endocannabinoid system: “NO” longer anonymous in the control of nitrergic signalling? *J Mol Cell Biol* **9**: 91–103.

Lisboa SF, Borges AA, Nejo P, Fassini A, Guimarães FS, Resstel LB (2015). Cannabinoid CB1 receptors in the dorsal hippocampus and prelimbic medial prefrontal cortex modulate anxiety-like behavior in rats: additional evidence. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **59**: 76–83.

Lisboa SF, Magesto AC, Aguiar JC, Resstel LBM, Guimarães FS (2013). Complex interaction between anandamide and the nitrergic system in the dorsolateral periaqueductal gray to modulate anxiety-like behavior in rats. *Neuropharmacology* **75**: 86–94.

Lisboa SF, Reis DG, Silva AL da, Corrêa FMA, Guimarães FS, Resstel LBM (2010a). Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. *Int J Neuropsychopharmacol* **13**: 1163–1173.

Lisboa SF, Stecchini MF, Corrêa FMA, Guimarães FS, Resstel LBM (2010b). Different role of the ventral medial prefrontal cortex on modulation of innate and associative learned fear. *Neuroscience* **171**: 760–768.

Marsch R, Foeller E, Rammes G, Bunck M, Kössl M, Holsboer F, *et al* (2007). Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **27**: 832–839.

Marsicano G, Lutz B (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* **11**: 4213–4225.

Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, *et al* (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* **418**: 530–534.

Martin HGS, Bernabeu A, Lassalle O, Bouille C, Beurrier C, Pelissier-Alicot A-L, *et al* (2015). Endocannabinoids Mediate Muscarinic Acetylcholine Receptor-

Dependent Long-Term Depression in the Adult Medial Prefrontal Cortex. *Front Cell Neurosci* **9**: 457.

McCormick DA (1993). Actions of acetylcholine in the cerebral cortex and thalamus and implications for function. *Prog Brain Res* **98**: 303–308.

Mesulam MM, Mufson EJ, Levey AI, Wainer BH (1983a). Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* **214**: 170–197.

Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI (1983b). Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* **10**: 1185–1201.

Metherate R, Ashe JH (1993). Nucleus basalis stimulation facilitates thalamocortical synaptic transmission in the rat auditory cortex. *Synapse* **14**: 132–143.

Metna-Laurent M, Soria-Gómez E, Verrier D, Conforzi M, Jégo P, Lafenêtre P, *et al* (2012). Bimodal control of fear-coping strategies by CB₁ cannabinoid receptors. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **32**: 7109–7118.

Meulemans A (1994). Diffusion coefficients and half-lives of nitric oxide and N-nitroso-L-arginine in rat cortex. *Neurosci Lett* **171**: 89–93.

Mezey E, Tóth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, *et al* (2000). Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3655–3660.

Miguel TT, Nunes-de-Souza RL (2008). 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.

Millan MJ (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* **70**: 83–244.

Monory K, Blaudzun H, Massa F, Kaiser N, Lemberger T, Schütz G, *et al* (2007). Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *PLoS Biol* **5**: e269.

Moreira FA, Aguiar DC, Guimarães FS (2007). Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology* **52**: 958–965.

Moreira FA, Aguiar DC, Terzian ALB, Guimarães FS, Wotjak CT (2012). Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? *Neuroscience* **204**: 186–192.

- Moreira FA, Molchanov ML, Guimarães FS (2004). 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.
- Musella A, De Chiara V, Rossi S, Cavasinni F, Castelli M, Cantarella C, *et al* (2010). Transient receptor potential vanilloid 1 channels control acetylcholine/2-arachidonoylglycerol coupling in the striatum. *Neuroscience* **167**: 864–871.
- Musella A, De Chiara V, Rossi S, Prosperetti C, Bernardi G, Maccarrone M, *et al* (2009). TRPV1 channels facilitate glutamate transmission in the striatum. *Mol Cell Neurosci* **40**: 89–97.
- Narushima M, Uchigashima M, Fukaya M, Matsui M, Manabe T, Hashimoto K, *et al* (2007). Tonic enhancement of endocannabinoid-mediated retrograde suppression of inhibition by cholinergic interneuron activity in the striatum. *J Neurosci* **27**: 496–506.
- Neafsey EJ (1990). Prefrontal cortical control of the autonomic nervous system: anatomical and physiological observations. *Prog Brain Res* **85**: 147-165-166.
- Neitz A, Mergia E, Eysel UT, Koesling D, Mittmann T (2011). Presynaptic nitric oxide/cGMP facilitates glutamate release via hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in the hippocampus. *Eur J Neurosci* **33**: 1611–1621.
- Neitz A, Mergia E, Imbrosci B, Petrasch-Parwez E, Eysel UT, Koesling D, *et al* (2014). Postsynaptic NO/cGMP increases NMDA receptor currents via hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in the hippocampus. *Cereb Cortex N Y N 1991* **24**: 1923–1936.
- Nicol B, Rowbotham DJ, Lambert DG (1996). μ - and κ -opioids inhibit K⁺-evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices. *Neurosci Lett* **218**: 79–82.
- Niyuhire F, Varvel SA, Thorpe AJ, Stokes RJ, Wiley JL, Lichtman AH (2007). The disruptive effects of the CB1 receptor antagonist rimonabant on extinction learning in mice are task-specific. *Psychopharmacology (Berl)* **191**: 223–231.
- Ohno-Shosaku T, Matsui M, Fukudome Y, Shosaku J, Tsubokawa H, Taketo MM, *et al* (2003). Postsynaptic M1 and M3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signalling in the hippocampus. *Eur J Neurosci* **18**: 109–116.
- Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B (2006). Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol* **68**: 685–717.
- Pamplona FA, Prediger RDS, Pandolfo P, Takahashi RN (2006). The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **188**: 641–

649.

Patel S, Hill MN, Cheer JF, Wotjak CT, Holmes A (2017). The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic drugs. *Neurosci Biobehav Rev* **76**: 56–66.

Patel S, Hillard CJ (2006). Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *J Pharmacol Exp Ther* **318**: 304–311.

Pava MJ, Woodward JJ (2014). Chronic ethanol alters network activity and endocannabinoid signaling in the prefrontal cortex. *Front Integr Neurosci* **8**: 58.
Paxinos G, Watson C (Academic Press: San Diego, 2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*.

Paxinos G, Watson C (Academic Press: San Diego, 2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*.

Pertwee RG (2005). Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci* **76**: 1307–1324.

Philippu A (2016). Nitric Oxide: A Universal Modulator of Brain Function. *Curr Med Chem* **23**: 2643–2652.

Poulin B, Butcher A, McWilliams P, Bourgognon J-M, Pawlak R, Kong KC, et al (2010). The M3-muscarinic receptor regulates learning and memory in a receptor phosphorylation/arrestin-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 9440–9445.

Pozo K, Goda Y (2010). Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron* **66**: 337–351.

Quijano C, Alvarez B, Gatti RM, Augusto O, Radi R (1997). Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem J* **322 (Pt 1)**: 167–173.

Quirion R (1993). Cholinergic markers in Alzheimer disease and the autoregulation of acetylcholine release. *J Psychiatry Neurosci* **18**: 226–234.

Quirk GJ, Garcia R, González-Lima F (2006). Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. *Biol Psychiatry* **60**: 337–343.

Quirk GJ, Mueller D (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* **33**: 56–72.

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.

Raybuck JD, Gould TJ (2010). The role of nicotinic acetylcholine receptors in the medial prefrontal cortex and hippocampus in trace fear conditioning. *Neurobiol*

Learn Mem **94**: 353–363.

Resstel LBM, Corrêa FM de A, Guimarães FS (2008). The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex N Y N* **18**: 2027–2035.

Resstel LBM, Corrêa FMA (2005). Pressor and tachycardic responses evoked by microinjections of L-glutamate into the medial prefrontal cortex of unanaesthetized rats. *Eur J Neurosci* **21**: 2513–2520.

Resstel LBM, Corrêa FMA (2006). Injection of l-glutamate into medial prefrontal cortex induces cardiovascular responses through NMDA receptor - nitric oxide in rat. *Neuropharmacology* **51**: 160–167.

Resstel LBM, Joca SRL, Guimarães FG, Corrêa FMA (2006a). Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience* **143**: 377–385.

Resstel LBM, Joca SRL, Moreira FA, Corrêa FMA, Guimarães FS (2006b). Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res* **172**: 294–298.

Rey AA, Purrio M, Viveros M-P, Lutz B (2012). Biphasic effects of cannabinoids in anxiety responses: CB1 and GABA(B) receptors in the balance of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* **37**: 2624–2634.

Rinaldo L, Hansel C (2013). Muscarinic acetylcholine receptor activation blocks long-term potentiation at cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapses via cannabinoid signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 11181–11186.

Robinson L, Platt B, Riedel G (2011). Involvement of the cholinergic system in conditioning and perceptual memory. *Behav Brain Res* **221**: 443–465.

Rouse ST, Gilmor ML, Levey AI (1998). Differential presynaptic and postsynaptic expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptors at the perforant pathway/granule cell synapse. *Neuroscience* **86**: 221–232.

Rouse ST, Marino MJ, Potter LT, Conn PJ, Levey AI (1999). Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. *Life Sci* **64**: 501–509.

Rubino T, Sala M, Viganò D, Braidà D, Castiglioni C, Limonta V, *et al* (2007). Cellular mechanisms underlying the anxiolytic effect of low doses of peripheral Delta9-tetrahydrocannabinol in rats. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* **32**: 2036–2045.

Russwurm M, Wittau N, Koesling D (2001). Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem* **276**: 44647–44652.

Sanders MJ, Kieffer BL, Fanselow MS (2005). Deletion of the mu opioid receptor results in impaired acquisition of Pavlovian context fear. *Neurobiol Learn Mem* **84**: 33–41.

Santini E, Porter JT (2010). M-type potassium channels modulate the intrinsic excitability of infralimbic neurons and regulate fear expression and extinction. *J Neurosci* **30**: 12379–12386.

Santini E, Sepulveda-Orengo M, Porter JT (2012). Muscarinic receptors modulate the intrinsic excitability of infralimbic neurons and consolidation of fear extinction. *Neuropsychopharmacology* **37**: 2047–2056.

Sbrenna S, Marti M, Morari M, Calo G, Guerrini R, Beani L, *et al* (1999). L-glutamate and gamma-aminobutyric acid efflux from rat cerebrocortical synaptosomes: modulation by kappa- and mu- but not delta- and opioid receptor like-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **291**: 1365–1371.

Schilling T, Eder C (2009). Importance of the non-selective cation channel TRPV1 for microglial reactive oxygen species generation. *J Neuroimmunol* **216**: 118–121.

Schmidt HH, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F (1992). Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* **40**: 1439–1456.

Schulkin J, Morgan MA, Rosen JB (2005). A neuroendocrine mechanism for sustaining fear. *Trends Neurosci* **28**: 629–635.

Seely KA, Brents LK, Franks LN, Rajasekaran M, Zimmerman SM, Fantegrossi WE, *et al* (2012). AM-251 and rimonabant act as direct antagonists at mu-opioid receptors: implications for opioid/cannabinoid interaction studies. *Neuropharmacology* **63**: 905–915.

Selvakumar B, Huganir RL, Snyder SH (2009). S-nitrosylation of stargazin regulates surface expression of AMPA-glutamate neurotransmitter receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 16440–16445.

Senn V, Wolff SBE, Herry C, Grenier F, Ehrlich I, Gründemann J, *et al* (2014). Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons. *Neuron* **81**: 428–437.

Spiacci GBL, Antero LS, Reis DG, Lisboa SF, Resstel LB (2016). Dorsal hippocampus cannabinoid type 1 receptors modulate the expression of contextual fear conditioning in rats: Involvement of local glutamatergic/nitrergic and GABAergic neurotransmissions. *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol* **26**: 1579–1589.

Spolidório PCM, Echeverry MB, Iyomasa M, Guimarães FS, Del Bel EA (2007). Anxiolytic effects induced by inhibition of the nitric oxide-cGMP pathway in the rat dorsal hippocampus. *Psychopharmacology (Berl)* **195**: 183–192.

Starowicz K, Maione S, Cristino L, Palazzo E, Marabese I, Rossi F, *et al* (2007). Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **27**: 13739–13749.

Steketee JD (2003). Neurotransmitter systems of the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev* **41**: 203–228.

Svízenská I, Dubový P, Sulcová A (2008). Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. *Pharmacol Biochem Behav* **90**: 501–511.

Terzian ALB, Aguiar DC, Guimarães FS, Moreira FA (2009). Modulation of anxiety-like behaviour by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. *Eur Neuropsychopharmacol* **19**: 188–195.

Terzian ALB, Reis DG dos, Guimarães FS, Corrêa FMA, Resstel LBM (2014). Medial prefrontal cortex Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) in the expression of contextual fear conditioning in Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)* **231**: 149–157.

Tonetto LL, Terzian AL, Del Bel EA, Guimarães FS, Resstel LB (2009). Inhibition of the NMDA receptor/Nitric Oxide pathway in the dorsolateral periaqueductal gray causes anxiolytic-like effects in rats submitted to the Vogel conflict test. *Behav Brain Funct BBF* **5**: 40.

Tóth A, Boczán J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z, *et al* (2005). Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **135**: 162–168.

Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* **83**: 393–411.

Uliana DL, Hott SC, Lisboa SF, Resstel LBM (2016). Dorsolateral periaqueductal gray matter CB1 and TRPV1 receptors exert opposite modulation on expression of contextual fear conditioning. *Neuropharmacology* **103**: 257–269.

Varvel SA, Wise LE, Niyuhire F, Cravatt BF, Lichtman AH (2007). Inhibition of fatty-acid amide hydrolase accelerates acquisition and extinction rates in a spatial memory task. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* **32**: 1032–1041.

Vaughan CW, Connor M, Bagley EE, Christie MJ (2000). Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray

neurons in vitro. *Mol Pharmacol* **57**: 288–295.

Verberne AJ, Owens NC (1998). Cortical modulation of the cardiovascular system. *Prog Neurobiol* **54**: 149–168.

Vianna DML, 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.

Volpicelli LA, Levey AI (2004). Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog Brain Res* **145**: 59–66.

Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL (2004). Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* **73**: 953–990.

Wang Q, Mergia E, Koesling D, Mittmann T (2017). Nitric oxide/cGMP signaling via guanylyl cyclase isoform 1 modulates glutamate and GABA release in somatosensory cortex of mice. *Neuroscience* **360**: 180–189.

Wang SZ, Lee SY, Zhu SZ, Fakahany EE el- (1996). Differential coupling of m1, m3, and m5 muscarinic receptors to activation of neuronal nitric oxide synthase. *Pharmacology* **53**: 271–280.

Wang S, Paton JFR, Kasparov S (2007). Differential sensitivity of excitatory and inhibitory synaptic transmission to modulation by nitric oxide in rat nucleus tractus solitarii. *Exp Physiol* **92**: 371–382.

Wedzony K, Chocyk A (2009). Cannabinoid CB1 receptors in rat medial prefrontal cortex are colocalized with calbindin- but not parvalbumin- and calretinin-positive GABA-ergic neurons. *Pharmacol Rep PR* **61**: 1000–1007.

Weinberger NM (1998). Physiological memory in primary auditory cortex: characteristics and mechanisms. *Neurobiol Learn Mem* **70**: 226–251.

Weinberger NM, Bakin JS (1998). Learning-induced physiological memory in adult primary auditory cortex: receptive fields plasticity, model, and mechanisms. *Audiol Neurotol* **3**: 145–167.

Wilson MA, Fadel JR (2017). Cholinergic regulation of fear learning and extinction. *J Neurosci Res* **95**: 836–852.

Wilson RI, Nicoll RA (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* **296**: 678–682.

Witkowski G, Szulczyk P (2006). Opioid mu receptor activation inhibits sodium currents in prefrontal cortical neurons via a protein kinase A- and C-dependent mechanism. *Brain Res* **1094**: 92–106.

Woolf NJ, Eckenstein F, Butcher LL (1983). Cholinergic projections from the basal forebrain to the frontal cortex: a combined fluorescent tracer and

immunohistochemical analysis in the rat. *Neurosci Lett* **40**: 93–98.

