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

LEANDRO ANTERO DA SILVA

**Receptores muscarínicos no hipocampo dorsal de ratos modulam a
resposta emocional condicionada contextual**

RIBEIRÃO PRETO
2013

LEANDRO ANTERO DA SILVA

**Receptores muscarínicos no hipocampo dorsal de ratos modulam a
resposta emocional condicionada contextual**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Resstel
Barbosa Moraes

RIBEIRÃO PRETO

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO 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

Antero, Leandro da Silva.

Receptores muscarínicos no hipocampo dorsal de ratos modulam a resposta emocional condicionada contextual. Ribeirão Preto, 2013.

77p

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Resstel, Leonardo Barbosa Moraes

1. Medo Condicionado.
2. Resposta Emocional Condicionada.
3. Hipocampo Dorsal.
4. Neurotransmissão colinérgica.
5. Receptores Muscarínicos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Data da Defesa: 08 de abril de 2013

Nome: Leandro Antero da Silva

Título: Receptores muscarínicos no hipocampo dorsal de ratos modulam a resposta emocional condicionada contextual

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
Para obtenção do título de Mestre em Ciências
Área de concentração: Farmacologia.

Aprovado em: ____/____/2013

Banca examinadora

Prof. Dr.: Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Hélio Zangrossi Júnior

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Rui Daniel Schröder Prediger

Instituição: UFSC

Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Marilene e Diná.

Obrigado pelo carinho, proteção e apoio.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marilene e Diná, pelo carinho, paciência e por terem me guiado no caminho do conhecimento. A saudade que sinto de vocês todos os dias me impulsiona a alcançar meus objetivos.

Ao Prof. Dr. Leonardo Resstel, pela dedicação com que me orientou durante todo esse tempo. Agradeço a amizade e confiança, por ter acreditado em meu trabalho. Saiba que sua competência e conduta profissional servem como exemplo para minha formação.

Aos Profs. Drs. Hélio Zangrossi e Rui Prediger por terem aceitado fazer parte da banca examinadora e por dedicarem tempo a avaliação deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Sâmia Joca, Fernando Morgan e Francisco Guimarães, pelos ensinamentos científicos.

A fiel amiga e companheira de jornada, Gabriela Spiacci, pela colaboração nos experimentos, conselhos e pelos diálogos diversos, carinho e preocupação.

A Manoela Fogaça, pela amizade sincera e por contribuir cientificamente neste trabalho. Obrigado pelas conversas enriquecedoras, pelo carinho e atenção durante esse período.

A amiga Dr. Cristiane Busnardo, pelo papel crucial no desenvolvimento deste trabalho. Obrigado pelo carinho, paciência, atenção, conselhos, “broncas” disponibilidade na leitura e correção dos meus relatórios, pelo cuidado e preocupação fraterna em todos os momentos.

A amiga e “família”, Aline Fassini, pelas conversas sobre a vida, pelo companheirismo durante todo esse tempo. Obrigado por me agüentar esse tempo.

Aos amigos do laboratório: Alessandra, Daniela, Daniel, Davi, Josie, Luciana, Nilson, Sara e Téo, pelo companheirismo e ajuda, durante todo o tempo em que convivemos no laboratório e fora dele.

Aos amigos do Laboratório do Prof. Dr. Fernando Morgan, Francisco Guimarães e Sâmia Joca: América, Bruna, Eduardo, Fernando, Milena, Silvana, Sabrina, Felipe, Laura e Andreza.

Aos amigos que me dão apoio emocional, alegrias e micos: Gustavo, Flávio, Camila Zanotto, Cassiano, Karla, Rheuri, Paulo e Vitor.

Aos amigos que estão longe, mas sempre comigo: Livia, Haila, Alex e Taína.

A Laura Helóise Camargo, por me auxiliar no suporte técnico dos experimentos. Obrigado pelo companheirismo e pelas energias positivas durante esse processo.

Ao Orlando Mesquita, pelo apoio técnico e carinho com todos do laboratório. Obrigado pelo café sempre “forte” e “animador”.

Aos técnicos e amigos Ivanilda (ou Varda), Idália, José Carlos, Simone, Eliana e Eleni pela ajuda técnica e boas risadas na “hora do café”.

A Beti, pela paciência e auxílio técnico no uso do confocal para a análise de imunofluorescência.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmacologia: Fátima, Sônia e Ramon, pelos serviços prestados.

A CAPES, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

ANTERO L.S., **Receptores muscarínicos no hipocampo dorsal de ratos modulam a resposta emocional condicionada contextual.** 2013. 77p Dissertação de Mestrado. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP-USP.

Durante situações aversivas, como choque nas patas, imobilidade ou restrição dos movimentos, há um aumento nos níveis de acetilcolina no hipocampo de ratos. Além disso, o aumento desse neurotransmissor está envolvido com a modulação comportamental do MCC, principalmente em sua porção dorsal, HD. Diante disso, é proposto neste estudo que os receptores muscarínicos presentes no HD de ratos, modulam a expressão da REC, no modelo do MCC. Ratos wistar foram submetidos às sessões de condicionamento aversivo contextual, sendo divididos nos grupos: condicionado (6 choques de 3s; 1,5 mA) e não condicionado (sem choques). Quarenta e oito horas após esta sessão foram avaliadas a comportamental (congelamento) e respostas autonômicas (PAM, FC e queda da TC). Além disso, foi verificada a distribuição de receptores M1 e M3 nas subáreas do HD e a quantificação dos mesmos em animais condicionados, não condicionados e *naive*, 48 após a sessão de condicionamento. A microinjeção bilateral de hemicolínio, inibidor da captação de colina, no HD promoveu uma redução do tempo de congelamento durante a re-exposição ao contexto aversivo, caracterizando um efeito do tipo ansiolítico. Além disso, este tratamento inibiu o aumento da PAM, FC e a queda da TC induzidos pelo MCC. O mesmo ocorreu com a administração de atropina, antagonista não seletivo de receptores muscarínicos, de forma dose-dependente em todas as respostas observadas. Adicionalmente, a microinjeção de diferentes doses de *J104129 fumarate* bloquearam o tempo de congelamento (de forma dose-dependente, semelhante a atropina), a elevação da PAM, FC e a queda da TC durante a re-exposição ao contexto aversivo. Como o *J104129 fumarate* bloqueia receptores muscarínicos tanto M1 quanto M3, foi utilizado um antagonista de maior afinidade para receptores do tipo M1, pirenzepina. Todas as doses utilizadas de pirenzepina inibiram as respostas autonômicas, sem afetar o tempo de congelamento induzidos pelo MCC. A análise de imunofluorescência, por dupla-marcação, mostrou que receptores M1 e M3 estão distribuídos nos mesmos compartimentos celulares nas subáreas do HD. A quantificação dos receptores 48 horas após o condicionamento evidencia apenas o aumento de receptores M3 no hipocampo de ratos, sem alteração na população de receptores M1. Com este conjunto de resultados podemos concluir que a ACh no HD é essencial para a expressão da REC. Especificamente, eles sugerem que os receptores muscarínicos do tipo M1 presentes nesta estrutura estão envolvidos com as respostas autonômicas e somente os receptores M3 participam das respostas comportamentais.

Palavras-chave: Medo condicionado contextual, neurotransmissão colinérgica, antagonista muscarínico, tempo de congelamento.

ABSTRACT

ANTERO L.S., **Dorsal hippocampus muscarinic receptors of rats modulate the expression of contextual fear conditioning.** 2013. 77p Dissertação de Mestrado. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP-USP.

During aversive and stressful situations, such as footshock, stillness and restriction of movements, there is an increase in the levels of acetylcholine in rat hippocampus. Moreover, the increasing in the synaptic level of this neurotransmitter is involved with behavioral modulation of contextual fear conditioning (CFC), especially in the dorsal portion, DH. Therefore, this study investigated the involvement of muscarinic receptors in DH of rats in the expression of conditioned emotional response (CER) in the CFC. Moreover, we verified the expression of these receptors in the DH by double labeling immunofluorescence. Male Wistar rats were subjected to aversive contextual conditioning sessions and were divided into two groups: conditioned and unconditioned. Forty-eight hours after this session were evaluated autonomic (mean arterial pressure, MAP, heart rate, HR and tail temperature, TT) and behavioral (freezing) responses. Moreover, the distribution of M1/M3 receptors in subareas of DH was observed and the quantification of these receptors were performed 48 hours after the conditioning session in conditioned, unconditioned and naive animals. The bilateral microinjection of hemicholinium, inhibitor of choline reuptake, in DH, caused a decrease of freezing during re-exposure to the aversive context, featuring an anxiolytic-like effect. Furthermore, this treatment inhibited the increase in MAP, HR and TT drop by CFC. DH muscarinic receptors antagonism evoked by atropine, a non-selective muscarinic antagonist, reduced the freezing, in a dose-dependent manner. Similar reduction was observed in autonomic responses. The selective antagonism of M1/M3 receptors evoked by J104129 fumarate also reduced freezing, in a dose-dependent manner, when compared with control animals. The same effect was observed with autonomic responses in all the tested doses. As J104129 fumarate blocks both M1 muscarinic as M3 muscarinic, was used a higher-affinity M1 antagonist, pirenzepine. All doses inhibited cardiovascular responses and decrease the TT drop, without affecting the freezing induced by CFC. The immunofluorescence analysis revealed that M1 and M3 receptors are distributed in the same cellular compartments in DH. The quantification of receptors showed an increase of M3 receptors in rat hippocampus, while no change in the density of receptors M1 was detected. These findings support that cholinergic neurotransmission present in DH is involved with the expression of responses evoked by fear contextual conditioning, through muscarinic receptors activation. In particular, M3 muscarinic receptors modulate behavioral responses, M1 and M3 muscarinic receptors modulate the autonomic responses.

Keywords: contextual fear conditioning, cholinergic neurotransmission, muscarinic receptors, freezing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Fotomicrografia de uma secção coronal do cérebro de um rato mostrando os sítios de injeção no HD.....	33
Figura 02	Representação diagramática de secções coronais do encéfalo de rato mostrando os sítios de microinjeção bilateral no HD dos animais utilizados no estudo.....	34
Figura 03	Efeitos da microinjeção bilateral de hemicolínio em animais condicionados na expressão do tempo de congelamento durante a reexposição ao contexto.....	37
Figura 04	Efeito de microinjeções bilaterais de veículo ou hemicolínio na variação da PAM, FC e TC de animais condicionados e não condicionados antes e durante a reexposição ao contexto.....	38
Figura 05	Efeito de microinjeções bilaterais de veículo ou Atropina no tempo de congelamento de animais condicionados e não condicionados.....	42
Figura 06	Curva dose-resposta gerada por análise de regressão não-linear a partir das microinjeções bilaterais de veículo ou Atropina no tempo de congelamento de animais condicionados.....	43
Figura 07	Efeito de microinjeções bilaterais de veículo ou Atropina na variação da PAM, FC e TC de animais condicionados e não condicionados antes e durante a re-exposição ao contexto	44
Figura 08	Curvas dose-resposta gerada por análise de regressão não-linear a partir das microinjeções bilaterais de veículo ou Atropina nas respostas autonômicas, PAM (A), FC (B) e TC (C).....	45
Figura 09	Efeito de microinjeções bilaterais de veículo ou <i>J 104129 fumarate</i> no tempo de congelamento de animais condicionados.....	47
Figura 10	Curva dose-resposta gerada por análise de regressão não-linear a partir das microinjeções bilaterais de veículo ou <i>J 104129 fumarate</i> no tempo de congelamento de animais condicionados.....	48
Figura 11	Efeito de microinjeções bilaterais de veículo ou <i>J 104129 fumarate</i> na variação da PAM, FC e TC de animais condicionados antes e durante a re-exposição ao contexto.....	49
Figura 12	Efeito de microinjeções bilaterais de veículo ou Pirenzepina no tempo de congelamento de animais condicionados.....	51
Figura 13	Efeito de microinjeções bilaterais de veículo ou Pirenzepina na variação da PAM, FC e TC de animais condicionados antes e durante a reexposição ao contexto.....	52

Figura 14	Imunofluorescência dos receptores muscarínicos M1 e M3 na região CA1 do HD de ratos.....	54
Figura 15	Imunofluorescência dos receptores muscarínicos M1 e M3 na região CA3 do HD de ratos.....	55
Figura 16	Imunofluorescência dos receptores muscarínicos M1 e M3 no GD de ratos.....	56
Figura 17	Expressão de receptores M1 e M3 após o condicionamento.....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVO.....	20
2.1 Geral.....	20
2.2 Específicos.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Animais.....	21
3.2 Cirurgia para implante de cânula-guia.....	21
3.3 Condicionamento ao contexto.....	22
3.4 Canulação da artéria femoral.....	23
3.5 Registros da PAM, FC e TC.....	23
3.6 Técnica para microinjeção de drogas no HD.....	24
3.7 Determinação anatômica do local de injeção.....	25
3.8 Drogas utilizadas.....	25
3.9 Imunofluorescência de dupla marcação.....	26
3.10 Análise da Expressão de proteínas por Western Blot.....	27
4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	29
4.1 Efeito da administração bilateral de um inibidor da captação da colina no HD sobre a REC ao contexto.....	29
4.2. Efeito da administração bilateral de antagonista de receptores muscarínicos no HD sobre a REC ao contexto.....	30
4.3 Efeito da administração bilateral de antagonista seletivo para receptores muscarínicos M1/ M3, <i>J 104129 fumarate</i> , no HD sobre a REC ao contexto.....	30
4.4 Efeito da administração bilateral de antagonista seletivo para receptores muscarínicos M1, pirenzepina, no HD sobre a REC ao contexto.....	30
4.5 Análise da Expressão de receptores M1 e M3 no hipocampo de ratos submetidos ao condicionamento contextual.....	31
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
6 RESULTADOS.....	33
6.1 Determinação do sítio de injeção.....	33

