

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA**

FERNANDO MIDEA CUCCOVIA VASCONCELOS REIS

**Mediação do medo condicionado contextual por glicocorticóides e
mecanismos glutamatérgicos no córtex pré-frontal medial**

RIBEIRÃO PRETO

- 2015 -

FERNANDO MIDEA CUCCOVIA VASCONCELOS REIS

Mediação do medo condicionado contextual por glicocorticóides e mecanismos glutamatérgicos no córtex pré-frontal medial

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão

RIBEIRÃO PRETO

- 2015 -

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Reis, Fernando Midea Cuccovia Vasconcelos
Mediação do medo condicionado contextual por glicocorticóides e mecanismos glutamatérgicos no córtex pré-frontal medial.
Ribeirão Preto, 2015. 116p. :il.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.
Orientador: Brandão, Marcus Lira.

1. Medo condicionado contextual. 2. Córtex pré-frontal medial. 3. Corticosterona. 4. Receptor mineralocorticóide. 5. Receptor glicocorticóide. 6. NMDA.

Nome: REIS, Fernando Midea Cuccovia Vasconcelos

Título: Mediação do medo condicionado contextual por glicocorticóides e mecanismos glutamatérgicos no córtex pré-frontal medial.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Dedico à minha família, pela confiança e apoio irrestrito.

Agradecimentos

Ao Professor Marcus Lira Brandão, minha gratidão pela orientação e pelas condições que me deu para o desenvolvimento do meu doutorado.

Ao Dr. Rafael Carvalho Almada, pela amizade e dedicação nos experimentos imunohistoquímicos dessa tese.

À Manoela Viar Fogaça, minha gratidão pelo apoio durante o desenvolvimento desse doutoramento e enorme contribuição na concepção e execução dos experimentos realizados.

À Professora Janete A. A. Franci, pela generosidade, disponibilidade e entusiasmo em compartilhar comigo seus conhecimentos de neuroendocrinologia.

Ao Professor Norberto Cysne Coimbra e Daoud Hibráhim Elias Filho, pela generosidade e colaboração no estudo neuromorfológico realizado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de pesquisa e apoio financeiro concedidos nesse estudo (nº processo: 2011/18001-8).

À CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de pesquisa concedidas nos estágios iniciais desse estudo.

Aos amigos desse Laboratório de Neuropsicofarmacologia.

“A grandiosa narrativa da ciência deve ser celebrada como um dos grandes feitos do intelecto humano, um testemunho da nossa habilidade coletiva de criar conhecimento. [...] Se a razão é a ferramenta que usamos na ciência, não é a sua motivação. Nosso objetivo não é apenas entender o mundo coletando dados, criando modelos. Nossa busca nos define: a paixão e o drama, os desafios, a sensação tão especial do momento da descoberta, o desespero do fracasso, a urgência que temos de prosseguir, a sensação sedutora de que sabemos tão pouco, que grandes revelações nos esperam [...]”.

(Marcelo Gleiser)

RESUMO

REIS, F.M.C.V. Mediação do medo condicionado contextual por glicocorticóides e mecanismos glutamatérgicos no córtex pré-frontal medial. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Alterações no sistema glutamatérgico e mudanças no funcionamento do córtex pré-frontal medial (CPFm) têm sido associadas a diversos distúrbios psiquiátricos, dentre os quais a ansiedade. Também é reconhecido que alterações nas concentrações circulantes de glicocorticóides podem induzir alterações nas sinapses e circuitos glutamatérgicos e, conseqüentemente, modificar a reatividade emocional dos animais. Embora se saiba que os glicocorticóides influenciam a liberação de glutamato no CPFm, a interação entre os efeitos mediados pelos receptores mineralocorticóides (MR) ou glicocorticóides (GR) e o sistema glutamatérgico, na expressão da resposta condicionada de medo, ainda não está elucidada. Nesse sentido, os objetivos do presente estudo foram investigar (i) a influência dos glicocorticóides na expressão do medo condicionado contextual e seus efeitos sobre a atividade do CPFm em ratos, (ii) o papel dos receptores MR e GR localizados no córtex pré-hipocámpico (PrL) na expressão da resposta condicionada de congelamento e (iii) a interação entre os mecanismos mediados pelos glicocorticóides e o sistema glutamatérgico, via receptores do tipo NMDA, na expressão dessa resposta. Ratos Wistar machos foram tratados com veículo ou metirapona, um bloqueador de síntese de corticosterona, e expostos a um contexto previamente pareado com choque nas patas. Foram avaliados o tempo de medo contextual (comportamento de congelamento) e a expressão de proteína Fos em diferentes regiões do CPFm. Os resultados mostraram que a exposição ao contexto aversivo levou a um aumento significativo da expressão de congelamento e de proteína Fos no PrL, nas áreas do córtex cingulado anterior 1 e 2 (Cg1 e Cg2), mas não no córtex infralímbico. A administração de metirapona levou a uma diminuição da expressão de congelamento e de proteína Fos no PrL, Cg1 e Cg2. A administração bilateral de espirolactona, um antagonista de receptores MR, no PrL antes do teste diminuiu as respostas de medo e o pré-tratamento com RU38486, um antagonista de receptores GR, aboliu este efeito. Os resultados também mostraram que a diminuição da resposta de congelamento induzida por injeções intra-PrL de corticosterona foi abolida pela administração prévia de RU38486, mas não por espirolactona, indicando que a corticosterona recruta preferencialmente os receptores GR para produzir esses efeitos. A

administração prévia do antagonista de receptor NMDA também preveniu os efeitos induzidos pelo tratamento com corticosterona sugerindo que, no PrL, parte dos efeitos rápidos do glicocorticóides sobre a expressão do medo condicionado se dá por uma interação com o sistema glutamatérgico. A administração de NMDA no PrL, antes do teste, induziu efeitos similares ao tratamento com corticosterona nessa região. De modo geral, os resultados sugerem que a liberação de corticosterona durante a apresentação de um estímulo condicionado aversivo influencia a atividade do CPFm de maneira que, uma mudança no equilíbrio das atividades mediadas por MR e GR, por meio de um aumento da atividade de GR, interage com o sistema glutamatérgico via aumento da atividade dos receptores NMDA influenciando a expressão da resposta de medo condicionado contextual.

Palavras-chave: medo condicionado contextual; córtex pré-frontal medial; corticosterona; receptor mineralocorticóide; receptor glicocorticóide; NMDA.

ABSTRACT

REIS, F.M.C.V. Mediation of contextual conditioned fear by glucocorticoids and glutamatergic mechanisms in the medial prefrontal cortex. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Changes in the glutamatergic system and in the functioning of the medial prefrontal cortex (mPFC) have been associated with different psychiatric disorders, including anxiety. It is also recognized that changes in circulating levels of glucocorticoids can induce changes in glutamatergic synapses and circuits and therefore alter the emotional reactivity of animals. Although it is known that glucocorticoids can influence the release of glutamate in the mPFC, the interaction between mineralocorticoid receptors (MR) and glucocorticoid receptors (GR) activation and the glutamatergic activity on the expression of conditioned fear response is not yet elucidated. The aims of the present study were to investigate (i) the influence of glucocorticoids on the expression of contextual conditioned fear and its effects in the activity of the mPFC in rats, (ii) the role of MR and GR in the prelimbic cortex (PrL) on expression of conditioned freezing response and (iii) a possible interaction between the effects mediated by the glucocorticoids and the glutamatergic system, via NMDA receptors on the expression of this response. Male Wistar rats were treated with vehicle or metyrapone, a corticosterone synthesis blocker, and exposed to a context previously paired with footshock. The time of contextual fear (freezing behavior) and Fos protein expression in different regions of mPFC were evaluated. The results showed that exposure to the aversive context induced a significant increase in freezing and Fos protein expression in the PrL, in the anterior cingulate cortex, areas 1 and 2 (Cg1 and Cg2), but not in the infralimbic cortex. The administration of metyrapone induced a decrease on the expression of freezing and Fos in PrL, Cg1 and Cg2. Bilateral administration of spironolactone (a MR antagonist) in PrL before the test, decreased conditioned fear response and the pretreatment with RU38486 (a GR antagonist) abolished this effect. The results also showed that the decrease of freezing response induced by intra-PrL corticosterone injections was abolished by prior administration of RU38486, but not by spironolactone, indicating that corticosterone recruits preferentially GR to produce the observed effects. Prior administration of the NMDA receptor antagonist also prevented the effects induced by corticosterone treatment in the PrL, suggesting that part of rapid effects of glucocorticoids on the expression of conditioned fear occurs by an

interaction with the glutamatergic system. Additionally, NMDA administration in the PrL prior to the test induced similar effects to corticosterone treatment in this region. Overall, the results suggest that the release of corticosterone during the presentation of a conditioned aversive stimulus influences the mPFC activity so that a change in the balance of the activities mediated by MR and GR through an increase in GR activity interacts with the glutamatergic system by increasing the activity of NMDA receptors influencing the expression of contextual fear conditioning response.

Keywords: contextual conditioned fear; medial prefrontal cortex; corticosterone; mineralocorticoid receptor; glucocorticoid receptor; NMDA.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
Resposta de estresse	18
Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA)	19
Receptores corticosteróides	20
Efeitos rápidos dos glicocorticóides no sistema nervoso central	21
Córtex pré-frontal medial	23
Sistema glutamatérgico	26
OBJETIVOS	29
MATERIAIS E MÉTODOS	31
Animais.....	32
Drogas	32
Procedimentos experimentais	33
Cirurgia estereotáxica	33
Procedimentos de microinjeção	33
Condicionamento aversivo	34
Experimento 1 - Efeitos do tratamento com o inibidor da síntese de corticosterona na expressão do medo condicionado e na expressão de proteína Fos no CPFm	35
Imunohistoquímica	36
Quantificação células Fos-positivas	37
Experimento 2 - Efeitos da administração de espironolactona e RU38486 no PrL sobre a expressão da resposta de medo condicionado	37
Experimento 3 - Efeitos da administração combinada de antagonistas MR e GR no PrL na expressão da resposta de medo condicionado	38
Experimento 4 - Efeitos da administração de corticosterona no PrL na expressão da resposta de medo condicionado	38
Experimento 5 - Efeitos da administração dos antagonistas MR e GR combinados com corticosterona no PrL na expressão da resposta de medo condicionado	38
Experimento 6 - Efeitos da espironolactona e corticosterona no PrL sobre o comportamento de congelamento em ratos submetidos a um contexto diferente	39
Experimento 7 - Efeitos da administração de AP7 no PrL na expressão da resposta de medo condicionado	39

Experimento 8 - Efeitos da administração do antagonista de receptor NMDA combinado com corticosterona no PrL na expressão da resposta de medo condicionado	39
Experimento 9 - Efeitos da administração de NMDA no PrL na expressão da resposta de medo condicionado	40
Experimento 10 - Efeitos do NMDA no PrL no tempo do comportamento de congelamento em ratos submetidos a um contexto diferente	40
Experimento 11 - Efeitos da administração de NMDA e corticosterona no PrL no comportamento exploratório no campo aberto	40
Experimento 12 - Efeitos da administração de NMDA combinado com corticosterona no PrL na expressão da resposta de medo condicionado	41
Histologia	41
Análise estatística	42
RESULTADOS	43
Experimento 1 - Efeitos do tratamento com o inibidor da síntese de corticosterona na expressão do medo condicionado e na expressão de proteína Fos no CPFm	44
Experimento 2 - Efeitos da administração de espirolactona e RU38486 no PrL sobre a expressão da resposta de medo condicionado	48
Experimento 3 - Efeitos da administração combinada de antagonistas MR e GR no PrL na expressão da resposta de medo condicionado	50
Experimento 4 - Efeitos da administração de corticosterona no PrL na expressão da resposta de medo condicionado	52
Experimento 5 - Efeitos da administração dos antagonistas MR e GR combinados com corticosterona no PrL na expressão da resposta de medo condicionado	53
Experimento 6 - Efeitos da espirolactona e corticosterona no PrL sobre o comportamento de congelamento em ratos submetidos a um contexto diferente	55
Experimento 7 - Efeitos da administração de AP7 no PrL na expressão da resposta de medo condicionado	56
Experimento 8 - Efeitos da administração do antagonista de receptor NMDA combinado com corticosterona no PrL na expressão da resposta de medo condicionado	57
Experimento 9 - Efeitos da administração de NMDA no PrL na expressão da resposta de medo condicionado	59
Experimento 10 - Efeitos do NMDA no PrL no tempo do comportamento de congelamento em ratos submetidos a um contexto diferente	60

Experimento 11 - Efeitos da administração de NMDA e corticosterona no PrL no comportamento exploratório no campo aberto	60
Experimento 12 - Efeitos da administração de NMDA combinado com corticosterona no PrL na expressão da resposta de medo condicionado	62
DISCUSSÃO	64
CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
APÊNDICES	95
Apêndice A - Estudo neuromorfológico de aferências corticais, provenientes do PrL, à porção ventro-lateral da substância cinzenta periaquedutal (vlPAG): localização de fibras corticais, neurônios GABAérgicos e neurônios parvalbumina-positivos na vlPAG, por meio de imunofluorescência.....	96
Apêndice B - Artigo: Rapid Activation of Glucocorticoid Receptors in the Prefrontal Cortex Mediates the Expression of Contextual Conditioned Fear in Rats.....	105

INTRODUÇÃO

Introdução

O estudo das emoções ocupa uma grande área de pesquisa nas neurociências. O debate, a discussão e a produção científica referente a esse tópico data dos primórdios da biologia moderna e da psicologia (DARWIN, 1872; CANNON, 1927; DAMASIO, 1994; LEDOUX, 1996; DAMASIO, 1999; LEDOUX, 2002; RUSSELL, 2003; SAPOLSKY, 2004; OCHSNER; GROSS, 2005; PANKSEPP, 2007) de modo que, com o avanço das pesquisas nesse campo, nos dias de hoje, compreendemos melhor o que é emoção e como ela difere de outros aspectos da mente e do comportamento. Segundo LeDoux (2012), um ponto comum aceito por muitos pesquisadores é que enquanto possam existir características singulares das emoções humanas, ao menos alguns de seus aspectos refletem nosso passado ancestral. Essa conclusão é a base da abordagem neurobiológica das emoções uma vez que as pesquisas com modelos animais são fundamentais para identificar os seus circuitos e mecanismos neurais específicos.

Sob essa perspectiva, o foco do estudo da neurobiologia das emoções está nos circuitos, nas evidências concretas que fundamentam as funções que permitem que os organismos sobrevivam e prosperem, detectando e respondendo a desafios e oportunidades (LEDOUX, 2012). Esses circuitos de sobrevivência (incluem-se, ao menos, circuitos envolvidos nas respostas de defesa, manutenção da energia e alimentação, equilíbrio de fluidos e reprodução) e suas funções adaptativas são conservados em um grau significativo entre as espécies de mamíferos, incluindo os humanos. Nesse sentido, o que segue não é uma tentativa de explicar ou definir o conceito de emoção, mas sim oferecer uma estrutura para pensar sobre alguns fenômenos-chave a ela associados (LEDOUX, 2012).

Nesse contexto, o termo “medo” é utilizado para descrever o sentimento que surge quando experimentamos uma ameaça iminente à nossa sobrevivência. As “respostas de medo” referem-se à combinação de respostas comportamentais e fisiológicas eliciadas em animais por uma ameaça evidente ou um sinal de ameaça potencial (LEDOUX, 1998).

Respostas comportamentais relacionadas ao medo podem ser diferenciadas entre respostas de “medo inato”, que são ativadas por estímulos originalmente ameaçadores, e de “medo aprendido”, que são eliciadas por estímulos neutros que foram associados com estímulos ameaçadores inatos (GROSS; CANTERAS, 2012). Embora estas respostas tenham funções adaptativas no curto prazo, sua ativação exagerada ou crônica pode contribuir para o desenvolvimento de estados patológicos (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000; RODRIGUES; LEDOUX; SAPOLSKY, 2009). Por isso, acredita-se que compreendendo melhor os mecanismos envolvidos na expressão do medo seja possível compreender os mecanismos neurais subjacentes aos distúrbios de ansiedade. No laboratório, o modelo de condicionamento aversivo Pavloviano é um dos paradigmas mais utilizados para o estudo do medo (MAROUN, 2012).

No condicionamento aversivo Pavloviano, durante a fase de aquisição, um estímulo inicialmente neutro (ex. som ou contexto) é pareado a um estímulo aversivo incondicionado (ex. choque nas patas) e adquire as propriedades aversivas deste, sendo então denominado estímulo condicionado. Como resultado, na fase de expressão, o estímulo condicionado se torna capaz de evocar respostas condicionadas de medo. As respostas condicionadas podem ser objetivamente medidas avaliando a duração das respostas defensivas dos animais (congelamento) durante a apresentação do estímulo condicionado (FENDT, 1999).

O congelamento é uma resposta de defesa comum em roedores. Este comportamento consiste em uma imobilidade que os animais apresentam tendo por finalidade impedir de serem identificados por um possível predador. Esse é um comportamento complexo e coordenado. É uma resposta caracterizada por um alto nível de alerta, considerável tonicidade muscular e classicamente definido por uma ausência de todos os movimentos corporais, exceto os respiratórios (BOLLES, 1970). Sabe-se que a magnitude dessa resposta obedece geralmente uma relação monotônica com o estado de medo apresentado pelo indivíduo, de

modo que um estímulo aversivo mais intenso durante a fase de aquisição tende a gerar uma resposta condicionada de maior magnitude (BLANCHARD; BLANCHARD, 1969).

Resposta de estresse

A habilidade de um organismo manter o ambiente interno de seu corpo dentro de limites que o permitam sobreviver está relacionada às suas condições de equilíbrio metabólico dinâmico conhecido como homeostase (MCEWEN, 2009). Esse conceito também refere-se a processos autorregulatórios que fazem com que sistemas fundamentais retornem a um ponto de ajuste dentro de um intervalo estreito de operação, consistente com a sobrevivência do organismo (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005). A alteração desse equilíbrio pode ocorrer em decorrência de eventos “estressantes”, físicos ou psicológicos, que interfiram com a habilidade de um indivíduo se adaptar.

O “estresse” tem sido descrito como um conceito multidimensional constituído basicamente por três componentes: a entrada do estímulo, um processo avaliativo e a produção de uma resposta. Segundo Kollack-Walker, Day and Akil (2009), a entrada do estímulo aversivo, ou estressor, refere-se a um evento que desencadeia uma resposta não seletiva (endócrina, comportamental, autonômica) que atinge diversos tecidos e órgãos em resposta ou em antecipação a um desafio à homeostase. Geralmente, a relação entre a entrada de um estímulo e a produção de uma resposta exige a participação de um processo avaliativo de um dado evento tido como estressante. Além do processamento de informações específicas dos estímulos, como intensidade ou intermitência, esse processo avaliativo também inclui a comparação entre a situação presente e experiências prévias. Esse processo é fundamental na determinação da habilidade do organismo lidar com o estressor, por exemplo no grau de controlabilidade real ou percebida. Já a produção da resposta, ou a resposta de estresse, refere-se às adaptações corporais necessárias para reestabelecer o equilíbrio fisiológico e/ou

psicológico. Dependendo das características do estímulo estressor um conjunto específico de respostas pode ser eliciada.

Além das adaptações às mudanças nos ambientes físico e social por meio das respostas comportamentais, a adaptação de um determinado organismo pode envolver a mobilização dos sistemas autonômico, neuroendócrino e imune (MCEWEN, 2009). Essa adaptação às mudanças ambientais ou aos estressores (resposta de estresse) é um processo ativo que envolve o recrutamento de mediadores como os neurotransmissores, neuro-hormônios e hormônios (MCEWEN, 2009).

Do ponto de vista fisiológico, a saber, as catecolaminas do sistema nervoso simpático e os glicocorticóides do córtex das adrenais, dão início a eventos celulares que promovem mudanças adaptativas em todo o corpo. Os objetivos dessa resposta são manter a homeostase e promover a sobrevivência do organismo. Entretanto, o estresse crônico, ou um funcionamento inadequado da resposta aguda ao estresse pode causar desgaste e exacerbar processos patológicos (MCEWEN, 2009).

Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA)

Um dos principais mecanismos pelo qual o encéfalo reage ao estresse é a ativação do eixo HPA.

Várias observações clínicas e experimentais apontam para a ocorrência de alterações neuroendócrinas em situações de medo e respostas de ansiedade (SCHULKIN; MORGAN; ROSEN, 2005). Esses eventos podem ativar o eixo HPA o qual aumenta a liberação de hormônios glicocorticóides. O funcionamento desse eixo depende do hormônio de liberação de corticotrofina (CRH) cujos corpos celulares dos neurônios que o secretam se encontram principalmente no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), o qual recebe numerosas conexões do sistema límbico. O CRH é secretado no sistema porta-hipofisário e transportado

a seguir até a hipófise anterior, onde induz a secreção de corticotrofina (ACTH). Este hormônio é finalmente liberado na circulação sistêmica e estimula o córtex da adrenal a secretar hormônios esteroidais, dentre eles, os glicocorticóides (ou corticosteróides), predominantemente corticosterona em roedores e cortisol em primatas (JOELS; SARABDJITSINGH; KARST, 2012).

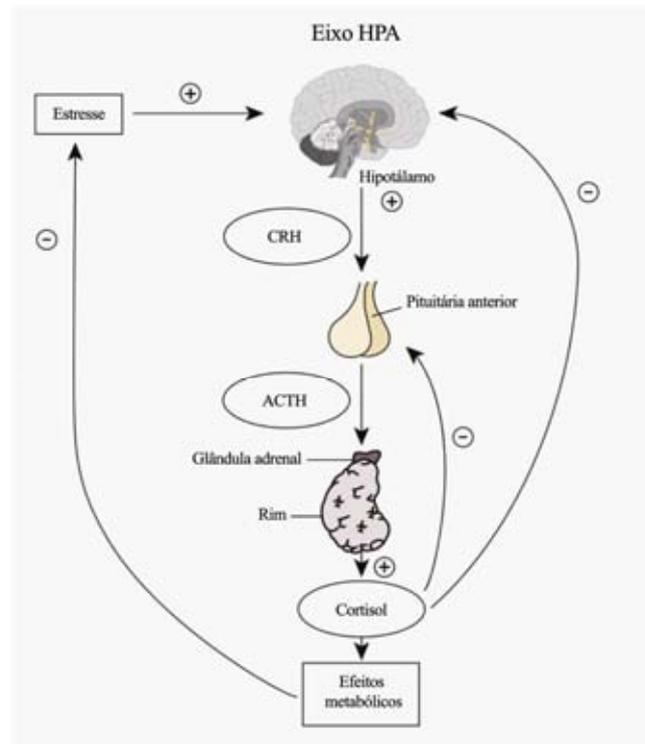


Fig 1. Representação dos mecanismos envolvidos no funcionamento do eixo HPA.

Receptores corticosteróides

Uma vez que os hormônios corticosteróides cruzam a barreira hematoencefálica e atingem o encéfalo, eles podem exercer suas ações em células que expressam dois tipos de receptores, os receptores mineralocorticóides (MR) e os glicocorticóides (GR) (REUL; DE KLOET, 1985). O nome desses receptores tem origem nos principais processos periféricos em que estão envolvidos: manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico (mineral) no corpo, principalmente nos rins, e gliconeogênese no fígado, respectivamente. Esses receptores pertencem à família de receptores nucleares e quando ativados, exercem os seus efeitos como fatores de transcrição no núcleo da célula para alterar a síntese de RNAm e proteínas de genes específicos (MCEWEN et al., 1979). Assim, os efeitos genômicos dos

esteróides sobre a função neuronal são lentos e exigem um intervalo de tempo de pelo menos 15 minutos, e às vezes horas após o início da situação de estresse, podendo durar por períodos de horas a dias (JOËLS; BARAM, 2009; GROENEWEG et al., 2011; JOELS; SARABDJITSINGH; KARST, 2012).

Esses receptores são expressos tanto em neurônios como em células glias, mas não são uniformemente distribuídos no encéfalo. Os MR são altamente expressos em neurônios da formação hipocampal e do septo lateral e moderadamente expressos em subnúcleos do complexo amigdalóide no PVN, no *locus coeruleus* e no córtex pré-frontal (DIORIO; VIAU; MEANEY, 1993; JOËLS; BARAM, 2009). Já os GR estão expressos em todo o encéfalo, mas estão presentes em grandes quantidades no hipocampo, septo lateral e PVN (JOËLS; BARAM, 2009). Os MR e GR apresentam diferentes afinidades pelos hormônios corticosteróides endógenos de modo que variações nas suas concentrações no encéfalo resultam em mudanças no equilíbrio da atividade entre esses receptores. O MR possui uma elevada afinidade para a aldosterona, corticosterona e o cortisol, enquanto a afinidade do GR para a corticosterona e o cortisol é aproximadamente 10 vezes inferior e menor ainda para a aldosterona (REUL; DE KLOET, 1985). Desse modo, sugere-se que a ativação dos receptores GR é iniciada quando os receptores MR já estão substancialmente ocupados pelos corticosteróides circulantes (WANG et al., 2012).

Efeitos rápidos dos glicocorticóides no sistema nervoso central

Apesar de muitos trabalhos na literatura sugerirem que os corticosteróides, por meio dos seus receptores possam regular a transcrição gênica, sabe-se há décadas que os corticosteróides também podem alterar rapidamente a atividade neural num domínio de tempo que é incompatível com as vias que envolvem a transcrição e tradução

(BORSKI, 2000; EVANSON; HERMAN; et al., 2010; JOELS; SARABDJITSINGH; KARST, 2012). Assim, sugere-se que os corticosteróides podem exercer seus efeitos rápidos e não-genômicos agindo em receptores localizados na membrana celular. A expressão de MR e GR em sítios extra-nucleares no núcleo lateral do complexo amigdalóide, incluindo terminais pré-sinápticos, dendritos neuronais e espinhos dendríticos, foi relatada em estudos de microscopia eletrônica (JOHNSON et al., 2005; PRAGER; JOHNSON, 2009; PRAGER et al., 2010). A existência de efeitos rápidos e não-genômicos mediados tanto por MR quanto por GR sobre a excitabilidade neuronal foi observada na conjunção basolateral do complexo amigdalóide (KARST et al., 2010) no hipotálamo (DI et al., 2003; EVANSON; TASKER; et al., 2010) e hipocampo (KARST et al., 2005), além de influenciar a neurotransmissão e vias de sinalização no córtex pré-frontal (BARSEGYAN et al., 2010; TRECCANI et al., 2014). Apesar de ainda não haver uma compreensão dos mecanismos moleculares pelos quais esses receptores interagem ou deslocam-se para a membrana plasmática, a existência desse fenômeno aumenta a janela temporal de ação na qual esses hormônios podem alterar a atividade neural. De fato, sua influência se estende desde os minutos iniciais da resposta de estresse até horas mais tarde (JOËLS; BARAM, 2009).

Nesse contexto, sabe-se que a ativação do eixo HPA, eliciada tanto por estímulos incondicionados quanto condicionados de medo, assim como a manipulação dos níveis circulantes de corticosterona também é capaz de interferir na organização de comportamentos defensivos. Alguns trabalhos mostraram que a exposição de roedores ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE) é capaz de elevar a concentração plasmática de corticosterona e correlaciona-se positivamente com a expressão de comportamentos defensivos classificados como avaliação de risco (FILE et al., 1994; RODGERS et al., 1999; REIS et al., 2012). A administração de diferentes doses desse hormônio antes do teste do LCE também leva a um aumento na frequência desses comportamentos sem alterar

a atividade locomotora dos animais (MIKICS et al., 2005). Em outros estudos, mostrou-se que a inibição da síntese de corticosterona antes de um estímulo estressor é capaz de bloquear seus efeitos ansiogênicos observados no teste do LCE (CALVO et al., 1998; REIS et al., 2012). Em relação ao medo condicionado, trabalhos que investigam os efeitos do estresse sobre a memória aversiva fornecem evidências de que os glicocorticóides desempenham um papel importante na consolidação da memória de longo prazo (MCGAUGH; ROOZENDAAL, 2002). De modo geral, esses achados apoiam a ideia de que os corticosteróides podem influenciar o estado de alerta, a aquisição de informações em situações potencialmente ameaçadoras e em última instância a expressão de comportamentos defensivos (KORTE, 2001; JOËLS; BARAM, 2009; SARABDJITSINGH et al., 2010).

Córtex pré-frontal medial

Segundo Heidbreder e Groenewegen (2003), o córtex pré-frontal tem sido classicamente definido e delineado de acordo com critérios anatômicos, como características citoarquitetônicas, conectividade com núcleo dorsomedial do tálamo, aferências de fibras específicas oriundas do mesencéfalo ou uma combinação desses critérios. Em ratos, uma proposta é a divisão do córtex pré-frontal em regiões topologicamente diferentes. Primeiramente, uma região cortical medialmente localizada, o córtex pré-frontal medial (CPFm), que constitui a maior porção da parede medial do hemisfério anterior e dorsal do *genu* do corpo caloso. Em uma segunda região, ventralmente localizado, o córtex pré-frontal orbital, encontra-se na parte dorsal da extremidade caudal do bulbo olfatório no banco dorsal do sulco rinal. E em terceiro, uma porção cortical lateralmente localizada, o córtex pré-frontal lateral (que também é chamado de córtex insular agranular), encontra-se na parte anterior do sulco rinal. Especificamente, o CPFm em ratos ainda pode ser dividido em ao menos quatro

sub-regiões citoarquiteticamente diferentes: área pré-central medial, área cingulada anterior (Cg), área pré-límbica (PrL) e área infra-límbica (IL).

Entretanto, além de critérios anatômicos, baseado em dados da literatura que parecem fornecer evidências suficientes para uma diferenciação funcional do CPFm, tem sido proposto uma subdivisão dessa região em um componente dorsal (área pré-central medial, Cg, e porção dorsal do PrL) e outro ventral (porção ventral do PrL, IL e áreas orbitais mediais) (KOLB, 1984; MCDONALD, 1998). Essa distinção funcional pode estar associada não somente à sua citoarquitetura, mas também aos padrões específicos de conectividade e neuroquímica.

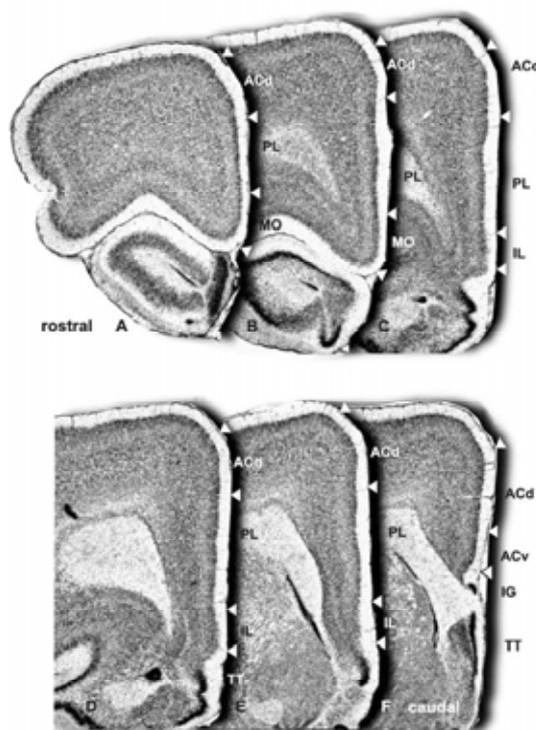


Fig. 2. A citoarquitetura do córtex pré-frontal medial do cérebro do rato é mostrada em seis secções coronais coradas com Nissl. De: *Christian A Heidbreder and Henk J Groenewegen. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. Neurosci Biobehav Rev. 27(6):555-79, 2003. Reprodução com permissão de Elsevier providenciada por Copyright Clearance Center n° licença: 3675380695284. ACD, área cingulada anterior dorsal; ACV, área cingulada anterior ventral; IG, indusium griseum; IL, área infralímbica; MO, área orbital medial; PL, área prelimbica; TT, tenia tecta.*

Considerando-se o conjunto bastante singular das aferências e eferências das divisões dorsal e ventral do CPFm, sugere-se que suas subregiões têm influência distinta sobre os processos emocionais e cognitivos. No sentido dorso-ventral, o conjunto de projeções aferentes do CPFm sofre uma mudança de entradas predominantemente sensório-motoras corticais e talâmicas “não-límbicas” na sua porção dorsal, para entradas “límbicas” corticais, talâmicas e do hipocampo na porção ventral (MCDONALD, 1998; HOOVER; VERTES, 2007). Algumas regiões projetam-se de modo comum ao CPFm como o córtex insular, o claustró, o complexo basolateral da amígdala (BLA), partes da linha mediana do tálamo, o núcleo supramamilar do hipotálamo, a área tegmental ventral (VTA), a substância cinzenta periaquedutal (PAG), o núcleo dorsal da rafe e o *locus coeruleus* (MCDONALD, 1998; HOOVER; VERTES, 2007).