Worley NB, Hill MN, Christianson JP (2017). Prefrontal endocannabinoids, stress controllability and resilience: A hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* doi:10.1016/j.pnpbp.2017.04.004.

Wu L-J, Sweet T-B, Clapham DE (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev* **62**: 381–404.

Xing J, Li J (2007). TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. *J Neurophysiol* **97**: 503–511.

Yang T-T, Hung C-F, Lee Y-J, Su M-J, Wang S-J (2004). Morphine inhibits glutamate exocytosis from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes) by reducing Ca²⁺ influx. *Synapse* **51**: 83–90.

Zhao Y, Tzounopoulos T (2011). Physiological activation of cholinergic inputs controls associative synaptic plasticity via modulation of endocannabinoid signaling. *J Neurosci* **31**: 3158–3168.

Zoubovsky SP, Pogorelov VM, Taniguchi Y, Kim S-H, Yoon P, Nwulia E, *et al* (2011). Working memory deficits in neuronal nitric oxide synthase knockout mice: potential impairments in prefrontal cortex mediated cognitive function. *Biochem Biophys Res Commun* **408**: 707–712.

Zschenderlein C, Gebhardt C, Bohlen Und Halbach O von, Kulisch C, Albrecht D (2011). Capsaicin-induced changes in LTP in the lateral amygdala are mediated by TRPV1. *PloS One* **6**: e16116.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sørsgård M, Di Marzo V, *et al* (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**: 452–457.

Anexo I - Tabela 1. Valores Basais de Pressão Arterial Média (PAM), Frequência Cardíaca (FC) e Temperatura Cutânea (TC) dos grupos experimentais dos protocolos com antagonista CB1 (NIDA).

Grupos	N (animais)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	TC (°C)
NIDA				
Vei	8	101,1±4,43	355,3±15,79	32,4±0.94
NIDA 25pmol	7	104,6±2,40	379,4±5,19	32,2±0.72
NIDA 55pmol	9	99,6±2,35	365,7±11,60	32,0±0.54
NIDA 100pmol	8	100,3±1,58	366,2±5,43	33.1±0.40
NIDA 55pmol PL-IL				
Vei	7	102,6±2,63	372,3±10,59	32,7±0.77
NIDA 55pmol PL	6	100,0±2,80	366,2±12,99	33,3±0.61
NIDA 55pmol IL	6	99,7±2,75	377,9±8,75	32,2±0.76
NIDA 100pmol PL-IL				
Vei	6	98,7±3,34	382,4±12,29	32,3±0.78
NIDA 100pmol PL	7	101,1±1,86	375,2±9,52	33,1±0.57
NIDA 100pmol IL	6	98,4±3,11	360,5±12,73	32,4±0.95
LY+NIDA				
Vei + Vei	8	108,3±2,77	349,6±8,60	30,1±0.92
Vei + NIDA	8	107,1±2,92	357.1±10,35	31,4±0.79
LY + Vei	7	106,1±3,51	372,8±19,90	31,3±1,22
LY + NIDA	9	107,9±2,75	364.6±17,97	32,2±1,12
NPLA+NIDA				
Vei + Vei	6	103,5±2,75	362±3,78	31,3±1,10
Vei + NIDA	7	105,6±3,42	362,8±8,54	31,1±0,55
NPLA + Vei	7	110,1±2,76	365,4±12,09	31,1±1,03
NPLA + NIDA	6	101,4±1,54	373,6±12,88	30,7±1,07
c-PTIO+NIDA				
Vei + Vei	6	102,2±4,44	351,1±8,57	31,9±1,12
Vei + NIDA	8	100,6±1,92	360,4±9,76	31,8±0.81
c-PTIO + Vei	7	101,8±2,88	376,9±9,60	33,6±0.70
c-PTIO+ NIDA	6	102,2±1,15	391,9±20,37	31,0±1,54
ODQ+NIDA				
Vei + Vei	8	104,9±3,11	383,0±12,46	30,1±1,06
Vei + NIDA	8	104,5±2,53	357,2±9,62	30,7±0,53
ODQ + Vei	6	103,7±3,20	368,1±6,36	30,5±0,76
ODQ + NIDA	6	105,3±2,95	385,4±12,55	30,8±0.66

Os valores na tabela estão representados como média ± EPM.

Anexo II - Tabela 2. Valores Basais de Pressão Arterial Média (PAM), Frequência Cardíaca (FC) e Temperatura Cutânea (TC) dos grupos experimentais dos protocolos com agonista TRPV1 (CPS).

Grupos	N (animais)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	TC (°C)
CPS				
Vei	6	107,1±3,58	370,0±13,03	32,1±0.63
CPS 0.1nmol	6	104,6±1,79	395,6±14,52	34,1±0.76
CPS 1nmol	7	101,6±1,06	374,6±5,62	32,47±1,13
CPS 10nmol	6	107,5±3,07	376,2±7,93	33,41±0.57
CPS 1nmol PL-IL				
Vei	6	104,8±2,88	369,2±11,13	32,42±0.51
CPS 1nmol PL	7	102,5±3,10	345,5±10,41	33,37±0.95
CPS 1nmol IL	6	102,1±1,18	363,8±9,92	32,1±0.62
LY+CPS				
Vei+Vei	7	106,5±2,31	375,7±10,78	32,5±0.86
Vei+CPS	7	100,2±1,32	358,6±8,28	32,4±0,66
LY+Vei	6	104,5±2,76	386,1±12,44	31,0±1,37
LY+CPS	6	108,8±2,47	376,1±15,72	32,6±0.90
NPLA+CPS				
Vei+Vei	7	106,3±2,87	376,5±9,32	31,9±0,97
Vei+CPS	7	101,4±3,24	359,7±13,65	31,4±0.91
NPLA+Vei	6	107,8±1,77	365,9±10,67	32,5±1,22
NPLA+CPS	6	103,4±2,16	355,3±9,17	32,6±0.79
c-PTIO+CPS				
Vei+Vei	7	101,7±1,37	366,0±15,75	32,1±0.75
Vei+CPS	6	103,3±1,48	348,9±13,01	32,9±1,10
c-PTIO+Vei	6	101,9±2,07	367,1±11,83	32,3±0,99
c-PTIO+CPS	7	102,7±2,42	364,3±12,85	33,06±0.43
ODQ+CPS				
Vei+Vei	6	104,8±2,63	379,0±10,53	32,94±1,14
Vei+CPS	7	100,9±2,67	353,6±7,56	31,9±0.81
ODQ+Vei	6	102,8±3,54	357,8±9,10	32,2±0,80
ODQ+CPS	8	103,4±2,96	361,0±8,91	32,0±0.61
NAC				
Vei	8	99,0±3,84	360,9±8,05	32,8±0.88
NAC 1nmol	6	98,2±4,57	376,0±11,11	33,0±1,02
NAC 5nmol	6	94,7±2,72	374,1±13,84	31,9±1,01
NAC 10nmol	8	103,2±2,43	365,3±16,34	31,9±0.76

NAC +CPS				
Vei+Vei	8	101,6 $\pm$ 2,49	367,2 $\pm$ 9,27	32,1 $\pm$ 0.76
Vei+CPS	6	100,9 $\pm$ 2,42	362,2 $\pm$ 14,47	32,4 $\pm$ 1,08
NAC+Vei	7	103,0 $\pm$ 4,65	371,2 $\pm$ 13,22	31,5 $\pm$ 0.66
NAC+CPS	8	99,4 $\pm$ 1,37	376,0 $\pm$ 11,00	31,8 $\pm$ 0.64

Os valores na tabela estão representados como média $\pm$ EPM.

Anexo III - Tabela 3. Valores Basais de Pressão Arterial Média (PAM), Frequência Cardíaca (FC) e Temperatura Cutânea (TC) dos grupos experimentais dos protocolos da interação dos receptores CB1 e TRPV1.

Grupos	N (animais)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	TC (°C)
6-Iodo+NIDA				
Vei+Vei	7	101,6±2,40	360,3±7,89	31,4±1,25
Vei+NIDA	7	99,0±5,70	363,3±12,17	31,8±1,47
6-Iodo+Vei	6	104,7±4,11	390,1±9,18	32,7±1,57
6-Iodo+NIDA	7	106,0±2,63	372,3±7,42	32,2±0.80
NIDA+6-Iodo				
Vei+Vei	6	102,5±2,07	361,4±8,51	31,4±0.50
Vei+6-Iodo	6	105,0±3,18	365,8±7,6	32,0±0.87
NIDA+Vei	5	104,4±2,10	358,9±7,50	33,0±0.32
NIDA+6-Iodo	6	103,1±4,33	361,0±9,46	31,7±1,37

Os valores na tabela estão representados como média ± EPM.

Anexo IV - Tabela 4. Valores Basais de Pressão Arterial Média (PAM), Frequência Cardíaca (FC) e Temperatura Cutânea (TC) dos grupos experimentais dos protocolos com o inibidor da AChE (NEO).

Grupos	N (animais)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	TC (°C)
LY+NEO				
Vei+Vei	7	104,8±3,57	368,1±6,28	32,0±1,02
Vei+NEO	6	100,7±2,17	363,6±12,64	31,9±1,09
LY+Vei	6	103,3±4,17	364,6±16,56	31,8±0,82
LY+NEO	6	104,2±1,08	376,2±8,19	33,7±0,65
NPLA+NEO				
Vei+Vei	7	101,4±2,38	361,4±9,17	31,8±0,59
Vei+NEO	6	101,7±4,20	356,7±17,47	32,1±1,29
NPLA+Vei	7	102,2±3,51	364,4±10,6	31,7±0,83
NPLA+NEO	7	97,0±2,02	359,7±7,49	32,6±0,82
c-PTIO+NEO				
Vei+Vei	7	103,8±2,98	357,1±7,50	31,9±1,07
Vei+NEO	6	100,7±3,89	360,3±15,95	32,9±1,28
c-PTIO+Vei	6	102,2±2,11	358,2±8,32	32,1±0,83
c-PTIO+NEO	6	104,0±4,69	349,1±7,57	34,8±0,74
ODQ+NEO				
Vei+Vei	7	100,9±2,95	357,1±12,44	32,0±0,94
Vei+NEO	6	99,6±4,55	355,4±15,2	31,6±1,13
ODQ+Vei	7	101,7±2,24	359,9±14,6	31,9±0,95
ODQ+NEO	7	107,8±2,71	365,8±11,61	32,8±1,09

Os valores na tabela estão representados como média ± EPM.

Anexo V - Tabela 5. Valores Basais de Pressão Arterial Média (PAM), Frequência Cardíaca (FC) e Temperatura Cutânea (TC) dos grupos experimentais dos protocolos da interação do Sistema colinérgico com os receptores CB1 e TRPV1.

Grupos	N (animais)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	TC (°C)
6-Iodo+NEO				
Vei+Vei	6	102,1±2,47	366,8±8,61	32,9±0,67
Vei+NEO	7	97,0±2,40	362,9±16,87	32,5±0,69
6-Iodo+Vei	6	101,5±1,76	373,8±11,42	32,0±0,90
6-Iodo+NEO	9	100,1±1,37	364,4±8,30	32,6±0,68
Fumarate+NIDA				
Vei+Vei	7	101,9±2,45	359,9±9,88	31,6±0,46
Vei+NIDA	6	98,02±4,14	372,9±11,36	32,4±1,16
Fumarate+Vei	6	103,3±2,28	386,4±8,94	33,7±0,98
Fumarate+NIDA	6	100,5±2,34	367,0±9,56	33,0±0,78
Fumarate+CPS				
Vei+Vei	8	100,7±2,18	365,2±9,29	31,8±0,97
Vei+CPS	6	100,3±3,23	360,7±18,19	31,5±1,02
Fumarate+Vei	6	102,9±2,47	379,6±10,09	33,2±1,13
Fumarate+CPS	7	97,3±2,87	367,2±4,44	31,0±0,93

Os valores na tabela estão representados como média ± EPM.

Anexo VI

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3315-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 171/2014, sobre o projeto intitulado “*Estudo do envolvimento do sistema endocanabinóide da porção ventral do córtex pré-frontal medial na modulação da resposta emocional condicionada: participação das neurotransmissões colinérgica, glutamatérgica e nitrérgica*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Leonardo Resstel Barbosa Moraes** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 30 de março de 2015.

We certify that the protocol nº 171/2014, entitled “*Local endocannabinoid system of ventromedial prefrontal cortex in conditioned emotional response modulation: role of cholinergic, glutamatergic and nitrergic neurotransmissions*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 03/30/2015.

Ribeirão Preto, 30 de março de 2015.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da CEUA – FMRP - USP

Anexo VII

Original manuscript

CB1 and TRPV1 receptors in ventromedial prefrontal cortex modulate the contextual fear conditioning by different NO pathway.

Uliana, DL*; Antero LS; Borges-Assis AB; Rosa J; Vila-Verde C; Lisboa, SF; Resstel LBM*.

Department of Pharmacology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

*Corresponding authors: Leonardo BM Resstel (leoresstel@yahoo.com.br) - Department of Pharmacology, School of Medicine, University of São Paulo. Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, São Paulo, 14049-900, Brazil. Phone: +55-16-36330441.

Abstract

CB1 and TRPV1 receptors present in ventromedial prefrontal cortex (vmPFC) has been related in modulation of defensive behavior, as fear conditioning response. In contextual fear conditioning, CB1 and TRPV1 antagonism increase and decrease, respectively, the behavior and autonomic response during the pre-exposure to aversive context. This receptor in vmPFC have an important role in regulation of cardiovascular response during stressful events in accordance of previous results demonstrated that vmPFC modulate cardiovascular response, related or not with behavior response. This response of CB1 and TRPV1 modulate behavior and cardiovascular response seems be related to capacity of this receptor modulate glutamatergic and nitrergic neurotransmission. CB1 and TRPV1 activation leads to decrease and increase of glutamate release. Glutamate is an important neurotransmitter in vmPFC involve in cardiovascular and behavior response. NMDA activation can promote nitric oxide (NO) production, and this mediator could regulate the pre-synaptic and post-synaptic signaling. Therefore, the aim of this study was investigated the CB1 and TRPV1 mechanism involve in modulation of both behavior and autonomic response in fear conditioning model. Male wistars rats with guide cannulas in vmPFC were submitted to contextual fear conditioning. 1 day after conditioning, a polyethylene catheter was implanted in the femoral artery for cardiovascular recording. Following 24h, drug was administrated in vmPFC and freezing behavior and autonomic response were recorded during context re-exposure. CB1 antagonism (NIDA41020) and TRPV1 agonism (Capsaicin; CPS) induced increase the expression of conditioned emotional response and the response was not different when injected in PL or IL subareas. The response of CB1 antagonism depends of TRPV1 activation and response of TRPV1 antagonism depends CB1 activation, demonstrating the relation these receptors. Moreover, the increase of fear conditioning response induced by CB1 antagonism and TRPV1 agonism was prevents by an NMDA antagonism and preferential neuronal NO synthase inhibitor. In case of CB1 antagonism, NO scavenger and a soluble guanylate cyclase inhibitor (sGC) also prevented this response, but not response induced by TRPV1 agonism. The response of TRPV1 agonism was prevent by antioxidant drug (N-Acetyl-L-cysteine). Our results demonstrated that in vmPFC CB1 receptor modulate the expression of conditioned emotional response through NMDA/NO/sGC pathway and TRPV1 receptor through NMDA/NO/oxidative stress.

