

Vários autores têm mostrado que a administração sistêmica de inibidores de recaptação de serotonina e agonistas seletivos de receptores 5-HT_{1A} diminuem a resposta de congelamento condicionada de maneira dose-dependente, sugerindo a participação do sistema serotoninérgico no medo condicionado (Inoue *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2001; ver Gray & Mc Naughton, 2000 para revisão). Entretanto, não são muitos os estudos encontrados na literatura sobre o envolvimento do NMR na regulação motora, comportamento defensivo e respostas autonômicas associadas com o medo (Graeff & Silveira Filho, 1978; Gray, 1987; Hillegaart & Hjorth, 1989; Hillegaart, 1990; Avanzi *et al.*, 1998). Nesse trabalho conduzimos vários experimentos que demonstram um papel crítico desse núcleo no medo condicionado. Os animais de nossos grupos controle injetados com salina no NMR apresentaram o congelamento como resposta proeminente quando colocados no contexto onde, anteriormente, receberam choques nas patas. Essa resposta foi ausente com a remoção dos sinais contextuais associados ao choque, isto é, quando os ratos foram colocados na caixa na qual não receberam choques nas patas (contexto diferente – caixa B). Esses resultados confirmam trabalhos prévios que mostram que o congelamento é uma resposta importante ao contexto associado com o choque, e por isso, bastante útil como medida do medo condicionado (Fanselow, 1991; Fanselow *et al.*, 1995; Maren *et al.*, 1997).

Uma via proposta como responsável pelas respostas na regulação do comportamento defensivo e respostas autonômicas associadas com o medo, são as projeções do NMR que ascendem pelo feixe prosencefálico medial até o septo e hipocampo (Bobillier *et al.*, 1975; 1976; Geyer *et al.*, 1976; Molliver, 1987). McKenna & Vertes (2001) demonstraram que o NMR se projeta densamente para o septo medial e hipocampo, e que uma quantidade significativa de neurônios serotoninérgicos participam

dessas projeções. De fato, existem fortes evidências de que o hipocampo está envolvido na aprendizagem das características contextuais em que o condicionamento ocorre (Maren *et al.*, 1997, Fanselow, 2000; Gewirtz *et al.*, 2000; Maren & Holt, 2000). Com base nessa e em outras evidências tem sido sugerido que essas vias constituem parte do chamado Sistema de Inibição Comportamental (Gray & McNaughton, 2000). De acordo com isso, a via NMR-hipocampo está envolvida na inibição comportamental e mecanismos de resistência ao estresse (Gray, 1987; Deakin & Graeff, 1991; Gray & McNaughton, 2000). Além disso, a estimulação elétrica do NMR elicia *crouching*, defecação, micção, piloereção e outros sinais que são característicos do comportamento emocional no rato (Graeff & Silveira-Filho, 1978).

Recentemente mostramos que a lesão eletrolítica do NMR abole a aquisição do medo condicionado contextual (Avanzi *et al.*, 1998). No presente trabalho, demos mais um passo neste campo ao verificar que esses efeitos não podem ser atribuídos a lesões das fibras de passagem, já que lesões neurotóxicas do NMR com NMDA - que destrói unicamente corpos celulares - produzem os mesmos efeitos causados pela lesão eletrolítica. A contribuição mais importante do presente estudo é que neurônios serotoninérgicos, com origem no NMR, têm um papel importante na regulação do condicionamento contextual. De fato, os presentes resultados mostraram que a microinjeção de 8-OH-DPAT no NMR reduz significativamente as respostas de medo evocadas por estímulos contextuais aversivos, indicando o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos, no processo de formação da memória de medo ao contexto aversivo.

Foi proposto que a via NMR-hipocampal está criticamente envolvida nesses efeitos, já que tem sido sugerido que lesões do hipocampo produzem efeitos similares (Kim & Fanselow, 1992; Phillips & LeDoux, 1992). Muitos outros dados têm mostrado