Em relação às suas eferências, os neurônios do CPFm projetam-se para uma grande variedade de estruturas subcorticais importantes das quais recebe projeções aferentes e que estão envolvidas em uma série de respostas comportamentais e fisiológicas (GABBOTT et al., 2005). Sugere-se que a maioria dessas vias de projeções seja glutamatérgica (CARTER, 1982; KOLB, 1984; CHRISTIE; JAMES; BEART, 1986). Dentre as regiões alvo dessas eferências, além de outras áreas corticais, destacam-se o estriado dorsal e ventral, o BLA, o hipotálamo lateral, o tálamo médio dorsal, a VTA, a PAG, o núcleo dorsal da rafe e o *locus coeruleus* (HEIDBREDEDER; GROENEWEGEN, 2003; GABBOTT et al., 2005).

Dada sua posição integrativa, tanto anatômica como fisiologicamente, além da regulação das reações de estresse mediadas pelo eixo HPA (JONES; MYERS; HERMAN, 2011), o CPFm desempenha papel importante em uma ampla gama de processos comportamentais. Dentre esses destacam-se as funções relacionadas à memória, planejamento ou execução de ações, inibição de comportamentos inapropriados, bem como processamento afetivo (FUSTER, 1991; HAUSER, 1999; FUSTER, 2002; HERRY; GARCIA, 2002;

ARNSTEN, 2009). Assim, o CPFm é considerado um centro estratégico que conecta redes envolvidas em diversos aspectos da resposta emocional, incluindo a modulação de respostas autonômicas (DIORIO; VIAU; MEANEY, 1993; RESSTEL; CORREA; GUIMARAES, 2008) e comportamentos defensivos, como a expressão do medo condicionado (QUIRK et al., 2003; LIKHTIK et al., 2005).

Estudos mostram que o CPFm é uma estrutura alvo da ação dos glicocorticóides e tem sido implicado na regulação homeostática do organismo. Dentre as diversas estruturas do sistema límbico, estudos indicam a presença de MR e GR no CPFm e sua importância no controle inibitório da atividade do eixo HPA (MCEWEN; DE KLOET; ROSTENE, 1986; DIORIO; VIAU; MEANEY, 1993). Algumas evidências mostram os efeitos dos glicocorticóides no CPFm nos processos relacionados à memória de trabalho e à consolidação da memória aversiva (BARSEGYAN et al., 2010), entretanto ainda não é claro como os glicocorticóides podem influenciar a atividade do CPFm e a expressão do medo condicionado (RODRIGUES; LEDOUX; SAPOLSKY, 2009). Nesse sentido, a compreensão do envolvimento de mecanismos rapidamente modulados pela ativação de MR e GR no CPFm na expressão do medo condicionado ainda continua aberta à investigação.

Sistema glutamatérgico

Um dos mecanismos propostos para os efeitos rápidos dos glicocorticóides é que estes podem influenciar a atividade de diversos sistemas neurotransmissores, dentre os quais a neurotransmissão glutamatérgica (DI et al., 2009; WANG; WANG, 2009; YUEN et al., 2009; POPOLI et al., 2012). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no cérebro de mamíferos, mais da metade dos neurônios no cérebro, incluindo todos os neurônios corticais piramidais, utilizam o glutamato como principal neurotransmissor (NIEUWENHUYNS, 1994). Diversas evidências sugerem que mecanismos glutamatérgicos participam da elaboração de

comportamentos defensivos e estados de ansiedade em roedores e humanos (HARVEY; SHAHID, 2012). No CPFm, a neurotransmissão glutamatérgica é complexa e parece estar envolvida tanto nos processos adaptativos como na organização dos comportamentos de defesa. Essa complexidade se deve em parte à diversidade de receptores glutamatérgico existentes que pode ser dividida em duas grandes famílias: os receptores ionotrópicos e os receptores metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são acoplados a um canal iônico e podem ser diferenciados em três classes baseadas na sua sensibilidade aos derivados sintéticos do glutamato: receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), de alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) e cainato. Esses dois últimos são, entretanto, tratados como a mesma entidade por alguns autores (BRANN, 1995; WATKINS; JANE, 2006). Os receptores metabotrópicos, que são ligados à proteína G são divididos em três grupos baseados na sua associação com o segundo mensageiro e sua sensibilidade às moléculas ligantes. Os receptores do grupo I estão positivamente ligados à fosfolipase C enquanto os grupos II e III estão negativamente ligados à adenilciclase (SPOOREN et al., 2003). Como resultado, quando ativado, o grupo I de receptores predominantemente potencializa a liberação pré-sináptica de glutamato e a neurotransmissão NMDA pós-sináptica. Em contraste, os grupos II e III, geralmente, limitam a liberação de glutamato particularmente nas condições onde há um excesso de glutamato na fenda sináptica.

É reconhecido que o estresse e seus mediadores endócrinos e neuroquímicos levam a alterações nas sinapses e circuitarias glutamatérgicas (YUEN et al., 2009; MUSAZZI; RACAGNI; POPOLI, 2011). Em um estudo utilizando a técnica de microdiálise, foi demonstrado que o estresse de restrição agudo, e consequente elevação das concentrações de corticosterona plasmática, aumentam rapidamente a liberação de glutamato no CPFm de ratos (MUSAZZI et al., 2010). Nessa direção, diversos estudos sugerem que a rápida ativação de

receptores para corticosterona possa influenciar a neurotransmissão glutamatérgica (KARST et al., 2005; KARST et al., 2010; GROENEWEG et al., 2011; POPOLI et al., 2012; TRECCANI et al., 2014). Entretanto, ainda não está totalmente claro como os glicocorticóides influenciam a atividade do CPFm e como seus efeitos estão relacionados aos mecanismos de neurotransmissão glutamatérgica na expressão do medo condicionado.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

O presente trabalho visa avançar o conhecimento atual sobre a expressão do medo condicionado contextual modulado pela ação dos glicocorticóides e do sistema glutamatérgico no CPFm de ratos, por meio de uma abordagem comportamental, farmacológica e imunohistoquímica.

Objetivos específicos

Investigar os efeitos da diminuição das concentrações plasmáticas de corticosterona na expressão da resposta de congelamento condicionado em ratos submetidos ao condicionamento aversivo contextual, assim como a participação de diferentes subregiões do CPFm envolvidas na expressão desse comportamento por meio da análise da expressão da proteína Fos.

Em seguida, considerando estudos prévios que indicam a relevância da porção PrL no processo de expressão do medo condicionado (BURGOS-ROBLES; VIDAL-GONZALEZ; QUIRK, 2009; SOTRES-BAYON; QUIRK, 2010) e os resultados obtidos no ensaio imunohistoquímico, essa região foi escolhida para avaliar o envolvimento da atividade dos receptores MR e GR no CPFm na expressão do medo condicionado contextual.

Por último, buscamos investigar se os efeitos rápidos induzidos pelos glicocorticóides no CPFm interagem com o sistema glutamatérgico via receptores NMDA na expressão da resposta de medo condicionado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados 429 ratos Wistar machos com peso médio de 270 gramas, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo, *Campus* de Ribeirão Preto, Brasil. Os animais foram alojados, em grupos de quatro, em gaiolas-viveiro (30 × 45 × 18 cm) de polietileno, e mantidos em condições controladas de temperatura (21-23°C) e em ciclo de claro-escuro de 12/12 h (luzes acesas às 07:00 h) por 72 h antes do início dos experimentos, com livre acesso a alimento e água. Os procedimentos deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação (CEUA) da Universidade de São Paulo, *Campus* de Ribeirão Preto (Protocolo nº 11.1.1300.53.1).

Drogas

As drogas utilizadas foram o inibidor da síntese de corticosterona, metirapona (Sigma, EUA), os antagonistas de receptores de corticosterona MR (espironolactona, Sigma, EUA) e GR (RU38486, Tocris, EUA), corticosterona (Sigma, EUA), o antagonista de receptores NMDA, ácido 2-amino-7-fosfono-heptanóico (AP7, Sigma, EUA) e o agonista de receptores NMDA, N-metil D Aspartato (NMDA, Sigma, EUA).

A metirapona foi dissolvida em salina (0,9%) contendo 5% de *Tween 80*. A espironolactona, o RU38486 e a corticosterona foram solubilizados em DMSO 100% e posteriormente diluídos em salina (0,9%) até a concentração final de DMSO de 0,1%. O AP7 e o NMDA foram solubilizados em salina (0,9%). Para cada respectivo grupo controle foi utilizado solução salina (0,9%) contendo 5% de *Tween 80*, salina (0,9%) contendo 0,1% de DMSO e salina (0,9%).

Procedimentos experimentais

Cirurgia estereotáxica

Cinco dias antes das sessões experimentais os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal com ketamina/xilazina na dose de 100/7,5 mg/kg, em um volume de 1/0,3 mL/kg, respectivamente, e fixados num aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments). A barra incisória superior foi fixada em 3,3 mm abaixo da linha interaural para que o crânio ficasse na posição horizontal entre o bregma e o lambda. O crânio foi fixado a um aparelho estereotáxico pelo rochedo temporal. Após a administração subcutânea do anestésico local cloridrato de lidocaína (2%), o crânio foi exposto e o periósteo removido. Cânulas-guia de aço inoxidável (10 mm de comprimento; 0,6 mm, diâmetro exterior; 0,4 mm, de diâmetro interno) foram implantadas bilateralmente no PrL usando o bregma como o ponto de referência para as coordenadas: ângulo de 22°, antero-posterior = +3,3 mm do bregma, médio-lateral = \pm 1,9 mm, dorso-ventral = -2,8 mm com base no atlas de Paxinos e Watson (2007). As cânulas foram fixadas ao osso por meio de uma resina acrílica e dois parafusos de aço inoxidável no qual as cânulas permaneceram vedadas por um fio de aço inoxidável até o momento das microinjeções. Ao término da cirurgia foi administrada uma associação antibiótica de largo espectro (Pentabiótico Veterinário, Fort Dodge, 600 000 UI em um volume de 0,2 mL) por via intramuscular e uma solução analgésica e antiinflamatória de Banamine (flunixinina meglumina, 2,5 mg/kg em 0,2 mL, Shering-Plough), por via subcutânea. Após o procedimento cirúrgico, os ratos foram reagrupados em grupos de 4 animais.

Procedimentos de microinjeção

Durante o procedimento de microinjeção, os animais permaneceram em uma caixa de polipropileno medindo 28 × 17 × 13 cm forrada com maravalha. Uma agulha dental 1 mm maior do que a cânula-guia foi utilizada. A agulha estava conectada a um tubo de polietileno

(PE-10; Becton-Dickinson, NJ, EUA) e a uma seringa Hamilton (Reno, EUA) graduada de 5 μL . As drogas ou seus veículos foram injetados em um fluxo constante de 0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$ com o auxílio de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, MA, EUA). O deslocamento de uma bolha de ar no interior do tubo de polietileno foi utilizado para monitorar a microinjeção. Um volume de 0,25 μL foi injetado em cada hemisfério do CPFm dos ratos. Após o término da infusão, a agulha foi mantida por mais 1 minuto para evitar refluxo da droga pela cânula-guia.

Condicionamento aversivo

Os animais foram submetidos ao paradigma de medo condicionado utilizando o contexto como estímulo condicionado. Durante a sessão treino, os ratos foram colocados individualmente em uma caixa experimental A (48 × 26 × 25 cm) iluminada por uma lâmpada vermelha de 15-W. As paredes laterais e do fundo da caixa de condicionamento eram feitas de acrílico cinza e o teto e porta da frente de Plexiglas transparente. O piso foi formado por uma grade constituída por 36 barras de aço inoxidável (3 mm de diâmetro), espaçadas por 1,5 cm de distância. Um estimulador, ligado a uma interface controlada por um computador distribuía os choques nas grades (Instrumentos Insight). Após 5 min de aclimação, os ratos foram submetido ao condicionamento aversivo contextual, que consistiu na aplicação de 10 choques nas patas, com intensidade de 0,6 mA e duração de 1 s cada, sendo variável o intervalo entre os choques (faixa de 30 – 120 s) como previamente descrito (ALBRECHET-SOUZA; CARVALHO; BRANDAO, 2013). Os ratos eram removidos da caixa de condicionamento 3 min após a apresentação do último choque e colocados novamente na gaiola-viveiro. A caixa era limpa com solução de etanol (20%) antes e depois do uso.

A sessão teste para avaliar a expressão do medo condicionado contextual foi conduzida 24 h após a sessão treino e consistia na exposição por 8 min ao contexto no qual os animais receberam previamente os choques nas patas, porém sem a apresentação de choques.

A medida comportamental avaliada nesse estudo foi o tempo despendido no comportamento de congelamento durante a sessão teste. Essa resposta foi operacionalmente definida pela ausência de todos os movimentos corporais (exceto aqueles envolvidos na respiração) por um período mínimo de 6 s (BOLLES, 1970; BOUTON, 1980; FENDT, 1999). Todos os experimentos foram monitorados por um único experimentador que manualmente cronometrou a resposta de congelamento de maneira contínua durante 8 min através de uma câmera de vídeo montada 12 cm acima da porta e situada sobre da caixa de modo que a presença do experimentador não interferiu com a condição experimental.

Grupos controle foram adicionados nesse estudo para avaliar possíveis processos de generalização de medo condicionado ou efeitos de drogas *per se*. Para isso, durante a sessão teste, grupos distintos de animais foram expostos a uma caixa experimental diferente da utilizada na sessão de condicionamento. Esse contexto diferente consistiu em uma caixa (31 × 21 × 21 cm) iluminada por uma lâmpada comum de 15-W. As paredes laterais e do fundo eram feitas de aço e o teto e a porta da frente de Plexiglas transparente. A grade foi coberta com plástico resistente. A câmara foi limpa com uma solução de álcool a 20% e aromatizada com ácido acético a 0,5% após cada sessão. Ambas as caixas estavam inseridas em uma caixa de madeira com isolamento acústico.

Experimento 1: Efeitos do tratamento com o inibidor da síntese de corticosterona na expressão do medo condicionado e na expressão de proteína Fos no CPFm

Vinte e quatro horas após a sessão treino, ratos que não foram submetidos à cirurgia estereotáxica foram divididos em dois grupos: Aqueles que seriam expostos ao mesmo contexto (caixa treino) e aqueles que seriam expostos ao contexto diferente. Ambos os grupos receberam uma injeção intraperitoneal de veículo ou metirapona na dose de 30 mg/kg em um volume de 1 mL/kg e 20 min depois a resposta de congelamento foi registrada durante 8 min.

Foi demonstrado que essa dose de metirapona é capaz de reduzir significativamente as concentrações plasmáticas de corticosterona em 20 min ((MIKICS; KRUK; HALLER, 2004), um efeito que dura por, pelo menos, 20 min (DE OLIVEIRA et al., 2012), sem alterar a atividade locomotora (MIKICS et al., 2005). Duas horas após o início da sessão teste, os ratos foram anestesiados com uretana (3 g/kg i.p.; Sigma-Aldrich, EUA) perfundidos intracardiacamente com tampão fosfato de sódio (PBS) a 0,1 M seguido de solução de paraformaldeído a 4% em PBS a 0,1 M (pH = 7,4) (ALBRECHET-SOUZA; CARVALHO; BRANDAO, 2013).

Imunohistoquímica

Depois da remoção da caixa craniana, os encéfalos foram armazenados em frascos contendo paraformaldeído a 4%, por 24 h, e então colocados em solução de sacarose a 30% em PBS a 0,1 M, a 4° C, por 72 h, para crioproteção. Os encéfalos foram então congelados em isopentana (-40° C) e seccionados em um criostato (-19° C). Os cortes (40 µm) foram coletados em recipientes contendo solução anti-congelante e a imunoreatividade da proteína Fos foi detectada utilizando-se técnicas padrão como previamente descrito (ALBRECHET-SOUZA; CARVALHO; BRANDAO, 2013). De modo resumido, os cortes foram tratados com uma solução de peróxido de hidrogênio a 1% em PBS 0,1 M por 10 min e após 3 lavagens com PBS 0,1 M, foram encubados *overnight* com anticorpo c-fos primário (1:4000, policlonal produzido em coelho; Santa Cruz Biotechnology, EUA) em solução composta por PBS a 0,1 M acrescido de albumina bovina a 0,1% e enriquecida com surfactante Triton X-100 (0,2%). Após a retirada do anticorpo primário os cortes foram lavados e incubados com o anticorpo secundário biotinilado produzido em cabra (1:400, anticorpo policlonal anticoelho biotinilado, Vector Laboratories, EUA) durante 1 h. Depois dessa incubação, o tecido foi novamente lavado e incubado por 1 h com o complexo de avidina-biotina (1:400, Vector

Laboratories). A imunoreatividade da proteína Fos foi revelada pela adição do cromógeno diaminobenzidina 3,3 (DAB; 0,02%; Sigma-aldrich) em solução de PBS 0,1 M, na qual foi adicionada 0,04% de peróxido de hidrogênio antes do uso. Depois de aproximadamente 10 min, os cortes foram lavados com PBS 0,1 M e apropriadamente posicionados em lâminas gelatinizadas. Após a secagem, as lâminas foram desidratadas por imersão em gradiente alcoólico, clareadas com xilol e cobertas com meio de montagem *Permount* e lamínula.

Quantificação de células Fos-positivas

As células Fos-positivas foram visualizadas com o uso de um microscópio (Olympus BX50, magnificação x 10) acoplado a uma videocâmara (Leica DFC320) e contadas por um programa de análise de imagem (Image Pro-Plus 6.2, Media Cybernetics, EUA). Foi obtido um número médio de células marcadas por 0,1mm² de estrutura (ALBRECHET-SOUZA et al., 2009). As áreas do CPFm analisadas foram: córtex prélimbico (PrL) e infralímbico (IL) (coordenadas anterior/posterior a partir do bregma: +4,20-3,00 mm); córtex cingulado, área 1 (Cg1) e área 2 (Cg2) (+2,16-1,68 mm) de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2007),

Experimento 2: Efeitos da administração de espirolactona e RU38486 no PrL sobre a expressão da resposta de medo condicionado

Vinte e quatro horas após a sessão treino, grupos independentes que passaram por cirurgia estereotáxica receberam microinjeções de veículo ou diferentes doses de espirolactona ou RU38486 (0,5; 2,5; ou 5 ng/0,25 µL por hemisfério) 10 min antes da sessão teste, onde foram expostos ao contexto aversivo e tiveram a resposta de congelamento avaliada durante 8 min.. As doses e o tempo de injeção foram baseados em estudos prévios (ROOZENDAAL; MCGAUGH, 1997; ROOZENDAAL; WILLIAMS; MCGAUGH, 1999; BARSEGYAN et al., 2010).

Experimento 3: Efeitos da administração combinada de antagonistas MR e GR no PrL na expressão da resposta de medo condicionado

Uma vez que as curvas dose-resposta de RU38486 e espironolactona foram determinadas, as drogas foram administradas de forma combinada no PrL em grupos independentes de ratos. O primeiro tratamento (veículo ou RU38486, 5 ng/0,25 µL) foi realizado 5 min antes do segundo tratamento (veículo ou espironolactona, 2,5 ou 5 ng/0,25 µL), enquanto este tratamento foi realizado 10 min antes da sessão de teste.

Experimento 4: Efeitos da administração de corticosterona no PrL na expressão da resposta de medo condicionado

Para avaliar possíveis efeitos rápidos de injeções de corticosterona no PrL, uma curva dose-resposta de corticosterona foi realizada. Vinte e quatro horas após a sessão treino, grupos independentes de ratos receberam microinjeções de veículo ou diferentes doses de corticosterona (0,25; 0,5; ou 1 ng/0,25 µL por hemisfério) 5 min antes da sessão teste. As doses e o tempo das injeções foram baseados em estudos prévios (MORROW et al., 1996; CHAUVEAU et al., 2009).

Experimento 5: Efeitos da administração dos antagonistas MR e GR combinados com corticosterona no PrL na expressão da resposta de medo condicionado

A fim de avaliar os mecanismos pelos quais a administração de corticosterona exerce os seus efeitos rápidos no PrL, microinjeções prévias de RU38486 (5 ng/0,25 µL) ou espironolactona (0,5 ng/0,25 µL) foram realizadas antes da administração de corticosterona (1 ng/0,25 µL) no PrL. Nesse experimento, o primeiro tratamento (veículo, RU38486 ou espironolactona) foi realizado 5 min antes do segundo tratamento (veículo ou corticosterona), enquanto a última administração foi realizada 5 min antes da sessão de teste.

Experimento 6: Efeitos da espironolactona e corticosterona no PrL sobre o comportamento de congelamento em ratos submetidos a um contexto diferente

Para avaliar possíveis efeitos gerais da espironolactona (2,5 ng/0,25 µL) e corticosterona (1 ng/0,25 µL) no PrL na expressão da resposta de congelamento, um grupo separado de ratos foi condicionado e tratado como anteriormente descrito, mas submetidos a um contexto diferente para a avaliação do comportamento de congelamento.

Experimento 7: Efeitos da administração de AP7 no PrL na expressão da resposta de medo condicionado

Com o objetivo de avaliar possíveis interações entre os efeitos rápidos induzidos pela administração de corticosterona e o sistema glutamatérgico no PrL, primeiramente, foi realizada uma curva dose-resposta dos efeitos da administração do antagonista de receptor NMDA, AP7, nessa região sobre a expressão da resposta de medo condicionado. Assim, vinte e quatro horas após a sessão treino, grupos independentes de ratos receberam microinjeções de veículo ou diferentes doses de AP7 (0,5; 1; ou 2 nmol/0,25 µL por hemisfério) no PrL 10 min antes da sessão teste. As doses e o tempo das injeções foram baseados em estudos prévios (REIMER; DE OLIVEIRA; BRANDAO, 2012).

Experimento 8: Efeitos da administração do antagonista de receptor NMDA combinado com corticosterona no PrL na expressão da resposta de medo condicionado

Esse experimento buscou avaliar uma possível interação entre os efeitos rápidos induzidos pela corticosterona e o sistema glutamatérgico no PrL na expressão do medo condicionado. Para isso, vinte e quatro horas após a sessão treino, veículo ou AP7 (1 nmol/0,25 µL) foram microinjetados localmente antes da infusão de veículo ou corticosterona (1 ng/0,25 µL). Nesse experimento, o primeiro tratamento foi realizado 5 min antes do

segundo tratamento, enquanto a última administração foi realizada 5 min antes da sessão de teste.

Experimento 9: Efeitos da administração de NMDA no PrL na expressão da resposta de medo condicionado

Baseado nos resultados do experimento anterior (Experimento 9), este experimento buscou investigar se o aumento da atividade de receptores NMDA no PrL é capaz de influenciar a expressão do medo condicionado contextual.

Vinte e quatro horas após a sessão treino, no dia do teste, grupos independentes de animais foram tratados com veículo ou NMDA (0,5; 1 ou 2 nmol/0,25 µL) e a resposta de congelamento avaliada. As doses e o tempo das injeções foram baseados em estudos prévios (REIMER; DE OLIVEIRA; BRANDAO, 2012).

Experimento 10: Efeitos do NMDA no PrL no tempo do comportamento de congelamento em ratos submetidos a um contexto diferente

Para avaliar um possível efeito *per se* do NMDA na resposta de congelamento, vinte e quatro horas após o treino, um grupo separado de ratos foi tratado com microinjeções de veículo ou NMDA (2 nmol/0,25 µL) no PrL e exposto a um contexto diferente de onde foram previamente condicionados.

Experimento 11: Efeitos da administração de NMDA e corticosterona no PrL no comportamento exploratório no campo aberto

Para investigar possíveis efeitos do NMDA e da corticosterona no PrL sobre a atividade locomotora do animais, um grupo separado de ratos foi tratado com microinjeções

de veículo, NMDA (2 nmol/0,25 μ L) ou corticosterona (1 ng/0,25 μ L) no PrL e exposto ao teste do campo aberto por 8 min.

Experimento 12: Efeitos da administração de NMDA combinado com corticosterona no PrL na expressão da resposta de medo condicionado

A fim de aprofundar as investigações da interação entre os efeitos rápidos induzidos pelos glicocorticóides no CPFm e o sistema glutamatérgico na mediação da resposta condicionada de medo, buscou-se avaliar um possível efeito sinérgico entre o tratamento local com NMDA e corticosterona. Para isso, vinte e quatro horas após a sessão treino, foram administrados doses inefetivas de NMDA (1 nmol/0,25 μ L) ou corticosterona (0,5 ng/0,25 μ L) no PrL. Nesse experimento, o primeiro tratamento (NMDA) foi realizado 5 min antes do segundo tratamento (corticosterona), enquanto a última administração foi realizada 5 min antes da sessão de teste.

Histologia

Após os testes comportamentais, todos os animais foram profundamente anestesiados com uretana (3 g/kg i.p.; Sigma-Aldrich, EUA) e perfundidos intracardiacamente com solução salina (0,9%) seguida de formalina (4%). Em seguida, o cérebro foi retirado e estocado em solução de formalina (4%). Após um prazo mínimo de 3 dias em sacarose a 30%, os cérebros foram seccionados em criostato a -19° C e os cortes (60 μ m) foram corados com violeta de cresila para a análise dos sítios de microinjeção com o auxílio de microscópio óptico. A localização das cânulas foi determinada por comparação com as pranchas e diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (2007).

Análise estatística

Os dados estão apresentados como média \pm EPM. No experimento 1, os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) de duas vias considerando tratamento (metirapona vs. veículo) e contexto (mesmo contexto vs. contexto diferente) como fatores independentes. Em função dos tratamentos, nos experimentos 2, 4, 6, 7, 9 e 11, os resultados foram analisados por meio da ANOVA de uma via. Nos experimentos 3, 5, 8 e 12 os dados foram analisados por meio da ANOVA de duas vias considerando o 1º tratamento e 2º tratamento como fatores independentes. No experimento 10 os dados dos grupos testados em um contexto diferente foram analisados por meio do teste *t* de Student. As diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas através do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Um valor de P igual ou menor que 0,05 foi considerado significativo.

RESULTADOS

Resultados

Experimento 1: Efeitos do tratamento com o inibidor da síntese de corticosterona na expressão do medo condicionado e na expressão de proteína Fos no CPFm

A Fig. 1A mostra a linha do tempo dos procedimentos experimentais referentes à avaliação dos efeitos da metirapona e do estímulo condicionado aversivo sobre a expressão do medo condicionado contextual e expressão de proteína Fos no CPFm. A Fig. 1B mostra o tempo médio das respostas de congelamento nos animais tratados com veículo ou metirapona e expostos ao contexto diferente ($n = 8$ para ambos os grupos) ou ao mesmo contexto ($n = 8$ para ambos os grupos). A ANOVA de duas vias mostrou efeitos significativos dos fatores tratamento e contexto assim como da interação tratamento \times contexto no tempo de congelamento ($F_{1,28} = 13,15; 11,38$ e $4,76$ respectivamente, $P < 0,05$ em todos os casos). A análise *post-hoc* mostrou que a exposição ao mesmo contexto levou a um aumento no tempo de congelamento dos animais do grupo veículo quando comparado a todos os outros grupos (Newman–Keuls, $P < 0,05$ [Fig. 1B]).

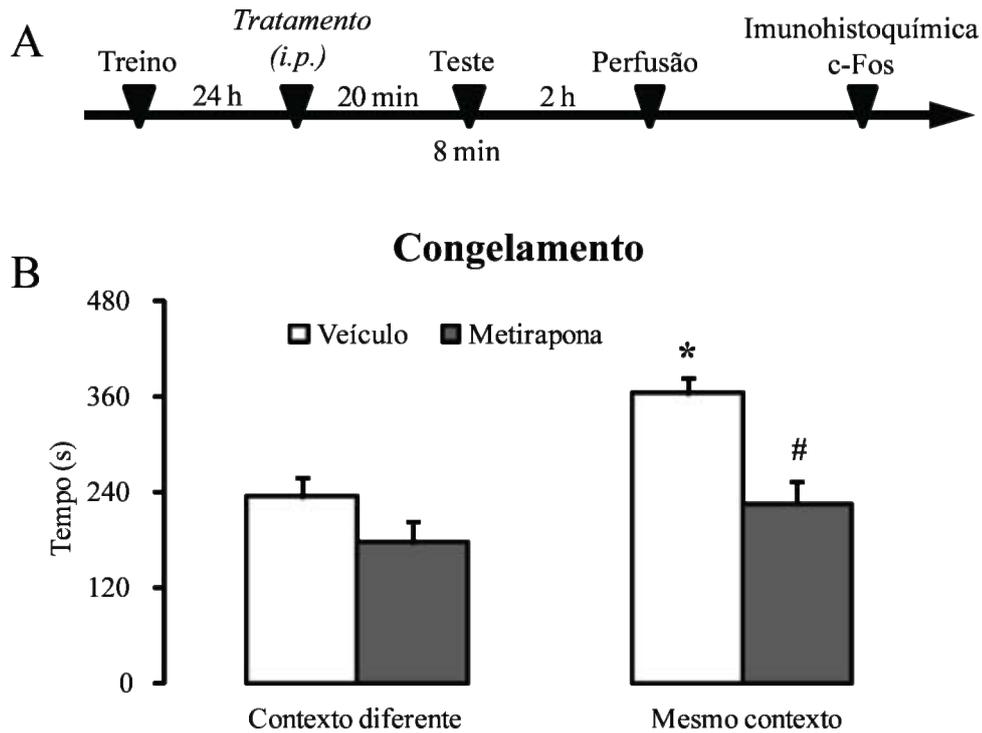


Figura 1. Efeitos da metirapona sobre a expressão da resposta de medo condicionado (A) Linha do tempo dos procedimentos experimentais referentes à avaliação dos efeitos da metirapona e do estímulo condicionado aversivo sobre a expressão do medo condicionado contextual e expressão de proteína Fos no CPFm. (B) Média das respostas de congelamento nos animais tratados com veículo ou metirapona e expostos ao contexto diferente ($n = 8$ para ambos os grupos) ou expostos ao mesmo contexto ($n = 8$ para ambos os grupos) *Diferente do grupo veículo exposto ao contexto diferente; # diferente do grupo veículo exposto ao mesmo contexto ($P < 0,05$).

Histogramas com a média do número de células Fos-positivas do CPFm de ratos tratados com veículo ou metirapona e expostos ao mesmo contexto ou contexto diferente de onde receberam choques nas patas estão apresentados na Fig. 2. Fotomicrografias representativas mostrando a imunorreatividade da proteína Fos nas diferentes subregiões do CPFm estão ilustradas na Fig. 3. A ANOVA de duas vias mostrou efeitos significativos do fator tratamento e da interação tratamento \times contexto na expressão de proteína Fos no Cg1 ($F_{1,25} = 10,56$ e $18,74$ respectivamente, $P < 0,05$ em ambos os casos), mas não no fator contexto ($F_{1,25} = 0,14$, $P > 0,05$, Fig. 2). Efeitos significativos na interação tratamento \times contexto foram observados no PrL, IL e Cg2 ($F_{1,25} = 11,05$; $6,47$ e $5,99$ respectivamente, $P < 0,05$ em todos os casos [Fig. 2]) mas sem efeitos significativos nos fatores tratamento e

contexto quando analisados isoladamente ($F_{1,25} = 3,60$ e $0,26$; $0,70$ e $0,60$; $3,77$ e $1,11$, respectivamente, $P > 0,05$ em todos os casos). As comparações *post-hoc* mostraram que os animais tratados com veículo e expostos ao mesmo contexto apresentaram um aumento na expressão de proteína Fos no PrL, Cg1 e Cg2 quando comparados aos animais tratados com veículo e expostos ao contexto diferente e aos animais tratados com metirapona e expostos ao mesmo contexto (Newman-Keuls, $P < 0,05$). As comparações também mostraram que os animais tratados com metirapona e expostos ao contexto diferente tiveram menor expressão de proteína Fos no Cg1 e Cg2 quando comparados ao grupo veículo exposto ao mesmo contexto (Newman-Keuls, $P < 0,05$). Na análise *post-hoc* não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos na expressão de proteína Fos no IL (Newman-Keuls, $P > 0,05$ [Fig. 2]).