1. Introduction

The medial prefrontal cortex (mPFC) is a limbic structure involved in regulation of neuroendocrine, autonomic and behavior response (Carlén, 2017; Lisboa *et al*, 2010c; Radley *et al*, 2006; Resstel *et al*, 2006a). The disruption of this brain area is related to psychiatric disorders, as anxiety and posttraumatic stress disorders (Clausen *et al*, 2017; Milad *et al*, 2006; Park and Moghaddam, 2017). Animal models had already demonstrated that vmPFC is an essential brain area related to cardiovascular and behavior related response (Frysztak and Neafsey, 1991, 1994; Lisboa *et al*, 2010c; Resstel *et al*, 2006a). vmPFC lesion in rodents demonstrated to produce decrease of freezing response and tachycardia in auditory fear conditioning (Frysztak and Neafsey, 1991, 1994). Fear conditioning is a model extensive use to study aversion and fear learning (Fendt and Fanselow, 1999; Resstel *et al*, 2006b). Is based in association of a neutral stimulus, as context, to an aversive stimulus, such as electrical footshock. Thus, the neutral stimulus is the conditioned stimulus. After pairing of this stimulus, the re-exposure to conditioned stimulus elicited emotional response as freezing behavior and also autonomic response, increased mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and decreased cutaneous temperature (CT) (Carrive, 2000; Resstel *et al*, 2006b). The autonomic response during re-exposure corroborate the alert state of animal during an aversive situation (Dielenberg *et al*, 2001; Kozłowska *et al*, 2015) and is a stronger suggestion of subjective freezing response. These collective responses are denominate of conditioned emotional response (Resstel *et al*, 2006b; Uliana *et al*, 2016). Evidence demonstrated increase expression of Fos-protein in vmPFC of conditioned animal (Beck and Fibiger, 1995). Moreover, the chemical ablation of vmPFC produce decrease of freezing and cardiovascular related response during animal re-exposure to aversive chamber (Resstel *et al*, 2006a). Results that demonstrated that vmPFC is a critical brain area related to expression of conditioned emotional response.

Glutamate is a major neurotransmitter related to stress response in vmPFC (Moghaddam, 1993; Resstel *et al*, 2008). Glutamate is increase during stress situation (Moghaddam, 1993) and administration of l-Glutamate produce increase of cardiac sympathetic activity and blood pressure (Resstel and Corrêa, 2005, 2006), that is compared to response during defense response (Resstel *et al*, 2006a). Glutamatergic relation has been demonstrated in contextual fear conditioning, the NMDA glutamate receptor antagonism produce decrease of freezing and cardiovascular response during re-exposure to context (Resstel

et al, 2008). NMDA glutamate receptor is the main responsible for glutamate action, is a permeable cations channel that leads to calcium influx and can activate several intracellular cascade (Moriyoshi *et al*, 1991). A particular pathway involved with NMDA activation is production of nitric oxide (NO) (Garthwaite, 2008). The calcium influx promoted by NMDA activated the neuronal oxide synthase (nNOS) to produce NO. As a gas, NO can diffuses to synaptic clef and act in other terminals through activation of soluble guanylate cyclase (sGC) (Garthwaite, 2008). Activation of sGC leads the production of cGMP that can increase the glutamate release (Bredt and Snyder, 1989). The NO also can promote the production of reactive species, as peroxynitrite (reaction of NO plus super oxide anion), and promoted protein S-nitrosilation and change protein function (Bradley and Steinert, 2016). The role of NO has demonstrated in vmPFC in modulation of autonomic response promote by l-glutamate injection (Resstel and Corrêa, 2006) and in conditioned emotional response (Resstel *et al*, 2008). In both case, the nNOS inhibition and/or extracellular scavenger prevent autonomic increase promote by glutamate and decrease the freezing and autonomic response in contextual fear conditioning, respectively (Resstel *et al*, 2008). The other NO pathways are not described yet in vmPFC to these responses.

An important modulator of glutamate release and NO production is the endocannabinoids (eCBs) (Auclair *et al*, 2000; Lipina and Hundal, 2017). Endocannabinoid system is an important neurotransmission involved in modulation of several physiology response, as emotional response (Araque *et al*, 2017; Patel *et al*, 2017). The two main eCBs are anandamide (AEA) and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) (Araque *et al*, 2017; Wilson and Nicoll, 2002). eCBs are produce on demand in response to Ca^{+2} influx in postsynaptic terminal and act presynaptic cannabinoid receptors (Egertová *et al*, 1998; Wilson and Nicoll, 2002), the type 1 receptor (CB1) is couple to a $\text{G}_{i/o}$ protein (Childers and Deadwyler, 1996). Therefore, AEA can also activated the Transient Receptor Potential Vanilloid type 1 (TRPV1) channel (Smart and Jerman, 2000; Zygmunt *et al*, 1999). CB1 and TRPV1 receptor are express in central nervous systems, especially in brain structure involve with anxiety and fear modulation, as vmPFC, hippocampus, amygdala, hypothalamus and periaqueductal gray matter (PAG) (Cavanaugh *et al*, 2011; Mezey *et al*, 2000; Tsou *et al*, 1998).

Large evidences demonstrated that CB1 and TRPV1 receptors are important targets in modulation of anxiolytic-like effects (Patel *et al*, 2017). In vmPFC, the CB1 antagonism

increase the expression of contextual fear conditioning, behavior and autonomic responses, and prevented the AEA decrease fear conditioning response (Lisboa *et al*, 2010b) and TRPV1 agonism and antagonist increase and decrease, respectively, this conditioned emotional response (Terzian *et al*, 2014). This opposite effect of this receptor possibly could be related the action on glutamate release (Auclair *et al*, 2000; Xing and Li, 2007), CB1 activation inhibits adenylate cyclase and reduce release TRPV1 activation induce depolarization and glutamate release (Xing and Li, 2007). These evidences suggest that CB1 and TRPV1 could modulate glutamate response and with consequence behaviors and autonomic response during aversive pre-exposure in fear conditioning. Therefore, have no evidences demonstrated this relation in contextual fear conditioning. Considering that CB1 and TRPV1 module conditioned emotional response and that this receptor can regulate the glutamate and NO transmission, our hypothesis is that CB1 antagonism and TRPV1 agosnim increase the conditioned emotional response by NMDA/nNOS/sGC or NMDA/nNOS/nitrosative pathway.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (230-260g) were used in the experiments and maintained in the Animal Care Unit of the Department of Pharmacology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Rats were housed in groups of 4 per cage (39x36x18cm) in a temperature-controlled room ($24\pm1^{\circ}\text{C}$) under standard laboratory conditions with free access to food and water and a 12 h light/ dark cycle (lights on at 06:30 a.m.). One day before the test, rats were housed individually in acrylic cages (24x36x18cm). The Institution's Animal Ethics Committee approved experimental procedures and housing conditions (process number: 171/2014). All procedures were in accordance with the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior guidelines for the care and use of laboratory animals, which are in agreement with international animal regulations.

2.2. Drugs

The CB1 cannabinoid receptor antagonist N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-methoxyphenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (NIDA41020; TOCRIS) 25, 55, and 100 pmol (Lisboa *et al*, 2010b), the TRPV1 agonist, (E)-Capsaicin (Capsaicin, TOCRIS) 0.1, 1, 10 nmol (Terzian *et al*, 2009), the potent vanilloid TRPV1 receptor antagonist 6-Iodonordihydrocapsaicin (6-Iodo; TOCRIS) 3nmol (Terzian *et al*, 2014) and

the inhibitor of NO-sensitive guanylyl cyclase, 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ; TOCRIS) 1 and 3nmol (Lisboa *et al*, 2013) were dissolved in 10% DMSO in saline (0.9% NaCl). The NMDA antagonist [3S-(3 α ,4 α ,6 β ,8 α)]-Decahydro-6-(phosphonomethyl)-3-isoquinolinecarboxylic acid (LY235959; TOCRIS) 2nmol (Resstel *et al*, 2008), the nNOS inhibitor, N ω -propyl-L-arginine (N-Propyl; TOCRIS) 0.04nmol (Resstel *et al*, 2008), the NO scavenger, (S)-3-Carboxy-4-hydroxyphenylglycine (c-PTIO; TOCRIS) 1 and 2nmol (Resstel *et al*, 2008) and N-Acetyl-L-cysteine (NAC; Sigma) 1, 5 and 10mol were dissolved in saline (0.9% NaCl). All drug solutions were prepared before use, kept on ice and protected from light during the experimental sessions. Urethane (1.25g/Kg; Sigma-Aldrich, USA) were dissolved in distilled water. Ketamine hydrochloride (general anesthetic; DOPALEN, Ceva) and Xylazine hydrochloride 2% (Analgesic, anesthetic, myorelaxant and sedative; XILAZIN, Syntec) were used to anaesthetize the rats before surgery procedure.

2.3. Apparatus

The conditioning chamber (23×20×21 cm) was constituted of a grid floor with 18 stainless steel rods (2 mm in diameter), with space of 1.5 cm apart each and plug to a shock generator (Insight, Ribeirão Preto, Brazil).

2.4. Surgical procedures

For implantation of bilateral guide cannula aimed into the vmPFC, rats were anaesthetized with Ketamine/Xylazine 1:1 solution (0.1mL/100g, i.p) and fixed in a stereotaxic frame. After scalp anesthesia with 2% lidocaine, a stainless steel guide cannula (0.6 mm OD) was implanted bilaterally aimed into the vMPFC (coordinates: AP=+3,3 mm from bregma, L= +2,5 mm at an angle of 23°, D=-3.2 mm PL and -3.3 mm IL) according to Paxinos and Watson (1997). Acrylic cement and one metal were used to fix in the skull. In the end of surgery, animals received a poly-antibiotic injection (Pentabiotico[®], Brazil) to prevent infection and a nonsteroidal anti-inflammatory flunixin meglumine (Banamine[®], Brazil) for post-operation analgesia.

For cardiovascular recording, rats were anaesthetized with Ketamine/Xylazine 1:1 solution (0.1mL/100g, i.p) and a catheter (a 4 cm PE-10 segment heat-bound to a 13 cm PE-50 segment, Clay Adams, USA) was inserted into the abdominal aorta through the femoral artery. The catheter was exteriorized on the animal's dorsum.

2.5. Fear conditioning and testing

The experimental procedure was conducted as depicted in Scheme 1. Seven days after stereotaxic surgery were habituated and conditioned. Habituation, conditioning and testing were carried out in a room with controlled temperature ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$). Habituation session consisted of one 10-min-long exposure to the footshock chamber without shock delivery. The animals were placed again into the experimental chamber, after 4 h of habituation, and three electric footshocks (0.85 mA, 2 s, 20-s to 1-min intervals) or six electric footshocks (1.5mA, 3s, 20s to 1-min intervals) were delivered (Lisboa et al., 2010). After habituation/conditioning, the animals were individualized. For cardiovascular recording, a catheter was implanted into the femoral artery twenty-four hours later and in the next day, animals were transferred from the animal facility to the experimental room (a different room was used for conditioning) in their home box. The test session started a day after catheter implantation and consisted of a 10-min-long re-exposure to the conditioning chamber without shock delivery. Cardiovascular recordings began after an acclimation period of 1 h to the acoustically isolated experimental room. Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were recorded with an amplifier (AECAD04P) connected to a signal acquisition board (Power Lab, USA) and a computer

The animals were randomly assigned to one of the treatment groups and were tested one at a time. Injection was performed into the vmPFC with 33G needles (Small Parts, USA) 1 mm longer than the guide cannula, connected to a 1- μl syringe (7002-H, Hamilton Co., USA) by PE-10 tubing. The needles remained in place for an additional 30-s to prevent reflux. The interval between the first and second microinjection was 5 min and the rats were tested 5-10 min after the last microinjection. Autonomic parameters recorded within the 10 min following the last drug injection were used as baseline values. Variation in the tail cutaneous temperature (CT) was recorded before and during the test with a thermal camera (Multi-Purpose Thermal Imager IRI 4010, InfraRed Integrated Systems Ltd. Northampton, UK) at a distance of 50 cm. The record was taken every 2 minutes from 10 min before the test and during the test was taken every minute until the end of the 10 min exposure to the conditioning chamber. Freezing behavior was manually recorded during the 10-min exposure test by an experienced experimenter seated 30 cm away from the chamber and it was defined as the complete absence of movement other than respiration while the animal assumed a characteristic tense posture (Fanselow, 1980; Resstel *et al*, 2006b).

Scheme 1. Temporal schematic representation of experimental procedure.

2.6. Experimental groups

Experimental groups are depicted in the scheme below.

Independent groups of animals received a first bilateral microinjection of vehicle (100nl) or drugs followed 5 min later by vehicle or drugs. 5-10 min later they were re-exposed to the chamber previous paired with footshocks.

CB1 antagonist

Veh or NIDA 25, 55, 100 pmol $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ Test (10 min)

Veh or LY/NPLA/c-PTIO/ODQ $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ Veh or NIDA 55 pmol $\xrightarrow{10 \text{ min}}$ Test (10 min)

TRPV1 and CB1 interaction

Veh or 6-Iodo $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ Veh or NIDA 55 pmol $\xrightarrow{10 \text{ min}}$ Test (10 min)

Veh or NIDA $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ Veh or 6-Iodo 3 nmol $\xrightarrow{10 \text{ min}}$ Test (10 min)

TRPV1 agonist

Veh or CPS 0.1, 1, 10 nmol $\xrightarrow{10 \text{ min}}$ Test (10 min)

Veh or LY/NPLA/c-PTIO/ODQ/NAC $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ Veh or CPS1 nmol $\xrightarrow{10 \text{ min}}$ Test (10 min)

2.7. Histology

At the end of experiments, rats were anesthetized with urethane (1.25 g/kg, i.p.). Their chests were surgically opened, the descending aorta occluded, the right atrium severed and the brain were perfused with 10% formalin through the left ventricle. Brains were post-fixed in 10% formalin for 24-48h at 4°C, and 40 μm sections were cut using a cryostat (CM-1900, Leica, Germany). Serial brain sections were made and injection sites determined using as reference the rat brain atlas of Paxinos and Watson (1997). The injection sites can be seen in Figure 1.

2.9. Statistical analysis

MAP, HR and CT values were recorded in the 10-min period before and during the 10-min period of re-exposure to the footshock chamber. The samples were obtained at 60-120s intervals. The samples obtained during the last 5 min before re-exposure were used as baseline values. Changes from baseline of MAP, HR and CT (respectively, Δ MAP, Δ HR and Δ CT) are expressed as means $\pm$ SEM and were analyzed using a repeated measure analysis of variance (ANOVA). Treatment (drug or vehicle) was the independent factor and time was the repeated factor. Duncan post-hoc test was used when significant interactions were observed.

Freezing behavior was expressed as percentage of the 10 min test exposure and one-way ANOVA was used for analysis. Duncan post-hoc test was used when ANOVA pointed to significant effects. Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Evaluation of the effect of CB1 receptor antagonism in the vmPFC on the expression of conditioned emotional response.

The administration of a more selective CB1 (NIDA) at a dose of 55pmol and 100pmol, but not at lower 25pmol, significantly increased freezing behavior ($F_{3,28}=17.29$; Fig.1.2A). Moreover, the both effective doses of CB1 antagonist did not induce different levels of freezing behavior when injected in PL or IL portion of vmPFC ($p > 0.05$; Supplementary material).

In autonomic evaluation, the treatment did not change the autonomic baseline values (MAP, $p > 0.05$; HR, $p > 0.05$; CT, $p > 0.05$; Table 1 Supplementary material). During re-exposure to aversive chamber, there was a significant effect of time (MAP, $F_{14,392}=157.55$, $p < 0.01$; HR, $F_{14,392}=107.33$, $p < 0.01$; CT, $F_{14,392}=139.53$, $p < 0.01$), treatment (MAP, $F_{3,28}=8.68$, $p < 0.01$; HR, $F_{3,28}=6.09$, $p < 0.01$; CT, $F_{3,28}=6.54$, $p < 0.01$) and a interaction between time and treatment (MAP, $F_{42,392}=4.31$, $p < 0.01$; HR, $F_{42,392}=3.69$, $p < 0.01$; CT, $F_{42,392}=4.89$, $p < 0.01$). The both 55 and 100pmol doses of CB1 antagonist accentuated the elevation of MAP ($p < 0.01$, Duncan; Figura 1.2C) and HR ($p < 0.01$, Duncan; Figura 1.2D) and the decrease of CT ($p < 0.01$, Duncan; Figura 1.2B). The both effective dose of CB1 antagonist did not induce different autonomic response during re-exposure to aversive context when microinjected in PL and IL portions (55pmol NIDA

PL/IL $p > 0.05$, Supplementary material; 100pmol NIDA PL/IL, $p > 0.05$, Supplementary material).