6.2 Efeito da administração bilateral do inibidor da captação de colina – Hemicolinio – no HD sobre a REC ao contexto.....	35
6.2.1 Respostas comportamentais durante o MCC.....	35
6.2.2 Respostas autonômicas durante o MCC.....	35
6.3 Efeito da administração bilateral do antagonista não seletivo de receptores muscarínicos – Atropina – no HD sobre a REC ao contexto.....	39
6.3.1 Respostas comportamentais durante o MCC.....	39
6.3.2 Respostas autonômicas durante o MCC.....	39
6.4 Efeito da administração bilateral do antagonista <i>J104129 Fumarate</i> no HD sobre a REC ao contexto.....	46
6.4.1 Respostas comportamentais durante o MCC.....	46
6.4.2 Respostas autonômicas durante o MCC.....	46
6.5 Efeito da administração bilateral do antagonista Pirenzepina no HD sobre a REC ao contexto.....	50
6.5.1 Respostas comportamentais durante o MCC.....	50
6.5.2 Respostas autonômicas durante o MCC.....	50
6.6 Imunofluorescência para avaliação dos receptores M1 e M3 localizados no HD.....	53
6.7 Expressão de receptores M1 e M3 após o condicionamento.....	53
 7 DISCUSSÃO.....	 58
 8 CONCLUSÃO.....	 71
 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 72

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O hipocampo é uma estrutura cortical do sistema límbico situado medialmente ao ventrículo lateral sendo dividido em áreas denominadas CA1, CA2 e CA3, se estendendo ao longo do assoalho do corno temporal dos ventrículos laterais. Ventralmente ao hipocampo estão três importantes regiões corticais que cercam o sulco rinal, o córtex entorrinal, o córtex perirrinal e o córtex para hipocampal (Bear et. al. 2002). O hipocampo, juntamente com o giro denteado e os córtices transicionais associativos, córtex entorrinal e subicular constituem a formação hipocampal que, juntamente com os córtices associativos, o complexo amigdalóide, os núcleos septais, o hipotálamo e o bulbo olfatório são os principais componentes do sistema límbico (O'Mara et al., 2001). Anatomicamente, o hipocampo pode ser dividido em hipocampo dorsal (HD) e hipocampo ventral (HV) (Paxinos & Watson, 2007).

O hipocampo está relacionado com a modulação de processos emocionais, de aprendizado, memória e defesa (Maclean e Delgado, 1953; Papez, 1995). Em diversos mamíferos, a estimulação elétrica do hipocampo induz alterações comportamentais como reações defensivas, tais como: respostas de ataque e agitação (Maclean e Delgado, 1953; Siegel e Flynn, 1968). Estudos apontam sua importância na modulação da atividade autonômica, em particular com as respostas associadas ao sistema cardiovascular. Por exemplo, a estimulação elétrica do HD de diversos mamíferos provoca inibição respiratória (Kaada e Jasper, 1952; Andy e Akert, 1955; Liberson e Akert, 1955; Anand e Dua, 1956), inibição do peristaltismo antral (Kaada, 1951), aumento da PA e FC (H. Blake Carlson, 1941; Akert e Andy, 1953).

Vários estudos mostram a participação do hipocampo na modulação da ansiedade (Deacon et al., 2002). Ansiedade é uma resposta emocional típica de um comportamento de avaliação de risco em situações onde o perigo é conflitante ou incerto (Blanchard e Blanchard 1988). Também pode ser definida como um estado subjetivo de apreensão ou tensão frequentemente acompanhado por uma ou mais sensações físicas - por exemplo, aumento da PA, FC, da respiração, urgência de micção ou defecação - induzido pela expectativa de perigo, dor ou necessidade de um esforço especial (Brandão et al., 2004). Em ratos, lesões eletrolíticas ou citotóxicas no hipocampo promovem comportamento do tipo ansiolítico nos modelos labirinto em cruz elevado (LCE) e interação social (IS), modelos preditivos de ansiedade (Menard e Treit, 1999, 2001; Bannerman et al., 2002; Deacon et al., 2002). Além disso, microinjeções de midazolam, um fármaco benzodiazepínico, no HD de ratos promove maior número de entrada nos braços abertos, no LCE, um efeito do tipo ansiolítico (Menard e Treit, 2001).

Um modelo animal utilizado no estudo da ansiedade é o medo condicionado (MC; Sanders et al., 2003; Resstel et al., 2006). Nesse modelo os animais antecipam uma ameaça, associando, por exemplo, o ambiente a situações aversivas. Essa aprendizagem associativa segue o princípio de Pavlov, no qual o animal é colocado em um único ambiente durante alguns minutos (período de familiarização). Após este período, um breve estímulo é apresentado (sinal sonoro ou luminoso - estímulo neutro) seguido de um estímulo aversivo (por exemplo, choque nas patas – estímulo incondicionado). Diante disso, ocorre um pareamento entre os estímulos, ou seja, o estímulo neutro passa a ser condicionado. Porém, não é apenas um sinal sonoro que pode ser pareado a um estímulo incondicionado, mas também o ambiente onde esse animal recebe o choque nas patas, contexto (Fanselow, 1980).

Com a reexposição ao estímulo condicionado ao contexto, por exemplo, ocorre uma antecipação da resposta de medo, caracterizada por respostas comportamentais e autonômicas. O conjunto de respostas observadas durante a expressão do MC é chamado de resposta emocional condicionada (REC). A REC ocorre quando o animal é reexposto ao mesmo contexto onde recebeu os choques, demonstrando uma associação entre os eventos (Fendt e Fanselow, 1999; Fanselow, 2000).

Em ratos, a REC é caracterizada por imobilidade, ou seja, todos os movimentos cessam, exceto os da respiração (Fanselow, 2000, Sanders et al., 2003) além de um intenso aumento de PA, FC, aumento da temperatura corporal e queda da temperatura nas extremidades corporais, como patas e cauda (Carrive, 2000; Godsil et al., 2000; Vianna e Carrive, 2005; Vianna et al., 2008). Adicionalmente, pela quantificação de mRNA da proteína c-Fos, marcador de atividade neuronal, foi observado um aumento da atividade de neurônios no hipocampo de animais condicionados, a partir do pareamento de um estímulo sonoro com choque nas patas quando eram expostos ao estímulo condicionado (Smith et al., 1992; Beck e Figiber 1995), sugerindo uma possível participação dessa estrutura na expressão da REC.

Lesões eletrolíticas e excitotóxicas intra-HD caracterizaram um efeito do tipo ansiolítico em diversos modelos animais, tais como: LCE, IS e hiponeofagia (Bannerman et al., 2002a; Deacon et al., 2002b). Em relação ao medo contextual, essas lesões atenuaram o tempo de congelamento de ratos, comportamento típico desse modelo (Kim e Fanselow, 1992; Phillips e LeDoux, 1992; Kim et al., 1993; Matus-Amat et al., 2004). Estes dados sugerem que a porção dorsal do hipocampo está envolvida no controle de respostas comportamentais relacionadas a ansiedade, em particular no modelo do MCC.

Resstel e colaboradores (2008), avaliaram a REC sob inativação sináptica reversível do HD com o CoCl_2 (inibidor sináptico não seletivo), em diversos momentos do condicionamento contextual. Essa interrupção sináptica, feita antes da sessão de condicionamento, promoveu uma diminuição do tempo de congelamento e das respostas cardiovasculares, sugerindo um importante papel desta estrutura na consolidação de memórias aversivas, ao medo contextual. Porém, quando a administração de CoCl_2 era feita antes da reexposição contextual, apenas as respostas cardiovasculares são atenuadas (Resstel, Joca et al. 2008). Esses dados mostram o envolvimento preferencial do HD nas respostas cardiovasculares observadas nesse modelo. Porém, todos os neurotransmissores presentes nesta estrutura foram inibidos, tornando possível o estudo de neurotransmissões específicas na expressão da REC.

O HD apresenta conexões com estruturas límbicas que modulam as respostas cardiovasculares, principalmente em situações de estresse. Como, por exemplo, indiretamente com o córtex pré-frontal medial (CPFm) (Tavares e Correa, 2006; Resstel et al., 2006). A ablação desta estrutura atenua as respostas cardiovasculares associadas com a estimulação hipocampal (Ruit e Neafsey 1988), além de ter projeções para a amígdala e o núcleo leito da estria terminal (McDonald et al., 1996; Turner e Herkenham, 1991) e projeção direta com alguns núcleos bulbares relacionados com a modulação cardiovascular autonômica (Fisk, Wyss et al. 2000; Vertes 2004).

Várias neurotransmissões participam da modulação das respostas observadas durante a reexposição ao contexto aversivo. Uma delas é a neurotransmissão colinérgica. No hipocampo de ratos, essa neurotransmissão é oriunda do núcleo septal medial e da banda diagonal de Broca (Raisman et al., 1966; Meibach e Siegel, 1977). Durante situações aversivas, como exposição do animal a um novo ambiente, apresentação de choque nas patas ou estresse por restrição, ocorre um aumento na

concentração de ACh no hipocampo, sendo esta, reduzida pela habituação, ou seja, familiarização ao ambiente durante um período (Acquas et al., 1996; Aloisi et al., 1997; Thiel et al., 1998; Giovannini et al., 2001; Tajima et al., 1996). Diante das observações de que há um aumento dos níveis de acetilcolina, principalmente no hipocampo, durante situações aversivas, isto poderia ser um indicativo da participação deste neurotransmissor em respostas defensivas, tanto comportamentais quanto autonômicas.

Sabe-se, através de estudos imunohistoquímicos, que no SNC de ratos há uma ampla população de receptores muscarínicos, incluindo o HD (Buckley et al., 1988; Rouse e Levey, 1997), e que esses receptores estão envolvidos com a modulação da ansiedade, como observado em alguns modelos animais. A administração sistêmica de escopolamina, um antagonista muscarínico não seletivo, antes da exposição ao teste da caixa claro-escuro (CCE) aumenta a permanência de ratos no lado escuro da caixa, caracterizando um comportamento ansiogênico (Smythe et al., 1996). Entretanto, a administrações desta mesma droga diretamente no HD, antes da exposição ao LCE, provoca um efeito do tipo ansiolítico, por aumentar o numero de entradas e tempo de permanência nos braços abertos (Zarrindast et al., 2011). Esses achados indicam um importante papel dos receptores muscarínicos, presentes no HD, na expressão de respostas comportamentais relacionadas à ansiedade.

Os receptores muscarínicos estão envolvidos com aquisição e consolidação do condicionamento Pavloviano clássico (Young et al., 1995). A administração sistêmica de escopolamina, em doses crescentes, reduz o tempo de congelamento em roedores no MCC, quando administrada antes do condicionamento (Anagnostaras et al., 1995; Young et al., 1995). Entretanto, esses tratamentos não afetam a consolidação de memórias aversivas ao medo contextual, quando administrada após o condicionamento (Anagnostaras et al., 1999). A administração deste antagonista antes da sessão de

condicionamento no HD provoca uma diminuição do tempo de congelamento, sugerindo que receptores muscarínicos no HD, quando ativados, modulam a aquisição memórias aversivas ao MCC.

Apesar dos dados apresentados sustentarem um importante papel do sistema colinérgico no HD, por ativação de receptores muscarínicos, na expressão da REC, poucos trabalhos avaliaram o envolvimento da neurotransmissão colinérgica e o papel distinto dos subtipos de receptores muscarínicos nas respostas autonômicas e comportamentais observadas no MCC. Diante dessas evidências, a hipótese do presente trabalho é que o sistema colinérgico presente no HD de ratos, através da ativação de receptores muscarínicos, modula a expressão da REC durante a reexposição ao contexto aversivo. Para testar essa hipótese foram realizadas manipulações farmacológicas do sistema colinérgico presente no HD através da administração de inibidor da captação de colina e antagonistas de receptores muscarínicos, seletivos e não seletivos, antes da reexposição dos animais ao contexto aversivo.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

2.1. Geral

Investigar o envolvimento da neurotransmissão colinérgica no HD modulando a expressão da resposta emocional condicionada em ratos submetidos ao modelo do medo condicionado ao contexto.

2.2 Específicos

- Determinar se a redução nos níveis de acetilcolina no HD, pela administração de um inibidor da captação de colina, interfere nas respostas comportamentais e autonômicas observadas durante a re-exposição a um contexto aversivo;
- Determinar quais os subtipos de receptores muscarínicos, presentes no HD, estão envolvidos na modulação da REC através de microinjeção local de antagonista muscarínico não seletivo ou seletivo para os receptores M1 e M3;
- Determinar a localização dos subtipos de receptores muscarínicos nas subáreas do HD, bem como sua expressão após o condicionamento contextual.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar pesando entre 190 – 220 g (8 – 9 semanas) provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto. Os animais foram alojados no biotério do próprio laboratório em caixa de polipropileno (39x32x17cm), em ambiente monitorado, com ciclo claro/escuro de 12 horas com início às 6:00 horas, temperatura ambiente $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, com água e comida *ad libitum*. As condições de moradia e todos os procedimentos experimentais estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA/ nº 167/2011).