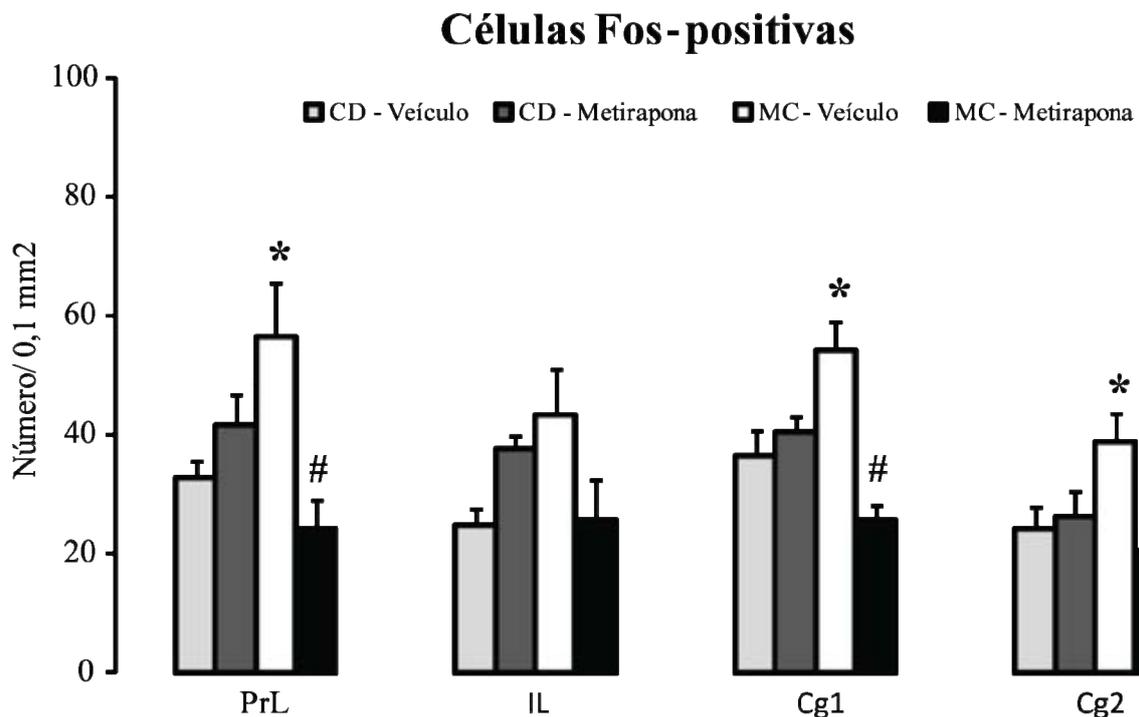


Figura 2. Efeitos do contexto aversivo e da metirapona sobre a expressão de proteína Fos no CPFm. Média do número de células Fos-positivas nas subregiões PrL, IL, Cg1 e Cg2 de ratos tratados com veículo ou metirapona e expostos ao contexto diferente ou ao mesmo contexto onde receberam choques nas patas. * Diferente do grupo veículo exposto ao contexto diferente; # diferente do grupo veículo exposto ao mesmo contexto ($P < 0,05$). $n = 7$ a 8 por grupo. Barra de escala igual a $150 \mu\text{m}$. CD, contexto diferente; MC, mesmo contexto; PrL, córtex pré-límbico; IL, córtex infralímbico; Cg1, córtex cingulado anterior área 1; Cg2, córtex cingulado anterior área 2.

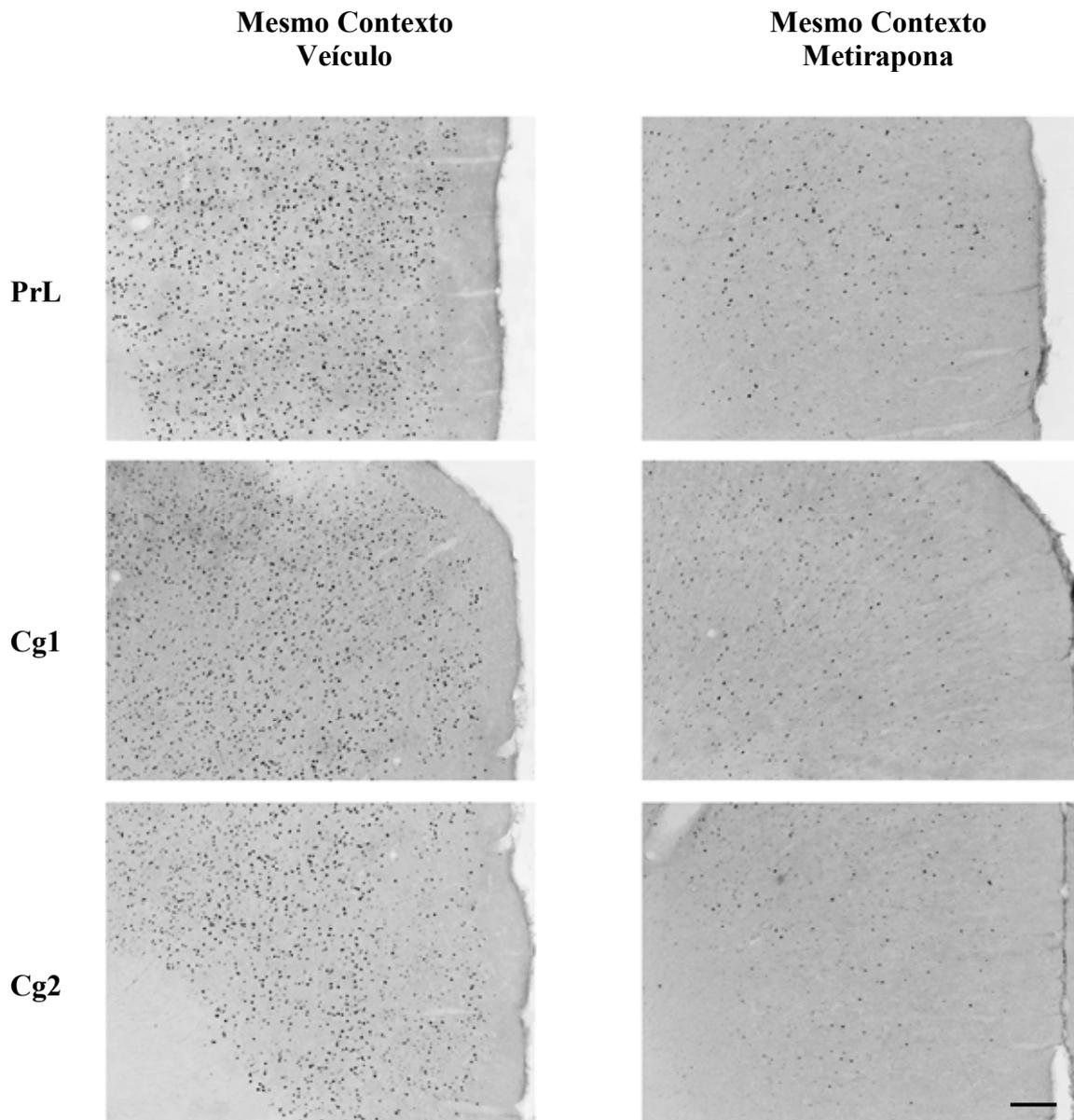


Figura 3. *Efeitos da metirapona sobre a expressão de proteína Fos no CPFm.* Fotomicrografias de cortes coronais de córtex cerebral passando pelo PrL Cg1 e Cg2 representativas da imunorreatividade da proteína Fos de ratos tratados com veículo ou metirapona e expostos ao contexto aversivo. Barra de escala igual a 150 μ m. PrL, córtex pré-límbico; Cg1, córtex cingulado anterior área 1; Cg2 córtex cingulado anterior área 2.

Experimento 2: Efeitos da administração bilateral de espironolactona e RU38486 no PrL sobre a expressão da resposta de medo condicionado

A Fig. 4A mostra a linha do tempo dos procedimentos experimentais referentes à avaliação dos efeitos da espironolactona e do RU38486 injetado bilateralmente no PrL sobre a expressão da resposta de medo condicionado. Como mostra a Fig. 4B, a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelaram que somente a dose intermediária (2,5 ng) de espironolactona diminuiu o tempo da resposta de congelamento quando administrada bilateralmente no PrL antes da exposição ao medo contextual ($F_{3,33} = 9,99$, $P < 0,0001$ [Newman-Keuls, $P < 0,05$]).

A administração bilateral de RU38486 no PrL antes da exposição ao medo condicionado não alterou o tempo da resposta de congelamento em nenhuma das doses utilizadas, como mostrou a ANOVA de uma via ($F_{3,37} = 0,71$, $P > 0,05$ [Fig. 4C]).

Uma fotomicrografia representativa dos sítios de microinjeção e os diagramas representando a localização dos sítios de microinjeção no PrL referentes a este e aos experimentos subsequentes estão representados na Fig. 4D.

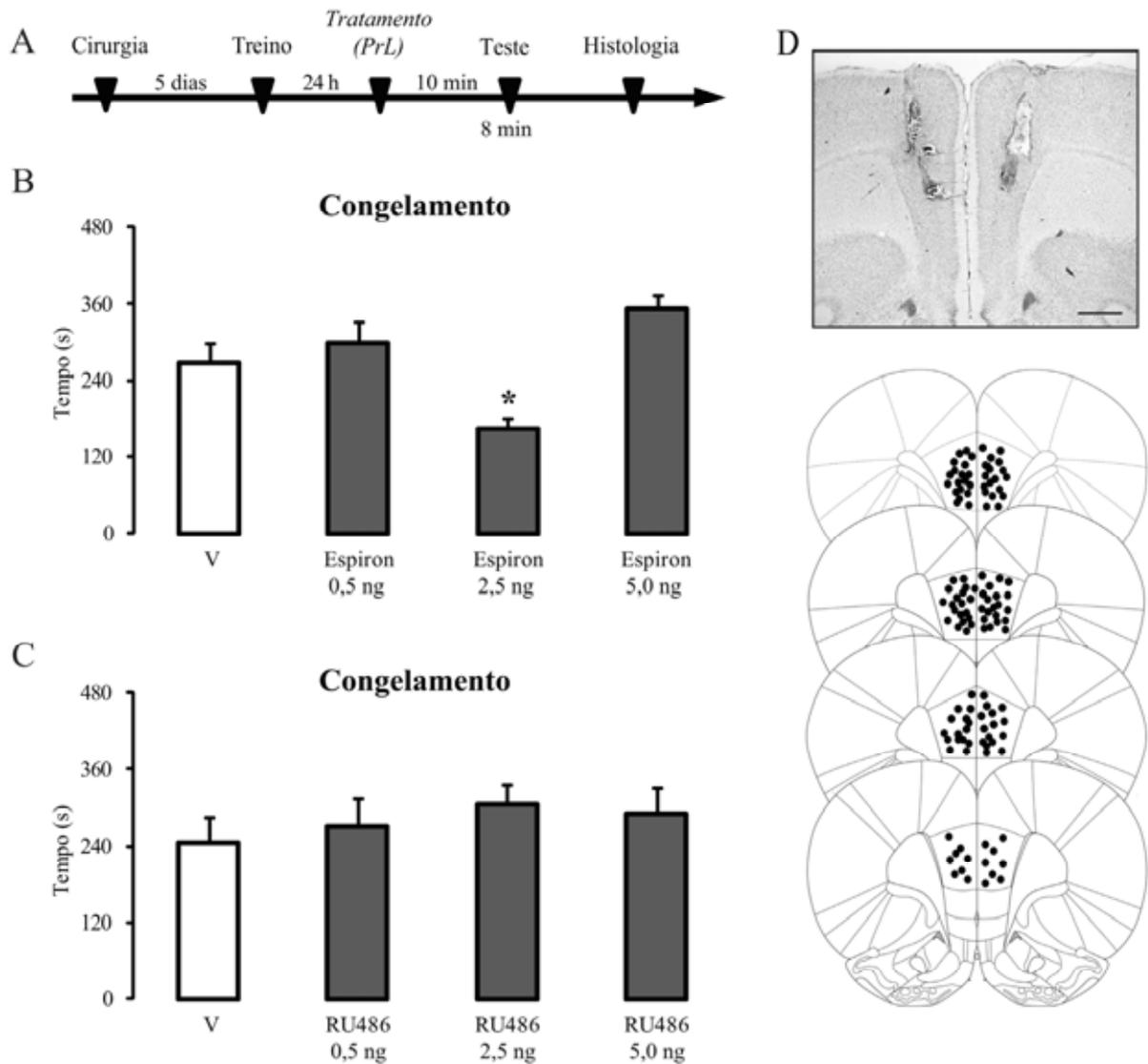


Figura 4. Efeitos das microinjeções dos antagonistas de receptores MR e GR no PrL sobre a expressão do medo condicionado contextual. (A) Linha do tempo referente aos procedimentos experimentais. (B) Média das respostas de congelamento nos animais que receberam microinjeções de veículo ($n = 10$) ou espironolactona nas doses de 0,5 ng ($n = 7$), 2,5 ng ($n = 10$) ou 5 ng ($n = 10$) e foram expostos ao mesmo contexto previamente pareado com choques nas patas. (C) Média das respostas de congelamento nos animais que receberam microinjeções bilaterais de veículo ($n = 12$) ou RU38486 nas doses de 0,5 ng ($n = 9$), 2,5 ng ($n = 10$) ou 5 ng ($n = 10$) e foram expostos ao contexto previamente pareado com choques nas patas. (D) Fotomicrografia representativa dos sítios de microinjeção no PrL e diagramas indicando os sítios de microinjeção em seções transversais do atlas Paxinos e Watson (2007). Barra de escala igual a 1,0 mm. PrL, córtex pré-límbico. * Diferente do grupo veículo ($P < 0,05$). Espiron, espironolactona.

Experimento 3: Efeitos da administração bilateral combinada de RU38486 e espironolactona no PrL na expressão da resposta de medo condicionado

A Fig. 5A mostra a linha do tempo dos procedimentos experimentais referentes à avaliação dos efeitos da administração combinada de espironolactona e RU38486 no PrL sobre a expressão da resposta de medo condicionado. Os efeitos das injeções combinadas de RU38486 e espironolactona estão ilustrados na Fig. 5B. A ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos no fator 2º tratamento e interação entre os fatores 1º tratamento × 2º tratamento ($F_{2,35} = 8,17$ e $3,22$ respectivamente, $P < 0,05$ em ambos os casos). Não foi observado efeito significativo no fator 1º tratamento ($F_{1,35} = 1,14$, $P > 0,05$). A análise *post-hoc* mostrou que a injeção combinada de veículo e espironolactona (2,5 ng) diminuiu o tempo da resposta de congelamento comparado a todos os outros tratamentos (Newman–Keuls, $P < 0,05$), efeito que foi bloqueado pela microinjeção prévia de RU38486 (5 ng [Newman–Keuls, $P > 0,05$]). A mesma análise não revelou diferenças entre os tratamentos com veículo + veículo, RU38486 + veículo, veículo + espironolactona (5 ng), RU38486 + espironolactona (5 ng) e (Newman–Keuls, $P > 0,05$).

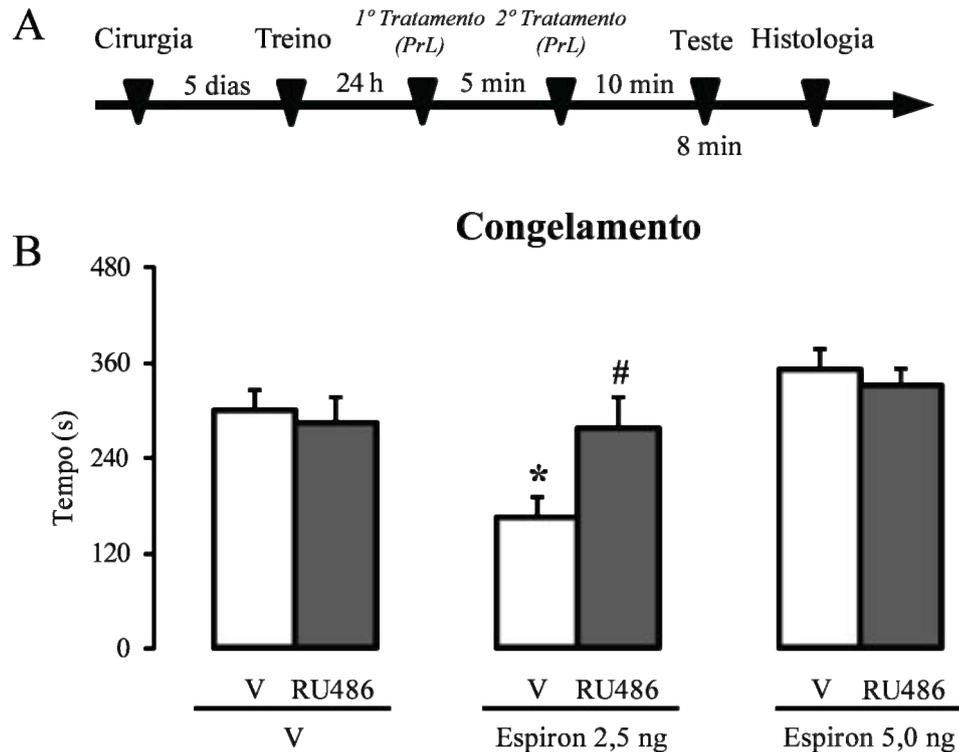


Figura 5. *Efeitos da administração prévia de RU38486 sobre os efeitos promovidos pelo antagonista MR microinjetado no PrL na expressão do medo condicionado contextual.* (A) Linha do tempo dos procedimentos experimentais referentes à avaliação dos efeitos da administração combinada de espironolactona e RU38486 (5 ng) injetados bilateralmente no PrL sobre a expressão da resposta de medo condicionado. (B) Média das respostas de congelamento nos animais que receberam microinjeções combinadas de V + V (n = 7), RU486 + V (n = 7), V + Espiron 2,5 ng (n = 7), RU486 + Espiron 2,5 ng (n = 6), e V + Espiron 5 ng (n = 7), RU486 + Espiron 5 ng (n = 7) e foram expostos ao mesmo contexto previamente pareado com choques nas patas. * Diferente do grupo V + V; # diferente do grupo V + Espiron 2,5 ng (P<0,05). V, veículo; RU486, RU38486; Espiron, espironolactona.

Experimento 4: Efeitos da administração de corticosterona no PrL na expressão da resposta de medo condicionado

A Fig. 6A mostra a linha do tempo dos procedimentos experimentais referentes à avaliação dos efeitos da administração bilateral de corticosterona no PrL sobre a expressão da resposta de medo condicionado. Como mostra a Fig. 6B, a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que a maior dose de corticosterona testada (1 ng) diminuiu a resposta de congelamento quando injetada no PrL antes do teste em comparação ao grupo tratado com veículo e corticosterona ($F_{3,19} = 6,28$, $P < 0,05$ [Newman-Keuls, $P < 0,05$]).

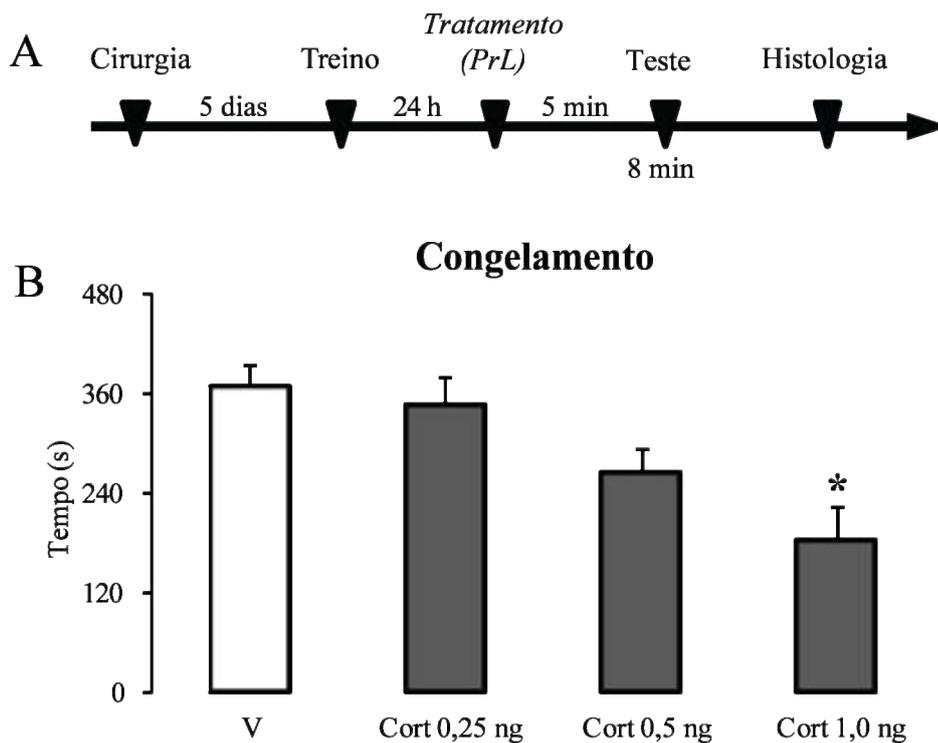


Figura 6. Efeitos das microinjeções de corticosterona no PrL sobre a expressão do medo condicionado contextual. (A) Linha do tempo referente aos procedimentos experimentais. (B) Média das respostas de congelamento nos animais que receberam microinjeções bilaterais de V (n = 5), Cort 0,25 ng (n = 5), Cort 0,5 ng (n = 7) e Cort 1 ng (n = 6) e foram expostos ao mesmo contexto previamente pareado com choques nas patas. * Diferente do grupo V ($P < 0,05$). V, veículo; Cort, corticosterona.

Experimento 5: Efeitos da administração combinada de antagonistas de receptores MR, GR e corticosterona no PrL na expressão da resposta de medo condicionado

A Fig. 7A mostra a linha do tempo dos procedimentos experimentais referentes à avaliação dos efeitos da administração de corticosterona (1 ng) e as consequências da administração prévia de espironolactona (0,5 ng) e RU38486 (5 ng) no PrL sobre a expressão da resposta de medo condicionado. A ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos do 1º tratamento ($F_{2,43} = 4,60$), 2º tratamento ($F_{1,43} = 10,15$) e interação entre os fatores 1º tratamento \times 2º tratamento ($F_{2,43} = 4,38$) ($P < 0,05$ em todos os casos). A análise *post-hoc* mostrou que os grupos tratados com corticosterona (1 ng) apresentaram uma diminuição no tempo de congelamento em comparação ao grupo tratado com veículo + veículo (Newman-Keuls, $P < 0,05$), um efeito que foi bloqueado pela administração prévia de RU38486 (5 ng) (Newman-Keuls, $P > 0,05$), mas não pela espironolactona (0,5 ng [Newman-Keuls, $P < 0,05$]). A mesma análise não revelou diferenças no tempo de congelamento entre os grupos tratados com veículo + corticosterona (1 ng) e espironolactona (0,5 ng) + corticosterona (1 ng) ([Newman-Keuls, $P > 0,05$] Fig. 7B).

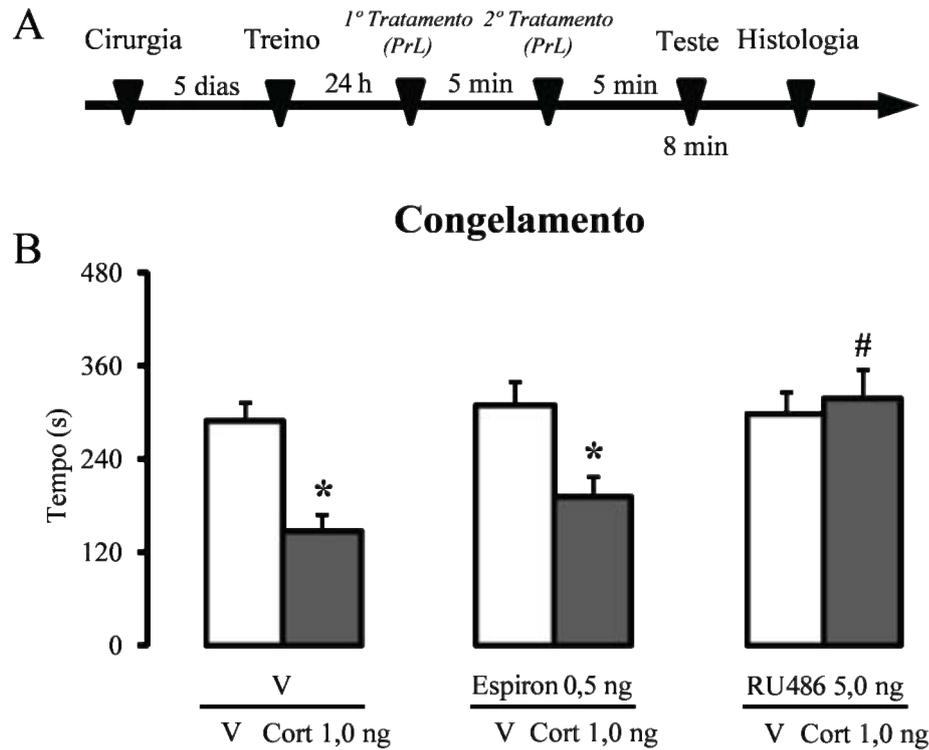


Figura 7. Efeitos da administração prévia de espironolactona e RU38486 sobre os efeitos promovidos pelo corticosterona microinjetada no PrL na expressão do medo condicionado contextual. (A) Linha do tempo referente aos procedimentos experimentais. (B) Média das respostas de congelamento nos animais que receberam microinjeções combinadas de V + V (n = 8), V + Cort (n = 6), Espiron 0,5 ng + V (n = 8), Espiron 0,5 ng + Cort (n = 9), e RU486 5 ng + V (n = 10), RU486 5 ng + Cort (n = 8) e foram expostos ao mesmo contexto previamente pareado com choques nas patas. * Diferente do grupo V + V; # diferente do grupo V + Cort e Espiron + Cort (P<0,05). V, veículo; Cort, corticosterona; Espiron, espironolactona e RU486, RU38486.

Experimento 6: Efeitos da espironolactona e corticosterona no PrL no tempo do comportamento de congelamento em ratos submetidos a um contexto diferente

Em relação aos efeitos da corticosterona e da espironolactona no PrL no tempo de congelamento de ratos submetidos a um contexto diferente, a ANOVA de uma via mostrou que as injeções de espironolactona (2,5 ng) e corticosterona (1 ng) no PrL não influenciaram a resposta de congelamento quando administradas em ratos expostos a um contexto diferente de onde foram condicionados comparados ao grupo tratado com veículo ($F_{2,17} = 0,28$, $P > 0,05$ [Tabela 1]).

Tabela 1. Efeitos da espironolactona e corticosterona na expressão do comportamento de congelamento em ratos condicionados e submetidos a um contexto diferente (n = 6 - 7 por grupo)

Tratamento	Congelamento (s)
V + V	146,50 ± 30,07
V + Espiron (2,5 ng)	188,57 ± 37,38
V + Cort (1 ng)	163,29 ± 45,57

Experimento 7: Efeitos da administração de AP7 no PrL na expressão da resposta de medo condicionado

A Fig. 8A mostra a linha do tempo dos procedimentos experimentais referentes à avaliação da microinjeção do antagonista de receptores NMDA (AP7) no PrL sobre a expressão da resposta de medo condicionado contextual. A ANOVA de uma via não mostrou efeitos significativos no tempo de congelamento em nenhuma das doses de AP7 administradas no PrL ($F_{3,29} = 1,60$, $P > 0,05$ [Fig. 8B]).

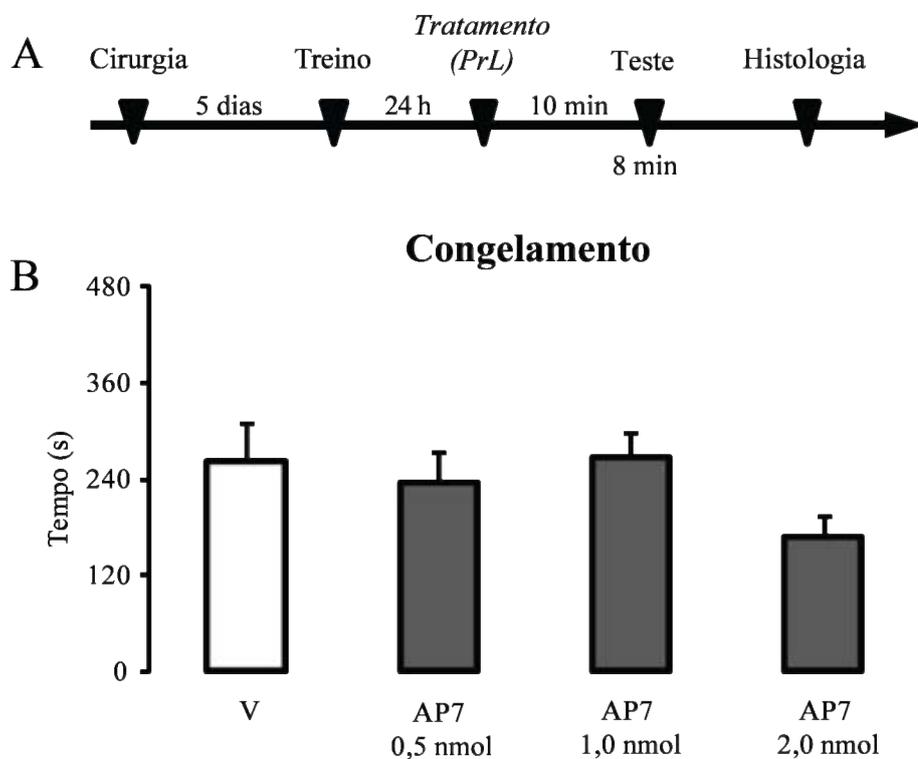


Figura 8. Efeito da administração de AP7 microinjetado no PrL sobre a expressão do medo condicionado contextual. (A) Linha do tempo referente aos procedimentos experimentais. (B) Média das respostas de congelamento nos animais que receberam microinjeções de V (n = 11), AP7 0,5 nmol (n = 11), AP7 1,0 nmol (n = 12) e AP7 2,0 nmol (n = 11) e foram expostos ao mesmo contexto previamente pareado com choques nas patas. * Diferente do grupo V ($P < 0,05$). V, veículo

Experimento 8: Efeitos da administração do antagonista de receptor NMDA combinado com corticosterona no PrL na expressão da resposta de medo condicionado

A Fig. 9A mostra a linha do tempo dos procedimentos experimentais referentes à avaliação dos efeitos da microinjeção combinada do antagonista de receptor NMDA, AP7, e corticosterona no PrL sobre a expressão da resposta de medo condicionado contextual. A ANOVA de duas vias não revelou efeitos significativos do 1º tratamento ($F_{1,29} = 2,07$, $P > 0,05$) e do 2º tratamento ($F_{1,29} = 0,40$, $P > 0,05$) isoladamente, mas revelou um efeito significativo na interação entre os fatores 1º tratamento \times 2º tratamento ($F_{1,29} = 8,48$, $P < 0,05$). A análise *post-hoc* mostrou que o grupo tratado com veículo + corticosterona (1 ng) apresentou uma diminuição no tempo de congelamento em comparação com o grupo tratado com veículo + veículo (Newman–Keuls, $P < 0,05$ [Fig. 9B]), um efeito que foi bloqueado pela administração prévia de AP7 (1 nmol [Newman–Keuls, $P > 0,05$]).