Figure 1. CB1 antagonism in the vmPFC with NIDA (55 pmol and 100 pmol) exacerbated the expression of conditioned emotional response. Effects of bilateral injection of vehicle, NIDA (25, 55, 100 pmol) in the vmPFC during re-exposure to the footshock chamber on A) percentage of freezing behavior; on time course changes in B) cutaneous temperature (DCT), C) mean arterial pressure (DMAP) and D) heart rate (DHR). Values are represented by means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ compared to vehicle group. ANOVA followed by Duncan.

3.2. Evaluation of NMDA/NO/sGC pathway involvement in the effects induced by a CB1 antagonist (NIDA 55 pmol) in the vmPFC on the expression of the conditioned emotional response.

The previous treatment with NMDA antagonist, nNOS inhibitor, NO scavenger and sGC inhibitor prevent the increase of freezing response induce by lowest effective dose of CB1 antagonist (LY, $F_{3,28}=15.72$, $p < 0.05$; NPLA, $F_{3,22}=7.81$, $p < 0.05$; c-PTIO, $F_{3,23}=20.23$, $p < 0.05$; ODQ, $F_{3,24}=17.48$, $p < 0.05$; Figure 2A,E,J,N). Moreover, the drugs treatment did not induce alteration in behavior response during re-exposure to aversive context (LY, $p > 0.05$; NPLA, $p > 0.05$; c-PTIO, $p > 0.05$; ODQ, $p > 0.05$).

In autonomic response, all the treatment did not change the autonomic baseline values (MAP, $p>0.05$; HR, $p>0.05$; CT, $p>0.05$; Table 1 Supplementary material). All the association treatment during the re-exposure to chamber show a significant effect of time (LY: MAP, $F_{14.392}=122.79$, HR, $F_{14.392}=117.05$, CT, $F_{14.392}=76.98$, $p<0.05$; NPLA: MAP, $F_{14.308}=54.96$, HR, $F_{14.308}=63.52$, CT, $F_{14.308}=69.16$, $p<0.05$; c-PTIO: MAP, $F_{14.322}=101.57$, HR, $F_{14.322}=51.70$, CT, $F_{14.322}=105.25$, $p<0.05$; ODQ: MAP, $F_{14.336}=96.98$, HR, $F_{14.336}=62.07$, CT, $F_{14.336}=68.53$, $p<0.05$), treatment (LY: MAP, $F_{3.28}=6.69$, HR, $F_{3.28}=8.98$, CT, $F_{3.28}=3.06$, $p<0.05$; NPLA: MAP, $F_{3.22}=3.14$, HR, $F_{3.22}=3.88$, CT, $F_{3.22}=3.48$, $p<0.05$; c-PTIO: MAP, $F_{3.23}=10.54$, HR, $F_{3.23}=3.23$, CT, $F_{3.23}=3.12$, $p<0.05$; ODQ: MAP, $F_{3.24}=4.86$, HR, $F_{3.24}=6.94$, CT, $F_{3.24}=3.89$, $p<0.05$) and a interaction between time and treatment (LY: MAP, $F_{42.392}=3.27$, HR, $F_{42.392}=3.02$, CT, $F_{42.392}=2.48$, $p<0.05$; NPLA: MAP, $F_{42.308}=2.22$, HR, $F_{42.308}=2.26$, CT, $F_{42.308}=2.71$, $p<0.05$; c-PTIO: MAP, $F_{42.322}=5.50$, HR, $F_{42.322}=2.28$, CT, $F_{42.322}=2.26$, $p<0.05$; ODQ: MAP, $F_{42.336}=2.79$, HR, $F_{42.336}=2.51$, CT, $F_{42.336}=2.40$, $p<0.05$). The NMDA antagonist ($p<0.05$, Ducan; Figure 2B,C,D), nNOS inhibitor ($p<0.05$, Ducan; Figure 2F,G,H), NO scavenger ($p<0.05$, Ducan; Figure 2K,L,M) and sGC inhibitor ($p<0.05$, Ducan; Figure 2O,P,Q) prevent the increase of MAP, HR and decrease of CT induce by CB1 antagonist (55pmol).

Figure 2. Inhibition of NMDA/NO/sGC pathway in the vmPFC prevented the increased conditioned emotional response induced by NIDA (CB1 antagonist). Effects of bilateral injection intra-vmPFC of vehicle (Veh; 100 nL) or LY (2 nmol), NPLA (0.04 nmol), c-PTIO (1 nmol) or ODQ (1 nmol) followed by CB1 antagonist (NIDA, 55 pmol) on A,E,I,M) percentage of freezing behavior; and on time course changes in B,F,J,N) cutaneous temperature (DCT), C,G,K,O) mean arterial pressure (DMAP) and D,H,L,P) heart rate (DHR). Values are represented by means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ compared to vehicle group, # $p < 0.05$ AP7, NPLA, c-PTIO or ODQ/NIDA compared to vehicle/NIDA. ANOVA followed by Duncan. N=7-9 animals/group.

3.3 Evaluation of CB1 and TRPV1 interaction in the vmPFC on expression of the conditioned emotional response.

The previous administration of a TRPV1 antagonist (6-IODO) prevented the increase of freezing behavior induced by lowest effective dose of CB1 antagonist ($F_{3,23}=11.52$, $p < 0.05$). The TRPV1 antagonist has no effect in freezing behavior during pre-exposure to aversive context ($p > 0.05$; Figure 3A). In more aversive protocol, effective dose of TRPV1 antagonist reduced the freezing behavior compared to control group ($F_{3,19}=5.02$, $p < 0.05$; Figure 3E). The ineffective dose of CB1 antagonist has no effect in freezing response, but prevented the freezing reduction induced by TRPV1 antagonist ($p < 0.05$, Duncan)

In autonomic response, the treatment did not change the autonomic baseline values in both protocols (MAP, $p>0.05$; HR, $p>0.05$; CT, $p>0.05$; Table 1 Supplementary material). In less aversive protocol, the re-exposure to context show significant effect of time (6-IODO+NIDA: MAP, $F_{14.322}=85.68$, HR, $F_{14.322}=54.67$, CT, $F_{14.322}=54.69$, $p<0.05$), treatment (6-IODO+NIDA: MAP, $F_{3.23}=3.25$, HR, $F_{3.23}=4.44$, CT, $F_{3.23}=3.39$, $p<0.05$) and interaction of treatment/time (6-IODO+NIDA: MAP, $F_{42.322}=2.35$, HR, $F_{42.322}=1.91$, CT, $F_{42.322}=2.47$, $p<0.05$). CB1 antagonist increased MAP, HR and reduction of CT in relation of control group, the TRPV1 antagonist have no effect in autonomic changes (MAP, $p>0.05$; HR, $p>0.05$; CT, $p>0.05$), but prevented the CB1 antagonist response (Figure 3B,C,D). In more aversive protocol, context re-exposure demonstrated significant effect of time (NIDA+6-IODO: MAP, $F_{14.266}=115.74$, HR, $F_{14.266}=125.51$, CT, $F_{14.266}=80.90$, $p<0.05$), treatment (NIDA+6-IODO: MAP, $F_{3.19}=3.26$, HR, $F_{3.19}=4.20$, CT, $F_{3.19}=3.44$, $p<0.05$) and interaction time/treatment (NIDA+6-IODO: MAP, $F_{42.266}=2.20$, HR, $F_{42.266}=2.58$, CT, $F_{42.266}=2.17$, $p<0.05$). The TRPV1 antagonist reduced the increase of MAP, HR and decrease of CT. CB1 antagonist didn't affect the autonomic response (MAP, $p>0.05$; HR, $p>0.05$; CT, $p>0.05$), but prevented the reduction of autonomic response induce by TRPV1 antagonist (Figure 3F,G,H).

Figure 3. TRPV1 agonism in the vmPFC with CPS (1 nmol) exacerbated the expression of conditioned emotional response and the CB1-TRPV1 interaction in the vmPFC on conditioned emotional response. Effects of bilateral injection intra-vmPFC of vehicle (Veh; 100 nL), TRPV1 agonist (CPS 1 mol), CB1 antagonist (25, 55 pmol) or 6-Iodo (3 nmol) on A,E,I,) percentage of freezing behavior; and on time course changes in B,F,J,) cutaneous temperature (DCT), C,G,K,) mean arterial pressure (DMAP) and D,H,L,) heart rate (DHR). Values are represented by means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ compared to vehicle group, # $p < 0.05$, 6-Iodo/NIDA or NIDA/6-Iodo compared to vehicle/NIDA and vehicle/6-Iodo, respectively. ANOVA followed by Duncan. $N=6-9$ animals/group.

3.4. Evaluation of the effect of TRPV1 receptor agonism in the vmPFC on the expression of conditioned emotional response.

The administration of a TRPV1 agonist (CPS) at a dose of 1nmol, but not at lower 0.1nmol and higher 10nmol, significantly increased freezing behavior ($F_{3,21}=13.25$; Fig.3.1A). Moreover, the effective dose of TRPV1 agonist did not induce different levels of freezing behavior when injected in PL or IL portion of vmPFC ($F_{2,16}=21.65$; Supplementary material).

In autonomic evaluation, the treatment did not change the autonomic baseline values (MAP, $p>0.05$; HR, $p>0.05$; CT, $p>0.05$; Table 1 Supplementary material). During re-exposure to aversive chamber, there was a significant effect of time (MAP, $F_{14,294}=178.45$; HR, $F_{14,294}=71.55$; CT, $F_{14,294}=55.69$, $p<0.05$), treatment (MAP, $F_{3,21}=16.01$; HR, $F_{3,21}=9.84$; CT, $F_{3,21}=5.77$, $p<0.05$) and an interaction between time and treatment (MAP, $F_{42,294}=4.53$; HR, $F_{42,294}=6.39$; CT, $F_{42,294}=4.17$, $p<0.05$). The 1nmol

dose of TRPV1 agonist accentuated the elevation of MAP ($p < 0.05$, Duncan; Figura 3.1C) and HR ($p < 0.01$, Duncan; Figura 3.1D) and the decrease of CT ($p < 0.05$, Duncan; Figura 3.1B). The effective dose of TRPV1 agonist did not induce different autonomic response during re-exposure to aversive context when microinjected in PL and IL portions ($p > 0.05$ region, Supplementary material).

3.5. Evaluation of NMDA/NO/sGC pathway involvement in the effects induced by TRPV1 agonism (CPS 1nmol) in the vmPFC on the expression of the conditioned emotional response.

The previous treatment with NMDA antagonist and nNOS inhibitor prevented the increase of freezing response induce by effective dose of TRPV1 agonist (LY, $F_{3,22}=20.81$; NPLA, $F_{3,22}=9.11$, $p < 0.05$), but not the NO scavenger and sGC inhibitor (c-PTIO, $p > 0.05$; ODQ, $p > 0.05$). Moreover, the drugs treatment did not induce alteration in behavior response during re-exposure to aversive context (LY, $p > 0.05$; NPLA, $p > 0.05$; c-PTIO, $p > 0.05$; ODQ, $p > 0.05$; Figure 4A, E, J, N).

In autonomic response, all the treatment did not change the autonomic baseline values (MAP, $p > 0.05$; HR, $p > 0.05$; CT, $p > 0.05$; Table 1 Supplementary material). NMDA antagonist and nNOS inhibitor the treatment during the re-exposure to chamber show a significant effect of time (LY: MAP, $F_{14,308}=126.05$, HR, $F_{14,308}=96.38$, CT, $F_{14,308}=55.26$; NPLA: MAP, $F_{14,308}=129.59$, HR, $F_{14,308}=80.97$, CT, $F_{14,308}=93.50$, $p < 0.05$), treatment (LY: MAP, $F_{3,22}=5.01$, HR, $F_{3,22}=2.51$, CT, $F_{3,22}=3.28$; NPLA, MAP, $F_{3,22}=6.95$, HR, $F_{3,22}=5.98$, CT, $F_{3,22}=4.54$, $p < 0.05$) and interaction between time and treatment (LY: MAP, $F_{42,308}=3.38$, HR, $F_{42,308}=2.51$, CT, $F_{42,308}=2.19$; NPLA, MAP, $F_{42,308}=4.41$, HR, $F_{42,308}=3.31$, CT, $F_{42,308}=3.16$, $p < 0.05$). The NO scavenger and sGC inhibitor during the pre-exposure have significant effect of time (c-PTIO: MAP, $F_{14,308}=113.66$, HR, $F_{14,308}=77.41$, CT, $F_{14,308}=140.93$; ODQ: MAP, $F_{14,322}=89.41$, HR, $F_{14,322}=69.60$, CT, $F_{14,322}=70.54$) but not effect of treatment and interaction time/treatment (c-PTIO: MAP, $p > 0.05$, HR, $p > 0.05$ CT, $p > 0.05$; ODQ: MAP, $p > 0.05$, HR, $p > 0.05$, CT, $p > 0.05$). The NMDA antagonist ($p < 0.05$, Duncan; Figure 4B, C, D) and nNOS inhibitor ($p < 0.05$, Duncan; Figure 4F, G, H) prevent the increase of MAP, HR and decrease of CT induced by TRPV1 agonist, but not NO scavenger ($p > 0.05$, Figure 4K, L, M) and sGC inhibitor ($p > 0.05$, Figure 4O, P, Q).

Figure 4. Inhibition of NMDA/NO pathway in the vmPFC, but not NO/sGC, prevented the increased conditioned emotional response induced by CPS (TRPV1 agonist). Effects of bilateral injection intra-vmPFC of vehicle (Veh; 100 nL) or LY (2 nmol), NPLA (0.04 nmol), c-PTIO (1 nmol) or ODQ (1 nmol) followed by TRPV1 agoist (CPS, 1 pmol) on A,E,I,M) percentage of freezing behavior; and on time course changes in B,F,J,N) cutaneous temperature (DCT), C,G,K,O) mean arterial pressure (DMAP) and D,H,L,P) heart rate (DHR). Values are represented by means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ compared to vehicle group, # $p < 0.05$ AP7, NPLA, c-PTIO or ODQ/CPS compared to vehicle/NIDA. ANOVA followed by Duncan. N=6-8 animals/group.

3.6. Evaluation of oxidative stress involvement in the effects induced by a TRPV1 agonism (CPS 1nmol) in the vmPFC on the expression of the conditioned emotional response.

The previous treatment with an antioxidant drug (NAC 10nmol) was able to prevent the freezing response increases induce by TRPV1 agonism ($F_{3,25}=20.76$, $p<0.01$; Figure 5A). The antioxidant drug has no effect in freezing behavior compared with control animals ($p>0.05$).

In relation of autonomic responses, the antioxidant drug did not change the baseline values (MAP, $p>0.05$; HR, $p>0.05$; CT, $p>0.05$; Table 1 Supplementary material). During pre-exposure, there was a significant effect of time (MAP, $F_{14,350}=100.91$; HR, $F_{14,350}=116.66$; CT, $F_{14,350}=59.51$; $p<0.05$), treatment (MAP, $F_{3,25}=7.77$; HR, $F_{3,25}=12.86$;

CT, $F_{3,25}=3.22$; $p<0.05$) and interaction time/treatment (MAP, $F_{42,350}=4.01$; HR, $F_{42,350}=6.69$; CT, $F_{42,350}=2.53$; $p<0.05$). TRPV1 accentuated the increase in MAP ($p<0.05$; Duncan; Figure 5C), in HR ($p<0.05$; Duncan; Figure 5D) and the decrease in CT ($p<0.05$; Duncan; Figure 5B). NAC have no effect on autonomic response (MAP, $p>0.05$; HR, $p>0.05$; CT, $p>0.05$), but prevented TRPV1 agonism response.

