



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Lucía Raily Acuña

**PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA RESPOSTA DEFENSIVA IMEDIATA E  
NA AQUISIÇÃO DE UM CONDICIONAMENTO AVERSIVO  
OLFATÓRIO INDUZIDO PELA ESTIMULAÇÃO QUÍMICA DA  
MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL**

**Florianópolis**

**2019**

**Lucía Raily Acuña**

**PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA RESPOSTA DEFENSIVA IMEDIATA E  
NA AQUISIÇÃO DE UM CONDICIONAMENTO AVERSIVO  
OLFATÓRIO INDUZIDO PELA ESTIMULAÇÃO QUÍMICA DA  
MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Coorientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

**Florianópolis**

**2019**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

ACUÑA, LUCIA RAILY  
PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA RESPOSTA DEFENSIVA IMEDIATA E  
NA AQUISIÇÃO DE UM CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO  
INDUZIDO PELA ESTIMULAÇÃO QUÍMICA DA MATÉRIA CINZENTA  
PERIAQUEDUTAL / LUCIA RAILY ACUÑA ; orientador, ANTONIO DE  
PÁDUA CAROBREZ, coorientador, JAMIL ASSREUY, 2019.  
122 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Óxido Nítrico . 3. Matéria Cinzenta  
Periaquedutal Dorsal. 4. Condicionamento Aversivo  
Olfatório. I. CAROBREZ, ANTONIO DE PÁDUA . II. ASSREUY,  
JAMIL . III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Lucía Raily Acuña

**Papel do óxido nítrico na resposta defensiva imediata e na aquisição de um condicionamento aversivo olfatório induzido pela estimulação química da matéria cinzenta periaquedutal**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Alline Cristina de Campos

Universidade de São Paulo

Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues

Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Newton Sabino Canteras

Universidade de São Paulo

Dr. José Eduardo da Silva Santos

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmacologia

---

Prof. Dr. Rui Daniel Schroder Prediger

Coordenador do Programa

---

Prof. Dr. Antonio de Pádua Carobrez

Orientador

Florianópolis, 19 de agosto de 2019

## **Agradecimentos**

*Ao meu orientador Professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez, pelos conhecimentos transferidos, pelas conversas de sala, pela compreensão e paciência, pela dedicação e incentivo, por ter marcado minha formação profissional desde a primeira vez que o ouvi falar.*

*Ao meu coorientador Professor Dr. Jamil Assreuy, por todo o apoio brindado durante o andamento deste trabalho e estar sempre disponível para esclarecer minhas dúvidas.*

*Aos membros da banca Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues, Dra. Alline Cristina Campos, Dr. Jose Eduardo Da Silva Santos, Dr. Newton S. Canteras e o Dr. Geison de Souza Izidio agradeço por aceitarem avaliar este trabalho.*

*A todos os professores do Departamento de Farmacologia pelo conhecimento compartilhado.*

*A todos os colegas de laboratório com quem tive o prazer de trabalhar durante estes quatro anos, Ana, Tarcila, Julia, Leticia, João, e especialmente a Cris e Frank que me ensinaram todo desde o primeiro dia em que cheguei ao lab e me acompanharam até o final do doutorado, porque se tornaram mais do que colegas, amigos que eu levarei para a vida toda.*

*A Clarissa Barp do NOLAB pela parceria durante os experimentos realizados juntas.*

*À minha família, pelo apoio incondicional, especialmente a minha mãe que me dá a força e apoio para continuar a crescer sempre, sem ela nada seria possível.*

*Aos meus amigos Ingrid e Herber por estar sempre conosco brindando seu apoio em todos os momentos importantes da nossa vida.*

*Ao meu namorado Alejandro, por ser meu pilar nos momentos mais difíceis. Pela parceria de todos os dias, o constante acompanhamento, e especialmente por me dar a paz que eu preciso, todo é mais fácil com você.*

*A minha filha Martina, minha melhor parceira de laboratório, por acompanhar com paciência e entusiasmo os experimentos em dias feriados e fins de semana, pela sua compreensão e apoio durante o percurso desta aventura, e por ser o motor que dá energia a minha vida cada dia!!!!*

*“A ciência não conhece de países, porque o conhecimento pertence à humanidade e é a tocha que ilumina o mundo. A ciência é a alma da prosperidade das nações e a fonte de todo progresso”*

*Louis Pasteur*

## Resumo

A região rostro-dorsal da matéria cinzenta periaqueductal (MCPd) apresenta abundantes neurônios imunoreativos para a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). A ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) pós-sinápticos é o principal estímulo para ativação da nNOS e a consequente síntese de óxido nítrico (NO) endógeno. A participação do NO nas respostas defensivas imediatas eliciadas pela MCPd tem sido amplamente estudada sob diferentes paradigmas, no entanto, apesar das investigações realizadas, a participação do sistema nitrérgico nos processos de aprendizagem e formação de memórias na MCPd ainda não foi desvendado totalmente. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar como o NO modula as respostas defensivas imediatas produzidas pela estimulação química da MCPd e a sua participação no processo de aquisição de uma memória aversiva durante o paradigma de condicionamento olfatório. Intervenções farmacológicas nos pontos críticos de regulação da via nitrérgica foram realizados mediante o uso do inibidor específico da nNOS, 7-Nitroindazole, o sequestrador de NO extracelular, C-PTIO, e o doador de NO, Spermine NONOate. Além disso, a quantificação *in vivo* do NO produzido durante a sessão de condicionamento e de teste foi realizada mediante o uso da sonda fluorescente DAF-FM DIACETATO com o intuito de obter uma medida bioquímica direta que permita correlacionar as respostas comportamentais observadas com a concentração de NO na MCPd, dando robustez a nossos resultados. Em linhas gerais foi observado que: existe uma correlação diretamente proporcional entre as respostas defensivas observadas após a estimulação química da MCPd e a concentração de NO medida; que o NO participa não só da modulação das respostas defensivas imediatas mas também do processo de aquisição do condicionamento aversivo olfatório; e que o NO tem a capacidade de modular a neurotransmissão glutamatérgica desempenhando um papel tanto na homeostase do sistema neural quanto no equilíbrio neuroquímico necessário para a ocorrência dos processos de plasticidade sináptica subjacentes ao aprendizado aversivo.

Palavras chave: Óxido nítrico, Matéria cinzenta periaqueductal dorsal, Condicionamento aversivo olfatório

## Abstract

The rostral region of the dorsal periaqueductal gray matter (dPAG) has abundant immunoreactive neurons to neuronal nitric oxide synthetase (nNOS) enzyme. The activation of postsynaptic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors is the main stimulus for nNOS activation and consequent synthesis of endogenous nitric oxide (NO). The participation of NO in the immediate defensive responses elicited by the PAG has been investigated under different paradigms, however, despite the investigations until now, the participation of the nitrenergic system in the processes of learning and memory formation in the dPAG has not yet been fully understood. Therefore, the objective of this work was to investigate how NO modulates the immediate defensive responses produced by the chemical stimulation of dPAG and its participation in the acquisition process of an aversive memory during the olfactory conditioning paradigm. Pharmacological intervention at critical points of the regulatory nitrenergic pathway were performed using the specific nNOS inhibitor 7-Nitroindazole, the extracellular NO scavenger C-PTIO, and the NO donor, Spermine-NONOate. In addition, the *in vivo* quantification of the NO produced during the conditioning and test session was performed using the DAF-FM DIACETATE fluorescent probe with the purpose of obtaining a direct biochemical measurement that allows to correlate the behavioral responses observed with the concentration of NO at dPAG, giving robust to our results. In general terms, it was observed that: there is a directly proportional correlation between the defensive responses observed after the chemical stimulation of the dPAG and the measured NO concentration; NO plays a role not only in the modulation of the immediate defensive responses but also in the acquisition process of the olfactory aversive conditioning; NO has the ability to modulate glutamatergic neurotransmission by regulating of neural system homeostasis and the neurochemical balance necessary for the occurrence of the synaptic plasticity processes underlying aversive learning.

Keywords: Nitric oxide, Dorsal periaqueductal gray matter, Olfactory aversive conditioning

## Lista de Figuras

1. Representação esquemática da divisão anatômica e funcional da matéria cinzenta periaquedutal .....	24
2. Receptores glutamatérgicos .....	27
3. Estrutura da nNOS e via metabólica de formação do NO .....	29
4. Neurotransmissão nitrérgica.....	30
5. Protocolo experimental do Condicionamento Aversivo Olfatório.....	43
6. Mecanismo de ação da sonda DAF-FM DIACETATO.....	45
7. Representação esquemática da edição das imagens da MCPd marcadas com DAF-FM.....	49
8. Corte coronal do encéfalo de ratos evidenciando o sítio de microinjeção mediante coloração de Azul de Evans. ....	53
9. Fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de rato com a coloração de NISSL.....	54
10. Diagrama esquemático de cortes coronais do encéfalo de rato demonstrando a localização da MCPd.....	54
11. Resultados do Experimento 1: efeitos da inibição da nNOS, sobre as respostas defensivas imediatas e aquisição de uma memória aversiva .....	57
12. Resultados do Experimento 2: efeitos da captura do NO na fenda sináptica sobre as respostas defensivas imediatas e aquisição de uma memória aversiva.....	59
13. Resultados do Experimento 4: quantificação <i>in vivo</i> do nível de NO produzido pela estimulação química da MCPd mediante a administração de NMDA.....	60
14. Análise minuto a minuto dos parâmetros comportamentais avaliados durante a sessão de condicionamento quando administrado DAF-FM DA antes da estimulação da MCPd mediante administração de NMDA.....	61
15. Resultados do Experimento 5: quantificação <i>in vivo</i> do NO presente na MCPd após a inibição da nNOS.....	63

16. Fotografias da emissão de fluorescência gerada pela reação DAF-FM -- NO na MCPd .....	64
17. Resultados do Experimento 6: curva dose-resposta para estimulação da MCPd utilizando o doador de NO Spermine NONOate como estímulo incondicionado .....	65
18. Análise minuto a minuto dos parâmetros comportamentais avaliados durante a sessão de condicionamento após a administração do doador de NO Spermine NONOate .....	67
19. Resultados do Experimento 7: quantificação da liberação de NO induzida pela infusão de Spermine NONOate na MCPd .....	68
20. Resultados do Experimento 8: efeitos da interferência obtida pela inibição da nNOS e a captura do NO na fenda sináptica sobre a expressão de uma memória aversiva .....	70
21. Resultados do Experimento 9: quantificação <i>in vivo</i> do NO produzido durante a evocação de uma memória aversiva.....	71
22. Esquema representativo das interações entre o sistema nitrérgico e outros sistemas de neurotransmissão envolvidos na modulação da MCPd durante o CAO. ....	91

## **Lista de abreviaturas e siglas**

2-AG – 2-araquidonoilglicerol

5-HT1A – receptores serotoninérgicos do subtipo 1A

5-HT2A – receptores serotoninérgicos do subtipo 2A

7NI – 7 Nitroindazole

8-OHDPAT – hidroxí-2- (di-n-propilamino) tetralina

1400W – N-([3-(aminometil)fenil]metil) dihidrocloruro de etanimidamida])

AEA – anandamida

AM251 – agonista inverso de receptores canabinoides do tipo 1

AMPA – ácido propiônico alfa-amino-3-hidroxi-metil-4-isoxazol, agonista de receptores AMPA

AMv – núcleo talâmico anteromedial ventral

ANOVA – análise de variância

AP – anteroposterior

BH4 – tetrahydrobiopterina

BLA – núcleo basolateral da amígdala

BOA – bulbo olfatório acessório

Ca<sup>2+</sup> – cátions de cálcio

CAO – condicionamento aversivo olfatório

CAP – capsaicina

CAMKII – Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina cinase II

CB1 – receptores endocanabinoides do tipo 1

CeA – núcleo central da amígdala

CNG – canais iônicos dependentes de nucleotídeos cíclicos

C-PTIO – Carboxy- PTIO

DAF-FM DIACETATO – 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato

DOI – 2,5-Dimetoxi-4-iodoanfetamina

DV – dorsoventral

EAAT1-2 – transportador de glutamato, subtipos 1 e 2

EC – estímulo condicionado

eCB – endocanabinoide

EDTA - ácido etilendiaminotetraacético

EI – estímulo incondicionado

EN – estímulo neutro

FAD – dinucleotídeo de flavina e adenina

FMN – mononucleotídeo de flavina

GABA – ácido gama-aminobutírico

GCs – guanilato ciclase solúvel

GG – gânglio de Grueneberg

Gi – proteína G inibitória

GLU – glutamato

GluA1-4 – subunidades de receptores AMPA, de 1 a 4. Também podem ser chamados de GluR1-4

Glum – receptores glutamatérgicos metabotrópicos

GluN1-3 – subunidades de receptores NMDA, de 1 a 3

GMPc – guanosina monofosfato cíclica

Gq – proteína G estimulatória

Gs – proteína G estimulatória

iGluR – receptores glutamatérgicos ionotrópicos

IR – imunoreativo

IF – intensidade de fluorescência

K<sup>+</sup> – cátions de potássio

LCE – labirinto em cruz elevado

LHASf – região perifornical da área hipotalâmica lateral

L-NAME – NG-nitro-L-arginina metilester

L-NOARG – L-NG-nitro-arginina

LTD – depressão de longa duração

LTP – potenciação de longa duração

MCP – matéria cinzenta periaquedutal

MCPd – matéria cinzenta periaquedutal, porção dorsal

MCPdl – matéria cinzenta periaquedutal, porção dorsolateral

MCPI – matéria cinzenta periaquedutal, porção lateral

MCPvl – matéria cinzenta periaquedutal, porção ventrolateral  
MEApv – parte posterior ventral do núcleo medial da amígdala  
Mg<sup>+2</sup> – cátion de magnésio  
ML – mediolateral  
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NHA – núcleo hipotalâmico anterior  
NMDA – N-metil-D-aspartato, agonista de receptores NMDA  
NPLA – N $\omega$ -propyl-Larginine  
Na<sup>+</sup> – cátions de sódio  
NO – óxido nítrico  
NOC-9 – 6-(2-Hidroxi-1-metil-2-nitro-hidrazino)-N-metil-1-hexanamina  
NSF – fator sensível a N-etilmaleimida  
eNOS – óxido nítrico sintetase endotelial  
iNOS – óxido nítrico sintetase induzível  
nNOS – óxido nítrico sintetase neuronal  
ODQ – 1H-[1,2,4] oxadiazolol [4,3-a]quinoxalin-1-one  
OVN – órgão vomeronasal  
PBS – solução salina com tampão fosfato  
PEA – amina  $\beta$  fenetilamina  
PDE – fosfodiesterases  
PKA – proteína cinase A  
PKG – proteína quinase G  
PMd – núcleo hipotalâmico pré-mamilar dorsal  
RD – respostas defensivas  
RE – núcleo hipotalâmico reuniens  
REP – resposta de expansão da probóscide  
SDT – paradigma de sensibilização dependente do tempo  
SIN1 – 3-morpholinylsydneimine hydrochloride  
SOA – sistema olfatório acessório  
SOP – sistema olfatório principal  
SP – Spermine NONOate

TA – tempo próximo a fonte de odor

TE – tempo gasto no compartimento fechado

TMT– 2,4,5-trimetiltiazolina

TRPV1 – receptor de potencial transitório do tipo vaniloide, subtipo 1

VMHdm – núcleo hipotalâmico ventromedial, porção dorsomedial

Zn<sup>2+</sup> – cátion de zinco

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	18
1.1. Valor adaptativo das emoções .....	18
1.2. Plasticidade dos comportamentos defensivos .....	19
1.3. Condicionamento aversivo olfatório .....	19
1.4. Neurobiologia do comportamento defensivo .....	22
1.5. Características neuronatômicas e funcionais da MCP .....	23
1.6. Neurotransmissão: papel do sistema glutamatérgico e do óxido nítrico na MCP .....	25
1.6.1. Sistema glutamatérgico .....	25
1.6.2. Óxido Nítrico e vias de sinalização .....	27
1.7. NO e comportamentos de defesa .....	31
1.8. NO, aprendizagem e memória .....	33
2. JUSTIFICATIVA .....	35
3. HIPÓTESE .....	35
4. OBJETIVO GERAL .....	35
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
6. MATERIAL E MÉTODOS .....	37
6.1. Animais .....	37
6.2. Considerações éticas .....	37
6.3. Cirurgia estereotáxica .....	38
6.4. Fármacos e soluções utilizados nos experimentos .....	39
6.5. Microinjeção cerebral .....	40
6.6. Aparatos experimentais.....	41
6.6.1. Caixa de Condicionamento.....	41
6.6.2. Caixa de Odor (teste) .....	41

6.6.3 Fonte de odor .....	41
6.7. Procedimento para o Condicionamento Aversivo Olfatório .....	41
6.8. Parâmetros Comportamentais Analisados .....	43
6.9. Métodos de quantificação do NO .....	44
6.10. Grupos Experimentais.....	46
<b>6.10.1. Grupo Experimental 1: Participação do NO na modulação das respostas defensivas imediatas e na aquisição do CAO obtido através da estimulação química da MCPd</b> .....	46
6.10.1.1. <b>Experimento 1:</b> Efeitos da inibição da nNOS sobre as respostas defensivas imediatas e aquisição de uma memória aversiva .....	46
6.10.1.2. <b>Experimento 2:</b> Efeitos da captura do NO na fenda sináptica sobre as respostas defensivas imediatas e a aquisição de uma memória aversiva .....	47
6.10.1.3. <b>Experimento 3:</b> Padronização de um protocolo para a quantificação de NO <i>in vivo</i> mediante o uso da sonda fluorescente DAF-FM DIACETATO .....	47
6.10.1.4. <b>Experimento 4:</b> Quantificação <i>in vivo</i> do nível de NO produzido pela estimulação química da MCPd mediante a administração de NMDA.....	49
6.10.1.5. <b>Experimento 5:</b> Quantificação <i>in vivo</i> do NO presente na MCPd após a inibição da nNOS realizada antes da estimulação mediante a infusão de NMDA 50 pmol.....	50
6.10.1.6. <b>Experimento 6:</b> Curva dose-resposta para estimulação da MCPd utilizando o doador de NO Spermine NONOate como estímulo incondicionado.....	50
6.10.1.7. <b>Experimento 7:</b> Quantificação da liberação de NO induzida pela infusão de Spermine NONOate na MCPd .....	51
<b>6.10.2. Grupo experimental 2: Participação do NO na expressão de respostas aprendidas durante o CAO</b> .....	51
6.10.2.1. <b>Experimento 8:</b> Efeitos da interferência dada pela inibição da nNOS e a captura do NO na fenda sináptica sobre a expressão de uma memória aversiva .....	51
6.10.2.2. <b>Experimento 9:</b> Quantificação <i>in vivo</i> do NO produzido durante a evocação de uma memória aversiva .....	52
6.11. Verificação do sitio de injeção e histologia.....	52
6.12. Análise estatística .....	55

7. RESULTADOS .....	56
7.1. <b>Experimento 1:</b> Efeitos da inibição da nNOS durante a sessão de condicionamento do CAO .....	56
7.2. <b>Experimento 2:</b> Efeitos da captura do NO na fenda sináptica durante a sessão de condicionamento do CAO .....	58
7.3. <b>Experimento 3-4:</b> Quantificação <i>in vivo</i> do nível de NO produzido pela estimulação química da MCPd mediante a administração de NMDA .....	59
7.4. <b>Experimento 5:</b> Quantificação <i>in vivo</i> do NO presente na MCPd após a inibição da nNOS .....	62
7.5. <b>Experimento 6:</b> Curva dose-resposta para estimulação da MCPd utilizando o doador de NO Spermine NONOate.....	64
7.6. <b>Experimento 7:</b> Quantificação da liberação de NO induzida pela infusão de Spermine NONOate na MCPd .....	67
7.7. <b>Experimento 8:</b> Efeitos da interferência da via nitrérgica sobre a expressão de uma memória aversiva .....	68
7.8. <b>Experimento 9:</b> Quantificação <i>in vivo</i> do NO produzido durante a evocação de uma memória aversiva.....	70
8. DISCUSSÃO .....	72
9. CONCLUSÃO.....	92
10. REFERÊNCIAS.....	93

## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1. Valor adaptativo das emoções

“A sobrevivência do mais apto”, frase cunhada por Herbert Spencer em seu livro *"Principles of Biology"* (1864), e adotada por Charles Darwin na quinta edição do seu renomado livro, *"The Origin of Species"* (1869), é frequentemente uma frase controversa, sujeita a diferentes interpretações, que tem gerado grandes debates ao longo da história da Biologia. O indivíduo mais apto muitas vezes não é o mais forte nem o mais inteligente, é aquele que melhor se adapta às mudanças nas condições ambientais às quais está exposto, conseguindo sobreviver e se reproduzir, transmitindo seus genes e garantindo assim a perpetuação da sua espécie.

A exposição constante a diversos estímulos ambientais leva a mudanças psicológicas e fisiológicas, capazes de produzir diferentes respostas comportamentais. Dentro do conjunto de comportamentos que auxiliam a sobrevivência dos indivíduos, aqueles gerados pelas emoções apresentam um papel fundamental.

A palavra emoção, deriva do latim *emover*, que significa agitação, movimento, excitação. Os indivíduos podem experimentar emoções tanto positivas quanto negativas, dentre as emoções antigamente classificadas como básicas encontramos tristeza, felicidade, surpresa, nojo, medo e raiva (Ekman, 2004; Ostrosky e Vélez, 2013; Damasio, 2014). O medo, por exemplo, leva ao desenvolvimento de estratégias de defesa, as quais desempenham um papel significativo do ponto de vista adaptativo frente às ameaças que podem afetar a sobrevivência, o bem-estar ou a segurança de um indivíduo, pelo qual o estudo dos comportamentos defensivos tornou-se uma área de pesquisa de grande interesse (Hetem e Graeff, 1997).

O livro *"The expression of the emotion in man and animals"* publicado em 1872 por Charles Darwin marcou o início dos estudos comportamentais, e a evolução dos mesmos. Nesse livro Darwin destaca que as emoções e sua expressão foram inicialmente aprendidas e, a causa da sua utilidade, foram transmitidas aos descendentes transformando-se em inatas. De fato, fatores de aprendizagem levam a aquisição e conseqüente expressão de novas estratégias comportamentais ao longo do desenvolvimento do indivíduo, aumentando a probabilidade de adaptação e sobrevivência das espécies às novas características do ambiente externo.

## 1.2. Plasticidade dos comportamentos defensivos

A expressão dos comportamentos defensivos possui uma longa história filogenética. Os padrões de respostas comportamentais não permanecem fixos ao longo do tempo, mudam constantemente conforme os estímulos apresentados, o entorno, o estágio de desenvolvimento e as experiências vivenciadas (Kats e Dill, 1998; Kavalier e Choleris, 2001; Wiedenmayer, 2009).

A ontogenia consiste nas mudanças fenotípicas que ocorrem ao longo do desenvolvimento de um indivíduo (Tinbergen, 1963). Neste contexto Wiedenmayer (2009) classificou em três grupos as mudanças que ocorrem nas respostas defensivas (RD) durante a ontogenia de diversas espécies: mudanças nas respostas não aprendidas, mudanças dependentes de experiências e mudanças de comportamentos defensivos aprendidos. Algumas espécies são capazes de apresentar respostas defensivas ante o primeiro encontro com uma ameaça, enquanto outros não possuem essa capacidade e precisam adquirir uma estratégia defensiva frente a uma situação perigosa.

Ameaças naturais como predadores, assim como a exposição a estímulos físicos perigosos ou desagradáveis para o indivíduo são considerados estímulos aversivos. Este tipo de estímulo induz uma resposta defensiva imediata que dependendo do impacto gerado no indivíduo pode levar a aprendizagem. O aprendizado fica estabelecido quando após o animal passar por um evento aversivo, a exposição a estímulos associados a essa situação desagradável são capazes de evocar a resposta adquirida (Wiedenmayer, 2009).

Existem diferentes formas de aprendizagem, mediante experiências individuais, aprendizagem social (por observação do comportamento dos pares normalmente), não associativo (habituação e sensibilização) e associativo, entre outros. Dos tipos de aprendizagem anteriormente citados, a aprendizagem associativa possui uma grande relevância na história da pesquisa das RD e os circuitos neurais envolvidos nelas.

## 1.3. Condicionamento aversivo olfatório

Durante a aprendizagem associativa diferentes tipos de respostas defensivas podem ser apresentadas por um indivíduo dependendo do tipo de ameaça a qual é exposto, presente *versus* potencial. Essas respostas podem ser exibidas pela exposição a um predador natural, a estímulos associados a esse ou quando exposto

a um estímulo previamente neutro que adquire propriedades aversivas após ser devidamente pareado a um estímulo aversivo (Blanchard e Blanchard, 1989; Kim e Jung, 2006).

Neste contexto, o condicionamento aversivo Pavloviano é um dos paradigmas comportamental melhor estabelecido e mais utilizado para o estudo da aprendizagem e da memória. Neste paradigma, um estímulo emocionalmente neutro (EN, estímulo visual, auditivo ou olfatório) adquire características aversivas quando é pareado com um estímulo incondicionado aversivo (EI, por exemplo: choque elétrico ou estimulação de estruturas neurais). Como resultado, respostas defensivas podem ser eliciadas quando o estímulo condicionado (EC, luz, som ou odor) é apresentado separadamente no futuro (Pavlov, 1927; Fanselow e Ponnusamy, 2008; Kincheski e col., 2012).