3.2 Cirurgia para implante de cânula-guia

Os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (Aldrich ChemicalCo. Inc., Milwaukee, EUA, 250 mg/Kg, intraperitoneal). Após a indução anestésica, os mesmos foram adaptados a um aparelho estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, Illinois, EUA). Foi realizada assepsia do campo cirúrgico com álcool 70% seguida pela administração de anestésico local cloridrato de lidocaína 2% com vaso constritor (Novocol 100, S.S. White-Brasil, 0,3 mL, subcutâneo). Após assepsia com H_2O_2 a 10%, foi realizada uma pequena incisão longitudinal de aproximadamente 1,5 cm, expondo a calota craniana. Com o auxílio de broca odontológica foi realizada a trepanação do crânio, obtendo-se três orifícios. Um orifício foi utilizado para a fixação de parafuso de aço inoxidável que auxiliará na fixação da resina acrílica a ser disposta no crânio do

animal. Através dos outros dois orifícios foram introduzidas cânulas guia, bilateralmente, no HD (coordenadas: Antero-posterior - 4.0 mm em relação ao bregma; Lateral + 2,8 mm em relação à sutura sagital; Vertical - 2,1 mm em relação à estrutura óssea da calota craniana e Incisivo: - 2,5 mm) segundo o atlas de Paxinos & Watson (1997).

As cânulas foram constituídas por um segmento de agulha hipodérmica (26 x 0,6 mm, 24G), com 11 mm de comprimento. Estas foram fixadas ao crânio com uma resina acrílica autopolimerizável (Simplex, DFL, Ind. Com., RJ, Brasil) e por um parafuso pequeno, previamente atarraxado na calota craniana. Um mandril, de 0,2 mm de diâmetro externo foi inserido no interior das cânulas visando evitar possível obstrução durante o período de recuperação do rato. Para prevenção de possíveis infecções, ao final da cirurgia o animal recebeu 0,2 mL de Pentabiótico veterinário (Pentabiotico®, Fontoura-Wyeth, SP, Brasil, 80.000 UI i.m.) com estreptomicinas e penicilinas, por via intramuscular, bem como 0,3 mL do antiinflamatório flunixinemeglumine (Banamine®, Schering Plough, RJ, Brasil) administrado subcutâneamente para minimizar sofrimento pós-cirúrgico.

3.3 Condicionamento ao contexto

Quatro dias após a cirurgia para implante das cânulas guias, os ratos foram colocados em uma caixa com assoalho capaz de deflagrar choque (23x20x21cm com barras espaçadas a 1 cm, Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 10 minutos como forma de familiarização. Em uma segunda exposição à caixa os animais foram divididos em dois grupos: condicionado e não condicionado. O grupo não condicionado não recebeu choque e permaneceu na caixa por 10 minutos. O grupo condicionado foi colocado na caixa e 6 choques inescapáveis de 1,5 mA com 3 segundos de duração

(Baldi et al., 2004; Lisboa et al., 2010). Os intervalos entre os choques variaram entre 20 segundos e 1 minuto. Dois dias após o condicionamento, a PAM, a FC e a TC foram registradas continuamente por um período de permanência na caixa de condicionamento de 10 minutos, porém, nenhum choque foi aplicado.

3.4. Canulação da artéria femoral

Vinte e quatro horas após o procedimento de condicionamento ao contexto aversivo, os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (Aldrich Chemical Co. Inc., Milwaukee, EUA, 250 mg/Kg, i.p.) para implantação de uma cânula na artéria femoral, que foi introduzida até a artéria aorta abdominal inferior. Esta cânula é constituída por segmento de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldado a segmento de polietileno PE-50 (12-13 cm) (Clay Adams, Parsippany, New Jersey, EUA) sendo preenchida com solução de salina estéril (150 mM NaCl) e anticoagulante heparina (15 UI/mL) obstruída com um pino de metal e suturada ao dorso do animal.

Após implantação dos cateteres, os mesmos foram transpassados subcutaneamente, exteriorizados na região dorsal do animal por um trocater e fixados à pele por sutura cirúrgica. Como medida profilática o animal recebeu via subcutânea Banamine (2,5mg/kg) como analgésico e antiinflamatório.

3.5 Registros da PAM, FC e TC

Os registros dos parâmetros cardiovasculares foram realizados 48h após o condicionamento. Em uma sala para registro de atividade cardiovascular, o cateter arterial previamente heparinizado, foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a

um amplificador de sinais (AECAD04P), o qual é conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizados (PowerLab 8/30, Austrália).

No dia do teste, os registros cardiovasculares foram iniciados após um período de adaptação de 30 minutos, dos animais às condições de som e iluminação da sala de experimentação. A PAM e a FC foram registradas antes e após o tratamento e durante os 10 minutos de reexposição ao contexto aversivo. A temperatura da cauda, variável da temperatura cutânea, foi registrada manualmente com uma câmera térmica Multi-Purpose Thermal Imager IRI 4010 (InfraRed Integrated Systems Ltd Park Circle, Tithe Barn Way Swan Valley Northampton, EUA) a uma distância de 50 cm do animal, antes e após a administração de drogas no HD, e durante o período de 10 minutos de reexposição contextual, a cada minuto (média da TC de 10 marcações na cauda do animal para cada minuto de avaliação).

3.6 Técnica para microinjeção de drogas no HD

Para as microinjeções foi usada uma seringa de 2 μ L, modelo KH7001 (Hamilton, Reno, Nevada, USA) conectada, por um tubo de polietileno PE-10, a uma agulha microinjetora de metal (33G, SmallParts, Miami Lakes, FL, EUA). A agulha microinjetora foi 1 mm mais longa do que a cânula guia. Todas as microinjeções foram realizadas no volume de 500nL a uma taxa de infusão de 1000nL/min com auxílio de uma bomba de infusão (INSIGHT, EFF 311, Brasil). A agulha foi mantida por mais 20 s para evitar refluxo após a microinjeção.

3.7 Determinação anatômica do local de injeção

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com uretana (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) 25% (10mL/kg) e, no local da microinjeção das drogas no HD foi administrado o corante Azul de Evan a 1%. Em seguida, os mesmos foram submetidos à perfusão transcardíaca com salina 0,9% (NaCl 20mL), seguida de solução tamponada de formalina a 10% (20 mL). O procedimento consiste em abertura do abdômen e da caixa torácica para exposição do coração. Para facilitar a perfusão cerebral, a aorta descendente foi bloqueada com o auxílio de uma pinça hemostática. Foi introduzida no ventrículo esquerdo uma agulha para perfusão e foi feita uma incisão no átrio direito para o escoamento do sangue e do perfusado. Após o procedimento, os cérebros foram retirados da caixa craniana e colocados em solução de formalina a 10% para fixação. Decorridas 48 h, os cérebros foram seccionados (em cortes frontais com 40 µm de espessura) com auxílio de um criostato (CM-1900, Leica, Wetzlar, Alemanha). As várias secções foram coradas com vermelho neutro a 1% e analisadas com base no Atlas de Paxinos e Watson (2007).

3.8 Drogas utilizadas

Veículos: solução fisiológica (NaCl 0,9%) e líquido cefalorraquidiano artificial (LCA composição: NaCl 100mM; Na₃PO₄ 2mM; KCl 2,5mM; MgCl₂ 1,0mM; NaHCO₃ 27mM; CaCl₂ 2,5mM, pH=7,4). Tribromo-cloro-etanol (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), uretana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), atropina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), J 104129 fumarate (Tocris Bioscience, West woods

Business Park, Ellisville, MO, USA), hemicolinio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e pirenzepina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.9 Imunofluorescência de dupla marcação

O procedimento de imunofluorescência foi feito como descrito por Fogaça e colaboradores, 2012 (Fogaça et al., 2012) e teve como objetivo determinar em que áreas do HD receptores muscarínicos, M1 e M3, estão distribuídos, além de sugerir uma posição co-localização. Os animais foram anestesiados com uretana (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) 25% (10mL/kg) e perfundidos com paraformaldeído (PFA 4%) dissolvido em uma solução tampão fosfato (PBS 0,1M; pH = 7,4). Os cérebros foram removidos e pós-fixados durante 2 horas em PFA 4% e armazenados em uma solução de sacarose 30% para crioproteção. Logo após, os encéfalos foram congelados adicionando-os durante 30 segundos em solução de isopentano e armazenados em freezer -80°C para posterior uso.

Cortes coronais de hipocampo dorsal (30µm) foram obtidos com auxílio de um criostato (CM-1900, Leica, Wetzlar, Alemanha), lavados com tampão TBS (0,1M, pH 7,4) e incubados por 1 hora em soro bovino 5% (BSA, SIGMA) diluído em TBST (TBS + 0,4% Triton X-100). Posteriormente, as secções foram incubadas com os anticorpos primários para receptores muscarínicos M1 e M3 (González et al., 2007; Cassiman et al., 2002; Anini et al., 2002; Kurzen et al., 2004) diluídos em TBST + BSA 1% (Santa Cruz, 1:500, M1 H-120: SC-9106, anti-rabbit policlonal IgGs; M3 C-20: SC-7474, anti-goat policlonal IgGs) por 12 horas sob agitação constante a 4°C. Depois desta incubação, as secções foram lavadas em TBS e incubadas os respectivos anticorpos secundários (Alexa Fluor 594 donkey anti-goat IgGs e Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgGs, 1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) por 1 hora. Os cortes foram

lavados com TBS e fixados em lâminas com meio de montagem Fluormount-G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA). As secções hipocampais foram analisadas com o auxílio de um sistema computadorizado de análise de imagem (Image Pro-Plus 6.0, Media Cybernetics) em microscópio de fluorescência (Olympus) e posteriormente em microscopia confocal (Leica SP5, Germany, 63 × de aumento). Tayebati e colaboradores demonstraram a especificidade dos anticorpos primários para receptores M1 e M3 (2004) inativando epítomos inespecíficos. Como controles da imunofluorescência foram feitas secções cerebrais incubadas com os anticorpos primários, mas sem a adição dos respectivos secundários.

3.10 Análise da Expressão de proteínas por Western Blot

Após 48 horas da sessão de condicionamento, os animais foram sacrificados e a região do hipocampo retirada para análise. Em seguida, as porções foram armazenadas em um tubo e maceradas para extração das proteínas a partir do homogenato de amostras independentes com tampão de lise (NaCl 137 mM; Tris-HCl 20 mM pH 7.6; glicerol 10%) e coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich, EUA). As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford, utilizando a proteína BSA em diferentes concentrações (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0 e 16.0 mg/μL), para construção de uma curva-padrão, através de um software acoplado ao leitor de Elisa (Pelkin Elmer, EUA).

O homogenato foi submetido à eletroforese em gel 10% de acrilamida e transferido para uma membrana Immobilon-P (Milipore, Bedford, MA, EUA). A fim de bloquear os sítios inespecíficos, a membrana foi incubada em BSA-TBS 3% por aproximadamente 2h. Em seguida, a membrana foi incubada, *overnight* com os

anticorpos primários para receptores muscarínicos, M1 e M3 (Santa Cruz, 1:500, M1 H-120: SC-9106; M3 C-20: SC-7474). Após três lavagens com TBS-t (salina tamponada em TRIS 0,05% tween 20) os imunoblots foram incubados com o anticorpo secundário acoplado com uma peroxidase (anti-rabbit e anti-goat 1:3000, Santa Cruz, EUA) por 1h e, após três lavagens, revelado com o kit colorimétrico 4CN (Pelkin Elmer, EUA). As bandas não saturadas tiveram suas densidades quantificadas com o auxílio do programa Image J, sendo a proteína α 1a-tubulina (Santa Cruz, EUA) usada como normalizadora uma vez que essa não se altera em protocolos envolvendo estresse

***P**ROCOLOS*
***E**XPERIMENTAIS*

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Em todos os protocolos os animais foram transportados, em suas respectivas caixas, à sala de experimentação, e mantidos por cerca de 30 minutos antes do início do experimento. Cada animal foi conectado ao sistema de registro de atividade cardiovascular, em sua respectiva caixa, para registro dos valores basais de PAM, FC e temperatura cutânea. Droga ou veículo foram administrados bilateralmente no HD. Em seguida, os animais, ainda conectados ao sistema de registro da atividade cardiovascular, foram reexpostos a caixa de condicionamento, onde permaneceram por 10 minutos. A PAM, FC e TC foram registradas antes e durante o período de reexposição ao contexto. Além dos parâmetros autonômicos, a resposta comportamental (tempo de congelamento) foi registrada manualmente. A imobilidade foi considerada como ausência total de movimentos, exceto aqueles relacionados à respiração (Fanselow, 1980). Para cada antagonista, utilizado nos protocolos experimentais, foram feitas doses crescentes partindo de uma dose de referência.

4.1 Efeito da administração bilateral de um inibidor da captação da colina no HD sobre a REC ao contexto.

Esse protocolo teve por objetivo estudar as consequências da redução dos níveis de acetilcolina no HD sobre a REC. Para isso os animais, condicionados e não condicionados receberam microinjeções bilaterais de 500 nL de veículo ou 3 nmol de um inibidor da captação de colina, o hemicolínio (Fernandes *et al.*, 2005) e foram reexpostos ao contexto aversivo.