Figure 5. The antioxidant/free radical scavenger NAC (10 nmol) prevented the increased conditioned emotional response induced by TRPV1 agonism in the vmPFC. Effects of bilateral injection intra-vmPFC of vehicle (Veh; 100nL) or NAC (10 nmol) followed by vehicle or CPS (1 nmol) on A) percentage of freezing behavior; and on time course changes in B) cutaneous temperature (ΔCT), C) mean arterial pressure (ΔMAP) and D) heart rate (ΔHR). Values are represented by means $\pm$ SEM. * $p<0.05$ compared to vehicle group, # $p<0.05$ NAC/CPS compared to vehicle/CPS. ANOVA followed by Duncan. $N=7-8$ animals/group.

5. Discussion

The present study demonstrated that CB1 and TRPV1 receptor in vmPFC have an opposite effect in modulation of contextual fear conditioning expression and act through different NO pathway. Conditioned emotional response induced by CB1 antagonist depends of activation of NMDA receptor, NO production, NO extracellular and cGMP pre-synaptic production. Contrary, conditioned emotional response induced by TRPV1

agonist depends of NMDA receptor activation, NO production and nitroactive stress pathway.

mPFC has an important role in modulation of defensive behavior and autonomic modulation (Frysztak and Neafsey, 1991, 1994; Resstel *et al*, 2006a). Our results reinforce this event, demonstrating that neuromodulation system in mPFC are able to change the behavior and related autonomic response during aversive situation. In rodents, previous studies show that vmPFC is an important area involved in baroreflex control (Resstel *et al*, 2004). Others cardiovascular modulation elicited by vmPFC was demonstrated in microinjection of l-glutamate, promoting increase of MAP and HR, without difference when injected in PL and IL areas (Resstel and Corrêa, 2005). This response of increase of both MAP and HR is similar to cardiovascular response during defensive response that reinforce the alert state of rats (Dielenberg *et al*, 2001; Resstel *et al*, 2006b). Moreover, evidences demonstrated that re-exposure to aversive context induce mPFC activation (Beck and Fibiger, 1995). In this idea, ablation or lesion of vmPFC neurotransmission disrupt behavior and autonomic alterations during re-exposure to aversive situation (Frysztak and Neafsey, 1991, 1994; Resstel *et al*, 2006a). This collective data suggests the essential role of vmPFC in modulation of both cardiovascular and behavior control.

Extensive neurotransmissions are related to behavior and cardiovascular regulation in mPFC, as glutamate and NO. Several response have been demonstrated to involve activation of NMDA receptor and NO production by NOS in mPFC, as cardiovascular response produced after l-glutamate injection and emotional conditioned response (Resstel *et al*, 2008; Resstel and Corrêa, 2006). Glutamatergic outputs are important to control behavior and cardiovascular control, probably by projection to others brain areas, that present a pivotal role in this response, as example amygdala (Quirk and Mueller, 2008). Thus, control of glutamatergic neurotransmission into mPFC is essential to lead defensive response and neuromodulators systems possibly represent important targets to regulate emotional conditioned response, as eCBs.

The endocannabinoid system have an important role in modulation of emotional response (Moreira *et al*, 2012; Patel *et al*, 2017), particularly in vmPFC the eCBs modulate emotional, aversive and autonomic response (Lisboa *et al*, 2010b; Worley *et al*, 2017). Here we describe that CB1 antagonist increase the behavior and autonomic response during re-exposure to aversive context. Our result is in accordance with previous data

demonstrating that other CB1 antagonist, AM251, increase freezing behavior and cardiovascular response in contextual fear conditioning (Lisboa *et al*, 2010b). Therefore, AM251 can also binding in μ opioid receptor (Seely *et al*, 2012) and for this reason could not represent the appropriate pharmacology approach to study the CB1 participation in emotional response. Opioid system presents in vmPFC regulate cardiovascular response during restrain stress (Fassini *et al*, 2014) and μ opioid receptor also modulate neurotransmitters release (Nicol *et al*, 1996; Steketee, 2003). Thus, results with AM251 in conditioning could be in parte related with opioid system regulation of aversive response. In the present study, we choose a more selective CB1 antagonist, NIDA 411040, to observe the participation of this receptor in conditioned emotional response. In fact, the CB1 antagonist increase behavioral and cardiovascular response during test, demonstrating CB1 present in vmPFC is an important receptor involved in expression of fear conditioning.

Otherwise, the CB1 antagonist also can promote the binding of AEA with TRPV1, as a channel TRPV1 promote the intense calcium influx and the increase release of glutamate (Kawahara *et al*, 2011; Xing and Li, 2007). This event could promote the enhance conditioned emotional response observed with CB1 antagonist administrate in vmPFC. In fear conditioning, we demonstrated that previous TRPV1 antagonism prevent the response induce by CB1 antagonist, demonstrating that TRPV1 activation is important to CB1 antagonist response in vmPFC. In addition, CB1 receptor probably represent a target in case of TRPV1 antagonist. Previous data show that TRPV1 antagonism in vmPFC decrease the behavioral and cardiovascular response during re-exposure to context (Terzian *et al*, 2014). In our investigation, the administration of CB1 antagonist in an infect dose (NIDA 25pmol) prevent the reduction of conditioned emotional response induced by TRPV1 antagonism. This data demonstrated that TRPV1 antagonism probably favored the AEA induce CB1 activation in vmPFC, leading to decrease conditioned emotional response. The capacity of AEA activate CB1 and TRPV1 receptor usually is related to biphasic effect promoting by drugs that affects endocannabinoid system (Casarotto *et al*, 2012; Moreira *et al*, 2007, 2012; Uliana *et al*, 2016).

TRPV1 agonist has been previously describe in contextual fear conditioning and your activation in vmPFC leads to increase of conditioned emotional response during test (Terzian *et al*, 2014), as same CB1 antagonist effect. We reproduce this event and also observed that high dose of TRPV1 agonist (10nmol) did not increase the conditioned

emotional response. The TRPV1 activation, especially in post-synaptic terminal, promote Ca^{+2} influx and NO production (Aguilar *et al*, 2014b; Lipina and Hundal, 2017), probably the excessive levels of NO could modulate others neurotransmission, as GABAergic (Garthwaite, 2008; Li *et al*, 2004; Wang *et al*, 2007). The increase of GABA release balance the glutamate levels and promoting the lack of efficacy in vmPFC TRPV1 agonist high dose. This event was describe in NTS, low level of NO induce glutamatergic potentiation and high levels GABAergic potentiation (Wang *et al*, 2007), supporting this idea in vmPFC in fear conditioning response.

Both CB1 antagonist and TRPV1 agonist induce enhancement of conditioned response that reflect the opposite role of these receptors in mPFC on modulation of aversive response. The vmPFC involve the PL and IL portion that usually related to a differential response in fear conditioning (Quirk *et al*, 2006), the PL is involved in the fear conditioning expression and IL in fear conditioning extinction. In this scene, we test the both effective doses (55 and 100pmol) of CB1 antagonist in PL and IL portions of vmPFC and no differences was observed in the expression of contextual conditioned response. We also investigate the conditioned response induce by TRPV1 agonism in PL and IL portion, but as same in CB1 antagonism protocol, the fear conditioned response is similar. This similar response could be observed because in our study we just investigate the expression of fear conditioning and no the extinction, that required a longer exposure to aversive context. This evidence shows that CB1 and TRPV1 receptor present in PL and IL portion have the same role in modulation of contextual fear conditioning.

Both CB1 and TRPV1 are related to glutamatergic neurotransmission modulation in several areas of CNS (Auclair *et al*, 2000; Katona and Freund, 2012; Kawahara *et al*, 2011; Marsicano and Lutz, 1999; Starowicz *et al*, 2007; Xing and Li, 2007), including vmPFC (Auclair *et al*, 2000; Lafourcade *et al*, 2007). Evidences demonstrate that activation of CB1 receptor decrease the release glutamate in PFC (Auclair *et al*, 2000) and TRPV1 have a facilitator role in other brain areas (Kawahara *et al*, 2011; Starowicz *et al*, 2007; Xing and Li, 2007). Glutamate is essential for vmPFC function and thus modulation of several response, as emotional and autonomic response in fear conditioning (Beck and Fibiger, 1995; Resstel *et al*, 2006a, 2008). Thus, the glutamate release modulated by eCBs could be a possible mechanism by which the CB1 antagonism and TRPV1 activation induce high conditioned response. The antagonism of CB1 and activation of TRPV1 probably disinhibit and induce glutamate release, respectively. To

access this possibility, we observed that the previous administration of NMDA antagonist prevents the high levels of freezing behavior and autonomic response during test, induced by both CB1 antagonist and TRPV1 agonist. Data that show the essential role of glutamate in this response.

Another important neurotransmission involved with endocannabinoid system and glutamatergic transmission is the nitroergic neurotransmission (Garthwaite, 2008; Lipina and Hundal, 2017). NO production is promoted by calcium influx and activation of nNOS, possibly by NMDA and TRPV1 activation, promoting pre- and post-synaptic pathway by NO production (Garthwaite, 2008). Considering these evidences, the previous administration of nNOS inhibitor was able to prevent the high conditioned response induced by CB1 antagonism and TRPV1 activation. This result demonstrates that the effect of CB1 and TRPV1 in contextual fear conditioning require NO production. NO as a gas can diffuse to synaptic cleft and other neurons and can change the excitability of presynaptic terminals, through activation of sGC to production of cGMP (Garthwaite, 2008; Schmidt *et al*, 1992). This event promotes the increase of neurotransmission release, as glutamate (Garthwaite, 2008). In our study, we use a NO scavenger and sGC inhibitor to access the role of this NO pathway present in vmPFC in response induced by CB1 and TRPV1 treatment. These drugs are able to prevent the high conditioned emotional response promoted by CB1 antagonism, but not in case of TRPV1 activation. Thus, CB1 antagonist in vmPFC involves the activation of NMDA receptor, NO production, NO release and sGC activation to lead the high fear conditioning response. In other way, TRPV1 agonism probably requires another post-synaptic NO pathway.

Evidences demonstrated that NO can act in post-synaptic terminal through reactive species production, as peroxynitrite (ONOO^-) and NO by itself ($\text{NO}^\bullet$). These species can induce translational modifications and change protein function, S-Nitrosylation in case of $\text{NO}^\bullet$ and Nitrotyrosination by ONOO^- . These events affect protein function in pre and post-synaptic terminal (Bradley and Steinert, 2016; Quijano *et al*, 1997). To investigate if this pathway is related with TRPV1 agonism response in vmPFC, we used an antioxidant drug, the n-acetylcysteine, before TRPV1 agonist. Evidences show that n-acetylcysteine can decrease the production of peroxynitrite (Kumar and Sitasawad, 2009) and possibly reduces this NO pathway. The previous administration of antioxidant was able to prevent the conditioned emotional response induced by TRPV1 activation, result that suggests that production of reactive species in vmPFC is important in TRPV1 pathway.

induce high emotional response. Thus, reactive species NO pathway probably affect post-synaptic protein function, as NMDA and AMPA glutamate receptor (Choi *et al*, 2000; Selvakumar *et al*, 2009). TRPV1 activation can lead a significant production of reactive species related to NO and promote increase/decrease of receptor function to increase the conditioned emotional response into vmPFC.

The differential pathway promoted by CB1 antagonism and TRPV1 agonism in vmPFC is surprising, because the different receptor in the same system induce similar response through differential NO pathway. Data from our group demonstrated that CB1 antagonist and TRPV1 agonism in dorsolateral PAG have the same pathway involving NMDA activation, NO production, NO release and sGC activation in contextual fear conditioning (Uliana *et al*, 2016). In dorsal hippocampus, the CB1 antagonist also induce greater conditioned response by NMDA/NO/sGC pathway (Spiacci *et al*, 2016). These evidences are in accordance with our finding involve CB1 antagonist in vmPFC, suggesting that CB1 have similar pathway in other brain areas that is related to contextual fear conditioning. Interesting, TRPV1 receptor pathway in vmPFC, at least in fear conditioning, seems promote response by another NO pathway. TRPV1 and reactive species relation in behavior and autonomic response during an aversive situation unexplored, because this relation is not usually investigated in this sense. However, more detailed studies are needed to evaluate the occurrence of this event in vmPFC during re-exposure to aversive situation.

Therefore, the collective data suggested that CB1 and TRPV1 receptor are important target in modulate defensive response, demonstrated in contextual fear conditioning. However, these receptors present a dissociative pathway involve NO pathway. CB1 receptor probably modulate glutamate release in vmPFC through NMDA activation, NO production/release and pre-synaptic sGC activation. TRPV1 receptor activation possibility leads to increase to calcium influx and induce NO production that act by reactive species production, modulating post-synaptic protein function.

Acknowledgments

The authors wish to thank Laura Camargo for technical assistance. This study was supported by the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES).

Statement of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Reference

- Aguiar DC, Moreira FA, Terzian AL, Fogaça MV, Lisboa SF, Wotjak CT, Guimaraes FS. 2014. Modulation of defensive behavior by Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 (TRPV1) channels. *Neurosci Biobehav Rev.* 46 Pt 3:418–428.
- Araque A, Castillo PE, Manzoni OJ, Tonini R. 2017. Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. *Neuropharmacology.* 124:13–24.
- Auclair N, Otani S, Soubrie P, Crepel F. 2000. Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 83:3287–3293.
- 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 Off J Soc Neurosci.* 15:709–720.
- Bradley SA, Steinert JR. 2016. Nitric Oxide-Mediated Posttranslational Modifications: Impacts at the Synapse. *Oxid Med Cell Longev.* 2016:5681036.
- Bredt DS, Snyder SH. 1989. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:9030–9033.
- Carlén M. 2017. What constitutes the prefrontal cortex? *Science.* 358:478–482.
- Carrive P. 2000. Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. *Brain Res.* 858:440–445.
- Casarotto PC, Terzian ALB, Aguiar DC, Zangrossi H, Guimarães FS, Wotjak CT, Moreira FA. 2012. Opposing roles for cannabinoid receptor type-1 (CB₁) and transient receptor potential vanilloid type-1 channel (TRPV1) on the modulation of panic-like responses in rats. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol.* 37:478–486.
- Cavanaugh DJ, Chesler AT, Jackson AC, Sigal YM, Yamanaka H, Grant R, O'Donnell D, Nicoll RA, Shah NM, Julius D, Basbaum AI. 2011. Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 31:5067–5077.
- Childers SR, Deadwyler SA. 1996. Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 52:819–827.
- Choi YB, Tenneti L, Le DA, Ortiz J, Bai G, Chen HS, Lipton SA. 2000. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci.* 3:15–21.
- Clausen AN, Francisco AJ, Thelen J, Bruce J, Martin LE, McDowd J, Simmons WK, Aupperle RL. 2017. PTSD and cognitive symptoms relate to inhibition-related prefrontal activation and functional connectivity. *Depress Anxiety.* 34:427–436.
- Dielenberg RA, Carrive P, McGregor IS. 2001. The cardiovascular and behavioral response to cat odor in rats: unconditioned and conditioned effects. *Brain Res.* 897:228–237.
- Egertová M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR. 1998. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci.* 265:2081–2085.
- Fanselow MS. 1980. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci.* 15:177–182.