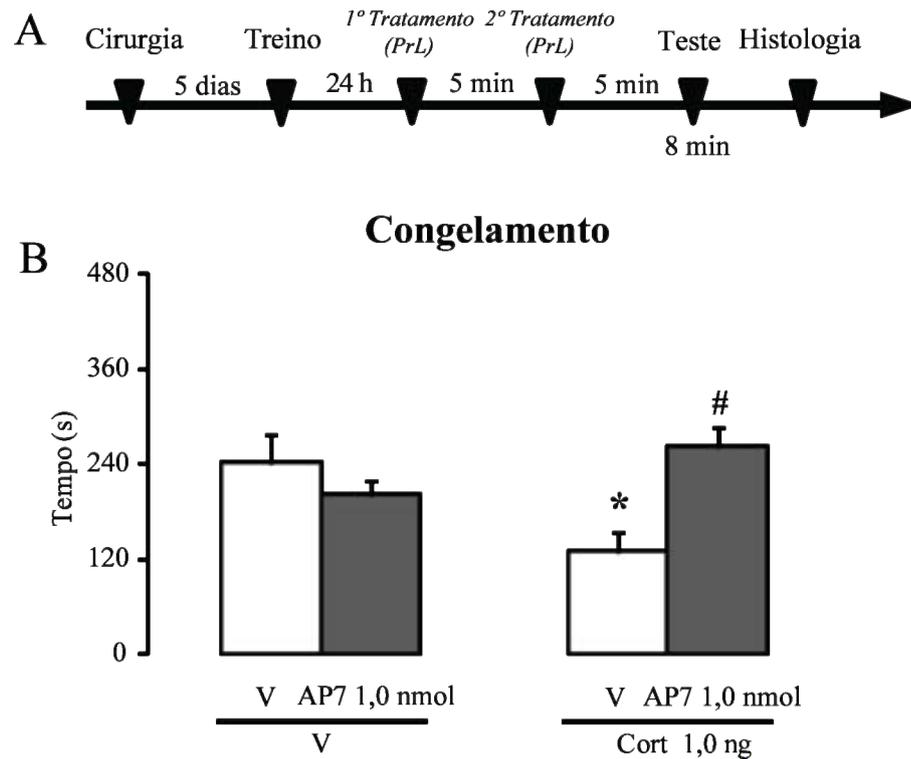


Figura 9. Efeito da administração prévia de AP7 sobre os efeitos promovidos pelo corticosterona microinjetada no PrL na expressão do medo condicionado contextual. (A) Linha do tempo dos procedimentos experimentais referentes à avaliação dos efeitos da administração combinada de AP7 (1 nmol) e corticosterona (1 ng) injetados bilateralmente no PrL sobre a expressão da resposta de medo condicionado. (B) Média das respostas de congelamento nos animais que receberam microinjeções combinadas de V + V (n = 8), V + AP7 (n = 8), V + Cort (n = 9) e AP7 + Cort (n = 8) e foram expostos ao mesmo contexto previamente pareado com choques nas patas. * Diferente do grupo V + V; # diferente do grupo V + Cort (P<0,05). V, veículo; Cort, corticosterona.

Experimento 9: Efeitos da administração de NMDA no PrL na expressão da resposta de medo condicionado

A Fig. 10A mostra a linha do tempo dos procedimentos experimentais referentes à avaliação dos efeitos da administração de NMDA (0,5; 1,0 ou 2,0 nmol/0,25 μ L) no PrL sobre a expressão da resposta de medo condicionado. A ANOVA uma vias revelou efeito significativo do tratamento com NMDA ($F_{3,41} = 3,83$, $P < 0,05$). A análise *post-hoc* mostrou que o grupo tratado com NMDA (2 nmol) apresentou uma diminuição no tempo de congelamento em relação ao grupo veículo (Fig. 10B).

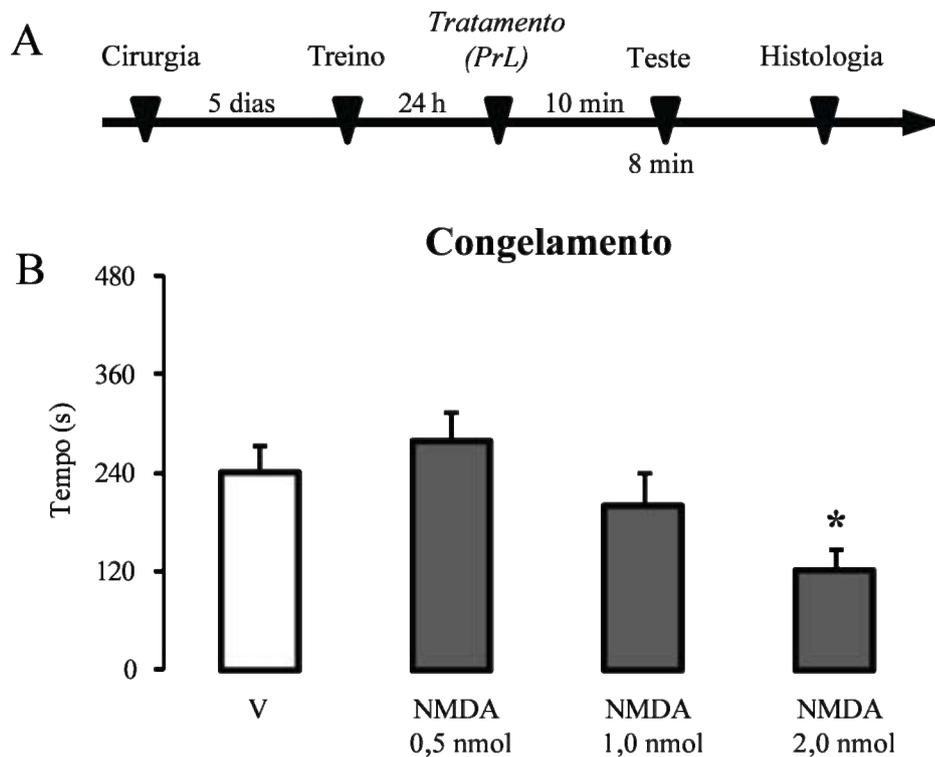


Figura 10. Efeito da administração de NMDA microinjetado no PrL sobre a expressão do medo condicionado contextual. (A) Linha do tempo referente aos procedimentos experimentais. (B) Média das respostas de congelamento nos animais que receberam microinjeções de veículo (n= 11), NMDA 0,5 nmol (n = 11), NMDA 1,0 nmol (n = 12) e NMDA 2,0 nmol (n = 11) e expostos ao mesmo contexto previamente pareado com choques nas patas. * Diferente do grupo veículo ($P < 0,05$).

Experimento 10: Efeitos do NMDA no PrL no tempo do comportamento de congelamento em ratos submetidos a um contexto diferente

Em relação aos efeitos do NMDA no PrL no tempo de congelamento de ratos submetidos a um contexto diferente, o teste *t* de Student mostrou que o tratamento com NMDA (2 nmol) não influenciaram a resposta de congelamento quando administradas em ratos expostos a um contexto diferente de onde foram condicionados comparados ao grupo tratado com veículo ($t = 0,02$, $P > 0,05$ [Tabela 2]).

Tabela 2. Efeitos da administração de NMDA no PrL na expressão do comportamento de congelamento em ratos submetidos a um contexto diferente (n = 9-10 por grupo)

Tratamento	Congelamento (s)
Veículo	78,90 ± 19,69
NMDA (2 nmol)	78,44 ± 18,00

Experimento 11: Efeitos da administração de NMDA e corticosterona no PrL no comportamento exploratório no campo aberto

A Fig. 11A mostra a linha do tempo dos procedimentos experimentais referentes à avaliação dos efeitos da administração de NMDA (2 nmol) e corticosterona (1 ng) no PrL sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do campo aberto. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças entre os grupos no número de cruzamentos ($F_{2,20} = 0,01$, $P > 0,05$ [Fig. 11B]), no número de levantamentos ($F_{2,20} = 0,92$, $P > 0,05$ [Fig. 11D]) nem no tempo gasto no centro ($F_{2,20} = 0,21$, $P > 0,05$ [Fig. 11E]) do campo aberto. A Fig. 11B ilustra a o número de cruzamentos dos animais tratados com veículo, NMDA ou corticosterona, minuto a minuto, durante o teste do campo aberto.

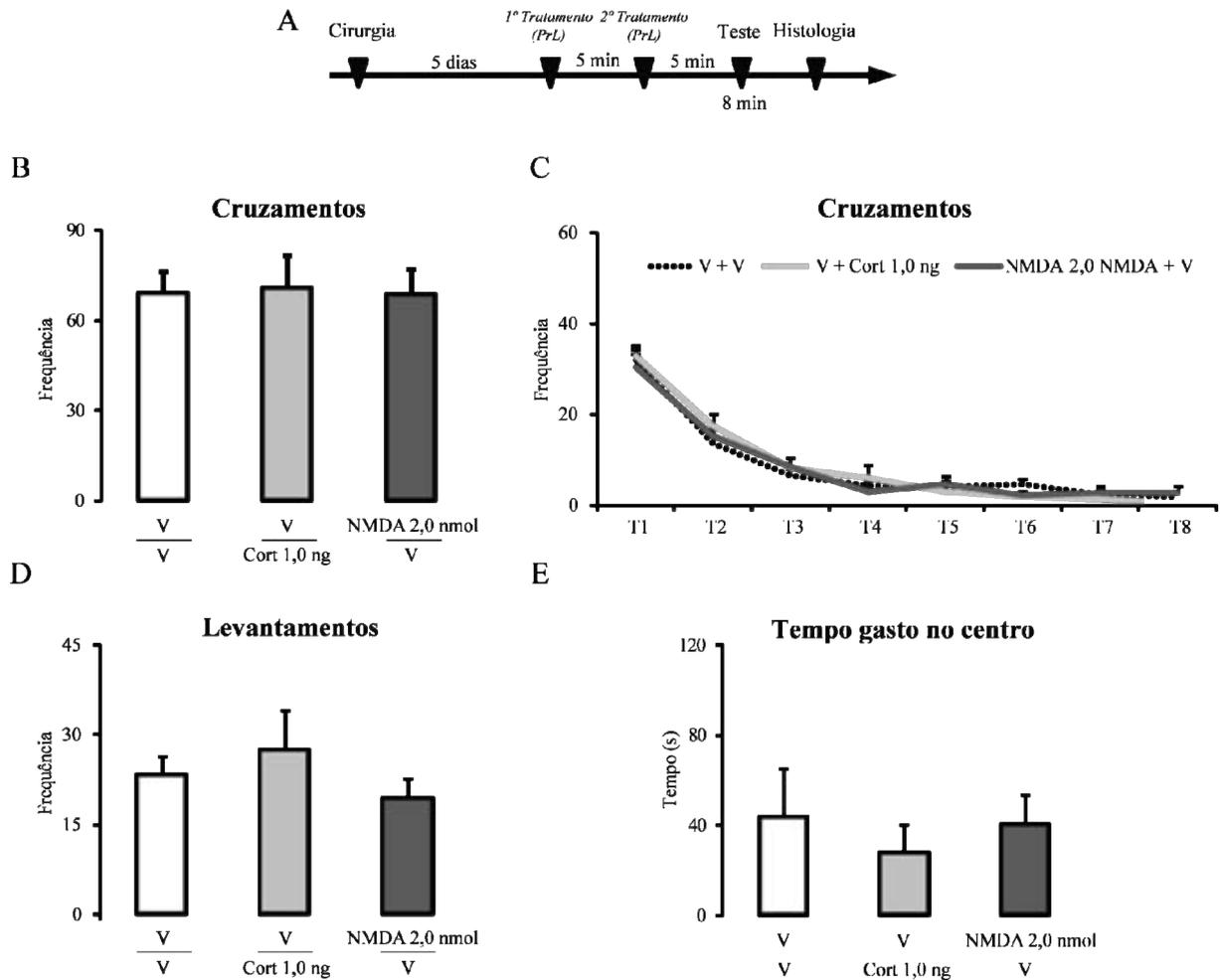


Figura 11. Efeitos da administração de NMDA e corticosterona no PrL sobre o comportamento exploratório de ratos no teste do campo aberto. (A) Linha do tempo referente aos procedimentos experimentais. (B) Média do número de cruzamentos, (C) número de cruzamentos, minuto a minuto, durante o teste do campo aberto, (D) média do número de levantamentos e (E) tempo gasto no centro do campo aberto de animais que receberam microinjeções de V (n = 8), NMDA 2 nmol (n = 6) e Cort 1 ng (n = 9) no PrL. V, veículo; Cort, corticosterona.

Experimento 12: Efeitos da administração de NMDA combinado com corticosterona no PrL na expressão da resposta de medo condicionado

A fim de avaliar em que medida os efeitos mediados pela corticosterona e as injeções de NMDA no PrL podem estar associados, investigou-se um possível efeito sinérgico entre o tratamento local com NMDA e corticosterona. A Fig. 12A mostra a linha do tempo dos procedimentos experimentais referentes à avaliação dos efeitos da microinjeção combinada de NMDA e corticosterona no PrL sobre a expressão da resposta de medo condicionado contextual. Os efeitos da administração combinada de doses inefetivas de NMDA (1 nmol) e corticosterona (0,5 ng) na expressão da resposta de congelamento estão ilustrados na Fig. 12B. A ANOVA de duas vias não revelou efeitos significativos do 1º tratamento ($F_{1,29} = 0,96$, $P > 0,05$), 2º tratamento ($F_{1,29} = 0,00$, $P > 0,05$) ou interação entre os fatores 1º tratamento \times 2º tratamento ($F_{1,29} = 0,22$, $P > 0,05$).

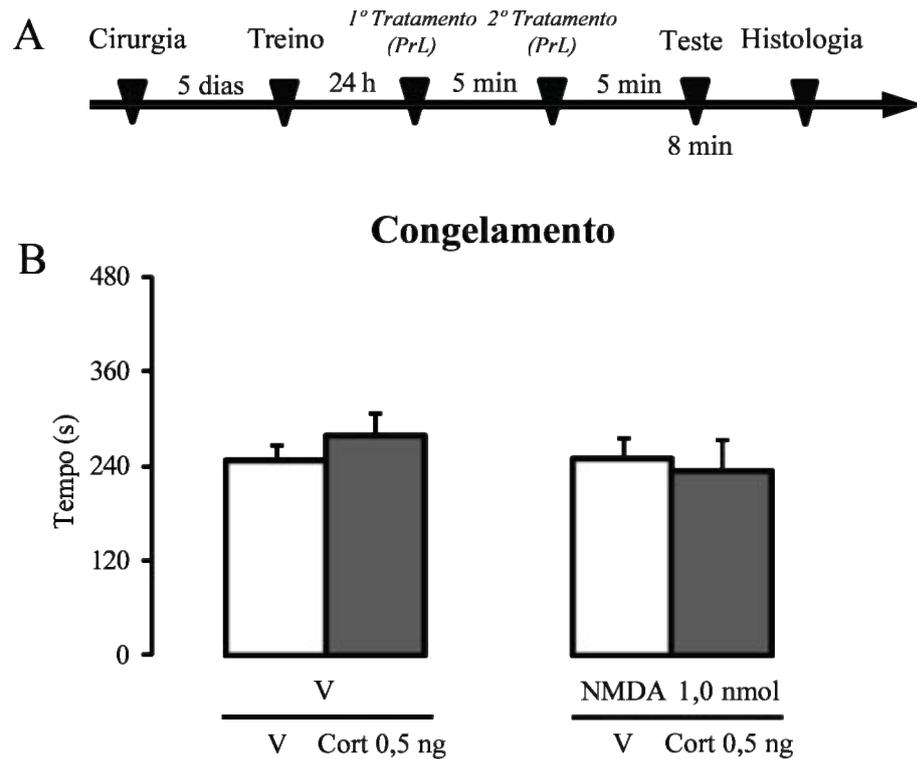


Figura 12. Efeito da administração combinada de NMDA e corticosterona no PrL sobre a expressão do medo condicionado contextual. (A) Linha do tempo dos procedimentos experimentais referentes à avaliação dos efeitos da administração combinada de NMDA (1 nmol) e corticosterona (0,5 ng). (B) Média das respostas de congelamento nos animais que receberam microinjeções combinadas de V + V (n = 8), V + Cort (n = 8), V + NMDA (n = 9) e NMDA + Cort (n = 8) e foram expostos ao mesmo contexto previamente pareado com choques nas patas. V, veículo; Cort, corticosterona.

DISCUSSÃO

Discussão

Os resultados do presente estudo sugerem que a liberação de glicocorticóides durante as respostas de medo condicionado contextual influencia a atividade do CPFm e a expressão do medo condicionado. A metirapona, um inibidor da síntese de corticosterona, atenuou essa resposta acompanhada por uma diminuição na expressão da proteína Fos no CPFm. Além disso, a espironolactona, um antagonista MR, diminuiu a resposta de congelamento quando injetada no PrL, um efeito que foi prevenido pelo pré-tratamento com o antagonista GR RU38486. A corticosterona endógena pode ativar tanto MR quanto GR, e os efeitos que foram observados após a administração do antagonista MR podem ser atribuídos às mudanças no equilíbrio da sinalização mediada por MR e GR e um redirecionamento das ações da corticosterona para GR. Corroborando a hipótese de que os efeitos antiaversivos induzidos pela corticosterona são mediados por um aumento na ativação de GR, a administração direta de corticosterona no PrL diminuiu a resposta de congelamento, efeito prevenido pelo pré-tratamento com o antagonista GR mas não pelo antagonista MR. A administração prévia do antagonista de receptor NMDA também preveniu os efeitos induzidos pelo tratamento com corticosterona sugerindo que, no PrL, parte dos efeitos rápidos dos glicocorticóides sobre a expressão do medo condicionado se dá por uma interação com o sistema glutamatérgico. A administração de NMDA no PrL induziu efeitos similares ao tratamento com corticosterona nessa região.

A administração do inibidor da síntese de corticosterona antes da exposição ao ambiente no qual os choques nas patas foram administrados previamente, produziu uma redução na resposta de congelamento associada com a diminuição da expressão de Fos no PrL, Cg1 e Cg2, sugerindo um papel importante de liberação desse hormônio na expressão de respostas de medo condicionado organizadas no CPFm. A explicação mais óbvia para os efeitos observados com administração de metirapona é que a ativação de receptores MR e GR

é influenciada pela diminuição dos níveis de corticosteróides (ROOZENDAALL; BOHUS; MCGAUGH, 1996). Um estudo prévio mostrou que a resposta de congelamento foi atenuada pela remoção das glândulas adrenais de ratos 1 h antes do teste, um efeito revertido pela administração sistêmica de corticosterona (BOHUS et al., 1987). Além disso, a administração de metirapona antes da sessão de teste, em ratos não-adrenalectomizados, também diminuiu o tempo da resposta de congelamento (ROOZENDAALL; BOHUS; MCGAUGH, 1996; DE OLIVEIRA et al., 2012). Ademais, estudos clínicos mostraram que a administração de metirapona foi capaz de reduzir de forma eficiente as concentrações de glicocorticóides plasmáticos e de diminuir a evocação de memórias emocionais de modo duradouro, sem alterar a evocação de respostas de conteúdo neutro (MARIN et al., 2011).

De forma interessante, alguns estudos têm demonstrado que o aumento das concentrações plasmáticas de glicocorticóides também pode reduzir respostas condicionadas de congelamento. Atsak et al. (2012) mostraram que a administração sistêmica de corticosterona antes da sessão de teste diminuiu a expressão de medo condicionado contextual em ratos. Em outro estudo, camundongos tratados por via sistêmica com corticosterona antes da sessão de teste também apresentaram uma redução na expressão do medo condicionado (CAI et al., 2006). Nessa mesma direção, em humanos, alguns estudos indicam que a administração exógena de cortisona - rapidamente absorvida e convertida em cortisol - pode prejudicar a recuperação da memória declarativa de informações com valência emocional (DE QUERVAIN et al., 2000; DE QUERVAIN et al., 2009). Com base nestes resultados, que indicam uma redução na expressão do medo condicionado após manipulações opostas das concentrações plasmáticas de corticosterona, pode ser observada a presença de uma função em forma de U invertido entre os níveis circulantes de corticosterona e a magnitude da expressão da resposta de medo condicionado contextual (JOELS; DE KLOET, 1994).

Entretanto, em relação aos efeitos observados com administração de metirapona, algumas explicações alternativas devem ser consideradas. A administração de metirapona pode resultar em um aumento nas concentrações de progesterona e deoxicorticosterona (KRUGERS et al., 2000). Esses hormônios podem potencializar as respostas que são mediadas por receptores GABA-A e bloquear canais dependentes de Ca^{2+} (FRENCH-MULLEN; SPENCE, 1991; LAMBERT et al., 1995; REDDY; ROGAWSKI, 2002). Tais efeitos podem estar subjacentes a uma ação ansiolítica do fármaco.

Evidências sugerem o envolvimento do CPFm na regulação da resposta ao estresse e essa estrutura parece estar envolvida na modulação de respostas endócrinas e comportamentais (DIORIO; VIAU; MEANEY, 1993; MOBBS et al., 2007; SOTRES-BAYON; QUIRK, 2010; HILL et al., 2011; JONES; MYERS; HERMAN, 2011). Em relação às respostas comportamentais, as regiões do PrL e do cíngulo parecem desempenhar um papel importante na expressão de comportamentos defensivos, incluindo o medo condicionado (SOTRES-BAYON; QUIRK, 2010; ALBRECHET-SOUZA; CARVALHO; BRANDAO, 2013). De fato, a importância da atividade do CPFm em ratos submetidos ao medo condicionado contextual tem sido recentemente destacada. A inativação farmacológica restrita ao PrL com tetrodotoxina (SIERRA-MERCADO et al., 2006), ou cloreto de cobalto (LISBOA et al., 2010) é capaz de reduzir a expressão de medo associado a um estímulo condicionado explícito ou contextual. Adicionalmente, estudos electrofisiológicos *in vivo* em ratos mostraram que os neurônios localizados no PrL respondem com um aumento na frequência de disparo durante a exposição ao estímulo condicionado aversivo (BAEG et al., 2001; BURGOS-ROBLES; VIDAL-GONZALEZ; QUIRK, 2009). A atividade intensa do PrL, induzida por um estímulo condicionado, também parece prejudicar o processo de extinção de memórias aversivas (BURGOS-ROBLES; VIDAL-GONZALEZ; QUIRK, 2009; SCHILLER; JOHANSEN, 2009; MAROUN, 2012).

O presente estudo não encontrou diferenças significativas entre os grupos na expressão da proteína Fos no IL. Estudos anteriores, voltados para a identificação de diferenças funcionais entre as sub-regiões do CPFm, sugerem que o IL está mais envolvido no processo de extinção do que na expressão de memória aversiva (SIERRA-MERCADO et al., 2006; MAROUN, 2012). A participação distinta do IL e do PrL em processos de memória tem sido atribuída à especificidade das projeções de cada área cortical (GABBOTT et al., 2005; HOOVER; VERTES, 2007). Considerando os núcleos do complexo amigdalóide, enquanto o IL se projeta diretamente às células inibitórias intercaladas e à divisão lateral do núcleo central do complexo amigdalóide, regulando o processo de extinção, o principal alvo de projeção do PrL é o BLA (MCDONALD, 1998; QUIRK et al., 2003; SOTRES-BAYON; QUIRK, 2010), sugerindo papéis distintos para cada região em funções límbico-cognitivas (VERTES, 2004).

Os hormônios corticosteróides secretados pelas glândulas adrenais atravessam rapidamente a barreira hemato-encefálica e em elevadas concentrações podem ligar-se aos receptores MR e GR (REUL; DE KLOET, 1985) localizados no CPFm de ratos e humanos (MEANEY; AITKEN, 1985; XING et al., 2004). Em um estudo clássico, que investigou a ligação de corticosteróides ao tecido cerebral, Diorio, Viau e Meaney (1993) mostraram que o CPFm de ratos é sensível tanto a agonistas seletivos para MR como a agonista específico para GR. Assim, considerando resultados anteriores e os do presente estudo, o PrL foi escolhido para avaliar a maneira pela qual a atividade dos MRs e GRs no CPFm influencia a expressão do medo condicionado contextual. Para abordar esta questão, foi investigado se microinjeções de antagonistas de MR ou GR no PrL antes do teste podem influenciar a resposta de medo condicionado. Os resultados mostraram que a dose intermediária de espironolactona (2,5 ng) causou uma diminuição na expressão do medo condicionado ao passo que a administração das outras doses e do RU38486 não influenciaram esta resposta.

Estes resultados confirmam os efeitos observados após a administração sistêmica e aguda ou intracerebroventricular (icv) de espironolactona antes da sessão teste que reduziram a expressão do congelamento condicionado em camundongos, enquanto a administração de RU38486 não produziu nenhum efeito sobre esta resposta (KORTE et al., 1995; ZHOU et al., 2011). Alguns estudos também sugerem que o antagonismo de MR pode influenciar a expressão de comportamentos do tipo ansioso visto que o tratamento crônico com eplerenona, um antagonista MR, diminuiu a exploração dos braços abertos de ratos submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado (HLAVACOVA; BAKOS; JEZOVA, 2010).

No presente trabalho, a maior concentração de espironolactona (5 ng) não causou alteração na resposta de congelamento. De forma similar, os efeitos comportamentais de administração icv de espironolactona no medo condicionado foram perdidos quando uma dose mais elevada foi administrada (KORTE et al., 1995). Contribuindo para o entendimento desse fenômeno, um estudo prévio caracterizou o perfil de ligação farmacológica de MR e GR mostrando que o RU38486 não tem afinidade significativa por MR, enquanto a espironolactona apresenta baixa afinidade por GR sem atividade intrínseca (RUPPRECHT et al., 1993). Assim, é possível que a maior concentração de espironolactona não tenha causado efeitos comportamentais por sua ação residual em GR.

Considerando as evidências acima mencionadas, o presente estudo investigou se os efeitos observados após a administração do antagonista MR no PrL poderiam ser atribuídos a uma prevalência das ações dos glicocorticóides endógenos em GR. Os resultados mostraram que a diminuição da resposta de medo condicionado induzida pela microinjeção de espironolactona foi abolida pela administração prévia de uma dose ineficaz (quando administrada isoladamente) de RU38486, sugerindo que o prejuízo da evocação da memória observado com o bloqueio de MR no PrL foi, ao menos em parte, causado por uma mudança no equilíbrio entre as atividades mediadas por MR e GR, possivelmente por um deslocamento

das ações da corticosterona em direção aos GR. De acordo com essa hipótese, os resultados apresentados mostraram que o tratamento com corticosterona diminuiu a resposta de congelamento, um efeito que foi abolido pelo pré-tratamento com RU38486 mas não pela espironolactona na dose de 0,5 ng. Além disso, os resultados apresentados também mostraram que nem espironolactona nem o tratamento com corticosterona promoveram qualquer influência direta na expressão do comportamento de congelamento em um contexto diferente de onde os ratos foram condicionados, sugerindo que o aumento da atividade de receptores GR no PrL antes da sessão de teste leva a uma seletiva diminuição da expressão do medo condicionado.

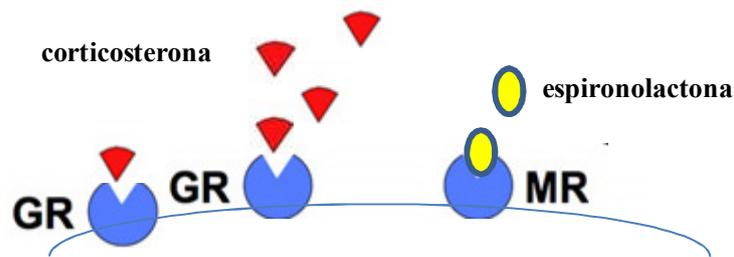


Figura 1. *Representação do deslocamento das ações da corticosterona atuando preferencialmente em GR em função da administração do antagonista MR ou do aumento das concentrações do hormônio.*

O CPFm é amplamente aceito como uma região-chave para a inibição de respostas inadequadas ao meio e conseqüentemente para processos adaptativos (NARAYANAN; HORST; LAUBACH, 2006; GREENBERG et al., 2013). É plausível que o equilíbrio entre GRs e MRs nessa região seja essencial para a adaptação comportamental (DE KLOET et al., 1998). Tem sido relatado que a exposição repetida a eventos aversivos leva a uma diminuição da expressão de GR e um aumento da expressão de MR no CPFm (CHIBA et al., 2012; ZHANG; HAN; SHI, 2012), sugerindo que uma mudança na taxa de ocupação de MR e GR pode ser um dos mecanismos subjacentes aos distúrbios emocionais associados ao estresse. É

amplamente conhecido que a corticosterona age primeiramente em MR, pois possui maior afinidade e atividade intrínseca por esses receptores (REUL; DE KLOET, 1985). Na região do PrL, quando a corticosterona atua secundariamente em GR, ela produz efeitos opostos. A extensão na qual essas ações opostas dos glicocorticoides em MR e GR contribui para o efeito geral observado, como visto durante situações de estresse, necessita ser investigada.

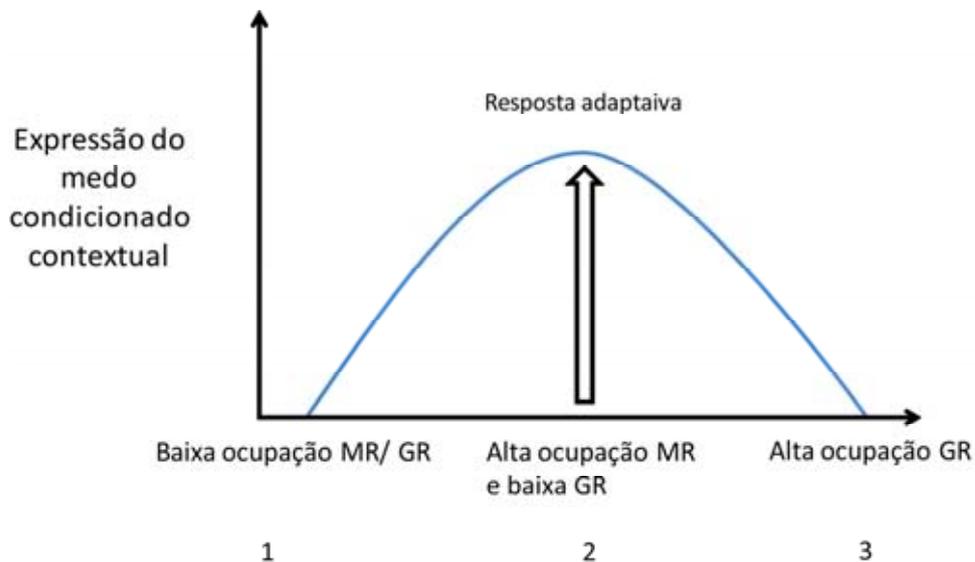


Figura 2. *Diagrama representando os efeitos da ocupação de receptores MR e GR na expressão do medo condicionado contextual.* Em 1, baixas concentrações endógenas de corticosterona (ex: administração de metirapona ou remoção das adrenais) levam a uma redução da resposta de congelamento supostamente influenciadas por uma diminuição da ocupação de MR e GR. Na situação representada em 2, a exposição a um contexto aversivo ativa o eixo HPA e dá-se início a um aumento nas concentrações de corticosterona, quando os receptores MR são primeiramente ativados seguido por uma ativação de receptores GR. Essa resposta é acompanhada pela expressão adaptativa do comportamento de congelamento. Em 3, a intensa e rápida ativação de receptores GR por altas concentrações de glicocorticóides (ex: administração exógena de corticosteróides ou estresse de grande intensidade) pode ativar mecanismos envolvidos na recuperação e término da resposta de estresse e influenciar uma diminuição da expressão do medo condicionado contextual.