o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos com o sistema NMR-hipocampal na mediação de situações ameaçadoras. Assim, a diminuição da neurotransmissão serotoninérgica nessas vias aumenta o comportamento exploratório de ratos durante o teste do labirinto em cruz elevado (Maisonette *et al.*, 1993; Padovan & Guimarães, 1993; Mendonça Neto & Guimarães, 1996; Andrade *et al.*, 1999) e ratos com lesão do NMR com 5,7-DHT gastam mais tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado que os animais do grupo controle (Thomas *et al.*, 2000). De acordo com isso, injeções intrahipocâmpais de 8-OH-DPAT prejudicam o desempenho no teste de esquiwa passiva (Carli & Samanin, 1992). Além disso, os efeitos ansiolíticos induzidos por lesões do sistema serotoninérgico nos núcleos da rafe também são observados no conflito da interação social e no teste do labirinto em cruz elevado (Briley *et al.*, 1990), e a microinjeção no NMR de 8-OH-DPAT que promove a ativação de autoreceptores 5-HT_{1A}, diminui a ansiedade nesse último teste (De Almeida *et al.*, 1998).

Andrade e colaboradores (1999) demonstraram que a lesão eletrolítica do NMR leva a um quadro ansiolítico no teste claro-escuro, com aumento da exploração do lado claro e no número de transições. A resposta comportamental evidenciada no labirinto em cruz elevado, foi correspondente à apresentada no teste claro-escuro (Andrade *et al.*, 1999). Isso sugere que a lesão do NMR causa, além de um efeito ansiolítico, uma desinibição comportamental. Conforme já descrito, a via NMR-hipocampo está envolvida nos mecanismos de inibição comportamental e de resistência ao estresse (Gray, 1987; Deakin & Graeff, 1991, Gray & McNaughton, 2000). Parece que existe um envolvimento de neurônios serotoninérgicos nessas respostas e que, receptores 5-HT_{1A} somatodendríticos tenham participação no controle dessa resposta.

Para Gray (1987), o hipocampo é uma estrutura que funciona como um comparador que avalia estímulos atuais e estímulos esperados, ativando, em situações

aversivas, os comportamentos mais adequados. A destruição do NMR levaria a uma interrupção na transmissão dessas informações ao hipocampo. Nesse caso, o animal deixaria de reconhecer o estímulo estressor como ameaçador, aumentando, assim, sua atividade exploratória, não somente em situações aversivas (no caso dos braços abertos do labirinto em cruz elevado e o lado claro do teste claro-escuro), como também após exposição prévia a um estímulo estressante, como, por exemplo, a imobilização (Andrade *et al.*, 1999).

O hipocampo também recebe projeções noradrenérgicas provenientes do locus coeruleus. O disparo de neurônios noradrenérgicos do locus coeruleus é regulado por autoreceptores α_2 -adrenérgicos somatodendríticos (Haring & Davis, 1985). Tem sido proposto que receptores serotoninérgicos e noradrenérgicos hipocampais estão envolvidos com os mecanismos de ação de agentes antidepressivos, sendo que os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico nessa estrutura são diferentemente afetados por tratamentos antidepressivos, os quais aumentam a neurotransmissão 5-HT_{1A} enquanto diminuem a neurotransmissão β -adrenérgica no hipocampo (Mongeau *et al.*, 1997).

Os presentes resultados mostram que a lesão com NMDA ou a microinjeção de 8-OH-DPAT no NMR reduzem significativamente o congelamento induzido pela exposição ao contexto previamente pareado com o choque nas patas. Esses efeitos não são devidos à menor sensibilidade dos animais ao choque nas patas. Pelo contrário, tem sido sugerido que se há alguma interferência na sensibilidade à dor, esta parece estar aumentada em animais com prejuízo da transmissão serotoninérgica mesolímbica (Gray, 1987). Além disso, todos os animais testados nesse estudo apresentaram, durante a sessão de condicionamento, uma atividade explosiva com saltos durante os choques, que também se estendia para os intervalos de teste. Essa resposta não foi estatisticamente diferente entre os grupos injetados com salina e 8-OH-DPAT ou

NMDA. Esses dados estão de acordo com estudos recentes que mostram que a lesão neurotóxica do NMR com ácido ibotênico não afeta o comportamento de congelamento apresentado imediatamente após a sessão de choque nas patas, enquanto que esses mesmos animais testados 48 horas após os choques, apresentaram uma diminuição desse comportamento (Melik *et al.*, 2000), como foi observado em nosso trabalho com a avaliação do congelamento 24 horas após os choques. Com isso, Melik e colaboradores (2000), sugerem que lesões de vias serotonérgicas do NMR não afetam o medo condicionado de curto prazo, mas apresentam um importante efeito na diminuição do congelamento de longo prazo. Segundo esses pesquisadores, vias serotonérgicas NMR-septo-hipocampal estão envolvidas na regulação da ansiedade relacionada ao condicionamento de medo, desencadeada por estímulo contextual, sugerindo que o medo contextual de curto prazo é independente do NMR, enquanto que o medo contextual de longo prazo é regulado por essa estrutura. Assim, os dados desse trabalho acrescentam um novo elemento aos processos fisiológicos regulados pelo NMR, a associação desse núcleo com o condicionamento contextual.