4.2. Efeito da administração bilateral de antagonista de receptores muscarínicos no HD sobre a REC ao contexto.

Este protocolo teve por objetivo avaliar a participação de receptores muscarínicos no HD sobre a REC. Os animais, condicionados e não condicionados, receberam microinjeções bilaterais de veículo ou as doses do antagonista não seletivo de receptores muscarínicos a atropina, partindo da dose de 6nmol (Fedoce et al., 2012), e foram reexpostos ao contexto aversivo. Uma curva dose resposta foi feita no tratamento em animais condicionados.

4.3 Efeito da administração bilateral de antagonista seletivo para receptores muscarínicos M1/ M3, *J 104129 fumarate*, no HD sobre a REC ao contexto.

Este protocolo teve por objetivo avaliar a participação de receptores muscarínicos do tipo M1 e M3 no HD sobre a REC. Os animais condicionados receberam microinjeções bilaterais de veículo ou as doses de 0,6, 6 ou 34 nmol do antagonista seletivo para receptores muscarínicos M1 e M3, o *J 104129 fumarate* (Fedoce et al., 2012) e foram reexpostos ao contexto aversivo.

4.4 Efeito da administração bilateral de antagonista seletivo para receptores muscarínicos M1, pirenzepina, no HD sobre a REC ao contexto.

Este protocolo teve por objetivo avaliar a participação de receptores muscarínicos do tipo M1 no HD sobre a REC. Os animais condicionados receberam microinjeções bilaterais de veículo ou as doses de 0,6, 6 ou 102 nmol do antagonista seletivo para receptores muscarínicos M1, pirenzepina (Kenny et al., 2000; Fedoce et al., 2012) e foram reexpostos ao contexto aversivo.

4.5 Análise da Expressão de receptores M1 e M3 no hipocampo de ratos submetidos ao condicionamento contextual.

Esse protocolo tem por objetivo avaliar a expressão de receptores muscarínicos do tipo M1 e M3 diante o condicionamento contextual. Para isso, os animais foram divididos em três grupos: condicionados (receberam choque nas patas), não condicionados (não receberam choque nas patas) e *naive* (não passaram pela sessão de condicionamento). Quarenta e oito horas após este procedimento, os animais foram sacrificados e a região do hipocampo retirada para análise, conforme descrito na sessão 3.10.

ANÁLISE
ESTATÍSTICA

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o software comercial Prisma (Prism version 5.0; Graph Pad, EUA). O teste utilizado para verificar as alterações autonômicas em relação a linha basal, por tratamento farmacológico, foi o teste *t de student* pareado (média de 5 minutos antes do tratamento comparada a média 5 minutos após). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão médio). As variações da Δ PAM, Δ FC e Δ TC foram medidas simultaneamente minuto a minuto em cada animal, sendo 5 minutos de basal (após o tratamento) e 10 minutos durante a reexposição contextual. Posteriormente foi calculada a média da variação desses parâmetros para cada grupo experimental.

No caso das respostas autonômicas, nas diferentes condições (no caso da atropina e do hemicolinio), utilizou-se a correção de *Huynh-Feldt*, (software SPSS), sendo feita análise de variância de dois fatores variáveis, tratamento e condição, e o fator tempo como medida repetida. No caso de evidenciar diferenças entre o tratamento com apenas duas variáveis, tratamento e tempo, foi utilizada *Two-way* ANOVA. Para avaliar a diferença entre os tratamentos fez-se uma análise de variância de uma via (*One-way* ANOVA), seguida do *post hoc* de *Tukey*.

O comportamento de congelamento dos animais foi expresso como percentual do tempo total de exposição à caixa, sendo analisado pela análise de variância de dois fatores (*Two-Way* ANOVA) nos casos onde temos como fatores o tratamento e a condição. No caso apenas da variável tratamento foi feita por uma análise de variância de uma via (*One-way* ANOVA), seguida do *post hoc* de *Tukey*. Para avaliar o efeito do tratamento em animais não condicionados, foi feito um *t de student* pareado. O nível de significância será assumido a um $p < 0,05$.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 Localização dos sítios de injeção

Fotomicrografia de uma secção coronal do cérebro de rato retratando os sítios de microinjeção localizados no HD (Figura 01). A representação diagramática mostram os sítios de injeção no HD, bem como as áreas localizadas fora do HD dos animais usados nos protocolos (Figura 02).

Figura 01: Fotomicrografia de uma secção coronal do cérebro de um rato mostrando os sítios de injeção no HD.

Figura 02: Diagramas de secções coronais do encéfalo de rato representando os sítios de microinjeção bilateral no HD (círculos pretos) e áreas adjacentes (círculos cinza), com base no atlas *The Rat Brain* de Paxinos e Watson (2007).

6.2 Efeito da administração bilateral do inibidor da captação de colina – Hemicolinio - no HD sobre a REC ao contexto

6.2.1 Respostas comportamentais durante o MCC

Os animais condicionados apresentaram um tempo de congelamento maior que os animais não condicionados durante a reexposição ao contexto aversivo ($n=5$; $79,73 \pm 4,2\%$ vs $13,06 \pm 2,3\%$; $F_{3,20}=195,05$; $p<0,05$). Além disso, o tratamento de hemicolinio foi capaz de alterar o tempo de congelamento ($F_{3,20}=43,33$; $p<0,05$), sendo observado apenas nos animais condicionados ($n=6$; $F_{3,20}=34,39$; $p<0,05$) sem qualquer efeito nos grupos não condicionados ($n=7$; $t=0,6820$; $p>0,05$).

O efeito do hemicolinio no grupo condicionado foi caracterizado por uma redução do tempo de congelamento, um efeito do tipo ansiolítico ($n=6$; $t=6,944$; $p<0,05$) (Figura 03).

6.2.2 Respostas autonômicas durante o MCC

A microinjeção de veículo ($n=5$; 500nL) ou hemicolinio ($n=6$; 3nmol/500nL), bilateralmente no HD, não causou alterações basais de PAM (veículo: $100,5 \pm 2,670$ mmHg vs $100,9 \pm 1,637$ mmHg, $t=0,1354$, $p>0,05$; hemicolinio 3nmol: $107,7 \pm 3,219$ mmHg vs $102,8 \pm 1,303$ mmHg, $t=1,569$, $p>0,05$), FC (veículo: $378,0 \pm 0,7884$ bpm vs $374,9 \pm 5,771$ bpm, $t=0,3125$, $p>0,05$; hemicolinio 3nmol: $378,1 \pm 9,948$ bpm vs $384,7 \pm 12,13$ bpm, $t=0,4218$, $p>0,05$) ou TC (veículo: $31,27 \pm 0,4578$ °C vs $31,98 \pm 0,2619$ °C, $t=1,342$, $p>0,05$; hemicolinio 3nmol: $30,53 \pm 0,6531$ °C vs $30,49 \pm 0,4548$ °C, $t=1,305$, $p>0,05$) de animais condicionados e não condicionados.

A análise de variância, *two-way* ANOVA de 2 fatores, condição (não condicionado ou condicionado) tratamento e o fator tempo como medida repetida, apresentou uma interação positiva, com correção *Huynh-Feldt*, em todos os parâmetros autonômicos. Animais condicionados apresentaram um aumento nos parâmetros autonômicos (PAM, $F_{3,22;61,15} = 9,34$; FC, $F_{4,97;94,33} = 8,75$; TC, $F_{5,29;100,325} = 16,5$, $p < 0,05$) durante a reexposição ao contexto aversivo, observadas apenas no grupo condicionado ($n=6$; PAM, $F_{3,22;61,15} = 15,15$; FC, $F_{4,97;94,33} = 12,03$; TC, $F_{5,29;100,325} = 11,76$, $p < 0,05$). Esses parâmetros foram reduzidos pelo tratamento com hemicolínio (PAM, $F_{3,22;61,15} = 6,95$; FC, $F_{4,97;94,33} = 5,21$; TC, $F_{5,29;100,325} = 17,38$, $p < 0,05$) apenas nos animais condicionados ($n=6$; PAM, $F_{1,135} = 112,6$, $p < 0,05$; FC, $F_{1,135} = 168,7$, $p < 0,05$ e TC, $F_{1,135} = 235,1$, $p < 0,05$).

Esses efeitos não foram observados no tratamento feito com hemicolínio nos animais não condicionados ($n= 7$; PAM, $F_{1,150} = 2,920$, $p < 0,05$; FC, $F_{1,150} = 0,8967$, $p < 0,05$ e TC, $F_{1,150} = 0,2834$, $p < 0,05$) (Figura 04).

Figura 03: Efeitos da microinjeção bilateral de hemicolínio (HEM, 3nmol/500nL), em animais condicionados na expressão do tempo de congelamento durante a reexposição ao contexto aversivo. As colunas representam a média do tempo de congelamento (em porcentagem %) e as barras o EPM; * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo condicionado (VEI, 500nL); ** $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo não condicionado (VEI, 500nL).

Figura 04: Efeito de microinjeções bilaterais de veículo (VEI, 500nL) ou hemicolinio 3nmol/500nL na variação da PAM, FC e TC de animais condicionados e não condicionados antes e durante a reexposição ao contexto aversivo. Os animais foram colocados no contexto no tempo 1. Os símbolos representam as médias das variações e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com VEI.

6.3 Efeito da administração bilateral do antagonista não seletivo de receptores muscarínicos – Atropina – no HD sobre a REC ao contexto

6.3.1 Respostas comportamentais durante o MCC

A análise de variância, *Two-way* ANOVA de 2 fatores, condição (não condicionado ou condicionado) e o tratamento, apresentou uma interação positiva ($F_{3,24} = 45,62$; $p < 0,05$). Nesta observação foi analisado apenas o tratamento com a maior dose de atropina e veículo, em animais condicionados e não condicionados, visto que não houve administração dos tratamentos menores de atropina nos animais não condicionados. Os animais condicionados ($n=5$) apresentaram um maior tempo de congelamento que os animais não condicionados ($n=6$) durante a reexposição ao contexto aversivo ($75,6 \pm 3,977\%$ vs $15,88 \pm 1,512\%$; $F_{3,24} = 374,96$; $p < 0,05$). Além disso, o tratamento de atropina ($6\text{nmol}/500\text{nL}$) foi capaz de alterar o tempo de congelamento ($F_{3,24} = 55,10$; $p < 0,05$), sendo observado apenas nos animais condicionados ($n=5$; $t = 6,585$; $p < 0,05$) sem qualquer efeito nos grupos não condicionados ($n=12$; $t = 0,7219$; $p > 0,05$) (Figura 05).

Animais condicionados tratados com atropina no HD apresentaram uma redução no congelamento ($F_{3,21} = 35,02$; $p < 0,05$) nas doses de 3 e 6nmol ($n=5-9$; $p < 0,05$) (Figura 04). O tratamento com a dose de $0,6\text{nmol}$ de atropina, no grupo condicionado, não foi diferente do grupo veículo ($n=6$; $p > 0,05$). O perfil da resposta comportamental com o bloqueio das doses de atropina foi dose-dependente ($n=5-11$; $r^2 = 0,99$; $p < 0,05$), como mostra a Figura 06.

6.3.2 Respostas autonômicas durante o MCC

A microinjeção de veículo ($n=5$; 500nL) ou atropina ($n=8$; $6\text{nmol}/500\text{nL}$), bilateralmente no HD, não causou alterações na PAM basal (Veículo: $99,56 \pm 5,509$ mmHg vs $99,21 \pm 5,576$ mmHg, $t = 0,0452$, $p > 0,05$; atropina $0,6\text{nmol}$: $101,9 \pm 6,694$

mmHg vs $98,62 \pm 2$ mmHg, $t=0,3647$, $p>0,05$; atropina 3nmol: $91,93 \pm 2,346$ mmHg vs $93,60 \pm 2,165$ mmHg, $t=0,5207$, $p>0,05$ e atropina 6nmol: $99,42 \pm 1,570$ mmHg vs $96,80 \pm 3,080$ mmHg, $t=0,7570$, $p>0,05$), na FC basal (Veículo: 347 ± 4 bpm vs 348 ± 5 bpm, $t=0,1$, $p>0,05$; atropina 0,6nmol: $364,6 \pm 6,495$ bpm vs $369,1 \pm 5,570$ bpm, $t=0,5189$, $p>0,05$; atropina 3nmol: $356,7 \pm 25,83$ bpm vs $376,4 \pm 1,160$ bpm, $t=0,5594$, $p>0,05$ e atropina 6nmol: $392,4 \pm 5,040$ bpm vs $394,2 \pm 6,054$ bpm, $t=0,2285$, $p>0,05$) ou na TC basal (Veículo: $29,74 \pm 1,030$ °C vs $29,00 \pm 1,135$ °C, $t = 0,4840$, $p>0,05$; atropina 0,6nmol: $31,49 \pm 0,7714$ °C vs $31,32 \pm 0,5617$ °C, $t = 0,1816$, $p>0,05$; atropina 3nmol: $31,70 \pm 0,5155$ °C vs $31,26 \pm 0,5672$ °C, $t = 0,5809$, $p>0,05$ e atropina 6nmol: $33,41 \pm 0,3978$ °C vs $33,45 \pm 0,4201$ °C, $t = 0,0777$, $p>0,05$) em ambos os grupos, condicionados e não condicionados.