Em relação aos estímulos olfatórios, diferente dos humanos, a principal entrada sensorial mediante a qual os roedores captam informação do ambiente é pelo olfato. Durante o desenvolvimento dos roedores, ocorre inicialmente a maturação dos sentidos olfatório e tátil, em seguida o sistema auditivo e finalmente o sistema visual. Da mesma forma, as respostas condicionadas são apresentadas de forma mais pronunciada frente a estímulos olfatórios, seguido de estímulos auditivos e por fim estímulos visuais (Richardson e col., 2000).

Pistas olfatórias derivadas de secreções corporais como urina e fezes de espécies predadoras (Isogai e col., 2011), odores de coespecíficos estressados (Brechtbühl e col. 2008), moléculas como amina  $\beta$  fenetilamina (PEA) derivada da urina de predadores (Ferrero e col., 2011), 2,4,5-trimetiltiazolína (TMT) derivado das fezes de raposa (Rosen e col., 2015), induzem RD inatas naturalmente. Por outro lado, odores inicialmente neutros também podem adquirir propriedades aversivas após ser associados com um estímulo incondicionado em um paradigma de condicionamento aversivo olfatório (CAO), sendo capazes de evocar respostas defensivas quando os indivíduos são expostos novamente a pista olfatória condicionada (Silva e col., 2016).

O sistema olfatório consta de vários subsistemas envolvidos no processamento das pistas olfatórias que indicam perigo, o sistema olfatório principal (SOP), o sistema olfatório acessório (SOA) e o gânglio de Grueneberg (GG) (Takahashi, 2014). O SOP reconhece substâncias químicas voláteis que transmitem informações sobre a localização de presas e predadores, assim como de alimentos

(Firestein, 2001). O SOA além de ser capaz de detectar kairomonas (Papes e col., 2010; Ben-Shaul e col., 2010) apresenta uma função mais especializada para detectar sinais de fase fluida, não voláteis, que vem de outros indivíduos como feromônas (Dulac e Torello 2003; Breer e col., 2006). O GG é uma pequena estrutura na ponta do nariz, capaz de detectar tanto odores intraespecíficos quanto interespecíficos, transmitindo principalmente sinais de coespecíficos estressados (Brechtbühl e col., 2008, 2013).

Tanto o SOP quanto o SOA recebem informação olfatória e enviam projeções para núcleos da amígdala que convergem numa via comum que se comunica com o circuito hipotalâmico de resposta ao predador, o qual processa as informações recebidas e integra os estímulos olfatórios e não olfatórios, organizando assim as respostas defensivas e recrutando estruturas para sua execução (Canteras, 2002; Motta e col., 2009, Takahashi, 2014).

Como citado acima, informações olfatórias são pareadas com estímulos incondicionados (EI) durante o CAO. Os modelos de condicionamento aversivo clássicos geralmente empregavam o choque elétrico nas patas de roedores como EI (Rosen e col., 1998; Kroon e Carobrez, 2009; Burman e col., 2014), no entanto, atualmente estímulos cada vez mais específicos vêm sendo utilizados conforme o objetivo da pesquisa.

Estímulos incondicionados como cloreto de lítio (Bernal-Gamboa e col., 2011), pentilenotetrazol (Cavalli e col., 2009; Galvão e col., 2010), som desagradável (Leaton e Cranney, 1990; Neumann e col., 2008), exposição ao predador vivo (Dielenberg e McGregor, 2001, Yang e col., 2004, Carvalho-Netto e col., 2009), odor de predador (Hubbard e col., 2004; Do Monte e col., 2008), estimulação química de estruturas neurais (Pavesi e col., 2011; Kincheski e col., 2012, Back e Carobrez, 2018) e estimulação optogenética (Johansen e col., 2010, Assareh e col., 2016) são capazes de induzir RD e dar suporte a aquisição durante experimentos utilizando paradigmas de condicionamento aversivo.

O CAO, paradigma comportamental escolhido para o desenvolvimento desta pesquisa, permite obter informações que nos permitem estudar discriminadamente as fases de aquisição, consolidação, evocação e extinção da memória (Slotnick, 2001), fornecendo a possibilidade de avaliar aspectos neurobiológicos destas etapas e os circuitos neurais subjacentes (Garakani e col., 2006; McGaugh, 2000; Nader e col., 2000; Kroon, 2012; Kincheski e col., 2012).

#### 1.4. Neurobiologia do comportamento defensivo

Estudos pioneiros estabeleceram que estruturas clássicas como amígdala, hipotálamo e mesencéfalo são capazes de evocar, modular e organizar os comportamentos defensivos. Com a amígdala, responsável pela análise e a integração de diferentes informações sensoriais, o hipotálamo atuando na integração das informações de diferentes áreas cerebrais, e a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) agindo como uma via final de defesa coordenando as RD frente à ameaça (Blanchard e Blanchard, 1988). Graeff (1994) propôs que diferentes estratégias comportamentais de defesa se correlacionam com sistemas neuronais próprios e interconectados, assim, o hipotálamo medial, a amígdala e a MCP constituiriam o “sistema cerebral aversivo” responsável pela integração e elaboração das RD.

A amígdala é uma das estruturas neurais mais importantes que participa no condicionamento aversivo, enviando densas projeções para a região dorsomedial do núcleo ventromedial hipotalâmico (VMHdm) (Canteras e col., 1995). O VMHdm junto com o núcleo hipotalâmico anterior (NHA) e o núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) constituem o “circuito hipotalâmico de resposta ao predador” (Canteras e col., 1997; Cezario e col., 2008; Staples e col., 2008; Canteras e col., 2008; Do Monte e col., 2008; Pavesi e col., 2011, Gross e Canteras, 2012). Além disso, o VMHdm envia projeções para o NHA e a MCP dorsal, enquanto o NHA por sua parte se comunica com o PMd, o qual também envia projeções para a MCPd. Sendo assim, a MCPd parece ser um dos objetivos principais a ser recrutado para coordenação e execução de respostas defensivas por parte do circuito de resposta ao predador (Canteras, 2002; Canteras e col., 2015).

Além de coordenar a expressão de RD evidentes como luta e fuga (Graeff e col., 1988), a MCP participa da modulação de comportamentos mais sutis como avaliação de risco, esquiva, dinâmica do processo de associação durante a aquisição de um condicionamento aversivo e a expressão de respostas defensivas aprendidas (Teixeira e Carobrez, 1999; Kincheski e col., 2012).

Vários estudos tem demonstrado a participação da MCPd em processos cognitivos. Em 1987, Di Scala e colaboradores, relataram que a estimulação elétrica da MCP era capaz de promover o aprendizado em paradigmas de tipo pavloviano quando eram pareados com estímulos neutros como luz e som, demonstrando assim que a estimulação desta estrutura dava suporte como EI neste tipo de

paradigma. Além disso, a estimulação química de receptores glutamatérgicos NMDA mediante a administração do agonista N-metil-D-aspartato (NMDA) também foi capaz de induzir aquisição quando utilizado como EI no paradigma do CAO, reforçando o envolvimento da MCPd não apenas nas RD imediatas, mas também nos processos de aprendizagem e memória (Kincheski e col., 2012; Back e Carobrez, 2018).

### **1.5. Características neuronatômicas e funcionais da MCP**

A MCPd, é uma estrutura mesencefálica que se encontra em torno ao aqueduto cerebral, estendendo-se rostro-caudalmente desde uma região próxima a comissura posterior até o nível do locus coeruleus (Paxinos e Mai, 2004). Baseados nas suas características neuroanatômicas, vários estudos tem dividido a MCP ao longo do seu eixo em quatro colunas longitudinais, a coluna dorsomedial (MCPdm), dorsolateral (MCPdl), lateral (MCPI) e ventrolateral (MCPvl) como detalhado na Figura 1 (Carrive, 1993; Bandler e col., 2000). Deve destacar-se que os neurônios das diferentes colunas se comunicam entre si, gerando um complexo circuito de neuromodulação intrínseca ao longo da MCP (Jansen e col., 1998).

A MCP recebe projeções corticais originadas principalmente do córtex prefrontal, insular e amígdala (Mantyh, 1982; Rizvi e col., 1991). A porção dorsolateral, MCPdl, recebe projeções do córtex préfrontal e do núcleo basolateral da amígdala (BLA), enquanto a MCPdm recebe projeções de outro núcleo da amígdala, o núcleo central (CeA). A MCPI recebe projeções do córtex dorsomedial e cingulado, e do CeA. Por fim, o córtex orbital e o CeA se projetam para a MCPvl (An e col., 1998, Linnman e col, 2012).

Devido a suas conectividades, a MCP se encontra relacionada a diversos sistemas funcionais, como sistema límbico, sensorial, motor e autonômico (Beitz, 1982). Participa da modulação e expressão de comportamentos sexuais e maternos (Sakuma e Paff, 1979; Lonstein e Stern, 1997, 1998), modulação da dor (Besson e col., 1991; Coimbra e Brandão, 1997), mudanças autonômicas (Carobrez e col., 1983; Bandler e Carrive, 1991), comportamentos defensivos relacionados a eventos aversivos (Fanselow, 1991; Carrive, 1993; Canteras e Goto, 1999), vocalização (Jurgens, 1994; Gruber-Dujardin, 2010), entre outros.

Em relação às RD, a ativação da MCPd foi evidenciada pelo aumento da expressão da proteína Fos nesta região frente a estímulos incondicionados como

choque nas patas (Babai e col., 2001), exposição ao predador (Canteras e Goto, 1999) ou odor de predador (Dielenberg e McGregor, 2001). Dependendo da coluna estimulada, a MCP pode apresentar diferentes perfis funcionais. Enquanto a estimulação da MCP dorsolateral e lateral evoca estratégias de enfrentamento ativas, como comportamentos de luta/fuga, hipertensão e taquicardia, a estimulação ventrolateral evoca comportamentos passivos, como hiporeatividade, hipotensão e bradicardia (Behbehani, 1995; Bandler e col., 2000). Além disso, diversos estímulos aversivos podem ativar áreas diferentes, sendo que predadores, agressores coespecíficos ou estímulos dolorosos são processados por distintas colunas da MCP (Gross e Canteras, 2012). Ameaças predatórias estimulam a coluna dorsolateral, enquanto pistas de agressores coespecíficos se dirigem a MCPdm e estímulos dolorosos a MCPvl (Gross e Canteras, 2012; Motta e col., 2016).

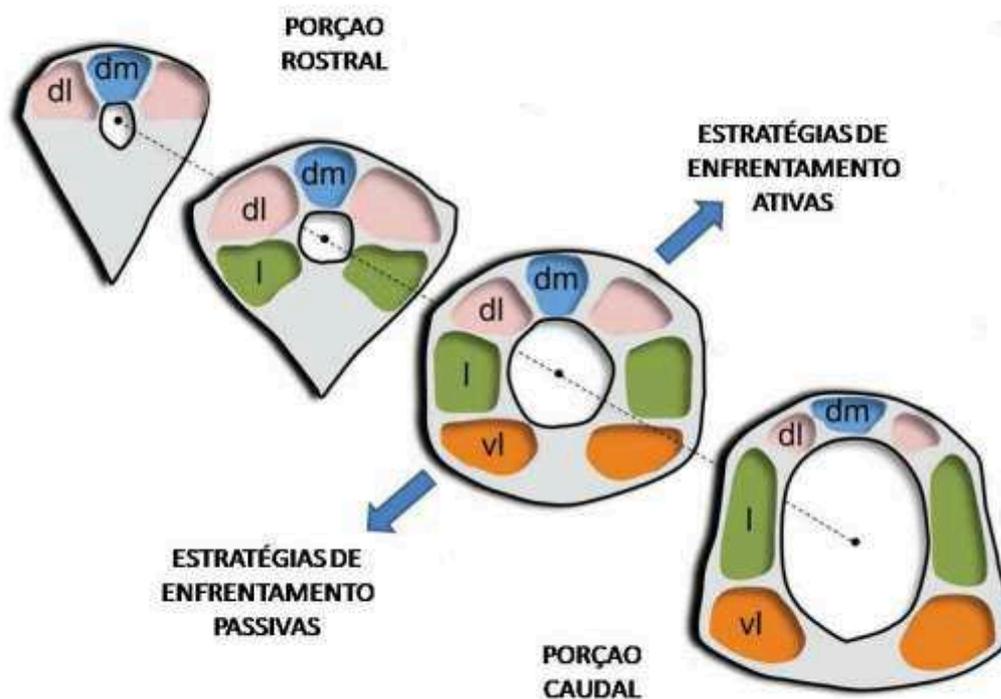


Figura 1. Representação esquemática da divisão anatômica e funcional da matéria cinzenta periaqueductal. Estão detalhadas as quatro colunas que rodeiam o aqueduto central, dm: dorsomedial, dl: dorsolateral, l: lateral e vl: ventrolateral. Imagem modificada de Bandler e col (2000) e Linnman e col. (2012).

Vários autores sugeriram que a influência da MCPd no aprendizado aversivo e na expressão de respostas condicionadas se deve a suas projeções ascendentes para estruturas envolvidas com o processamento e a formação de memórias

aversivas. A MCP envia densas projeções para as regiões hipotalâmicas, NHA e a região perifornical da área hipotalâmica lateral (LHASf) (Kincheski e col., 2012) e ambas estruturas se projetam fortemente para o PMd (Goto e col., 2005; Risold e col., 1994). Dados da literatura indicam que a modulação do processamento da memória pelo PMd envolveria as suas projeções a o núcleo reuniens (RE) e a parte ventral do núcleo anteromedial (AMv) (Canteras e Swanson, 1992; Risold e Swanson, 1997), duas estruturas talâmicas que se projetam para o circuito cortico-hipocampal-amigdalal relacionado ao aprendizado do medo.

## **1.6. Neurotransmissão: papel do sistema glutamatérgico e do óxido nítrico na MCP**

A estimulação da MCP mediante diversas técnicas, elétrica (Carobrez e col., 1983; Fanselow, 1991, Sandner e col., 1992), química (Krieger e Graeff, 1985; Kincheski e col., 2012; Back e Carobrez, 2018); ou por optogenética (Deng e col., 2016; Assareh e col., 2016) tem sido amplamente utilizada na pesquisa das RD e os processos mnemônicos relacionados a eventos aversivos. A modulação destes processos é realizada por diversos sistemas de neurotransmissão como glutamatérgico, serotoninérgico, GABAérgico, endocanabinoide, vanilóide, nitrérgico (Schenberg e Graeff, 1978; Fogaça e col, 2012; Graeff e col, 2015; Back e Carobrez, 2018), dos quais damos destaque aqui a modulação observada pela interação entre os sistemas glutamatérgico e nitrérgico.

### **1.6.1. Sistema glutamatérgico**

O sistema glutamatérgico e seus componentes, o glutamato (principal neurotransmissor excitatório), seus receptores, transportadores e enzimas de síntese e degradação (Collingridge e Lester, 1989), são essenciais para os processos de aprendizagem, memórias e eventos de plasticidade sináptica subjacentes. O glutamato (GLU) é armazenado em vesículas, as quais quando a membrana pré-sináptica é despolarizada liberam seu conteúdo para a fenda sináptica onde o GLU atinge e ativa seus receptores alvo. Uma parte deste GLU liberado é recaptado pelos transportadores de aminoácidos excitatorio, EAAT1 e EAAT2, e levado para neurônios e astrócitos, onde é re-armazenado em vesículas ou convertido em glutamina, pela glutamina sintetase, respectivamente (Collingridge e Lester, 1989; Traynelis e Wollmuth, 2010).

Os receptores glutamatérgicos, são classificados em base a sua estrutura e função em ionotrópicos e metabotrópicos (Figura 2). Os receptores ionotrópicos, ligados a canal iônico, permitem a passagem de cátions e subdividem-se em NMDA, AMPA e CAINATO, conforme sua afinidade por agonistas sintéticos (Traynelis e Wollmuth, 2010). Os receptores metabotrópicos, acoplados a proteínas G (Gi/G0/Gq), ativam cascatas de sinalização intracelular e se dividem em três grupos de acordo com a proteína G acoplada. Grupo I, Glum1 e Glum5, ligados às proteínas Gas e/ou Gαq/11 (estimulatória), grupo II, Glum 2 e Glum3, ligados à proteína Gαi/0 (inibitória) e grupo III, Glum4, 6, 7 e 8, ligados à proteínas Gαi/0 (inibitória) (Gladding e col., 2009; Alexander e col., 2015).

Os receptores NMDA são cruciais nos processos de aprendizado e memória e encontram-se distribuídos em grande densidade na MCPd, em sua maioria na pós-sinapse (Albin e col., 1990). Estes receptores são heterotetrâmeros, constituídos por duas subunidades GluN1 fundamentais onde se encontra o sítio de ligação para glicina – co-agonista – (Laurie e Seeburg, 1994; Paupard e col., 1997), e duas subunidades regulatórias onde está localizado o sítio para o glutamato, as quais podem ser a subunidade GluN2, para qual existem quatro variantes GluN2A-D, e a subunidade GluN3 que apresenta duas variantes GluN3A-B (Goebel e Poesch, 1999; Paoletti e col., 2013). A composição das subunidades regulatórias define as propriedades cinéticas e farmacológicas dos NMDARs. Nas áreas neurais envolvidas com funções cognitivas como hipocampo e córtex pré-frontal predominam as subunidades GluN2A e GluN2B (Paoletti e col., 2013; Sanz-Clemente e col., 2013; Baez e col., 2018).

Além dos sítios de ligação para glicina e glutamato, os NMDARs, possuem sítios de ligação regulatórios para magnésio, zinco e poliaminas (Traynelis e Wollmuth, 2010). Quando o neurônio encontra-se em repouso o poro do NMDARs está ocupado por um íon  $Mg^{2+}$ , o qual é deslocado do seu lugar quando ocorre a despolarização prévia da membrana permitindo a ligação do GLU ou seu agonista sintético na subunidade GluN2, levando assim ao influxo de cátions através da membrana plasmática. Os NMDARs possuem maior permeabilidade para  $Ca^{2+}$  do que ao  $Na^+$  e  $K^+$  (Van Dogen, 2009; Traynelis e Wollmuth, 2010). O  $Ca^{2+}$  ingressa na célula e interage com proteínas quinases, fosfatases e complexos protéicos que levam a ativação de cascatas moleculares que promovem mudanças sinápticas responsáveis por diversas respostas como as RD imediatas, aprendizagem aversiva

e formação de memórias, que são de nosso interesse, entre outras incontáveis respostas celulares desencadeadas.

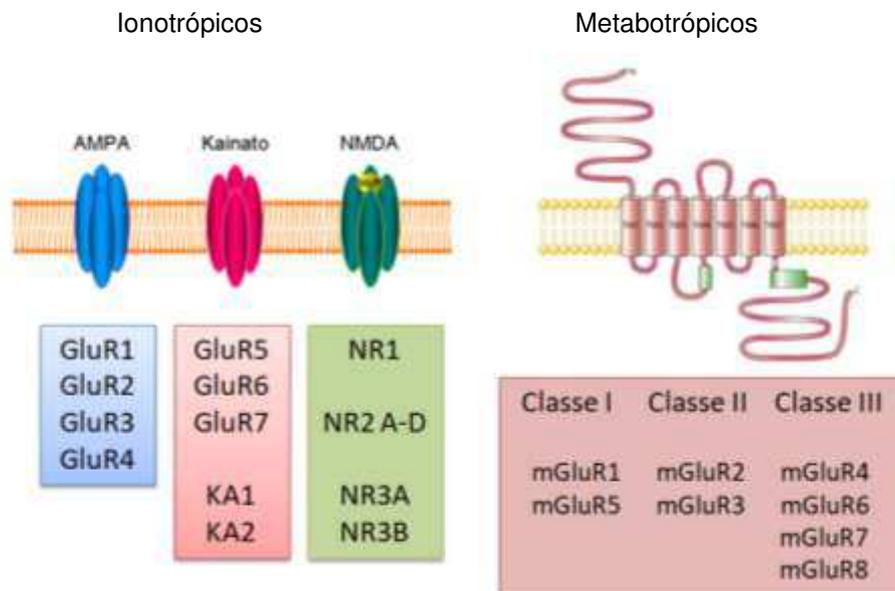


Figura 2. Receptores Glutamatérgicos Ionotrópicos AMPA, KAINATO e NMDA. Metabotrópicos Classe I, II e III, e as composições de subunidades. Adaptado de Flores Soto e col. (2012).

Os receptores AMPA/Kainato, heterotetrameros, constituídos pelas subunidades GluA1, GluA2, GluA3 e GluA4, são mais permeáveis ao  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  do que ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Traynelis e Wollmuth, 2010; Henley e Wilkinson, 2016). Devido a sua alta afinidade pelo glutamato, os AMPAR são capazes de mediar a neurotransmissão glutamatérgica necessária para a despolarização de membrana que os NMDARs precisam para o deslocamento do  $\text{Mg}^{2+}$  do poro, no momento em que o glutamato e a glicina ligam-se no receptor. Dada a complexidade de ativação dos NMDARs, estes são considerados detectores de coincidência molecular pré e pós-sinápticas (Seeburg e col., 1995; Van Dogen, 2009; Traynelis e Wollmuth, 2010, Báez e col., 2018).

### 1.6.2. Óxido Nítrico e vias de sinalização

O óxido nítrico (NO do inglês “*Nitric Oxide*”), inicialmente descrito como “fator de relaxamento derivado do endotélio” devido a suas funções de sinalização observadas no sistema cardiovascular, é uma molécula ubíqua, pouco convencional, e multifuncional, que além de possuir uma importância fundamental para o sistema cardiovascular, atua como mensageiro no sistema nervoso e apresenta importantes funções no sistema imunológico.

O NO é um radical livre de baixo peso molecular ( $30 \text{ g mol}^{-1}$ ), coeficiente de difusão aquoso ( $3,3 \mu\text{m}^2 \text{ ms}^{-1}$ ), taxa de difusão aquosa (cerca de  $2,5 \mu\text{m}$  em  $1 \text{ ms}$ ) e tempo de meia vida de  $5 - 30$  segundos (Lancaster, 1997; Garthwaite, 2016). Duas características importantes diferenciam o NO de outros neurotransmissores. Devido ao fato de não ser armazenado em vesículas sinápticas e a sua alta solubilidade lipídica, o NO consegue atravessar as membranas celulares rapidamente ( $3 \text{ nm}$  em cerca de  $3 \text{ ns}$ ), e difundir-se para células vizinhas (Ignarro, e col., 1987; Palmer e col., 1987; Moller e col., 2005), além disso, ele não se liga em um receptor de membrana clássico.

As enzimas responsáveis pela síntese bioquímica do NO são conhecidas como enzimas óxido nítrico sintase (NOS do inglês "*Nitric Oxide Synthase*"), as quais são complexas proteínas que se apresentam em três isoformas nos vertebrados. Existem duas isoformas constitutivas, a isoforma endotelial (eNOS ou NOS 3) e a isoforma neuronal (nNOS ou NOS 1), as quais são cálcio dependentes. A terceira isoforma, a induzível (iNOS ou NOS 2), é ativada na presença de estímulos imunológicos, nas quais citocinas pró-inflamatórias estimulam a produção de NO (Bredt e Snyder, 1990; Bredt, 1999; Kerwin e Heller, 1994; Hemmens e Mayer, 1998; Stuehr, 1997; Stuehr e col., 2001).

A primeira NOS purificada e clonada a partir do cerebelo de ratos foi a nNOS (NOS neuronal, Brenman e col., 1996; Steinert e col., 2010). Os monómeros de nNOS apresentam uma estrutura com dois domínios, um domínio oxigenase (N-terminal) e um domínio redutase (C-terminal), podendo estar separados pelo sítio de ligação da calmodulina (CaM) como pode observar-se na Figura 3. O sítio de ligação para L-Arginina encontra-se no domínio oxigenase que possui também os sítios de ligação para tetrahydrobiopterina (BH4), um sítio ativo heme tipo citocromo P-450, e um sítio de ligação para  $\text{Zn}^+$  que facilita a dimerização da nNOS. Outro cofator necessário para produção de NO é a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) que se liga no domínio redutase onde se encontram os sítios de ligação para duas flavinas, a mononucleotídeo de flavina (FMN) e a dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD). A ligação do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  facilita a transferência de elétrons doados pelo NADPH no domínio redutase para o domínio oxigenase via FAD, FMN e heme, respectivamente (Sagami e col, 2001; Noguchi e col, 2001; Hemmens e col, 2000; Roman e Master, 2006; Zhou e Zhu, 2009).

A ativação da nNOS depende de sua ligação ao complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . No SNC o estímulo pós-sináptico mais importante para produção de NO é a ativação do principal receptor para glutamato, o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), e em menor medida a ativação do receptor AMPA (Garthwaite e col., 1988, Steinert e col., 2010).

A nNOS encontra-se associada à subunidade NR2B do receptor NMDA mediante a ligação com a proteína de densidade pós-sináptica 95 (PSD-95) no seu domínio PDZ (NMDAR-PSD-95-nNOS), o que deixa a enzima à 18 nm da membrana celular, próxima ao receptor NMDA (Brenman e col., 1996; Valtchanoff e Weinberg, 2001). Essa disposição facilita a união do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  – nNOS, o que leva a dimerização da enzima aumentando a afinidade da L-Arginina pela BH4, permitindo a oxidação da L-Arginina e assim gerando como produto final o NO e a citrulina (Garthwaite e col., 1988; Garthwaite e col., 1989; Salerno, 2008; Zhou e Zhu, 2009).