Em uma revisão, de Kloet (2013) abordou o perfil funcional desse sistema binário de receptores corticosteróides e propôs que os processos modulatórios coordenados pela corticosterona, em resposta a desafios homeostáticos, operam via MR e GR em 2 modos complementares. Ele sugeriu que os MR fazem a mediação de processos de avaliação, como avaliação de risco e o início das reações de estresse, enquanto as ações mediadas por GR estão relacionadas à controlabilidade da situação, adaptação e término da resposta de estresse. Dado que a situação teste no presente estudo era aversiva, um rápido aumento nos níveis circulantes de corticosterona nos animais tratados com veículo era esperado (ROOZENDAAL; KOOLHAAS; BOHUS, 1992), que começa a completar a ocupação de MR e cada vez mais ocupar GR (YAU; SECKL, 2012). Como mencionado anteriormente, parte dos efeitos da metirapona na diminuição da resposta de congelamento é mediada pela diminuição das concentrações endógenas de corticosterona e pode influenciar não apenas os efeitos mediados por GR, mas também os efeitos mediados por MR (ROOZENDAALL; BOHUS; MCGAUGH, 1996). Considerando os resultados apresentados e estudos anteriores que mostraram uma diminuição da expressão da resposta de congelamento induzida pela administração de corticosterona (ATSAK et al., 2012), as alterações nas respostas comportamentais influenciadas por esse hormônio devem ser mediadas por um aumento tanto na atividade em MR como em GR. Portanto, embora nossos resultados tenham mostrado que um aumento das ações da corticosterona mediadas por GR seja crucial para esse processo, tanto a corticosterona como a metirapona podem levar ao mesmo resultado comportamental ao influenciar o equilíbrio entre as atividades mediadas por MR e GR e a recuperação da memória condicionada de medo em uma função em forma de U invertido (JOELS; DE KLOET, 1994).

Em relação à falta de efeito do antagonismo de GR *per se*, embora tenha sido observado um efeito do bloqueio de MR dependente de GRs, o oposto não é necessariamente

verdadeiro (ex: a facilitação da recuperação da memória). O equilíbrio entre a sinalização MR e GR no controle homeostático reflete os papéis diferentes e complementares da ativação GR e MR (DE KLOET, 2013). Esses receptores recrutam diferentes vias de sinalização e modulam de modo distinto os efeitos rápidos sobre a neurotransmissão (TASKER; DI; MALCHER-LOPES, 2006).

Os glicocorticóides podem influenciar indiretamente a atividade neuronal ao modularem diferentes sistemas neurotransmissores. Tem sido relatado que os glicocorticóides podem exercer suas ações ao aumentar a mobilização endocanabinóide (eCB) (DI et al., 2003). Esse mecanismo é mediado pela ativação de GRs localizados na membrana, os quais rapidamente estimulam a produção de eCBs no cérebro que por sua vez podem atuar em receptores canabinóides do tipo 1 (CB₁) localizados pré-sinápticamente e inibir liberação de neurotransmissores (POPOLI et al., 2012). Estudos prévios que confirmaram essa interação entre os glicocorticóides e o sistema eCB mostraram que os efeitos da administração sistêmica de corticosterona em ratos diminuíram a expressão do medo condicionado contextual por meio do aumento dos níveis de eCB no hipocampo (ATSAK et al., 2012) e que o estresse agudo aumentou a produção de eCB no CPFm por meio da ativação de GR (Hill 2011). A ativação de receptores CB₁ por eCBs, tais como 2-araquidonilglicerol e a anandamida, podem modular a transmissão sináptica ao regular tanto a liberação de GABA como glutamato (KANO et al., 2009; POPOLI et al., 2012; WANG et al., 2012). Em relação ao glutamato, mostrou-se que o estresse agudo aumenta rapidamente a liberação de glutamato no CPFm e que a administração sistêmica do antagonista GR preveniu essa resposta (MUSAZZI et al., 2010). Além disso, a aplicação *in vitro* de corticosterona nessa região induziu rapidamente a mobilização de vesículas sinápticas preparando os terminais para aumentar a liberação de glutamato em resposta ao estresse agudo (TRECCANI et al., 2014). Assim, baseado em evidências que sugerem que o estresse agudo e os glicocorticóides influenciam a

neurotransmissão glutamatérgica em algumas regiões cerebrais (KARST et al., 2005; WANG; WANG, 2009; YUEN et al., 2009; MUSAZZI; RACAGNI; POPOLI, 2011) e os dados observados no presente estudo, buscou-se investigar a possível interação entre os efeitos induzidos pelos glicocorticóides e a neurotransmissão glutamatérgica no CPFm sobre a expressão do medo condicionado contextual.

Assim, avaliou-se se o efeito observado após a administração de corticosterona no PrL poderia estar relacionado a um aumento da neurotransmissão glutamatérgica local via receptores ionotrópicos do tipo NMDA. De forma interessante, os dados apresentados mostraram que a diminuição do medo condicionado induzida pela administração de corticosterona no PrL foi inibida pela microinjeção prévia do antagonista de receptores NMDA (AP7) sugerindo que, ao menos em parte, a redução da resposta de congelamento observada com a administração do glicocorticóide no PrL depende da neurotransmissão mediada por receptores NMDA nessa região. Assim, para aprofundar a investigação da hipótese de que um aumento da neurotransmissão glutamatérgica mediada por um aumento da atividade dos receptores NMDA no CPFm poderia influenciar a expressão do medo condicionado contextual, um experimento foi realizado para avaliar os efeitos comportamentais da administração de NMDA no CPFm sobre a expressão dessa resposta. Os resultados mostraram que a administração de NMDA no PrL levou a uma diminuição seletiva da resposta de medo condicionado contextual sem alterar a expressão de congelamento em um contexto diferente ou a atividade locomotora *per se*.

A compreensão dos efeitos na circuitaria neuronal e nas respostas comportamentais que envolvem a atividade de receptores NMDA no CPFm é complexa. Um estudo utilizando a técnica de microdiálise mostrou que a infusão de NMDA no CPFm induz um aumento nas concentrações extracelulares tanto de GABA como de glutamato nessa mesma região (DEL ARCO; MORA, 2002). Entretanto, o antagonismo de receptores NMDA no CPFm parece

induzir efeitos opostos em interneurônios e neurônios excitatórios. Homayoun e Moghaddam (2007) mostraram que a atividade de interneurônios GABA corticais é altamente sensível à regulação tônica por receptores de NMDA enquanto a atividade basal de neurônios piramidais não foi diretamente regulada por receptores NMDA, mas era suscetível à desinibição. Assim, no CPFm, o bloqueio de receptores NMDA parecem preferencialmente influenciar a atividade de interneurônios inibitórios, sugerindo que o antagonismo desses receptores pode provocar uma excitação cortical por desinibição de neurônios piramidais. Sob essa perspectiva é interessante observar que a administração de um antagonista NMDA no CPFm também foi capaz de diminuir a expressão do medo condicionado contextual (RESSTEL; CORREA; GUIMARAES, 2008) e produzir efeitos do tipo ansiolítico no teste do labirinto em cruz elevado (STERN et al., 2010). A administração sistêmica de bloqueadores farmacológicos não-seletivos de receptores NMDA é capaz de desencadear uma profunda ativação cortical em roedores (SUZUKI et al., 2002; JACKSON; HOMAYOUN; MOGHADDAM, 2004) e voluntários humanos (VOLLENWEIDER et al., 1997). Estudos que utilizaram essa abordagem para o estudo de processos relacionados à esquizofrenia, mostraram que esse tratamento leva a uma alteração comportamental caracterizada por aumento da atividade locomotora e da liberação de glutamato no CPFm (MOGHADDAM et al., 1997; MOGHADDAM; ADAMS, 1998). Sugere-se que, além de uma interferência na neurotransmissão dopaminérgica cortical, parte dessa alteração comportamental seja decorrente de uma baixa atividade de receptores NMDA e de uma hiperativação glutamatérgica de receptores não-NMDA no CPFm (MOGHADDAM et al., 1997).

O CPFm tem-se destacado como uma importante região na regulação “*top-down*” das respostas de medo e do controle do impulso. Tem sido descrito que essa é uma região-chave para a inibição da ansiedade em humanos e do medo em modelos de estresse pós-traumático e ansiedade generalizada em roedores (GREENBERG et al., 2013; LIKHTIK et al., 2014).

Estudos anteriores mostraram que a administração de NMDA no PrL de ratos induziu um efeito do tipo ansiolítico no teste do labirinto em cruz elevado sem alteração na atividade locomotora (AHMADI et al., 2013) enquanto a inativação dessa região com a administração combinada de agonistas de receptores GABA-A e GABA-B causou um aumento nos níveis de ansiedade nesse mesmo teste (DE VISSER et al., 2011). Outro trabalho mostrou que a estimulação elétrica do CPFm inibiu o aumento da pressão sanguínea induzida por um estímulo aversivo condicionado (ZBROZYNA; WESTWOOD, 1991). Likhtik et al. (2014) destacam que uma diminuição do estado emocional aversivo está relacionada a um aumento da atividade do CPFm avaliada por disparo neuronal (BURGOS-ROBLES et al., 2007), potenciais de campo (LESTING et al., 2011), ativação de genes de expressão imediata (HERRY; MONS, 2004; KNAPSKA; MAREN, 2009) e níveis de oxigenação sanguínea (PHELPS et al., 2004).

Entretanto, como mostram os presentes dados imunoistoquímicos para a proteína Fos mencionados anteriormente, o CPFm também é recrutado em estados de medo intenso e ansiedade. Dadas as projeções que recebe tanto do BLA (região crítica para o processamento do medo) como do hipocampo ventral, sugere-se que essa região seja ativada durante a expressão do medo. Foi demonstrado que os disparos neuronais no CPFm em resposta à apresentação de estímulos condicionados de medo diminuem significativamente após a inativação do BLA (SOTRES-BAYON et al., 2012). Adicionalmente, como já referenciado, alguns estudos mostraram que a inativação do CPFm é capaz de reduzir a expressão de medo associado a um estímulo condicionado explícito ou contextual (SIERRA-MERCADO et al., 2006; LISBOA et al., 2010) assim como a estimulação elétrica dessa região mostrou ser capaz de aumentar a expressão do medo condicionado quando o procedimento de condicionamento foi realizado com estímulos aversivos (choques nas patas) de baixa intensidade (VIDAL-GONZALEZ et al., 2006).

Uma outra abordagem utilizada no presente trabalho para investigar possíveis efeitos sinérgicos entre as ações mediadas pelos glicocorticóides e o sistema glutamatérgico na expressão do medo condicionado foi a administração combinada de doses inefetivas de NMDA e corticosterona no CPFm. O resultado obtido não mostrou um efeito aditivo da administração combinada dos fármacos sobre a expressão da resposta de congelamento. Uma possível explicação para ausência de efeito dessa abordagem é que, por atuarem em mecanismos distintos (a corticosterona aumentando a probabilidade de liberação de glutamato e o NMDA atuando diretamente nos receptores NMDA), a dose de corticosterona utilizada seja insuficiente para promover seus efeitos nos terminais sinápticos ou por que parte de seus efeitos, ao influenciar a liberação de glutamato, também possa depender da ativação de receptores do tipo AMPA.

Considerando o que foi exposto até o momento, uma visão unificada do circuito prosencefálico do medo e da ansiedade tem sido proposta. Por meio de suas diversas conexões com diferentes níveis dos circuitos neurais envolvidos no processamento do medo e da ansiedade (GABBOTT et al., 2005; HOOVER; VERTES, 2007), tem sido proposto que o CPFm está posicionado de modo singular para processar a discriminação e a avaliação de ameaças durante a expressão do medo, bem como durante a sua supressão (SOTRES-BAYON et al., 2012). Em um estudo muito interessante, e que ilustra bem a complexidade da avaliação dinâmica dos sinais ameaçadores pelo circuito CPFm-BLA, Likhtik et al. (2014) mostraram que em camundongos que aprenderam a discriminar estímulos que sinalizavam uma situação de perigo de outra não-ameaçadora (neutra), a proporção de tempo na qual o PrL orienta a atividade do BLA é maior durante a supressão da resposta de congelamento quando um estímulo neutro é apresentado, ou seja, a direcionalidade predominante do ajuste entre essas regiões é maior no sentido do CPFm para o BLA. Essa relação é inversa durante a apresentação do estímulo condicionado aversivo, na qual o BLA tem maior predominância na

orientação dos ajustes da atividade entre o PrL e o BLA. Já os animais que não apresentavam a capacidade de discriminar os dois estímulos, ou seja, generalizavam a resposta de congelamento, não manifestaram alternância nessa direcionalidade entre as duas situações experimentais, sugerindo a mesma influência em ambos os sentidos do circuito nessa condição. Um estudo recente sugere que o processo de discriminação do medo recruta um mecanismo dependente de receptores NMDA localizados em neurônios excitatórios no PrL, que controlam e reduzem os processos de generalização aversiva (VIEIRA et al., 2015). Esses achados são consistentes com a ideia de que o circuito CPFm-BLA é muito importante na diminuição dos estados de medo e ansiedade (HERRY et al., 2008; PAPE; PARE, 2010). Likhtik et al. (2014) destacam que apesar de muitos trabalhos sugerirem que o IL esteja mais envolvido nos processos de diminuição do medo do que o PrL, como no processo de extinção (SOTRES-BAYON; QUIRK, 2010), a maioria dos registros dos fenômenos relatados foram realizados no PrL. Entretanto, como se tratam de registros de potenciais de campo em regiões contíguas, a possibilidade de que as oscilações observadas tenham sido conduzidas de uma região do CPFm para a outra não pode ser excluída.

Cabe destacar também a importância dos glicocorticóides e da neurotransmissão glutamatérgica no CPFm sobre os processos relacionados à memória de trabalho e questionar se a influência sobre esses processos poderia influenciar na recuperação das memórias emocionais. Entretanto, os efeitos dos glicocorticóides e da neurotransmissão glutamatérgica sobre a memória de trabalho ainda são controversos. Um estudo relatou que o aumento da atividade glutamatérgica no CPFm, induzida pelo estresse agudo (via ativação de receptores GR), favorece a performance de ratos submetidos a atividades que avaliam esse tipo de memória (YUEN et al., 2009). Por outro lado, um outro estudo mostrou que os efeitos rápidos decorrentes da administração glicocorticóides no PrL prejudicaram a memória de trabalho (BARSEGYAN et al., 2010).

Além disso, no presente estudo, não se pode excluir a possibilidade de que o aumento da ativação de MR, GR ou NMDA no PrL possa influenciar a atividade do eixo HPA e, conseqüentemente, respostas comportamentais. O CPFm é uma estrutura alvo para os efeitos dos glicocorticóides no mecanismo de *feedback* negativo do eixo HPA ativado por estresse psicológico agudo (DIORIO; VIAU; MEANEY, 1993; HERMAN et al., 2005; RADLEY; GOSSELINK; SAWCHENKO, 2009). Apesar do curto intervalo de tempo entre a administração de corticosterona ou NMDA no PrL e o teste do medo condicionado, sugere-se que a ativação de GR no PrL (HILL et al., 2011), assim como a ativação dessa região por meio da administração local do antagonista GABA bicuculina (JONES; MYERS; HERMAN, 2011) contribuam respectivamente para a recuperação/término da ativação do eixo HPA e atenuação da sua ativação induzida por estresse.

Em resumo, os dados apresentados mostraram que a inibição da síntese de corticosterona durante a expressão do medo condicionado contextual diminuiu a atividade do PrL e a resposta de congelamento. Os resultados também mostraram que o antagonismo de MR nesta região diminuiu o medo condicionado, um efeito que dependeu da ativação de receptores GR pela corticosterona endógena. A administração de corticosterona no PrL também reduziu o comportamento de congelamento, um efeito que é atribuído às mudanças no equilíbrio MR:GR em direção a um aumento de suas ações mediadas por GR e maior atividade de receptores NMDA. Esses resultados sugerem um papel importante para os efeitos rápido e não-genômicos do glicocorticóides e do sistema glutamatérgico no CPFm no controle cognitivo de experiências emocionais aprendidas.

CONCLUSÕES

Conclusões

- A exposição de ratos ao um contexto condicionado aversivo promoveu uma robusta ativação de células do CPFm indicando o envolvimento do CPFm na expressão do medo condicionado contextual;
- O inibidor da síntese de corticosterona metirapona, administrado antes do teste, diminuiu a expressão do medo condicionado e a expressão de proteína Fos no CPFm, sugerindo uma participação relevante dos efeitos rápidos dos glicocorticóides na expressão de respostas emocionais aprendidas;
- A administração de antagonistas MR no PrL antes do teste reduziu a expressão do medo condicionado contextual enquanto o antagonista GR não alterou a expressão dessa resposta;
- Sugere-se que os efeitos produzidos pelo antagonismo de MR e pela corticosterona no PrL sejam mediados por um desequilíbrio nas atividades mediadas por MR e GR no sentido de uma maior ativação de receptores GR;
- A administração combinada do antagonista NMDA e corticosterona, assim com a administração de NMDA no PrL, sugerem que os glicocorticóides interagem com o sistema glutamatérgico para induzir seus efeitos no CPFm na expressão do medo condicionado;
- De modo geral, os resultados sugerem que a liberação de corticosterona durante a apresentação de um estímulo condicionado aversivo influencia a atividade do CPFm de maneira que, uma mudança no equilíbrio das atividades mediadas por MR e GR, por meio de um aumento da atividade de GR, interage com o sistema glutamatérgico via aumento da atividade dos receptores NMDA influenciando a expressão da resposta de medo condicionado contextual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas

- AHMADI, H.; NASEHI, M.; ROSTAMI, P.; ZARRINDAST, M. R. Involvement of the nucleus accumbens shell dopaminergic system in prelimbic NMDA-induced anxiolytic-like behaviors. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 112-23, 2013.
- ALBRECHET-SOUZA, L.; BORELLI, K. G.; CARVALHO, M. C.; BRANDÃO, M. L. The anterior cingulate cortex is a target structure for the anxiolytic-like effects of benzodiazepines assessed by repeated exposure to the elevated plus maze and Fos immunoreactivity. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p. 387-397, 2009.
- ALBRECHET-SOUZA, L.; CARVALHO, M. C.; BRANDAO, M. L. D(1)-like receptors in the nucleus accumbens shell regulate the expression of contextual fear conditioning and activity of the anterior cingulate cortex in rats. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 5, p. 1045-57, 2013.
- ARNSTEN, A. F. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 410-22, 2009.
- ATSAK, P.; HAUER, D.; CAMPOLONGO, P.; SCHELLING, G.; MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Glucocorticoids interact with the hippocampal endocannabinoid system in impairing retrieval of contextual fear memory. **Proceedings of National the Academy of Science USA**, v. 109, n. 9, p. 3504-9, 2012.
- BAEG, E. H.; KIM, Y. B.; JANG, J.; KIM, H. T.; MOOK-JUNG, I.; JUNG, M. W. Fast spiking and regular spiking neural correlates of fear conditioning in the medial prefrontal cortex of the rat. **Cerebral Cortex**, v. 11, n. 5, p. 441-51, 2001.
- BARSEGYAN, A.; MACKENZIE, S. M.; KUROSE, B. D.; MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Glucocorticoids in the prefrontal cortex enhance memory consolidation and impair working memory by a common neural mechanism. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 107, n. 38, p. 16655-16660, 2010.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Crouching as an index of fear. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 67, n. 3, p. 370-5, 1969.
- BOHUS, B.; BENUS, R. F.; FOKKEMA, D. S.; KOOLHAAS, J. M.; NYAKAS, C.; VAN OORTMERSSEN, G. A.; PRINS, A. J.; DE RUITER, A. J.; SCHEURINK, A. J.; STEFFENS, A. B. Neuroendocrine states and behavioral and physiological stress responses. **Progress in Brain Research**, v. 72, p. 57-70, 1987.
- BOLLES, R. C. Species-specific defense reactions and avoidance learning. **Psychological Review**, v. 71, p. 32-48, 1970.
- BORSKI, R. J. Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 11, n. 10, p. 427-36, 2000.
- BOUTON, M. E. B., R. C. . Conditioned fear assessed by freezing and by the suppression of three different baselines. **Animal Learning and Behavior**, v. 8, p. 429-434, 1980.

BRANN, D. W. Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. **Neuroendocrinology**, v. 61, n. 3, p. 213-25, 1995.

BURGOS-ROBLES, A.; VIDAL-GONZALEZ, I.; QUIRK, G. J. Sustained conditioned responses in prelimbic prefrontal neurons are correlated with fear expression and extinction failure. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 26, p. 8474-82, 2009.

BURGOS-ROBLES, A.; VIDAL-GONZALEZ, I.; SANTINI, E.; QUIRK, G. J. Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. **Neuron**, v. 53, n. 6, p. 871-80, 2007.

CAI, W. H.; BLUNDELL, J.; HAN, J.; GREENE, R. W.; POWELL, C. M. Postreactivation glucocorticoids impair recall of established fear memory. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 37, p. 9560-6, 2006.

CALVO, N.; MARTIJENA, I. D.; MOLINA, V. A.; VOLOSIN, M. Metyrapone pretreatment prevents the behavioral and neurochemical sequelae induced by stress. **Brain Research**, v. 800, n. 2, p. 227-235, 1998.

CANNON, W. B. The James-Lange theory of emotions: a critical examination and an alternative theory. By Walter B. Cannon, 1927. **American Journal of Psychology**, v. 100, n. 3-4, p. 567-86, 1987.

CARTER, C. J. Topographical distribution of possible glutamatergic pathways from the frontal cortex to the striatum and substantia nigra in rats. **Neuropharmacology**, v. 21, n. 5, p. 379-83, 1982.

CHAUVEAU, F.; PIÉRARD, C.; TRONCHE, C.; COUTAN, M.; DROUET, I.; LISCIA, P.; BÉRACOCHEA, D. The hippocampus and prefrontal cortex are differentially involved in serial memory retrieval in non-stress and stress conditions. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 91, n. 4, p. 447-455, 2009.

CHIBA, S.; NUMAKAWA, T.; NINOMIYA, M.; RICHARDS, M. C.; WAKABAYASHI, C.; KUNUGI, H. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 39, n. 1, p. 112-9, 2012.

CHRISTIE, M. J.; JAMES, L. B.; BEART, P. M. An excitatory amino acid projection from rat prefrontal cortex to periaqueductal gray. **Brain Research Bulletin**, v. 16, n. 1, p. 127-9, 1986.

DAMASIO, A. R. **Descartes' error : emotion, reason, and the human brain**. New York: Putnam, 1994. 312 p.

_____. **The feeling of what happens : body and emotion in the making of consciousness**. 1st. New York: Harcourt Brace, 1999,.386 p.

DARWIN, C. **The expression of the emotions in man and animals**. London, : J. Murray, 1872. vi, 374 p.

- DE KLOET, E. R. Functional profile of the binary brain corticosteroid receptor system: mediating, multitasking, coordinating, integrating. **European Journal of Pharmacology**, v. 719, n. 1-3, p. 53-62, 2013.
- DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463-475, 2005.
- DE KLOET, E. R.; VREUGDENHIL, E.; OITZL, M. S.; JOELS, M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocrinology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 269-301, 1998.
- DE OLIVEIRA, A. R.; REIMER, A. E.; REIS, F. M.; BRANDAO, M. L. Conditioned fear response is modulated by a combined action of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and dopamine activity in the basolateral amygdala. **European Neuropsychopharmacology**, 2012.
- DE QUERVAIN, D. J.; AERNI, A.; SCHELLING, G.; ROOZENDAAL, B. Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 3, p. 358-70, 2009.
- DE QUERVAIN, D. J.; ROOZENDAAL, B.; NITSCH, R. M.; MCGAUGH, J. L.; HOCK, C. Acute cortisone administration impairs retrieval of long-term declarative memory in humans. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 4, p. 313-4, 2000.
- DE VISSER, L.; BAARS, A. M.; VAN 'T KLOOSTER, J.; VAN DEN BOS, R. Transient inactivation of the medial prefrontal cortex affects both anxiety and decision-making in male wistar rats. **Frontiers in Neuroscience**, v. 5, p. 102, 2011.
- DEL ARCO, A.; MORA, F. NMDA and AMPA/kainate glutamatergic agonists increase the extracellular concentrations of GABA in the prefrontal cortex of the freely moving rat: modulation by endogenous dopamine. **Brain Research Bulletin**, v. 57, n. 5, p. 623-30, 2002.
- DI, S.; MALCHER-LOPES, R.; HALMOS, K. C.; TASKER, J. G. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 4850-7, 2003.
- DI, S.; MAXSON, M. M.; FRANCO, A.; TASKER, J. G. Glucocorticoids regulate glutamate and GABA synapse-specific retrograde transmission via divergent nongenomic signaling pathways. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 393-401, 2009.
- DIORIO, D.; VIAU, V.; MEANEY, M. J. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 3839-3847, 1993.
- EVANSON, N. K.; HERMAN, J. P.; SAKAI, R. R.; KRAUSE, E. G. Nongenomic actions of adrenal steroids in the central nervous system. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, n. 8, p. 846-61, 2010.
- EVANSON, N. K.; TASKER, J. G.; HILL, M. N.; HILLARD, C. J.; HERMAN, J. P. Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. **Endocrinology**, v. 151, n. 10, p. 4811-9, 2010.

FENDT, M. F., M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 5, p. 743-60, 1999.

FILE, S. E.; ZANGROSSI, H., JR.; SANDERS, F. L.; MABBUTT, P. S. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 113, n. 3-4, p. 543-546, 1994.

FRENCH-MULLEN, J. M.; SPENCE, K. T. Neurosteroids block Ca²⁺ channel current in freshly isolated hippocampal CA1 neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 202, n. 2, p. 269-72, 1991.

FUSTER, J. M. The prefrontal cortex and its relation to behavior. **Progress in Brain Research**, v. 87, p. 201-11, 1991.

_____. Frontal lobe and cognitive development. **Journal of Neurocytology**, v. 31, n. 3-5, p. 373-85, 2002.

GABBOTT, P. L.; WARNER, T. A.; JAYS, P. R.; SALWAY, P.; BUSBY, S. J. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 492, n. 2, p. 145-77, 2005.

GREENBERG, T.; CARLSON, J. M.; CHA, J.; HAJCAK, G.; MUJICA-PARODI, L. R. Ventromedial prefrontal cortex reactivity is altered in generalized anxiety disorder during fear generalization. **Depression and Anxiety**, v. 30, n. 3, p. 242-50, 2013.

GROENEWEG, F. L.; KARST, H.; DE KLOET, E. R.; JOELS, M. Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. **Journal of Endocrinology**, v. 209, n. 2, p. 153-67, 2011.

GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 651-8, 2012.

HARVEY, B. H.; SHAHID, M. Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as neurobiological targets in anxiety and stress-related disorders: focus on pharmacology and preclinical translational models. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 4, p. 775-800, 2012.

HAUSER, M. D. Perseveration, inhibition and the prefrontal cortex: a new look. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 9, n. 2, p. 214-22, 1999.

HEIDBREDE, C. A.; GROENEWEGEN, H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 6, p. 555-79, 2003.

HERMAN, J. P.; OSTRANDER, M. M.; MUELLER, N. K.; FIGUEIREDO, H. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 29, n. 8, p. 1201-1213, 2005.

HERRY, C.; CIOCCHI, S.; SENN, V.; DEMMOU, L.; MULLER, C.; LUTHI, A. Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. **Nature**, v. 454, n. 7204, p. 600-6, 2008.

HERRY, C.; GARCIA, R. Prefrontal cortex long-term potentiation, but not long-term depression, is associated with the maintenance of extinction of learned fear in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 577-83, 2002.

HERRY, C.; MONS, N. Resistance to extinction is associated with impaired immediate early gene induction in medial prefrontal cortex and amygdala. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 781-90, 2004.

HILL, M. N.; MCLAUGHLIN, R. J.; PAN, B.; FITZGERALD, M. L.; ROBERTS, C. J.; LEE, T. T.; KARATSOREOS, I. N.; MACKIE, K.; VIAU, V.; PICKEL, V. M.; MCEWEN, B. S.; LIU, Q. S.; GORZALKA, B. B.; HILLARD, C. J. Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 29, p. 10506-15, 2011.

HLAVACOVA, N.; BAKOS, J.; JEZOVA, D. Eplerenone, a selective mineralocorticoid receptor blocker, exerts anxiolytic effects accompanied by changes in stress hormone release. **Journal of Psychopharmacology**, v. 24, n. 5, p. 779-86, 2010.

HOMAYOUN, H.; MOGHADDAM, B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 43, p. 11496-500, 2007.

HOOVER, W. B.; VERTES, R. P. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. **Brain Structure and Function**, v. 212, n. 2, p. 149-79, 2007.

JACKSON, M. E.; HOMAYOUN, H.; MOGHADDAM, B. NMDA receptor hypofunction produces concomitant firing rate potentiation and burst activity reduction in the prefrontal cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 101, n. 22, p. 8467-72, 2004.

JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 459-466, 2009.

JOELS, M.; DE KLOET, E. R. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. **Progress in Neurobiology**, v. 43, n. 1, p. 1-36, 1994.

JOELS, M.; SARABDJITSINGH, R. A.; KARST, H. Unraveling the time domains of corticosteroid hormone influences on brain activity: rapid, slow, and chronic modes. **Pharmacology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 901-38, 2012.

JOHNSON, L. R.; FARB, C.; MORRISON, J. H.; MCEWEN, B. S.; LEDOUX, J. E. Localization of glucocorticoid receptors at postsynaptic membranes in the lateral amygdala. **Neuroscience**, v. 136, n. 1, p. 289-99, 2005.

JONES, K. R.; MYERS, B.; HERMAN, J. P. Stimulation of the prelimbic cortex differentially modulates neuroendocrine responses to psychogenic and systemic stressors. **Physiology and Behavior**, v. 104, n. 2, p. 266-71, 2011.

KANO, M.; OHNO-SHOSAKU, T.; HASHIMOTODANI, Y.; UCHIGASHIMA, M.; WATANABE, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. **Physiology Reviews**, v. 89, n. 1, p. 309-80, 2009.

KARST, H.; BERGER, S.; ERDMANN, G.; SCHUTZ, G.; JOELS, M. Metaplasticity of amygdalar responses to the stress hormone corticosterone. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 107, n. 32, p. 14449-54, 2010.

KARST, H.; BERGER, S.; TURIAULT, M.; TRONCHE, F.; SCHÜTZ, G.; JOËLS, M. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 102, n. 52, p. 19204-19207, 2005.

KNAPSKA, E.; MAREN, S. Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear. **Learning and Memory**, v. 16, n. 8, p. 486-93, 2009.

KOLLACK-WALKER, S; DAY, H. W.; AKIL, H. Central Stress neurocircuits. In: Fink, G **Neuroendocrinology**. Boston, MA: Elsevier, 2009. p. 341-448.

KOLB, B. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. **Brain Research**, v. 320, n. 1, p. 65-98, 1984.

KORTE, S. M. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 2, p. 117-142, 2001.

KORTE, S. M.; DE BOER, S. F.; DE KLOET, E. R.; BOHUS, B. Anxiolytic-like effects of selective mineralocorticoid and glucocorticoid antagonists on fear-enhanced behavior in the elevated plus-maze. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, n. 4, p. 385-94, 1995.

KRUGERS, H. J.; MASLAM, S.; KORF, J.; JOELS, M.; HOLSBOER, F. The corticosterone synthesis inhibitor metyrapone prevents hypoxia/ischemia-induced loss of synaptic function in the rat hippocampus. **Stroke**, v. 31, n. 5, p. 1162-72, 2000.

LAMBERT, J. J.; BELELLI, D.; HILL-VENNING, C.; PETERS, J. A. Neurosteroids and GABAA receptor function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 16, n. 9, p. 295-303, 1995.

LEDOUX, J. **The EMOTIONAL BRAIN: THE MYSTERIOUS UNDERPINNINGS OF EMOTIONAL LIFE**. Simon & Schuster, 1998.

LEDOUX, J. Rethinking the emotional brain. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 653-76, 2012.

LEDOUX, J. E. **The emotional brain : the mysterious underpinnings of emotional life**. New York: Simon & Schuster, 1996. 384 p.

_____. **Synaptic self : how our brains become who we are**. New York: Viking, 2002. 406 p.

LESTING, J.; NARAYANAN, R. T.; KLUGE, C.; SANGHA, S.; SEIDENBECHER, T.; PAPE, H. C. Patterns of coupled theta activity in amygdala-hippocampal-prefrontal cortical circuits during fear extinction. **PloS One**, v. 6, n. 6, p. e21714, 2011.

LIKHTIK, E.; PELLETIER, J. G.; PAZ, R.; PARÉ, D. Prefrontal control of the amygdala. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 32, p. 7429-7437, 2005.

LIKHTIK, E.; STUJENSKE, J. M.; TOPIWALA, M. A.; HARRIS, A. Z.; GORDON, J. A. Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 106-113, 2014.