- Fassini A, Scopinho AA, Resstel LBM, Correa FMA. 2014. Opioid receptors in the prelimbic cortex modulate restraint stress-induced cardiovascular responses in the rat. *Neuropharmacology*. 85:367–374.
- Fendt M, Fanselow MS. 1999. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev*. 23:743–760.
- Frysztak RJ, Neafsey EJ. 1991. The effect of medial frontal cortex lesions on respiration, “freezing,” and ultrasonic vocalizations during conditioned emotional responses in rats. *Cereb Cortex N Y N* 1991. 1:418–425.
- Frysztak RJ, Neafsey EJ. 1994. The effect of medial frontal cortex lesions on cardiovascular conditioned emotional responses in the rat. *Brain Res*. 643:181–193.
- Garthwaite J. 2008. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci*. 27:2783–2802.
- Katona I, Freund TF. 2012. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci*. 35:529–558.
- Kawahara H, Drew GM, Christie MJ, Vaughan CW. 2011. Inhibition of fatty acid amide hydrolase unmasks CB1 receptor and TRPV1 channel-mediated modulation of glutamatergic synaptic transmission in midbrain periaqueductal grey. *Br J Pharmacol*. 163:1214–1222.
- Kozłowska K, Walker P, McLean L, Carrive P. 2015. Fear and the Defense Cascade: Clinical Implications and Management. *Harv Rev Psychiatry*. 23:263–287.
- Kumar S, Sitasawad SL. 2009. N-acetylcysteine prevents glucose/glucose oxidase-induced oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in H9c2 cells. *Life Sci*. 84:328–336.
- Lafourcade M, Elezgarai I, Mato S, Bakiri Y, Grandes P, Manzoni OJ. 2007. Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PloS One*. 2:e709.
- Li D-P, Chen S-R, Finnegan TF, Pan H-L. 2004. Signalling pathway of nitric oxide in synaptic GABA release in the rat paraventricular nucleus. *J Physiol*. 554:100–110.
- Lipina C, Hundal HS. 2017. The endocannabinoid system: “NO” longer anonymous in the control of nitrergic signalling? *J Mol Cell Biol*. 9:91–103.
- Lisboa SF, Magesto AC, Aguiar JC, Resstel LBM, Guimarães FS. 2013. Complex interaction between anandamide and the nitrergic system in the dorsolateral periaqueductal gray to modulate anxiety-like behavior in rats. *Neuropharmacology*. 75:86–94.
- Lisboa SF, Reis DG, da Silva AL, Corrêa FMA, Guimarães FS, Resstel LBM. 2010. Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. *Int J Neuropsychopharmacol*. 13:1163–1173.
- Lisboa SF, Stecchini MF, Corrêa FMA, Guimarães FS, Resstel LBM. 2010. Different role of the ventral medial prefrontal cortex on modulation of innate and associative learned fear. *Neuroscience*. 171:760–768.
- Marsicano G, Lutz B. 1999. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci*. 11:4213–4225.
- Mezey E, Tóth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A. 2000. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:3655–3660.

- Milad MR, Rauch SL, Pitman RK, Quirk GJ. 2006. Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders. *Biol Psychol.* 73:61–71.
- Moghaddam B. 1993. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem.* 60:1650–1657.
- Moreira FA, Aguiar DC, Guimarães FS. 2007. Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology.* 52:958–965.
- Moreira FA, Aguiar DC, Terzian ALB, Guimarães FS, Wotjak CT. 2012. Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? *Neuroscience.* 204:186–192.
- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. 1991. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature.* 354:31–37.
- Nicol B, Rowbotham DJ, Lambert DG. 1996. μ - and κ -opioids inhibit K^+ evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices. *Neurosci Lett.* 218:79–82.
- Park J, Moghaddam B. 2017. Impact of anxiety on prefrontal cortex encoding of cognitive flexibility. *Neuroscience.* 345:193–202.
- Patel S, Hill MN, Cheer JF, Wotjak CT, Holmes A. 2017. The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic drugs. *Neurosci Biobehav Rev.* 76:56–66.
- Quijano C, Alvarez B, Gatti RM, Augusto O, Radi R. 1997. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem J.* 322 (Pt 1):167–173.
- Quirk GJ, Garcia R, González-Lima F. 2006. Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. *Biol Psychiatry.* 60:337–343.
- Quirk GJ, Mueller D. 2008. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol.* 33:56–72.
- Radley JJ, Arias CM, Sawchenko PE. 2006. Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 26:12967–12976.
- Resstel LBM, Corrêa FM de A, Guimarães FS. 2008. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex N Y N 1991.* 18:2027–2035.
- Resstel LBM, Corrêa FMA. 2005. Pressor and tachycardic responses evoked by microinjections of L-glutamate into the medial prefrontal cortex of unanaesthetized rats. *Eur J Neurosci.* 21:2513–2520.
- Resstel LBM, Corrêa FMA. 2006. Injection of l-glutamate into medial prefrontal cortex induces cardiovascular responses through NMDA receptor - nitric oxide in rat. *Neuropharmacology.* 51:160–167.
- Resstel LBM, Fernandes KBP, Corrêa FMA. 2004. Medial prefrontal cortex modulation of the baroreflex parasympathetic component in the rat. *Brain Res.* 1015:136–144.
- Resstel LBM, Joca SRL, Guimarães FG, Corrêa FMA. 2006. Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience.* 143:377–385.
- Resstel LBM, Joca SRL, Moreira FA, Corrêa FMA, Guimarães FS. 2006. Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res.* 172:294–298.
- Schmidt HH, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F. 1992. Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 40:1439–1456.

- Seely KA, Brents LK, Franks LN, Rajasekaran M, Zimmerman SM, Fantegrossi WE, Prather PL. 2012. AM-251 and rimonabant act as direct antagonists at mu-opioid receptors: implications for opioid/cannabinoid interaction studies. *Neuropharmacology*. 63:905–915.
- Selvakumar B, Huganir RL, Snyder SH. 2009. S-nitrosylation of stargazin regulates surface expression of AMPA-glutamate neurotransmitter receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:16440–16445.
- Smart D, Jerman JC. 2000. Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor. *Trends Pharmacol Sci*. 21:134.
- Spiacchi GBL, Antero LS, Reis DG, Lisboa SF, Resstel LB. 2016. Dorsal hippocampus cannabinoid type 1 receptors modulate the expression of contextual fear conditioning in rats: Involvement of local glutamatergic/nitrergic and GABAergic neurotransmissions. *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol*. 26:1579–1589.
- Starowicz K, Maione S, Cristino L, Palazzo E, Marabese I, Rossi F, de Novellis V, Di Marzo V. 2007. Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 27:13739–13749.
- Steketee JD. 2003. Neurotransmitter systems of the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev*. 41:203–228.
- Terzian ALB, Aguiar DC, Guimarães FS, Moreira FA. 2009. Modulation of anxiety-like behaviour by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol*. 19:188–195.
- Terzian ALB, dos Reis DG, Guimarães FS, Corrêa FMA, Resstel LBM. 2014. Medial prefrontal cortex Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) in the expression of contextual fear conditioning in Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 231:149–157.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. 1998. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 83:393–411.
- Uliana DL, Hott SC, Lisboa SF, Resstel LBM. 2016. Dorsolateral periaqueductal gray matter CB1 and TRPV1 receptors exert opposite modulation on expression of contextual fear conditioning. *Neuropharmacology*. 103:257–269.
- Wang S, Paton JFR, Kasparov S. 2007. Differential sensitivity of excitatory and inhibitory synaptic transmission to modulation by nitric oxide in rat nucleus tractus solitarii. *Exp Physiol*. 92:371–382.
- Wilson RI, Nicoll RA. 2002. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*. 296:678–682.
- Worley NB, Hill MN, Christianson JP. 2017. Prefrontal endocannabinoids, stress controllability and resilience: A hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*.
- Xing J, Li J. 2007. TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. *J Neurophysiol*. 97:503–511.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sjørgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED. 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. 400:452–457.

Supplementary Results

Supplementar Figure 1. CB1 antagonism in the vmPFC with NIDA (55 pmol and 100 pmol) microinjected in PL and IL portios exacerbated the expression of conditioned emotional response. Effects of bilateral injection of vehicle, NIDA (55 and 100 pmol) in the vmPFC during re-exposure to the footshock chamber on A) percentage of freezing behavior; on time course changes in B) cutaneous temperature (DCT), C) mean arterial pressure (DMAP) and D) heart rate (DHR). Values are represented by means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ compared to vehicle group. ANOVA followed by Duncan.

Supplemental Figure 2. TRPV1 agonism in the vmPFC with CPS (1 nmol) microinjected in PL and IL portios exacerbated the expression of conditioned emotional response. Effects of bilateral injection of vehicle, CPS (1 nmol) in the vmPFC during re-exposure to the footshock chamber on A) percentage of freezing behavior; on time course changes in B) cutaneous temperature (DCT), C) mean arterial pressure (DMAP) and D) heart rate (DHR). Values are represented by means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ compared to vehicle group. ANOVA followed by Duncan.

Supplemental Figure 3. The antioxidant/free radical scavenger NAC (1, 5, 10 nmol) administrated in vmPFC not affect conditioned emotional response. Effects of bilateral injection intra-vmPFC of vehicle (Veh; 100nL) or NAC (1, 5, 10 nmol) on A) percentage of freezing behavior; and on time course changes in B) cutaneous temperature (ΔCT), C) mean arterial pressure (ΔMAP) and D) heart rate (ΔHR). Values are represented by means $\pm$ SEM.

Anexo VIII

Original manuscript

Fear Extinction disruption in a developmental rodent model of schizophrenia:
change in basolateral amygdala-medial prefrontal cortex balance.

Uliana, DL^{*1}; Resstel LBM¹; Grace AA².

¹Department of Pharmacology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 14049-900.

²Departments of Neuroscience, Psychiatry and Psychology, University of Pittsburgh, A210 Langley Hall, Pittsburgh, PA 15260.

*Corresponding authors: danielalescano@usp.br

Abstract

Schizophrenia patients typically exhibit prominent negative symptoms, associated with deficits in extinction recall and decreased ventromedial prefrontal cortex activity (vmPFC, related to medial PFC infralimbic segment in rodents). mPFC activity modulates the activity of basolateral amygdala (BLA) and this connectivity is related to extinction. mPFC and BLA activity has been shown to be altered in the methylazoxymethanol acetate (MAM) developmental disruption model of schizophrenia. However, it is unknown if there are alterations in extinction processes in this model. Therefore, we investigated extinction and the role of mPFC-BLA balance in MAM rats. Male offspring of pregnant rats treated with Saline or MAM (20mg/kg; i.p.) on gestational day 17 were used in fear conditioning (Contextual/Tone) and electrophysiological experiments (mPFC-BLA plasticity). No difference was observed in conditioning, extinction and test sessions in contextual fear conditioning. However, MAM-treated rats demonstrated impairment in extinction learning and recall in tone fear conditioning. Furthermore, high frequency stimulation (HFS) of the BLA decreased spike probability in the mPFC of saline-treated rats but not in MAM rats. NMDA antagonist microinjected into the BLA induced extinction learning and recall disruption in control rats, resulting in a similar response as that observed in MAM-treated rats. These data demonstrated extinction impairment in the MAM model, analogous to that observed in schizophrenia patients, which was probably due to disruption in the regulation of mPFC activity by glutamatergic neurotransmission in the BLA.

1. Introduction

In addition to prominent positive symptoms and cognitive deficits, schizophrenia patients also exhibit alterations in emotional functions related to negative symptoms (Polgár et al., 2008; Waltz et al., 2011). The ability of schizophrenia patients to process emotional information can affect the symptom severity and contribute to psychosis (Polgár et al., 2008; Barch and Dowd, 2010; Strauss et al., 2011). Impairment in aversive associative learning is observed in schizophrenia (Kosmidis et al., 1999; Hofer et al., 2001; Jensen et al., 2008), such as disruption of extinction memory (Holt et al., 2009). Extinction involves formation of a new emotional memory, as shown by studies in rodents and humans (Milad and Quirk, 2012; Furini et al., 2014). Pavlovian fear conditioning is extensively used to understand this process; this paradigm is based on pairing a neutral stimulus as context and a tone (the conditioned stimulus-CS) with an aversive stimulus (the unconditioned stimulus-US), with the aversive stimulus being footshock in rodents (Izquierdo et al., 2016). After pairing, the CS can predict the US event and elicit a conditioned response, such as freezing behavior in rats (Fanselow, 1980; Resstel et al., 2006). The extinction of fear memory involves a decrease in the emotional response produced in response to previous aversive learning by repeated presentation of CS without the aversive stimulus, and depends on formation of new learning (Milad e Quirk 2012; Singewald et al. 2015).

The process of extinction is impaired in some neuropsychiatric disorders, such as posttraumatic stress disorder and schizophrenia (Milad et al. 2009; Holt et al. 2009). Evidence in schizophrenia patients, using fear conditioning, demonstrated extinction recall impairment (Holt et al. 2009) associated with decreased ventromedial prefrontal cortex (vmPFC) function during the task (Holt et al. 2012). vmPFC is functionally analogous to the medial prefrontal cortex (mPFC) in rodents, especially the infralimbic portion (Phelps et al., 2004; Milad et al., 2007). Both in humans and rodents this area is essential for extinction learning. Therefore, disruption of the mPFC directly affects the consolidation of extinction (Quirk, Garcia, e González-Lima 2006; Milad et al., 2007). The amygdala is another brain area involved in fear conditioning that has reciprocal connectivity with the mPFC (Quirk and Mueller, 2008; Marek et al., 2013). The

balance between amygdala and mPFC is crucial in fear and extinction learning. During extinction learning the mPFC has an inhibitory role over amygdala activity and conditioned responses (Quirk and Mueller, 2008). Recent evidence also demonstrated that the amygdala projections to the mPFC are essential for extinction learning and recall (Klavir et al., 2017). There is a limited amount of studies investigating the extinction process in animal models of schizophrenia and the neural basis of this process, especially in a developmental disruption animal model of schizophrenia.

The developmental disruption animal model of schizophrenia employed here consists of administering methylazoxymethanol acetate (MAM), an DNA alkylating agent, during gestational day 17, which leads to an increase in mesolimbic dopamine responsivity in the adult. This model demonstrates substantial neuroanatomic, behavior and electrophysiology alterations that parallel those observed in schizophrenia patients (Modinos et al., 2015). Several brain structures that are related to modulation of extinction process have been shown to undergo important changes in this model, including the BLA and mPFC (Lavin et al., 2005; Belujon et al., 2014; Du and Grace, 2016). The mPFC in particular presents significant alterations in activity (Lavin et al., 2005; Belujon et al., 2014) that is believed to contribute to BLA hyperactivity (Du and Grace, 2016) and deficits in extinction (Quirk *et al*, 2006; Burgos-Robles *et al*, 2007). Considering that MAM-treated animals have altered mPFC and BLA activity and that these brain areas are essential in extinction memory, we examined whether MAM-treated rats also exhibit deficits in extinction memory that correspond to changes in mPFC-BLA interactions.

2. Materials and Methods

Animals and Methylazoxymethanol treatment

Pregnant female Sprague–Dawley rats were administered saline (1mg/kg) or MAM (20mg/kg, i.p.) on GD 17 (Moore *et al*, 2006). Male offspring were weaned on postnatal day (PND) 22 and were housed in groups of two or three with littermates until approximately 3–4 months of age. Rats were then used for behavioral and electrophysiological experiments after PND 65, as young adults (Schneider, 2013). The rats were housed in a temperature-controlled room

($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) under standard laboratory conditions with free access to food and water and a 12 h light/ dark cycle (lights on at 7 a.m.). 7 days before PDN65, the animals were transferred to a reverse light cycle room (lights on 7 p.m.). The rats were tested during the lights-off cycle in behavior experiments.

All the experiments were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of Pittsburgh.

Contextual fear conditioning

The conditioning chamber used was a grid floor with stainless steel rods plugged into a shock generator (MedAssociates). The animals were placed into the footshock chamber and, after 2 minutes habituation, four footshocks (0.75mA for 1s at 20-60s random intervals) were delivered. Twenty-four hours later the animals were re-exposed to the experimental chamber for a 30-min-long session (6 blocks of 5 min) without shock delivery (extinction session). On the next day, the test (extinction recall) was recorded during 10 minutes of novel exposure. Freezing behavior was recorded during all sessions of conditioning, extinction and test. Freezing was defined as the complete absence of movement other than respiration while the animal assumed a characteristic splayed posture (Fanselow 1980).

Tone fear conditioning

The tone fear conditioning protocol was based on Brugos-Robles et al (2007). The same chamber used in contextual fear conditioning was used in the tone protocol. In the acquisition phase, the animals were placed into the footshock chamber and after 2 minutes received 5 habituation tones (30s; 65dB; 30-60s random interval), followed by 7 tones that co-terminated with footshocks (0.5 s; 0.6mA; 30-60 random interval). Twenty-four hours later the animals were re-exposed to the chamber with 2 minutes baseline and 20 tone presentations (extinction session). The following day the rats were tested with 2 minutes baseline and 8 tone presentations. The same chamber was used in all the sessions.