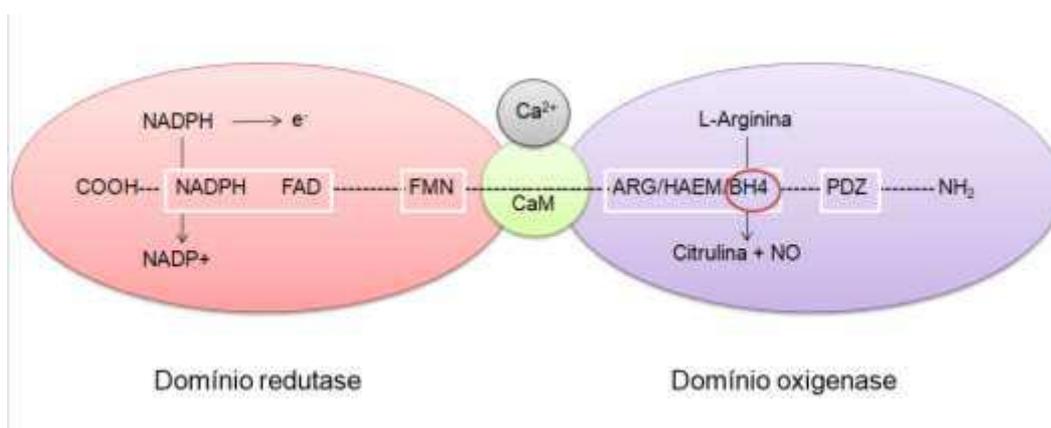


Figura 3. Estrutura da nNOS e via metabólica de formação do NO. A ligação do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  facilita a transferência de elétrons doados pelo NADPH no domínio redutase para o domínio oxigenase, leva a dimerização da enzima nNOS aumentando a afinidade de L-Arginina pela BH4, permitindo a oxidação da L-Arginina, gerando como produto final citrulina e NO. Adaptado de Zhou e Zhu (2009)

Existem várias vias de transdução do sinal do NO, porém, a mais estudada e melhor compreendida até o momento é a via NO-GCs-GMPc na qual a responsável pela transdução do sinal do NO é uma hemo-proteína heterodimérica, conhecida como guanilato ciclase solúvel (GCs), que se encontra ligada a enzimas e associada indiretamente às membranas (WP e col., 1977; Talavera-Cuevas e col., 2003; Zhao e col., 1999).

A ativação da cascata de sinalização NO-GCs-GMPc resulta na produção de GMPc que media os efeitos do NO no organismo, como por exemplo, canais iônicos dependentes de nucleotídeos cíclicos (CNG) (Kaupp e Seifert, 2002; Craven e

Zagotta, 2006), proteínas quinases ativadas por GMPc (PKG) e fosfodiesterases reguladas por GMPc (PDE) (Bender e Beavo, 2006; Garthwaite, 2008).

Uma das funções mais importantes do GMPc é a ativação da proteína quinase G (PKG), uma quinase específica serina/treonina que está amplamente distribuída pelo SNC (Steinert e col., 2010), encontrando-se no cerebelo, nos gânglios da raiz dorsal, bulbo olfatório, hipocampo, tálamo, entre outros, e modula muitos processos fisiológicos importantes. Por outro lado, as PDE podem metabolizar o próprio GMPc finalizando a sinalização NO-GCs (Feil e col., 2005; Vaandrager e col., 2005; Hofmann e col., 2006; Garthwaite, 2008).

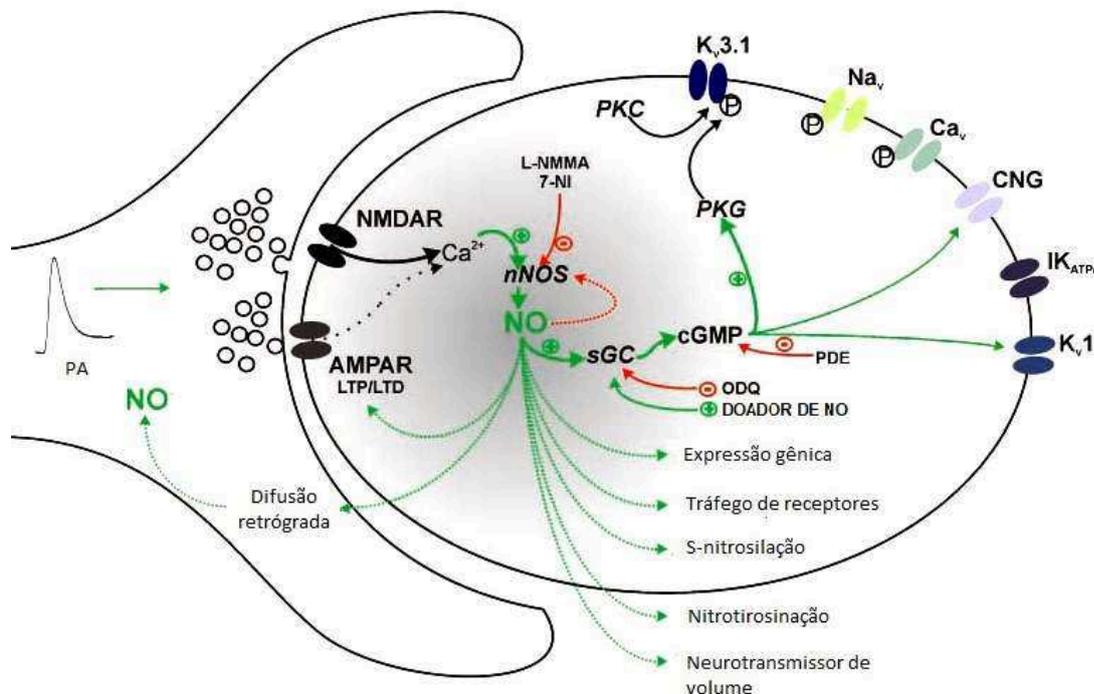


Figura 4. Neurotransmissão nitrérgica. A ativação dos receptores NMDA e em menor medida de receptores AMPA, leva a um influxo de  $Ca^{2+}$  que estimula a nNOS a síntese de NO, o qual leva a ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) e consequente produção de GMPc e ativação de diversas cascatas bioquímicas. Na pós-sinapse participa de processos como expressão gênica, tráfego de receptores, S-nitrosilação, nitrotirosinação, processos de plasticidade sináptica como LTP/LTD, e por difusão pode agir como neurotransmissor de volume. Pode difundir-se de forma retrógrada para agir na pré-sinapse. Pontos cruciais para interferência desta neurotransmissão são: inibição da nNOS (L-NMMA, 7-NI), inibição da GCs (ODQ), metabolização de GMPc (PDE) ou administração de doadores de NO. Imagem modificada de Steinert e col. (2010).

Outras vias de sinalização relevantes nas quais participa o NO são a S-nitrosilação de grupos tiol (Stamler e col., 2001; Selvakumar e col., 2009), a nitrotirosinação, uma reação da tirosina com peroxinitrito para formar 3 resíduos de nitrotirosina (ONOO-) (Steinert e col., 2010). Além disso, o NO pode influenciar no tráfego de receptores pós-sinápticos (Serulle e col., 2008), na liberação de outros

neurotransmissores, na expressão gênica (Contestabile, 2008), difundir-se e agir como neurotransmissor de volume ou como mensageiro retrógrado (Steinert e col., 2008, 2010).

O NO pode modular os receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluR) mediante duas vias, uma direta, independente de GMPc, e uma indireta dependente de GMPc (Ahern e col., 2002; Wang e col., 2012). A via direta envolve a S-nitrosilação de proteínas que levam a modificações na estrutura e função terciária de iGluR (Sen e Snyder, 2010) enquanto a via indireta está mediada pela estimulação de GMPc e consequente ativação das cascatas bioquímicas dependentes deste mensageiro (Bredt e Snyder, 1989).

Portanto, o NO participa ativamente de uma ampla variedade de processos neurobiológicos como neurogênese (Romero-Grimaldi e col., 2008; Islam e col., 2003), plasticidade sináptica (Böhme e col., 1993; Bon e Garthwaite, 2003), isquemia e citotoxicidade (Sun e col., 2005), neurodegeneração (Moncada e Bolaños, 2006; Zhou e Zhu, 2009), depressão, ansiedade (Zhou e col., 2007; Hua e col., 2008), dor, comportamento alimentar, sono, atividade reprodutiva (Garthwaite, 2008) aprendizagem e memória, respostas defensivas (Guimarães e col., 2005).

### **1.7. NO e comportamentos de defesa**

Estudos utilizando técnicas de histoquímica para NADPH e imunohistoquímica para c-Fos demonstraram a presença de células nNOS positivas em numerosas regiões envolvidas com respostas de defesa, sendo elas: a amígdala medial e lateral, o hipocampo dorsal, o núcleo paraventricular, PMd e NHA, o núcleo bed da estria terminalis, o córtex pré-frontal medial e ventromedial, e a MCP (Vincent e Kimura, 1992; Garthwaite, 1991; De Oliveira e col., 2000b; Guimarães e col., 2005; Schafe e col., 2005; Beijamini e Guimaraes, 2006, Pavesi e col., 2012; Shioda e col., 2012; Campos e col., 2013b; Vila-Verde e col., 2016).

Na MCP, foi observada uma correlação entre a distribuição das células nNOS positivas com a funcionalidade das colunas longitudinais (dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventral) nos comportamentos defensivos. Estando a maior parte das células imunoreativas (IR) concentrada na coluna dorsolateral. Movimentando-se em direção caudal ao longo do eixo rostro-caudal da MCP, esta população de células aumenta em número e vai mudando sua distribuição medial e ventralmente. Já nos

níveis caudais a área da coluna dorsolateral ocupada por NOS-IR foi notavelmente reduzida (Onstott e col., 1993).

A participação do NO nas RD imediatas eliciadas pela MCP na presença de um estímulo aversivo vem sendo estudada há mais de 20 anos sob diversos paradigmas como exposição ao predador (Beijamini e Guimarães, 2006), condicionamento de medo contextual (Kelley e col., 2010, 2011), condicionamento aversivo visual, auditivo (Schafe e col., 2005) e estimulação química de estruturas do circuito neural defensivo (De Oliveira e col., 2001; Overeem e col., 2010, Pavesi e col., 2013).

A exposição ao predador ativa a nNOS na MCPd, e vários experimentos demonstraram a modulação das respostas defensivas inatas pelo NO (Chiavegatto e col., 1998; Beijamini e Guimaraes, 2006). O bloqueio dos receptores NMDA mediante a administração de antagonistas atenua as respostas defensivas inatas produzidas pela presença do gato, indicando a participação do sistema glutamatérgico neste tipo de resposta. Além disso, inibidores seletivos da nNOS também foram capazes de atenuar as respostas induzidas pelo estímulo do predador (Aguilar e Guimarães, 2009; Carvalho-Netto e col., 2009).

Por outro lado, a micro-injeção de aminoácidos excitatórios direto na MCPd induz respostas de fuga e ativa a nNOS produzindo um aumento na síntese de NO. Doadores de NO, como SIN-1 (De Oliveira e col., 2000a; Moreira e col., 2004), complexo óxido nítrico/dietilamina (DEA/NO) (De Oliveira e col., 1999) e 6-(2-Hidroxi-1-metil-2-nitro-hidrazino)-N-metil-1-hexanamina (NOC-9) intra-MCPdI geraram reações de fuga (Braga e col., 2009). A administração prévia de antagonistas dos receptores glutamatérgicos NMDA, AMPA/Kainato é capaz de reverter essas respostas defensivas, demonstrando o envolvimento da via NMDA-NO na modulação da MCPd (Moreira e col., 2004).

Não podemos deixar de destacar que o sistema olfatório de roedores, altamente desenvolvido, possui um grande número de células positivas para nNOS, e as vias de sinalização do NO podem processar as informações resultantes de pistas olfatórias. Células nNOS positivas foram observadas no córtex piriforme e na camada glomerular do bulbo olfatório, duas áreas necessárias para o aprendizado olfatório (McNamara e col., 2008; Pavesi e col., 2013). A associação entre o NO e memórias olfatórias foi inicialmente descrita em estudos sobre reconhecimento maternal em ovelhas (Kendrick e col., 1997) e social em roedores (Böhme e col.,

1993). Camundongos *knock-out* para nNOS submetidos a um paradigma de condicionamento aversivo olfatório utilizando choque nas patas também demonstraram déficit na retenção de uma memória olfatória e generalização do odor (Pavesi e col., 2013).

### **1.8. NO, aprendizagem e memória**

O repertório comportamental observado nos animais deriva da atividade coordenada de circuitos neurais. Modificações comportamentais observadas após determinadas experiências são o resultado de processos de aprendizagem sustentados por mudanças na eficácia da transmissão química sináptica (Kandel, 2001; Sweatt, 2016).

Diversos estudos demonstraram que o NO pode afetar desde os comportamentos observados durante a fase de aprendizagem até as diferentes fases da memória como memória a curto, médio e longo prazo, evocação e reconsolidação (Susswein e col., 2004). Porém, a participação da neurotransmissão nitrérgica nestes processos é controversa e parece ser dependente muitas vezes da espécie estudada, da fase de desenvolvimento na qual se encontra e o paradigma empregado para o estudo do fenômeno (Son e col., 1998; Blackshaw e col., 2003).

Os processos de plasticidade sináptica associativa ou Hebbiana (Hebb, 1949) envolvidos na aquisição de um aprendizado e a formação de memórias melhor estudados são a potencialização de longa duração – LTP do inglês *long-term potentiation* – (Lomo, 1966; Bliss e Gardner-Medwin, 1973; Morris e col., 1983), e a depressão de longa duração – LTD do inglês *long-term depression* (Linden, 1996; Mauk e col., 1998).

A plasticidade sináptica em estruturas como cerebelo, hipocampo, córtex e amígdala envolvem mudanças tanto pré quanto pós-sinápticas (Schafe e col., 2005). O glutamato é um dos principais neurotransmissores envolvidos nestes processos, a ativação de receptores NMDA pós-sinápticos leva a um incremento nos níveis de  $Ca^{2+}$  e consequente ativação das cinases  $Ca^{2+}$ /Calmodulina cinase II (CAMKII), proteína quinase C (PKC) e tirosina cinase Fyn, as quais induzem o processo de LTP. A CAMKII e a PKC fosforilam os receptores AMPA aumentando sua sensibilidade para glutamato, contribuindo desta forma para a manutenção pós-sináptica da LTP (Matynia e col., 2002). Por outro lado, um mensageiro retrógrado precisa transmitir a informação do início da LTP no sítio pós-sináptico para a pré-

sinapse, e o NO parece ser um bom candidato para este trabalho (Schuman e Madison, 1991).

O NO pode modular a LTP mediante várias vias, o principal alvo do NO é a enzima GCs, a ativação desta leva a um incremento nos níveis de GMPc (Bredt e Snyder 1989), o qual ativa a proteína cinase dependente de GMPc (PKG) que modula outros mensageiros secundários (Garthwaite, 2008). A administração de inibidores da PKG bloqueia a LTP, enquanto a ativação desta pode induzir LTP (Zhuo e col., 1994a; Son e col., 1998; Susswein e col., 2004) o que demonstra a participação de GMPc neste processo sináptico. A PKG parece modular este processo mediante a ativação de fosfodiesterases que degradam GMPc diminuindo sua concentração o que é necessário para que ocorra a LTP (Monfort e col., 2002; Susswein e col., 2004). Outra via pela qual o NO parece regular a LTP seria pelo bloqueio da ribosilação do ADP, o que bloqueia o processo de LTP (Schuman e col., 1994; Kleppisch e col., 1999). Além dos efeitos pré-sinápticos, o NO pode potencializar a LTP na pós-sinapse (Ko e Kelly, 1999) ou suprimir-la mediante a S-nitrosilação de proteínas (Murphy e Bliss, 1999). Além disso, o NO participa do tráfego de receptores AMPA necessário para processos de plasticidade sináptica (Huang e col., 2005; Rameau e col., 2007).

A participação do NO na LTD foi relatado tanto para o cerebelo (Lev-Ram e col., 1997) quanto para o hipocampo (Lev-Ram e col., 1997; Wu e col., 1998), onde pode agir na pós-sinapse ou como mensageiro retrógrado mediante os mecanismos antes mencionados.

Assim, a informação acima citada demonstra a importância do estudo do NO nos processos de aprendizagem e formação de memórias.

## **2. JUSTIFICATIVA**

---

A matéria cinzenta periaquedutal (MCP) envolvida na organização e instrução de respostas defensivas imediatas e aprendidas apresenta na sua coluna dorsolateral abundantes neurônios imunoreativos para a enzima oxido nítrico sintetase neuronal (nNOS). O conjunto de informações apresentadas até aqui mostra como o NO participa da modulação das RD imediatas coordenadas pela MCPd, assim como a complexa interação que se dá entre o sistema glutamatérgico e o nitrérgico durante o processamento da informação aversiva nesta estrutura. No entanto, apesar das investigações realizadas, o papel do sistema nitrérgico nos processos de aprendizagem e formação de memórias a partir da estimulação da MCPd ainda não foi estudado em profundidade.

## **3. HIPÓTESE**

---

O NO modula as estratégias comportamentais de defesa imediata coordenadas pela matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPd), no entanto a aprendizagem mediada por ela durante a aquisição de um condicionamento aversivo olfatório (CAO) ocorre de forma independente do sistema nitrérgico.

## **4. OBJETIVO GERAL**

---

Estudar as estratégias comportamentais adotadas durante o condicionamento aversivo olfatório como consequência da modulação química do sistema nitrérgico na matéria cinzenta periaquedutal dorsal correlacionando os resultados obtidos com a concentração de NO quantificada mediante fluorescência.

## **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

---

1. Avaliar os efeitos da interferência da inibição da enzima sintetizadora de NO, oxido nítrico sintase neuronal, sobre as RD imediatas e a aquisição de uma memória aversiva no CAO.

2. Analisar os efeitos da interferência da captura do NO na fenda sináptica sobre as RD imediatas e aquisição de uma memória aversiva no CAO.

3. Padronizar um protocolo para quantificar os níveis de NO *in vivo*, usando a sonda fluorescente DAF-FM DIACETATO.

4. Quantificar o nível de NO produzido pela estimulação química da MCPd mediante NMDA.

5. Quantificar o nível de NO após a inibição da nNOS quando utilizada a estimulação química da MCPdI mediante a administração de NMDA.

6. Avaliar se a estimulação química da MCPd mediada pela administração de um doador de NO é capaz de induzir aquisição do CAO.

7. Quantificar a liberação de NO induzida pelo doador de NO utilizado durante o CAO.

8. Avaliar os efeitos da interferência dada pela inibição da nNOS e a captura do NO na fenda sináptica sobre a expressão de uma memória aversiva.

9. Quantificar os níveis de NO produzidos durante a sessão de teste do CAO.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 6.1. Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho de investigação foram utilizados ratos machos heterogêneos da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem *Wistar*, pesando 260-360 g entre 3-4 meses de idade, provenientes do Biotério Central da UFSC, localizado no Campus Trindade, Florianópolis, SC. Após o desmame dos mesmos, foram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia da mesma universidade. Uma semana antes de atingir a idade apropriada para os processos cirúrgicos, foram transferidos para o biotério do Laboratório de Neurobiologia Comportamental, onde foram mantidos em gaiolas coletivas (3 a 4 animais por caixa de 41x34x16cm) e em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), com exaustor ativado, em ciclo de iluminação claro-escuro 12/12h (luzes acesas às 7h e desligadas às 19h), com acesso *ad libitum* à comida e água. A limpeza das caixas foi realizada mediante lavado e troca da serragem duas vezes na semana.

### 6.2. Considerações éticas

Este trabalho foi realizado utilizando procedimentos experimentais aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o número 4301200818. Foram respeitadas as recomendações éticas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e a lei AROUCA (No 11.794, de 8 de outubro de 2008), com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Todos os animais deste projeto foram submetidos ao procedimento de cálculo estatístico. Para definição do tamanho da amostra baseou-se no teste de estimativas aplicando à fórmula descrita abaixo:

$$n = \{[(z_\alpha + z_\beta) * s]/\delta\}^2$$

O cálculo baseia-se no intervalo de confiança da diferença entre as médias ou entre proporções ( $\delta$ ), do desvio-padrão ( $s$ ) do parâmetro alfa ( $\alpha$ ) que é a probabilidade aceitável de erro do Tipo I (falso positivo) e do parâmetro beta ( $\beta$ ), erro do Tipo II (falso negativo).

Assim sendo, seguem os seguintes pressupostos para o cálculo:

1. O valor de  $\alpha$  foi fixado em 0,05. Assim o valor de  $z_{\alpha}$  baseado na tabela de valores de z para distribuição bi-caudal é 1,96.
2. O valor de  $\beta$  foi fixado em 0,10. Assim o valor de  $z_{\beta}$  baseado na tabela de valores de z (distribuição unicaudal) é 1,28.
3. O valor da diferença entre as médias dos grupos como sendo pelo menos 40% (baseado em dados experimentais do nosso laboratório). Experimentos biológicos têm embutido um erro da ordem de 10-15% (resultantes de variações individuais), pois diferenças entre dois grupos que sejam menores que 20% do valor da média de cada grupo podem aumentar a probabilidade de cometer erros tipo I ou tipo II.
4. O valor do desvio padrão como sendo em média 35% do valor das médias. (baseado em dados experimentais do nosso laboratório):

$$n = \left\{ \frac{(1,96 + 1,28) * 35}{40} \right\}^2 = 8.0$$

Define-se o número de 8 animais por grupo em protocolos onde serão avaliados parâmetros comportamentais.

### 6.3. Cirurgia estereotáxica

Todos os animais deste projeto foram submetidos ao procedimento de cirurgia estereotáxica 10 dias antes do início dos experimentos para a implantação de cânulas-guia na MCPd para posterior intervenção farmacológica. Os animais foram anestesiados com uma combinação de cloridrato de cetamina (10%; Cetamin®; Syntec, Brasil) e cloridrato de xilazina (2%; Xilanzin®; Syntec, Brasil) via intraperitoneal (3:2; 1,0 ml/kg). Após a ausência total dos reflexos, os animais foram cuidadosamente posicionados no aparelho estereotáxico (Insight®, Ribeirão Preto, Brasil) onde foi administrada anestesia local acima da calota craniana (lidotesim 3%: cloridrato de lidocaína e norepinefrina 1:50.000; 0,1 ml, PROBEM, Alpino Catanduva/SP). Logo, foi realizada a tricotomia e então uma incisão longitudinal para a exposição da calota craniana, e visualização do Bregma e do Lambda, pontos de intersecção entre as suturas coronal e sagital e lambdóide e sagital, respectivamente. Após a remoção do escalpo e assepsia com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%), foram fixados dois parafusos de aço inoxidável no crânio, um deles foi colocado no osso frontal ipsilateral à cânula-guia e o outro no osso parietal, contralateral à cânula-guia.

A implantação da cânula-guia (13,0 mm) foi direcionada para a região da MCPd, de acordo com as coordenadas do atlas estereotáxico para ratos (Paxinos e Watson, 1998). As coordenadas empregadas para a canulação, partindo do bregma como referência foram: Ântero-posterior (AP): -5,8 mm; Médio-lateral (ML): -2,0 mm e Dorso-ventral (DV): -4,0 mm. Uma vez implantadas as cânulas-guia, a superfície craniana foi recoberta com uma camada de acrílico auto polimerizável (Jet®, Brasil), permitindo a formação de uma prótese sólida para isolamento da área. Ainda, para evitar possíveis obstruções, foram inseridos fios de aço inoxidável (mandril, n° 28, 0,30 mm) em cada cânula-guia. Imediatamente após a cirurgia, foi administrado, por via subcutânea (2,5mg/kg; 0,1 ml), uma solução antipirética, analgésica e anti-inflamatória de flunixinameglumina (Banamine®; Schering-Plough, Brasil) e uma solução antibiótica de Benzilpenicilina benzatina/procaína/potássica, diidroestreptomicina base (sulfato), estreptomicina base (sulfato) (Pentabiótico®, Zoetis, Brasil) por via intramuscular (24.000 UI). Logo após, os animais foram retirados do aparelho estereotáxico e colocados em caixas com serragem limpa, onde foram cobertos por serragem para que a temperatura fosse mantida até que o animal se recupere da anestesia. Os animais foram acompanhados por 3-4 horas após o procedimento, para assegurar a total recuperação.