A análise de variância, *Two-way* ANOVA de 2 fatores, condição (não condicionado ou condicionado) tratamento e o fator tempo como medida repetida, apresentou uma interação positiva, com correção *Huynh-Feldt*, em todos os parâmetros autonômicos. Nesta observação foi analisado apenas o tratamento com a maior dose de atropina e veículo, em animais condicionados e não condicionados, o mesmo procedimento feito na análise comportamental. Animais condicionados apresentaram um aumento nos parâmetros autonômicos (PAM, $F_{2,46;58,96} = 5,81$; FC, $F_{5,35;128,37} = 11,44$; TC, $F_{3,59;86,27} = 18,85$, $p<0,05$) durante a reexposição ao contexto aversivo, observadas apenas no grupo condicionado ($n=5$; PAM, $F_{2,46;58,96} = 5,02$; FC, $F_{5,35;128,37} = 9,81$; TC, $F_{3,59;86,27} = 17,74$, $p<0,05$). Esses parâmetros foram reduzidos pelo tratamento com atropina 6nmol (PAM, $F_{2,46;58,96} = 6,66$; FC, $F_{5,35;128,37} = 14,98$; TC, $F_{3,59;86,27} = 16,21$, $p<0,05$) apenas nos animais condicionados ($n=6$; PAM, $F_{1,135} = 112,6$, $p<0,05$; FC, $F_{1,135} = 168,7$, $p<0,05$ e TC, $F_{1,135} = 235,1$, $p<0,05$). Esses efeitos não foram observados no tratamento feito com atropina 6nmol nos animais não condicionados ($n= 12$; PAM,

$F_{1,240} = 0,1272$, $p < 0,05$; FC, $F_{1,1,240} = 3,837$, $p < 0,05$ e TC, $F_{1,240} = 1,168$, $p < 0,05$) (Figura 07).

Estas respostas também foram reduzidas após administrações de atropina (PAM, $F_{3,315} = 62,02$, $p < 0,0001$; FC, $F_{3,315} = 69,61$, $p < 0,0001$ e TC, $F_{3,315} = 57,99$, $p < 0,0001$) nas doses de 3 e 6nmol ($n=5-9$; PAM, $F_{3,21} = 8,093$, $p < 0,05$; FC, $F_{3,21} = 10,32$, $p < 0,05$ e TC, $F_{3,21} = 6,68$, $p < 0,05$), sendo que a dose de 0,6nmol não foi diferente do grupo veículo ($n=6$; $p > 0,05$) (Figura 06). O perfil da resposta autonômica com o bloqueio das doses de atropina foi dose-dependente (PAM: $r^2 = 0.99$; $p < 0.05$; FC: $r^2 = 0.99$; $p < 0.05$ e TC: $r^2 = 0.99$; $p < 0,05$), como mostra a Figura 08.

Figura 05: Efeito de microinjeções bilaterais de veículo (VEI, 500nL) ou Atropina (0,6, 3 ou 6nmol/500nL) no tempo de congelamento de animais condicionados e não condicionados (6nmol). As colunas representam a média do tempo de congelamento (em %) e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo condicionado tratado com VEI; + $p < 0,05$ em relação ao grupo não condicionado tratado com VEI e *a* ao grupo não condicionado que recebeu 6nmol de atropina.

Figura 06: Curva dose-resposta gerada por análise de regressão não-linear a partir das microinjeções bilaterais de veículo (VEI, 500nL) ou Atropina (0,6, 3 ou 6nmol/500nL) no tempo de congelamento de animais condicionados.

Figura 07: Efeito de microinjeções bilaterais de veículo (VEI, 500nL) ou Atropina (ATR, 0,6, 3 ou 6nmol/500nL) na variação da PAM, FC e TC de animais condicionados e não condicionados antes e durante a reexposição ao contexto aversivo. Os animais foram colocados no contexto no tempo 1. Os símbolos representam as médias das variações e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com VEI.

Figura 08: Curvas dose-resposta gerada por análise de regressão não-linear a partir das microinjeções bilaterais de veículo (VEI, 500nL) ou Atropina (0,6, 3 ou 6nmol/500nL) nas respostas autonômicas, PAM (A), FC (B) e TC (C).

6.4 Efeito da administração bilateral do antagonista *J104129 fumarate* no HD sobre a REC ao MCC

6.4.1 Respostas comportamentais durante o MCC

Os animais condicionados apresentaram um aumento no tempo de congelamento quando reexpostos ao contexto aversivo aproximadamente $75,34 \pm 2,416\%$ ($n=10$; $F_{3,25}=18,95$). Contudo, este aumento foi atenuado com administrações no HD de 6 e 34nmol/500nL de fumarate ($n=7-9$; $p<0,05$) de forma dose-dependente ($R^2=0,99$; $p<0,05$) (Figura 09 e 10).

6.4.2 Respostas autonômicas durante o MCC

A microinjeção de veículo ($n=10$; 500nL) ou *J104129 fumarate* ($n=9$; 34nmol/500nL) ($n=9$), bilateralmente no HD, não causou alterações na PAM basal (Veículo: $89,67 \pm 6,470$ mmHg vs $104,4 \pm 6,571$ mmHg, $t=1,601$, $p>0,05$; *J104129 fumarate* 0,6nmol: $94,85 \pm 2,457$ mmHg vs $97,26 \pm 2,663$ mmHg, $t=0,6673$, $p>0,05$; *J104129 fumarate* 6nmol: $106,60 \pm 7,271$ mmHg vs $106,7 \pm 6,905$ mmHg, $t=0,0163$, $p>0,05$ e *J104129 fumarate* 34nmol: $95,02 \pm 4,305$ mmHg vs $97,33 \pm 4,143$ mmHg, $t=0,3860$, $p>0,05$), FC basal (Veículo: $321,6 \pm 6,035$ bpm vs $335,9 \pm 5,122$ bpm, $t=1,796$, $p>0,05$; *J104129 fumarate* 0,6nmol: $342,2 \pm 24,30$ bpm vs $370,7 \pm 10,18$ bpm, $t=1,081$, $p>0,05$; *J104129 fumarate* 6nmol: $396,3 \pm 10,71$ bpm vs $408,11 \pm 11,03$ bpm, $t=0,0777$, $p>0,05$ e *J104129 fumarate* 34nmol: $398,2 \pm 16,34$ bpm vs $379,2 \pm 9,068$ bpm, $t=1,017$, $p>0,05$) e ou TC basal na TC basal (Veículo: $29,13 \pm 1,00$ °C vs $28,67 \pm 0,7529$ °C, $t=1,766$, $p>0,05$; *J104129 fumarate* 0,6nmol: $29,14 \pm 0,7513$ °C vs $28,92 \pm 0,7801$ °C, $t=0,2043$, $p>0,05$; *J104129 fumarate* 6nmol: $29,65 \pm 0,4520$ °C vs $28,94 \pm$

0,4226 °C, $t=0,1440$, $p>0,05$ e *J104129 fumarate* 34nmol: $30,46 \pm 0,9087^{\circ}\text{C}$ vs $30,01 \pm 0,9527^{\circ}\text{C}$, $t=1,099$, $p>0,05$).

Os animais condicionados apresentaram um aumento da PAM, FC e diminuição da TC quando reexpostos ao contexto aversivo ($n=10$; PAM, $F_{14,360}=13,47$, $p<0,0001$; FC, $F_{14,360}=12,24$, $p<0,0001$ e TC, $F_{14,390}=19,94$, $p<0,0001$). A administração de *J104129 fumarate* no HD atenuou essas respostas nos animais condicionados (PAM, $F_{3,360}=81,27$, $p<0,0001$; FC, $F_{3,360}=131,6$, $p<0,0001$ e TC, $F_{3,390}=63,59$, $p<0,0001$) em todas as doses utilizadas, 0,6, 3 e 34nmol ($n=3-9$; $p<0,05$) (Figura 11).

Figura 09: Efeito de microinjeções bilaterais de veículo (VEI, 500nL) ou *J104129 fumarate* (0,6, 6 e 34nmol/500nL) no tempo de congelamento de animais condicionados. As colunas representam a média do tempo de congelamento (em %) e as barras o EPM. * $p<0,05$ em relação ao grupo condicionado tratado com VEI.

Figura 10: Curva dose-resposta gerada por análise de regressão não-linear a partir das microinjeções bilaterais de veículo (VEI, 500nL) ou *J104129 fumarate* (0,6, 6 ou 34 nmol/500nL) no tempo de congelamento de animais condicionados.

Figura 11: Efeito de microinjeções bilaterais de veículo (VEI, 500nL) ou *J104129 fumarate* (0,6, 6 e 34nmol/500nL) na variação da PAM, FC e TC de animais condicionados antes e durante a re-exposição ao contexto aversivo. Os animais foram colocados no contexto aversivo no tempo 1. Os símbolos representam as médias das variações e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com VEI.

6.5 Efeito da administração bilateral do antagonista pirenzepina no HD sobre a REC ao contexto

6.5.1 Respostas comportamentais durante o MCC

Os animais condicionados apresentaram um maior tempo de congelamento durante a reexposição ao contexto aversivo, aproximadamente $70,34 \pm 3,635\%$ ($n=8$; $F_{2,22}=2,209$), sendo que os tratamentos não foram diferentes, ou seja, as doses de pirenzepina 6 e 102nmol/500nL administradas no HD não reduziram o tempo de congelamento de animais condicionados ($n=8-9$; $p>0,05$) (Figura 12).

6.5.2 Respostas autonômicas durante o MCC

A microinjeção de veículo ($n=8$; 500nL) ou pirenzepina ($n=9$; 102nmol/500nL), bilateralmente no HD, não causou alterações na PAM basal (Veículo: $89,23 \pm 6,277$ mmHg vs $103,6 \pm 6,235$ mmHg, $t=1,628$, $p>0,05$; pirenzepina 6nmol: $99,43 \pm 2,351$ mmHg vs $101,1 \pm 2,921$ mmHg, $t=0,4463$, $p>0,05$ e pirenzepina 102nmol: $101,8 \pm 3,353$ mmHg vs $100,2 \pm 3,427$ mmHg, $t=0,3289$, $p>0,05$), na FC basal (Veículo: $343,6 \pm 13,35$ bpm vs $346,6 \pm 8,769$ bpm, $t=0,1878$, $p>0,05$, pirenzepina 6nmol: $375,3 \pm 10,56$ bpm vs $377,7 \pm 7,908$ bpm, $t=0,1838$, $p>0,05$ e pirenzepina 102nmol: $362,2 \pm 11,88$ bpm vs $381,4 \pm 10,50$ bpm, $t=0,8929$, $p>0,05$) ou na TC basal na TC basal (Veículo: $27,95 \pm 0,7102$ °C vs $27,39 \pm 0,6581$ °C, $t=0,5701$, $p>0,05$, pirenzepina 6nmol: $27,22 \pm 0,3831$ °C vs $26,96 \pm 0,4048$ °C, $t=0,4637$, $p>0,05$ e pirenzepina 102nmol: $30,48 \pm 0,7001$ °C vs $30,13 \pm 0,7552$ °C, $t=0,4637$, $p>0,05$).

Durante a reexposição ao contexto aversivo, animais condicionados apresentaram um aumento na PAM, FC e diminuição na TC ($n=8$; PAM, $F_{14,330}=24,20$, $p<0,0001$; FC, $F_{14,330}=18,65$, $p<0,0001$ e TC, $F_{14,300}=27,70$, $p<0,0001$). Estas respostas

foram atenuadas pela administração prévia de pirenzepina no HD antes da reexposição ao contexto aversivo (PAM, $F_{2,330}=166,2$, $p<0,0001$; FC, $F_{2,330}=125,3$, $p<0,0001$ e $TC_{2,300}=286,4$), sendo este efeito visto nas três doses utilizadas, 0,6, 6 e 102nmol ($n=8-9$; $p<0,005$) (Figura 13).

Figura 12: Efeito de microinjeções bilaterais de veículo (VEI, 500nL) ou Pirenzepina (6 e 102nmol/500nL) no tempo de congelamento de animais condicionados. As colunas representam a média do tempo de congelamento (em %) e as barras o EPM. * $p<0,05$ em relação ao grupo condicionado tratado com VEI.

Figura 13: Efeito de microinjeções bilaterais de veículo (VEI, 500nL) ou pirenzepina (0,6, 6 e 102 nmol/500nL) na variação da PAM, FC e TC de animais condicionados antes e durante a reexposição ao contexto aversivo. Os animais foram colocados no contexto aversivo no tempo 1. Os símbolos representam as médias das variações e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com VEI.

6.6 Imunofluorescência para avaliação dos receptores M1 e M3 localizados no HD

A análise qualitativa, imunofluorescência de dupla marcação, mostrou que os receptores muscarínicos M1 e M3 estão presentes em todas as áreas analisadas do HD, regiões CA1 (Figura 14), CA3 (Figura 15) e GD (Figura 16), distribuídos em células neurais, possivelmente em uma mesma localidade. Essa análise evidencia que receptores M1 estão localizados em mais células neurais do que receptores M3, sugerindo uma maior proporção destes receptores no HD de ratos. Nenhuma marcação para esses receptores foi encontrada quando os anticorpos primários foram omitidos (dados não mostrados).

6.7 Expressão de receptores M1 e M3 após o condicionamento

A análise quantitativa dos receptores M1 e M3 no hipocampo de ratos demonstrou um aumento de receptores M3 apenas no grupo condicionado ($n=4$ para cada grupo; $F_{2,11}=4,559$; $p<0,05$). A densidade de receptores M1 não foi alterada em nenhuma condição ($n=5$ para cada grupo; $F_{2,14}=0,9852$; $p>0,05$). A expressão destes receptores está representada na figura 17.

