

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

**Distribuição da proteína Fos no lobo temporal medial de  
ratos Wistar durante o medo condicionado ao contexto, luz  
e som**

**Gustavo Massaro Onusic**

Tese apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão  
Preto – USP, como parte das exigências  
para obtenção do título de Doutor em  
Ciências. Área de Concentração:  
Psicobiologia.

Versão revisada

Ribeirão Preto

- 2010 -

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

**Distribuição da proteína Fos no lobo temporal medial de  
ratos Wistar durante o medo condicionado ao contexto, luz  
e som**

**Gustavo Massaro Onusic**

Tese apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão  
Preto – USP, como parte das exigências  
para obtenção do título de Doutor em  
Ciências. Área de Concentração:  
Psicobiologia.

**Orientador: Prof. Dr. Silvio Morato de Carvalho**

Versão revisada

Ribeirão Preto

- 2010 -

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

Onusic, Gustavo Massaro

Distribuição da proteína Fos no lobo temporal medial de ratos Wistar durante o medo condicionado ao contexto, luz e som. Ribeirão Preto, 2010.

50 p.; 10 il.; 30 cm.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências. – Área de Concentração: Psicobiologia.

Orientador: Silvio Morato

1. Medo condicionado. 2. Expressão *Fos*. 3. Lobo temporal medial. 4. Córtex entorrinal. 5. Córtex perirrinal. 6. Córtex ectorrinal.

## *DEDICATÓRIA*

*Dedico esta conquista*

Aos meus queridos pais **José** e **Rute** pelo amor, carinho, dedicação, compreensão e, principalmente pelo apoio nesta jornada de formação pessoal e acadêmica, sempre acreditando em meu potencial.

Aos meus irmãos *Luciana, Daniel e Alexandre* pela presença carinhosa em todos estes anos de risos, choros, lutas e superações.

## AGRADECIMENTOS

Às forças divinas.

Ao Professor Dr. Marcus Lira Brandão, por confiar em minha capacidade profissional, sua excelente orientação bem como sua disposição em ensinar e ajudar-me neste caminho, muitas vezes difícil.

A Professora Dra. Cláudia Maria Padovan, por me acolher em seu laboratório e auxiliando-me no amadurecimento técnico-profissional, bem como no âmbito pessoal.

Aos professores que compuseram a banca examinadora de qualificação: Dr. Antônio Roberto Martins, Dr. Norberto Cysne Coimbra e Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, sempre com pontuações q ajudaram fundamentalmente na elaboração deste trabalho.

Ao Professor Dr. Silvio Morato de Carvalho, por seu profissionalismo em orientar-me nas diversas questões surgidas bem como por me acolher para o término desta etapa.

A Renata Vicentini Del Moro, por sua paciência, atenção e orientação com relação aos aspectos formais ao longo de todo o estudo de doutorado.

Aos amigos, Diego, Karina, Aline, Melissa, Lucas, Rafael entre tantos outros sem os quais não teria tido tanta força para continuar, e tanto contribuíram intelectualmente também para elaboração deste trabalho.

Ao Professor Dr. Nilson Santos, por suas imprescindíveis contribuições durante estes anos de estudo e elaboração do presente trabalho, e também por compartilhar momentos felizes em lugares magníficos.

À Professora Dr<sup>a</sup>. *Juliana Setem Carvalho Tucci* pelo apoio e incentivo ainda durante a graduação, o que muito me motivou a seguir carreira acadêmica. Além disso, é uma excelente docente.

À Professora Dr<sup>a</sup>. *Soraya Maria Romano Pacífico*, com quem tive oportunidade de ser aluno e estagiário PAE. Uma excelente profissional e uma pessoa magnífica.

Ao Professor *Dr. Francisco Silveira Guimarães*, por me acolher em seu laboratório quando precisei aprender técnicas que auxiliassem meu trabalho.

*Ana Carolina (Karola)*, por sua presença em minha vida, além de toda ajuda dedicação e carinho, sua imensurável compreensão por minhas constantes alterações de humor durante a redação desta tese.

Às minhas grandes amigas de laboratório *Selma e Cíntia*, que além de estarem sempre presentes compartilhando os momentos e também os dias difíceis, me ajudaram a crescer como pessoa e como profissional. Auxiliaram-me com artigos, computador, e leram incansavelmente meus relatórios. Sem vocês, este trabalho teria sido ainda mais difícil. Muito obrigado e minha sincera admiração.

Aos antigos amigos de laboratório *Tatá, Lígia, Luiz, Ana Catarina, Mônica e Karina*. Mesmo não estando mais presentes aqui, posso dizer que aprendi muito com vocês e os levo em meu coração.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

“Mas, em verdade, somos nós, os brancos ricos e altamente educados, que ostentamos a nudez de nossas costas. Cobrimos nossa paradisíaca aparência anterior com alguma filosofia – cristã, marxista, físico-freudiana – mas nos descuidamos da outra face, deixando-a à mercê de todos os ventos que possam soprar. O pobre índio, por outro lado, se tem valido do espírito para proteger-lhe a retaguarda, complementando a folha de parreira teológica com a tanga da experiência transcendental”.

**(Aldous Huxley)**

# SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>5</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>9</b>
1.1. Medo e Ansiedade: Conceito .....	9
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>20</b>
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>22</b>
3.1 Animais .....	22
3.2. Medo Condicionado .....	22
3.3. Treinamento .....	23
3.4. Teste .....	24
3.5. Imunohistoquímica para <i>Fos</i> .....	24
3.6. Quantificação de células imunorreativas (positivas) para <i>Fos</i> ....	25
3.7. Análise Estatística .....	26
<b>4. Resultados</b> .....	<b>28</b>
4.1. Efeitos Comportamentais .....	28
4.2. Expressão da proteína <i>Fos</i> .....	29
<b>5. Discussão</b> .....	<b>34</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>43</b>



*ONUSIC, Gustavo Massaro. Distribuição da proteína Fos no lobo temporal medial de ratos Wistar durante o medo condicionado ao contexto, luz e som. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.*

## RESUMO

No condicionamento clássico de medo, os animais são treinados associando-se um estímulo neutro, por exemplo, som, contexto ou luz a um estímulo aversivo incondicionado, como um choque elétrico nas patas. Após repetidos pareamentos, a presença do estímulo que inicialmente era neutro passa a eliciar uma resposta condicionada de medo no animal. O congelamento é a resposta mais proeminente dos animais expostos aos estímulos condicionados previamente pareados com choques nas patas, sendo freqüentemente utilizado como medida de medo condicionado (MC). Circuitos cerebrais independentes subjacentes a diferentes formas de memória, e, dentro de um determinado domínio de memória, o envolvimento de estruturas específicas pode depender do tipo de condicionamento, se utilizado contexto ou estímulos explícitos tais como a luz ou som. Diversos relatos clínicos têm implicado o prejuízo do lobo temporal medial (LTM) com amnésia retrógrada. Embora muito tenha sido feito para desvendar os circuitos neurais subjacentes ao medo condicionado, utilizando contexto, som ou luz como estímulo condicionado (EC) o envolvimento do LTM nessas formas de condicionamento ainda não está claro. Para abordar esta questão foi avaliada a distribuição de *Fos* no LTM de ratos após a exposição a um contexto, um som ou uma luz, previamente emparelhados com choques nas patas. Vinte e quatro horas após as sessões de

condicionamento, os animais foram colocados na mesma caixa experimental ou em um contexto distinto ou foram expostos ao som e luz sem receber choques nas patas. Diferença significativa na expressão de *Fos* foi determinada por análise de regiões do lobo temporal medial (córtex entorrinal, perirrinal e entorrinal). Os resultados comportamentais mostraram que houve congelamento nos três tipos de medo condicionado, mas o padrão de distribuição *Fos* foi diferente em ratos expostos estímulos específicos ou contexto previamente emparelhado com choques nas patas. Apesar da saliente aquisição da resposta do medo ocorrer nas três condições, o achado mais saliente foi uma distribuição selectiva de *Fos* no córtex entorrinal, perirrinal e entorrinal do grupo. Estes resultados indicam que regiões corticais no LTM parecem ser críticas no armazenamento de informações contextuais, mas não de informações associadas a estímulos explícitos previamente pareados a choques nas patas.

**Palavras-chaves:** Medo condicionado, Expressão *Fos*, Lobo temporal medial, Córtex entorrinal, Córtex perirrinal, Córtex entorrinal

ONUSIC, Gustavo Massaro. **Fos distribution in the medial temporal lobe during context-, auditory- and light-cued conditioned fear in Wistar rats.** Doctoral Thesis Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

## **Abstract**

Conditioned fear (CF) is one of the most frequently used animal models of associative memory to background or foreground stimuli. Independent brain circuits underlie different forms of memory, and, within a particular memory domain, the involvement of specific structures may depend upon the type of conditioning, whether using context or explicit cues such light or a tone.

Several clinical reports have implicated the damage to the medial temporal lobe (MTL) with retrograde amnesia. Although much has been done to disclose the neural circuits underlying CF using context, a tone or light as conditioned stimuli (CS) the involvement of the MTL in these forms of conditioning is still unclear. To address this issue we assessed the *Fos* distribution in the MTL of rats following exposure to a context, a tone or a light previously paired with footshocks. Twenty-four hours after the conditioning sessions they were placed in the same chamber or in a distinct context and presented with the tone or light but without any footshocks.

Significant group differences in regional *Fos* expression were determined by analysis in regions of the medial temporal lobe (ectorhinal, perirhinal and entorhinal cortices). The behavioral results showed comparable freezing in the three types of CF but the pattern of *Fos* distribution was distinct in rats exposed to specific cues or context previously paired with footshocks.

Despite comparable acquisition of the conditioned fear response, the most remarkable finding was a selective distribution of *Fos* in the entorhinal,

perirhinal and entorhinal cortices of the MTL for context-CS groups. It is suggested that context and explicit stimuli endowed with aversive properties through conditioning cause distinct *Fos* brain mapping in the hippocampal formation. These results indicate that tasks requiring the association between context and an aversive stimulus depend on subregions of the MTL. Such findings suggested that cortical regions of the MTL appears to be critical for storing context – but not explicit cue – footshock associations.