#### **6.4. Fármacos e soluções utilizados nos experimentos**

Para manipulação farmacológica, as seguintes drogas foram utilizadas:

- N-metil-D-aspartato (NMDA; Sigma-Aldrich®): agonista dos receptores NMDA glutamatérgicos
- 7- Nitroindazole (7NI; Sigma-Aldrich®): inibidor específico para a enzima oxido nítrico sintase neuronal, nNOS
- Carboxy- PTIO (C-PTIO; Tocris Bioscience®): sequestrador de óxido nítrico extracelular
- Spermine NONOate (SP; Tocris Bioscience®): doador de óxido nítrico
- DAF-FM DIACETATO (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato): sonda fluorescente (Invitrogen™)
- Acetato de amila (Aldrich Chemical®, EUA): odor sintético de ésteres frutados (banana)

As concentrações dos fármacos e intervalos de microinjeções aqui utilizadas foram baseadas na literatura: NMDA (25, 50 e 200 pmol) (Kincheski e col., 2012; Back e Carobrez, 2018), 7NI (40 e 100 nmol) (Ferreira e col., 1999; Morato e col., 2004; Spolidório e col., 2007), C-PTIO (1 e 2 nmol) (Guimarães e col., 2005; Aguiar e col., 2014), DAF-FM DIACETATO (5 e 10  $\mu$ M) (Kojima e col., 1998; Lepiller e col., 2007). Para o experimento utilizando o doador de NO, foram realizados experimentos piloto e uma curva dose-resposta foi realizada utilizando as doses de Spermine NONOate de 5, 10, 20, 40, 80 nmol. Todos os fármacos foram diluídos em soluções iniciais de maior concentração e armazenados em alíquotas em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . No dia das microinjeções, as soluções foram descongeladas e diluídas em uma solução-tampão fosfato (PBS 0,1 M; pH=7,4) para as concentrações necessárias. A solução de acetato de amila 5%, diluída em propilenoglicol, foi mantida em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  e levada à temperatura ambiente para ser usada nos experimentos.

### **6.5. Microinjeção cerebral**

Para a administração das drogas no sítio de injeção, os animais foram gentilmente imobilizados com o auxílio de uma flanela e o mandril foi removido com um alicate. Em seguida, uma agulha injetora 27G (comprimento de 14,5 mm) foi inserida na cânula-guia, conectada a uma microseringa (Hamilton®, 5  $\mu$ l) por meio de um tubo de polietileno (PE-10) preenchido com a solução a ser injetada. As microseringas estavam acopladas à bomba de infusão (modelo B12000, Insight® Ltda., Ribeirão Preto, Brasil), o que permitiu a administração automática do volume de 0,2  $\mu$ l/cânula para a MCPd na cânula-guia, em uma velocidade constante de 0,6  $\mu$ l/min. Uma bolha de ar no tubo de polietileno entre a solução a ser injetada e água destilada foi utilizada para visualização e controle da infusão através do tubo. As agulhas injetoras foram mantidas no interior das cânulas por um período adicional de 20 s após o fim da injeção para maximizar a difusão e evitar possível refluxo da droga.

Alguns grupos experimentais receberam uma microinjeção, outros receberam duas ou três microinjeções com intervalos que variaram conforme o protocolo utilizado. Ainda, as intervenções farmacológicas foram feitas em dois momentos: antes da sessão de condicionamento (aquisição) e antes do teste (expressão).

## **6.6. Aparatos experimentais**

### **6.6.1. Caixa de Condicionamento**

O pareamento do estímulo neutro com o estímulo incondicionado foi realizado na caixa de condicionamento (Insight® Ltda., Ribeirão Preto, Brasil) medindo 25 x 25 x 25 cm, com paredes de acrílico, sendo a face frontal e tampas confeccionadas em acrílico transparente. O assoalho da caixa é composto de grades distanciadas 1 cm entre elas. Um compartimento em forma de gaveta localizado abaixo do piso gradeado da caixa serviu para recolhimento dos resíduos e para a instalação da fonte do estímulo olfatório durante a sessão de condicionamento.

### **6.6.2. Caixa de Odor (teste)**

Este aparato, inteiramente construído em acrílico, é dividido em dois compartimentos, um fechado (20 x 25 x 40 cm) com cobertura, mimetizando um ambiente seguro, e um aberto (40 x 25 x 40 cm) sem cobertura. Para permitir a visualização dos animais no teste, as paredes frontais, tanto do compartimento aberto quanto do fechado, são construídas em acrílico transparente. Uma pequena abertura (6 x 6 cm), situada na parede divisória, permite o livre acesso dos animais a ambos os compartimentos. Na parede lateral do compartimento aberto, do lado oposto à abertura entre os compartimentos, a fonte do estímulo olfatório condicionado foi fixada.

### **6.6.3 Fonte de odor**

Foi utilizada como fonte de odor uma solução contendo acetato de amila diluído em propilenoglicol (5 %), sendo que 100 µL desta solução foi adicionada em um papel filtro (4 cm x 4 cm) colocado no compartimento abaixo do piso gradeado da caixa de condicionamento ou na parede oposta do compartimento fechado na caixa de odor. O papel foi trocado a cada animal.

## **6.7. Procedimento para o Condicionamento Aversivo Olfatório**

O protocolo para o Condicionamento Aversivo Olfatório (CAO) utilizado neste trabalho foi adaptado de trabalhos previamente realizados no Laboratório de Neurobiologia Comportamental (Kroon e Carobrez, 2009). No primeiro dia foi realizada uma sessão de familiarização, na qual os animais foram colocados em

uma caixa de condicionamento para a livre exploração do ambiente por 5 min, a fim de conhecer o nível basal dos comportamentos defensivos e para permitir a exploração do ambiente pelos animais evitando comportamentos de neofobia que podem interferir no dia do condicionamento. No segundo dia após a manipulação farmacológica (intra-MCPd), os animais foram colocados novamente na caixa de condicionamento, na presença do estímulo olfatório neutro, odor amilacetato 5 %, por 10 min. No terceiro dia, com o intuito de diminuir as influências contextuais adquiridas na caixa de condicionamento, a análise da expressão do comportamento defensivo evocado pelo estímulo condicionado (odor) foi realizada em uma caixa diferente, a caixa de odor, para avaliar apenas as respostas ligadas à memória evocada pela pista olfatória. Os animais foram colocados na caixa de odor pelo compartimento aberto junto à parede divisória e foram deixados por 5 min, para livre exploração e avaliação dos comportamentos basais no ambiente novo em ausência da fonte de odor. Finalmente, no quarto dia os animais foram colocados novamente na caixa de odor por 10 min, na presença da fonte de odor de amilacetato. Essa sessão possibilitou a avaliação das respostas frente ao estímulo condicionado (odor).

Durante todos os dias de experimentação os aparatos utilizados foram limpos com solução de etanol 10% e secos com papel toalha após a retirada de cada animal. Os experimentos foram realizados em um ambiente com som atenuado, temperatura controlada ( $22 \pm 1$  °C) e intensidade de luz definida como 80 lux para caixa de condicionamento, enquanto que na caixa de odor, luminosidade de 4 lux no espaço aberto e 1 lux para o espaço fechado. Um exaustor presente logo acima dos aparatos utilizados era ligado durante a limpeza realizada entre a troca de animais na sala de experimentação, impedindo assim o acúmulo do odor volátil de acetato de amila no ambiente.

Todos os experimentos foram registrados através de um sistema de vídeo-câmera, permitindo desta forma a correta avaliação dos comportamentos exibidos durante as diferentes sessões. A análise dos comportamentos defensivos foi realizada utilizando o programa KINOSCOPE (GNU General Public License, version 3 (GPL v3) (Kokras e col, 2017).



Figura 5: Protocolo experimental do condicionamento aversivo olfatório. A fase de aquisição se leva a cabo na caixa de condicionamento no segundo dia, e a fase de expressão na caixa de odor no último dia. As microinjeções foram realizadas no dia 2 e 4 conforme protocolo. O odor esteve presente no segundo e quarto dia. Protocolo e figuras adaptados de Kroon e Carobrez (2009); Kincheski e col., (2012); Back e Carobrez (2018).

## 6.8. Parâmetros Comportamentais Analisados

Para a sessão de familiarização e condicionamento (Dia 1 e 2), na caixa de condicionamento, foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Congelamento (%): Comportamento de congelamento, caracterizado pela ausência total de movimentos no corpo, exceto a movimentação do tórax no processo respiratório.
- Agachar-Cheirar (%): Postura investigativa que o animal assume ficando em posição agachada com o dorso curvado (crouching), acompanhado de qualquer movimento de cabeça, à procura de novas informações do ambiente.
- Investigação vertical (%): Postura assumida pelo animal quando este se sustenta apenas nas duas patas traseiras, sem que as patas dianteiras toquem o chão.
- Investigação horizontal (%): Livre exploração na caixa, com as quatro patas tocando o chão.
- Autolimpeza (%): Comportamento de autolimpeza, quando o animal lambe ou esfrega suas patas dianteiras em alguma parte de seu corpo.

Na sessão de familiarização e teste (Dias 3 e 4), na caixa de odor os seguintes parâmetros foram quantificados:

- Tempo de aproximação (%): Tempo em que o animal permanece com pelo menos a cabeça ou uma das patas próxima a fonte de odor.
- Tempo escondido (%): Tempo em que o animal permanece com as 4 patas no compartimento fechado da caixa de odor.
- Tempo de *head-out* (%): Tempo em que o animal permanece no compartimento fechado da caixa e com a cabeça e/ou as patas dianteiras invadindo o

compartimento aberto, realizando um comportamento denominado avaliação de risco.

## 6.9. Métodos de quantificação do NO

O NO por ser um radical livre pode reagir com diferentes espécies químicas, o que pode influenciar nas concentrações, taxas de meia vida, e distribuição espaço-temporal, sendo assim uma molécula biológica complexa de estudar.

Ao longo dos anos, têm sido desenvolvidas uma ampla gama de técnicas para quantificação do NO, métodos químicos, físicos e biológicos, que permitem hoje a detecção de NO até níveis de attmoles ( $5 \times 10^{-17}$  moles) (Gertz, 2018).

A espectroscopia ótica tem sido utilizada por muito tempo para quantificação de nitritos e NO, sendo a “*reação de diazotação de Griess*” uma das técnicas pioneiras nesta área (Griess, 1879). Técnicas electroquímicas (Shibuki, 1990), de voltametria cíclica e amperometria (Peiris e Pubudu, 2009), espectrometria de massas (Dubey e col, 2007), espectroscopia fotoeletrônica de raios X (McManus e col., 2005), espectroscopia laser infrarroja quântica em cascata e sensorização mecatrônica (Di Franco e col., 2009), espectrometria de ressonância paramagnética eletrônica (Yoshimura e col., 1996) quimiluminescência (Leone e col., 1996; Woldman e col. 2009), e o uso de sondas fluorescentes baseadas em organometais (Chang e Chang, 2012; Huili e Ajun, 2015), são algumas das técnicas disponíveis para quantificar NO.

Dentre as técnicas acima mencionadas, as de bioimagem baseadas em sondas fluorescentes apresentam características vantajosas como alta sensibilidade e seletividade, viabilidade experimental e resolução espaço-temporal, que as converte em uma ferramenta poderosa para o estudo *in vitro* e *in vivo* de células e tecidos (Nagano, 2009; Chen e col., 2011; Yang e col, 2013; Wolley e col., 2013).

Segundo Li e Wan (2015), uma boa sonda fluorescente deve apresentar as seguintes características:

\*Ser solúvel em água e permeável à membrana, para poder ingressar facilmente nos tecidos e células.

\*Não devem ser citotóxicas nem interferir com os processos biológicos normais.

\*Devem apresentar mudanças dinâmicas das propriedades fluorescentes após reagir com NO ou seus produtos.

\*Devem ser sensíveis as mudanças de concentração do NO celular.

\*Ser excitáveis a longitudes de onda baixas, a fim de prevenir a autofluorescência.

Reunir todas essas características em uma sonda é muito difícil, porém as sondas fluorescentes para NO baseadas em compostos orgânicos apresentam várias destas características.

Nagano e col (2009) desenvolveram sondas baseadas na funcionalidade de grupos o-diamina, nas quais uma parte funcional da o-diamina reage com a forma oxidada do NO para produzir um derivado triazólico fluorescente.

Baseados neste princípio, para o estudo do NO em células vivas foram desenhadas e sintetizadas sondas que incorporaram diaminofluoresceínas “DAF” e um grupo diacetato ou éster de acetoximetilo para conferir a característica de permeabilidade. Diversos análogos de DAF são encontrados na literatura, cada um com propriedades particulares DAF-2, DAF-4 e DAF-5 (derivados diclorados) (Nakatsubo e col., 1998; Kojima e col., 1998), DAF-FM (derivado fluorado) (Kojima e col., 1999). Destas sondas, DAF-FM DIACETATO (4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína Diacetato) possui átomos de flúor nas posições 2' e 6', e um grupo N-metilo (Figura 6), o que proporciona uma maior resistência a fotodecoloração em comparação com DAF-2 (Kojima e col., 1999), uma maior estabilidade em condições de pH superior a 5,5, a diferença de DAF-2 que se torna instável em pH menores a 7 e DAF-4 e DAF-5 que se mostraram muito instáveis em pH próximos a neutralidade (Nakatsubo e col., 1998; Kojima e col., 1998 e 1999). Além disso, DAF-FM DIACETATO apresenta uma sensibilidade 1.4 vezes maior que DAF-2 (Kojima e col., 1999; Itoh e col., 2000).

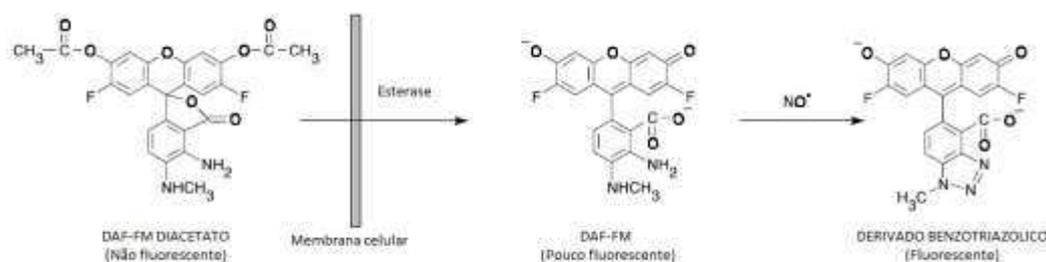


Figura 6. DAF-FM DIACETATO (não fluorescente) atravessa a membrana celular e uma esterase cliva o grupo diacetato liberando no espaço intracelular o composto DAF-FM o qual é fracamente fluorescente e que ao reagir com óxido nítrico se transforma num derivado benzotriazólico fluorescente. Adaptado de Molecular Probes, Inc., Copyright (2001).

Com o objetivo de obter uma evidência direta da concentração de NO, o que incrementa a relevância e robustez dos dados comportamentais obtidos a partir da modulação farmacológica na via nitrérgica realizados durante este trabalho de pesquisa, decidimos escolher a sonda DAF-FM DIACETATO para realizar a quantificação *in vivo* do NO produzido na MCPd durante as fases de aquisição e expressão do CAO.

## **6.10. Grupos Experimentais**

Todos os animais utilizados durante este trabalho foram submetidos ao protocolo de condicionamento aversivo olfatório descrito no item 6.7. Dois grupos experimentais foram realizados, no primeiro grupo as intervenções farmacológicas foram realizadas antes da sessão de condicionamento, a fim de avaliar respostas defensivas imediatas e aquisição do CAO. No segundo grupo experimental as intervenções foram realizadas antes da sessão de teste na caixa de odor, onde foi avaliada a participação do NO na expressão das respostas defensivas aprendidas.

### ***6.10.1. Grupo Experimental 1: Participação do NO na modulação das respostas defensivas imediatas e na aquisição do CAO obtido através da estimulação química da MCPd***

#### **6.10.1.1. Experimento 1: Efeitos da inibição da nNOS sobre as respostas defensivas imediatas e aquisição de uma memória aversiva**

Este experimento foi realizado com o intuito de avaliar se a administração do inibidor da nNOS, 7NI, poderia interferir nos comportamentos imediatos após a infusão de NMDA e a associação entre este e a pista olfatória.

Após 30 min de ambientação numa sala adjacente à sala experimental, os animais foram submetidos ao CAO conforme descrito no item 6.7. Na sessão de condicionamento todos os grupos receberam duas microinjeções. Uma microinjeção inicial (0,2 µl) de PBS (grupo controle) ou 7NI (40 ou 100 nmol), e 10 min após foi administrado (0,2 µl) PBS ou NMDA (50 pmol), resultando nos seguintes grupos experimentais [PBS-PBS (n=10), PBS-NMDA 50 pmol (n=8), 7NI 40 nmol-PBS (n=9), 7NI 40 nmol-NMDA 50 pmol (n=8), 7NI 100 nmol-PBS (n=8), 7NI 100 nmol-NMDA 50 pmol (n=13)]. Imediatamente após, os animais foram colocados na caixa de condicionamento impregnada com odor de acetato de amila durante 10 min. Nos

seguintes dias os animais foram expostos a sessão de familiarização (em ausência do odor), e teste (em presença da pista olfatória) na caixa de odor como descrito no item 6.7 e os parâmetros comportamentais foram analisados conforme descrito no item 6.8.

#### **6.10.1.2. Experimento 2:** Efeitos da captura do NO na fenda sináptica sobre as respostas defensivas imediatas e a aquisição de uma memória aversiva

Este experimento foi realizado no mesmo formato que o experimento 1 com o objetivo de testar a influencia do NO produto da nNOS assim como do NO circundante produto de outro tipo de NOS (iNOS, eNOS) nas RD e na aquisição do CAO. Para isso foi administrado um sequestrador de NO extracelular, C-PTIO (1 e 2 nmol) ou PBS, 10 minutos antes da estimulação da MCPd mediante a infusão de NMDA 50 pmol e posterior exposição a sessão de condicionamento, resultando nos seguintes grupos experimentais [PBS-PBS (n=10), PBS-NMDA 50 pmol (n=8), C-PTIO 1 nmol-PBS (n=8), C-PTIO 1 nmol-NMDA 50 pmol (n=9), C-PTIO 2 nmol-PBS (n=8), C-PTIO 2 nmol-NMDA 50 pmol (n=8)].

Os parâmetros comportamentais desta sessão e das sessões de familiarização e teste levadas a cabo na caixa de odor nos dias subsequentes foram analisados conforme descrito no item 6.8.

#### **6.10.1.3 Experimento 3:** Padronização de um protocolo para a quantificação de NO *in vivo* mediante o uso da sonda fluorescente DAF-FM DIACETATO

A padronização deste protocolo foi realizada com o intuito de obter uma medida direta da quantidade de NO que estava sendo liberado mediante a infusão de NMDA 50 pmol no dia do condicionamento. Para isso duas microinjeções com 10 min de diferença entre elas foram realizadas numa sala quase escura, com o mínimo de luminosidade necessária para o procedimento.

A sonda fluorescente DAF-FM DA foi inicialmente diluída em 20  $\mu$ L de DMSO para preparação da solução estoque 5 mM. No dia do experimento 1  $\mu$ L da solução mãe foi diluída em 1 mL de PBS para atingir a concentração desejada de DAF-FM DA 5  $\mu$ M. Os animais receberam inicialmente uma micro-injeção de DAF-FM DA 5  $\mu$ M (0,2  $\mu$ l, numa velocidade de 0,6  $\mu$ l/min), e foram logo alocados numa gaiola isolada por 10 min até ser realizada a infusão de NMDA 50 pmol. Imediatamente

após este procedimento, os animais foram colocados na caixa de condicionamento por 10 min, e quando retirados da caixa imediatamente eutanasiados mediante o procedimento de perfusão transcardíaca (solução salina 0,9 %, 150 ml, solução de paraformaldeído 4 %, 150 ml, durante 20 min).

Os encéfalos foram coletados e mantidos em formalina 10% por 48 horas. Após esse período, foram imersos em uma solução de sacarose (30%, Vetec®, Brasil) por 24 horas para criopreservação. Para obtenção de fatias coronais da MCPd marcada com DAF-FM os encéfalos foram congelados a  $-25^{\circ}\text{C}$  e cortes coronais na espessura de 15  $\mu\text{m}$  foram realizados no criostato Leica® CM1850 (Microsystems AG®, Wetzlar, Alemanha) em condições de mínima luminosidade no Laboratório Multiusuário do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFSC.

As lâminas com as fatias recentemente cortadas foram acondicionadas, mediante adição de duas gotas de Gel Mount™ (Biomeda Corp. Sigma Aldrich®) e cobertas com lamínula. Imediatamente após foram levadas para sua observação e obtenção de fotos ao Microscópio de Fluorescência Leica DMI 3000B (Leica®, Wetzlar, Alemanha) e as imagens obtidas foram analisadas mediante o software ImageJ®.

Com a finalidade de quantificar apenas o óxido nítrico gerado na MCPd as fotos em tamanho 4x (40 vezes) foram avaliadas mediante a superposição da imagem da MCPd, no AP -5.8 obtida do atlas Paxino e Watson (1998). Seções retangulares das imagens em aumento 10x atingindo a MCPd foram recortadas utilizando o programa Paint, e analisadas mediante o uso do software Image J®. O procedimento de edição encontra-se detalhado na Figura 7.

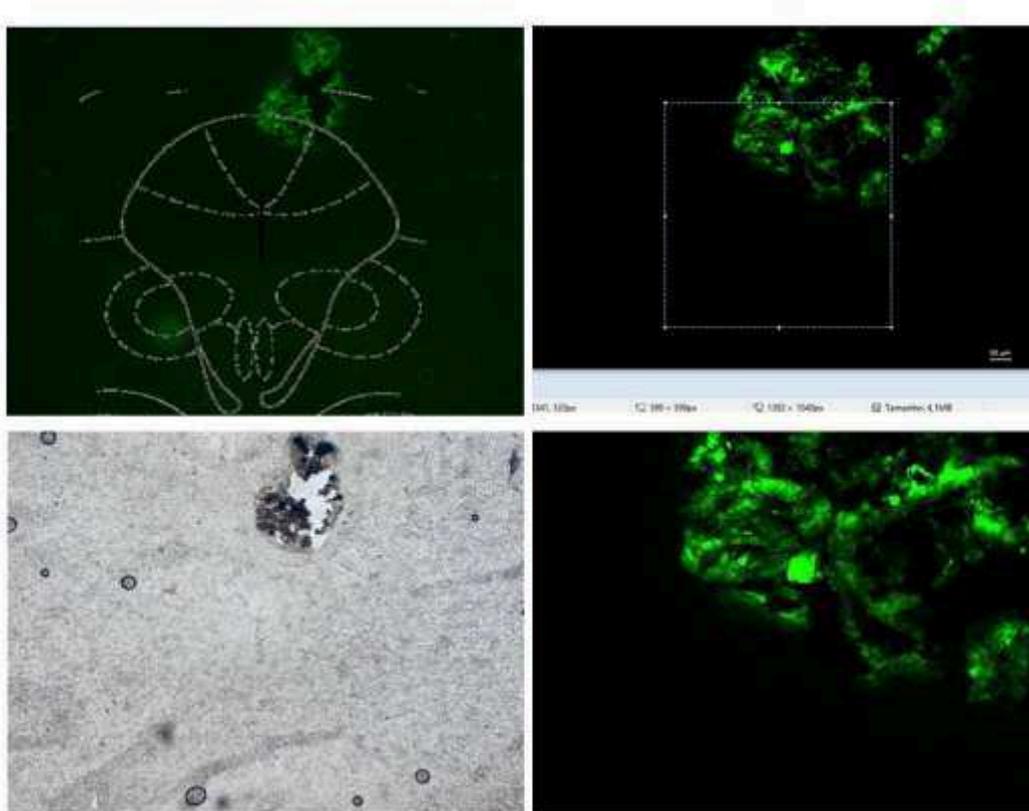


Figura 7. Representação esquemática da edição das imagens da MCPd marcadas com DAF-FM. A. Superposição da fotomicrografia fluorescente (aumento 4x, 40 vezes) com a imagem do atlas Paxinos e Watson (1998). B. Imagem obtida mediante campo claro (aumento 4x, 40 vezes). C. Delimitação da área de fluorescência pertencente a MCPd. D. Imagem finalmente editada utilizada para quantificação de NO.

#### 6.10.1.4. Experimento 4: Quantificação *in vivo* do nível de NO produzido pela estimulação química da MCPd mediante a administração de NMDA

Este experimento foi desenhado para quantificar os níveis de NO produzidos pela infusão de três doses de NMDA, 25, 50 e 200 pmol na MCPd as quais foram utilizadas em trabalhos anteriores deste laboratório.

Para isso foi realizada uma infusão inicial de DAF-FM DA 5  $\mu$ M, e 10 min depois foi administrado NMDA nas doses acima mencionadas. Imediatamente após os animais foram colocados na caixa de condicionamento durante 10 min, resultando nos seguintes grupos experimentais [DAF-FM 5  $\mu$ M-PBS (n=3), DAF-FM 5  $\mu$ M-NMDA 25 pmol (n=3), DAF-FM 5  $\mu$ M-NMDA 50 pmol (n=3), DAF-FM 5  $\mu$ M-NMDA 200 pmol (n=3)]. Os parâmetros comportamentais referentes a essa sessão foram analisados como descrito no item 6.8. Seguidamente foram realizados os procedimentos para retirada dos encéfalos e quantificação do NO mediante análise

de imagens em duplicata pelo software ImageJ<sup>®</sup> como descrito no protocolo detalhado no item 6.10.1.3.

**6.10.1.5. Experimento 5:** Quantificação *in vivo* do NO presente na MCPd após a inibição da nNOS realizada antes da infusão de NMDA 50 pmol

Este experimento foi realizado com o intuito de verificar se existe uma correlação entre o comportamento observado após a inibição da nNOS durante a sessão de condicionamento na qual foi utilizada a estimulação química mediada por NMDA e os níveis de NO encontrados na MCPd.