LISBOA, S. F.; STECCHINI, M. F.; CORREA, F. M.; GUIMARAES, F. S.; RESSTEL, L. B. Different role of the ventral medial prefrontal cortex on modulation of innate and associative learned fear. **Neuroscience**, v. 171, n. 3, p. 760-8, 2010.

MARIN, M. F.; HUPBACH, A.; MAHEU, F. S.; NADER, K.; LUPIEN, S. J. Metyrapone administration reduces the strength of an emotional memory trace in a long-lasting manner. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 8, p. E1221-7, 2011.

MAROUN, M. Medial Prefrontal Cortex: Multiple Roles in Fear and Extinction. **Neuroscientist**, 2012.

MCDONALD, A. J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Progress in Neurobiology**, v. 55, n. 3, p. 257-332, 1998.

MCEWEN, B. S.; DAVIS, P. G.; PARSONS, B.; PFAFF, D. W. The brain as a target for steroid hormone action. **Annual Reviews of Neuroscience**, v. 2, p. 65-112, 1979.

MCEWEN, B. S.; DE KLOET, E. R.; ROSTENE, W. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. **Physiological Reviews**, v. 66, n. 4, p. 1121-88, 1986.

MCEWEN, B.S. Stress: Homeostasis, rheostasis, allostasis and allostatic load. In: Fink, G **Neuroendocrinology**. Boston, MA: Elsevier, 2009. p. 10-14.

MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, n. 2, p. 205-10, 2002.

MEANEY, M. J.; AITKEN, D. H. [3H]Dexamethasone binding in rat frontal cortex. **Brain Research**, v. 328, n. 1, p. 176-80, 1985.

MIKICS, E.; BARSY, B.; BARSVÁRI, B.; HALLER, J. Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. **Hormones and Behavior**, v. 48, n. 2, p. 152-162, 2005.

MIKICS, E.; KRUK, M. R.; HALLER, J. Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids on aggressive behavior in male rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, n. 5, p. 618-35, 2004.

MOBBS, D.; PETROVIC, P.; MARCHANT, J. L.; HASSABIS, D.; WEISKOPF, N.; SEYMOUR, B.; DOLAN, R. J.; FRITH, C. D. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. **Science**, v. 317, n. 5841, p. 1079-1083, 2007.

MOGHADDAM, B.; ADAMS, B.; VERMA, A.; DALY, D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 2921-7, 1997.

MOGHADDAM, B.; ADAMS, B. W. Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1349-52, 1998.

MORROW, L. E.; MCCLELLAN, J. L.; KLIR, J. J.; KLUGER, M. J. The CNS site of glucocorticoid negative feedback during LPS- and psychological stress-induced fevers. **American Journal of Physiology**, v. 271, n. 3 Pt 2, p. R732-7, 1996.

MUSAZZI, L.; MILANESE, M.; FARISELLO, P.; ZAPPETTINI, S.; TARDITO, D.; BARBIERO, V. S.; BONIFACINO, T.; MALLEI, A.; BALDELLI, P.; RACAGNI, G.; RAITERI, M.; BENFENATI, F.; BONANNO, G.; POPOLI, M. Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. **PloS One**, v. 5, n. 1, p. e8566-e8566, 2010.

MUSAZZI, L.; RACAGNI, G.; POPOLI, M. Stress, glucocorticoids and glutamate release: Effects of antidepressant drugs. **Neurochemistry International**, 2011.

NARAYANAN, N. S.; HORST, N. K.; LAUBACH, M. Reversible inactivations of rat medial prefrontal cortex impair the ability to wait for a stimulus. **Neuroscience**, v. 139, n. 3, p. 865-76, 2006.

NIEUWENHUYNS, R. The neocortex. An overview of its evolutionary development, structural organization and synaptology. **Anatomy and Embryology (Berl)**, v. 190, n. 4, p. 307-37, 1994.

OCHSNER, K. N.; GROSS, J. J. The cognitive control of emotion. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 9, n. 5, p. 242-249, 2005.

PANKSEPP, J. Neurologizing the Psychology of Affects: How Appraisal-Based Constructivism and Basic Emotion Theory Can Coexist. **Perspectives on Psychological Science**, v. 2, n. 3, p. 281-96, 2007.

PAPE, H. C.; PARE, D. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 2, p. 419-63, 2010.

PAXINOS, G., WATSON, C. . **The rat brain in Stereotaxic Coordinates**. New York: Academic Press, 2007.

PHELPS, E. A.; DELGADO, M. R.; NEARING, K. I.; LEDOUX, J. E. Extinction learning in humans: role of the amygdala and vmPFC. **Neuron**, v. 43, n. 6, p. 897-905, 2004.

- POPOLI, M.; YAN, Z.; MCEWEN, B. S.; SANACORA, G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 22-37, 2012.
- PRAGER, E. M.; BRIELMAIER, J.; BERGSTROM, H. C.; MCGUIRE, J.; JOHNSON, L. R. Localization of mineralocorticoid receptors at mammalian synapses. **PloS One**, v. 5, n. 12, p. e14344, 2010.
- PRAGER, E. M.; JOHNSON, L. R. Stress at the synapse: signal transduction mechanisms of adrenal steroids at neuronal membranes. **Science Signaling**, v. 2, n. 86, p. re5, 2009.
- QUIRK, G. J.; LIKHTIK, E.; PELLETIER, J. G.; PARÉ, D. Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 25, p. 8800-8807, 2003.
- RADLEY, J. J.; GOSSELINK, K. L.; SAWCHENKO, P. E. A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 22, p. 7330-7340, 2009.
- REDDY, D. S.; ROGAWSKI, M. A. Stress-induced deoxycorticosterone-derived neurosteroids modulate GABA(A) receptor function and seizure susceptibility. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 9, p. 3795-805, 2002.
- REIMER, A. E.; DE OLIVEIRA, A. R.; BRANDAO, M. L. Glutamatergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray matter modulate the expression of conditioned freezing and fear-potentiated startle. **Neuroscience**, v. 219, p. 72-81, 2012.
- REIS, F. M.; ALBRECHET-SOUZA, L.; FRANCI, C. R.; BRANDAO, M. L. Risk assessment behaviors associated with corticosterone trigger the defense reaction to social isolation in rats: role of the anterior cingulate cortex. **Stress**, v. 15, n. 3, p. 318-28, 2012.
- RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M.; GUIMARAES, F. S. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 18, n. 9, p. 2027-35, 2008.
- REUL, J. M.; DE KLOET, E. R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. **Endocrinology**, v. 117, n. 6, p. 2505-11, 1985.
- RODGERS, R. J.; HALLER, J.; HOLMES, A.; HALASZ, J.; WALTON, T. J.; BRAIN, P. F. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiology & Behavior**, v. 68, n. 1-2, p. 47-53, 1999.
- RODRIGUES, S. M.; LEDOUX, J. E.; SAPOLSKY, R. M. The influence of stress hormones on fear circuitry. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, p. 289-313, 2009.
- ROOZENDAAL, B.; KOOLHAAS, J. M.; BOHUS, B. Central amygdaloid involvement in neuroendocrine correlates of conditioned stress responses. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 4, n. 4, p. 483-9, 1992.

ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 67, n. 2, p. 176-9, 1997.

ROOZENDAAL, B.; WILLIAMS, C. L.; MCGAUGH, J. L. Glucocorticoid receptor activation in the rat nucleus of the solitary tract facilitates memory consolidation: involvement of the basolateral amygdala. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 4, p. 1317-23, 1999.

ROOZENDAALL, B.; BOHUS, B.; MCGAUGH, J. L. Dose-dependent suppression of adrenocortical activity with metyrapone: Effects on emotion and memory. **Psychoneuroendocrinology**, v. 21, n. 8, p. 681-693, 1996.

RUPPRECHT, R.; REUL, J. M.; VAN STEENSEL, B.; SPENGLER, D.; SODER, M.; BERNING, B.; HOLSBOER, F.; DAMM, K. Pharmacological and functional characterization of human mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands. **European Journal of Pharmacology**, v. 247, n. 2, p. 145-54, 1993.

RUSSELL, J. A. Core affect and the psychological construction of emotion. **Psychological Reviews**, v. 110, n. 1, p. 145-72, 2003.

SAPOLSKY, R. M. **Why zebras don't get ulcers**. 3rd. New York: Times Books, 2004. 539 p.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55-89, 2000.

SARABDJITSINGH, R. A.; CONWAY-CAMPBELL, B. L.; LEGGETT, J. D.; WAITE, E. J.; MEIJER, O. C.; DE KLOET, E. R.; LIGHTMAN, S. L. Stress responsiveness varies over the ultradian glucocorticoid cycle in a brain-region-specific manner. **Endocrinology**, v. 151, n. 11, p. 5369-79, 2010.

SCHILLER, D.; JOHANSEN, J. Prelimbic prefrontal neurons drive fear expression: a clue for extinction--reconsolidation interactions. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 43, p. 13432-4, 2009.

SCHULKIN, J.; MORGAN, M. A.; ROSEN, J. B. A neuroendocrine mechanism for sustaining fear. **Trends in Neuroscience**, v. 28, n. 12, p. 629-35, 2005.

SIERRA-MERCADO, D., JR.; CORCORAN, K. A.; LEBRON-MILAD, K.; QUIRK, G. J. Inactivation of the ventromedial prefrontal cortex reduces expression of conditioned fear and impairs subsequent recall of extinction. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 6, p. 1751-8, 2006.

SOTRES-BAYON, F.; QUIRK, G. J. Prefrontal control of fear: more than just extinction. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 20, n. 2, p. 231-235, 2010.

SOTRES-BAYON, F.; SIERRA-MERCADO, D.; PARDILLA-DELGADO, E.; QUIRK, G. J. Gating of fear in prelimbic cortex by hippocampal and amygdala inputs. **Neuron**, v. 76, n. 4, p. 804-12, 2012.

SPOOREN, W.; BALLARD, T.; GASPARINI, F.; AMALRIC, M.; MUTEL, V.; SCHREIBER, R. Insight into the function of Group I and Group II metabotropic glutamate (mGlu) receptors: behavioural characterization and implications for the treatment of CNS disorders. **Behavioral Pharmacology**, v. 14, n. 4, p. 257-77, 2003.

STERN, C. A.; DO MONTE, F. H.; GAZARINI, L.; CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. **Neuroscience**, v. 170, n. 1, p. 214-22, 2010.

SUZUKI, Y.; JODO, E.; TAKEUCHI, S.; NIWA, S.; KAYAMA, Y. Acute administration of phencyclidine induces tonic activation of medial prefrontal cortex neurons in freely moving rats. **Neuroscience**, v. 114, n. 3, p. 769-79, 2002.

TASKER, J. G.; DI, S.; MALCHER-LOPES, R. Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5549-56, 2006.

TRECCANI, G.; MUSAZZI, L.; PEREGO, C.; MILANESE, M.; NAVA, N.; BONIFACINO, T.; LAMANNA, J.; MALGAROLI, A.; DRAGO, F.; RACAGNI, G.; NYENGAARD, J. R.; WEGENER, G.; BONANNO, G.; POPOLI, M. Stress and corticosterone increase the readily releasable pool of glutamate vesicles in synaptic terminals of prefrontal and frontal cortex. **Molecular Psychiatry**, v. 19, n. 4, p. 433-43, 2014.

VERTES, R. P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse**, v. 51, n. 1, p. 32-58, 2004.

VIDAL-GONZALEZ, I.; VIDAL-GONZALEZ, B.; RAUCH, S. L.; QUIRK, G. J. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. **Learning and Memory**, v. 13, n. 6, p. 728-33, 2006.

VIEIRA, P. A.; CORCHES, A.; LOVELACE, J. W.; WESTBROOK, K. B.; MENDOZA, M.; KORZUS, E. Prefrontal NMDA receptors expressed in excitatory neurons control fear discrimination and fear extinction. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 119, p. 52-62, 2015.

VOLLENWEIDER, F. X.; LEENDERS, K. L.; OYE, I.; HELL, D.; ANGST, J. Differential psychopathology and patterns of cerebral glucose utilisation produced by (S)- and (R)-ketamine in healthy volunteers using positron emission tomography (PET). **European Neuropsychopharmacology**, v. 7, n. 1, p. 25-38, 1997.

WANG, C. C.; WANG, S. J. Modulation of presynaptic glucocorticoid receptors on glutamate release from rat hippocampal nerve terminals. **Synapse**, v. 63, n. 9, p. 745-51, 2009.

WANG, M.; HILL, M. N.; ZHANG, L.; GORZALKA, B. B.; HILLARD, C. J.; ALGER, B. E. Acute restraint stress enhances hippocampal endocannabinoid function via glucocorticoid receptor activation. **Journal of Psychopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 56-70, 2012.

WATKINS, J. C.; JANE, D. E. The glutamate story. **British Journal of Pharmacology**, v. 147 Suppl 1, p. S100-8, 2006.

XING, G. Q.; RUSSELL, S.; WEBSTER, M. J.; POST, R. M. Decreased expression of mineralocorticoid receptor mRNA in the prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 7, n. 2, p. 143-53, 2004.
YAU, J. L.; SECKL, J. R. Local amplification of glucocorticoids in the aging brain and impaired spatial memory. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 4, p. 24, 2012.

YUEN, E. Y.; LIU, W.; KARATSOREOS, I. N.; FENG, J.; MCEWEN, B. S.; YAN, Z. Acute stress enhances glutamatergic transmission in prefrontal cortex and facilitates working memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 106, n. 33, p. 14075-9, 2009.

ZBROZYNA, A. W.; WESTWOOD, D. M. Stimulation in prefrontal cortex inhibits conditioned increase in blood pressure and avoidance bar pressing in rats. **Physiology and Behavior**, v. 49, n. 4, p. 705-8, 1991.

ZHANG, J. H.; HAN, F.; SHI, Y. X. Single prolonged stress induces changes in the expression of mineralocorticoid receptor in the medial prefrontal cortex in a rat model of post-traumatic stress disorder. **Molecular Medicine Reports**, v. 6, n. 2, p. 330-4, 2012.

ZHOU, M.; KINDT, M.; JOELS, M.; KRUGERS, H. J. Blocking mineralocorticoid receptors prior to retrieval reduces contextual fear memory in mice. **PloS One**, v. 6, n. 10, p. e26220, 2011.

Apêndice A.

Estudo neuromorfológico de aferências corticais, provenientes do PrL, à porção ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal (vIPAG): localização de fibras corticais, neurônios GABAérgicos e neurônios parvalbumina-positivos na vIPAG, por meio de imunofluorescência.

Baseado no conhecimento das estruturas cerebrais envolvidas no processamento do medo e da ansiedade e suas interconexões (CHRISTIE; JAMES; BEART, 1986; CARRIVE et al., 1997; SOTRES-BAYON; QUIRK, 2010), o presente estudo buscou avançar na investigação de um possível mecanismo neural envolvido na regulação cortical do comportamento defensivo. Assim, avaliamos as características morfológicas de uma conhecida via neural que conecta o PrL à substância cinzenta periaquedutal ventrolateral (vIPAG) (GABBOTT et al., 2005) por meio da utilização de técnicas de neurotraçamento e imunofluorescência.

Materiais e métodos

Foram utilizados 4 ratos Wistar machos com peso médio de 270 gramas, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo, *Campus* de Ribeirão Preto, Brasil, alojados, em grupo de quatro, em uma gaiola-viveiro (30 × 45 × 18 cm) de polietileno, e mantidos em condições controladas de temperatura (21-23°C) e em ciclo de claro-escuro de 12/12 h (luzes acesas às 07:00 h) por 72 h antes do início dos experimentos, com livre acesso a alimento e água. Os procedimentos deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação (CEUA) da Universidade de São Paulo, *Campus* de Ribeirão Preto (Protocolo nº 11.1.1300.53.1).

Os animais foram submetidos ao procedimento de cirurgia estereotáxica previamente descrito para a implantação de cânulas-guia no PrL e microinjeção do neurotraçador fluorescente associado à dextrana, de característica preferencialmente anterógrada, (BDA – amina de dextrana biotinizada, peso molecular 10 kDa [Life Technologies, EUA]).

O BDA a 10% foi solubilizado em solução tampão fosfato e as microinjeções realizadas durante a cirurgia, enquanto os animais estavam anestesiados. Um volume de 0,5 µL de BDA por hemisfério foi injetado durante 300 s, e a agulha foi mantida no sítio de injeção por 120 s adicionais para evitar o refluxo da solução.

Catorze dias após a cirurgia, os animais foram profundamente anestesiados, perfundidos por via intracardíaca e tiveram seus encéfalos removidos, tratados e congelados como descrito no Experimento 1. Posteriormente, os encéfalos foram seccionados em um criostato e cortes histológicos coronais seriados com espessura de 15 µm foram coletados e dispostos em lâminas não gelatinizadas extrabranças para o ensaio de imunohistoquímica. As coordenadas das secções do PrL foram as mesma utilizadas no Experimento 1 e as secções da PAG tiveram como referência as seguintes coordenadas anterior/posterior a partir do bregma: -7,56 mm a -8,16 mm, segundo o Atlas de Paxinos e Watson (2007).

As lâminas foram postas à vácuo pernoite e posteriormente em PBS por mesmo período de tempo. Posteriormente as lâminas passaram por diversas: lavagem em PBS 0,1 M; lavagem em PBS + 0,1 M de glicina (3 min); lavagem em PBS (5 min) e bloqueio com PBS + BSA 1 %, em câmara úmida (60 min). A seguir, foi realizada a incubação com os anticorpos primários para parvalbumina (IgG [*goat*] anti-parvalbumina na proporção de 1:100) e GABA (IgG [*mouse*] anti-GABA na proporção de 1:100) diluídos em PBS + BSA a 1 % por 18 h em temperatura ambiente. Posteriormente foram realizadas lavagens com PBS e uma incubação com PBS + soro de burro a 1%. Após 6 lavagens com PBS por 5 min cada, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário (Fa,b de IgG de burro anti-Fc de IgG de cabra marcado

Alexa Flúor 350, na proporção de 1:200, cada), por 1 h, no escuro em câmara úmida à temperatura ambiente. Após a incubação, foram realizadas 6 lavagens com PBS, por 5 min cada. A montagem com lamínulas foi realizada com a utilização de Prolong (Life Technologies, Eugene, OR, USA). As amostras foram levadas ao fotomicroscópio AxioImager Z1 (Zeiss), utilizando, no caso de HBO, filtros de excitação 44 (para o Alexa Flúor 488), 00 (para o Alexa Flúor 647) e 02 (para o Alexa Flúor 350) (ALMADA et al., 2015).

Resultados

A Fig. 1A mostra a linha do tempo referente aos procedimentos experimentais. A Fig. 1B mostra uma representação de um corte sagital de cérebro de rato e da via que conecta o PrL à vIPAG. A Fig 1C mostra os diagramas representando a localização dos sítios de microinjeção no PrL. A Fig. 1D mostra uma fotomicrografia representativa de um corte coronal de córtex cerebral, passando pelo PrL, mostrando sítios de microinjeção bilateral e do neurotraçador BDA microinjetado no PrL. A Fig 1E mostra diagramas contendo a localização da vIPAG (pontos em vermelho) em diferentes planos do encéfalo de ratos. A Fig. 1F mostra uma fotomicrografia de cortes transversais de tegmento mesencefálico passando pela coluna ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal (vIPAG) onde se veem marcações fluorescentes de fibras corticais (em verde), provenientes do PrL, aferentes à vIPAG. As Fig. 1G e 1H mostram, respectivamente, a marcação de neurônios positivos para GABA (em azul) e parvalbumina (em vermelho) na vIPAG. A Fig. 1I mostra a sobreposição das marcações fluorescentes das aferências corticais (fibras) e de neurônios positivos para GABA e parvalbumina localizados na vIPAG. A análise morfológica sugere uma colocalização neuronal do GABA e da parvalbumina e uma conexão axo-somática entre as fibras provenientes do PrL e esses interneurônios da vIPAG.

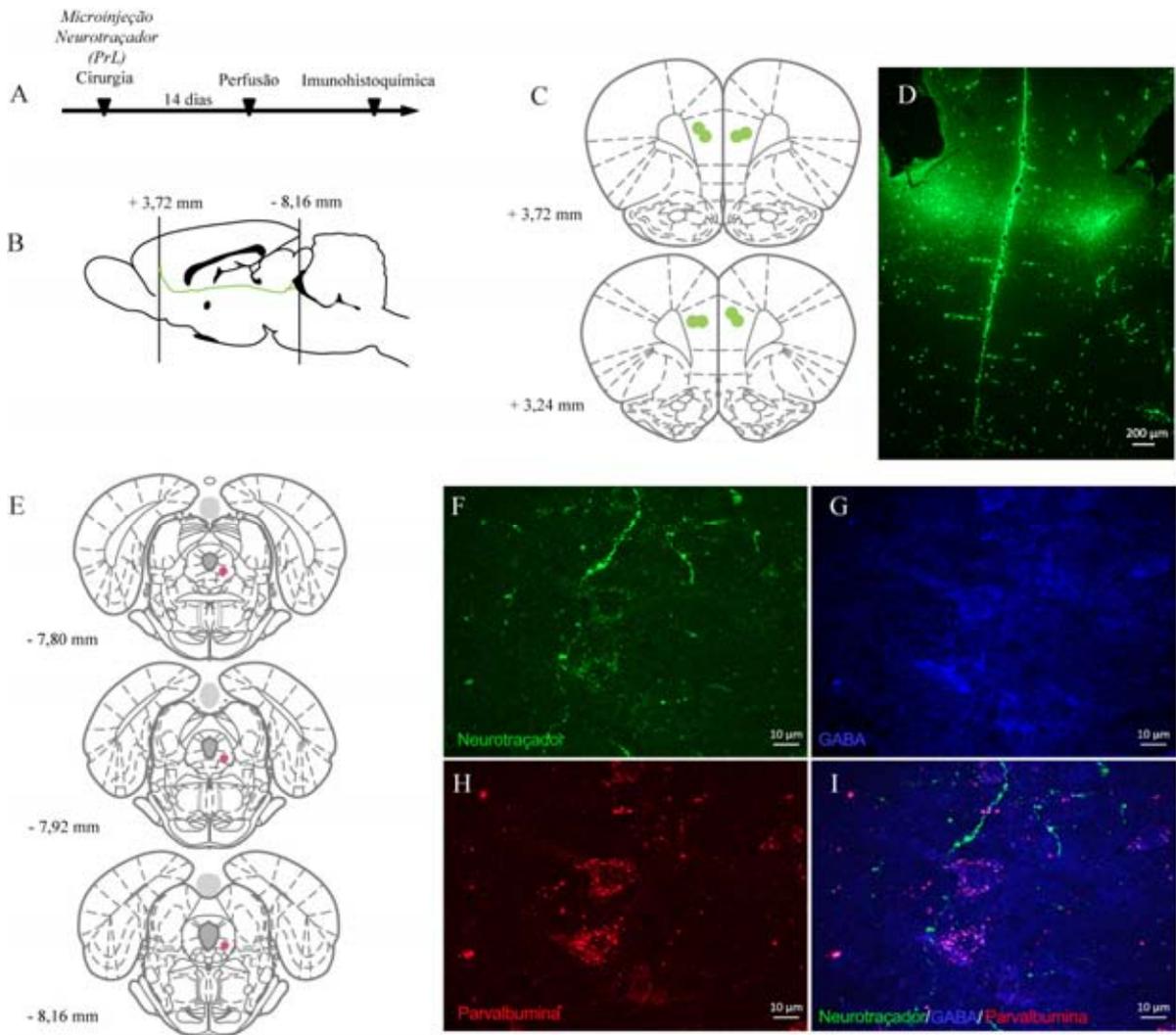


Figura 1. Estudo morfológico de aferências corticais, provenientes do PrL, à vlPAG. (A) Linha do tempo dos procedimentos experimentais. (B) Sítios de microinjeção e marcação fluorescente do neurotraçador BDA microinjetado no PrL. (C) Aferências (fibras [verde]) provenientes do PrL na vlPAG. Marcação de neurônios positivos para GABA (D [azul]) e parvalbumina (E [vermelho]). (F) Sobreposição das imagens mostrando a colocalização neuronal da marcação para GABA e parvalbumina em proximidade a uma fibra proveniente do PrL sugerindo uma conexão axo-somática.

Discussão

A análise morfológica realizada no presente trabalho sugere que parte da via que conecta o CPFm à vPAG projeta-se para interneurônios GABAérgicos nessa região, indicando um potencial substrato anatômico pelo qual o PrL pode orientar a atividade inibitória nessa área e exercer um papel importante na modulação das respostas defensivas. De modo similar, os resultados de um trabalho anterior, por meio de procedimentos eletrofisiológicos, sugerem que os axônios provenientes do CPFm também conectam-se a neurônios inibitórios do núcleo dorsal da rafe (DRN) (HAJOS et al., 1998; VARGA et al., 2001; VARGA; KOCSIS; SHARP, 2003). Corroborando essa hipótese, dados de microscopia eletrônica mostraram que essa via projeta-se para dendritos contendo GABA no DRN (JANKOWSKI; SESACK, 2004).

Uma série de trabalhos indica que o CPFm é rico em conexões e neurônios glutamatérgicos (BOZKURT et al., 2005; PALOMERO-GALLAGHER et al., 2009) e que o principal neurotransmissor na maioria das eferências corticais é o glutamato (CARTER, 1982; KOLB, 1984; MORGANE; GALLER; MOKLER, 2005). Especificamente em relação à PAG, um estudo mostrou que lesões excitotóxicas restritas ao CPFm reduziram seletivamente a recaptação de D- ^3H aspartato, de modo significativo, em preparações de sinaptossomos da PAG, sugerindo a presença de projeções que utilizam o glutamato ou aspartato como neurotransmissor na via que conecta CPFm à PAG (CHRISTIE; JAMES; BEART, 1986). Em humanos, um estudo que utilizou uma combinação de técnicas para medir a conectividade funcional e estrutural em estado de repouso mostrou a importância das concentrações de glutamato no CPFm na conectividade funcional entre essa região e a PAG, sugerindo que essa relação glutamatérgica decorre de uma conexão anatômica direta entre essas áreas (DUNCAN et al., 2013).

O fato dos resultados apresentados sugerirem que neurônios do PrL conectem-se a neurônios inibitórios na VIPAG reforçam a ideia da função do CPFm na regulação “top-down” dos comportamento defensivos. A presença de neurônios contendo parvalbumina na PAG em ratos e outras espécies já fora descrito anteriormente (BARBARESI et al., 2013; DE LEON et al., 1993). A parvalbumina é um marcador neuroanatômico pertencente à grande família *EF-Hand* ligantes de cálcio, que regulam a concentração de cálcio intracelular em neurônios contendo GABA (CARLÉN et al., 2012; GIRARD et al., 2015). Os interneurônios parvalbuminérgicos regulam a atividade de redes neurais através da inibição GABA-érgica de neurônios excitatórios locais de modo que a atividade sincronizada desses interneurônios está relacionada com o desempenho em uma variedade de tarefas cognitivas, como atenção, medo condicionado e memória de trabalho. (UHLHAAS et al, 2008; CARLÉN et al. 2012; COURTIN et al, 2014).

A PAG é tida como uma das principais estruturas encefálicas envolvidas no processamento do medo (GROSS; CANTERAS, 2012). Resultados de estudos anteriores destacam a importância dessa região na expressão de comportamentos de defesa condicionados (CARRIVE et al., 1997; CARRIVE; LEE; SU, 2000). Por meio de ensaios imunistoquímicos, esses autores mostraram a ocorrência de um aumento da expressão de proteína Fos na VIPAG de ratos após a exposição a estímulos condicionados aversivos contextuais. Outros trabalhos mostraram que a lesão ou manipulação farmacológica dessa região interfere na expressão comportamento de congelamento durante e expressão do medo condicionado contextual (KIM; RISON; FANSELOW, 1993; WALKER; CARRIVE, 2003).

O papel da via PrL-VIPAG na expressão do medo condicionado poderá ser elucidado em futuros experimentos que, por meios farmacológicos, farmacogenéticos ou optogenéticos, manipulem o funcionamento de ambas regiões simultaneamente. Igualmente, considerando a baixa presença de parvalbumina na PAG (BARBARESI et al., 2013), é necessário um

aprofundamento do estudo morfológico da vIPAG, investigando a relevância e possível envolvimento de outros neurônios inibitórios. Ademais, considerando os estudos como o de Likhtik et al., (2014), que buscou investigar o funcionamento de mecanismos envolvidos em processos de discriminação e generalização da resposta de medo, ainda está em aberto a investigação do envolvimento da vIPAG assim como da via entre o CPFm e essa região nesses processos.

Conclusões

- Os dados neuromorfológicos apresentados sugerem que parte da via que conecta o CPFm à vIPAG projeta-se para interneurônios GABAérgicos nessa área, indicando um potencial substrato neural envolvido na regulação cortical das respostas defensivas.

Referências bibliográficas

ALMADA, R. C.; RONCON, C. M.; ELIAS-FILHO, D. H.; COIMBRA, N. C. Endocannabinoid signaling mechanisms in the substantia nigra pars reticulata modulate GABAergic nigrothalamic pathways in mice threatened by urutu-cruzeiro venomous pit viper. *Neuroscience*, v. 303, p. 503-14, 2015.

BARBARESI, P.; MENSA, E.; LARICCIA, V.; PUGNALONI, A.; AMOROSO, S.; FABRI, M. Differential distribution of parvalbumin- and calbindin-D28K-immunoreactive neurons in the rat periaqueductal gray matter and their colocalization with enzymes producing nitric oxide. *Brain Research Bulletin*, v. 99, p. 48-62, 2013.

BOZKURT, A.; ZILLES, K.; SCHLEICHER, A.; KAMPER, L.; ARIGITA, E. S.; UYLINGS, H. B.; KOTTER, R. Distributions of transmitter receptors in the macaque cingulate cortex. *NeuroImage*, v. 25, n. 1, p. 219-29, 2005.

CARLEN, M.; MELETIS, K.; SIEGLE, J. H.; CARDIN, J. A.; FUTAI, K.; VIERLING-CLAASSEN, D.; RUHLMANN, C.; JONES, S. R.; DEISSEROTH, K.; SHENG, M.; MOORE, C. I.; TSAI, L. H. A critical role for NMDA receptors in parvalbumin interneurons for gamma rhythm induction and behavior. *Molecular Psychiatry*, v. 17, n. 5, p. 537-48, 2012.

CARRIVE, P.; LEE, J.; SU, A. Lidocaine blockade of amygdala output in fear-conditioned rats reduces Fos expression in the ventrolateral periaqueductal gray. *Neuroscience*, v. 95, n. 4, p. 1071-80, 2000.

CARRIVE, P.; LEUNG, P.; HARRIS, J.; PAXINOS, G. Conditioned fear to context is associated with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. **Neuroscience**, v. 78, n. 1, p. 165-77, 1997.

CARTER, C. J. Topographical distribution of possible glutamatergic pathways from the frontal cortex to the striatum and substantia nigra in rats. **Neuropharmacology**, v. 21, n. 5, p. 379-83, 1982.

CHRISTIE, M. J.; JAMES, L. B.; BEART, P. M. An excitatory amino acid projection from rat prefrontal cortex to periaqueductal gray. **Brain Research Bulletin**, v. 16, n. 1, p. 127-9, 1986.

COURTIN, J.; CHAUDUN, F.; ROZESKE, R. R.; KARALIS, N.; GONZALEZ-CAMPO, C.; WURTZ, H.; ABDI, A.; BAUFRETON, J.; BIENVENU, T. C.; HERRY, C. Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. **Nature**, v. 505, n. 7481, p. 92-6, 2014.

DE LEON, M.; COVENAS, R.; NARVAEZ, J. A.; AGUIRRE, J. A.; GONZALEZ-BARON, S. Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the cat brain stem. **Brain Research Bulletin**, v. 32, n. 6, p. 639-46, 1993.

DUNCAN, N. W.; WIEBKING, C.; TIRET, B.; MARJANSKA, M.; HAYES, D. J.; LYTTLETON, O.; DOYON, J.; NORTHOFF, G. Glutamate concentration in the medial prefrontal cortex predicts resting-state cortical-subcortical functional connectivity in humans. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60312, 2013.