**Keywords:** Fear conditioning; *Fos* expression; medial temporal cortex, entorhinal cortex, perirhinal cortex and entorhinal cortex.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH:** hormônio adrenocoticotrópico
- 5-HT:** 5 hidroxitriptamina, serotonina
- BZDs:** benzodiazepínicos
- CA:** Cornos de Ammon
- CS:** estímulo condicionado
- ECTO:** córtex ectorrinal
- ENTO:** córtex entorrinal
- EPM:** erro padrão médio
- GABA:** ácido gama-aminobutírico
- HM:** hipotálamo medial
- LTM:** lobo temporal medial
- NDR:** núcleo dorsal da rafe
- PERI:** córtex perirrinal
- SCA:** sistema cerebral aversivo
- SCPD:** substância cinzenta periaquedutal dorsal
- SIC:** sistema de inibição comportamental
- SNC:** sistema nervoso central
- SH:** sistema septo-hipocampal

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática das estruturas que compõem o Sistema Cerebral Aversivo (SCA) .....	12
<b>Figura 2</b> – Representação esquemática do Sistema de Inibição Comportamental. ....	13
<b>Figura 3</b> - A integração visual e tátil informação perceptual do córtex perirrinal .....	14
<b>Figura 4</b> - Fotomicrografia demonstrando células imunorreativas para <i>Fos</i> .....	15
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática do giro para-hipocampal .....	16
<b>Figura 6</b> - Formação hipocampal e giro para-hipocampal .....	18
<b>Figura 7</b> - Tempo da resposta de congelamento, em segundos, na sessão teste, em ratos submetidos ao condicionamento: contexto diferente (D), mesmo contexto (M), luz (L) ou som (S). Um grupo não-condicionado (N) não recebeu choque nas patas .....	28

**Figura 8** - Fotomicrografias de cortes coronais do lobo temporal medial: córtex ectorrinal (Ecto), córtex perirrinal (Peri) e córtex entorrinal (Ento) de ratos mostrando a distribuição da imunorreatividade Fos nos diferentes grupos ..... 30

**Figura 9** - Número de células imunorreativas para Fos em áreas corticais (0,1 mm<sup>2</sup>): córtex ectorrinal (Ecto), córtex perirrinal (Peri), córtex entorrinal (Ento) de ratos submetidos ao condicionamento: usando contexto diferente (D), mesmo contexto (M), luz (L) ou som (S). Um grupo não-condicionado (N) não recebeu choque nas patas ..... 31

**Figura 10-A** Número de células imunorreativas para Fos em áreas corticais (hemisfério esquerdo) de ratos submetidos ao condicionamento: usando contexto diferente (D), mesmo contexto (M), luz (L) ou som (S). Um grupo não-condicionado (N) não recebeu choque nas patas ..... 32

**Figura 10-B** Número de células imunorreativas para Fos em áreas corticais (hemisfério direito) de ratos submetidos ao condicionamento: usando contexto diferente (D), mesmo contexto (M), luz (L) ou som (S). Um grupo não-condicionado (N) não recebeu choque nas patas ..... 32

## *1 - INTRODUÇÃO*

---

---



# **1 - INTRODUÇÃO**

O medo se expressa através de comportamentos defensivos ou da reação de defesa. Os comportamentos defensivos e a reação de defesa serão caracterizados mais adiante nesta introdução. Os comportamentos defensivos são resultados da ativação do sistema neural de defesa, que é um sistema que detecta perigo e produz as respostas que maximizam a probabilidade de sobrevivência do indivíduo face as condições ameaçadoras ou de perigo iminente. Em geral, o sistema neural do medo é acionado para que o indivíduo tenha consciência disso. Ao mesmo tempo, fatores outros tais como os hormonais, autonômicos e somáticos são acionados determinando a reação de defesa (Brandão, 2001).

Dado o caráter evolutivo das emoções na medida em que elas se expressam de forma parecida em todos os animais da escala filogenética, o sistema de defesa do cérebro e o medo, enquanto emoção a ele associada, podem ser usados como ponto de partida para estudos sobre a neurobiologia de doenças mentais, como a ansiedade (Brandão, 2001).

## **1.1. Medo e ansiedade**

Medo e ansiedade são estados emocionais com alto valor adaptativo, manifestados em situações que representam ameaça à integridade física do organismo ou à sua sobrevivência. Para lidarem com os perigos a que são expostos, os animais emitem respostas defensivas. O medo e a ansiedade

podem ser compreendidos, portanto, como adaptativos, uma vez que existe uma relação direta entre seu nível de expressão e a eficiência no desempenho em determinada tarefa (GRAEFF e GUIMARÃES, 2000).

Segundo Nutt (1990), a ansiedade é caracterizada por um conjunto de manifestações físicas e psíquicas que tanto podem ser experimentadas por indivíduos sadios, como acompanhar ou caracterizar enfermidades, sendo qualificada subjetivamente como um estado emocional desagradável, acompanhado por sentimentos de apreensão, insegurança e um conjunto de alterações comportamentais, neurovegetativas e hormonais. Contudo, a partir de certo ponto, observa-se o comprometimento do comportamento devido a níveis muito elevados de ansiedade, o que assinala um prejuízo funcional nas atividades cotidianas. Neste caso, a ansiedade é caracterizada como psicopatologia e, dentro de uma perspectiva biológica, suas raízes funcionais encontram uma analogia nas reações de defesa que os animais exibem frente a estímulos ou situações ameaçadoras (GRAEFF, 1990). Essa visão justifica o uso de modelos animais em estudos experimentais, considerando-se que as propriedades do cérebro permanecem conservadas ao longo da escala evolutiva.

Em 1988, os pesquisadores Robert e Caroline Blanchard instituíram o conceito de níveis de defesa através da análise eto-experimental do comportamento de ratos. Sob esta perspectiva, a ansiedade seria estabelecida em diversos níveis de perigo, possuindo características distintas em cada um deles, dependendo do contexto em que o animal se encontra. Sendo assim, diferentes substratos neuroanatômicos estariam envolvidos no gerenciamento das reações observadas em cada estágio. A

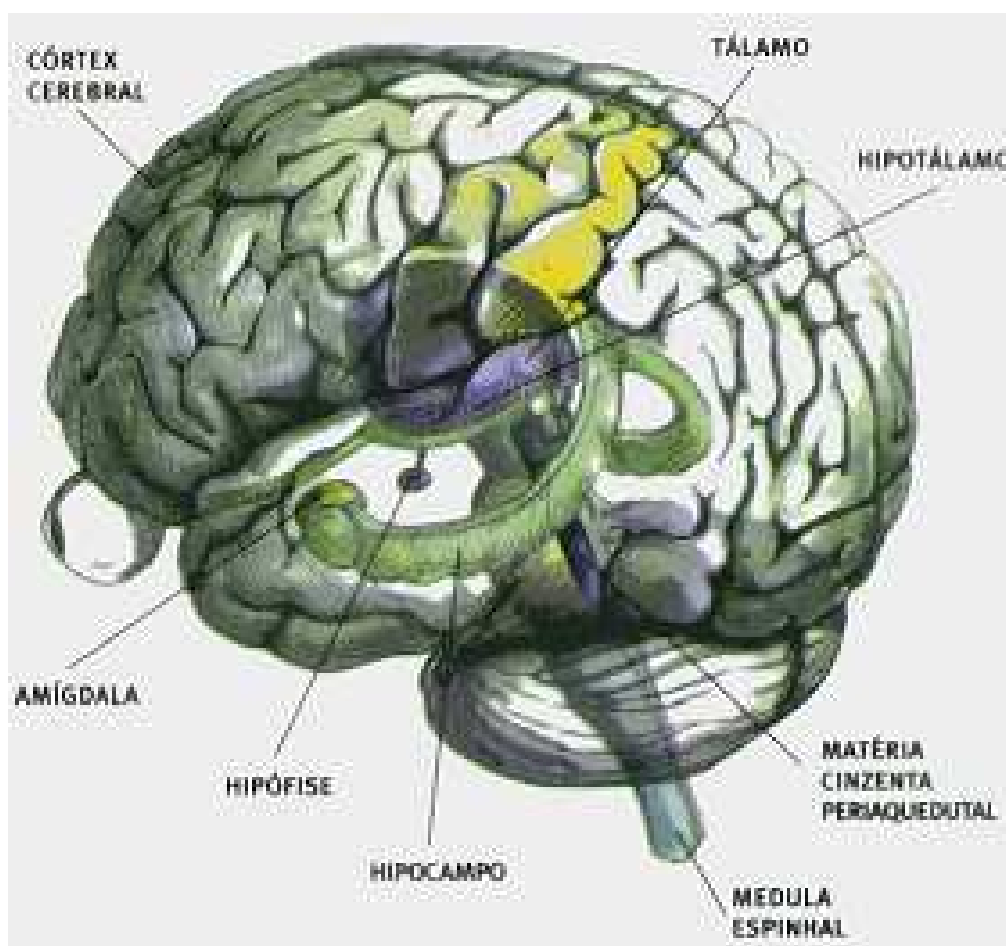
Tabela 1 faz referência às três estratégias básicas de defesa apresentadas pelos animais frente a situações de perigo, enumerando diversas estruturas do sistema nervoso central (SNC) que têm sido relacionadas aos comportamentos defensivos. Em primeiro lugar, destacam-se: o sistema septo-hipocampal (SH) e a amígdala (AM), os quais serviriam de interface entre o neocórtex e o complexo amigdalóide. Tanto o SH quanto a AM recebem densas projeções do córtex temporal polimodal, onde se verifica a síntese das informações colhidas pelos diferentes sistemas sensoriais, bem como das informações sensoriais de natureza olfativa e interoceptiva. Outras evidências indicam, no entanto, que estas áreas cerebrais não seriam as únicas envolvidas na geração da ansiedade. Assim tem sido demonstrado, que, um conjunto de estruturas cerebrais, longitudinalmente organizado,

**Tabela 1** - Níveis de defesa, substrato neural, emoção relacionada.

<b>Perigo</b>	<b>Reação de defesa</b>	<b>Estruturas cerebrais</b>	<b>Emoção</b>
Potencial	Avaliação de risco/ Inibição comportamental	Septo-hipocampo/ Amígdala	Ansiedade
Antecipado	Congelamento	Amígdala/ Periaquedutal ventral	Ansiedade antecipatória
Distal	Esquiva	Amígdala	Ansiedade condicionada
	Fuga	Hipotálamo medial	Ansiedade incondicionada
Proximal	Fuga/congelamento	Periaquedutal dorsal	Pânico