Electrophysiological recordings

The electrophysiological experiments were performed the day after the tone fear conditioning protocol, as described previously (Belujon et al, 2014). The rats were injected with chloral hydrate (400mg/kg) and fixed in a stereotaxic frame (Kopf). Body temperature was held constant at 37°C using a thermostatically-controlled heating pad (Fintronics). Anesthesia was maintained by i.p. injection of chloral hydrate as needed to maintain suppression of the hindlimb compression reflex. *In vivo* extracellular recordings were performed using microelectrodes pulled from Omegadot 2.0mm glass tubing on a vertical electrode puller (Narishige P-5, Japan) and the tip broken back under microscopic control to an impedance of 12-16MΩ and filled with 2M NaCl containing 2% Sky Blue dye. Microelectrodes were lowered through the mPFC (A/P +3.2-2.4mm from bregma; M/L +0.4-0.5mm from midline; V -2.5-4.5mm from brain surface). Electrophysiological signals were amplified (x1000) and filtered with 10-50Hz high pass and 16kHz low pass using an amplifier (model WDR-420). An oscilloscope (B&K precision) was used to display the electrophysiological signal and the data were transferred via a Powerlab interface (AD instruments) to a computer with LabChart v.8 software. A signal-to-noise ratio >3 was the cutoff used for data analyses.

Concentric bipolar stimulation electrodes (NEX-100X; Rhodes Medical Instruments) positioned in the BLA (A/P -2.6mm from bregma; M/L -4.6-4.8mm from midline; V -7.8-8mm from skull) were used to apply the single-pulse and high frequency stimulation (HFS; 20Hz; 10s at suprathreshold). Single-pulse stimulation in the BLA was applied using a dual-output stimulator (S8800; Grass Technologies) with 1mA intensity/0.5Hz frequency/0.25ms pulse duration to search for a responsive neuron in the mPFC. When a responsive monosynaptically activated neuron was found the current administered to the BLA was adjusted to evoke an action potential 50% of the time. Spike probability was measured 10min before HFS (baseline) and 30min after HFS, dividing the number of spikes by the total number of single-pulse stimuli. Only 1 neuron was recorded per animal.

BLA cannula implantation and drug administration.

For implantation of cannulae into the BLA, rats were anesthetized with isoflurane and fixed in the stereotaxic frame. After incision, stainless steel guide cannulae

were implanted bilaterally targeting the BLA (A/P -2.8mm from bregma; M/L +5.0mm from midline; V -7.8mm from skull) according to Paxino and Watson (1997). Acrylic cement and one metal screw were used to fix it to the skull. After surgery, a subcutaneous injection of a nonsteroidal anti-inflammatory (Carprofen; Rimadyl, Zoetis Inc) was administered for post-operative analgesia, and a medicated food (MediGel®CPF) was provided in the rat homecage. To survey recovery the rats were maintained in an isolated environment for 2 days, after which the rats were housed in groups of two with a littermate in a clean cage. The rats were maintained in the animal care unit for 7 days to complete recovery before initiating behavior experiments.

In a subgroup of rats, ten minutes before the extinction session saline 0.9% (0.5µl) or NMDA antagonist (DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid, AP5 0.5µg/0.5µl; Sigma) (Zimmerman and Maren, 2010) was administered into the BLA using a 2µl Hamilton syringe (Hamilton Co., USA). After injection, the needles remained in place for an additional 30 sec to prevent reflux. The animals were then tested for tone fear conditioning.

Histology

At the end of electrophysiology recordings, the recording site was verified with electrophoretic ejection of Chicago Sky Blue dye (-20µA constant negative current, 20 min). The site of electrode stimulation was verified by administering 10s cathodal current at 200µA. A lethal dose of chloral hydrate (additional 400mg/kg) was administered for euthanasia. In rats that received the BLA implantation, after testing the animals were killed using a closed chamber and CO₂.

The rats were decapitated and the brain removed before fixing the tissue in 8% paraformaldehyde for approximately 48h, following by transferring to 25% sucrose solution for cryoprotection. The brains were frozen and sliced coronally (60µM), after saturation, using a cryostat (Leica Frigocut 2800). The slices were mounted in gelatin-chormalum-coated slides and stained with a combination of neutral red and cresyl violet.

Statistical Analyses

Freezing behavior in conditioning/extinction sessions and electrophysiological recording data were analyzed using a two-way ANOVA (Time - repeated factor; condition – independent variable and freezing behavior/%change in spike probability – dependent variable). The extinction retention test and spike probability were analyzed using the Student's t-test (Condition – independent variable and freezing behavior/spike probability – dependent variable). All data were represented as the mean $\pm$ SEM. Statistical tests with $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Contextual fear conditioning

In the acquisition session of contextual fear conditioning, saline and MAM rats acquired the contextual fear memory, and no difference was observed between the groups (Fig. 1; two-way ANOVA; time $F_{4.52}=176.2$, $p < 0.05$; condition $p > 0.05$; interaction $p > 0.05$). On day two, saline and MAM groups were similar in contextual fear expression (first point of extinction, $p > 0.05$, t-test). In the extinction session, no difference was found between both groups (two-way ANOVA; time $F_{5.65}=25$, $p < 0.05$; condition $p > 0.05$; interaction $p > 0.05$). No difference was observed between saline and MAM groups ($p > 0.05$, t-test).

3.2. Tone fear conditioning

Saline and MAM groups acquired the tone fear memory conditioning at the same rate (Fig. 2; time, $F_{5.95}=700.5$; condition, $p > 0.05$; interaction, $p > 0.05$; two-way ANOVA). During the extinction session, baseline and fear expression (first point of training) were similar between saline and MAM groups ($p > 0.05$, t-test). Two-way ANOVA showed a significant effect of time ($F_{9.17}=18.47$, $p < 0.05$), condition ($F_{1.19}=5.52$, $p < 0.05$), but there was no interaction ($p > 0.05$) in the extinction session. In extinction recall, saline and MAM-treated animals were significantly different at baseline ($t=2.24$, $p < 0.05$) and during the extinction recall ($t=2.96$, $p < 0.05$).

3.3. BLA-mPFC plasticity.

In Conditioned saline and MAM group, single-pulse stimulation in BLA was used to evoke spike discharge in mPFC neurons (Figure 3A-C). The mean baseline

spike probability was not different between groups ($p < 0.05$, t-test, Figure 3D). The current used to obtain at least 50% spike probability baseline for BLA-evoked response was not significantly different between Saline and MAM-treated animals (Saline $1.12\text{mA} \pm 0.031$ and MAM $1.09\text{mA} \pm 0.035$; $p > 0.05$, t-test;). At baseline, there was no difference in activity evoked by single-pulse stimulation of the BLA (Saline 42.9% and MAM 37.5% of total neurons recorded). BLA HFS in saline-treated animals decreases probability of evoking spikes in mPFC neurons, which was not observed in MAM-treated animals (2-way ANOVA significant effect of time ($F_{7,13}=2.76$, $p < 0.05$), condition ($F_{1,19}=10.01$, $p < 0.05$) and interaction ($F_{7,13}=2.34$, $p < 0.05$; Figure 3E). The mean percent change in BLA-evoked spike probability following HFS was decreased in saline rats, but not in the MAM group ($t=2.99$, $p < 0.05$, t-test, Figure 3F).

In saline animals, BLA stimulation produced similar spike probabilities with PL ($n=8$) and IL ($n=6$) stimulation ($p > 0.05$, t-test, Figure 4C; significant effect of time, $F_{7,84}=7.52$, $p < 0.05$, but not mPFC subregion, $p > 0.05$, Figure 4D). The mean of %Change in BLA-evoked spike probability was not significantly different comparing MAM and Saline rats ($p > 0.05$; Figure 4E).

In order to examine whether conditioning impacted spike probability, the impact of single-pulse and HFS of BLA in naive animals on the mPFC was evaluated. With single-pulse stimulation at baseline, saline and MAM-treated animals did not exhibit differences in evoked spike probability ($p > 0.05$, t-test, Supplemental Figure 1C) and intensity of current required to obtain at least 50% spike probability ($p > 0.05$, t-test; Saline 1.27 ± 0.044 , MAM 1.28 ± 0.036). BLA HFS in saline rats also decreased the probability of evoking spikes in mPFC neurons, which was not observed in the MAM rats 2-way ANOVA significant effect of time ($F_{7,84}=4.63$, $p < 0.05$), condition ($F_{1,12}=5.71$, $p < 0.05$) and interaction ($F_{7,84}=3.46$, $p < 0.05$; Supplemental Figure 1D). The Mean percent change in BLA-evoked spike probability was significantly decreased in the Saline group compared to MAM-treated rats ($t=2.39$, $p < 0.05$, t-test, Supplemental Figure 1E).

3.4. NMDA antagonist injection in BLA.

To investigate whether the BLA itself was involved in the differential impact of BLA stimulation on mPFC plasticity, an NMDA antagonist was administered into

the BLA before extinction (Figure 5). Both groups of rats acquired fear conditioning (Time effect, $F_{5.55} = 255.2$, $p < 0.05$; Group effect $p > 0.05$; interaction, $p > 0.05$; Two-way ANOVA). In the Extinction session, no difference was observed at baseline ($p > 0.05$; t-test). However, the rats that received NMDA antagonist did not extinguish the fear response ($p > 0.05$, ANOVA), as was observed in the Saline group ($F_{9.50} = 2.60$, $p < 0.05$, repeated measures ANOVA effect of time ($F_{9.99} = 7.08$, $p < 0.05$), treatment ($F_{1.11} = 8.05$, $p < 0.05$) and no interaction ($p < 0.05$). During the test session, the rats that received the NMDA antagonist exhibited a higher degree of freezing at baseline ($t = 2.86$, $p < 0.05$; t-test) and at testing ($t = 3.31$, $p < 0.05$; t-test).

4. Discussion

Prenatal MAM treatment, as described previously, produces a set of alterations that is analogous with those observed in schizophrenia patients (Modinos, 2015), such as deficits in social interaction and spatial memory (Moore et al., 2006; Le Pen, 2006). In humans, schizophrenia patients present impairment of extinction recall memory in fear conditioning (Holt, 2009), suggesting that aversive learning is abnormal. Using tone fear conditioning we first described an alteration in aversive learning in MAM rats. Thus, MAM-treated rats exhibit a deficit in tone fear extinction learning and recall, demonstrating an abnormal processing of extinction learning that partially mimics what happens in schizophrenia patients. Moreover, we demonstrated that MAM-treated rats have no alteration in contextual fear conditioning. A recent study from our group suggests that MAM-treated animals have a deficiency in context discrimination to predict a future aversive situation (Gill et al., 2017). In the contextual fear conditioning experiment, we observed a similar expression of conditioned response between Saline and MAM-treated animals. This difference is probably due to the different protocol used, where in the present study we applied a higher number of footshocks (4) and higher intensity (0.75mA) as contrasted with 1 footshock (0.5mA) in the previous study that probably produced a strong association with context.

The results with contextual and tone fear conditioning is possibly related to different neural pathways that control these responses (Maren and Quirk, 2004). Evidence suggests that in fear conditioning, contextual information is

preferentially modulated by the hippocampus and tone information is controlled by amygdala (Maren and Quirk, 2004; Quirk and Mueller, 2008). In the MAM model, the amygdala likely has an important role in fear conditioning. MAM rats exhibit hyperactivity in the BLA (Du and Grace, 2016), which could contribute to the abnormalities in extinction memory observed here. Although hyperactivity in the ventral hippocampus (vHipp) has been characterized in MAM rats (Lodge and Grace, 2007), the vHipp in this preparation did not impact the BLA-mPFC pathway (Esmaeili and Grace, 2013). This suggests that the contextual valence in extinction that is dependent on the vHipp is not essential for learning of extinction under the conditions tested. Evidence demonstrated that BLA projections to mPFC are important in modulating the mPFC excitability and also the extinction process (Laviolette et al., 2005; Klavir, 2017). Optogenetic HFS before extinction training of BLA-mPFC projection has been shown to improve extinction training and recall (Klavir, 2017). Considering the presence of BLA hyperactivity in MAM-treated rats and the role of BLA-mPFC pathway in aversive memory, we examined whether this pathway played a role in extinction investigated here. HFS of BLA was found to decrease the spike probability in the BLA-mPFC pathway of Saline-treated rats, but not in MAM rats, reflecting a deficient modulation of mPFC activity by the BLA. Moreover, this same response was observed in Naive MAM rats, suggesting that impairment in BLA-mPFC plasticity is a condition specific to MAM-treated rats. Neuronal excitability decreases in mPFC after HFS of BLA was described recently in an *in vitro* study using optogenetic methodology (Klavir, 2017), which is consistent with the current *in vivo* data.

Data from the electrophysiological recordings revealed a reduction in BLA-evoked spike probability in mPFC in normal conditions. We propose that activation of the BLA projection induces disinhibition of mPFC function by inhibiting mPFC interneurons. Thus, in the normal case, BLA activation during extinction learning could induce a gradual reduction in plasticity that would be expected to disinhibit the mPFC during the task, resulting in an efficient extinction learning and recall, considering that normal mPFC activity is essential for this type of learning (Quirk *et al*, 2006). This idea is consistent with results demonstrating that PV-immunoreactive GABAergic interneurons in mPFC

receive glutamatergic projections from the BLA (Shinonaga et al., 1994; McDonald, 1996; Gabbott et al., 2006), supporting the assumption of mPFC interneuron control by the BLA projections in our study. In MAM-treated animals, however, BLA activation during this task is impaired, likely due to PV interneuron dysfunction (Lodge et al., 2009; Lewis et al., 2012), which would produce an opposite action of the BLA on mPFC plasticity and disruption of extinction learning and recall. These results are in accordance with a previous study in MAM-treated animals demonstrating that activity of mPFC during a latent inhibition paradigm is deficient, suggested by GABAergic signaling disruption during the task (Lodge et al., 2009). Moreover, MAM-treated animals show decreased expression of PV-positive interneurons in mPFC (Lodge et al., 2009) that reflect a GABAergic dysfunction in the mPFC of MAM rats. Thus, the impairment in mPFC interneuron function would interfere with the BLA-mPFC pathway and impaired extinction learning. Additional evidence also demonstrated that mPFC interneurons act to direct CS attention (Baeg et al., 2001) and if this interneuron activity is disrupted, as observed in mPFC of MAM-treated rats, it would likely impact both the conditioned response and extinction learning. It has been demonstrated that schizophrenia patients exhibit deficiency in activation of mPFC under a cognitive task (Perlstein et al., 2001; Weiss and Heckers, 2001), which is consistent with the cortical inability to control cognitive functions as observed in animal models.

Evidence for an opposite role of the PL and IL portion of the mPFC in aversive response has been described (Maren and Quirk, 2004; Radley et al., 2006; Tavares et al., 2009; McEwen and Morrison, 2013). In fear conditioning, PL activity is related to expression of fear conditioning response and IL activity is essential for extinction learning (Quirk et al., 2006). In our study, PL and IL neurons presented a similar response, i.e. a global decrease of spike probability after BLA HFS. However, this result does not exclude that PL and IL subdivisions present opposite responses in neuronal activity during fear extinction training in Saline-treated rats. Differential roles of PL and IL also have been suggested in response to stressful events (Radley et al., 2006; McEwen and Morrison, 2013). Thus, the PLPFC has an inhibitory effect on the response to stress (Gomes, 2016) whereas the IL facilitates this effect (Radley et al., 2006; Tavares et al.,

2009). The PL is impacted by both amygdala and hippocampus activity during stressors that trigger emotional responses (Quirk and Beer, 2006; McEwen and Morrison, 2013). It is possible that during conditioning the PL dysfunction in MAM-treated animals produces a strong association of fear memory, with greater activation of the amygdala. Inefficient inhibition of BLA by IL during extinction secondary to interneuron loss may also contribute to extinction disruption. It is therefore likely that this condition facilitated the pro-aversive emotional learning.