Outra importante contribuição do presente estudo é que microinjeções de 8-OH-DPAT - agonista de receptores 5-HT_{1A} somatodendríticos – e NMDA no NMR não afetam a resposta de congelamento apresentada por ratos submetidos ao condicionamento com pareamento som/choques nas patas, mas reduzem o congelamento condicionado obtido como consequência do pareamento luz/choques nas patas. Com isso, sugerimos que o NMR não é essencial para a memória de medo baseada na associação som/choque. Assim, os efeitos das manipulações do NMR nas respostas condicionadas de medo quando o EC é contexto ou luz não podem ser generalizadas para outros tipos de EC, como o estímulo acústico. Em outras palavras, os circuitos neurais não são os mesmos para outro tipo de EC, como o estímulo

condicionado acústico de natureza aversiva. O NMR parece ser crítico na aquisição do medo condicionado contextual ou resultante do pareamento luz/choque. Similarmente, quando o hipocampo foi lesado antes do condicionamento, foi observada uma diminuição na aprendizagem associativa entre choques e som (Kim & Fanselow, 1992; Philips & LeDoux, 1992). Lesões dessa estrutura bloqueiam o desempenho em tarefas que requerem a aprendizagem e memória de relações espaciais (Olton *et al.*, 1979; Morris *et al.*, 1986; Chan *et al.*, 2001; Redish, 2001). Ainda nesse sentido, lesões ou microinjeções de agonistas 5-HT_{1A} no hipocampo prejudicam a memória contextual, mas não tem efeitos naquela decorrente da associação som/choque, sugerindo um envolvimento preferencial de receptores 5-HT_{1A} hipocampais na resposta ao medo contextual (Fanselow, 2000; Stiedl *et al.*, 2000; Corcoran & Maren, 2001).

O envolvimento da amígdala nesse processo não pode ser descartado. Fibras do NMR se projetam a partir do feixe prosencefálico medial, passam pela cápsula interna e chegam à amígdala (Nieuwenhuys, 1985). Lesões da amígdala prejudicam o medo condicionado a um sinal contextual da situação experimental, avaliado pelo congelamento e resposta de sobressalto (Kim & Fanselow, 1992; Phillips & LeDoux, 1992). Como mostra a Figura 13, a amígdala recebe essa informação de várias estruturas que atuam em paralelo, como o tálamo, hipocampo e córtex perirrinal e suas várias interconexões.

A amígdala parece também estar envolvida na produção da resposta de medo, já que lesões dessa estrutura reduzem ou abolem o desenvolvimento de praticamente todas as medidas do medo condicionado, por exemplo, a analgesia, o congelamento e a resposta de sobressalto (Blanchard & Blanchard, 1972; Hitchcock & Davis, 1986; Helmstetter, 1992). De interesse para o entendimento do papel funcional das conexões amígdala-hipocampais são os relatos de que lesões hipocampais atenuam o

congelamento contextual sem qualquer efeito na potencialização de sobressalto, enquanto que a lesão eletrolítica ou neurotóxica da amígdala bloqueia a potencialização do medo a um sinal contextual (Hithcock & Davis, 1986; Sananes & Davis, 1992; Philips & LeDoux, 1994; Campeau & Davis, 1995; McNish *et al.*, 1997).