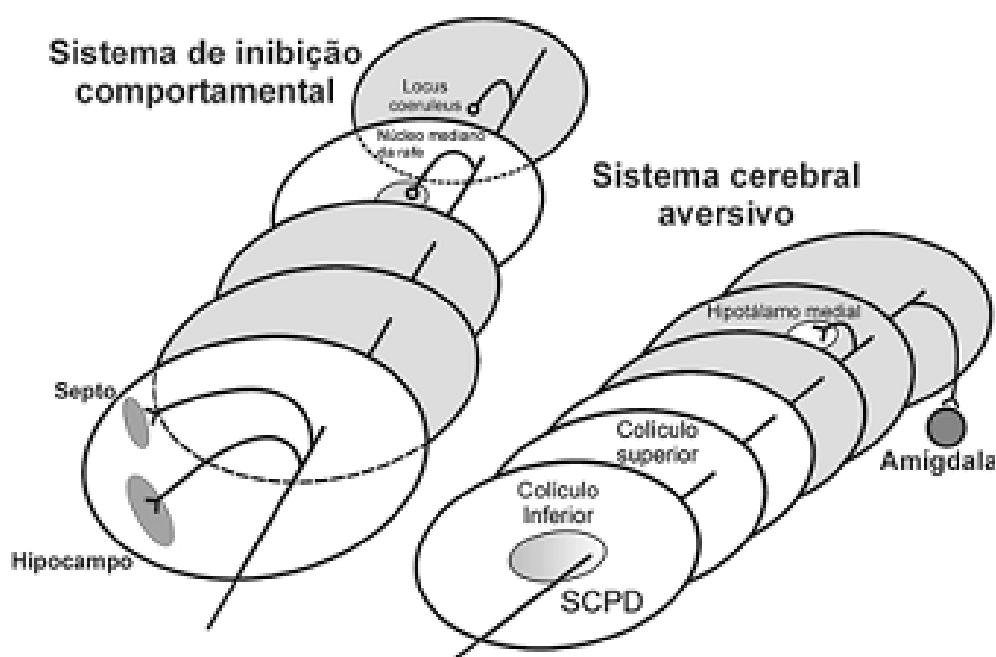
Adaptada de Graeff e Guimarães, 2000.

compreendendo além de partes da AM, a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) e o hipotálamo medial (HM) e interligado por vias nervosas ascendentes e descendentes, também se constitui em substrato neural da ansiedade. Este circuito, designado de sistema cerebral aversivo (SCA) (GRAEFF, 1990), coordenaria diferentes estratégias de defesa, como a imobilidade tensa ou congelamento e os comportamentos de luta e de fuga (Figura 1). A ativação dessas regiões também evoca sensações extremamente desagradáveis (medo intenso, dor não localizada) no homem (GRAEFF, 1991).



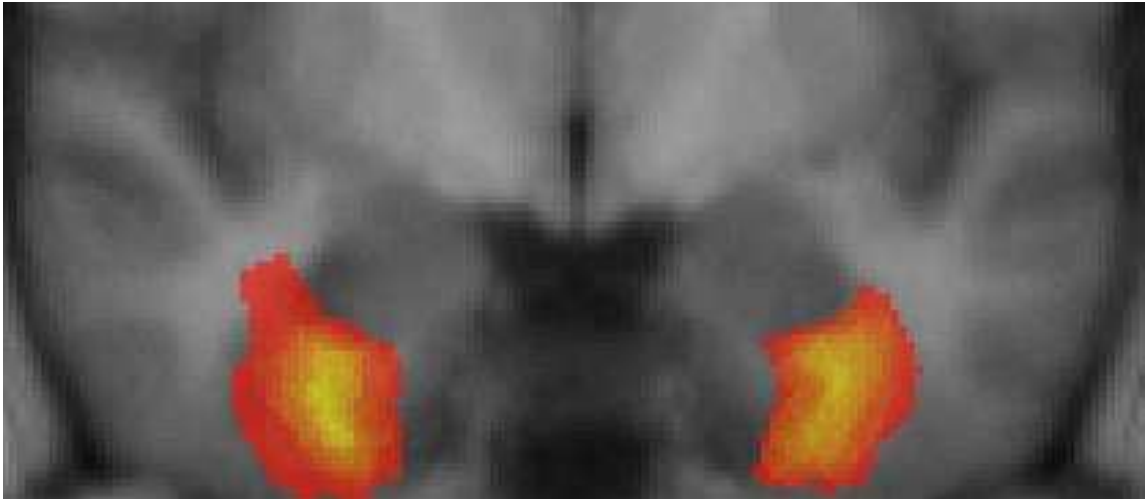
**Figura 1** - Representação esquemática das estruturas que compõem o Sistema Cerebral Aversivo (SCA) (Bear et. al., 2002).

O psiquiatra inglês Jeffrey Gray (1987) propôs um modelo teórico, denominado Sistema de Inibição Comportamental (SIC), para explicar o mecanismo de modulação da ansiedade. Este sistema levaria a um aumento da atenção e vigilância do animal. As estruturas neuroanatômicas que supostamente constituiriam o SIC seriam o hipocampo e a área septal (SH), assim como suas interconexões, fibras e vias (Figura 2).



**Figura 2** - Representação esquemática do Sistema inibitório comportamental. (Brandão *et al.*, 2003).

Segundo Gray (1982), o sistema septo-hipocampo teria a função de comparar os dados oriundos do córtex perirrinal (Figura 3), que são recebidos pelo hipocampo, com as previsões formuladas no circuito de Papez (núcleo mamilar do hipotálamo, tálamo antero-ventral e córtex do giro do cíngulo). Havendo correspondência entre as duas representações, o SH continuaria a funcionar como “comparador”. Se, por outro, lado ocorresse



**Figura 3** - A integração visual e tátil informação perceptual do córtex perirrinal (Holdstock et. al.,2009).

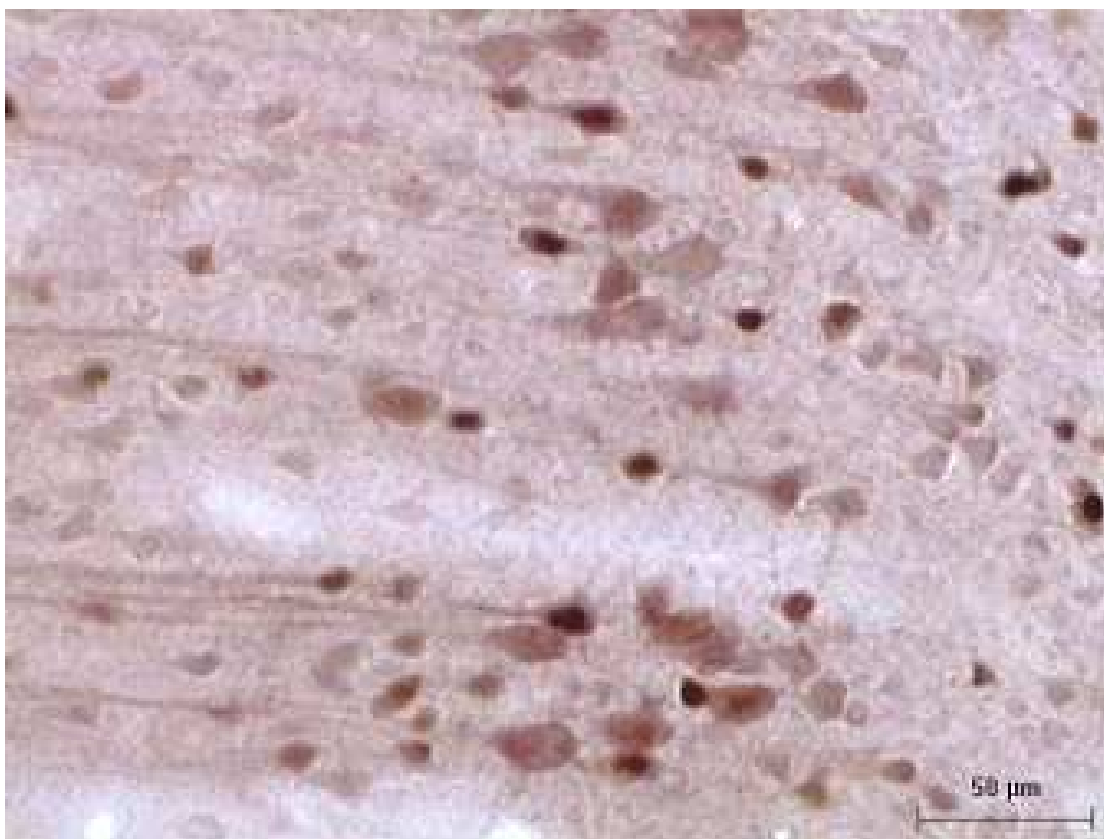
algo inesperado, este passaria a trabalhar no modo de “controle”.

desencadeando a ansiedade. Em poucas palavras, a ativação do SIC teria como consequência uma alteração no equilíbrio entre aproximação/esquiva, tendendo para o comportamento de esquiva (GRAY e MACNAUGHTON, 2000). Assim, uma vez o SIC ativado por estímulos aversivos, ocorreria uma diminuição ou inibição do comportamento em curso, o que poderia em casos extremos, levar o animal a emitir uma resposta de imobilidade tensa (congelamento).

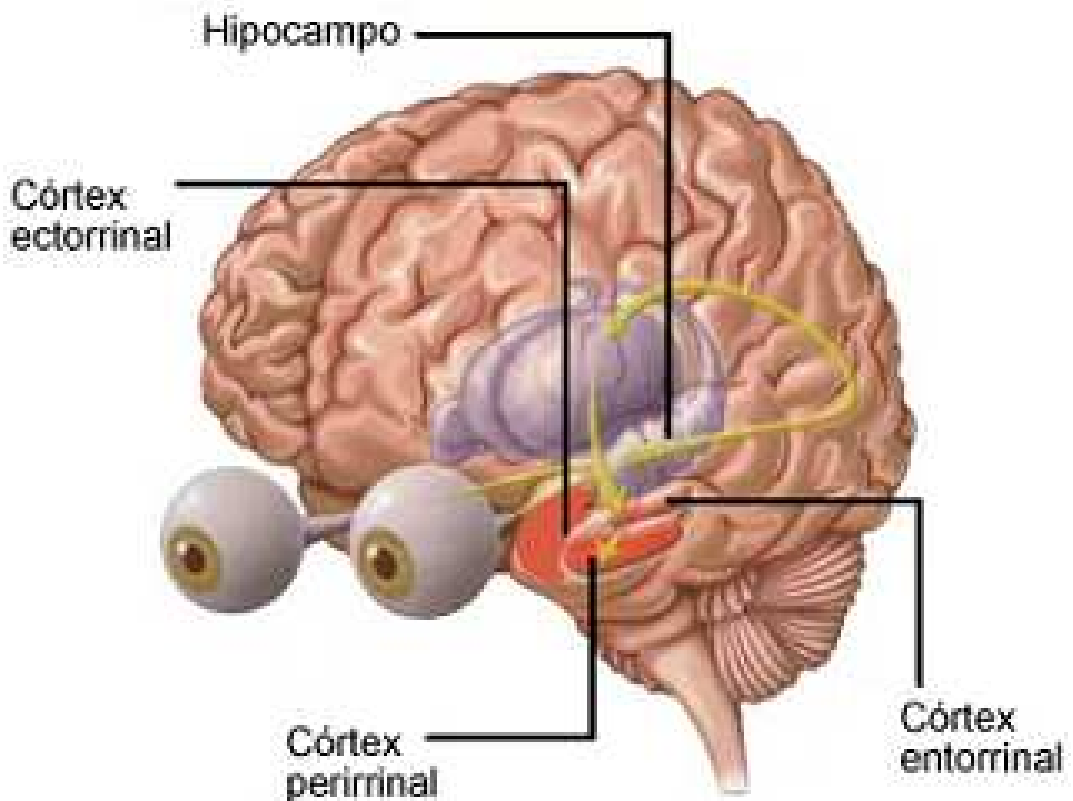
Ainda que o medo seja responsável por desencadear um complexo conjunto de respostas tanto comportamentais como fisiológicas (DAVIS *et. al.*, 1991, 1997), sua mensuração é objetivamente plausível em laboratório, tanto do medo incondicionado (inato) como do medo condicionado (pareamento de um estímulo neutro a um estímulo aversivo) (FENDT; FANSELOW, 1999). Como citado brevemente nessa introdução, a resposta de medo condicionado mais estudada é o comportamento de congelamento,

que é definido como a imobilidade total acompanhada de postura tensa (FANSELOW, 1984).