Seguindo o mesmo formato do experimento anterior foram realizadas 2 ou 3 microinjeções intra-MCPd. A infusão inicial foi de PBS (grupos controle) ou DAF-FM DA 5  $\mu$ M. Após 10 min foram administrados PBS, NMDA 50 pmol ou 7NI 100 nmol. O grupo que recebeu o inibidor 7NI, 10 min depois desta infusão, recebeu ainda mais uma microinjeção de NMDA 50 pmol, resultando nos seguintes grupos experimentais [PBS-PBS (n=3), PBS-NMDA 50 pmol (n=3), DAF-FM 5  $\mu$ M-PBS (n=3), DAF-FM 5  $\mu$ M-NMDA 50 pmol (n=3), DAF-FM 5  $\mu$ M- 7NI 100 nmol- NMDA 50 pmol (n=3)].

**6.10.1.6. Experimento 6:** Curva dose-resposta para estimulação da MCPd utilizando o doador de NO Spermine NONOate como estímulo incondicionado

Dados da literatura têm demonstrado que os doadores de NO geram fortes respostas defensivas quando são microinjetados diretamente na MCPd. Aqui testamos se a estimulação química da MCPd mediante a infusão do doador de NO Spermine NONOate seria capaz de gerar aprendizado no CAO. Para isso foram realizados vários experimentos pilotos nos quais foi realizada uma única injeção de PBS ou Spermine NONOate nas doses de 5, 10, 20, 40 e 80 nmol imediatamente antes da exposição à caixa do condicionamento, resultando nos seguintes grupos experimentais [PBS (n=8), Spermine NONOate 5 (n=8), 10 (n=8), 20 (n=8), 40 (n=11), 80 (n=8) nmol].

Nos seguintes dias se levaram a cabo as sessões de familiarização e teste na caixa de odor como descrito no item 6.7 e os parâmetros comportamentais foram analisados durante os três dias conforme descrito na seção 6.8.

#### **6.10.1.7. Experimento 7:** Quantificação da liberação de NO induzida pela infusão de Spermine NONOate na MCPd

Altas doses de Spermine NONOate geram fortes respostas defensivas imediatas, porém, não foram capazes de promover associação com a pista olfatória pareada neste experimento. No entanto a dose mais baixa de doador utilizada neste trabalho demonstrou ser capaz de dar suporte a aquisição do CAO. Mediante este experimento buscamos quantificar os níveis de NO produzidos pelo doador a fim de correlacionar as concentrações de NO com a capacidade de induzir aprendizagem associativa na MCPd.

Uma microinjeção de DAF-FM DA 5  $\mu$ M foi administrada 10 min antes da estimulação com PBS ou as doses Spermine NONOate 5 e 80 nmol, resultando nos seguintes grupos experimentais [DAF-FM DA 5  $\mu$ M-PBS (n=3), DAF-FM DA 5  $\mu$ M-Spermine NONOate 5 nmol (n=3), DAF-FM DA 5  $\mu$ M-Spermine NONOate 80 nmol (n=3)]. Os procedimentos de avaliação comportamental e quantificação utilizados foram os mesmos descritos para os experimentos de quantificação anteriores.

#### **6.10.2. Grupo experimental 2: Participação do NO na expressão de respostas aprendidas durante o CAO**

##### **6.10.2.1. Experimento 8:** Efeitos da interferência dada pela inibição da nNOS e a captura do NO na fenda sináptica sobre a expressão de uma memória aversiva

O objetivo deste experimento foi avaliar se intervenções farmacológicas realizadas no quarto dia utilizando 7NI e C-PTIO antes da sessão de teste poderiam interferir na expressão dos comportamentos relacionados à evocação das respostas aprendidas durante o CAO.

O protocolo utilizado neste experimento foi o protocolo padrão do CAO descrito no item 6.7. No dia do condicionamento foi administrada uma única microinjeção, de PBS ou NMDA 50 pmol, imediatamente antes de colocar os animais na caixa de condicionamento. No dia do teste 10 min antes da exposição à caixa de odor, foi realizada uma infusão de PBS, 7NI (100 nmol) ou C-PTIO (2 nmol), resultando nos seguintes grupos experimentais [PBS (cond)-PBS (teste) (n=8), NMDA 50 pmol (cond)-PBS (teste) (n=8), NMDA 50 pmol (cond)-7NI 100 nmol (teste) (n=8), NMDA 50 pmol (cond)-C-PTIO 2 nmol (teste) (n=8)]. Os parâmetros

comportamentais foram analisados durante os três dias consecutivos, conforme descrito no item 6.8.

#### **6.10.2.2. Experimento 9:** Quantificação *in vivo* do NO produzido durante a evocação de uma memória aversiva

A evocação de uma memória envolve a ativação de mecanismos moleculares que participam da re-modulação das mesmas. Mediante este experimento fomos corroborar se existe uma mudança no nível de expressão de NO durante a elicitação das respostas aprendidas.

O protocolo empregado neste experimento foi o protocolo padrão de 4 dias do CAO. No dia do condicionamento todos os animais receberam uma única microinjeção de PBS ou NMDA 50 pmol imediatamente antes de serem colocados na caixa de condicionamento impregnada com odor de acetato de amila por 10 min. No dia do teste, 10 min antes da exposição à caixa de odor, todos os animais receberam uma infusão de DAF-FM DA 5  $\mu$ M (0,2  $\mu$ l), resultando nos seguintes grupos experimentais [PBS (cond)-DAF-FM DA 5  $\mu$ M (teste) (n=3), NMDA 50 pmol (cond)- DAF-FM DA 5  $\mu$ M (teste) (n=3)]. Após a sessão de teste foram realizados os procedimentos para retirada dos encéfalos e quantificação do NO mediante análise de imagens como descritos no item 6.9.1.3. Os parâmetros comportamentais foram analisados durante os três dias consecutivos, conforme descrito no item 6.8.

#### **6.11. Verificação do sítio de injeção e histologia**

Após o procedimento experimental, foi realizada a eutanásia dos animais com anestesia de cetamina e xilazina (4:3; 1,5 ml/Kg) juntamente com exposição ao gás isoflurano em câmara fechada. Após verificação da ausência de movimentos respiratórios e opacidade dos olhos, foi realizada uma microinjeção da solução corante Azul de Evans (0,5%, Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) no sítio encefálico empregado para infusão de fármacos durante os experimentos a fim de determinar o sítio da microinjeção. Em seguida, seus encéfalos foram removidos e armazenados em uma solução de formalina (10%) durante no mínimo 48 horas.

No caso de técnicas imunohistoquímicas, os animais foram anestesiados com a mesma dose de anestésico pré-cirúrgico e perfundidos via transcardíaca, com

solução salina (0,9% 150 ml), seguida por uma solução de paraformaldeído 4% (150 ml), durante 20 min.

A efeitos de crioproteção, 24 horas antes de ser levados ao criostato, os cérebros foram colocados em uma solução de sacarose 30% (Vetec®, Brasil). Cortes coronais (50  $\mu$ m) foram realizados em criostato (Leica® CM1850, Microsystems AG®, Wetzlar, Alemanha), coletados em lâminas gelatinizadas e observados em microscópio estereoscópico para verificação do sítio de microinjeção. Para análise estatística foram considerados os animais com o sítio de microinjeção na porção dorsal da MCP, o qual foi conferido com base no atlas Paxinos e Watson, 1998 (Figura 8).



Figura 8. Imagem de um corte coronal do encéfalo de ratos evidenciando o sítio de microinjeção. Eixo anteroposterior -5.8 mm em relação ao bregma. O sítio de microinjeção na matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPd) rostral esquerda foi destacado com o corante azul de Evans.

A coloração de Nissl foi realizada num grupo de lâminas com o objetivo de avaliar se as doses de NMDA 50 pmol, SP 5 e 80 nmol utilizadas neste trabalho geraram dano tecidual. As lâminas coradas foram fotografadas em um microscópio óptico invertido acoplado a um sistema de captura de imagem (Microscópio Invertido Olympus IX83, Japão).

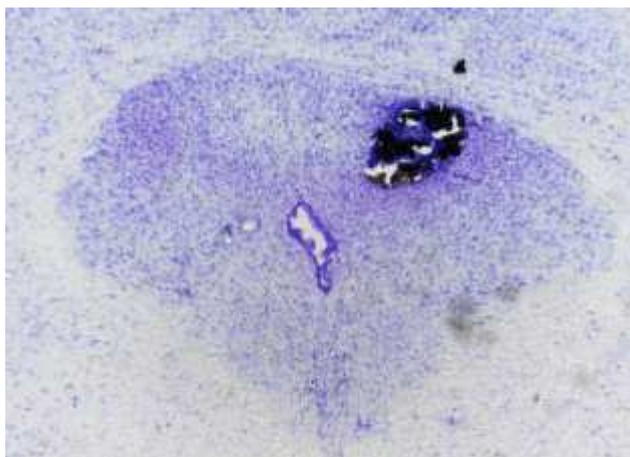


Figura 9. Fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de rato com a coloração de Nissl na região da MCPd mostrando o local da microinjeção do doador de NO Spermine NONOate 5 nmol.

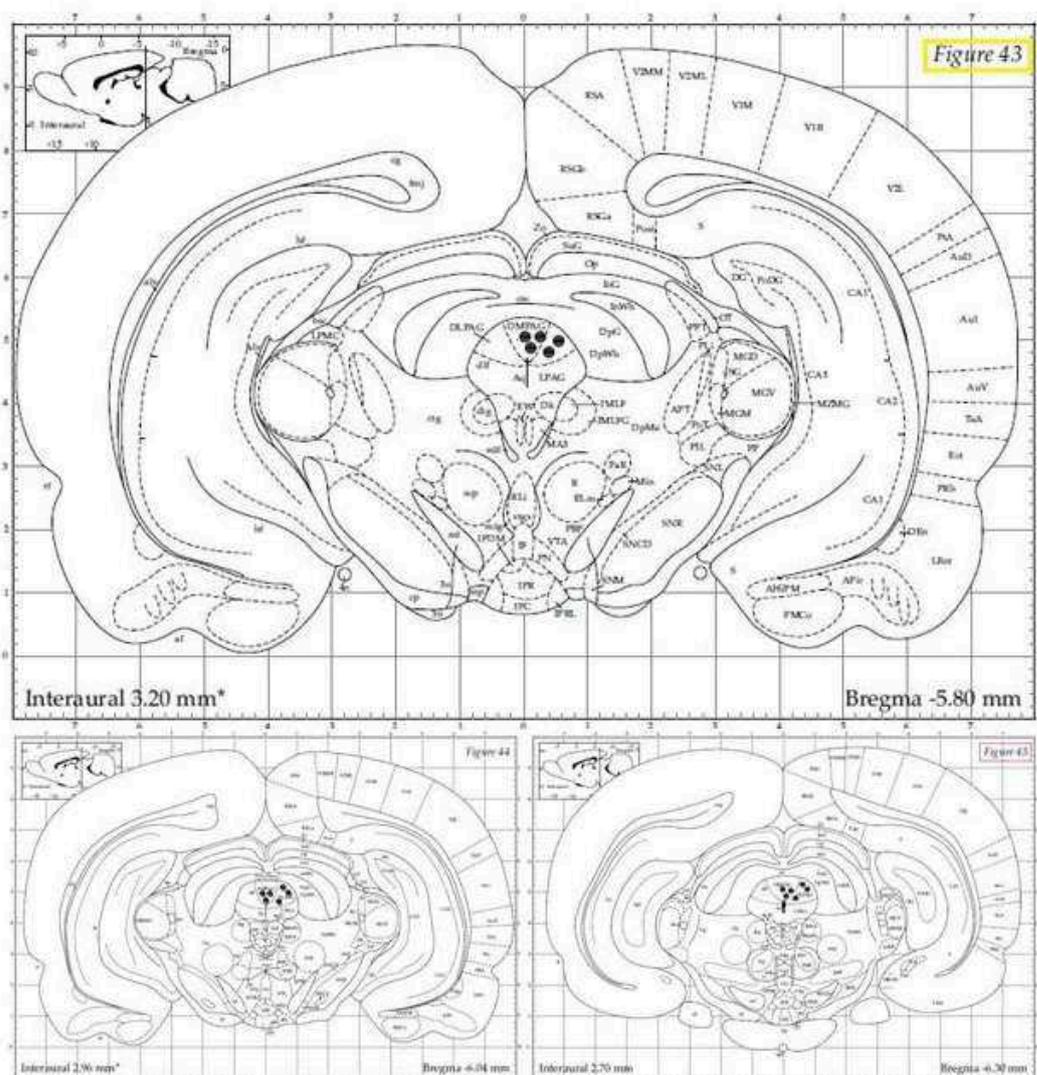


Figura 10. Diagrama esquemático de cortes coronais do encéfalo de rato, localizando a MCPd. Os círculos pretos indicam o local das microinjeção, o número de círculos representados é menor do que o número de animais utilizados nos protocolos experimentais. Anteroposterior -5.8 mm, -6.04 mm e -6.30 mm com relação ao bregma (Paxinos e Watson, 1998).

## 6.12. Análise estatística

Todos os parâmetros comportamentais observados durante o CAO foram transformados em porcentagem e considerados como variáveis dependentes. Analisados pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e o teste de Levene para homocedasticidade.

Os dados obtidos no dia do condicionamento foram agrupados em comportamentos defensivos (% congelamento + % agachar-cheirar) e comportamentos não defensivos (% autolimpeza + % exploração vertical + % investigação).

No dia da familiarização na caixa de odor e no dia do teste foram avaliados os parâmetros %TE (tempo gasto no compartimento fechado) e %TA (tempo próximo a fonte de odor).

Para analisar os dados obtidos pelos diferentes grupos durante a sessão de familiarização na caixa de odor foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de uma via. Nos experimentos nos quais não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos durante esta sessão, os valores obtidos foram agrupados e representados numa barra horizontal como média  $\pm$  95% do intervalo de confiança. Já os dados do grupo tratado com C-PTIO, onde foi observada uma diferença significativa na sessão de familiarização foram analisados junto com os dados do obtidos da sessão de teste, através da ANOVA para medidas repetidas e representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

Para análise dos dados obtidos na sessão de condicionamento e de teste, foram utilizados ANOVA de uma via, ANOVA fatorial e ANOVA de medidas repetidas, sendo especificado o teste utilizado nos resultados de cada experimento. Em todos os casos que a ANOVA indicou valores significativos, os dados foram submetidos ao teste *post hoc* correspondente.

As análises foram realizadas através do programa Statistica® (versão 13; TIBCO® Statistica™ Software Inc) e os gráficos montados no programa Prisma 5.0 (GraphPad Prism®, San Diego, EUA). O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .

## 7. Resultados

---

### ***Grupo Experimental 1: Participação do NO na modulação das respostas defensivas imediatas e na aquisição do CAO obtido através da estimulação química da MCPd***

#### **7.1. Experimento 1: Efeitos da inibição da nNOS, sobre as respostas defensivas imediatas e aquisição de uma memória aversiva**

Na Figura 11 são ilustrados os comportamentos defensivos (Fig. 11A) e não defensivos (Fig. 11B) analisados na sessão de condicionamento e a expressão das respostas evocadas quando os animais foram novamente expostos ao odor previamente pareado com o EI analisadas na sessão de teste (Fig. 11 C e D).

Durante a sessão de condicionamento, a ANOVA revelou efeitos significativos para os fatores pré-tratamento [ $F(2,50)= 6,179$ ;  $p= 0,0039$ ] e tratamento [ $F(1,50)= 11,12$ ;  $p= 0,0016$ ]. Também foi observada uma interação entre esses fatores [ $F(2,50)= 5,89$ ;  $p= 0,0050$ ] (Fig. 11A). O teste *post hoc* Newman Keuls indicou que a administração de 7NI na dose de 100 nmol foi capaz de reduzir as respostas defensivas induzidas pela administração de NMDA 50 pmol quando comparado com os grupos PBS-NMDA 50 pmol e 7NI 40 nmol-NMDA 50 pmol (Fig.11A). A análise dos comportamentos não defensivos demonstrou uma diferença significativa para os parâmetros pré-tratamentos [ $F(2,50)=5,93$ ;  $p= 0,0049$ ], tratamento [ $F(1,50)= 11,52$ ;  $p= 0,0013$ ], e uma interação entre estes fatores [ $F(2,50)= 5,86$ ;  $p= 0,0052$ ]. O teste *post hoc* revelou um aumento dos comportamentos não defensivos no grupo que recebeu a dose maior de 7NI em relação aos grupos PBS-NMDA 50 pmol e 7NI 40 nmol-NMDA 50 pmol (Fig. 11B). Esses resultados demonstraram que a maior dose de 7NI foi capaz de diminuir as respostas defensivas induzidas pela estimulação química da MCPd com NMDA 50 pmol.

Na sessão de teste foi observado um efeito do fator tratamento [ $F(1,50)= 4.81$ ;  $p= 0,0329$ ] sobre o parâmetro comportamental %TE e uma interação entre os fatores pré-tratamento x tratamento tanto para a %TE [ $F(2,50)= 5,30$ ;  $p= 0,0081$ ] quanto para %TA [ $F(2,50)= 3,53$ ;  $p= 0,0366$ ]. O teste *post hoc* revelou uma redução na %TE e um aumento na %TA nos grupos que receberam 7NI em ambas doses, 40 e 100 nmol em relação ao grupo PBS-NMDA 50 pmol (Fig. 11 C e D). Portanto, ambas as

doses de 7NI foram capazes de interferir com o processo de aquisição do CAO, prejudicando o aprendizado associativo aversivo deste paradigma.

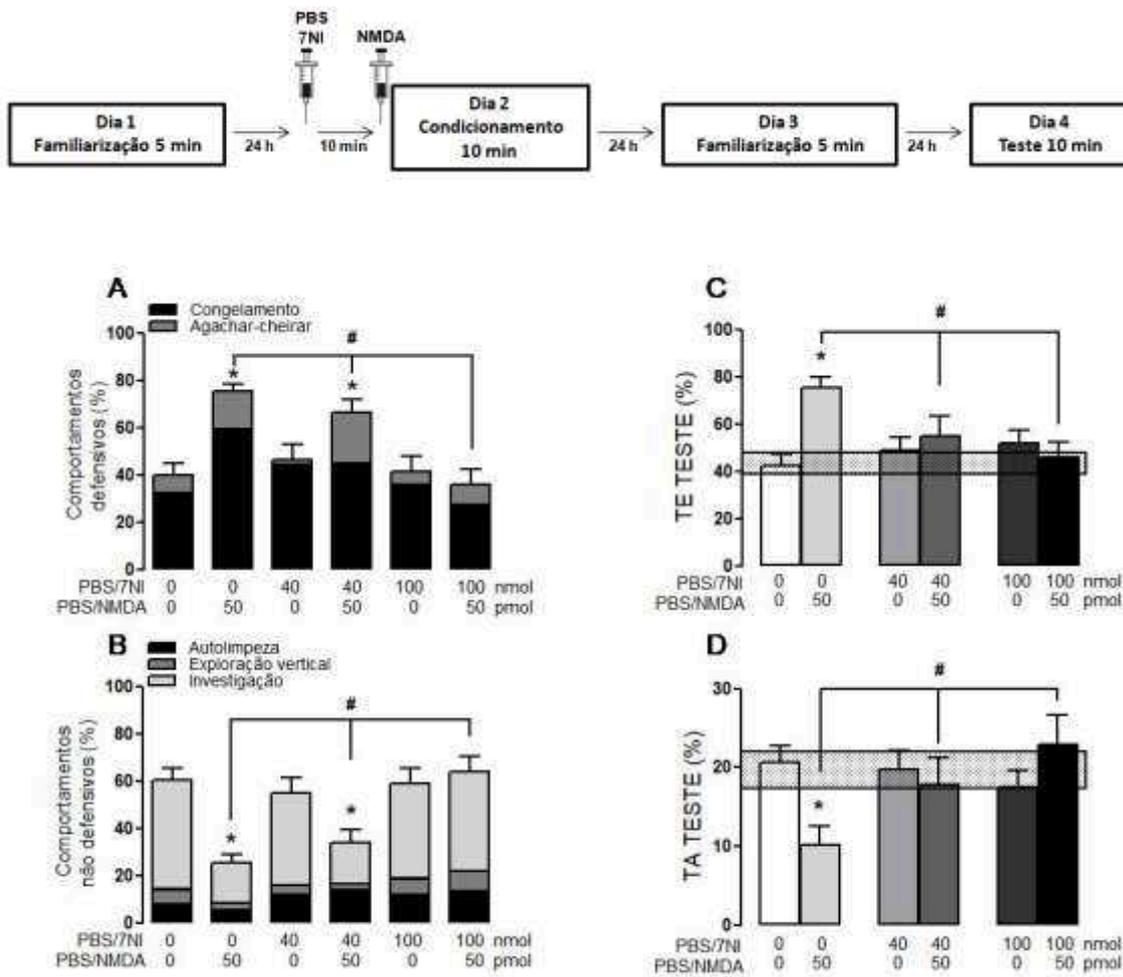


Figura 11. Acima fluxograma indicando o delineamento experimental. À esquerda, % de comportamentos defensivos (A) e não defensivos (B) observados durante a sessão de condicionamento onde foi realizada a administração de PBS ou 7NI (40 e 100 nmol) 10 min antes da estimulação da MCPd com PBS ou NMDA 50 pmol. À direita, expressão de comportamentos apresentados durante a reexposição a pista olfatória na sessão de teste, representados pela % de tempo escondido (C) e aproximado a fonte de odor (D). As colunas representam a média  $\pm$  e.p.m.. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. ANOVA fatorial seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls.  $*p < 0.05$  do grupo PBS-NMDA 50 pmol (8) comparado ao grupo PBS-PBS (10) e 7NI 40 nmol-NMDA 50 pmol (8) em comparação a 7NI 40 nmol- PBS (9).  $\#p < 0.05$  diferença significativa entre os grupos PBS-NMDA 50 pmol (8), 7NI 40 nmol-NMDA 50 pmol (8) e 7NI 100 nmol-NMDA 50 pmol (13).

## 7.2. Experimento 2: Efeitos da captura do NO na fenda sináptica sobre as respostas defensivas imediatas e a aquisição de uma memória aversiva

Para a análise dos dados deste experimento foram aplicados dois tipos de testes, ANOVA fatorial para sessão de condicionamento, e ANOVA para medidas repetidas para as sessões de familiarização e teste, já que os dados da

familiarização apresentaram efeitos significativos do fator pré-tratamento para os parâmetros %TE e %TA.

Para sessão de condicionamento foram observados efeitos significativos do pré-tratamento [ $F(2,45)= 4,41$ ;  $p= 0,0178$ ], tratamento [ $F(1,45)= 7,81$ ;  $p= 0,0076$ ] e a interação entre esses fatores [ $F(2,45)= 6,35$ ;  $p= 0,0037$ ] sobre os comportamentos defensivos (Fig. 12A). Os mesmos efeitos foram observados para os comportamentos não defensivos, sendo o pré-tratamento [ $F(2,45)= 4,20$ ;  $p= 0,0212$ ], tratamento [ $F(1,45)= 7,50$ ;  $p= 0,0087$ ] e interação dos fatores anteriores [ $F(2,45)= 6,08$ ;  $p= 0,0046$ ] (Fig. 12B).

O teste *post hoc* Newman Keuls indicou que ambas as doses de C-PTIO, 1 e 2 nmol, reduziram os comportamentos defensivos gerados pela administração de NMDA 50 pmol, incrementando os parâmetros não defensivos avaliados como pode ser observado na Figura 12.

A análise da sessão de teste, a qual foi realizada conjuntamente com os dados da familiarização mediante ANOVA de medidas repetidas, mostrou um efeito para o fator pré-tratamento [ $F(2,45)= 4,44$ ;  $p= 0,017$ ], interação entre os fatores pré-tratamento x tratamento [ $F(2,45)= 5,79$ ;  $p= 0,005$ ] para %TE (Fig. 12C), e um efeito do pré-tratamento para %TA [ $F(2,45)= 5,50$ ;  $p= 0,0072$ ] (Fig. 12D).

O teste *post hoc* utilizado, Newman Keuls, indicou que ambas as doses de C-PTIO, as quais não geram um efeito *per se*, foram capazes de interferir com a aquisição do CAO, levando a uma diminuição do tempo que os animais deste grupo passam escondidos no compartimento fechado da caixa de odor e um incremento do tempo próximo a fonte de odor em comparação com o grupo que recebeu NMDA 50 pmol-PBS (Fig. 12C e 12D).