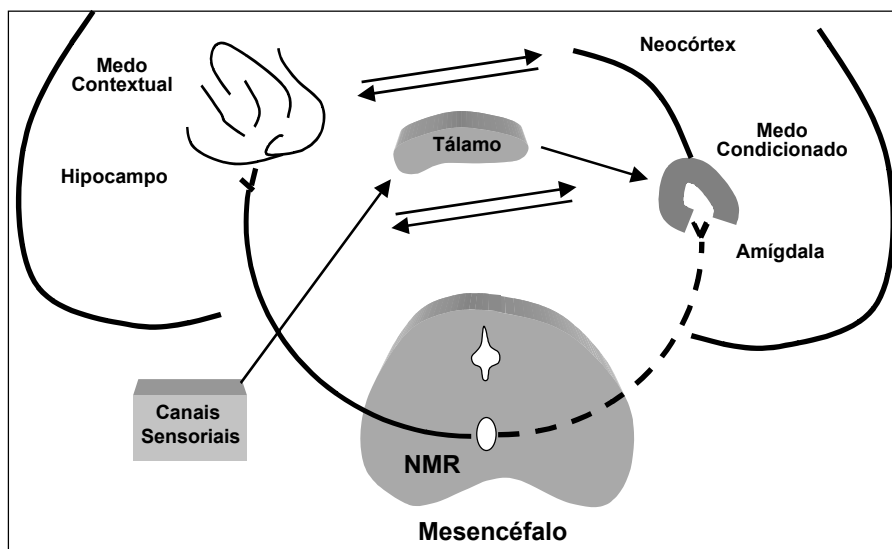


Figura 13: Representação esquemática dos circuitos envolvidos na modulação do medo condicionado evocado por estímulos contextuais ou discretos durante situações ameaçadoras. Neurônios ascendentes no núcleo mediano da rafe para o hipocampo são supostamente ativados por um estímulo contextual, enquanto aqueles que se projetam para a amígdala são ativados por estímulos implícitos de natureza aversiva. A amígdala é a interface entre o sistema sensorial que transmite informações sobre estímulos condicionados e incondicionados, e diferentes sistemas motores e autonômicos envolvidos na reação de defesa (Fendt & Fanselow, 1999).

Trabalhos recentes têm mostrado que a inativação funcional pré-treino do núcleo basolateral da amígdala prejudica a aquisição do medo condicionado a um estímulo contextual ou auditivo (Wilensky *et al.*, 2000; Maren, 1999). Além disso, os núcleos lateral e central da amígdala são necessários para a aquisição da resposta de

medo a um estímulo auditivo em um procedimento de aprendizagem associativa som/choques nas patas (Goosens & Maren, 2001; Nader *et al.*, 2001). Com base nesses relatos aliados a nossos resultados, sugerimos que o NMR não está envolvido em processos de aprendizagem associativa com estímulos acústicos aversivos e que, talvez a amígdala, seja essencial nessa resposta.

Acredita-se que a seleção da resposta de congelamento do repertório do animal é dependente de estruturas prosencefálicas, desde que esse comportamento é, em geral, associado a processos de aprendizagem (Davis, 1992; Fanselow *et al.*, 1995). Nesse contexto, tanto o SSH quanto o circuito amígdala-MCPV poderiam estar envolvidos na expressão dessa resposta. Contudo, o SSH parece estar principalmente relacionado com a iniciação e manutenção das funções que permitem a convivência a longo prazo com situações de estresse (Hillegaart & Hjort, 1989; Maren *et al.*, 1997; Fanselow, 2000; Gewirtz *et al.*, 2000; Maren & Holt, 2000). Por outro lado, é provável que um circuito envolvendo a amígdala-MCPV esteja envolvido na mediação do congelamento como resposta a estímulos inesperados, desde que a estimulação da MCPV resulta imediatamente em congelamento (Fanselow, 1991). O *output* de neurônios responsáveis por esse comportamento parece estar localizado na MCPV, e a informação que ativa esse comportamento provém da amígdala (Liebman *et al.*, 1970; Fanselow, 1991). A ativação da MCPV pode também estar relacionada com projeções diretas do NMR (Bobillier *et al.*, 1976; Beitz *et al.*, 1986). Apoiando essa sugestão tem sido proposto que a analgesia pode ser induzida por um contexto previamente associado com o choque inescapável, e a antinocicepção tem sido usualmente associada à MCPV (Fanselow, 1984; Fanselow, 1991). Esta analgesia é de natureza opióide e é atenuada pelo naloxone ou por tratamentos com antidepressivos crônicos (Murua & Molina, 1991). Esses

resultados estão de acordo com nossa hipótese, na medida que une os mecanismos serotoninérgicos do NMR com os mecanismos opióides na MCP ventral.