Cabe ressaltar que, são escassos os estudos que relacionem a mensuração da expressão de *Fos* (Figura 4) e as estruturas encefálicas do córtex para-hipocampal, tais como: o córtex entorrinal, córtex perirrinal e ectorrinal (Figura 5) em ratos submetidos ao medo condicionado (condicionamento pavloviano clássico). Isto é, o condicionamento realizado nesse estudo, consiste na associação de um estímulo inicialmente neutro, como uma luz ou um tom, a um estímulo aversivo incondicionado, como um choque nas patas. Após apresentações sucessivas, o estímulo condicionado



**Figura 4** – Fotomicrografia de um corte histológico mostrando células imunorreativas para Fos (BEAR et. al., 2002).



**Figura 5** - Representação esquemática do giro para-hipocampal

adquire propriedades aversivas e passa a produzir respostas características de estímulos ameaçadores, como congelamento e aumento da pressão arterial (FANSELOW, 1994).

Respostas emocionais condicionadas são também eliciadas pelo próprio ambiente em que o animal se encontrava quando lhe foi apresentado o estímulo incondicionado. Nessa situação, o estímulo que adquire propriedades condicionadas não é um estímulo explícito — como no caso da luz e do som — mas diversas pistas contextuais presentes no ambiente quando o animal recebeu o estímulo incondicionado (BLANCHARD; BLANCHARD, 1972). Quando esse estímulo, porém, é apresentado sem



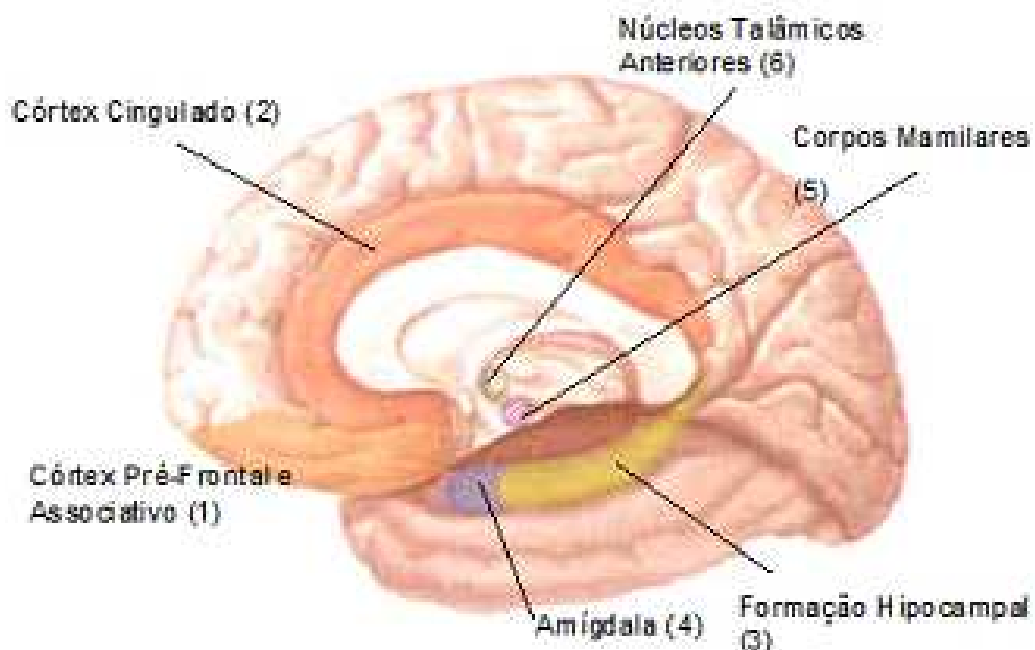
que o animal tenha a oportunidade de explorar o ambiente, ocorre uma ausência da resposta de congelamento (BLANCHARD; FUKUNAGA; BLANCHARD, 1976; FANSELOW, 1986). Nesse paradigma — denominado de déficit do choque imediato — os animais não têm tempo suficiente para desenvolver uma representação espacial do contexto, de maneira que as pistas detectadas no ambiente são incapazes de prever a administração do choque (FANSELOW, 1986; LANDEIRA-FERNANDEZ *et al.*, 2006).

Ainda que as respostas emocionais eliciadas pelos estímulos condicionados explícitos ou contextuais sejam idênticas, os substratos neurais dessas duas formas de medo condicionado são distintos (PHILLIPS e LeDOUX, 1992). Evidências indicam que a AM tem um papel essencial no medo condicionado. Lesões dessa estrutura interferem na aquisição e na expressão de respostas emocionais condicionadas, tanto a estímulos explícitos quanto ao próprio contexto (BLANCHARD; BLANCHARD, 1972; HITCHCOCK; DAVIS, 1986). A AM, também está diretamente conectada ao eixo HPA, de modo que lesões do núcleo central reduzem a liberação de corticosterona plasmática em ratos durante o medo condicionado ao som, à luz e ao contexto (FELDMAN *et al.*, 1994; SULLIVAN *et al.*, 2004). Há evidências, porém, de que os núcleos da AM podem influenciar de maneira distinta, o eixo HPA (VAN DE KAR *et al.*, 1991).

Uma outra estrutura límbica que parece estar criticamente envolvida no medo condicionado é o hipocampo. Diversos estudos mostram que lesões eletrolíticas do hipocampo dorsal produzem déficits na aquisição e expressão do medo contextual. Em contraste, essa estrutura parece ter um papel mais específico do que a AM, uma vez que lesões hipocámpais não

afetam o medo condicionado a estímulos explícitos (KIM; FANSELOW, 1992; PHILLIPS e LeDOUX, 1992; ANAGNOSTARAS; MAREN; FANSELOW, 1999).

Entretanto, estudos recentes, apontam controvérsias na participação do hipocampo (Figura 6) no medo condicionado contextual. Gewirtz, McNish and Davis (2000), levantaram a possibilidade das lesões hipocampais, ao invés de interromperem a aquisição e a expressão do medo condicionado contextual, produzirem déficits na resposta de congelamento dos animais. Corroboram essa possibilidade o fato de lesões hipocampais interromperem também a resposta de congelamento incondicionado (BLANCHARD; BLANCHARD, 1972) e não interferirem na resposta de sobressalto potencializado pelo medo. Para elucidar essas questões, os autores sugerem a investigação dos efeitos de lesões do hipocampo em outras respostas associadas ao estado emocional de medo.



**Figura 6** - Formação hipocampal e giro para-hipocampal (Lent, 1999)

## *2 - OBJETIVOS*

---

---

## 2 - OBJETIVOS

Diversos estudos da literatura mostram que o lobo temporal medial (LTM) está envolvido com a formação de memórias. Embora muito tenha sido feito para desvendar os circuitos neurais subjacentes ao medo condicionado, utilizando contexto, som ou luz como estímulo condicionado (EC) o envolvimento do LTM nessas formas de condicionamento ainda não está claro. No presente trabalho pretendeu-se contribuir para este campo de estudo analisando as respostas comportamentais de ratos submetidos ao procedimentos de medo condicionado utilizando a luz, o som e o contexto como estímulos neutros. Ao lado disso, analisou-se também a distribuição de *Fos* no LTM de ratos após a exposição a um contexto, um som ou luz, previamente emparelhado com choques nas patas.

## *3 - MATERIAL E MÉTODOS*

---

---

## **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Animais**

Foram utilizados trinta e quatro ratos *Wistar*, machos, pesando entre 250-300 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, *Campus* de Ribeirão Preto. Os animais foram alojados em gaiolas-viveiro com, no máximo, quatro animais cada, com ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas das 7:00 às 19:00 h) e temperatura de 22°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Durante todo o experimento, os animais tiveram livre acesso à água e à comida. Os ratos foram distribuídos randomicamente em cinco grupos (N = 6-8): não condicionado (N), contexto diferente (D), mesmo contexto (M), exposição à luz (L) ou exposição ao som (S). Os experimentos foram realizados em conformidade com as normas da Sociedade brasileira de neurociência e comportamento (SBNec).

### **3.2. Medo condicionado**

Três dias depois da chegada, os animais foram submetidos ao condicionamento do contexto, luz ou som como estímulo condicionado. Duas caixas experimentais foram utilizadas: A e B. A caixa A foi utilizada como caixa de treinamento. Ambas as caixas eram iluminadas brandamente por luz fluorescente indiretamente. As paredes laterais e do fundo da caixa A (40 x 25 x 25 cm) foram construídas de acrílico branco e o teto e a porta da frente foram feitos de acrílico transparente. O assoalho da caixa era

constituído por barras de metal de 5 mm de diâmetro, distando 1,2 cm entre si, conectadas a um gerador de choques. Também havia na caixa duas lâmpadas de 15 W. Esta caixa encontrava-se em um câmara de atenuação acústica feita de compensado de madeira revestida com Eucatex, onde se encontravam um auto-falante e uma lâmpada vermelha de 6 W, a qual permitia a visualização do animal. O som gerado era um tom de 1 kHz (72 dB). A caixa B era diferente e maior (50 x 30 x 25), construída com acrílico pintado de preto nas laterais e no fundo. Luz e auto-falante eram dispostos em posições diferentes da caixa A. Como da gaiola A, o teto e a porta da frente eram feitos de acrílico transparente.