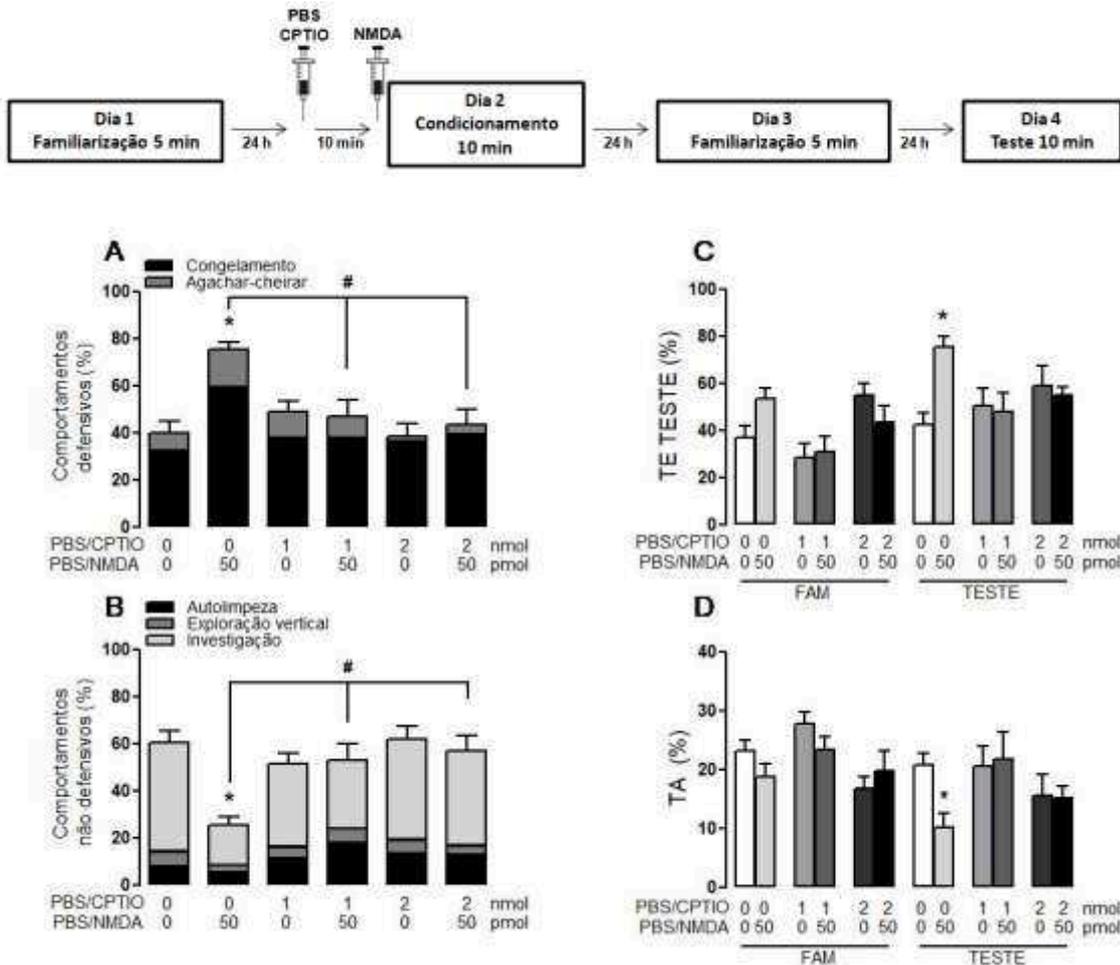


Figura 12. Acima fluxograma indicando o delineamento experimental. A esquerda, comportamentos defensivos (A) e não defensivos (B) observados durante a sessão de condicionamento onde foi realizada a administração de PBS ou C-TPIO (1 e 2 nmol) 10 min antes da estimulação da MCPd mediante a microinjeção de NMDA 50 pmol. Os dados desta sessão foram analisados mediante ANOVA fatorial seguido do *post hoc* Newman-Keuls. À direita, dados de % de tempo escondido (C) e tempo próximo a fonte de odor (D) observados durante as sessões de familiarização e teste realizadas na caixa de odor, analisados mediante ANOVA de medidas repetidas seguido do *post hoc* Newman-Keuls. As colunas representam a média  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0.05$  do grupo PBS-NMDA 50 pmol (8) comparado ao grupo PBS-PBS (10). # $p < 0.05$  diferenças significativas entre os grupos PBS-NMDA 50 pmol (8), C-PTIO 1 nmol-NMDA 50 pmol (9) e C-PTIO 2 nmol-NMDA 50 pmol (8).

### 7.3. Experimento 3-4: Quantificação *in vivo* do nível de NO produzido pela estimulação química da MCPd mediante a administração de NMDA

A quantificação do NO mediante o uso da sonda fluorescente DAF-FM DIACETATO permitiu obter uma medida bioquímica direta da quantidade de NO que estava sendo produzido no momento da sessão de condicionamento. Aqui correlacionamos as respostas comportamentais observadas nesta sessão, quando administrado PBS ou 3 doses de NMDA diferentes, 25, 50 e 200 pmol, com a

fluorescência emitida pela sonda e medida mediante o software ImageJ<sup>®</sup> como ilustrado na Figura 13.

Os dados obtidos foram analisados mediante ANOVA e foi evidenciado um efeito significativo do tratamento [ $F(3,14)= 18,88$ ;  $p= 0,00003$ ] sobre as respostas defensivas observadas nesta sessão (Fig. 13.A), e a quantidade de fluorescência emitida [ $F(3,20)= 17,25$ ;  $p= 0,000009$ ] (Fig. 13.B). O teste *post hoc* Newman Keuls mostrou que os grupos que receberam NMDA 50 e 200 pmol apresentaram respostas defensivas mais fortes e apresentaram maior emissão de fluorescência, indicando maior conteúdo de NO que nos grupos que receberam PBS e NMDA 25 pmol.

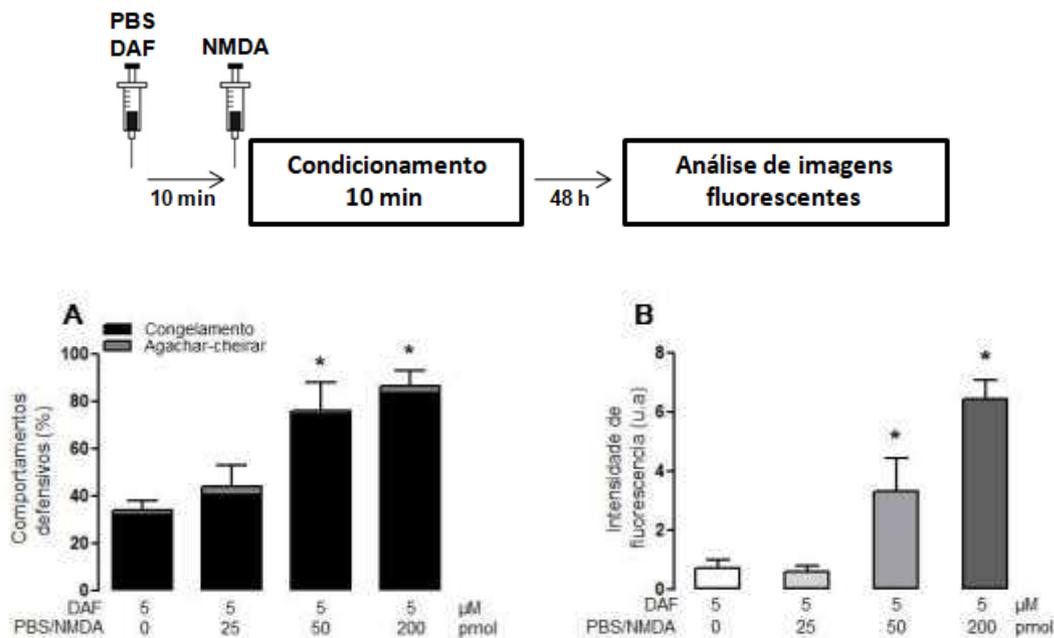


Figura 13. Acima o fluxograma indicando o delineamento experimental. A esquerda, comportamentos defensivos (A) observados durante a sessão de condicionamento onde foi realizada uma microinjeção inicial da sonda fluorescente DAF-FM DA 5 µM 10 min antes da administração de PBS, NMDA 25, 50 ou 200 pmol. À direita, dados obtidos da intensidade de fluorescência das imagens obtidas a partir de cortes coronais da MCPd e analisados mediante o software ImageJ<sup>®</sup> (B). Todos os dados foram analisados mediante ANOVA de uma via seguido do *post hoc* Newman-Keuls. As colunas representam a média ± e.p.m. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS (3). u.a= unidade arbitrária.

Uma análise minuto a minuto dos dados comportamentais obtidos a partir deste experimento foi realizada a fim de avaliar se a sonda fluorescente DAF-FM DA, a qual reage ao ligar-se irreversivelmente com o NO produzido, poderia interferir com as respostas comportamentais.

Na Figura 14 observa-se uma comparação dos parâmetros comportamentais avaliados durante a sessão de condicionamento entre os grupos NMDA 50 pmol, e DAF-FM 5  $\mu$ M -NMDA 50 pmol. ANOVA encontrou uma diferença estatisticamente significativa [ $F(1,4)= 11,46$ ;  $p= 0,00043$ ] só para o comportamento agachar-cheirar, não achando diferenças significativas entre os grupos para os outros parâmetros, demonstrando que a sonda não interfere nas respostas de congelamento autolimpeza, exploração vertical e investigação.

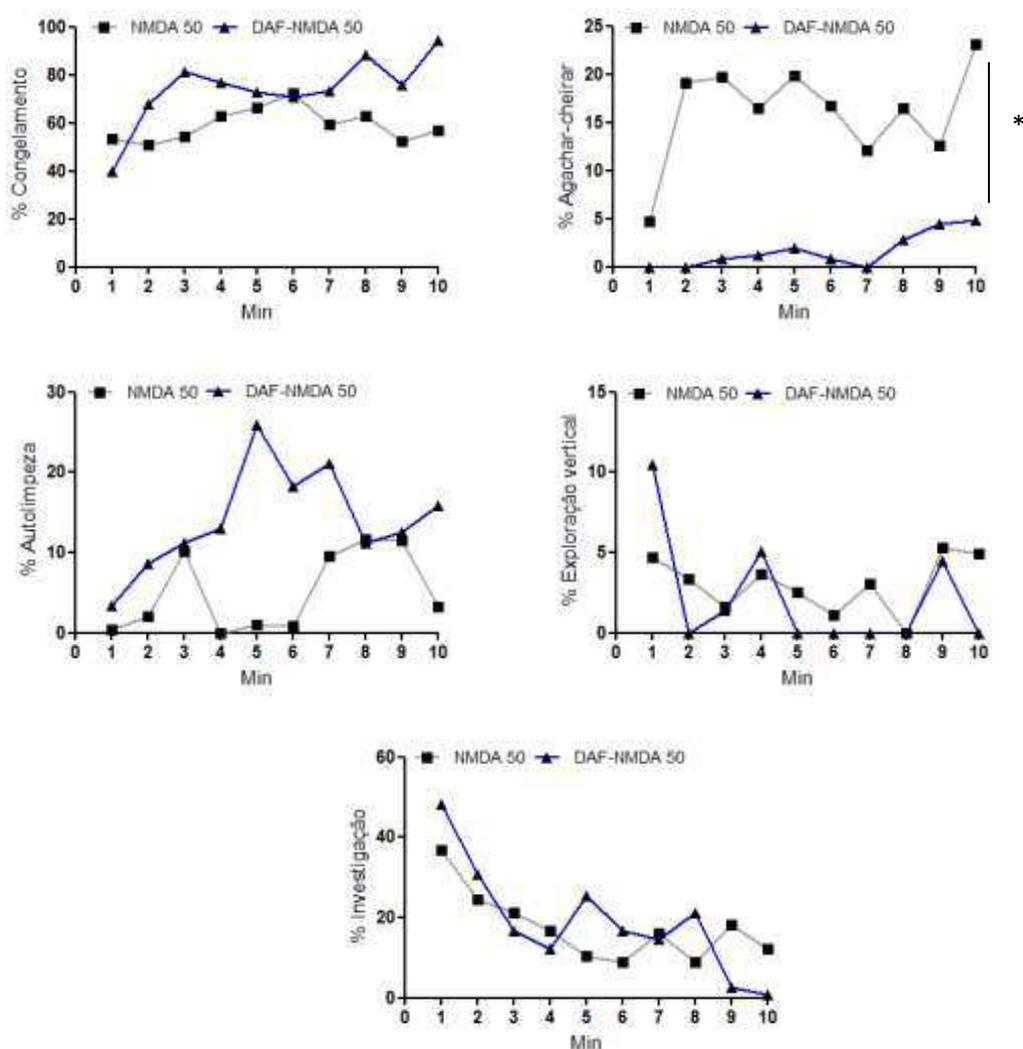


Figura 14. Análise minuto a minuto dos parâmetros comportamentais avaliados durante a sessão de condicionamento após a infusão de NMDA 50 pmol, representado pela linha cinza ou DAF-FM 5  $\mu$ M-NMDA 50 pmol, representado pela linha azul. Os pontos junto às linhas representam a média dos comportamentos defensivos. \* $p < 0.05$  do grupo DAF 5  $\mu$ M-NMDA 50 pmol (3) comparado ao grupo NMDA 50 pmol (3).

#### **7.4. Experimento 5:** Quantificação *in vivo* do NO presente na MCPd após a inibição da nNOS realizada antes da infusão de NMDA 50 pmol

No experimento 1 foi demonstrado que a administração do inibidor da nNOS 7NI na dose de 100 nmol foi capaz de reduzir as respostas defensivas apresentadas após a estimulação da MCPd com NMDA 50 pmol. Aqui apresentamos os dados comportamentais e a quantificação de NO produzido durante a sessão de condicionamento quando utilizado o 7NI. Os dados foram analisados mediante ANOVA de uma via, e como pode ser observado na Figura 15 foi evidenciado um efeito do tratamento [ $F(4,10)= 13,19$ ;  $p= 0,00053$ ] sobre as respostas defensivas e a quantidade de NO produzido após os tratamentos empregados [ $F(4,25)= 6,72$ ;  $p= 0,0008$ ]. O teste *post hoc* Newman Keuls indicou que os grupos que receberam NMDA 50 pmol apresentaram respostas defensivas mais intensas e maior fluorescência que aqueles recebendo PBS. Além disso, como ilustrado na Figura 15, a administração de 7NI 100 nmol, 10 min antes da infusão de NMDA 50 pmol, foi capaz de reduzir as RD assim como a fluorescência até níveis ainda menores que aqueles observados para o grupo controle (PBS). Indicando uma inibição da produção basal de NO produzido diante o estímulo físico gerado pela microinjeção.

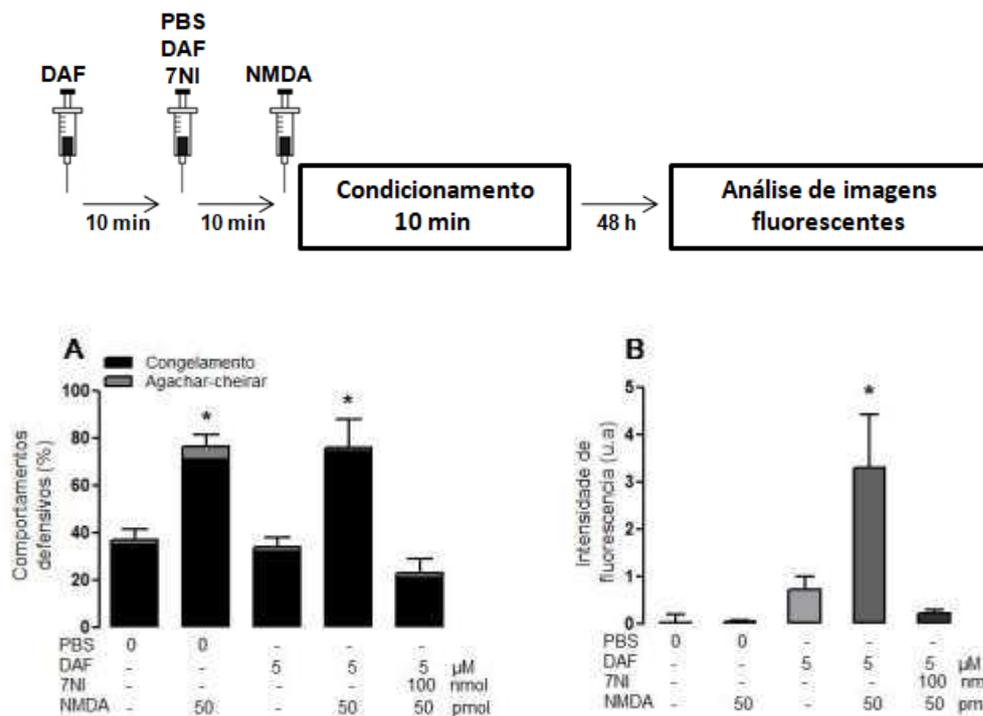


Figura 15. Acima o fluxograma indicando o delineamento experimental. A esquerda, comportamentos defensivos (A) observados durante a sessão de condicionamento na qual foi realizada uma microinjeção inicial de PBS ou da sonda fluorescente DAF-FM DA 5  $\mu\text{M}$  10 min antes da administração de PBS, NMDA 50 pmol ou 7NI 100 nmol. O grupo que recebeu 7NI, 10 min após recebeu mais uma infusão de NMDA 50 pmol. À direita, dados obtidos da intensidade de fluorescência das imagens obtidas a partir de cortes coronais da MCPd e analisados mediante o software ImageJ® (B). Todos os dados foram analisados mediante ANOVA de uma via seguido do *post hoc* Newman-Keuls. As colunas representam a média  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0.05$  comparado ao grupo PBS (3). u.a= unidade arbitraria.

Na Figura 16 se encontram as imagens obtidas para cada um dos tratamentos deste experimento. Os grupos controle PBS-PBS e PBS-NMDA 50 pmol, não demonstraram sinais de autofluorescência. Como representado estatisticamente, podemos observar nas fotos apresentadas aqui a diferença de fluorescência entre os grupos DAF-FM 5  $\mu\text{M}$ -PBS, o qual apresenta uma quantidade de fluorescência basal devido ao próprio evento de microinjeção da substancia neutra, e o grupo DAF-FM 5  $\mu\text{M}$ -NMDA 50 pmol, o qual incrementa significativamente a quantidade de fluorescência emitida.

No caso do grupo que recebeu o tratamento DAF 5  $\mu\text{M}$ -7NI 100 nmol- NMDA 50 pmol, observa-se uma fluorescência ainda menor que a do grupo DAF-FM 5  $\mu\text{M}$ -PBS, indicando que o inibidor 7NI foi capaz de reduzir os quantidade de NO produzido até níveis menores que o basal.

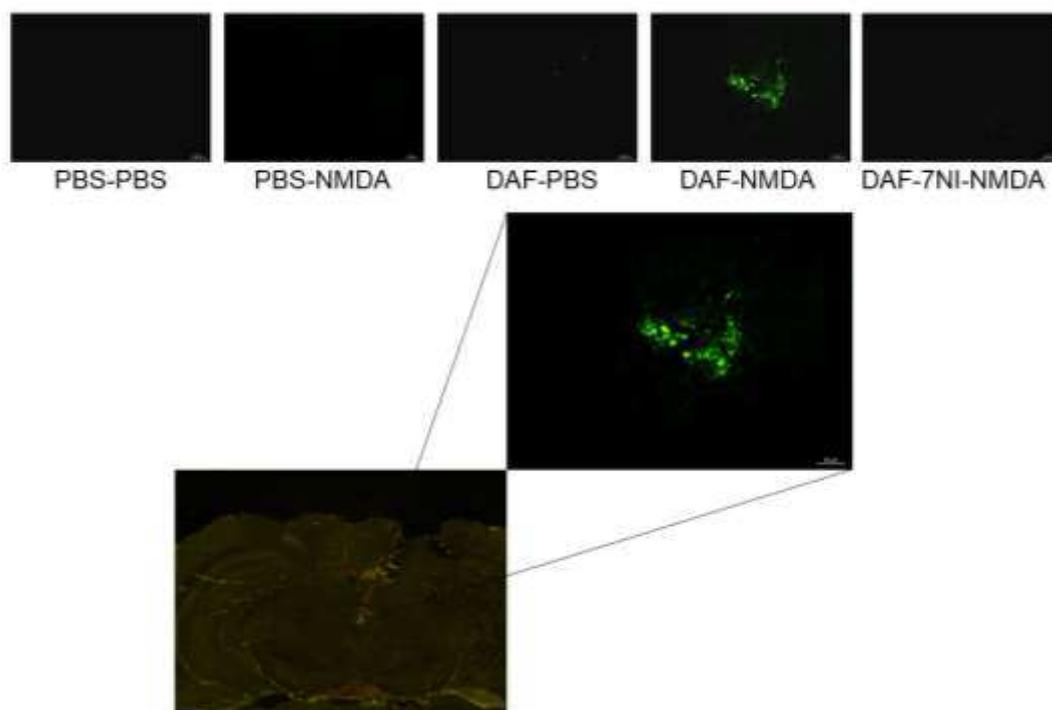


Figura 16. Fotografias da emissão de fluorescência gerada pela reação DAF-FM --- NO na MCPd. Acima fotos de cada tratamento realizado neste experimento, embaixo uma ampliação do sitio de injeção do grupo DAF-FM 5  $\mu$ M –NMDA 50 pmol. Contraste das fotos -10.

### 7.5. Experimento 6: Curva dose-resposta para estimulação da MCPd utilizando o doador de NO Spermine NONOate como estímulo incondicionado

Os dados obtidos a partir da curva dose-resposta realizada utilizando Spermine NONOate como EI no dia da sessão de condicionamento, foram analisados mediante ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* Dunnett.

Mediante estas análises foram encontrados efeitos do tratamento sobre as respostas defensivas [ $F(5,45)= 14,45$ ;  $p= 0,000001$ ] (Fig. 17A) e não defensivas [ $F(5,45)= 13,19$ ;  $p= 0,000001$ ] (Fig. 17B) durante a sessão de condicionamento. O teste *post hoc* indicou que todas as doses administradas de SP foram capazes de induzir RD robustas em comparação com o grupo que recebeu PBS.

Na sessão de teste foi observado um efeito significativo do fator tratamento para %TE [ $F(5,45)= 2,43$ ;  $p= 0,0493$ ] (Fig. 17C) e %TA [ $F(5,45)= 4,16$ ;  $p= 0,0034$ ] (Fig. 17D). O teste de Dunnett determinou que unicamente o grupo que tinha recebido a dose menor, SP 5 nmol, durante a sessão de condicionamento, manteve-se por mais tempo no compartimento fechado, e afastado da fonte de odor, que o grupo que recebeu PBS indicando a aquisição de uma memória aversiva para o odor utilizado como EC quando utilizada esta dose no CAO.

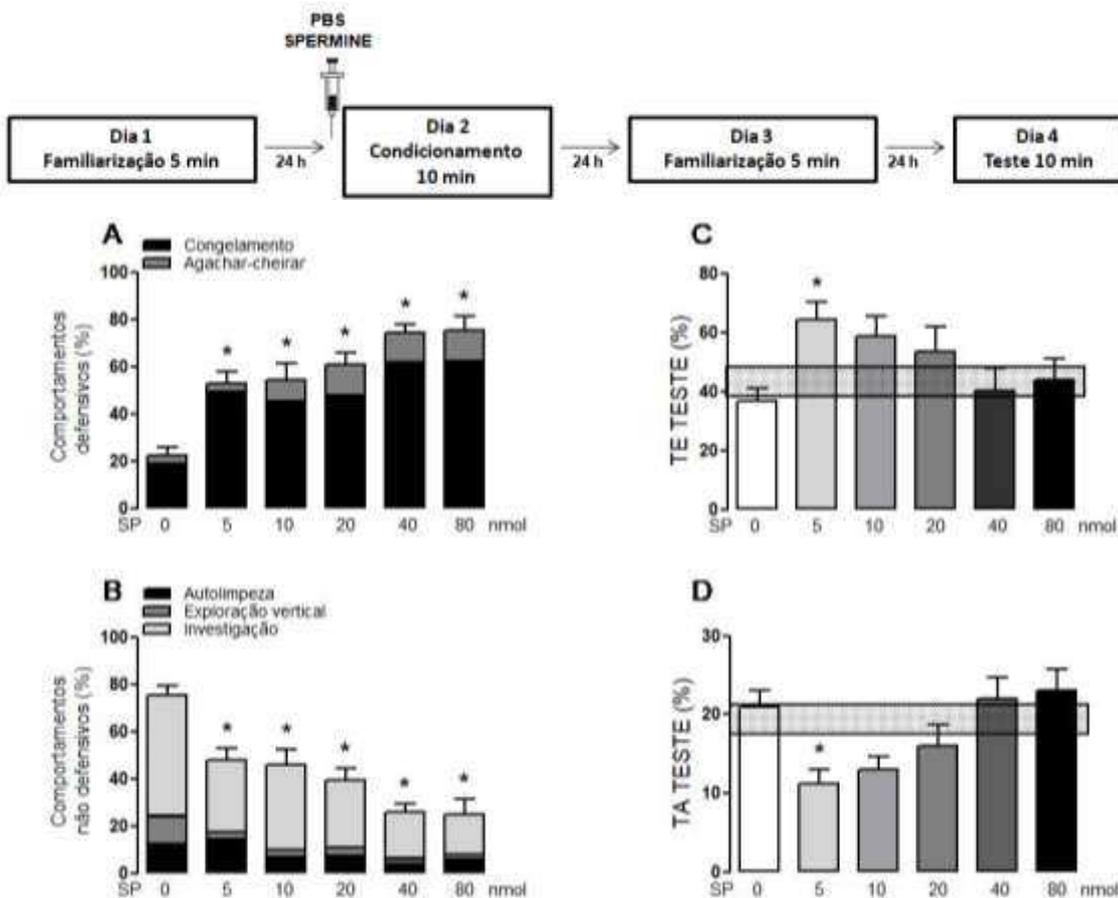


Figura 17. Curva dose-resposta Spermene NONOate. Acima o fluxograma indicando o delineamento experimental. À esquerda, comportamentos defensivos (A) e não defensivos (B) observados durante a sessão de condicionamento induzidos pela microinjeção de diferentes doses de Spermene NONOate, 5, 10, 20, 40 e 80 nmol na MCPd. À direita, expressão de comportamentos % tempo escondido (C) e tempo próximo a fonte de odor (D) apresentados durante a reexposição ao EC durante a sessão de teste. As colunas representam a média  $\pm$  e.p.m. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. ANOVA seguido pelo *post hoc*. \* $p < 0.05$  dos grupos SP 5 nmol (8), SP 10 nmol (8), SP 20 nmol (8), SP 40 nmol (11) e SP 80 nmol (8) comparado ao grupo PBS (8).