A redução da atividade locomotora vertical em ratos controle, medida neste estudo pela ocorrência de levantamentos, necessita ser analisada com cuidado. Na verdade, esses animais não mostraram qualquer alteração no número de levantamentos quando eles foram colocados em contextos diferentes, já que foi decorrência do efeito deslocamento dessa atividade pela indução do congelamento pelo contexto aversivo. Esses resultados são similares àqueles obtidos em recente trabalho desse laboratório (Avanzi *et al.*, 1998). Além disso, esta lesão produziu um claro aumento na atividade locomotora horizontal, como medida no teste de campo aberto. Vale lembrar que esses animais com diminuição da atividade serotoninérgica no NMR apresentaram uma deambulação atípica, com arqueamento do dorso e locomoção em disparos. Portanto, parece haver uma exacerbação motora desses animais. Estas descobertas estão de acordo com trabalhos recentes que mostram que lesões eletrolíticas desse núcleo aumentam a locomoção, mas não o comportamento exploratório vertical. (Wirtshafter & Asin, 1982; Albinsson *et al.*, 1996; Avanzi *et al.*, 1998). Também de acordo com os presentes resultados, a injeção de 8-OH-DPAT no NMR, que diminui a transmissão neuronal através da ativação dos autoreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} nas células da rafe, causa uma clara estimulação da atividade locomotora (Hillegaart & Hjorth, 1989; Hillegaart, 1990; Carli & Samanin, 1992).

Quanto às respostas autonômicas, microinjeções de NMDA ou 8-OH-DPAT no NMR afetam significativamente a micção que acompanha as manifestações comportamentais do medo. Esses efeitos não são surpreendentes dado que a estimulação desse núcleo causa respostas autonômicas (Graeff & Silveira-Filho, 1978). Como a micção foi diminuída em ambos os contextos (mesmo e diferente), essa resposta

autônoma parece não ser um componente do medo condicionado contextual e é, provavelmente, produzida incondicionalmente, ou seja, essa resposta é independente do estímulo aversivo. Por outro lado, nem a lesão neuroquímica do NMR com NMDA nem a inativação dessa estrutura com 8-OH-DPAT alterou a defecação em relação aos seus controles. Como mostramos anteriormente que a lesão eletrolítica do NMR reduziu o número de bolos fecais, outros mecanismos, que não aqueles mediados pela serotonina estão provavelmente envolvidos na expressão dessa resposta autônoma em particular. Embora a mediação química dessa resposta não esteja clara, ela parece estar associada ao sistema septo-hipocampal. De fato, lesões hipocâmpais produzem déficits no condicionamento contextual em modelos como aversão condicionada a estímulos gustativos e defecação induzida pelo medo (Sutherland & McDonald, 1990; Aguado *et al.*, 1998).

Antoniadis & McDonald (1999) examinaram a ocorrência de defecação durante sessões múltiplas de condicionamento e, em um paradigma discriminativo, encontrou que o condicionamento dessa resposta autônoma necessita de, pelo menos, três sessões de condicionamento para aumentar diferencialmente a ocorrência da defecação. Já a micção é aumentada durante a primeira sessão de condicionamento, sugerindo, assim, que mecanismos rápidos de aprendizagem associativa são acionados na produção desta resposta. De acordo com essa possibilidade, a resposta de micção condicionada não foi prejudicada quando o hipocampo ou a amígdala foram lesados, sugerindo que outro sistema de memória pode participar do condicionamento dessa resposta (Antoniadis & McDonald, 2001). Com isso, sugerimos que o substrato neural para as respostas autônomas em situações ameaçadoras parece não ser o mesmo daqueles relacionados ao comportamento defensivo.

Microinjeções de 8-OH-DPAT no NMR - agonista de receptores 5-HT_{1A} somatodendríticos - causa efeitos similares aos da lesão do NMR com NMDA. A diminuição da atividade serotoninérgica neuronal nessa estrutura pode ser responsável pela alteração das respostas comportamentais e autonômicas normalmente observadas no medo condicionado desencadeado por um estímulo contextual previamente pareado com situações ameaçadoras, ou seja, a inativação dessa estrutura causa uma redução na resposta de congelamento e outras alterações características da reação de medo. Resultados similares foram obtidos em um procedimento com pareamento luz/choque nas patas. Tendo em vista que microinjeções de 8-OH-DPAT no NMR não afetam a resposta de medo condicionado ao som previamente associado ao choque nas patas, esse estudo sugere que dependendo do tipo de estímulo condicionado, diferentes vias serotoninérgicas provenientes do NMR podem estar envolvidas no medo condicionado.