### **3.3. Treinamento**

Os animais eram colocados na caixa de treinamento e após um período de cinco minutos de habituação, eles eram submetidos à fase de treino, na qual cada animal recebia 10 tons (som) ou luz pareados com choques nas patas. Em cada pareamento, um tom (72 dB, 1 kHz), ou luz (15 W) foram apresentados por 10 segundos e choque nas patas (0,6 mA, 1s), eram apresentados no final de cada apresentação de estímulo condicionado. O intervalo variava randomicamente entre 30 e 120 segundos. No condicionamento contextual (grupo M), os estímulos provenientes da caixa, eram pareados com os choques nas patas. Um grupo pseudocondicionado (grupo N) foi submetido ao mesmo procedimento exceto que não recebia choque nas patas. Todos os grupos foram condicionados na caixa A. Cada animal era removido 3 minutos após o último choque e retornavam as suas

caixas. As seções de treinamento duravam aproximadamente 18 minutos. O grupo P foi considerado o grupo controle do estudo.

### **3.4. Teste**

No dia seguinte, a sessão de teste era conduzida da mesma maneira que na sessão de treino, mas sem a apresentação dos choques nas patas. Apenas o grupo do “mesmo contexto” era testado na caixa A. O critério usado para acessar o medo condicionado foi o tempo em que os animais permaneceram em congelamento (*freezing*) durante o período de 18 minutos do teste. O congelamento foi operacionalmente definido como total ausência de movimento do animal exceto de respiração.

### **3.5. Imunohistoquímica para Fos**

Duas horas após a sessão de teste, os animais foram anestesiados com Uretana 25% (5 ml/kg) e submetidos à perfusão transcardíaca com PBS 0,1 M e, em seguida, com paraformaldeído 4% tamponado em 0,1 M PBS (pH 7,4). Os cérebros foram então removidos e pós-fixados em solução de paraformaldeído 4% durante duas horas (4° C). Em seguida, os cérebros foram crioprotetidos em sacarose 30% (em PBS 0,01 M) durante 48 horas e finalmente congelados em isopentano (-40° C, 30 seg). Em seguida, os cérebros foram armazenados em freezer -70° C até o momento de serem cortados em criostato e processados para o ensaio de imunohistoquímica.

No dia do ensaio, foram utilizadas duas amostras de seções representativas, tendo como referência o Bregma: - 6,8 mm (Atlas de



Paxinos e Watson, 2005) de 40 µm recolhidas em PBS 0,1M. Essa serie foi processada *free-floating* de acordo com o procedimento avidina-biotina, usando Vectastain ABC Elite peroxidase rabbit IgG kit (Vector, USA, Ref. PK 6101). As secções foram primeiro incubadas com 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10 minutos, lavadas 4 vezes com PBS 0,1 M (por 5 minutos cada) e então incubadas *overnight* com o anticorpo primário para *Fos* (rabbit policlonal IgG; Santa Cruz, USA, SC-52) na concentração de 1:2000 em PBS+ (0,1 M PBS enriquecido com 0,2% Triton-X e 0,1% BSA). As secções foram lavadas mais 3 vezes por 5 minutos cada lavagem com PBS 0,1 M e incubadas por 1 hora com anti-rabbit biotinilado IgG (H + L) (Vectastain, Vector Laboratories) na concentração de 1:400 em PBS+. Após outra série de lavagem de 3 vezes por 5 minutos cada em PBS 0,1 M, elas foram incubados por 1 hora com complexo avidina-biotina-peroxidase em 0,1 M em PBS (solução A e B do Kit Vectastain ABC, Vector Laboratories) na concentração de 1:250 em 0,1 M de PBS e lavados 3 vezes por cinco minutos cada em 0,1 M de PBS. Imunorreatividade para *Fos* foi obtida com a adição de DAB (0,02%) com peróxido de hidrogênio (0,04%). Em seguida as secções foram lavadas duas vezes.

### **3.6. Quantificação de células imunorreativas (positivas) para *Fos***

As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas para observação e contagem de células por microscopia. Núcleo neuronal expressando níveis de reação de produtos de DAB foram automaticamente contados como neurônios positivos para *Fos* por um sistema de análise

computadorizado (Imagem Pró Plus 4.0, Media Cybernetics, USA), de acordo com métodos utilizados previamente neste laboratório (BORELLI *et al.*, 2006; Ferreira-Neto *et al.*, 2007). A análise das regiões encefálicas nesse estudo dão ênfase ao córtex entorrinal lateral, córtex perirrinal e córtex ectorrinal. Núcleo foi contado individualmente e expressam o número de células positivas para Fos em  $0,1 \text{ mm}^2$  (BORELLI *et al.*, 2006; FERREIRA-NETO *et al.*, 2007).

### **3.7. Análise Estatística**

Para análise imunohistoquímica das estruturas em estudo, uma vez que, são estruturas bilaterais, foram contadas as células imunorreativas para Fos bilateralmente, e considerada a média em ambos os lados de cada estrutura. O tempo de congelamento nas sessões de teste e o número de células reativas para Fos em cada estrutura foi feita por meio de análise de variância de uma via (ANOVA). O teste *post hoc* de Newman-Keuls foi utilizado quando apropriado. O nível de significância adotado em todos os casos foi  $p < 0,05$ .

## *4 - RESULTADOS*

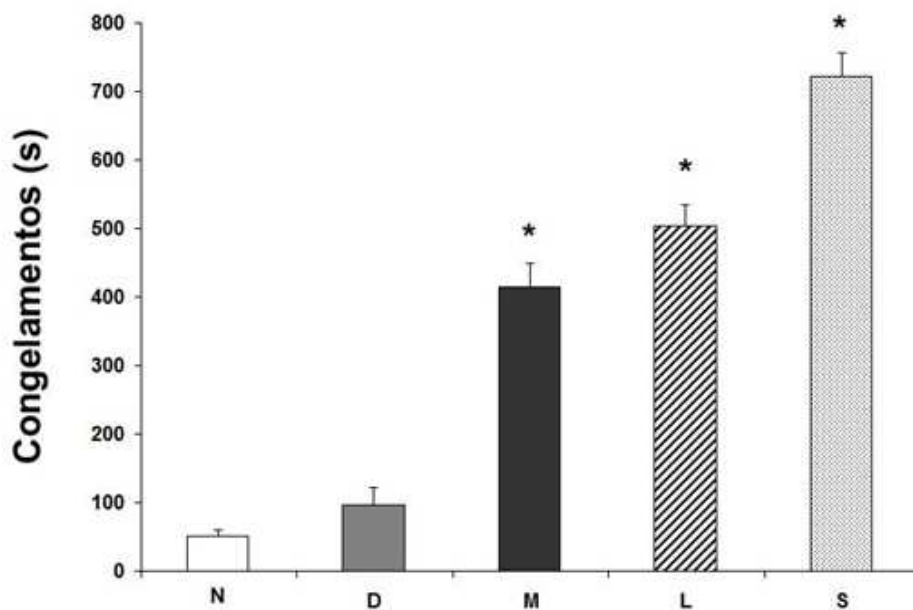
---

---

## 4 - RESULTADOS

### 4.1. Efeitos Comportamentais

A Figura 7 ilustra a média do tempo de congelamento dos grupos de animais deste estudo na sessão teste. A ANOVA de uma via indicou diferença estatisticamente significativa [ $F(4,29) = 45.60, p < 0.001$ ] entre os grupos. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que os animais submetidos ao mesmo contexto (M), luz (L) e som (S) foram significativamente diferentes do grupo controle não-condicionado (N) ( $p < 0,001$ ).



**Figura 7** - Tempo da resposta de congelamento, em segundos, na sessão teste, em ratos submetidos ao condicionamento: contexto diferente (D), mesmo contexto (M), luz (L) ou som (S). Um grupo não-condicionado (N) não recebeu choque nas patas. Barras representam média + EPM para 6-8 ratos. \*,  $p < 0,001$  em relação ao grupo N (ANOVA seguida do teste *post-hoc* de Newman Keuls).