Figura 14: Imunofluorescência dos receptores muscarínicos M1 e M3, na região CA1 do HD de ratos. As fotomicrografias (com aumento do microscópio confocal, Leica SP5, 63 x, escalas entre 20 - 50 μ m) mostram receptores M1 em verde (a), receptores M3 em vermelho (b) e ambos (amarelo ou laranja; c e d), indicados pelas setas vermelhas.

Figura 15: Imunofluorescência dos receptores muscarínicos M1 e M3, na região CA3 do HD de ratos. As fotomicrografias (com aumento do microscópio confocal, Leica SP5, 63 x, escalas entre 20 - 50µm) mostram receptores M1 em verde (*a*), receptores M3 em vermelho (*b*) e ambos (amarelo e laranja; *c* e *d*) indicados pelas setas vermelhas.

Figura 16: Imunofluorescência dos receptores muscarínicos M1 e M3 no GD de ratos. As fotomicrografias (com aumento do microscópio confocal, Leica SP5, 63 x, escalas entre 20 - 50µm) mostram receptores M1 em verde (a), receptores M3 em vermelho (b) e ambos (amarelo e laranja; c e d), indicados pelas setas vermelhas.

Figura 17: Análise da quantificação de receptores M1 e M3 no hipocampo de ratos. Como observado, a expressão de receptores M3 aumenta em animais condicionados, representados em B. A densidade de receptores M1 não se altera em nenhuma condição (A). * One Way ANOVA, seguida do post hoc de Dunnett.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Os presentes resultados mostram que a neurotransmissão colinérgica no HD, por meio da ativação dos receptores muscarínicos, desempenha um papel importante na REC, sobretudo facilitando as respostas comportamentais e autonômicas, observadas em ratos condicionados durante a reexposição ao contexto aversivo. Além disso, nossos resultados sugerem o papel de receptores muscarínicos do tipo M3 na modulação das respostas comportamentais e do tipo M1 e M3 participando das respostas autonômicas associadas a REC. A análise qualitativa, imunofluorescência de dupla marcação, revelou que os receptores M1 e M3 estão localizados nos mesmos compartimentos neuronais. Entretanto, a quantificação destes receptores, após o condicionamento, demonstrou um aumento apenas nos receptores M3 no hipocampo de ratos, confirmando o dado farmacológico observado.

Os resultados avaliados no presente estudo mostram que os animais condicionados tratados com veículo no HD apresentaram alterações nas respostas comportamentais (tempo de congelamento) e autonômicas (aumento de PAM e FC e queda) (Fanselow, 1980, Antoniadis and McDonald, 1999, Fendt and Fanselow, 1999, Carrive, 2000, Godsil et al., 2000). Nos animais não condicionados, independente do tratamento feito com a dose maior de atropina e de hemicolinio, não foi observado tais alterações, sugerindo que estas características seriam expressas apenas sob exposição ao estímulo condicionado, ou seja, o estímulo neutro, contexto, pareado com choque nas patas.

Dessa forma, para verificar o possível envolvimento da neurotransmissão colinérgica presente no HD na expressão da REC contextual, os animais receberam injeções bilateralmente de hemicolinio, um inibidor da captação de colina, e reexpostos

ao contexto. Foi observado uma redução do tempo de congelamento, sugerindo que a redução das concentrações de ACh na fenda sináptica no HD promove um efeito do tipo ansiolítico. Nenhuma alteração foi observada em ratos não condicionados tratados com hemicolínio.

Colaborando com nossos achados, Csernansky e colaboradores (2005), demonstraram que a administração intraperitoneal de inibidores da acetilcolinesterase, donezepil ou fisostigmina, antes da reexposição ao contexto aversivo, promovem um aumento da resposta de congelamento em camundongos, efeito do tipo ansiogênico. Como dito anteriormente, os níveis de ACh endógena aumentam durante situações aversivas, principalmente durante a reexposição ao contexto aversivo (Acquas et al., 1996; Aloisi et al., 1997; Thiel et al., 1998; Giovannini et al., 2001; Tajima et al., 1996). demonstrando a importância da ACh em desencadear a REC.

Confrontando nossos resultados, estudos demonstraram que a administração de fisostigmina, um inibidor da acetilcolinesterase, no HD causou um efeito do tipo ansiolítico, em decorrência do aumento das concentrações de ACh no HD, em vários modelos animais de ansiedade. Ratos submetidos ao modelo do LCE ou ao teste “*shock-probe burying*”, apresentaram um comportamento do tipo ansiolítico quando a droga era administrada no HD antes da exposição aos modelos (Degroot e Treit, 2002). Em comparação com os dados apresentados no presente estudo, a administração de hemicolínio diminuiu o tempo de congelamento, caracterizando também um efeito do tipo ansiolítico. Entretanto, esta droga atua diminuindo os estoques de ACh, ou seja, o efeito ansiolítico observado no modelo do MCC se dá pela diminuição dos níveis de ACh no HD, e não pelo seu aumento. Os modelos utilizados por Degroot e Treit (2002), não envolvem aprendizado e memória, apenas a aversão inata do animal em espaços abertos ou em situações de perigo. Com isso, podemos sugerir que o aumento de ACh

no HD parece modular de forma distinta as respostas de ansiedade, dependendo do modelo empregado, inato ou aprendido, sendo importante na expressão do medo condicionado.

Além da resposta comportamental, avaliamos a participação da ACh no controle do aumento da PAM e FC, bem como na mediação da queda da temperatura cutânea associadas ao MCC. A redução nas concentrações deste neurotransmissor no HD, pelo tratamento local com hemicolinio, reduziu significativamente tanto o aumento na PAM e FC quanto à queda na TC da cauda. Estes dados indicam que o sistema colinérgico no HD modula a atividade do sistema nervoso autonômico vascular, cardíaco e inclusive a mediação da redistribuição do fluxo sanguíneo da cauda de rato para outros leitos vasculares. Isto porque, a temperatura cutânea em ratos depende tanto fluxo sanguíneo quanto do tônus vasoconstritor simpático em artérias da pele (Garcia et al., 2001, Blessing, 2003, Vianna and Carrive, 2005).

Estudos imunohistoquímicos revelaram a presença de receptores muscarínicos amplamente no SNC, incluindo o HD (Buckley et al., 1988), sendo que os subtipos M1 e M3 são localizados na membrana pós-sináptica e os subtipos M2 e M4 são localizados pré-sinápticamente (Levey et al., 1995, Rouse and Levey, 1997, Rouse et al., 1998). Para avaliarmos a participação destes receptores no HD na expressão da REC contextual, os animais foram pré-tratados bilateralmente com doses crescentes de atropina, e reexpostos ao contexto aversivo. Nós observamos uma redução do tempo de congelamento bem como uma diminuição significativa das respostas autonômicas observadas durante o MCC, ambas de forma dose-dependente. Esses dados sugerem que a ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos facilita o componente comportamental e autonômico induzido pelo MCC. Nenhuma alteração foi observada

em ratos não condicionados durante a reexposição ao contexto aversivo após a administração prévia da maior dose de atropina.

Outros estudos analisaram os efeitos da administração sistêmica de escopolamina, um antagonista não seletivo de receptores muscarínicos, na expressão do REC de ratos antes e após a sessão de condicionamento. Foi observado que a escopolamina, de forma dose-dependente, prejudicou a aquisição, mas não a consolidação ao medo contextual, sendo que em altas doses também prejudicaram o medo associado ao som (Anagnostaras et al., 1995, Anagnostaras et al., 1999). Doses de escopolamina administradas no HD, antes do condicionamento, diminuíram a aquisição ao medo contextual, sem interferir na aquisição do congelamento associado com o estímulo condicionado ao som (Gale et al., 2001). Em conformidade com esses achados, podemos concluir que o sistema colinérgico do HD via receptores muscarínicos participam da aquisição e evocação de respostas de medo relacionadas ao condicionamento contextual.

A participação da neurotransmissão colinérgica, por ativação de receptores muscarínicos, foi observada em modelos preditivos de ansiedade, tais como: LCE o teste da caixa claro-escuro (CCE). Diferente dos nossos achados, a administração sistêmica de escopolamina antes da exposição ao CCE aumentou a permanência de ratos no lado escuro da caixa, caracterizando um comportamento do tipo ansiogênico (Smythe et al., 1996). Por outro lado, a administração desta mesma droga no HD, antes da exposição ao LCE, promoveu um aumento no número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, um efeito do tipo ansiolítico, assim como observado no presente trabalho (Zarrindast et al., 2011). Esses achados indicam um importante papel

dos receptores muscarínicos, presentes no HD, na modulação dos comportamentos defensivos relacionados a ansiedade, sendo distinta dependendo do modelo utilizado.

Como observado em nossos resultados utilizando atropina, receptores muscarínicos no HD estão envolvidos com a expressão da REC contextual. Assim, procuramos identificar quais os subtipos de receptores muscarínicos estariam participando desta modulação. O primeiro antagonista muscarínico seletivo escolhido foi o *J104129 fumarate*, que possui afinidade semelhante para receptores muscarínicos M1 e M3 (Mitsuya et al., 1999a, Mitsuya et al., 1999b). Com base no K_i desta droga, e da atropina, foi escolhida a primeira dose, 34nmol (dose equipotente), com o objetivo de mimetizar um bloqueio proporcional ao promovido pela atropina em receptores muscarínicos M3. Além dessa dose equipotente, foram propostas as outras duas doses, uma dose similar a dose efetiva de atropina, 6nmol, e uma 10 vezes menor, 0,6nmol. A menor dose teve como finalidade buscar uma melhor seletividade para receptores muscarínicos M1 e/ou M3, uma vez que esse fármaco tem pouca afinidade pelos outros receptores muscarínicos.

As doses de 6 e 34 nmol, mas não de 0,6nmol, de *J104129 fumarate*, administradas no HD, reduziram o tempo de congelamento dos animais de forma dose-dependente. Entretanto, todas as doses deste antagonista foram capazes de bloquear as respostas autonômicas. Embora o *J104129 fumarate* possua uma seletividade de aproximadamente 4,5 vezes para M3 em relação ao M1 (Mitsuya et al., 1999b), não é o bastante para determinar o envolvimento apenas do receptor M3 na modulação das respostas observadas durante a reexposição ao contexto aversivo. Com base nesses resultados, supomos que exista uma modulação das respostas autonômicas, segregada das respostas comportamentais, uma vez que a dose equipotente, 34 nmol, e a dose equimolar a da atropina, 6 nmol, foram capazes de reduzir o tempo de congelamento.

Porém, a dose 10 vezes menor que a dose equimolar, 0,6 nmol, foi capaz de reduzir apenas as respostas autonômicas, mostrando que essas respostas são mais sensíveis ao antagonismo dos receptores M1 ou M3.

Com intuito de excluir e/ou confirmar a participação dos receptores muscarínicos do tipo M1 na modulação da REC, foi utilizado um antagonista muscarínico com maior afinidade para receptores M1 ($K_i=16\text{nM}$) em relação a receptores muscarínicos do tipo M3 ($K_i=400\text{nM}$), a pirenzepina (Lee et al., 1994). Primeiro foi utilizada a dose de 102 nmol, dose equimolar a da atropina para receptores M1. Logo, foram administradas doses menores deste antagonista, equivalentes a menor dose de *J104129 fumarate*. Todas as doses desta droga reduziram apenas as respostas autonômicas, sem alterar o tempo de congelamento. Com isso, sugerimos que receptores M1, no HD de ratos, estão envolvidos apenas no controle autonômico gerado pela reexposição ao contexto aversivo.

Nenhuma das doses de pirenzepina atenuaram o tempo de congelamento dos animais condicionados, sugerindo que receptores muscarínicos do tipo M1 não estão envolvidos com o efeito, tanto da atropina quanto do *J104129 fumarate*, na modulação da expressão da resposta comportamental do MCC. Além disso, esses resultados reforçam que os efeitos da atropina e do *J104129 fumarate*, possam envolver os receptores muscarínicos M3, mostrando que esses receptores presentes no HD estão envolvidos com a expressão da resposta comportamental, e consequentemente autonômica.

Por outro lado, todas as doses de pirenzepina foram capazes de atenuar as respostas autonômicas de forma semelhante, evidenciando um papel específico de receptores M1 na modulação destas respostas. Esses resultados estão de acordo com

resultados prévios de nosso laboratório, onde foi demonstrado que a inibição não seletiva de sinapses no HD era capaz de reduzir as respostas autonômicas associadas ao MCC, mas não alterava o congelamento em animais condicionados (Resstel et al., 2008).

Alguns estudos indicam a participação dos receptores muscarínicos do tipo M1 na resposta comportamental associada ao MCC, em diferentes momentos do processo de condicionamento. Administrações intraperitoneais de diciclomina, antagonista muscarínico preferencialmente M1, antes da sessão de condicionamento, diminuíram o tempo de congelamento de ratos reexpostos ao contexto aversivo. A administração desse antagonista feita logo após a sessão de condicionamento não atenua a expressão do congelamento ao MCC e ao estímulo condicionado sonoro (Fornari et al., 2000; Soares et al., 2006; Figueredo et al., 2008), ou seja, esses receptores possivelmente estão envolvidos apenas com a aquisição relacionada ao MCC.