A estimulação química da MCPd utilizando o doador de NO Spermene NONOate como EI durante a sessão de condicionamento do CAO foi um procedimento novo dentro do nosso laboratório pelo qual decidimos fazer uma caracterização das respostas comportamentais observadas após a administração da dose de SP 5 nmol, a qual foi capaz de promover aquisição de uma memória aversiva, e da dose SP 80 nmol, a qual induziu fortes respostas defensivas, porém, não conseguiu gerar aprendizagem neste paradigma.

Na Figura 18 encontram-se ilustrados os parâmetros comportamentais avaliados durante a sessão de condicionamento, imediatamente após a administração de PBS, NMDA 50 pmol e Spermene NONOate nas doses 5 e 80

nmol. As análises realizadas minuto a minuto foram avaliadas mediante ANOVA de medidas repetidas seguida do teste *post hoc* Newman Keuls.

Em relação aos comportamentos defensivos observamos diferenças significativas para % de congelamento [ $F(3,29)= 6,37$ ;  $p= 0,0019$ ], % de agachar-cheirar [ $F(3,29)= 13,93$ ;  $p= 0,000008$ ], % de exploração vertical [ $F(3,29)= 3,57$ ;  $p= 0,0260$ ] e % de investigação [ $F(3,29)= 12,38$ ;  $p= 0,00002$ ]. O teste *post hoc* indicou que para os parâmetros % de congelamento e % de exploração vertical houve uma diferença significativa entre os grupos NMDA 50 pmol, SP 5 e 80 nmol quando comparados com o grupo PBS, porém não foram observadas diferenças entre eles. Para o comportamento % de agachar-cheirar, a diferença foi evidenciada entre o grupo NMDA 50 pmol e o grupo PBS só para o minuto 10. Finalmente para % de investigação os animais que receberam NMDA 50 pmol e a dose de SP 80 nmol se diferenciam do grupo PBS e SP 5 nmol, já que durante os primeiros minutos da sessão investem mais tempo na investigação da caixa de condicionamento até que nos seguintes minutos atingem uma porcentagem de tempo de congelamento bastante alta na qual se mantém quase até o final da sessão, sendo este comportamento acompanhado pela postura de avaliação da área, agachar-cheirar. No entanto o grupo que recebeu a dose de SP 5 nmol apresenta um comportamento oscilante entre congelamento, pouco tempo agachado cheirando, e bastante tempo investigando a caixa.

Na Figura 18 observa-se que a dose de SP 80 nmol induz respostas defensivas de uma magnitude muito semelhante às induzidas pelo NMDA 50 pmol, enquanto os animais que receberam a dose de 5 nmol, apresentaram comportamentos mais sutis.

Os comportamentos não defensivos não mostraram um padrão de comportamento específico dose-dependente, porém, o comportamento do grupo que recebeu SP 80 nmol foi muito similar com o grupo NMDA 50 pmol. Não foram observadas diferenças significativas para o parâmetro % autolimpeza.

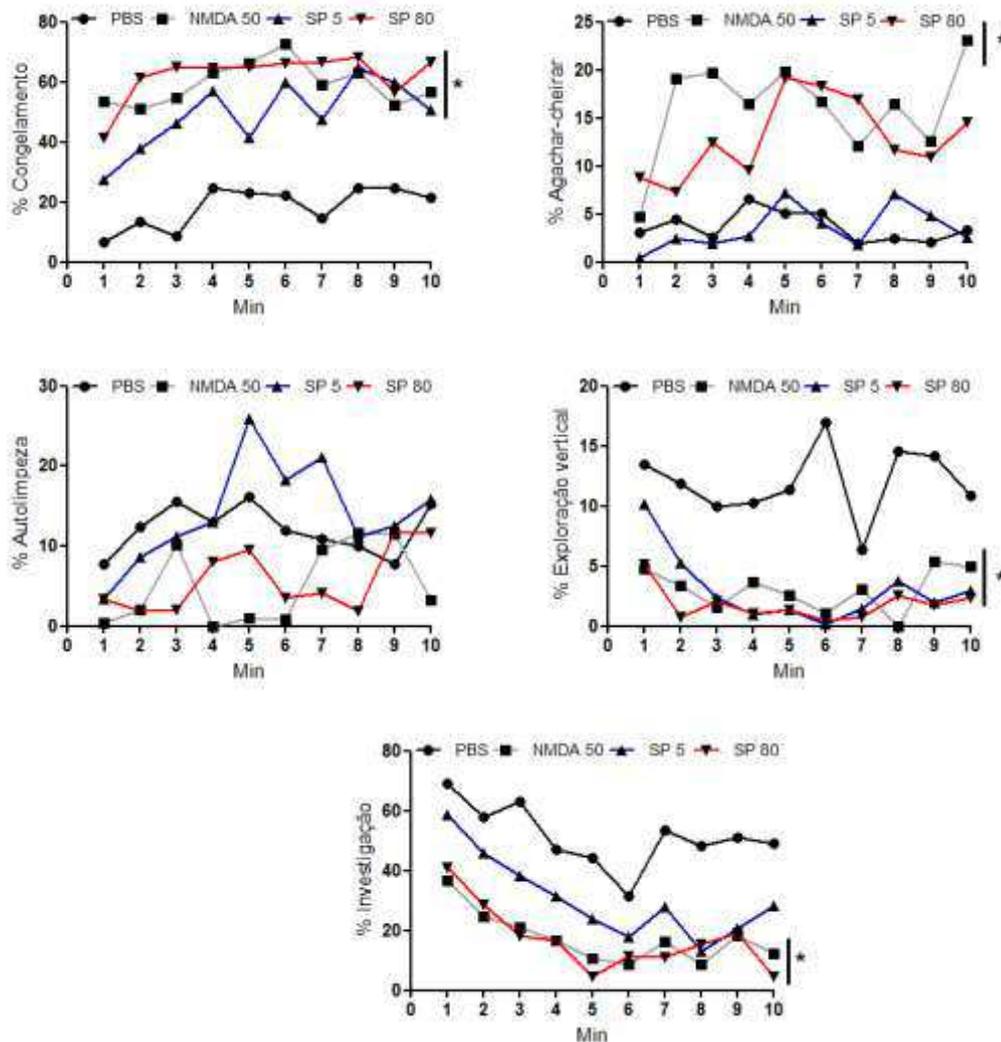


Figura 18. Análise minuto a minuto dos parâmetros comportamentais avaliados durante a sessão de condicionamento após a infusão de PBS (linha preta), NMDA 50 pmol (linha cinza), SP 5 nmol (linha azul) ou SP 80 nmol (linha vermelha). Os pontos juntos às linhas representam a média dos comportamentos defensivos. Todos os dados foram analisados mediante ANOVA seguida do teste *post hoc* Newman Keuls. \* $p < 0.05$  dos grupos NMDA 50 pmol (8), SP 5 nmol (8) e SP 80 nmol (8) comparado ao grupo PBS (8).

## 7.6. Experimento 7: Quantificação da liberação de NO induzida pela infusão de Spermine NONOate na MCPd

Neste experimento analisamos as RD apresentadas e a quantidade de NO que estava sendo produzido pela menor e a maior dose de Spermine NONOate utilizadas durante a sessão de condicionamento. Os dados obtidos foram analisados mediante ANOVA de uma via, e se observou um efeito significativo do tratamento [ $F(2,9) = 42,90$ ;  $p = 0,000025$ ] para o parâmetro comportamentos defensivos (Fig. 19A) e a intensidade de fluorescência que estava sendo emitida [ $F(2,15) = 31,00$ ;  $p = 0,000005$ ] (Fig. 19B). O teste *post hoc* Newman Keuls indicou que ambas as doses

induziram fortes RD quando comparadas com o grupo que recebeu PBS, e que por sua vez as doses eram diferentes entre elas em relação aos níveis de NO produzido. Como pode ser observado na Figura 19, a dose de SP 80 nmol produz RD e emite fluorescência muito mais robustas do que a dose de SP 5 nmol.

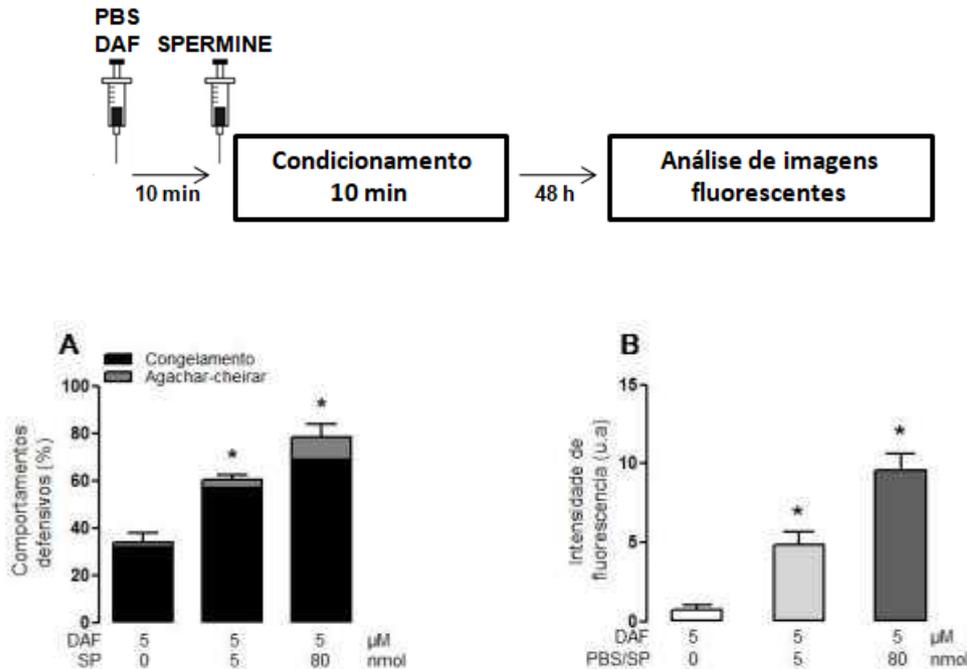


Figura 19. Acima o fluxograma indicando o delineamento experimental. À esquerda, comportamentos defensivos (A) observados durante a sessão de condicionamento induzidos pela microinjeção de PBS ou SP 5 ou 80 nmol após a administração da sonda fluorescente DAF-FM DA 5 µM. À direita, dados da intensidade de fluorescência das imagens obtidas a partir de cortes coronais da MCPd e analisados mediante o software ImageJ® (B). Todos os dados foram analisados mediante ANOVA de uma via seguido do *post hoc* Newman-Keuls. As colunas representam a média ± e.p.m. \* $p < 0.05$  dos grupos SP 5 nmol (3) e SP 80 nmol (3) comparado ao grupo PBS (3).

### **Grupo experimental 2: Participação do NO na expressão de respostas aprendidas durante o CAO**

#### **7.7. Experimento 8: Efeitos da interferência dada pela inibição da nNOS e a captura do NO na fenda sináptica sobre a expressão de uma memória aversiva**

Neste experimento foram realizadas interferências farmacológicas no dia da sessão de teste com o intuito de verificar se a inibição ou o sequestro de NO na fenda sináptica poderiam influenciar na expressão das respostas comportamentais frente à reexposição dos animais ao odor previamente pareado com a microinjeção de NMDA 50 pmol (EI) no paradigma do CAO.

A análise realizada mediante ANOVA de uma via revelou um efeito do tratamento [ $F(3,27)= 8,93$ ;  $p= 0,00028$ ] sobre os comportamentos defensivos (Fig. 20A) e [ $F(3,27)= 8,08$ ;  $p= 0,00053$ ] para comportamentos não defensivos (Fig. 20B), avaliados na sessão de condicionamento. O teste *post hoc* Newman Keuls mostrou que os grupos que receberam NMDA 50 pmol apresentaram um incremento das RD e uma diminuição de comportamentos não defensivos quando comparados com o grupo PBS.

Antes da sessão de teste foram administrados 3 tratamentos diferentes, PBS, 7NI 100 nmol e C-PTIO 2 nmol. Observou-se um efeito significativo do fator tratamento [ $F(3,27)= 6,57$ ;  $p= 0,0017$ ] sobre a expressão das respostas evocadas pelo odor de acetato de amila. Como pode observar-se na Fig. 20C a análise *post hoc* (N.K) mostrou que os grupos que tinham sido condicionados mediante a infusão de NMDA 50 pmol, e que no dia do teste receberam PBS ou 7NI, não foram influenciados por estes tratamentos quando comparados com o grupo que recebeu C-PTIO, o qual ficou no compartimento fechado quase o mesmo tempo que o grupo controle PBS-PBS, demonstrando a interferência do C-PTIO durante a evocação das respostas aprendidas. Não foram encontradas diferenças significativas para o parâmetro %TA.

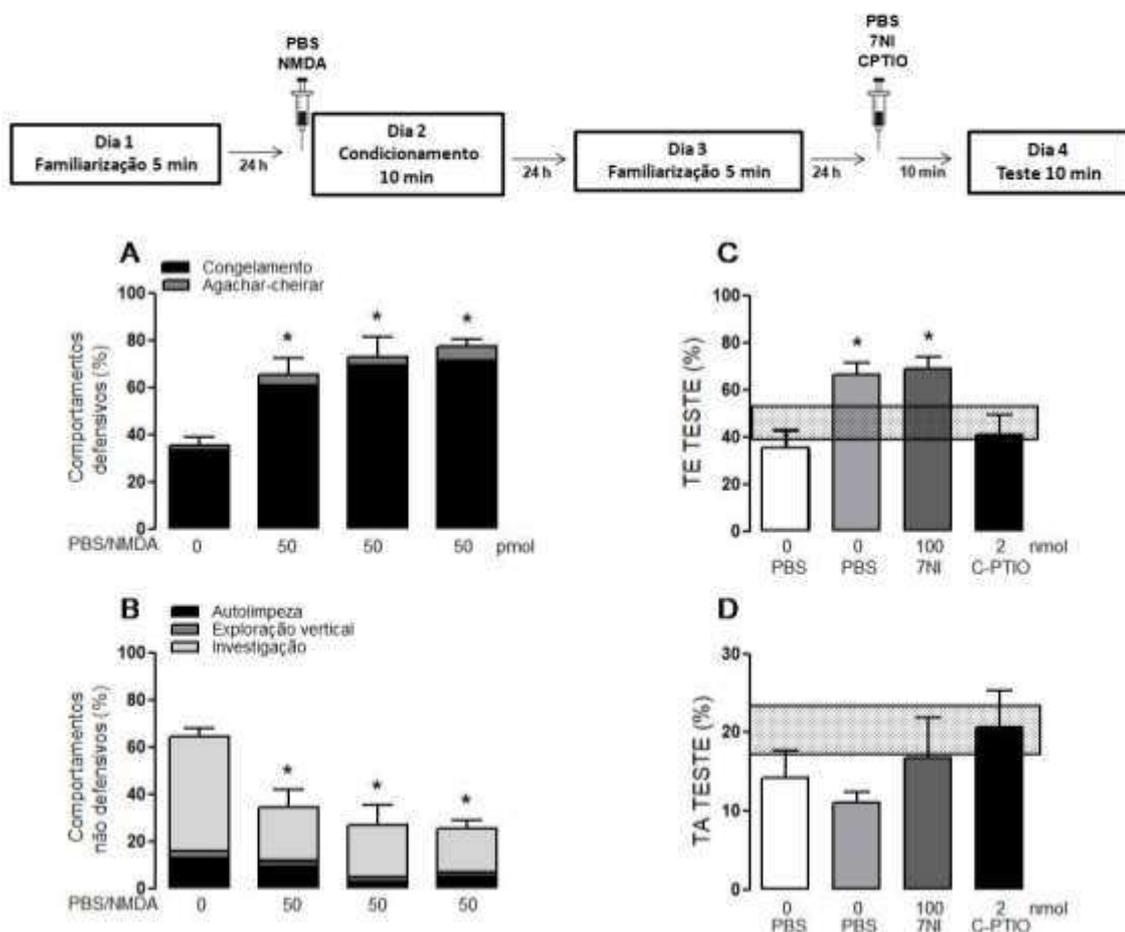


Figura 20. Acima o fluxograma indicando o delineamento experimental. À esquerda, comportamentos defensivos (A) e não defensivos (B) observados durante a sessão de condicionamento no CAO induzidos pela microinjeção de PBS ou NMDA 50 pmol na MCPd. À direita, expressão dos comportamentos de % de tempo escondido (C) e tempo próximo a fonte de odor (D) apresentados durante a sessão de teste. Antes da reexposição ao EC foi administrado PBS (8), 7NI 100 nmol (8) ou C-PTIO 2 nmol (8). As colunas representam a média  $\pm$  e.p.m. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. Todos os dados foram analisados mediante ANOVA de uma via seguido do *post hoc* Newman-Keuls. \* $p < 0.05$  comparado ao grupo PBS.

### 7.8. Experimento 9: Quantificação *in vivo* do NO produzido durante a evocação de uma memória aversiva

Como não foi observado um efeito do inibidor 7NI sobre a expressão dos comportamentos evocados pela reexposição à pista olfatória no experimento anterior, avaliamos os níveis de NO produzidos na sessão de teste.

A Figura 21 ilustra os dados do comportamento no CAO e a quantificação de NO durante esta sessão. A análise dos dados foi realizada utilizando ANOVA de uma via, e foi observado um efeito do tratamento [ $F(1,4) = 19,30$ ;  $p = 0,0117$ ] sobre os comportamentos defensivos avaliados na sessão de condicionamento (Fig. 21A), e para %TE [ $F(1,4) = 26,39$ ;  $p = 0,0068$ ] avaliado na sessão de teste (Fig. 21C). O teste

*post hoc* Newman Keuls revelou uma clara diferença entre o grupo que recebeu NMDA 50 pmol, quem mostrou um incremento das RD durante a sessão de condicionamento e passou mais tempo no compartimento fechado no dia do teste, em comparação com o grupo que recebeu PBS. Na sessão de teste não foram observadas diferenças significativas para intensidade de fluorescência, o que indica que não houve um incremento significativo na quantidade de NO liberado quando os animais foram reexpostos ao estímulo olfatório (Fig. 21B).

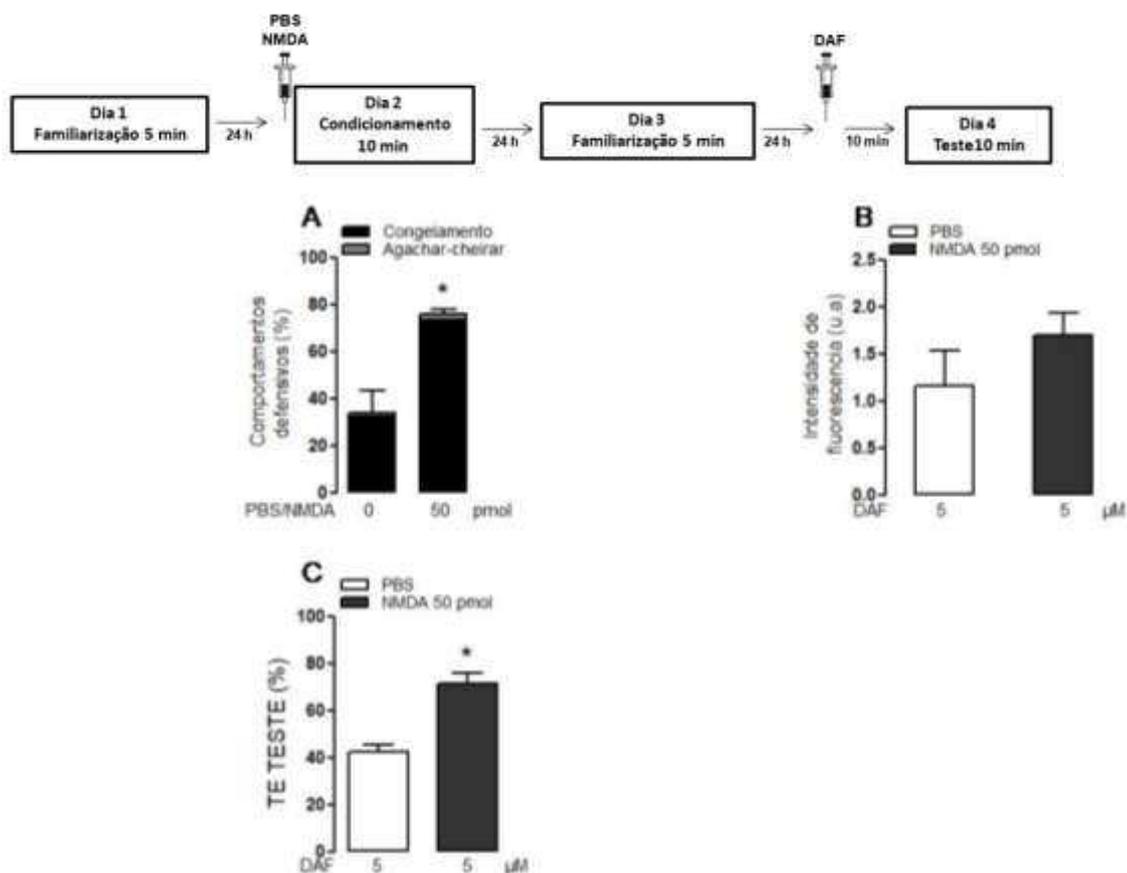


Figura 21. Acima o fluxograma indicando o delineamento experimental. À esquerda, comportamentos defensivos (A) observados durante a sessão de condicionamento no CAO induzidos pela microinjeção de PBS ou NMDA 50 pmol. À direita, dados obtidos da intensidade de fluorescência emitida após a infusão da sonda fluorescente DAF-FM DA 5  $\mu$ M antes da sessão de teste (B). C representa o parâmetro tempo escondido (%TE) avaliado durante a sessão de teste. Todos os dados foram analisados mediante ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* Newman-Keuls. As colunas representam a média  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0.05$  do grupo NMDA (3) comparado ao grupo PBS (3).

## 8. Discussão

---

As respostas defensivas (RD) inatas são fundamentais para a sobrevivência dos indivíduos durante as fases iniciais da sua vida. As experiências e aprendizagem possuem grande relevância, pois modificam os comportamentos defensivos ao longo da ontogenia levando a maturação, reorganização e configuração das RD expressadas diante um entorno dinâmico.

Paradigmas de condicionamento de tipo Pavloviano são muito úteis para o estudo dos circuitos e mecanismos neuronais envolvidos nas RD e aprendizado. Das estruturas envolvidas nestes circuitos a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) foi considerada durante muito tempo uma interface anatômica e funcional responsável pela integração de informações provenientes de diferentes áreas encefálicas e instrução de comportamentos e respostas autonômicas associadas às RD (para revisão ver Benarroch, 2012). No entanto, sabe-se hoje que a MCP possui a capacidade de promover aprendizagem e modular processos mais complexos mediante a regulação fina de uma intrincada rede de neurotransmissão (Kincheski e col., 2012; Back e Carobrez, 2018).

Devido a forte presença de neurônios imunoreativos (IR) para nNOS na porção rostro-dorsal da MCP todos os experimentos realizados durante este trabalho foram dirigidos para esta área. Além disso, considerando que o sistema olfatório de roedores, altamente desenvolvido, possui um grande número de células positivas para nNOS, e que as vias de sinalização do NO podem processar as informações resultantes de pistas olfatórias, neste estudo avaliamos o papel do óxido nítrico durante as respostas defensivas imediatas eliciadas pela estimulação química da MCPd e sua participação no processo de aquisição de um condicionamento aversivo olfatório (CAO).

Sem dúvida, as respostas comportamentais imediatas, aprendizagem e os processos mnemônicos não são eventos unitários e como veremos ao longo desta discussão o NO age de diferentes formas dependendo do paradigma comportamental empregado, das doses e os tempos utilizados, e das fases da memória testadas, provavelmente devido a sua característica de neurotransmissor promíscuo.

*Efeitos da inibição da nNOS sobre as respostas defensivas imediatas e aquisição de uma memória aversiva*

A estimulação da MCPd mediada pela administração de NMDA produz um incremento significativo nos níveis de NO endógeno. Com o objetivo de estudar o papel deste tanto nas respostas defensivas imediatas quanto na aquisição do CAO no primeiro experimento deste trabalho foram utilizadas duas doses do inibidor seletivo para nNOS, o 7NI. Nossos resultados demonstraram que nas nossas condições experimentais apenas a maior dose de 7NI foi capaz de reduzir as RD induzidas pela microinjeção de NMDA, o que está de acordo com o observado por Spolidório e colaboradores (2007) quando duas doses de 7NI foram testadas no hipocampo dorsal antes da exposição ao LCE e o teste de Vogel. Eles relataram que das duas doses utilizadas, 10 e 100 nmol, só a microinjeção de 100 nmol produz efeitos ansiolíticos no LCE; da mesma forma para o teste de Vogel, doses de 30 e 100 nmol foram testadas e novamente só a maior dose foi capaz de induzir um incremento no número de lambidas neste teste. Por outro lado, a administração de uma dose de 7NI 40 nmol na MCPdl em um paradigma no qual foi administrado sistemicamente 1.0 g/kg de álcool antes da exposição ao labirinto em cruz elevado (LCE) gerou um efeito ansiolítico (Morato e col., 2004).