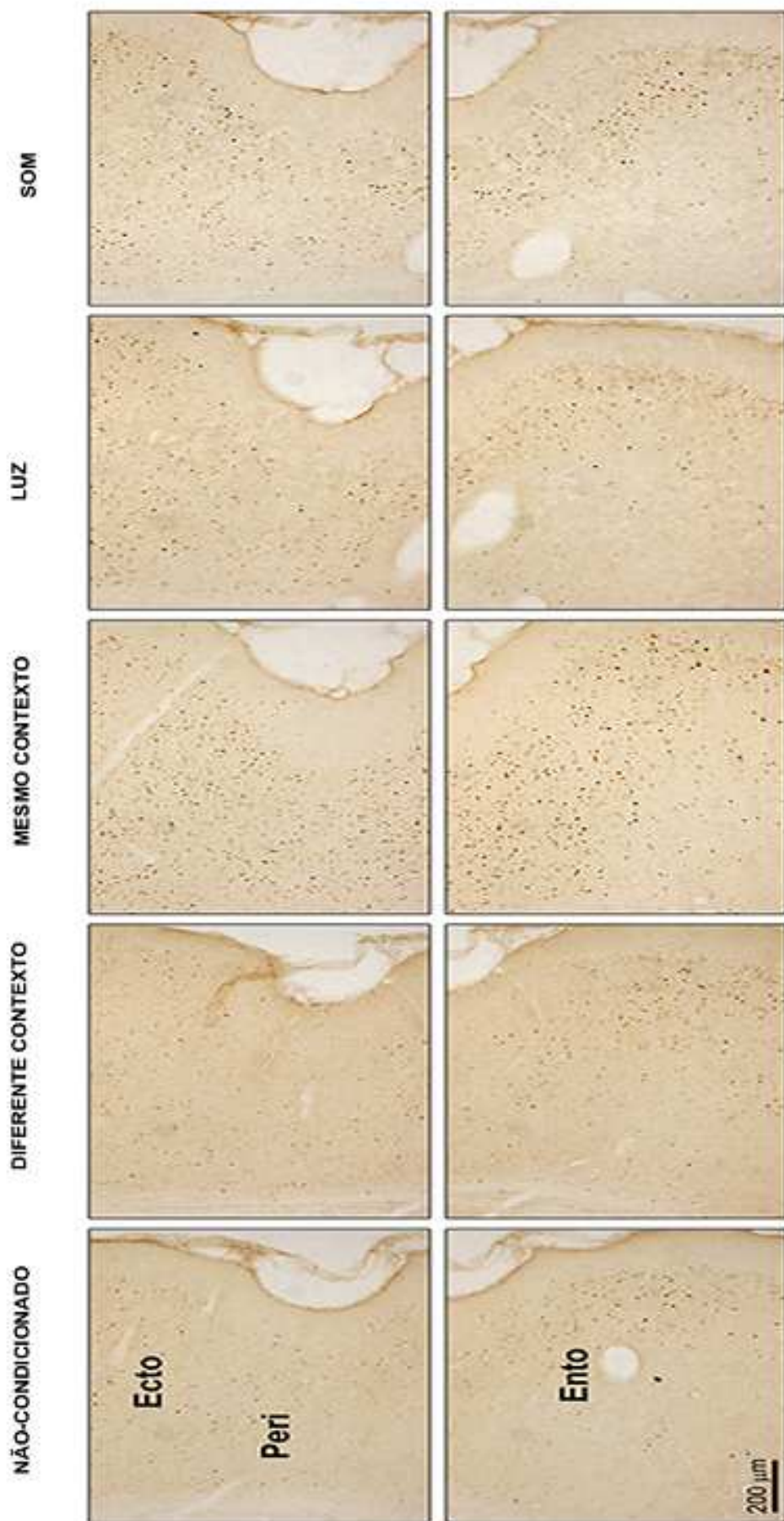
## 4.2. Expressão da proteína Fos

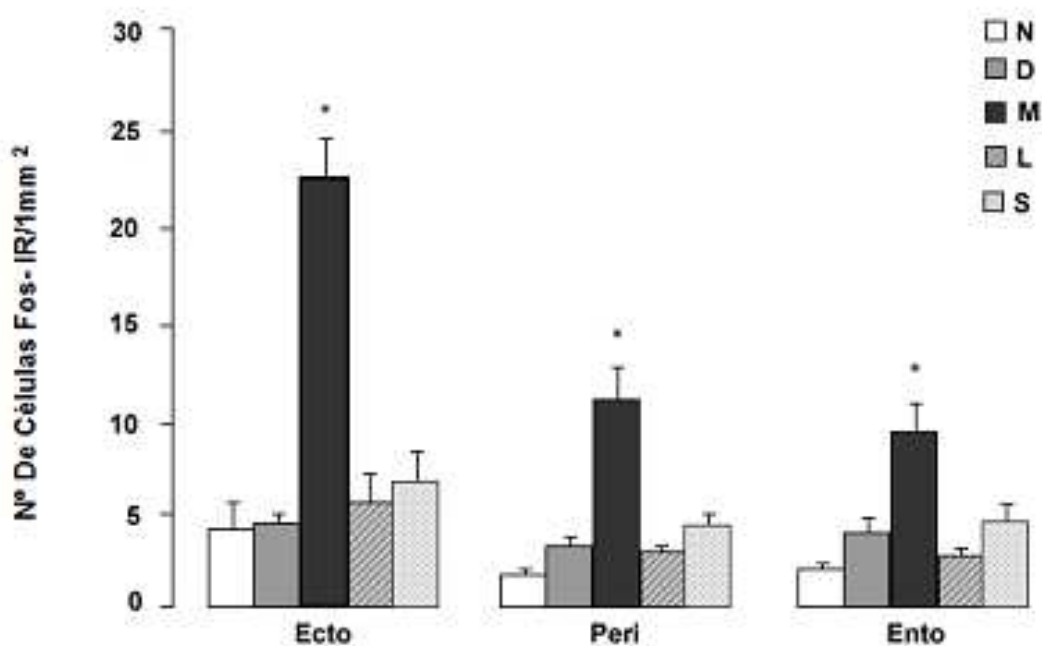
A Figura 8 mostra fotomicrografias representativas da imunorreatividade Fos (pontos escuros) nas subregiões do córtex do lobo temporal medial de ratos sujeitos a sessões de teste usando o procedimento de medo condicionado com luz, som e contexto como estímulos condicionados. Como pode ser notado, somente o contexto usado como estímulo condicionado foi capaz de produzir marcações da proteína Fos no córtex entorrinal, perirrinal e ectorrinal. A luz, o som e um contexto diferente daquele no qual os animais previamente receberam choques nas patas não causaram alterações significativas na imunorreatividade à proteína Fos.

A Figura 9 mostra que o medo condicionado alterou significativamente a expressão de células imunorreativas Fos entre os grupos no córtex perirrinal [ $F(4,28) = 18.84$ ;  $p < 0.001$ ], entorrinal [ $F(4,28) = 5.79$ ;  $p < 0.001$ ], e ectorrinal [ $F(4,28) = 24.28$ ;  $p < 0.001$ ]. O teste post-hoc de Newman Keuls indicou que o efeito significativo ocorreu nos grupos expostos ao mesmo contexto.

A Figura 10 (A e B) mostra que o medo condicionado alterou de modo estatisticamente significativo a expressão de proteína Fos nas estruturas do lobo temporal medial indicadas acima mesmo quando os dados foram analisados em separado, considerando a lateralidade hemisférica e quanto aos estímulos a que os animais foram submetidos. A análise indicou efeitos significativos no córtex entorrinal direito [ $F(4,28) = 18,16$ ;  $p = 0.001$ ], córtex perirrinal esquerdo [ $F(4,28) = 10.81$ ;  $p < 0.001$ ], córtex perirrinal direito [ $F(4,28) = 25,35$ ;  $p < 0.001$ ], córtex ectorrinal esquerdo [ $F(4,28) = 6,14$ ;  $p <$

**Figura 8** - Fotomicrografias de cortes coronais do lobo temporal medial: córtex ectorrinal (Ecto), córtex perirrinal (Peri) e córtex entorrinal (Ento) de ratos mostrando a distribuição da imunorreatividade Fos nos diferentes grupos. Barra = 200  $\mu\text{m}$ .

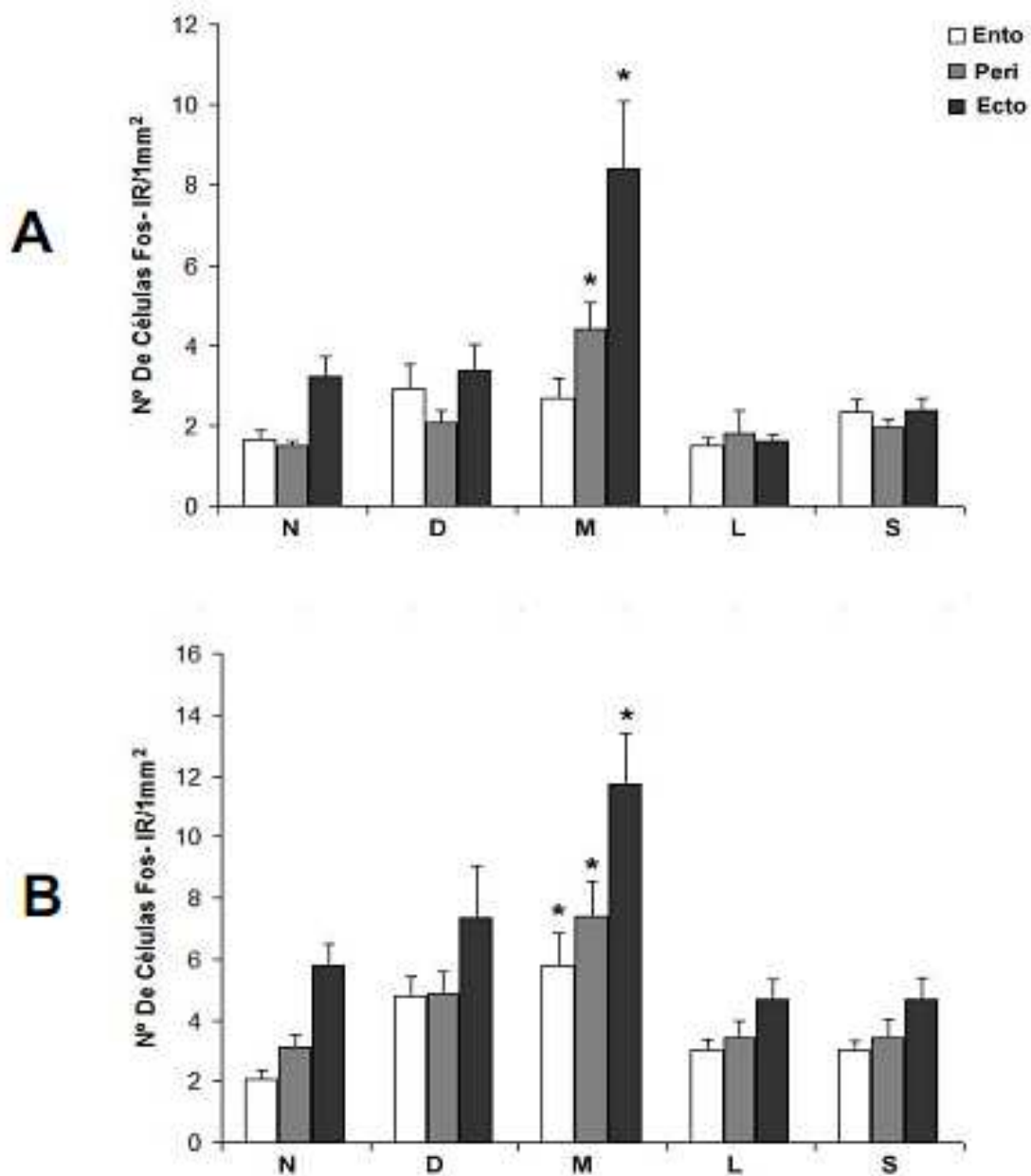




**Figura 9** - Número de células imunorreativas para Fos em áreas corticais (0,1 mm<sup>2</sup>): córtex ectorrinal (Ecto), córtex perirrinal (Peri), córtex entorrinal (Ento) de ratos submetidos ao procedimento de medo condicionamento: usando contexto diferente (D), mesmo contexto (M), luz (L) ou som (S). Um grupo não-condicionado (N) não recebeu choques nas patas. Barras representam média + EPM. 6-8 para ratos. \*  $p < 0,005$  em relação ao grupo N. (ANOVA seguida do teste post-hoc de Newman Keuls).

0.001] e córtex ectorrinal direito [ $F(4,28) = 11.29$ ;  $p = 0.001$ ]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que a significância dos resultados foi devida às alterações nos grupos expostos ao mesmo contexto, independente do hemisfério estudado.

Como pode ser observado na contagem das células marcadas o córtex ectorrinal foi a subregião do córtex do lobo temporal medial que mostrou o maior número de células imunorreativas à proteína Fos. É possível que exista um gradiente de ativação destas estruturas do lobo temporal medial pelos estímulos condicionados contextuais aversivos.



**Figura 10** - Figura 10-A- Número de células imunorreativas para *Fos* em áreas corticais (A: hemisfério esquerdo; B: hemisfério direito) de ratos submetidos ao condicionamento: usando contexto diferente (D), mesmo contexto (M), luz (L) ou som (S). Um grupo não-condicionado (N) não recebeu choque nas patas. Barras representam média + EPM para 6-8 ratos. \*,  $p < 0,005$  em relação ao grupo N. Córtex entorrinal (Ento), córtex perirrinal (Peri), córtex ectorrinal (Ecto). (ANOVA seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls).