The amygdala is a key area for the control of fear and extinction memory. Therefore, we propose that dysfunction in the BLA could be a mechanism by which MAM-treated animals exhibit extinction impairment. As described previously, the BLA sends glutamatergic projections to the mPFC that provide mPFC disinhibition (Shinonaga et al., 1994; McDonald, 1996; Gabbott et al., 2006). In fear conditioning, NMDA antagonism delivered before the extinction session was described to negatively impact extinction learning (Zimmerman and Maren, 2010). However, in that study the extinction recall was not tested. In our study, NMDA antagonist injected before the extinction session produces impairment in extinction learning and a greater response during the test session. Glutamatergic transmission into BLA probably is controlled by local projections within amygdala subnuclei (i.e., central and lateral nuclei) (Duvarci and Pare, 2014) that exhibit reciprocal connections with the mPFC (Marek *et al*, 2013). Moreover, these data are similar to that observed in MAM-treated animals in fear conditioning. This similar response between MAM-treated animals and the group of animals treated with NMDA antagonism before extinction suggests that glutamatergic neurotransmission within the BLA could be the major transmission involved in extinction impairment observed in MAM-treated animals.

Collectively, our results demonstrate that MAM-treated rats have a significant disruption of extinction learning and recall using tone fear conditioning, probably due to alteration in the BLA-mPFC projection. We propose that glutamatergic projections from the BLA to the mPFC did not activate efficiently the interneurons in the mPFC that in normal conditions disinhibit mPFC activity, which in turn affects extinction. Moreover, these results demonstrate the translational nature of using the MAM model of schizophrenia to examine the circuits that disrupt aversive learning in schizophrenia patients.

Acknowledgments

The authors wish to thank Niki MacMurdo and Christy Smolak for technical assistance, Kathryn Gill and Felipe Gomes for technical support. This study was supported by the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education, PDSE/CAPES (88881.135250/2016-01) and US National Institutes of Health (MH57440 to A.A.G.).

Statement of Interest

Uliana and Dr Resstel declare no conflict of interest. Dr Grace has received funds from Johnson & Johnson, Lundbeck, Pfizer, GSK, Merck, Takeda, Dainippon Sumitomo, Otsuka, Lilly, Roche, Asubio, Abbott, Autofony, and Janssen.

References

- Baeg, E.H.**, Kim, Y.B., Jang, J., Kim, H.T., Mook-Jung, I., and Jung, M.W. (2001). Fast spiking and regular spiking neural correlates of fear conditioning in the medial prefrontal cortex of the rat. *Cereb. Cortex* 11, 441–451.
- Barch, D.M.**, and Dowd, E.C. (2010). Goal representations and motivational drive in schizophrenia: the role of prefrontal-striatal interactions. *Schizophr Bull* 36, 919–934.
- Belujon, P.**, Patton, M.H., and Grace, A.A. (2014). Role of the prefrontal cortex in altered hippocampal-accumbens synaptic plasticity in a developmental animal model of schizophrenia. *Cereb. Cortex* 24, 968–977.
- Burgos-Robles, A.**, Vidal-Gonzalez, I., Santini, E., and Quirk, G.J. (2007). Consolidation of Fear Extinction Requires NMDA Receptor-Dependent Bursting in the Ventromedial Prefrontal Cortex. *Neuron* 53, 871–880.
- Du, Y.**, and Grace, A.A. (2016). Amygdala Hyperactivity in MAM Model of Schizophrenia is Normalized by Peripubertal Diazepam Administration. *Neuropsychopharmacology* 41, 2455–2462.
- Duvarci S**, Pare D (2014). Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron* 82: 966–980.
- Esmaeili, B.**, and Grace, A.A. (2013). Afferent drive of medial prefrontal cortex by hippocampus and amygdala is altered in MAM-treated rats: evidence for interneuron dysfunction. *Neuropsychopharmacology* 38, 1871–1880.
- Fanselow, M.S.** (1980). Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci* 15, 177–182.
- Floresco, S.B.**, and Tse, M.T. (2007). Dopaminergic regulation of inhibitory and excitatory transmission in the basolateral amygdala-prefrontal cortical pathway. *J. Neurosci.* 27, 2045–2057.
- Furini, C.**, Myskiw, J., and Izquierdo, I. (2014). The learning of fear extinction. *Neurosci Biobehav Rev* 47, 670–683.

- Gabbott, P.L.A.**, Warner, T.A., and Busby, S.J. (2006). Amygdala input monosynaptically innervates parvalbumin immunoreactive local circuit neurons in rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 139, 1039–1048.
- Gill, K.M.**, Miller, S.A., and Grace, A.A. (2017). Impaired contextual fear-conditioning in MAM rodent model of schizophrenia. *Schizophr. Res.*
- Hofer, E.**, Doby, D., Anderer, P., and Dantendorfer, K. (2001). Impaired conditional discrimination learning in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 51, 127–136.
- Holt, D.J.**, Lebron-Milad, K., Milad, M.R., Rauch, S.L., Pitman, R.K., Orr, S.P., Cassidy, B.S., Walsh, J.P., and Goff, D.C. (2009). Extinction memory is impaired in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 65, 455–463.
- Holt, D.J.**, Coombs, G., Zeidan, M.A., Goff, D.C., and Milad, M.R. (2012). Failure of neural responses to safety cues in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 69, 893–903.
- Izquierdo, I.**, Furini, C.R.G., and Myskiw, J.C. (2016). Fear Memory. *Physiol. Rev.* 96, 695–750.
- Jensen, J.**, Willeit, M., Zipursky, R.B., Savina, I., Smith, A.J., Menon, M., Crawley, A.P., and Kapur, S. (2008). The formation of abnormal associations in schizophrenia: neural and behavioral evidence. *Neuropsychopharmacology* 33, 473–479.
- Klavir, O.**, Prigge, M., Sarel, A., Paz, R., and Yizhar, O. (2017). Manipulating fear associations via optogenetic modulation of amygdala inputs to prefrontal cortex. *Nat. Neurosci.* 20, 836–844.
- Kosmidis, M.H.**, Breier, A., and Fantie, B.D. (1999). Avoidance learning in schizophrenia: a dissociation between the effects of aversive and non-aversive stimuli. *Schizophr. Res.* 38, 51–59.
- Lavolette, S.R.**, Lipski, W.J., and Grace, A.A. (2005). A subpopulation of neurons in the medial prefrontal cortex encodes emotional learning with burst and frequency codes through a dopamine D4 receptor-dependent basolateral amygdala input. *J. Neurosci.* 25, 6066–6075.
- Le Pen, G.**, Gourevitch, R., Hazane, F., Hoareau, C., Jay, T.M., and Krebs, M.-O. (2006). Peri-pubertal maturation after developmental disturbance: a model for psychosis onset in the rat. *Neuroscience* 143, 395–405.
- Lodge, D.J.**, and Grace, A.A. (2007). Aberrant hippocampal activity underlies the dopamine dysregulation in an animal model of schizophrenia. *J. Neurosci.* 27, 11424–11430.
- Lodge, D.J.**, Behrens, M.M., and Grace, A.A. (2009). A loss of parvalbumin-containing interneurons is associated with diminished oscillatory activity in an animal model of schizophrenia. *J. Neurosci.* 29, 2344–2354.
- Marek, R.**, Strobel, C., Bredy, T.W., and Sah, P. (2013). The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit. *J. Physiol. (Lond.)* 591, 2381–2391.

- Maren, S.**, and Quirk, G.J. (2004). Neuronal signalling of fear memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 844–852.
- Mcdonald, A.J. (1996).** Glutamate and aspartate immunoreactive neurons of the rat basolateral amygdala: colocalization of excitatory amino acids and projections to the limbic circuit. *J. Comp. Neurol.* 365, 367–379.
- McEwen, B.S.**, and Morrison, J.H. (2013). The brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course. *Neuron* 79, 16–29.
- Milad, M.R.**, Wright, C.I., Orr, S.P., Pitman, R.K., Quirk, G.J., and Rauch, S.L. (2007). Recall of fear extinction in humans activates the ventromedial prefrontal cortex and hippocampus in concert. *Biol. Psychiatry* 62, 446–454.
- Milad, M.R.**, and Quirk, G.J. (2012). Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annu Rev Psychol* 63, 129–151.
- Modinos, G.**, Allen, P., Grace, A.A., and McGuire, P. (2015). Translating the MAM model of psychosis to humans. *Trends Neurosci.* 38, 129–138.
- Moore H**, Jentsch JD, Ghajarnia M, Geyer MA, Grace AA (2006). A neurobehavioral systems analysis of adult rats exposed to methylazoxymethanol acetate on E17: implications for the neuropathology of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 60: 253–264.
- Paxinos G**, and Watson C (1996). The rat brain in stereotaxic coordinates. (San Diego: Academic Press).
- Pérez-Jaranay, J.M.**, and Vives, F. (1991). Electrophysiological study of the response of medial prefrontal cortex neurons to stimulation of the basolateral nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Res.* 564, 97–101.
- Perlstein, W.M.**, Carter, C.S., Noll, D.C., and Cohen, J.D. (2001). Relation of prefrontal cortex dysfunction to working memory and symptoms in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 158, 1105–1113.
- Phelps, E.A.**, Delgado, M.R., Nearing, K.I., and LeDoux, J.E. (2004). Extinction learning in humans: role of the amygdala and vmPFC. *Neuron* 43, 897–905.
- Polgár, P.**, Farkas, M., Nagy, O., Kelemen, O., Réthelyi, J., Bitter, I., Myers, C.E., Gluck, M.A., and Kéri, S. (2008). How to find the way out from four rooms? The learning of “chaining” associations may shed light on the neuropsychology of the deficit syndrome of schizophrenia. *Schizophr. Res.* 99, 200–207.
- Quirk, G.J.**, and Beer, J.S. (2006). Prefrontal involvement in the regulation of emotion: convergence of rat and human studies. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 723–727.
- Quirk, G.J.**, Garcia, R., and González-Lima, F. (2006). Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. *Biol. Psychiatry* 60, 337–343.
- Quirk, G.J.**, and Mueller, D. (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33, 56–72.
- Radley, J.J.**, Arias, C.M., and Sawchenko, P.E. (2006). Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J. Neurosci.* 26, 12967–12976.

- Resstel, L.B.M.**, Joca, S.R.L., Moreira, F.A., Corrêa, F.M.A., and Guimarães, F.S. (2006). Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behav. Brain Res.* 172, 294–298.
- Schneider, M.** (2013). Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. *Cell Tissue Res.* 354, 99–106.
- Shinonaga, Y.**, Takada, M., and Mizuno, N. (1994). Topographic organization of collateral projections from the basolateral amygdaloid nucleus to both the prefrontal cortex and nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience* 58, 389–397.
- Strauss, G.P.**, Frank, M.J., Waltz, J.A., Kasanova, Z., Herbener, E.S., and Gold, J.M. (2011). Deficits in positive reinforcement learning and uncertainty-driven exploration are associated with distinct aspects of negative symptoms in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 69, 424–431.
- Tavares, R.F.**, Corrêa, F.M.A., and Resstel, L.B.M. (2009). Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. *J. Neurosci. Res.* 87, 2601–2607.
- Waltz, J.A.**, Frank, M.J., Wiecki, T.V., and Gold, J.M. (2011). Altered probabilistic learning and response biases in schizophrenia: behavioral evidence and neurocomputational modeling. *Neuropsychology* 25, 86–97.
- Weiss, A.P.**, and Heckers, S. (2001). Neuroimaging of declarative memory in schizophrenia. *Scand J Psychol* 42, 239–250.
- Zimmerman, J.M.**, and Maren, S. (2010). NMDA receptor antagonism in the basolateral but not central amygdala blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning in rats. *Eur. J. Neurosci.* 31, 1664–1670.

Figures

Figure 1. Contextual fear conditioning in Saline-treated ($n=7$; white circles) and MAM-treated ($n=8$; black circles) rats. Conditioning session (4 FS of 0.75mA/1s) in Saline- and MAM-treated rats represent acquisition of fear memory. Extinction (6 blocks of 5 min; 30min total) and Test (10min) session in both group represent extinction learning and recall. No statistic difference was observed between MAM and saline rats in any session.

Figure 2. Impairment of extinction learning and recall in MAM-treated rats. Tone fear conditioning (7Tone+FS 0.6mA/0.5s) in Saline- ($n=14$; white circles) and MAM-treated ($n=7$; black circles) rats. In the conditioning session, no difference was observed between Saline-treated and MAM-treated rats. In the extinction session (10 trials; 20 total tones), no difference was observed at baseline, but an impairment of extinction learning was observed ($*p<0,05$ to saline group). In the test session (8 tones) there was a difference at baseline and with extinction recall between saline-treated and MAM-treated rats ($*p<0.05$).

Figure 3. HFS of the BLA induces abnormal plasticity in the mPFC in MAM-treated rats. (A) Schematic illustration of recording electrode placement in mPFC and (B) stimulation electrodes in BLA for Saline-treated (gray circles) and MAM-treated (Black circles) rats, as shown in coronal sections of rat brain taken from Paxinos and Watson (Paxinos and Watson 1996). (C) Representative example of extracellular mPFC recording showing a neuron responsive to single BLA stimulation (1mA) in Saline-treated and MAM-treated animals. (D) Spike probability over 10 min in Saline-treated and MAM-treated rats evoked by 1mA stimulation. (E) MAM-treated rats (black circles) showed significantly less change in BLA-evoked spike probability following HFS of the BLA compared to Saline-treated (white circles) rats. (* $p < 0.05$). (F) MAM-treated rats showed significantly less change in BLA-evoked spike probability following HFS compared to Saline-treated rats (* $p < 0.05$).

Figure 4. HFS of BLA does not exhibit significant differences in plasticity in the PL and IL subdivisions of the mPFC Saline-treated animals. (A) Schematic illustration of recording electrodes placement in PL or IL mPFC and (B) stimulation electrodes in BLA for PL (gray circles) and IL (Black circles) subdivisions illustrated in coronal sections of rat brain taken from Paxinos and Watson (Paxinos and Watson 1996) (C) Spike probability over 10 min in PL and IL subdivisions in Saline-treated rats evoked by 1mA stimulation. (D) Mean percent change ($\pm$ SEM) in BLA-evoked spike probability over the time, normalized to baseline, following HFS of the BLA and recorded in PL (white circle) and IL (black circles) of Saline-treated rats. (E) Mean percent change in BLA-evoked spike probability following HFS in PL and IL of Saline-treated.

Figure 5. Extinction impairment following NMDA antagonist injection in BLA before extinction session in Saline-treated rats. (A) Schematic illustration of injection sites in BLA for Saline (gray circles) and NMDA antagonist (Black circles) groups in coronal sections of rat brain taken from Paxinos and Watson (Paxinos and Watson 1996). (B) Tone fear conditioning (7Tone+FS 0.6mA/0.5s) following Saline ($n=6$; white circles) and NMDA antagonist ($n=7$; black circles) injection into BLA before extinction in saline-treated rats. In the conditioning session, no difference was observed between Saline and NMDA antagonist groups. During extinction (10 trials; 20 total tones), no difference in baseline was observed; however, an impairment in extinction learning was observed in the AP5 treated group ($*p<0.05$ to saline group). In the test session (8 tones) the AP5 treated groups exhibited a significant impairment at baseline and with extinction recall ($*p<0.05$ to saline group).

SUPPLEMENTARY RESULTS

Supplementary Figure 1. HFS of the BLA induces abnormal plasticity in the mPFC in naive MAM-treated rats. (A) Schematic illustration of recording electrode placement in mPFC and (B) stimulation electrodes in BLA for Saline -treated (gray circles) and MAM-treated (Black circles) rats, as shown in coronal sections of rat brain taken from Paxinos and Watson (Paxinos and Watson 1996). (C) Spike probability over 10 min in naive Saline-treated and MAM-treated rats evoked by 1mA stimulation. (D) Naive MAM-treated rats (black circles) showed significantly less change in BLA-evoked spike probability following HFS of the BLA compared to Naive Saline-treated (white circles) rats. (* $p < 0.05$). (E) Naive MAM-treated rats showed significantly less change in BLA-evoked spike probability following HFS compared to Naive Saline-treated rats (* $p < 0.05$).