Entretanto, os estudos citados acima, utilizam apenas administrações sistêmicas, extrapolando a intervenção de estruturas encefálicas, como córtex, hipocampo e amígdala, na expressão da resposta observada. Além disso, a diciclomina possui afinidade semelhante para receptores M3 (Doods et al., 1987), deixando dúvidas quanto a seletividade deste antagonista para receptores M1 e M3 nas respostas comportamentais observadas no MCC. Assim, nossos dados acrescentam novas informações sobre como o sistema colinérgico, principalmente no papel de receptores M1 e M3 no HD, nos processos envolvidos com a modulação da REC, em particular no processo de expressão da REC contextual.

Com base no efeito observado com o bloqueio dos antagonistas no HD e na quantificação dos receptores M1 e M3, nossos resultados sugerem que receptores M1

não participam da modulação da resposta comportamental. Entretanto, não excluimos a participação de receptores M3 na expressão da resposta autonômica, devido a administração de *J104129 fumarate*. Hori e colaboradores (1995) demonstraram que a administração de neostigmina intra-HD, provocava um aumento da PAM e uma diminuição da FC em ratos wistar anestesiados. Essas respostas foram bloqueadas com pirenzepina, mas não com a administração de 4-DAMP (antagonista M1 e M3). Esses resultados sugerem que receptores M1 estão envolvidos nas respostas cardiovasculares, geradas pelo aumento de ACh no HD.

Poulin e colaboradores (2010), investigaram a importância dos receptores muscarínicos do tipo M3 nos processos de aprendizagem envolvidos com o MCC e sonoro, utilizando camundongos *knock out* para receptores M3 e camundongos deficientes na fosforilação desses receptores. Quando reexpostos ao contexto aversivo, esses animais apresentaram redução no tempo de congelamento em relação ao grupo controle (tipo selvagem - *Wild-type*), resposta essa não observada na reexposição sonora. Além disso, não houve diferença entre os grupos *knock out* e selvagem na ansiedade inata, avaliada no modelo do LCE. Nesse mesmo estudo foi detectada uma baixa expressão de proteína *c-fos* no hipocampo de camundongos deficientes na fosforilação dos receptores M3, depois da sessão de condicionamento. Esse estudo corrobora os achados do nosso estudo com ratos, evidenciando a importância dos receptores M3 na resposta comportamental associada ao MCC.

Nossos resultados demonstraram que a diminuição do estoque de ACh ou antagonismo de receptores M1 e M3 são capazes de reduzir a expressão das respostas autonômicas e comportamentais em animais condicionados, de forma dissociada no HD. Como já mencionado, dados prévios do nosso grupo, mostraram que o bloqueio sináptico reversível do HD com o CoCl_2 , antes da reexposição contextual, promoveu

uma diminuição das respostas cardiovasculares no MCC, sem alterar o tempo de congelamento (Resstel, Joca et al. 2008). Isso sugere que o HD pode desempenhar um papel preferencial na regulação da resposta cardiovascular observada nesse modelo, sendo geradas em conjunto com outras estruturas encefálicas.

O HD apresenta projeções, por exemplo, para áreas bulbares importantes para a regulação da atividade autonômica, incluindo núcleo dorsal do vago (Gray e Magnuson 1987), a medula ventrolateral caudal (Giancola, Roder et al. 1993) e o núcleo do trato solitário (Holstege, Meiners et al. 1985; Gray e Magnuson 1987). Assim, os efeitos observados após o antagonismo de receptores M1 e M3 poderiam envolver essas projeções, que podem influenciar a atividade autonômica através de núcleos bulbares, compondo uma via que exerce importante papel na expressão das respostas autonômicas geradas pelo MCC.

Todavia, é importante destacar que no trabalho de Resstel e colaboradores (Resstel et al., 2008), todos os neurotransmissores presentes no HD foram inibidos, enquanto que neste trabalho foram feitas inibições seletivas de receptores muscarínicos ou redução de ACh. Da mesma maneira, dados recentes de nosso grupo, demonstraram que uma via receptores NMDA/óxido nítrico presente no HD é responsável pela expressão da REC, uma vez que tanto a inibição de receptores NMDA ou de óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), eram capazes de reduzir tanto o congelamento quanto as respostas autonômicas associados ao MCC (Fabri et al, 2012). Juntos, esses resultados sugerem que o HD, de uma forma geral, modula a REC, de tal maneira que sua inativação completa afeta de forma direta apenas as respostas autonômicas e que possivelmente existam sistemas modulando a resposta comportamental de forma diferente. Assim, quando todos esses sistemas são inibidos ao mesmo tempo, a resposta não se altera, porém, quando inibidos separadamente, como é o caso da utilização do

hemicolínio ou o antagonismo de receptores M3, ou o antagonismo de receptores NMDA, bem como a inibição da nNOS, podem interferir com a resposta comportamental. Dessa forma, juntos esses resultados sugerem que o HD, de uma forma geral, modula a REC, de tal forma que sua inibição completa afeta de forma direta apenas as respostas cardiovasculares e que possivelmente existam outros sistemas modulando a resposta comportamental de forma diferente.

Outra neurotransmissão presente no HD e envolvida com o MCC é a glutamatérgica (Bast et al., 2003, Gravius et al., 2006). Foi relatado, que receptores NMDA no HD estão envolvidos com a aquisição do MCC (Fanselow e Kim, 1994). Além disso, dados do nosso laboratório mostraram que o sistema glutamatérgico presente nessa área, através da ativação de receptores NMDA e conseqüente síntese de óxido nítrico (NO), modulam a expressão do MCC, reduzindo a REC em ratos (Fabri et al., 2012). Corroborando com esses achados, foi demonstrado que camundongos *knock out* para receptores NMDA na região CA1 do HD apresentam redução da REC ao contexto (Rampon and Tsien, 2000). Dessa forma, apesar do bloqueio não seletivo da neurotransmissão do HD reduzir apenas as respostas cardiovasculares associadas à REC (Resstel et al., 2008), o sistema glutamatérgico parece modular a expressão do MCC. Esses achados sugerem que neurotransmissores no HD podem estar modulando de forma diferenciada a REC, ou de maneira semelhante, como o sistema colinérgico e glutamatérgico no HD, sendo essa interação pouco explorada.

A interação entre esses dois sistemas tem sido pouco investigada no MCC. Figueredo e colaboradores (Figueredo et al., 2008) investigaram essa interação na esQUIVA inibitória em ratos utilizando antagonista de receptores muscarínicos do tipo M1 e de receptores NMDA, diciclomina e MK-801 respectivamente. Quando co-administrados em doses sub-efetivas, esses antagonistas foram capazes de interromper o

desempenho de esquiva inibitória, sugerindo que receptores NMDA e muscarínicos M1 interagem na modulação dos processos de aprendizagem. Csernansky e colaboradores (Csernansky et al., 2005) relataram que a administração intraperitoneal de inibidores da acetilcolinesterase, donezepil ou fisostigmina, antes da re-exposição ao contexto aversivo, reverte a redução de expressão do MCC provocada pela administração sistêmica de um antagonista NMDA, o MK-801, sugerindo que o aumento da ACh pode aumentar os níveis de glutamato no sistema nervoso central, em particular no HD, revertendo o antagonismo dos receptores NMDA.

Adicionalmente, receptores muscarínicos M1 são responsáveis por aumentar a ativação de receptores NMDA em células piramidais hipocâmpais da região CA1, modulando a liberação de glutamato nesta região (Marino et al., 1998). Assim, se essa interação ocorre no HD, o sistema colinérgico local pode estar envolvido com a expressão do MCC, onde a ACh atuaria em receptores do tipo M1 e M3, aumentando os níveis de NO, este por sua vez promoveria um aumento nos níveis de glutamato que culminaria em um aumento das respostas autonômicas e comportamentais observadas no MCC.

Foi demonstrado que a estimulação elétrica ou química do hipocampo em ratos promove respostas cardiovasculares, mediadas por ativação simpática (Ruit and Neafsey, 1988). Em relação ao papel nas respostas cardiovasculares foi demonstrado que o HD está interligado, pelo núcleo leito da estria terminal, ao hipotálamo e áreas do tronco cerebral envolvidas na regulação de respostas autonômicas durante situações defensivas (Herman et al., 1994, Herman and Cullinan, 1997, Dong et al., 2001). Sabe-se que o núcleo leito da estria terminal tem projeção para áreas bulbares importantes na regulação da atividade autonômica, incluindo núcleo dorsal do vago, a medula ventrolateral caudal e o núcleo do trato solitário (Holstege et al., 1985, Gray and

Magnuson, 1987, Giancola et al., 1993, Pacak et al., 1995, Davis et al., 1997). Além disso, a ablação do córtex pré-frontal medial diminui as respostas cardiovasculares associadas com a estimulação do hipocampo (Ruit e Neafsey 1998), projetando-se diretamente a alguns núcleos bulbares que estão relacionados com a modulação do sistema nervoso autônomo (Fisk and Wyss, 2000, Vertes, 2004). Dados do nosso laboratório demonstraram o envolvimento de receptores muscarínicos presentes no CPFm, M1 e M3, na modulação da REC no MCC (Fedoce, 2012). Com isso, é possível que o CPFm atue como uma estrutura chave pela qual o hipocampo dorsal influencie as respostas cardiovasculares durante o medo condicionado (Resstel, Joca et al. 2008), principalmente pela modulação de receptores muscarínicos.

A análise qualitativa da imunofluorescência com dupla marcação mostrou que receptores M1 e M3 parecem estar distribuídos nos mesmos compartimentos celulares nas camadas do HD analisadas. Entretanto, está bem descrito na literatura que esses receptores estão presentes em células gliais do giro denteado e corpos de neurônios, como células piramidais hipocâmpais na região CA1, localizados principalmente na membrana pós-sináptica (Levey et al., 1995; Rouse and Levey, 1997; Rouse et al., 1998).

Não há dados na literatura de análises quantitativas para verificação da proporção destes receptores no HD de ratos wistar, submetidos ou não ao MCC. Há poucos estudos com esse direcionamento, como o de Tayebati e colaboradores (2002), que demonstraram maior quantidade de receptores muscarínicos M1 em relação aos M3 em todas as camadas do HD de ratos Fisher jovens (Tayebati et al., 2002). Com isso, teríamos uma confirmação mais fidedigna sobre a atuação das baixas doses de pirenzepina, e principalmente de *J104129 fumarate* nas respostas autonômicas, reforçando o papel de receptores M1 em tal modulação. Entretanto, com base nos

resultados de quantificação, podemos sugerir que apenas receptores M3 aumentam no hipocampo de ratos condicionados, e que receptores M1 não se alteram em nenhuma condição. Também suponhamos, que o estresse por novidade não altera a densidade destes receptores no hipocampo em animais *naive* e não condicionados.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

Em conclusão, os presentes resultados confirmam que o HD é um relé importante nas vias neurais envolvidas na mediação das respostas comportamentais e autonômicas causadas pelo MCC. Especificamente, os resultados sugerem o envolvimento da neurotransmissão colinérgica via receptores muscarínicos do tipo M1 e M3 no controle da regulação do aumento da PAM e FC, e da queda da TC observadas durante a reexposição ao contexto aversivo, sendo que, somente receptores do tipo M3 estão envolvidos com a modulação comportamental associada a REC. Também podemos sugerir que a densidade destes receptores não se altera no estresse por novidade, mas a expressão de M3 aumenta em animais submetidos ao MCC.

Esse estudo farmacológico se torna válido, visto que não há trabalhos que mostram a participação destes receptores, principalmente na distinção de vias M1 e M3 na modulação de respostas autonômicas e comportamentais associadas ao MCC, e nem sua quantificação em situações aversivas.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

9 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* 16:3089-3096.
- Akert K, Andy OJ (1953) Experimental studies on the Ammon's formation in cats and monkeys. *Trans Am Neurol Assoc* 3:194-195; discussion, 195-197.
- Aloisi AM, Casamenti F, Scali C, Pepeu G, Carli G (1997) Effects of novelty, pain and stress on hippocampal extracellular acetylcholine levels in male rats. *Brain Res* 748:219-226.
- Anagnostaras SG, Maren S, Fanselow MS (1995) Scopolamine selectively disrupts the acquisition of contextual fear conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem* 64:191-194.
- Anagnostaras SG, Maren S, Sage JR, Goodrich S, Fanselow MS (1999) Scopolamine and Pavlovian fear conditioning in rats: dose-effect analysis. *Neuropsychopharmacology* 21:731-744.
- Anand BK, Dua S (1956) Circulatory and respiratory changes induced by electrical stimulation of limbic system (visceral brain). *J Neurophysiol* 19:393-400.
- Andy OJ, Akert K (1955) Seizure patterns induced by electrical stimulation of hippocampal formation in the cat. *J Neuropathol Exp Neurol* 14:198-213.
- Anini Y, Hansotia T, Brubaker PL (2002) Muscarinic receptors control postprandial release of glucagon-like peptide-1: in vivo and in vitro studies in rats. *Endocrinology* 143(6):2420-6.
- Antoniadis EA, McDonald RJ (1999) Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. *Behav Brain Res* 101:1-13.
- 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.
- Bannerman DM, Lemaire M, Yee BK, Iversen SD, Oswald CJ, Good MA, Rawlins JN (2002) Selective cytotoxic lesions of the retrohippocampal region produce a mild deficit in social recognition memory. *Exp Brain Res* 142:395-401.
- Barkus C, McHugh SB, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JN, Bannerman DM (2010) Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. *Eur J Pharmacol* 626:49-56.
- Bast T, Zhang WN, Feldon J (2003) Dorsal hippocampus and classical fear conditioning to tone and context in rats: effects of local NMDA-receptor blockade and stimulation. *Hippocampus* 13:657-675.
- Beck CH, Fibiger HC (1995) Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. *J Neurosci* 15:709-720.
- Blessing WW (2003) Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. *Cell Mol Neurobiol* 23:527-538.
- Bruneau EG, Akaaboune M (2006) Running to stand still: ionotropic receptor dynamics at central and peripheral synapses. *Mol Neurobiol* 34:137-151.
- Buckley NJ, Bonner TI, Brann MR (1988) Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. *J Neurosci* 8:4646-4652.