## *5 - DISCUSSÃO*

---

---

## 5 - DISCUSSÃO

Embora muito se tenha avançado no conhecimento dos distintos circuitos neurais do medo condicionado, ainda não estão claros os mecanismos subjacentes à aquisição do medo condicionado ao contexto, ao som e à luz. Por exemplo quais e em que medida os circuitos neurais subjacentes à expressão desses tipos de condicionamento do medo são sobrepostos. Diferentes circuitos neurais podem ser recrutados no cérebro durante a aquisição de condicionamento de medo, dependendo do fato de o estímulo condicionado ser um contexto ou uma luz ou som (estímulos explícitos) (Philips e LeDoux, 1994). Diferenças entre estímulos que são mais explícitos e observáveis como no caso de um som ou luz (estímulo explícito) e outros implícitos como o contexto são também observadas em experimentos que mostram que, em baixas intensidades de estímulo incondicionado, o condicionamento ocorre apenas para o estímulo condicionado explícito (Philips e LeDoux, 1992). Dada a grande quantidade de evidências que implicam o lobo temporal medial em processos de aprendizagem e memória é surpreendente que apenas poucos estudos analisaram a participação desta região encefálica no condicionamento de medo. Assim, este estudo foi delineado para a hipótese de que o medo condicionado envolvendo diferentes estímulos condicionados; contexto, luz, ou o som ativa diferentes vias neurais. Comportamentalmente, observamos uma pequena diferença entre os grupos que responderam aos estímulos condicionados com congelamento durante o teste. Com relação ao estudo

imunoistoquímico com *Fos*, entretanto, os resultados obtidos mostraram aspectos importantes quanto à reatividade das estruturas do lobo temporal medial aos estímulos neutros utilizados nesse estudo como estímulos condicionados.

Todos os grupos de três regiões do córtex medial temporal estudado responderam com o aumento de expressão de *Fos* tendo o contexto como estímulo condicionado enquanto que não mostraram alteração significativa na marcação de *Fos* ao som e à luz. Corroborando estes achados, estudos anteriores indicaram que dependendo do estímulo utilizado no condicionamento de medo ocorre uma ativação fásica ou tônica de substratos neurais de medo através do recrutamento da via tálamo auditivo-amígdala ou pela via tálamo-córtico amigdalár (Romanski & LeDoux, 1992a, 1992b). Também foi observado que os danos ao LTM antes ou logo após o treino de uma tarefa contextual de medo condicionado, provoca déficits na expressão subsequente ao medo contextual. Estas regiões estão implicadas na aquisição ou expressão de memória contextual (Maren e Fanselow, 1997; Burwell et al. , 2004). Também em apoio aos presentes dados, verificou-se que a lesão extensa do córtex perirrinal, prejudica a aquisição do medo condicionado ao som descontínuo (PIP), bem como o condicionamento ao contexto, mas não tem efeito sobre o condicionamento de sons contínuos (Kholodar-Smith et al. , 2008). Durante o medo condicionado ao contexto, o gatilho da resposta é um padrão de estímulos inócuos que representa o ambiente e não um único estímulo sensorial sinalizando, um estímulo

incondicionado. A participação diferencial do córtex temporal medial no presente estudo sobre o processamento de estímulos explícitos reforça o papel proposto para a região cortical na representação da aprendizagem de contexto, que envolve a configuração multimodal de estímulos sensoriais presentes em um ambiente de treinamento dado (Bucci et al., 2000).

De maneira interessante, foi observado no Laboratório de Neuropsicofarmacologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras (Universidade de São Paulo) que o hipocampo ventral apresenta níveis *Fos* comparáveis ao grupo controle em animais submetidos a três tipos de medo condicionado. Estes resultados contrastam com o grande número de evidências mostrando que o hipocampo dorsal é fundamental para o condicionamento de medo contextual (Kim e Fanselow, 1992; Maren e Fanselow, 1997 Anagnostaras et al., 1999). O envolvimento diferenciado do hipocampo ventral e dorsal no condicionamento de medo pode ter a ver com o fato de aferências do hipocampo ventral surgirem de estruturas subcorticais envolvidas na defesa e emoção, incluindo o córtex cingulado (GC2), a amígdala, o hipotálamo, septo, e núcleo accumbens (Ottersen, 1982; Canteras e Swanson, 1992; Pitkänen et al., 2000). O hipocampo ventral pode desempenhar um importante papel na resolução de conflitos, especificamente aos sinais de "segurança" em situações que envolvam a ansiedade e a ameaça de punição (Gray e McNaughton, 2000). Por outro lado, no córtex temporal medial existem regiões polimodais de associação que fornecem os elementos corticais sensoriais importantes para a função

hipocampal e recebem densas conexões do hipocampo propriamente dito (Burwell & Amaral, 1998; Burwell, Witter, & Amaral, 1995; Shi & Cassell, 1997). Dadas estas conexões neuroanatômicas, um papel para estas regiões no condicionamento contextual de medo não é surpreendente, ao lado do hipocampo dorsal que, como relatado anteriormente, tem um papel fundamental neste tipo de condicionamento (Kim e Fanselow, 1992; Maren e Fanselow, 1997).

De acordo com nossos resultados relatados neste estudo, a tríade córtex perirrinal, entorrinal e ectorrinal são prováveis candidatos para a participação cortical na aprendizagem contextual. Lesões eletrolíticas, mas não neurotóxicas, do hipocampo feita antes do treino prejudicam a aquisição de medo contextual, o que sugere que danos ou desconexão com outras regiões podem ser a base do déficit produzido por lesões eletrolíticas (Maren, Aharonov, & Fanselow, 1997; Phillips & LeDoux, 1992). Além disso, lesões neurotóxicas, bem como lesões eletrolíticas do hipocampo feitas logo após o treinamento prejudicam a expressão do medo condicionado, enquanto o condicionamento contextual permaneceu praticamente intacto após várias semanas da lesão (Kim & Fanselow, 1992; Maren et al., 1997).

As conexões cortico-hipocampais sugerem que a participação da formação hipocampal no medo condicionado contextual pode depender de associações polimodais, de ordem superior, a partir de informações sensoriais provenientes de regiões do LTM (Maren et al., 1997). Assim, parece razoável supor que as regiões corticais da formação hipocampal desempenham um papel na tradução das informações sensoriais em

informações contextuais ou relacionais. Além disso, a inativação reversível do córtex perirrinal em diferentes momentos após o treinamento dificulta a expressão de medo contextual nas sessões de teste (Sachetti et al. 1999).

Um ponto interessante revelado a partir da análise adicional de dados neste estudo foi de que o córtex ectorrinal mostrou maior marcação Fos em ratos expostos ao condicionamento contextual de medo do que as outras regiões corticais LTM analisadas neste estudo. Estes resultados sugerem que deve existir um gradiente neural de dentro para fora na formação hipocampal que processa as informações contextuais para posterior armazenamento ou recuperação de representações contextuais. Embora sejam necessários mais estudos para avaliar de forma mais completa a função mnemônica do LTM com base nos dados discutidos acima, propõe-se que o córtex temporal medial pode estar envolvido na consolidação e, eventualmente, no armazenamento de informações contextuais.

Uma explicação alternativa para os presentes resultados seria a de que existe um único processo subjacente ao condicionamento de medo explícito e contexto, em vez de separar os circuitos neurais para cada modalidade de condicionamento de medo. Esta interpretação baseia-se em dois pontos: 1) distribuição Fos fornece uma indireta ao invés de uma medida direta da consolidação da memória e 2) a memória explícita ou medo contextual consolida dentro de janelas de tempos distintos (Silva et al., 2004; Borelli et al. , 2005). Assim o mesmo sistema neural poderia ser usado para ambas as memórias ao longo do tempo. Por exemplo, estímulos

como luz e som são estímulos condicionados rápidos e salientes enquanto que os contextuais são preditores mais fortes do estímulo incondicionado no procedimento de medo contextual. Assim, uma rápida transferência de informação permeia o processo subjacente condicionado ao tom ou luz, enquanto um ritmo mais lento de transferência de informação ocorre no condicionamento de medo contextual. Coerente com esta possibilidade, uma redução do medo condicionado contextual é observado após a lesão do núcleo mediano da rafe um dia pós-treinamento, enquanto o medo sobressalto potencializado pelo medo com a luz-EC não foi alterada por esta lesão (Silva et al., 2004; Borelli et al., 2005). Em outras palavras, o processo de transferência de informações é rápida ou lenta, dependendo se o condicionamento de medo usa estímulo explícito ou pistas contextuais, respectivamente.

Concluindo, o presente estudo indica que os resultados comportamentais estão de acordo com estudos anteriormente relatados na literatura que mostram que tanto estímulos condicionados explícitos (luz e som) como os estímulos implícitos (background) são eficazes em produzir medo condicionado em ratos quando previamente pareados com choques nas patas uma vez que houve aumento significativo de resposta de imobilidade tensa (congelamento) em animais submetidos ao procedimento de medo condicionado utilizado neste estudo. Corroborando estes achados houve aumento significativo na imunoreatividade Fos nas subregiões do córtex do lobo temporal medial em ratos sujeitos a sessões-teste usando o

procedimento de medo condicionado utilizando o contexto como estímulo condicionado. Assim, somente o contexto usado como estímulo condicionado foi capaz de produzir marcações da proteína Fos no córtex entorrinal, perirrinal e ectorrinal. A luz, o som e um contexto diferente do que os animais previamente receberam choques nas patas não causaram alterações significativas na imunorreatividade à proteína Fos. Como pode ser observado na contagem das células marcadas o córtex entorrinal foi a subregião do córtex do lobo temporal medial que mostrou o maior número de células imunorreativas à proteína Fos. Em uma análise adicional em que se investigou uma possível lateralização hemisférica nos efeitos da exposição dos animais aos estímulos condicionados de medo não mostrou diferenças significativas na contagem de células imunorreativas Fos nos hemisférios direito e esquerdo.

Os achados do presente estudo representam uma contribuição relevante ao nosso entendimento da neurobiologia do medo condicionado em geral, e aportam evidências para o nosso entendimento dos substratos neurais do medo condicionado no encéfalo de roedores. Em particular, os presentes resultados mostram claramente a seletividade de subregiões do lobo temporal medial no processamento de estímulos condicionados contextuais aversivos. Das três estruturas estudadas o córtex ectorrinal foi a que mais expressou a proteína Fos em presença dos estímulos contextuais aversivos. É possível que exista um gradiente de ativação destas estruturas do lobo temporal medial pelos estímulos condicionados contextuais aversivos.