GABBOTT, P. L.; WARNER, T. A.; JAYS, P. R.; SALWAY, P.; BUSBY, S. J. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. **Journal of Comparative Neurology**, v. 492, n. 2, p. 145-77, 2005.

GIRARD, F.; VENAIL, J.; SCHWALLER, B.; CELIO, M. R. The EF-hand Ca(2+)-binding protein super-family: a genome-wide analysis of gene expression patterns in the adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 294, p. 116-55, 2015.

GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 651-8, 2012.

HAJOS, M.; RICHARDS, C. D.; SZEKELY, A. D.; SHARP, T. An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat. **Neuroscience**, v. 87, n. 1, p. 95-108, 1998.

JANKOWSKI, M. P.; SESACK, S. R. Prefrontal cortical projections to the rat dorsal raphe nucleus: ultrastructural features and associations with serotonin and gamma-aminobutyric acid neurons. **Journal of Comparative Neurology**, v. 468, n. 4, p. 518-29, 2004.

KIM, J. J.; RISON, R. A.; FANSELOW, M. S. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. **Behavioral Neuroscience**, v. 107, n. 6, p. 1093-8, 1993.

KOLB, B. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. **Brain Research**, v. 320, n. 1, p. 65-98, 1984.

LIKHTIK, E.; STUJENSKE, J. M.; TOPIWALA, M. A.; HARRIS, A. Z.; GORDON, J. A. Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 106-13, 2014.

MORGANE, P. J.; GALLER, J. R.; MOKLER, D. J. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. **Progress in Neurobiology**, v. 75, n. 2, p. 143-60, 2005.

PALOMERO-GALLAGHER, N.; VOGT, B. A.; SCHLEICHER, A.; MAYBERG, H. S.; ZILLES, K. Receptor architecture of human cingulate cortex: evaluation of the four-region neurobiological model. **Human Brain Mapping**, v. 30, n. 8, p. 2336-55, 2009.

PAXINOS, G., WATSON, C. . **The rat brain in Stereotaxic Coordinates**. New York: Academic Press, 2007.

SOTRES-BAYON, F.; QUIRK, G. J. Prefrontal control of fear: more than just extinction. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 20, n. 2, p. 231-5, 2010.

UHLHAAS, P.J.; HAENSCHER, C.; NIKOLIC, D.; SINGER, W. The role of oscillations and synchrony in cortical networks and their putative relevance for the pathophysiology of schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 34, p. 927-943, 2008

VARGA, V.; KOCSIS, B.; SHARP, T. Electrophysiological evidence for convergence of inputs from the medial prefrontal cortex and lateral habenula on single neurons in the dorsal raphe nucleus. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 280-6, 2003.

VARGA, V.; SZEKELY, A. D.; CSILLAG, A.; SHARP, T.; HAJOS, M. Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurones. **Neuroscience**, v. 106, n. 4, p. 783-92, 2001.

WALKER, P.; CARRIVE, P. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery. **Neuroscience**, v. 116, n. 3, p. 897-912, 2003.

Apêndice B.**Artigo:****Rapid Activation of Glucocorticoid Receptors in the Prefrontal Cortex Mediates the Expression of Contextual Conditioned Fear in Rats.**

Reis FMCV, Almada RC, Fogaça MV, Brandão ML.

Cerebral Cortex, 2015, 1–11. May 13. doi: 10.1093/cercor/bhv103. [Epub ahead of print]

ORIGINAL ARTICLE

Rapid Activation of Glucocorticoid Receptors in the Prefrontal Cortex Mediates the Expression of Contextual Conditioned Fear in Rats

Fernando M.C.V. Reis^{1,3}, Rafael C. Almada^{3,2}, Manoela V. Fogaça^{3,2}, and Marcus L. Brandão^{1,3}

¹Departamento de Psicologia, FFCLRP, ²Departamento de Farmacologia, FMRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil and ³Instituto de Neurociências e Comportamento (INeC), Ribeirão Preto, SP, Brazil

Address correspondence to Fernando M.C.V. Reis, Departamento de Psicologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP, Brasil. Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brazil. Email: fereis@usp.br

Abstract

The aim of the present study was to investigate the role of glucocorticoids in medial prefrontal cortex (mPFC) activity and the expression of contextual conditioned fear (freezing). Rats were pretreated with vehicle or metyrapone, a corticosterone synthesis blocker, and exposed to a context previously paired with footshocks. Freezing and Fos-protein expression in different mPFC regions were assessed. Exposure to the aversive context led to increased freezing and Fos expression in the prelimbic (PrL), anterior cingulate areas 1 and 2 (Cg1/Cg2). Pretreatment with metyrapone decreased freezing and Fos expression in these areas. Administration of spironolactone, an MR antagonist, in the PrL before the test decreased freezing. Pretreatment with RU38486, a glucocorticoid receptor (GR) antagonist, reduced this effect of spironolactone, suggesting that the effects of this MR antagonist may be attributable to a redirection of endogenous corticosterone actions to GRs. Consistent with this result, the decrease in freezing that was induced by intra-PrL injections of corticosterone was attenuated by pretreatment with RU38486 but not spironolactone. These findings indicate that corticosterone release during aversive conditioning influences mPFC activity and the retrieval of conditioned fear memory indicating the importance of balance between MR:GR-mediated effects in this brain region in this process.

Key words: corticosterone, mineralocorticoid receptors, nongenomic effects, prelimbic cortex, spironolactone

Introduction

Contextual fear conditioning in rats is a form of associative learning that has been used to elucidate mechanisms that are involved in aversive memory processes. Freezing is a species-specific response to fear that occurs following the presentation of an aversive conditioned stimulus. The expression of this response is associated with an increase in the plasma concentrations of corticosterone, a steroid hormone that is produced by the cortex of the adrenal glands in response to hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis activation (Rodrigues et al. 2009). This hormone can act via 2 types of steroid receptors, mineralocorticoid

receptors (MRs) and glucocorticoid receptors (GRs), which are expressed in both neurons and glial cells (Bohn et al. 1991). These intracellular receptors belong to the nuclear receptor family and exert their effects as transcription factors in the nucleus of the cell to change the mRNA and protein synthesis of target genes (McEwen et al. 1979).

MRs and GRs have different affinities for endogenous corticosteroid hormones. Thus, variations in their concentrations in the brain result in changes in the balance of activity between these receptors (Reul and de Kloet 1985). The activation of relatively low-affinity GRs is initiated when higher-affinity MRs are already

substantially occupied by normally circulating corticosteroids (Wang et al. 2012). Corticosterone coordinates a vast variety of actions, depending on the site, time, context, stress history, and cognitive and genetic inputs (de Kloet 2013). The distinct expression of MRs and GRs and time course of their occupation have far reaching consequences with regard to the extent of receptor occupancy in response to homeostatic challenge, which is reflected by their different modulating processes (de Kloet 2013).

Despite many results in the literature that show that corticosteroids can exert their effects through gene transcription, these hormones may also exert rapid and nongenomic effects on synaptic transmission in several brain regions such as the hypothalamus (Di et al. 2003; Evanson et al. 2010), hippocampus (Karst et al. 2005), basolateral amygdala (Karst et al. 2010) insular cortex (Roosendaal et al. 2010), and medial prefrontal cortex (mPFC; Barsegyan et al. 2010). Some of these rapid effects of corticosterone in the brain appear to require the presence of MRs or GRs that are located on the cell membrane, whereas other effects are mediated by yet unknown receptors (Groeneweg et al. 2011).

Both MRs and GRs are highly expressed and have distinct distributions in the brain, including the mPFC (McEwen et al. 1986; Diorio et al. 1993), a brain region that is critically involved in multiple aspects of emotional and cognitive processes. Specifically, the mPFC has been considered an important area that connects brain regions that are involved in the modulation of defensive behaviors that are evoked by the presence of threatening stimuli (Sotres-Bayon and Quirk 2010). Together with several limbic structures, an increase in neuronal activity in the mPFC has been associated with contextual fear-conditioning responses (Burgos-Robles et al. 2009). Considering the fairly unique set of afferent projections to the dorsal and ventral divisions of the mPFC, including the anterior cingulate cortex (Cg), which receives predominantly sensorimotor (nonlimbic) cortical and thalamic inputs, and prelimbic cortex (PrL) and infralimbic cortex (IL), which receive primarily limbic, cortical, thalamic, and hippocampal inputs (McDonald 1998; Hoover and Vertes 2007), mPFC subfields have been suggested to have discernible influences on emotional and cognitive processes. Moreover, considering the sensitivity of the mPFC to corticosterone (McEwen et al. 1986; Diorio et al. 1993) and rapid effects induced by glucocorticoids, corticosterone can influence emotional and cognitive functions within the mPFC (Barsegyan et al. 2010).

Some evidence has shown that glucocorticoids that act in the mPFC can enhance memory consolidation and impair working memory, effects that depend on membrane steroid receptor activation (Barsegyan et al. 2010). Highlighting the participation of GRs that are located in the mPFC on contextual fear-conditioning responses, a negative relationship was reported between the time spent freezing and expression of GRs in the PFC in high-anxiety rats that were exposed to a conditioned aversive context (Wisłowska-Stanek et al. 2013). However, despite this evidence, still unclear is the way in which glucocorticoids can influence mPFC activity and the expression of conditioned fear (Rodrigues et al. 2009). To investigate this issue, metyrapone, a corticosterone synthesis inhibitor, was administered in rats prior to exposure to an aversive conditioned context to assess freezing behavior and Fos-protein expression in different subregions of the PFC. Considering previous studies that indicated the relevance of the PrL in the fear expression process (Burgos-Robles et al. 2009; Sotres-Bayon and Quirk 2010), this region was chosen to evaluate the ways in which MR and GR activity in the mPFC influences the expression of contextual conditioned fear. The involvement of MRs and GRs in this response was evaluated by treating rats with bilateral intra-PrL microinjections of spironolactone and

RU38486 (MR and GR antagonists, respectively) combined with corticosterone treatment.

Materials and Methods

Animals

Two hundred and forty-three male Wistar rats weighting 270–300 grams, from the central animal facility of the University of São Paulo, Campus of Ribeirão Preto, Brazil, were used. Rats were housed in groups of 4 per cage (40 × 33 × 17 cm) for at least 72 h under a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 07:00 h) at 23 ± 1°C and given free access to food and water. The age of the animals at the time of behavioral testing was ~8 weeks. The experiments reported in this article were performed in accordance with the recommendations of the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior and complied with the United States National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. The procedures were approved by the Committee for Animal Care and Use, University of São Paulo (no. 11.1.1300.53.1).

Drugs

The drugs used were metyrapone (2-methyl-1, 2-di-3-pyridyl-1-propanone, Sigma, Sigma–Aldrich), a corticosterone synthesis inhibitor, spironolactone (Sigma) and RU38486 (Tocris), MR and GR antagonists, respectively, and corticosterone (Sigma). Metyrapone was dissolved in 0.9% saline that contained 5% Tween 80. Spironolactone, RU38486, and corticosterone were dissolved in 100% DMSO and further diluted in saline (0.9%) so that the final concentration of DMSO was 0.1%. For each respective control group, 0.9% saline containing 5% Tween 80 and 0.9% saline containing 0.1% DMSO were used.

Experimental Procedures

Surgery

Five days before the experimental sessions, rats were anesthetized with intraperitoneal ketamine/xylazine at a dose of 100/7.5 mg/kg (i.p.), in a volume of 1/0.3 mL/kg, respectively, and fixed in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments). The upper incisor bar was set at 3.3 mm below the interaural line so that the skull was horizontal between bregma and lambda. After scalp anesthesia with 2% lidocaine, the skull was surgically exposed and stainless steel guide cannulae (10 mm, length; 0.6 mm, outer diameter; 0.4 mm, inner diameter) were bilaterally implanted into the PrL using bregma as the reference point for coordinates: angle of 22°; anterior/posterior, +3.3 mm; medial/lateral, ±1.9 mm dorsal/ventral, 2.8 mm (Paxinos and Watson 2007). The cannulae were fixed to the skull by means of acrylic resin and 1 stainless steel screws. At the end of the surgery, each guide cannula was sealed with a stainless steel wire to prevent obstruction and rats received an intramuscular injection of penicillin-G benzathine (Pentabiotic, 600 000 IU in a 0.2 mL volume; Fort Dodge) and a subcutaneous injection of the anti-inflammatory analgesic Banamine (flunixin meglumine, 2.5 mg/kg in 0.2 mL, Shering-Plough). After surgery, rats were placed again in their home cages in groups of 4.

Microinjection Procedures

Intracerebral infusions were delivered via an infusion pump (Harvard Apparatus) at a rate of 0.3 µL/min. A thin dental needle (0.3 mm, outer diameter) was introduced through each guide

cannula attached by polyethylene tubing to a 5- μ L Hamilton syringe (Reno). The injection needle extended 1 mm below the ventral tip of the implanted guide cannula. The injection needles were left in place for 1 min after the end of the infusion period to allow for diffusion.

Fear Conditioning

The animals were subjected to fear conditioning paradigm using context as conditioned stimulus. During the training session, the rats were individually placed in an experimental chamber (48 \times 26 \times 25 cm) illuminated by a 15-W red light. The side walls were made of acrylic and gray roof and front door of transparent Plexiglas. The floor consisted of a grid with 36 stainless steel rods (3 mm in diameter), spaced 1.5 cm apart. A stimulator linked to an interface controlled by a computer delivered footshocks (Insight Instruments). After 5 min of habituation, the rats received 10 electric 0.6-mA footshocks (duration of 1 s each), varying the interval between shocks (range 30–120 s), as previously reported (Albrechet-Souza et al. 2013). The rats were removed from the conditioning chamber 3 min after the presentation of the last shock and put back into their home cage. The chamber was cleaned with 20% ethanol, before and after use. The test session to assess fear conditioning expression was conducted 24 h after training and consisted of an exposure of 8 min to an environment in which footshocks were previously administered. The behavioral response used in this study was the time spent freezing during the test session. Freezing was operationally defined as the complete absence of movement of the vibrissa and body, except those required for respiration, for at least 6 s (Bouton and Bolles 1980; Fanselow 1980). All scoring procedure was made by a single experimenter who manually timed freezing response during 8 min in a continuous manner, 1 rat at a time. All experiments were monitored in real time by a video camera mounted 12 cm above the door and located on the top side of the box so that the presence of the experimenter did not interfere with the experimental condition.

Control groups were added in this study to assess possible generalization of fear conditioning and drug effects per se. To this end, during testing, a separate group of rats was exposed to an experimental chamber different from the one used during the training session. This different context consisted of a chamber (31 \times 21 \times 21 cm) illuminated by a 15-W white lamp. The side and back walls were made of steel, and the ceiling and front door were made of transparent Plexiglas. The grid was covered with thick plastic. The chamber was cleaned with 20% alcohol and scented with 0.5% acetic acid after each session. Both chambers were enclosed in wooden sound-attenuating boxes.

Experiment 1: Effects of Metyrapone on Freezing and Fos-Protein Expression in the mPFC

Twenty-four hours after the training session, rats that did not undergo stereotaxic surgery were divided in 2 groups: those who would be exposed to the same context (training chamber) and those who would be exposed to a different context. Both groups received either an intraperitoneal injection of vehicle or metyrapone at a dose of 30 mg/kg in a volume of 1 mL/kg and 20 min after freezing behavior was registered over 8 min. This dose of metyrapone has been shown to significantly reduce plasma corticosterone concentrations within 20 min (Mikics et al. 2004), an effect that lasts for at least 20 min (de Oliveira et al. 2012) without altering locomotor activity (Mikics et al. 2005). Two hours after the beginning of the test session, they were deeply anaesthetized with urethane (3 g/kg i.p.; Sigma-Aldrich) and

intracardially perfused with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS (pH 7.4) (Albrechet-Souza et al. 2013).

Immunohistochemical Analysis

After removal from the skull, the brains were immersed overnight in paraformaldehyde and stored for 72 h in 30% sucrose in 0.1 M PBS for cryoprotection. The brains were quickly frozen in isopentane (-40°C) and sliced in a cryostat (-19°C). Sections (40 μ m) were collected in antifreeze solution, and Fos-protein immunoreactivity was detected using standard techniques, as previously described (Albrechet-Souza et al. 2013). Briefly, the sections were first treated with 1% hydrogen peroxide in 0.1 M PBS for 10 min and incubated with primary c-fos antibody (1:4000, rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology) in 0.1 M PBS enriched with 0.2% Triton-X and 0.1% bovine serum albumin overnight at $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$. The sections were then incubated in biotinylated goat antirabbit secondary antibody (1:400; Vector Laboratories) and avidin-biotin complex (1:200; Vector Laboratories) for 1 h each. Fos immunoreactivity was revealed by the addition of the chromogen 3,3'-diaminobenzidine (DAB; 0.02%; Sigma-Aldrich) in 0.1 M PBS, to which 0.04% peroxide hydrogen was added before use. After ~ 10 min, the tissue sections were rinsed with buffer solution, mounted on gelatine-coated slides and dehydrated. Fos-positive cells were visualized and counted under a 10 \times objective using a bright-field microscope (Olympus BX-50; Olympus Corporation) equipped with a video camera module (Leica DFC320; Leica Camera AG). The average number of labeled cells "per" 0.1-mm² structure was obtained. The analyzed mPFC areas comprised the prelimbic (PrL) and infralimbic (IL) cortices (anterior/posterior coordinates from bregma: 4.20–3.00 mm), cingulate cortex, area 1 (Cg1) and 2 (Cg2) (2.16–1.68 mm) according to the Paxinos and Watson Atlas (Paxinos and Watson 2007).

Experiment 2: Effects of the MR and GR Antagonists Injected into the PrL on the Expression of Conditioned Fear Response

Twenty-four hours after the training session, independent groups that underwent stereotaxic surgery received microinjections of vehicle or different doses of spironolactone or RU38486 (0.5, 2.5, or 5 ng/0.25 μ L "per" hemisphere) 10 min prior to the test session. The doses and time of the injection were based on previous studies (Roozendaal and McGaugh 1997; Barsegyan et al. 2010).

Experiment 3: Effects of Combined Administration of MR and GR Antagonists Injected into the PrL on the Expression of Conditioned Fear Response

Once dose-response curves of spironolactone and RU38486 were determined, drugs were administered in a combined way into the PrL of independent groups of rats. The first treatment (vehicle or RU38486, 5 ng/0.25 μ L) was performed 5 min before the second treatment (vehicle or spironolactone, 2.5 or 5 ng/0.25 μ L) whereas this treatment was given 10 min before the test session.

Experiment 4: Effects of Corticosterone Injected into the PrL on the Expression of Conditioned Fear Response

To assess possible rapid effects of corticosterone injections into the PrL, a dose-response curve of corticosterone was performed. Twenty-four hours after the training session, independent groups of rats received microinjections of vehicle or different doses of corticosterone (0.25, 0.5, or 1 ng/0.25 μ L "per" hemisphere) 5 min prior to the test session. The doses and time of

injections were based on previous studies (Morrow et al. 1996; Chauveau et al. 2009).

Experiment 5: Effects of Administration of MR or GR Antagonists Combined with Corticosterone Injected into the PrL on the Expression of Conditioned Fear Response

In order to evaluate the mechanisms by which corticosterone exerts its rapid effects into the PrL, RU38486 (5 ng/0.25 μ L) or spironolactone (0.5 ng/0.25 μ L) were locally administered prior to corticosterone infusions (1 ng/0.25 μ L) into the PrL. In these experiments, the first treatment was performed 5 min before the second treatment whereas this latter administration was carried out 5 min before the test session.

Experiment 6: Effects of Spironolactone and Corticosterone into the PrL on Time of Freezing Behavior in Rats Submitted to a Different Context
To evaluate possible general effects of spironolactone and corticosterone in the PrL on freezing expression, a separated group of rats was conditioned and treated as previously described but submitted to a different context for the assessment of freezing behavior.

Histology

Upon conclusion of the experiments, the rats were deeply anesthetized with intraperitoneal urethane (3 g/kg i.p.; Sigma-Aldrich) and perfused transcardially with 0.9% saline followed by buffered 4% formalin. Brains were removed from the skulls, maintained in formalin solution for 2 h and cryoprotected in 30% sucrose for 72 h. Coronal brain slices (50 μ m) that contained the PrL cortex were stained with Cresyl Violet (5%, Sigma-Aldrich) to localize the microinjection sites by microscopic examination according to the Paxinos and Watson Atlas (Paxinos and Watson 2007). Rats receiving injections outside the aimed area were not included in the analysis.

Data Analysis

The software used for all statistical analysis was STATISTICA version 6.0. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). In the first experiment, behavioral and Fos-positive cells data were assessed by two-way analysis of variance (ANOVA) to evaluate the effects of treatment (metyrapone or vehicle) and condition (same context or different context) factors. In the second and fourth experiment, freezing response was analyzed using one-way ANOVA for same context conditioning. In the case where combined treatments were performed for same context conditioning, freezing response was analyzed using two-way ANOVA considering pretreatment and treatment as factors. The assessment of the effective drug doses on freezing response in a different context was done using one-way ANOVA. Significant comparisons were followed by Newman-Keuls post-hoc test. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Effects of Metyrapone on the Expression of Conditioned Fear Response and Fos Protein in the mPFC

Figure 1 shows the average freezing time in rats treated with vehicle or metyrapone before exposure to the same or different context where footshocks were previously administered. Two-way ANOVA showed significant effects of treatment, condition, and treatment \times condition interaction on freezing time ($F_{1,28} = 13.15$; 11.38 , and 4.76 respectively, $P < 0.05$ in all cases). The post-hoc analysis showed that exposure to the same context increased

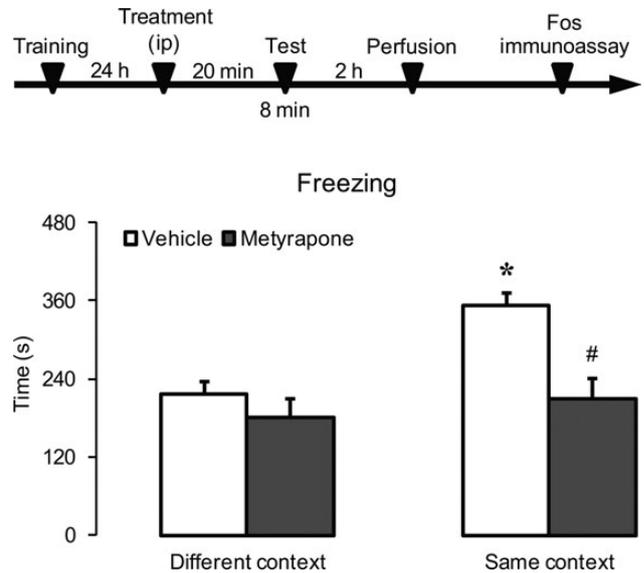


Figure 1. Effects of metyrapone on the expression of conditioned fear response. Average freezing responses in rats treated with vehicle or metyrapone and exposed to a different or the same context previously paired with footshock ($n = 8$ for all groups). * Different from vehicle group exposed to different context; # different from the vehicle group exposed to the same context ($P < 0.05$).

freezing expression in the vehicle-treated group when compared with all other groups and that metyrapone treatment was associated with decreased fear expression only in the context where footshocks were previously administered ($P < 0.05$, Newman-Keuls).

Fos-positive cells in different areas of the mPFC and representative photomicrographs that illustrate Fos immunoreactivity in the PrL are shown in Figure 2A,B, respectively. A two-way ANOVA showed significant effects of the drug treatment and the interaction drug treatment \times condition on the expression of Fos-protein expression in the Cg1 ($F_{1,25} = 10.56$ and 18.74 , respectively, $P < 0.05$ in both cases), but not in the condition factor alone ($F_{1,25} = 0.14$, $P > 0.05$). Significant effects were observed on the interaction treatment \times condition in the PrL, IL, and Cg2 ($F_{1,25} = 11.05$, 6.47 , and 5.99 , respectively, $P < 0.05$ in all cases), but no significant effects on treatment ($F_{1,25} = 3.60$, 0.26 , and 0.70 , $P > 0.05$ in all cases) and condition factors ($F_{1,25} = 0.60$, 3.77 , and 1.11 , respectively, $P > 0.05$ in all cases) when analyzed separately. The post-hoc comparisons showed that rats treated with vehicle and exposed to the same context showed an increased expression of Fos expression in the PrL, Cg1, and Cg2 compared with the vehicle-treated groups and exposed to different context and with metyrapone-treated groups and exposed to the same context ($P < 0.05$, Newman-Keuls). The comparisons also demonstrated that metyrapone-treated group exposed to the different context had a lower expression of Fos in the Cg1 and Cg2 when compared with vehicle-treated group exposed to the same context ($P < 0.05$, Newman-Keuls). The post-hoc analysis found no significant difference between groups in the expression of Fos protein in the IL ($P > 0.05$, Newman-Keuls).

Effects of Spironolactone and RU38486 Bilaterally Injected into the PrL on the Expression of Conditioned Fear Response

As shown in Figure 3A, one-way ANOVA followed by the post-hoc Newman-Keuls tests showed that only the intermediate dose of

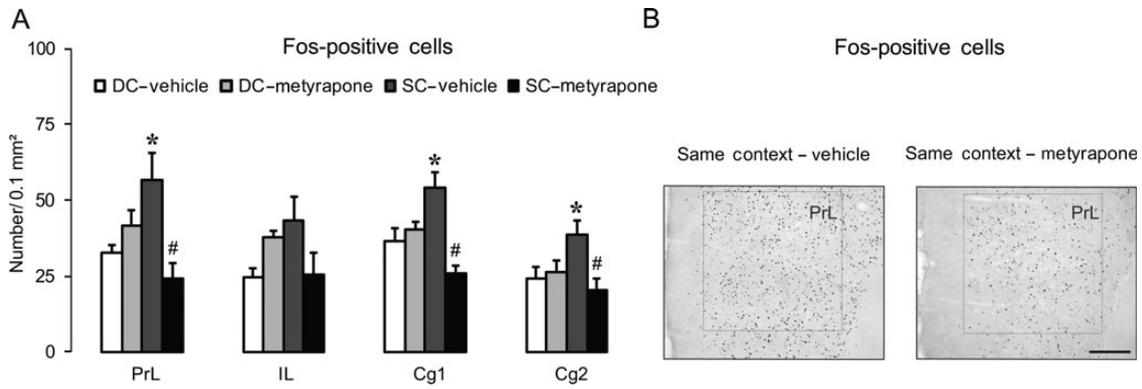


Figure 2. Effects of aversive context and metyrapone on the expression of Fos protein in the mPFC. Average number of Fos-positive cells in the PrL, IL, Cg1, and Cg2 subregions of rats treated with vehicle or metyrapone and exposed to a different or to the same context previously paired with footshock (A). Representative photomicrographs illustrating the Fos-protein immunoreactivity in the PrL of rats treated with vehicle or metyrapone and exposed to the same context (B). * Different from the vehicle group exposed to a different context, # different from the vehicle group exposed to the same context ($P < 0.05$). $n = 7-8$ "per" group. Scale bar equal to 100 μm . DC, different context; SC, same context; PrL, prelimbic cortex; IL, infralimbic cortex; Cg1, anterior cingulate cortex area 1; and Cg2, anterior cingulate cortex area 2.

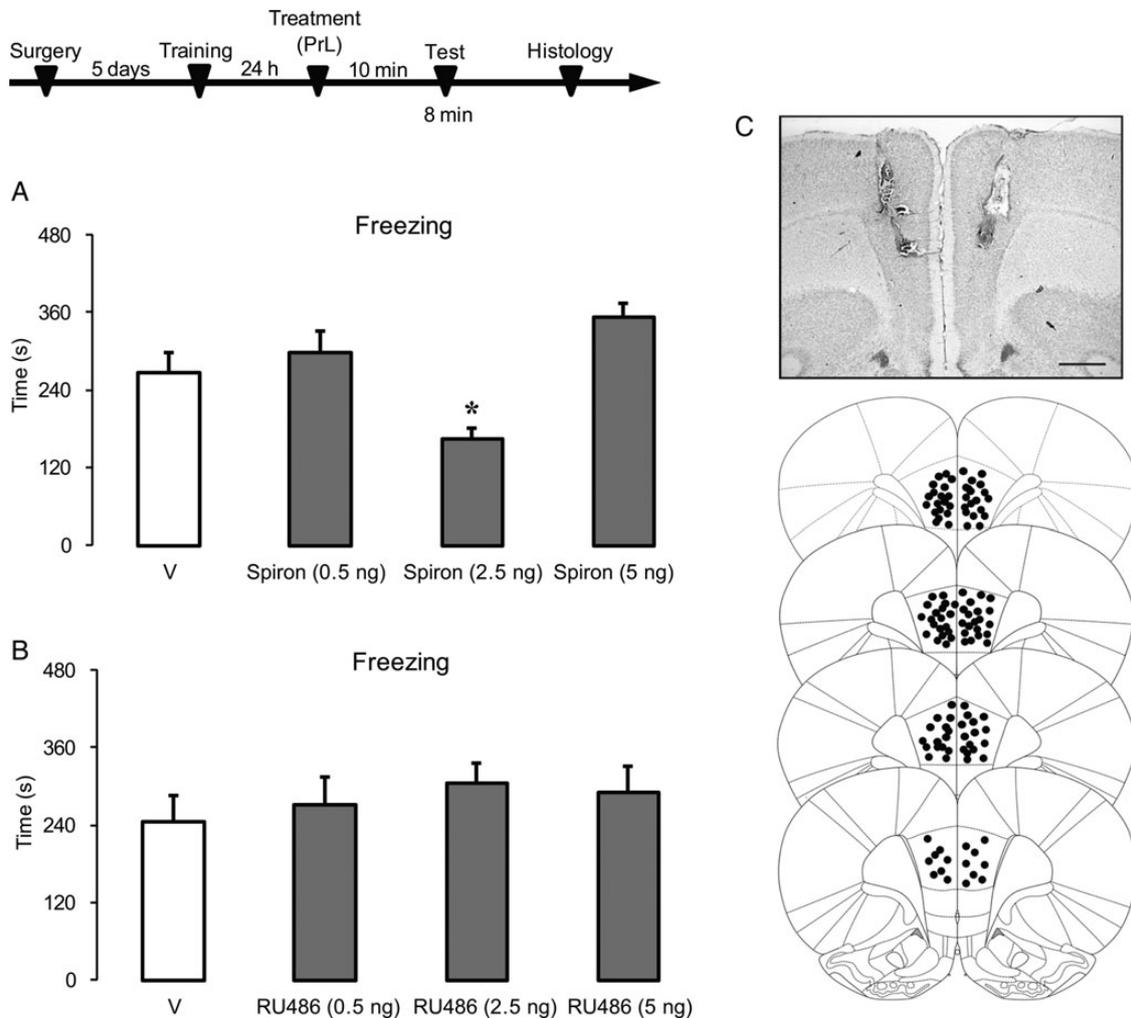


Figure 3. Effects of MR and GR antagonists microinjected in the PrL in the expression of contextual fear conditioning. Average of freezing responses in rats treated with vehicle ($n = 10$) or spironolactone at doses of 0.5 ng ($n = 7$), 2.5 ng ($n = 10$), or 5 ng ($n = 10$) and exposed the same context previously paired with footshocks (A). Average of freezing responses in rats that received bilateral microinjections of vehicle ($n = 12$) or RU38486 at doses of 0.5 ng ($n = 9$), 2.5 ng ($n = 10$), or 5 ng ($n = 10$); exposed to the same context (B). Photomicrograph representative of microinjection sites in the PrL and diagrams representing the microinjection sites in cross-sections of the Paxinos and Watson atlas (Paxinos and Watson 2007) (C). Scale bar equal to 1.0 mm. PrL, prelimbic cortex. The number of points in the figure is less than the total number of animals because of overlapping injection sites. * Different from vehicle group ($P < 0.05$). Spiron, spironolactone.

spironolactone (2.5 ng) decreased freezing time response when administered bilaterally in the PrL before the test ($F_{3,33} = 9.99$, $P < 0.05$). The bilateral administration of RU38486 in the PrL before the test session did not change the freezing expression in any of the doses tested, as shown in Figure 3B ($F_{3,37} = 0.46$, $P > 0.05$).