- Cassiman D, Libbrecht L, Sinelli N, Desmet V, Deneff C, Roskams T (2002) The vagal nerve stimulates activation of the hepatic progenitor cell compartment via muscarinic acetylcholine receptor type 3. *Am J Pathol* 161(2):521-30.
- Carrive P (2000) Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. *Brain Res* 858:440-445.
- Csernansky JG, Martin M, Shah R, Bertchume A, Colvin J, Dong H (2005) Cholinesterase inhibitors ameliorate behavioral deficits induced by MK-801 in mice. *Neuropsychopharmacology* 30:2135-2143.
- Davis M, Walker DL, Lee Y (1997) Roles of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. Possible relevance to PTSD. *Ann N Y Acad Sci* 821:305-331.
- Deacon RM, Bannerman DM, Rawlins JN (2002) Anxiolytic effects of cytotoxic hippocampal lesions in rats. *Behav Neurosci* 116:494-497.
- Degroot A, Treit D (2002) Dorsal and ventral hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. *Brain Res* 949:60-70.
- Dong HW, Petrovich GD, Watts AG, Swanson LW (2001) Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. *J Comp Neurol* 436:430-455.
- Doods HN, Mathy MJ, Davidesko D, van Charldorp KJ, de Jonge A, van Zwieten PA (1987) Selectivity of muscarinic antagonists in radioligand and in vivo experiments for the putative M1, M2 and M3 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 242:257-262.
- Fabri, DRS (2012) Envolvimento dos sistemas glutamatérgico, nitrérgico e da via GMPC no hipocampo dorsal na expressão da resposta emocional condicionada em ratos submetidos ao modelo do medo condicionado contextual. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.
- 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.
- Fanselow MS, Kim JJ (1994) Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. *Behav Neurosci* 108:210-212.
- Fedoce, AG (2012) O sistema colinérgico presente no córtex pré-frontal medial modula a expressão do medo condicionado ao contexto via receptores muscarínicos M3. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.
- Fendt M, Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23:743-760.
- Figueredo LZ, Moreira KM, Ferreira TL, Fornari RV, Oliveira MG (2008) Interaction between glutamatergic-NMDA and cholinergic-muscarinic systems in classical fear conditioning. *Brain Res Bull* 77:71-76.
- Fisk GD, Wyss JM (2000) Descending projections of infralimbic cortex that mediate stimulation-evoked changes in arterial pressure. *Brain Res* 859:83-95.
- 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(2):202-10.

- Fornari RV, Moreira KM, Oliveira MG (2000) Effects of the selective M1 muscarinic receptor antagonist dicyclomine on emotional memory. *Learn Mem* 7:287-292.
- Gale GD, Anagnostaras SG, Fanselow MS (2001) Cholinergic modulation of pavlovian fear conditioning: effects of intrahippocampal scopolamine infusion. *Hippocampus* 11:371-376.
- Garcia JN, Pedersen NP, Nalivaiko E, Blessing WW (2001) Tail artery blood flow measured by chronically implanted Doppler ultrasonic probes in unrestrained conscious rats. *J Neurosci Methods* 104:209-213.
- Giancola SB, Roder S, Ciriello J (1993) Contribution of caudal ventrolateral medulla to the cardiovascular responses elicited by activation of bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 606:162-166.
- Giovannini MG, Rakovska A, Benton RS, Pazzagli M, Bianchi L, Pepeu G (2001) Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA, and glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. *Neuroscience* 106:43-53.
- Godsil BP, Quinn JJ, Fanselow MS (2000) Body temperature as a conditional response measure for pavlovian fear conditioning. *Learn Mem* 7:353-356.
- González I, Arévalo-Serrano J, Sanz-Anquela JM, Gonzalo-Ruiz A (2007) Effects of beta-amyloid protein on M1 and M2 subtypes of muscarinic acetylcholine receptors in the medial septum-diagonal band complex of the rat: relationship with cholinergic, GABAergic, and calcium-binding protein perikarya. *Acta Neuropathol.* 113 (6):637-51.
- Gravius A, Barberi C, Schafer D, Schmidt WJ, Danysz W (2006) The role of group I metabotropic glutamate receptors in acquisition and expression of contextual and auditory fear conditioning in rats - a comparison. *Neuropharmacology* 51:1146-1155.
- Gray JA (1987) [The neuropsychology of the emotions and personality structure]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 37:1011-1024.
- Gray TS, Magnuson DJ (1987) Neuropeptide neuronal efferents from the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus to the dorsal vagal complex in the rat. *J Comp Neurol* 262:365-374.
- H. Blake Carlson EG, C. W. Darrow (1941) Representation of the sympathetic and parasympathetic nervous systems in the forebrain of the cat. *Arch Neuropsych* 45:105-106.
- Herman JP, Cullinan WE (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20:78-84.
- Herman JP, Cullinan WE, Watson SJ (1994) Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. *J Neuroendocrinol* 6:433-442.
- Holstege G, Meiners L, Tan K (1985) Projections of the bed nucleus of the stria terminalis to the mesencephalon, pons, and medulla oblongata in the cat. *Exp Brain Res* 58:379-391.
- Hori H, Haruta K, Nanki M, Sakamoto N, Uemura K, Matsubara T, Itoh K, Iguchi A (1995). Pressor response induced by the hippocampal administration of neostigmine is suppressed by M1 muscarinic antagonist. *Life Sci* 57(20):1853-9.
- Kaada BR (1951) Somato-motor, autonomic and electrocorticographic responses to electrical stimulation of rhinencephalic and other structures in primates, cat, and dog; a study of responses from the limbic, subcallosal, orbito-insular, piriform

- and temporal cortex, hippocampus-fornix and amygdala. *Acta Physiol Scand Suppl* 24:1-262.
- Kaada BR, Jasper H (1952) Respiratory responses to stimulation of temporal pole, insula, and hippocampal and limbic gyri in man. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 68:609-619.
- Kenny PJ, Cheeta S, File SE (2000) Anxiogenic effects of nicotine in the dorsal hippocampus are mediated by 5-HT_{1A} and not by muscarinic M₁ receptors. *Neuropharmacology* 39:300-307.
- Kim JJ, Fanselow MS (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256:675-677.
- Kim JJ, Rison RA, Fanselow MS (1993) Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behav Neurosci* 107:1093-1098.
- Kurzen H, Berger H, Jäger C, Hartschuh W, Näher H, Gratchev A, Goerdts S, Deichmann M (2004) Phenotypical and molecular profiling of the extraneuronal cholinergic system of the skin. *J Invest Dermatol* 123(5):937-49.
- Lee SW, Woo CW, Kim JG (1994) Selectivity of oxomemazine for the M₁ muscarinic receptors. *Arch Pharm Res* 17:443-451.
- Levey AI, Edmunds SM, Koliatsos V, Wiley RG, Heilman CJ (1995) Expression of m₁-m₄ muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J Neurosci* 15:4077-4092.
- Liberson WT, Akert K (1955) Hippocampal seizure states in guinea pig. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 7:211-222.
- Lisboa SF, Reis DG, da Silva AL, Correa FM, Guimaraes FS, Resstel LB (2010) Cannabinoid CB₁ receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:1163-1173.
- Maclean PD, Delgado JM (1953) Electrical and chemical stimulation of frontotemporal portion of limbic system in the waking animal. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 5:91-100.
- Marino MJ, Rouse ST, Levey AI, Potter LT, Conn PJ (1998) Activation of the genetically defined m₁ muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11465-11470.
- Matus-Amat P, Higgins EA, Barrientos RM, Rudy JW (2004) The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. *J Neurosci* 24:2431-2439.
- Meibach RC, Siegel A (1977) Efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Brain Res* 124:197-224.
- Menard J, Treit D (1999) Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 23:591-613.
- Menard J, Treit D (2001) The anxiolytic effects of intra-hippocampal midazolam are antagonized by intra-septal L-glutamate. *Brain Res* 888:163-166.
- Mitsuya M, Kawakami K, Ogino Y, Miura K, Mase T (1999a) Stereoselective synthesis of a new muscarinic M₃ receptor antagonist, J-104129. *Bioorg Med Chem Lett* 9:2037-2038.
- Mitsuya M, Mase T, Tsuchiya Y, Kawakami K, Hattori H, Kobayashi K, Ogino Y, Fujikawa T, Satoh A, Kimura T, Noguchi K, Ohtake N, Tomimoto K (1999b) J-104129, a novel muscarinic M₃ receptor antagonist with high selectivity for M₃ over M₂ receptors. *Bioorg Med Chem* 7:2555-2567.

- O'Mara SM, Commins S, Anderson M, Gigg J (2001) The subiculum: a review of form, physiology and function. *Prog Neurobiol* 64:129-155.
- Pacak K, Palkovits M, Kopin IJ, Goldstein DS (1995) Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdialysis studies. *Front Neuroendocrinol* 16:89-150.
- Pang MH, Kim NS, Kim IH, Kim H, Kim HT, Choi JS (2010) Cholinergic transmission in the dorsal hippocampus modulates trace but not delay fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 94:206-213.
- Papez JW (1995) A proposed mechanism of emotion. 1937. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 7:103-112.
- Paxinos & Watson (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*.
- Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274-285.
- Poulin B, Butcher A, McWilliams P, Bourgognon JM, Pawlak R, Kong KC, Bottrill A, Mistry S, Wess J, Rosethorne EM, Charlton SJ, Tobin AB (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.
- Raisman G, Cowan WM, Powell TP (1966) An experimental analysis of the efferent projection of the hippocampus. *Brain* 89:83-108.
- Rampon C, Tsien JZ (2000) Genetic analysis of learning behavior-induced structural plasticity. *Hippocampus* 10:605-609.
- Resstel LB, Joca SR, Correa FM, Guimaraes FS (2008) Effects of reversible inactivation of the dorsal hippocampus on the behavioral and cardiovascular responses to an aversive conditioned context. *Behav Pharmacol* 19:137-144.
- Resstel LB, Joca SR, Guimaraes FG, Correa FM (2006) Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience* 143:377-385.
- Rouse ST, Gilmore 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, Levey AI (1997) Muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity after hippocampal commissural/associational pathway lesions: evidence for multiple presynaptic receptor subtypes. *J Comp Neurol* 380:382-394.
- Ruit KG, Neafsey EJ (1988) Cardiovascular and respiratory responses to electrical and chemical stimulation of the hippocampus in anesthetized and awake rats. *Brain Res* 457:310-321.
- Sanders MJ, Wiltgen BJ, Fanselow MS (2003) The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur J Pharmacol* 463:217-223.
- Siegel A, Flynn JP (1968) Differential effects of electrical stimulation and lesions of the hippocampus and adjacent regions upon attack behavior in cats. *Brain Res* 7:252-267.
- Smith MA, Banerjee S, Gold PW, Glowa J (1992) Induction of c-fos mRNA in rat brain by conditioned and unconditioned stressors. *Brain Res* 578:135-141.
- Smythe JW, Murphy D, Bhatnagar S, Timothy C, Costall B (1996) Muscarinic antagonists are anxiogenic in rats tested in the black-white box. *Pharmacol Biochem Behav* 54:57-63.

- Soares JC, Fornari RV, Oliveira MG (2006) Role of muscarinic M1 receptors in inhibitory avoidance and contextual fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 86:188-196.
- Tajima T, Endo H, Suzuki Y, Ikari H, Gotoh M, Iguchi A (1996) Immobilization stress-induced increase of hippocampal acetylcholine and of plasma epinephrine, norepinephrine and glucose in rats. *Brain Res* 720:155-158.
- Tayebati SK, Amenta F, El-Assouad D, Zaccheo D (2002) Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the hippocampus of aged rats. *Mech Ageing Dev* 123(5):521-8.
- Tayebati SK, Di Tullio MA, Amenta F (2004) Age-related changes of muscarinic cholinergic receptor subtypes in the striatum of Fisher 344 rats. *Exp Gerontol* 39(2):217-23.
- Thiel CM, Huston JP, Schwarting RK (1998) Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience* 85:1253-1262.
- Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32-58.
- Vianna DM, Allen C, Carrive P (2008) Cardiovascular and behavioral responses to conditioned fear after medullary raphe neuronal blockade. *Neuroscience* 153:1344-1353.
- Vianna DM, Carrive P (2005) Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *Eur J Neurosci* 21:2505-2512.
- Young SL, Bohenek DL, Fanselow MS (1995) Scopolamine impairs acquisition and facilitates consolidation of fear conditioning: differential effects for tone vs context conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 63:174-180.
- Zarrindast MR, Nasehi M, Piri M, Heidari N (2011) Effects of cholinergic system of dorsal hippocampus of rats on MK-801 induced anxiolytic-like behavior. *Neurosci Lett* 505:65-70.