O presente trabalho abre a perspectiva de se avançar na compreensão da neurobiologia do medo condicionado, analisando futuramente os efeitos de drogas tranqüilizantes menores injetadas diretamente nessas estruturas do lobo temporal medial sobre respostas de medo condicionado contextual.

## *6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

---

---

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAGNOSTARAS, S. G.; MAREN, S.; FANSELOW, M. S.** Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats. **Journal of Neuroscience**, v.19, p.1106-1114, 1999.
- ALBRECHET-SOUZA, L.; CARVALHO, M.C.; FRANCI, C.R.; BRANDÃO, M.L.** Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naïve and previously exposed to the elevated plus maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. **Horm. Behav.**, v.52, p.267-273, 2007.
- AVANZI, V.; SILVA, R.C.B.; MACEDO, C.E.; BRANDÃO, M.L.** 5-HT mechanisms of median raphe nucleus in the conditioned freezing caused by light/foot-shock association. **Physiol. Behav.**, v.78, p.471-477, 2003.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.** Effects of hippocampal lesions on the rats reaction to a cat. **Journal of Comparative Physiology Psychology**, v.78, p.77-82, 1972.
- BLANCHARD, R. J.; FUKUNAGA, K. K.; BLANCHARD, D. C.** Environmental control of defensive reactions to footshock. **Bulletin of Psychonomic Society**, v.8, p.129-130, 1976.
- BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.** Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Review of Psychology**, v.7, p.24S-35S, 1987.
- BOLLES, R. C.; COLLIER, A. C.** The effect of predictive cues on freezing in

- rats. **Animal Learning and Behavior**, v.4, p.6-8, 1976.
- BORELLI, K.G.; GARGARO, A.C.; SANTOS, J.M.; BRANDÃO, M.L.**  
Effects of inactivation of serotonergic neurons of the median raphe nucleus on learning and performance of contextual fear conditioning. **Neuroscience Letters**, v.387, p.105-110, 2005.
- BORELLI, K.G.; FERREIRA-NETO, C.; BRANDÃO, M.L.** Distribution of Fos immunoreactivity in the rat brain after freezing or escape elicited by inhibition of glutamatergic acid decarboxylase or antagonism of GABA-A receptors in the inferior colliculus. **Behav. Brain. Res.**, v.170, p.84-93, 2006.
- BRANDÃO, M.L.; ANSELONI, V.Z.; PANDÓSSIO, J.E.; DE ARAÚJO, J.E.; CASTILHO, V.M.** Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.23, p.863-875, 1999.
- BRANDÃO, M.L.** Psicofisiologia. Atheneu, Rio de Janeiro, 2001.
- BRANDÃO, M.L.; BORELLI, K.G.; NOBRE, M.J.; SANTOS, J.M.; ALBRECHET-SOUZA, L.; OLIVEIRA, A.R.; MARTINEZ, R.C.**  
Gabaergic regulation of the neuronal organization of fear in the midbrain tectum. **Neurosci. Biobehavioral Rev.**, v.29, p.1299-1311, 2005.
- BRANDÃO, M.L.; ZANOVELI, J.M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; CARVALHO, M.C.; RUIZ-MARTINEZ, R.C.; OLIVEIRA, L.C.**  
Organization of distinct patterns of freezing behavior. **Behav. Brain Res.**, v.188, p. 1-13, 2008.

- CARRIVE, O.; 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, p.65-177, 1997.
- CARRIVE, P.; Lee, J.; Su, A.** Lidocaine blocked of amigdala output in fear-conditioned rats induces Fos expression in the ventrolateral periaqueductal gray. **Neuroscience**, v.95, p.1071-1080, 2000.
- CASTILHO, V.M.; BRANDÃO, M.L.** Conditioned antnociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT<sub>2A</sub> receptors in rats. **Psychopharmacology** (Berl) v.155, p.154-162, 2001.
- DAVIS, M.** Diazepam and Flurazepam: effects on conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. **Psychopharmacology**, v.62, p.1-7, 1979.
- DE SOUZA, E.B.** Corticotropin-releasing factor receptors: Physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. **Psychoneuroendocrinology**, v.20, p.789-819, 1995.
- FANSELOW, M. S.** Associative vs topographical accounts of the immediate shock freezing deficit in rats: implications for the response selection rules governing species-specific defensive reactions. **Learning and Motivation**, v.17, p.16-39, 1986.
- FANSELOW, M. S.** The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear an anxiety. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R.

- The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and immunohistochemical organization.** New York: Plenum Publishing Corporation, p.151-173, 1991.
- FANSELOW, M. S.** Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. **Psychonomic Bulletin and Review**, v.1, p.429-438, 1994.
- FANSELOW, M.** Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behavioural Brain research**, v.110, p.73-81, 2000.
- FELDMAN, S.; CONFORTI, N.; ITZIK, A.; WEIDENFELD, J.** Differential effect of amygdaloid lesions on CRF-41, ACTH and corticosterone responses following neural stimuli. **Brain Research**, v.658, p.21-26, 1994.
- FENDT, M.; FANSELOW, M. S.** The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v.23, p.743-760, 1999.
- FERREIRA-NETO, C.; BORELLI, K.G.; BRANDÃO, M.L.** Distinct Fos expression in the brain following freezing behavior elicited by stimulation with NMDA of the ventral or dorsal inferior colliculus. **Exp. Neurol.**, v.204, p.693-704, 2007.
- GRAEFF, F.G.** Brain defense systems and anxiety. in: Roth M, Burrows GD, Noyes R (eds.), **Handbook of Anxiety**, vol. 3. Elsevier Science Publishers: Amsterdam, 307-354, 1990.
- GRAEFF, F.G.** Serotonina, ansiedade e pânico. **Jornal Brasileiro de**

- Psiquiatria**, v.40, p.605-609, 1991.
- GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. Fundamentos da Psicofarmacologia.**  
Atheneu: São Paulo, 2000.
- GRAY, J.A.** Pécis of The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. **The Behavioral and Brain Sciences**, v.5, p.469-534, 1982.
- GRAY, J.A.; McNAUGHTON, N. The Neuropsychology of Anxiety.** Oxford: Oxford University Press, 2000.
- GEWIRTZ, J. C.; McNISH, K. A.; DAVIS, M.** Is the hippocampus necessary for contextual fear conditioning? **Behavioural Brain Research**, v.110, p.83-95, 2000.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E.** Tratado de fisiologia médica. In: \_\_\_\_\_. **Os hormônios adrenocorticais.** 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 77, p.813-826, 2002.
- KIM, J. J.; FANSELOW, M. S.** Modality specific retrograde amnesia of fear following hippocampal lesions. **Science**, v.256, p.675-677, 1992.
- LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; DeCOLA, J. P.; KIM, J. J.; FANSELOW, M. S.** Immediate shock deficit in fear conditioning: effects of shock manipulations. **Behavioral Neuroscience**, v.120, p.873-879, 2006.
- LeDOUX, J.E.; IWATA, J.; CICHETTI, P.; REIS, D.J.** Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **J. Neurosci.**, v.8, p.2517-1529, 1988.
- LIDQUIST, D.H.; JARRARD, L.E.; BROWN, T.H.** Perirhinal cortex supports

- delay fear conditioning to rat ultrasonic social signals. **J. Neurosci.**, v.24(14), p.3610-3617, 2004.
- MILAD, M.R.; QUIRK, G.J.** Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. **Nature**, v.420, p.70-74, 2002.
- MORGAN, M.A.; LeDOUX, J.E.** Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. **Behav. Neurosci.**, v.109, p.601-668, 1995.
- NUTT, D.J.** Anxiety and its therapy: Today and tomorrow. *In*: BRILEY, M.; NUTT, D.J. (eds) The pharmacology of human anxiety. **Pharmacology and Therapeutics**, v.47, p. 233-266, 1990.
- PEZZE, M.A.; BAST, T.; FELDON, J.** Significance of dopamine transmission in the rat medial prefrontal cortex for conditioned fear. **Cereb. Cortex**, v.13, p.371-380, 2003.
- PHILLIPS, R.G.; LeDOUX, J.E.** Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v.106, p.274-285, 1992.
- RIZVI, T.A.; ENIIS, M.; BEHBEHAMI, M.M.; SHIPLEY, M.T.** Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. **J. Comp. Neurol**, v.303, p.121-131, 1991.
- ROSEN, J.B.; HITH; COCK, J.M.; SANANES, C.B.; MISENREDINO, M.J.D.; DAVIS, M.** A direct projection from the central nucleus of the amygdala to the acoustic startle pathway: anterograde and retrograde



- tracing studies. **Behav. Neurosci.**, v.105, p.817-825, 1991.
- Silva, R.C.B.; Gárgaro, A.C.; Brandão, M.L.** Differential regulation of the expression of contextual freezing and fear-potentiated startle by 5-HT mechanisms of the median raphe nucleus. **Behav. Brain Res.**, v.151, p.93-101, 2004.
- SULLIVAN, G.M.; APERGIS, J.; BUSH, D.E.; JOHNSON, L.R.; HOU, M.; Le DOUX, J.E.** Lesions in the bed nucleus of the stria terminalis disrupt corticosterone and freezing responses elicited by a contextual but not by a specific cue-conditioned fear stimulus. **Neuroscience**, v.128, p.7-14, 2004.
- VAN De KAR, L.; PIECHOWSKI, R.A.; RITTENHOUSE, P.A.; GRAY, T.S.** Amygdaloid lesion: differential effects on conditioned stress and immobilization-induced increases in corticosterone and renin secretion. **Neuroendocrinology**, v.54, p.89-95, 1991.
- VANN, S.D.; BROWN, M.W.; ERICHSEN, J.T.; AGGLETON, J.P.** Fos Imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. **J. Neurosci.**, v.20(7), p.2711-2718, 2000.
- VOUIMBRA, R.M.; GARCIA, R.; BAUDRY, M.; THOMPSON, R.F.** Potentiation of conditioned freezing following dorsomedial prefrontal cortex lesions does not interfere with fear reduction in mice. **Behav. Neurosci.**, v.114, p.720-724, 2000.
- WARBURTON, E.C.; GLOVER, C.P.J.; MASSEY, P.V.; WAN, H.;**

**JOHNSON, B.; BIENEMANN, A.; DEUSCHLE, U.; KEW, J.N.C;**  
**AGGLETON, J.P.; BASHIR, Z.I.; UNEY, J.; BROWN, M.W.** cAMP  
responsive element-binding protein phosphorylation is necessary for  
perirhinal long-term potentiation and recognition memory. **J. Neurosci.**,  
v.25(27), p.6296-6303, 2005.