A representative photomicrograph of microinjection into the PrL and the sites of injections located on diagrams of cross-sections from the Paxinos and Watson Atlas (Paxinos and Watson 2007) are shown in Figure 3C.

Effects of Combined Administration of RU38486 and Spironolactone Bilaterally Injected into the PrL on the Expression of Conditioned Fear Response

The combined effects of RU38486 and spironolactone injections are illustrated in Figure 4. Two-way ANOVA analysis revealed significant effects of treatment and interaction among pretreatment \times treatment ($F_{2,35} = 8.17$ and 3.22, respectively, $P < 0.05$ in both cases). There was no significant effect of pretreatment factor ($F_{1,35} = 1.14$, $P > 0.05$). The post-hoc analysis showed that the combined injection of vehicle and spironolactone (2.5 ng) decreased the freezing time response compared with all other treatments, an effect that was blocked by prior microinjection of RU38486 (5 ng [$P > 0.05$, Newman-Keuls]). The same analysis revealed no significant differences between the other groups ($P > 0.05$, Newman-Keuls).

Effects of Corticosterone Bilaterally Injected into the PrL on the Expression of Conditioned Fear Response

As shown in Figure 5A, the one-way ANOVA followed by the post-hoc Newman-Keuls tests showed that the higher dose of corticosterone tested (1 ng) decreased freezing response when injected into the PrL before the test ($F_{3,19} = 6.28$, $P < 0.05$).

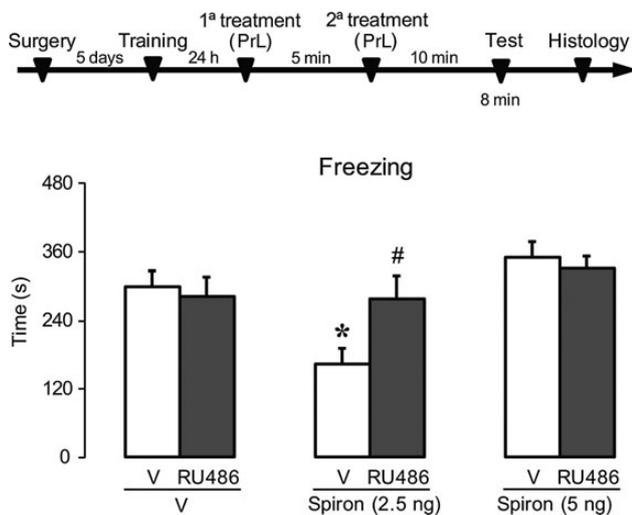


Figure 4. Effect of prior administration of RU38486 on the effects promoted by spironolactone microinjected in the PrL in the expression of contextual fear conditioning. Average freezing responses in rats treated with the combination of V + V, ($n = 7$); RU38486 (5 ng) + V, ($n = 7$); V + Spiron (2.5 ng), ($n = 7$); RU38486 (5 ng) + Spiron (2.5 ng), ($n = 6$); V + Spiron (5 ng), ($n = 7$); and RU38486 + Spiron (5 ng), ($n = 7$) and exposed to the same context previously paired with footshocks. * Different from V + V group, # different from the V + Spiron (5 ng) group ($P < 0.05$). V, vehicle; Spiron, spironolactone.

Effects of Combined Administration of Corticosterone and its Antagonists Injected into the PrL on the Expression of Conditioned Fear Response

As shown in Figure 5B, the two-way ANOVA analysis revealed significant effects of the pretreatment ($F_{2,43} = 4.60$), treatment ($F_{1,43} = 10.15$), and interaction between pretreatment \times treatment ($F_{2,43} = 4.38$, $P < 0.05$ in all cases). The post-hoc analysis showed that the groups treated with corticosterone (1 ng) showed decreased time of freezing response (Newman-Keuls, $P < 0.05$), an effect that was blocked by prior microinjection of RU38486 but not by spironolactone. The analysis revealed no significant differences between the groups treated with vehicle + corticosterone (1 ng) and spironolactone (0.5 ng) + corticosterone (1 ng).

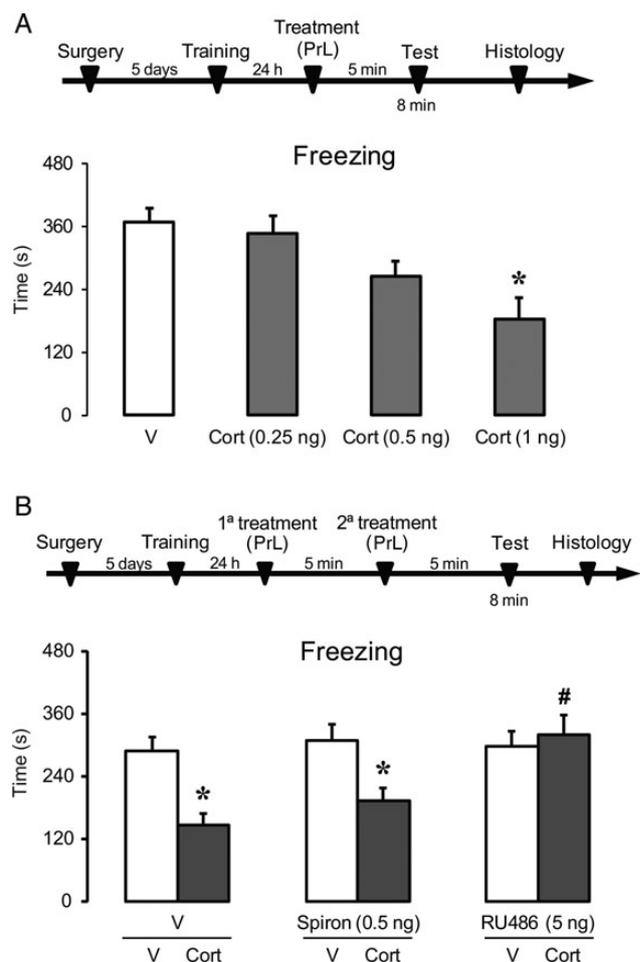


Figure 5. Effect of corticosterone and prior administration of spironolactone or RU38486 microinjected in the PrL in the expression of contextual fear conditioning. Average of freezing responses in rats treated with vehicle ($n = 5$) or corticosterone at doses of 0.25 ng ($n = 5$), 0.5 ng ($n = 7$), or 1 ng ($n = 6$) and exposed to the same context previously paired with footshocks (A). * Different from vehicle group ($P < 0.05$). Average freezing responses in rats treated with the combination of V + V, ($n = 7$); V + Cort (1 ng), ($n = 7$); Spiron (0.5 ng) + V, ($n = 7$); Spiron (0.5 ng) + Cort (1 ng), ($n = 6$); RU38486 (5 ng) + V, ($n = 7$); and RU38486 (5 ng) + Cort (1 ng), ($n = 7$) and exposed to the same context previously paired with footshocks (B). * Different from V + V, Spiron (0.5 ng) + V, and V + RU38486 (5 ng) groups. # Different from the V + Cort (1 ng) and Spiron (0.5 ng) + Cort (1 ng) groups ($P < 0.05$). V, vehicle; Spiron, spironolactone; Cort, corticosterone.

Table 1 Effects of spironolactone and corticosterone on the expression of freezing behavior in rats submitted to a different context (n = 6–7 “per” group)

Treatment	Freezing (s)
Veh + Veh	146.50 ± 30.07
Veh + Spiron (2.5 ng)	188.57 ± 37.38
Veh + Cort (1 ng)	163.29 ± 45.57

Effects of Corticosterone and Spironolactone into the PrL on Time of Freezing Behavior in Rats Submitted to a Different Context

One-way ANOVA revealed that injections of spironolactone (2.5 ng) or corticosterone (1 ng) into the PrL did not influence freezing response of rats that were subjected to a context different from the conditioning context compared with the vehicle-treated group (Table 1 [$F_{2,17} = 0.28, P > 0.05$]).

Discussion

The present results suggest that glucocorticoid release during contextual fear-conditioning responses influences mPFC activity and the expression of conditioned fear. Metyrapone, a glucocorticoid synthesis inhibitor, attenuated this behavioral response accompanied by a decrease in Fos-protein expression in the mPFC. Moreover, spironolactone, an MR antagonist, decreased the freezing response when it was injected in the PrL, an effect that was prevented by pretreatment with the GR antagonist RU38486. Endogenous corticosterone can activate both MRs and GRs, and the effects that were observed after MR antagonist administration could be attributable to changes in the balance of MR and GR signaling and a redirection of corticosterone actions to GRs. Supporting the hypothesis that the antiaversive effect of corticosterone is mediated by an increase in GR activation, direct injections of corticosterone into the PrL decreased the freezing response, which was prevented by pretreatment with a GR antagonist but not MR antagonist.

The inhibition of corticosterone synthesis prior to exposure to the environment where footshocks were previously administered reduced the freezing response, associated with a decrease in Fos expression in the PrL, Cg1, and Cg2, suggesting an important role of hormone release in the expression of conditioned fear responses that are organized in the mPFC. A previous study demonstrated that the freezing response was attenuated by removing the adrenal glands in rats 1 h before the test, an effect that was reversed by systemic corticosterone administration (Bohus et al. 1987). Moreover, metyrapone administration before the test session in nonadrenalectomized rats decreased the duration of conditioned freezing (Roozendaall et al. 1996; de Oliveira et al. 2012). Furthermore, a clinical study reported that metyrapone administration effectively reduced both plasma cortisol concentrations and the strength of an emotional memory in a long-lasting manner, without affecting the retrieval of neutral responses (Marin et al. 2011).

The most obvious explanation for the effects of metyrapone is that the activation of GRs and MRs receptors is influenced by decreases in corticosteroid levels (Roozendaall et al. 1996). However, some alternative explanations should be considered. Metyrapone administration may result in increases in progesterone and deoxycorticosterone concentrations (Krugers et al. 2000). These hormones can potentiate responses that are mediated by

γ -aminobutyric acid-A (GABA_A) receptors and block Ca²⁺-dependent channels (French-Mullen and Spence 1991; Reddy and Rogawski 2002). Such effects may underlie an anxiolytic action of the drug.

Interestingly, some studies have demonstrated that increases in plasma corticosteroid concentrations can also reduce conditioned freezing responses. Atsak et al. (2012) showed that systemic corticosterone administration before the test session decreased the expression of contextual conditioned fear in rats. In another study, mice were systemically treated with corticosterone before the test session and exhibited a reduction of the expression of conditioned fear (Cai et al. 2006). Consistent with these results, some human studies indicated that the exogenous administration of cortisone, which is rapidly absorbed and converted to cortisol, may impair the declarative memory retrieval of emotional valence information (de Quervain et al. 2007). Based on the results that indicated a reduction of the expression of conditioned fear after opposing manipulations of plasma corticosterone concentrations, an inverted U-shaped function may be observed between the circulating levels of corticosterone and magnitude of contextual conditioned fear expression (Joels and de Kloet 1994).

Evidence suggest the involvement of the mPFC in regulating stress responses, and this structure appears to be involved in the modulation of endocrine and behavioral responses (Diorio et al. 1993; Mobbs et al. 2007; Radley et al. 2009; Sotres-Bayon and Quirk 2010; Jones et al. 2011). With regard to behavioral data, the PrL and cingulate regions appear to play roles in the expression of defensive behavior, including fear conditioning (Sotres-Bayon and Quirk 2010; Albrechet-Souza et al. 2013). In fact, the importance of mPFC activity in rats that are subjected to contextual fear conditioning has been extensively reported. Pharmacological inactivation by tetrodotoxin (Sierra-Mercado et al. 2006) or cobalt chloride (Lisboa et al. 2010) that was restricted to the PrL reduced the expression of fear that was associated with an explicit or contextual conditioned stimulus. Furthermore, in vivo electrophysiological studies in rats showed that neurons in PrL responded with an increase in firing rate during exposure to aversive conditioned stimuli (Baeg et al. 2001). The intense activity of the PrL that was induced by a conditioned stimulus also impaired the process of aversive memory extinction (Burgos-Robles et al. 2009; Maroun 2013).

The present study found no significant differences between groups in Fos-protein expression in the IL. Previous studies that reported differential functions between subregions of the mPFC suggested that the IL is more involved in extinction than in the expression of aversive memory (Sierra-Mercado et al. 2006; Maroun 2013). The differential participation of the IL and PrL in memory processes has been attributed to the specificity of projection pathways from each cortical region (Gabbott et al. 2005; Hoover and Vertes 2007), although little is known about the complex neuronal network functioning of these areas or how these networks interact during stressful situations (van Aerde et al. 2008). Considering the amygdaloid nuclei, although IL projects directly to inhibitory intercalated cell masses and the lateral division of the central nucleus of the amygdala to regulate the process of extinction, the main projection target of the PrL is the basolateral nucleus of the amygdala (McDonald 1998; Sotres-Bayon and Quirk 2010), suggesting different roles of each region in limbic-cognitive function.

Corticosteroid hormones that are secreted by the adrenal glands rapidly cross the blood–brain barrier and at high concentrations can bind to MRs and GRs (Reul and de Kloet 1985) that are located in both the rat and human mPFC (Meaney and Aitken

1985; Xing et al. 2004). In a classic study that investigated the binding of corticosteroids to brain tissue, Diorio et al. (1993) showed that the rat mPFC is sensitive to both selective MR and GR agonists. Thus, considering previous findings and the present results, the PrL was chosen to evaluate the ways in which MR and GR activity in the mPFC influences the expression of contextual conditioned fear. To address this issue, we investigated whether microinjections of an MR or GR antagonist in the PrL before the test affects the conditioned fear response. The intermediate dose of spironolactone (2.5 ng) decreased the expression of conditioned fear whereas administration of the other doses and RU38486 did not affect this response.

The present results confirm the effects that were observed after acute systemic or intracerebroventricular (i.c.v.) administration of spironolactone before the test session which reduced conditioned freezing in mice, whereas RU38486 had no effect (Korte et al. 1995; Zhou et al. 2011). Some studies have also suggested that MR antagonism may influence the expression of anxiety-like behavior, in which chronic treatment with an MR antagonist eplerenone decreased open-arm exploration in the elevated plus maze test in rats (Hlavacova et al. 2010).

In the present study, the higher dose of spironolactone (5 ng) lost its effect on the expression of the freezing response. Similarly, the behavioral effects of i.c.v. spironolactone administration on fear conditioning were lost when a higher dose was administered (Korte et al. 1995). To further understand this phenomenon, a previous study characterized the pharmacological MR and GR binding profiles, showing that RU38486 does not have significant affinity for MRs, whereas spironolactone has low affinity for GRs without intrinsic activity (Rupprecht et al. 1993). Thus, it is possible that the higher dose of spironolactone did not cause behavioral effects because of its residual action on GRs.

Given the aforementioned evidence, the present study investigated whether the effects that are observed after MR antagonist administration into the PrL could be attributable to the facilitation of endogenous corticosterone actions on GRs. The results showed that the decrease in conditioned fear that was induced by the microinjection of spironolactone was inhibited by pretreatment with an ineffective dose of RU38486, suggesting that the impairment in memory retrieval that was observed with MR antagonism in the PrL was at least partially caused by changes in the balance between MRs and GRs toward an increase in GR-mediated corticosterone action. Supporting this hypothesis, the present results showed that corticosterone treatment decreased the freezing response, an effect that was abolished by pretreatment with RU38486 but not by spironolactone at the dose of 0.5 ng, which cannot completely exclude the possible role of MRs in this process. Additionally, the present results showed that neither spironolactone nor corticosterone treatment altered the expression of freezing behavior in a context that was different from the one where the rats were conditioned, suggesting that the increase in GR activity in the PrL before the test session led to a selective decrease in the expression of conditioned fear.

The PFC has been implicated in the inhibition of inappropriate responses and consequently adaptive processes. It is plausible that the balance between GRs and MRs in this brain region is essential for behavioral adaptation. Repeated exposure to stressful situations has been reported to decrease GR expression and increase MR expression in the mPFC (Chiba et al. 2012; Zhang et al. 2012), suggesting that an imbalance between MR and GR activity could underlie some aspects of emotional disorders that are influenced by stress. Corticosterone is well known to act primarily on MRs because it has higher affinity and intrinsic activity

for these receptors (Reul and de Kloet 1985). In the PrL region, when corticosterone acts secondarily on GRs, it produces opposite effects. The extent to which these opposing actions of glucocorticoids on MRs and GRs contribute to the overall effect, as seen during stressful situations, remains to be determined.

A review by de Kloet (2013) discussed the functional profile of this binary brain corticosteroid receptor system, proposing that modulating processes that are coordinated by corticosterone in response to homeostatic challenge operate via MRs and GRs in 2 complementary modes. He suggested that MRs mediate appraisal processes, such as risk assessment and the onset of stress reactions, whereas GR-mediated actions are related to controllability of the situation, adaptation, and turning off the stress reaction. Because the test situation in the present study was aversive, a rapid rise in circulating corticosterone levels in vehicle-treated animals was expected (Roozendaal et al. 1992), which begin to fully occupy MRs and increasingly occupy GRs (Yau and Seckl 2012). As mentioned previously, some of the effects of metyrapone in decreasing freezing responses are mediated by decreases in endogenous corticosterone concentrations and might influence not only GR—but also MR-mediated effects (Roozendaal et al. 1996). Considering the present findings and previous studies that reported decreases in the expression of freezing responses that were induced by corticosterone administration (Atsak et al. 2012), the behavioral responses that are induced by this hormone may be mediated by a rapid increase in both MR and GR activity. Therefore, although our results showed that an increase in GR-mediated corticosterone actions is crucial for this process in the mPFC, both corticosterone and metyrapone may induce the same behavioral outcome by influencing the balance between MR and GR activity and the retrieval of conditioned fear memory in an inverted U-shaped function (Joels and de Kloet 1994).

Regarding the lack of an effect of GR antagonism per se, although we observed an effect of MR blockade that depended on GRs, the opposite is not necessarily true (i.e., the facilitation of memory retrieval). The balance between MR and GR signaling in homeostatic control reflects different and complementary roles of GR and MR activation (de Kloet 2013). These receptors have different signaling pathways and mediate distinct rapid effects on neurotransmission (Tasker et al. 2006).

Glucocorticoids can indirectly influence neuronal activity by modulating neurotransmitter systems. Glucocorticoids were reported to exert their actions by increasing endocannabinoid (eCB) mobilization (Di et al. 2003; Wang et al. 2012). This mechanism is mediated by GR activation, also in the membrane, which rapidly stimulates the production of eCBs in the brain, which in turn can bind to cannabinoid 1 receptors (CB₁) that are located presynaptically and inhibit neurotransmitter release (Popoli et al. 2012). Previous studies that confirmed this interaction between glucocorticoids and the eCB system showed that the effects of systemic corticosterone administration in rats decreased contextual conditioned fear by increasing eCB levels in the hippocampus (Atsak et al. 2012) and acute stress increased eCB production in the mPFC through GR activation (Hill et al. 2011). The activation of CB₁ receptors by eCBs, such as 2-arachidonoylglycerol and anandamide, can modulate synaptic transmission by regulating GABA and glutamate release (Kano et al. 2009; Popoli et al. 2012; Wang et al. 2012). With regard to glutamate, acute stress was recently shown to rapidly increase glutamate release in the mPFC, and systemic GR antagonist administration prevented this response (Musazzi et al. 2010). Furthermore, the *in vitro* application of corticosterone in this region rapidly induced the mobilization of synaptic vesicles, priming

the terminals to enhance glutamate release in response to acute stress (Treccani et al. 2014).

In the present study, we cannot exclude the possibility that increases in GR activation in the PrL as a result of corticosterone challenge may influence HPA axis activity and consequently behavioral responses. The mPFC is a target structure for the effects of glucocorticoids in the negative feedback mechanism of the HPA axis in responses to acute psychological stressors (Herman et al. 2005; Radley et al. 2009; Jones et al. 2011). Despite the short time interval between corticosterone administration in the PrL and the fear conditioning test, GR activation in the PrL is suggested to contribute to the recovery and termination of stress-induced HPA axis activation (Hill et al. 2011).

In summary, the present study showed that the inhibition of corticosterone synthesis during the expression of contextual conditioned fear decreased PrL activity and the freezing response. The results also showed that MR antagonism in this region decreased conditioned fear, an effect that depended on GR activation by endogenous glucocorticoids. Corticosterone administration in the PrL also reduced freezing behavior, an effect that is attributable to changes in the MR:GR balance toward an increase in GR-mediated corticosterone action. The results suggest an important role of rapid nongenomic effects of glucocorticoids in the mPFC in the cognitive control of emotional learning experiences.

Funding

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (grant no. 11/00041-3) and CNPq (grant no. 471325/2011-2).

Notes

The corresponding author, F.M.C.V.R., holds a Doctoral fellowship, grant #2011/18001-8, São Paulo Research Foundation (FAPESP) in the Department of Psychology of FFCLRP, University of São Paulo, Brazil. Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre. Ribeirão Preto, SP, Brazil, Zip code: 14040-901. R.C.A. has a Post-doctoral fellowship, grant #2012/22681-7, São Paulo Research Foundation (FAPESP) and M.V.F. holds a Doctoral fellowship, grant #2011/19801-8, São Paulo Research Foundation (FAPESP). The authors declare sole responsibility for the scientific content of this paper. *Conflict of Interest:* None declared.

References

- Albrechet-Souza L, Carvalho MC, Brandao ML. 2013. D(1)-like receptors in the nucleus accumbens shell regulate the expression of contextual fear conditioning and activity of the anterior cingulate cortex in rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 16:1045–1057.
- Atsak P, Hauer D, Campolongo P, Schelling G, McGaugh JL, Roozendaal B. 2012. Glucocorticoids interact with the hippocampal endocannabinoid system in impairing retrieval of contextual fear memory. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109:3504–3509.
- Baeg EH, Kim YB, Jang J, Kim HT, Mook-Jung I, Jung MW. 2001. Fast spiking and regular spiking neural correlates of fear conditioning in the medial prefrontal cortex of the rat. *Cereb Cortex.* 11:441–451.
- Barsegyan A, Mackenzie SM, Kurose BD, McGaugh JL, Roozendaal B. 2010. Glucocorticoids in the prefrontal cortex enhance memory consolidation and impair working memory by a common neural mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:16655–16660.
- Bohn MC, Howard E, Vielkind U, Krozowski Z. 1991. Glial cells express both mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 40:105–111.
- Bohus B, Benus RF, Fokkema DS, Koolhaas JM, Nyakas C, van Oortmerssen GA, Prins AJ, de Ruiter AJ, Scheurink AJ, Steffens AB. 1987. Neuroendocrine states and behavioral and physiological stress responses. *Progress Brain Res.* 72:57–70.
- Bouton ME, Bolles RC. 1980. Conditioned fear assessed by freezing and by the suppression of three different baselines. *Anim Learn Behav.* 8:429–434.
- Burgos-Robles A, Vidal-Gonzalez I, Quirk GJ. 2009. Sustained conditioned responses in prelimbic prefrontal neurons are correlated with fear expression and extinction failure. *J Neurosci.* 29:8474–8482.
- Cai WH, Blundell J, Han J, Greene RW, Powell CM. 2006. Postreactivation glucocorticoids impair recall of established fear memory. *J Neurosci.* 26:9560–9566.
- Chauveau F, Pierard C, Tronche C, Coutan M, Drouet I, Liscia P, Beracochea D. 2009. The hippocampus and prefrontal cortex are differentially involved in serial memory retrieval in non-stress and stress conditions. *Neurobiol Learn Mem.* 91:447–455.
- Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Richards MC, Wakabayashi C, Kunugi H. 2012. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 39:112–119.
- de Kloet ER. 2013. Functional profile of the binary brain corticosteroid receptor system: mediating, multitasking, coordinating, integrating. *Eur J Pharmacol.* 719:53–62.
- de Oliveira AR, Reimer AE, Reis FM, Brandao ML. 2012. Conditioned fear response is modulated by a combined action of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and dopamine activity in the basolateral amygdala. *Eur Neuropsychopharmacol.* 5:379–389.
- de Quervain DJ, Aerni A, Roozendaal B. 2007. Preventive effect of beta-adrenergic blockade on glucocorticoid-induced memory retrieval deficits. *Am J Psychiatry.* 164:967–969.
- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG. 2003. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci.* 23:4850–4857.
- Diorio D, Viau V, Meaney MJ. 1993. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci.* 13:3839–3847.
- Evanson NK, Herman JP, Sakai RR, Krause EG. 2010. Nongenomic actions of adrenal steroids in the central nervous system. *J Neuroendocrinol.* 22:846–861.
- Fanselow MS. 1980. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci.* 15:177–182.
- French-Mullen JM, Spence KT. 1991. Neurosteroids block Ca²⁺ channel current in freshly isolated hippocampal CA1 neurons. *Eur J Pharmacol.* 202:269–272.
- Gabbot PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ. 2005. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol.* 492:145–177.
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joels M. 2011. Rapid nongenomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *J Endocrinol.* 209:153–167.

- Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H. 2005. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 29:1201–1213.
- Hill MN, McLaughlin RJ, Pan B, Fitzgerald ML, Roberts CJ, Lee TT, Karatsoreos IN, Mackie K, Viau V, Pickel VM, et al. 2011. Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. *J Neurosci*. 31:10506–10515.
- Hlavacova N, Bakos J, Jezova D. 2010. Eplerenone, a selective mineralocorticoid receptor blocker, exerts anxiolytic effects accompanied by changes in stress hormone release. *J Psychopharmacol*. 24:779–786.
- Hoover WB, Vertes RP. 2007. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct*. 212:149–179.
- Joels M, de Kloet ER. 1994. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol*. 43:1–36.
- Jones KR, Myers B, Herman JP. 2011. Stimulation of the prelimbic cortex differentially modulates neuroendocrine responses to psychogenic and systemic stressors. *Physiol Behav*. 104:266–271.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M. 2009. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiological Rev*. 89:309–380.
- Karst H, Berger S, Erdmann G, Schutz G, Joels M. 2010. Metaplasticity of amygdalar responses to the stress hormone corticosterone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:14449–14454.
- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schütz G, Joëls M. 2005. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:19204–19207.
- Korte SM, de Boer SF, de Kloet ER, Bohus B. 1995. Anxiolytic-like effects of selective mineralocorticoid and glucocorticoid antagonists on fear-enhanced behavior in the elevated plus-maze. *Psychoneuroendocrinology*. 20:385–394.
- Krugers HJ, Maslam S, Korff J, Joels M, Holsboer F. 2000. The corticosterone synthesis inhibitor metyrapone prevents hypoxia/ischemia-induced loss of synaptic function in the rat hippocampus. *Stroke*. 31:1162–1172.
- Lisboa SF, Stecchini MF, Correa FM, Guimaraes FS, Resstel LB. 2010. Different role of the ventral medial prefrontal cortex on modulation of innate and associative learned fear. *Neuroscience*. 171:760–768.
- Marin MF, Hupbach A, Maheu FS, Nader K, Lupien SJ. 2011. Metyrapone administration reduces the strength of an emotional memory trace in a long-lasting manner. *J Clin Endocrinol Metab*. 96:1221–1227.
- Maroun M. 2013. Medial prefrontal cortex: multiple roles in fear and extinction. *Neuroscientist*. 4:370–383.
- McDonald AJ. 1998. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress Neurobiol*. 55:257–332.
- McEwen BS, Davis PG, Parsons B, Pfaff DW. 1979. The brain as a target for steroid hormone action. *Annu Rev Neurosci*. 2:65–112.
- McEwen BS, De Kloet ER, Rostene W. 1986. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev*. 66:1121–1188.
- Meaney MJ, Aitken DH. 1985. [3H]Dexamethasone binding in rat frontal cortex. *Brain Res*. 328:176–180.
- Mikics E, Kruk MR, Haller J. 2004. Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids on aggressive behavior in male rats. *Psychoneuroendocrinology*. 29:618–635.
- Mikics E, Barsy B, Barsvári B, Haller J. 2005. Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. *Horm Behav*. 48:152–162.
- Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ, Frith CD. 2007. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science*. 317:1079–1083.
- Morrow LE, McClellan JL, Klir JJ, Kluger MJ. 1996. The CNS site of glucocorticoid negative feedback during LPS- and psychological stress-induced fevers. *Am J Physiol*. 271:732–737.
- Musazzi L, Milanese M, Farisello P, Zappettini S, Tardito D, Barbiero VS, Bonifacino T, Mallei A, Baldelli P, Racagni G, et al. 2010. Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PLoS One*. 5:8566.
- Paxinos G, Watson C. 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press.
- Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G. 2012. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci*. 13:22–37.
- Radley JJ, Gosselink KL, Sawchenko PE. 2009. A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci*. 29:7330–7340.
- Reddy DS, Rogawski MA. 2002. Stress-induced deoxycorticosterone-derived neurosteroids modulate GABA(A) receptor function and seizure susceptibility. *J Neurosci*. 22:3795–3805.
- Reul JM, de Kloet ER. 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*. 117:2505–2511.
- Rodrigues SM, LeDoux JE, Sapolsky RM. 2009. The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annu Rev Neurosci*. 32:289–313.
- Rooszendaal B, Bohus B, McGaugh JL. 1996. Dose-dependent suppression of adrenocortical activity with metyrapone: Effects on emotion and memory. *Psychoneuroendocrinology*. 21:681–693.
- Rooszendaal B, Hernandez A, Cabrera SM, Hagewoud R, Malvaez M, Stefanko DP, Haettig J, Wood MA. 2010. Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *J Neurosci*. 30:5037–5046.
- Rooszendaal B, Koolhaas JM, Bohus B. 1992. Central amygdaloid involvement in neuroendocrine correlates of conditioned stress responses. *J Neuroendocrinol*. 4:483–489.
- Rooszendaal B, McGaugh JL. 1997. Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. *Neurobiol Learn Mem*. 67:176–179.
- Rupprecht R, Reul JM, van Steensel B, Spengler D, Soder M, Berning B, Holsboer F, Damm K. 1993. Pharmacological and functional characterization of human mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands. *Eur J Pharmacol*. 247:145–154.
- Sierra-Mercado D Jr, Corcoran KA, Lebron-Milad K, Quirk GJ. 2006. Inactivation of the ventromedial prefrontal cortex reduces expression of conditioned fear and impairs subsequent recall of extinction. *Eur J Neurosci*. 24:1751–1758.
- Sotres-Bayon F, Quirk GJ. 2010. Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr Opin Neurobiol*. 20:231–235.
- Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R. 2006. Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology*. 147:5549–5556.
- Treccani G, Musazzi L, Perego C, Milanese M, Nava N, Bonifacino T, Lamanna J, Malgaroli A, Drago F, Racagni G, et al. 2014. Stress and corticosterone increase the readily

- releasable pool of glutamate vesicles in synaptic terminals of prefrontal and frontal cortex. *Mol Psychiatry*. 19:433–443.
- van Aerde KI, Heistek TS, Mansvelde HD. 2008. Prelimbic and infralimbic prefrontal cortex interact during fast network oscillations. *PLoS One*. 3:2725.
- Wang M, Hill MN, Zhang L, Gorzalka BB, Hillard CJ, Alger BE. 2012. Acute restraint stress enhances hippocampal endocannabinoid function via glucocorticoid receptor activation. *J Psychopharmacol*. 26:56–70.
- Wisłowska-Stanek A, Lehner M, Skorzevska A, Maciejak P, Szyndler J, Turzyska D, Sobolewska A, Plaznik A. 2013. Corticosterone modulates fear responses and the expression of glucocorticoid receptors in the brain of high-anxiety rats. *Neurosci Lett*. 533:17–22.
- Xing GQ, Russell S, Webster MJ, Post RM. 2004. Decreased expression of mineralocorticoid receptor mRNA in the prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 7:143–153.
- Yau JL, Seckl JR. 2012. Local amplification of glucocorticoids in the aging brain and impaired spatial memory. *Front Aging Neurosci*. 4:24.
- Zhang JH, Han F, Shi YX. 2012. Single prolonged stress induces changes in the expression of mineralocorticoid receptor in the medial prefrontal cortex in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Mol Med Rep*. 6:330–334.
- Zhou M, Kindt M, Joels M, Krugers HJ. 2011. Blocking mineralocorticoid receptors prior to retrieval reduces contextual fear memory in mice. *PLoS One*. 6:26220.