A efetividade dos inibidores da NOS para atenuar as RD em diferentes paradigmas está amplamente documentada na literatura. Inibidores não seletivos da NOS como L-NOARG injetado tanto sistemicamente (De Oliveira e col., 1997) quanto intra-MCPd (Guimaraes e col., 1994) produziram efeitos tipo- ansiolíticos no LCE. L-NAME reduziu a latência da esquivia inibitória no labirinto em T elevado quando microinjetado 5 min antes no ventrículo lateral (Calixto e col., 2008). NPLA foi efetivo também ao diminuir as RD apresentadas por roedores na presença de um predador vivo (Aguiar e Guimaraes, 2009), e por camundongos no paradigma de exposição ao rato (RET do inglês -*Rat exposure test*-) (Carvalho-Netto e col., 2009).

No entanto, a administração de inibidores da NOS antes da modulação química da MCPdl tem gerado diversos resultados. Aguiar e colaboradores (2006) observaram em experimentos realizados em ratos, que a administração do inibidor L-NAME (100 e 200 nmol) não conseguiu impedir as reações imediatas de fuga e salto induzidas pela microinjeção de NMDA (0,1 nmol) intra-MCPdl durante os minutos iniciais após sua administração, o que sugere que as respostas

comportamentais observadas a partir da estimulação exógena do receptor NMDA não dependem da ativação da via nitrérgica. Por outro lado, um estudo similar, realizado em camundongos, demonstrou que a administração de NPLA (0,4 nmol) antes da estimulação com NMDA (0,04 nmol), foi capaz de reduzir significativamente os comportamentos de salto, corrida e freezing observados durante um tempo de 5 min (Miguel e Nunes de Souza, 2006). Além disso, NPLA também foi efetivo ao reduzir significativamente o comportamento de freezing induzido pela estimulação da MCPdl mediante a microinjeção do antagonista CB1, AM251, e do agonista TRPV1, Capsaicina (Uliana e col., 2016). A diferença encontrada por estes pesquisadores no efeito dos inibidores da NOS pode ser devido à espécie de roedor utilizada, às doses de NMDA empregadas para a estimulação da MCPdl ou também pode ser pelo tempo de observação e quantificação dos caracteres observados.

Como destacado anteriormente o NO não apresenta o padrão de comportamento típico dos neurotransmissores convencionais e as respostas observadas dependem tanto do paradigma empregado quanto das doses e tempos utilizados durante a sessão experimental. Portanto, o resultado observado no nosso estudo, no qual apenas a maior dose de 7NI foi capaz de reduzir as RD induzidas pela microinjeção de NMDA na MCPd, está de acordo com o observado por outros pesquisadores onde a modulação das RD imediatas foram dependentes das doses utilizadas, dos tempos avaliados, e da intensidade do estímulo utilizado.

As intervenções farmacológicas realizadas antes da exposição à sessão de condicionamento influenciam tanto nas RD imediatas quanto na associação do estímulo incondicionado com o estímulo inicialmente neutro. A grande maioria dos estudos encontrados na literatura avaliam apenas o papel do NO nas RD eliciadas pela MCPd frente a estímulos aversivos, porém, poucas pesquisas tem relatado os efeitos da inibição da síntese de NO sobre a aquisição de um condicionamento coordenado por esta estrutura.

Quando analisada a aquisição do CAO na sessão de teste observamos que apesar da menor dose de 7NI não ter influenciado as RD durante a sessão de condicionamento, ambas as doses prejudicaram o aprendizado, confirmando a participação do NO durante o processo de associação no CAO.

Investigações realizadas em outras espécies de animais têm relatado efeitos controversos em relação à participação do NO em processos mnemônicos. A inibição da NOS mediante o uso de NOArg ou L-NAME em abelhas *Apis mellifera*

antes do condicionamento olfatório não inibiu a resposta de expansão da probóscide (REP) durante a sessão de condicionamento, nem a aquisição quando foi utilizado um treinamento simples, porém, a aquisição e a memória de longo duração foram influenciadas pela inibição da NOS quando foi utilizado um treinamento múltiplo, observando-se uma forte diminuição do REP 24 horas após (Müller, 1996).

Um estudo baseado no comportamento alimentar de *Aplysia* testou se a inibição da NOS mediante a administração de L-NAME seria capaz de influenciar no aprendizado da tarefa. A administração de L-NAME 10 minutos antes do treinamento não interferiu com o comportamento alimentar *per se*, porém bloqueou a formação das memórias a curto, médio e longo prazo. (Katzoff e col., 2002). Da mesma forma, um estudo baseado no comportamento alimentar do molusco *Hélix* também demonstrou que a administração de L-NAME não interfere no comportamento espontâneo, porém prejudicou o aprendizado, já que o grupo que recebeu o tratamento com inibidor da NOS demorou mais tempo para encontrar o alimento em comparação com o grupo controle (Teyke, 1996). Assim, os dados antes citados dão suporte ao observado no nosso primeiro experimento, no qual a menor dose de 7NI apesar de não interferir nas RD imediatas na sessão de condicionamento foi capaz de prejudicar a aquisição do CAO da mesma forma que a maior dose.

Além disso, Rufino e colaboradores (2019) mostraram recentemente que a administração de NPLA na MCPd imediatamente após a exposição de um roedor a um predador, prejudica a aquisição do condicionamento contextual. Reforçando a importância da manutenção de níveis ótimos de NO durante a fase de aquisição até entrar na fase de consolidação da memória aversiva.

Alguns autores têm argumentado que a inibição não específica da NOS poderia prejudicar a aprendizagem e memória devido a um incremento na pressão arterial (Takahashi e col., 1985) decorrente da vasoconstrição e consequente diminuição do fluxo sanguíneo para o encéfalo (Paul e Ekambaram, 2011) já que o NO se caracteriza por induzir o relaxamento dos vasos sanguíneos e incrementar o fluxo de sangue para o encéfalo (Garthwaite e Boulton, 1995). No entanto, o composto 7-Nitroindazole (7NI), utilizado neste trabalho, inibe a NOS por competição com L-arginina e tetrahidrobiopterina e apresenta uma seletividade 10 vezes maior pela isoforma neuronal (nNOS) (Wolff e Gribbin, 1994). Desta forma o 7NI parece não afetar a isoforma endotelial da NOS a qual participa da regulação do fluxo sanguíneo encefálico (Yildiz e col., 2007). Dando suporte a que o prejuízo observado

na aquisição do CAO durante nosso primeiro experimento é decorrente da atividade da nNOS.

*Efeitos da captura do NO na fenda sináptica sobre as respostas defensivas imediatas e a aquisição de uma memória aversiva*

Com o objetivo de complementar a informação proporcionada pela inibição seletiva da nNOS, no nosso segundo experimento utilizamos um sequestrador de NO e de outras espécies reativas de oxigênio, C-PTIO, o qual ao agir extracelularmente consegue capturar tanto o NO formado no citoplasma pós-sináptico que se difunde através da membrana para pré-sinapse, quanto o NO produzido por outras isoformas da NOS que poderia influenciar nos resultados observados nesta pesquisa.

Duas doses de C-PTIO foram utilizadas para o segundo experimento deste trabalho, no qual se observou que ambas foram capazes de reduzir as RD induzidas pela infusão de NMDA, confirmando que a captura do NO na fenda sináptica interfere com as respostas imediatas como sugerido por outros trabalhos nos quais a administração de C-PTIO gerou efeitos de tipo ansiolítico antes da exposição ao LCE (File, S., 1992; Guimaraes e col., 2005; Lisboa e col., 2013).

A diminuição das RD apresentadas pelos grupos que receberam a menor dose de C-PTIO durante a sessão de condicionamento se manteve no dia da familiarização. Uma diminuição significativa no tempo permanecido no compartimento fechado acompanhado pelo aumento da aproximação a fonte de odor, em ausência do estímulo olfatório, foi evidenciado nesta sessão tanto para o grupo controle quanto para o grupo que recebeu a estimulação química no dia anterior.

Deve considerar-se que na MCPd, o NO interage de forma complexa com outros sistema de neurotransmissão como glutamato, GABA, serotoninérgico e endocanabinoide (De Petrocellis e col., 2004, Lisboa e col., 2013). Como C-PTIO interfere na transmissão nitrérgica de uma forma geral e influencia também outros sistemas de neurotransmissão, os comportamentos observados na sessão de familiarização provavelmente foram devido a que 24 horas não foi suficiente para os sistemas alterados voltarem para seu equilíbrio basal. O restabelecimento do comportamento esperado para o grupo controle, foi observado na sessão de teste

no dia seguinte a familiarização, dando suporte a nossa hipótese da demora para os sistemas sinápticos retornarem ao seu equilíbrio químico.

No contexto da aprendizagem e a memória, como relatado anteriormente para inibidores da NOS, existe pouca informação disponível na literatura sobre a interferência que pode causar a captura do NO sobre a aquisição de um condicionamento. Na sessão de teste deste experimento foi observada uma diminuição na porcentagem do tempo que os grupos que receberam C-PTIO permaneceram no compartimento fechado, assim como um incremento do tempo aproximado ao estímulo olfatório, o que indica que a administração de C-PTIO 10 min antes do condicionamento prejudicou a aquisição do CAO.

Nossos resultados coincidem com o observado em experimentos realizados em *Aplysia californica* utilizando um paradigma de condicionamento alimentar no qual foram contabilizadas as tentativas por engolir um alimento enredado numa rede. No referido trabalho demonstraram que a captura de NO mediante administração de C-PTIO antes da sessão de treinamento não influenciou os comportamentos alimentares *per se*, porém, quando os animais foram reexpostos a esta tarefa apresentaram um prejuízo tanto na aprendizagem, quanto na memória de longa duração (Katzoff e col., 2002).

#### *Quantificação in vivo do nível de NO produzido pela estimulação química da MCPd mediante a administração de NMDA*

Considerando que a MCPd apresenta uma abundante quantidade de neurônios imunoreativos para nNOS na região rostro-dorsal, migrando caudalmente para ventral (Onstott, 1993); durante o desenvolvimento deste trabalho o terceiro experimento teve como objetivo a padronização de um protocolo para a quantificação de NO *in vivo* mediante o uso de uma sonda inicialmente neutra, que ao reagir com NO emite fluorescência permitindo que as imagens biológicas obtidas sejam medidas em softwares digitais como ImageJ<sup>®</sup>.

Ao ser o NO um radical livre, altamente difusível e com uma meia vida muito curta, a obtenção de uma medida direta que proporcione informação espaço-temporal adequada é um grande desafio. Kojima e colaboradores (1999) desenvolveram uma série de sondas baseadas nas características das diaminofluoresceínas, das quais, as características de independência do pH,

fotoestabilidade, e maior sensibilidade, apresentadas pela sonda DAF-FM DIACETATO nos levaram a sua escolha para a padronização deste protocolo.

O estudo da cinética de ativação de DAF-FM DA na presença de NO utilizando o doador de NO Spermine NONOate (Namim e col., 2013) tem demonstrado que existe uma relação linear entre a intensidade de fluorescência (IF) e a concentração de NO liberado por diferentes doses do doador empregado. Quando a concentração de DAF-FM DA administrada é maior do que a concentração de NO produzida a pendente é proporcional a concentração de NO e independente da concentração de DAF-FM DA. No entanto, em presença de grandes quantidades de NO foi observada uma saturação de DAF-FM, portanto, a calibração da relação [DAF-FM] vs [NO] resulta de suma importância na padronização de um protocolo de quantificação baseado em sondas fluorescentes, pelo qual durante os testes realizados neste experimento duas doses de DAF-FM DA, 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  foram empregadas. Não observando-se diferenças significativas entre a fluorescência emitida por elas optamos por utilizar a menor dose testada.

Por outro lado, Broillet e colaboradores (2001) relataram que a presença de cátions como  $\text{Ca}^{2+}$  pode produzir um incremento na fluorescência, portanto, também testamos um protocolo de descalcificação utilizando uma solução de EDTA 0,5 M, porém nas nossas condições experimentais foi observado um incremento da fluorescência no grupo que passou pela descalcificação, razão pela qual este passo do protocolo foi descartado.

Finalmente, o protocolo descrito no experimento três nas condições utilizadas neste trabalho se mostrou sensível a mudanças na concentração de NO quantificado quando utilizadas diferentes doses de compostos estimulantes, o que foi evidenciado pela diferença na quantificação da IF emitida como será descrito ao longo desta discussão.

Além disso, como DAF-FM DA se liga de forma irreversível ao NO outorgando estabilidade à fluorescência observada, pois a mesma não desaparece após a eliminação do NO (Namin e col., 2013), com o objetivo de verificar se esta ligação poderia interferir nas RD observadas devido à diminuição do NO disponível, fizemos uma análise minuto a minuto dos comportamentos expressados durante a sessão de condicionamento por um grupo estimulado com NMDA e um grupo que recebeu DAF-FM DA antes da estimulação com a mesma dose de NMDA. Como representado na Figura 14, a maioria dos parâmetros comportamentais avaliados

não apresentaram influência da sonda fluorescente, sobre os parâmetros comportamentais analisados na sessão de condicionamento, indicando que o uso desta sonda não interfere com os comportamentos, o que resulta uma vantagem deste protocolo para quantificar NO em sistemas *in vivo*.

#### *Intensidade de ativação da MCPd quando é estimulada pela infusão de NMDA*

A estimulação de receptores NMDA é o principal fator ativador da síntese de NO endógeno, então, com o intuito de correlacionar os níveis de NO produzido pelas diferentes doses de NMDA empregadas em trabalhos anteriores do nosso laboratório, com as respostas comportamentais observadas para cada caso, no quarto experimento deste estudo foi realizada a quantificação do NO produzido pela estimulação da MCPd utilizando três doses de NMDA, uma dose sub-efetiva, uma efetiva e uma dose alta.

Na Figura 13B observa-se um incremento significativo da fluorescência nos grupos que receberam as doses mais altas de NMDA em relação ao grupo controle e o grupo que recebeu a dose sub-efetiva, o que se correlaciona com as respostas comportamentais observadas em trabalhos anteriores realizados no nosso laboratório (Kincheski e col., 2012; Back e Carobrez, 2018). Quando avaliamos o comportamento apresentado imediatamente após a estimulação química da MCPd e os níveis de NO produzidos, observamos que efetivamente o grupo que recebeu a menor dose de NMDA apresenta RD leves e um IF baixo, o que pode ser correlacionado com uma IF similar ao grupo controle, dando suporte à falta de efetividade desta dose. Por outro lado, o grupo que recebeu a maior dose de NMDA apresentou fortes RD durante esta sessão e uma IF que duplicou a IF do grupo NMDA 50 pmol, e foi 5 vezes mais intensa que os outros grupos. A dose efetiva de NMDA, capaz de promover RD e aprendizagem, apresenta um incremento de 2 vezes maior na IF em comparação com o grupo controle e o grupo que recebeu a menor dose de NMDA. Assim, os dados obtidos neste experimento nos permitem fazer uma correlação direta dos comportamentos observados após a administração de diferentes doses de NMDA com o nível de NO produzido por esta estimulação, observado pela IF medida pelo método de quantificação aqui proposto, fornecendo desta forma suporte bioquímico aos resultados observados em pesquisas realizadas anteriormente neste laboratório.

Por outro lado, durante a padronização do CAO realizada no nosso laboratório, quatro doses de NMDA foram microinjetadas numa região mais caudal da MCPdl por Kincheski e colaboradores (2012). Eles observaram que apenas a dose de 100 nmol foi capaz de induzir a associação entre o estímulo aversivo e o odor de acetato de amila (Kincheski e col., 2012). No entanto, outros pesquisadores deste grupo de investigação observaram que na região rostral desta coluna da MCP, a dose de 50 pmol foi capaz de dar suporte a aquisição do CAO (Zanella, 2015; Sperandio, 2016; Webber, 2017; Back e Carobrez, 2018). A hipótese geralmente aceita para esta diferença regional na resposta a diferentes doses é que existe uma densidade de receptores para NMDA distribuída diferencialmente ao longo eixo rostro caudal (Albin e col., 1990). No entanto, continuando na linha de pensamento, que correlaciona os níveis de NO produzidos pela estimulação de receptores NMDA, e considerando os numerosos neurônios imunoreativos para nNOS encontrados na região rostro-dorsal da MCPd, é possível pensar na probabilidade destes estarem colaborando para potencialização da neurotransmissão glutamatérgica, pelo qual uma dose de NMDA 50 pmol seria capaz de gerar as mesmas respostas observadas na região mais caudal pela dose de 100 pmol, reforçando a idéia da modulação comportamental gerada em conjunto pelos sistemas glutamatérgico-nitrérgico.

Neste contexto, e com o intuito de confirmar os dados obtidos no primeiro experimento deste trabalho, no quinto experimento realizamos a quantificação de NO após a inibição da nNOS. Aqui observamos que novamente os dados comportamentais avaliados durante a sessão de condicionamento foram diretamente proporcionais a IF observada. Note-se que os grupos que não receberam a infusão de DAF-FM DA não apresentaram autofluorescência *per se*. Por outro lado, o grupo controle expressou um IF característico da expressão basal de NO diante o estímulo físico da microinjeção e o grupo NMDA manifestou altos níveis de NO evidenciados pela elevada IF. Já o grupo que recebeu a infusão do inibidor 10 min após a microinjeção de DAF-FM DA e 10 min antes da estimulação com NMDA, apresentou uma IF ainda menor que a observada para o grupo controle, o que indica que a inibição da nNOS foi capaz de reduzir a produção basal de NO da MCPd neste experimento, dando suporte aos resultados observados no primeiro experimento deste trabalho, no qual a maior dose de 7NI foi capaz de reduzir as RD induzidas pela microinjeção de NMDA até níveis menores que o grupo controle e prejudicar a aquisição do CAO.

### *Estimulação química da MCPd mediante a administração do doador de NO Spermine NONOate*

No sexto experimento deste trabalho testamos se a estimulação química da MCPd mediante a infusão do doador de NO Spermine NONOate (SP) seria capaz de promover aprendizagem no CAO quando utilizada como EI.

A curva dose-resposta demonstra um incremento das RD diretamente proporcional ao incremento das doses de Spermine NONOate (SP) utilizadas. No entanto, as respostas comportamentais condicionadas observadas no dia do teste foram inversamente proporcionais às doses de SP administradas. Quanto maior a dose de SP administrada maior foi a intensidade das RD durante a sessão de condicionamento e menor a resposta condicionada no dia do teste.

Nossos dados estão de acordo com a literatura que mostra que a microinjeção intra-MCPdl de doadores de NO como NOC-9 (Braga e col., 2009), SIN-1 e DEA/NO provocam respostas defensivas como fuga e salto acompanhadas por um incremento da expressão de c-FOS nesta estrutura (De Oliveira e col., 2000a). Como estas respostas foram atenuadas pela administração de antagonistas dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos, AP7 e NBQX (Moreira e col., 2004), se sugere que as RD observadas após a infusão de doadores de NO estaria mediada pela liberação de glutamato facilitada pelo incremento nas concentrações de NO.

Em relação à aprendizagem, no dia da sessão de teste das cinco doses de SP que foram utilizadas neste experimento, apenas a menor dose de SP foi capaz de induzir a aquisição da memória olfatória aversiva na MCPd. Neste contexto, a partir do momento em que Kincheski e colaboradores (2012) demonstraram que a estimulação química da MCPdl foi capaz de dar suporte ao processo de aquisição do CAO, a investigação sobre a modulação neuroquímica deste evento vem sendo intensamente estudada no nosso laboratório. Assim, intervenções farmacológicas a fim de avaliar se outros sistemas de neurotransmissão poderiam induzir aquisição do CAO tem sido realizadas.

Back e Carobrez (2018) observaram que a modulação de outras vias bioquímicas foram capazes de promover aprendizado. Tanto a combinação de doses sub-efetivas de NMDA com o agonista inverso dos receptores CB1 quanto a ativação dos receptores TRPV1 mediante a administração de Capsaicina, foram capazes de promover a aquisição do CAO. Além disso, as interferências conjuntas

realizadas através do agonismo inverso de CB1 e a ativação do receptor TRPV1 no dia do condicionamento foram capazes de produzir RD e induzir a aquisição do CAO. Os agonistas CB1 reduzem a liberação de glutamato pré-sináptico mediante um mecanismo de sinalização retrógrada negativa reduzindo as RD (Castillo e col., 2012; Mechoulam e col., 2014, Back e Carobrez, 2018), enquanto os agonistas inversos geram o efeito contrário (Fogaça e col., 2012; Moreira e col., 2012, Back e Carobrez, 2018). De esta forma foi sugerido o papel do sistema eCB como regulador da liberação de glutamato pré-sináptico para os efeitos observados. No entanto, o bloqueio dos receptores NMDA não interferiu nas respostas incondicionadas nem condicionadas geradas pela ativação do receptor TRPV1, indicando que este sistema operou de forma independente destes receptores (Back e Carobrez, 2018).

Por outro lado, Bortoloci e Carobrez (2019) testaram a efetividade da estimulação de receptores AMPA como EI no paradigma do CAO. Apesar da estimulação destes receptores mediante a infusão de diferentes doses de ácido quisquálico gerar robustas RD durante a sessão de condicionamento, não foram observadas respostas condicionadas que indiquem a associação entre o EI e o odor de acetato de amila. No entanto, o bloqueio dos receptores NMDA antes da administração de ácido quisquálico conseguiu induzir a aquisição do CAO mesmo sem interferir nas RD apresentadas na sessão de condicionamento, o que indica a participação dos NMDAR durante o processo de aprendizagem.

As evidências até aqui apresentadas indicam que a participação da MCPd em processos de aprendizagem e memórias aversivas depende da manutenção de um ótimo equilíbrio na neurotransmissão global desta estrutura orquestrado principalmente pelo sistema glutamatérgico. Então, quais são as possíveis vias bioquímicas mediante as quais a administração de um doador de NO na MCPd foi capaz de promover aquisição do CAO?

Os doadores de NO medeiam processos relacionados com a via nitrérgica imitando a função fisiológica do NO endógeno. Características de reatividade química e cinética do composto particular, as vias bioquímicas que utiliza para produzir o NO, a quantidade e o tempo de liberação de NO são parâmetros que precisam ser analisados para cada procedimento experimental particular (Feelisch, 1998).

Alguns doadores precisam de reações enzimáticas e outros não, alguns dependem de processos de redução, oxidação e outros precisam de grupos tiol para produzir NO. Oxigênio, luz, temperatura e pH são condições que podem alterar os efeitos destes compostos, não só nas condições experimentais mas também durante a preparação das soluções e armazenamento de estoque (Feelisch, 1998) e portanto devem ser controlados já que muitas vezes influenciam nos resultados observados gerando discordâncias entre diferentes trabalhos.

Spermine NONOate libera  $1,7 \pm 0,1$  moles de NO a partir de cada NONOate dissociado, a meia vida dele é de 39 minutos a temperatura ( $37^{\circ}\text{C}$ ) e pH fisiológicos (7,4), e devido a sua reação de primeira ordem apresenta uma taxa de decomposição constante de  $0.019$  ( $0.002 \text{ min}^{-1}$ ) (Ramamurthi e Lewis, 1997), o que leva a uma cinética de liberação de NO sustentável que começa nos primeiros minutos após a administração do doador, produzindo-se um incremento de NO gradual até atingir o pico máximo de concentração aos 8-10 min aproximadamente (Namim e col., 2013). Portanto, as características deste agente fazem com que seja apropriado para ser utilizado nas nossas condições experimentais, nas quais o animal permanece exposto 10 minutos ao estímulo olfatório durante a sessão de condicionamento. A liberação gradual e sustentável acompanhada por um platô após atingir a concentração máxima permite que o NO exerça seus efeitos ao longo da sessão experimental e inclusive após a retirada do animal da caixa de condicionamento acompanhando assim todo o processo de associação necessário para aquisição do CAO.

O NO é uma molécula de grande relevância para manutenção da homeostase sináptica já que exerce um papel dual sobre a regulação da transmissão glutamatérgica. A estimulação adequada da MCPd mediante a infusão de doses mais baixas de NMDA e SP, ativa um mecanismo pré-sináptico de retroalimentação positiva induzido pelo NO agindo como mensageiro retrógrado. O NO gerado na pós-sinapse após a ativação dos NMDAR, se difunde através da membrana plasmática e ativa a GCs na pré-sinapse facilitando a liberação de glutamato necessária para os processos de plasticidade sináptica (Garthwaite, 2008). Além disso, a GCs ativa outras vias mediadas pela PKG, PKA (Müller, 2000) e a ADP-ribosilação (Schuman e col., 1994) que também participam de processos de aprendizagem e memória.

Assim, provavelmente a menor dose de SP utilizada neste trabalho foi capaz de dar suporte à aquisição do CAO devido a uma liberação de NO gradual e equilibrada que colaborou para a liberação de glutamato sustentável necessária para ativação de NMDAR e AMPAR e manutenção dos processos de plasticidade sináptica como LTP e LTD.

Por outro lado, o NO pode agir como regulador dos receptores NMDA e AMPA através de um mecanismo de retroalimentação negativa. A S-nitrosilação dos resíduos de cisteína C744, C789 na subunidade NR1 do NMDAR, ou nos resíduos de cisteína C87, C322 ou C399 na extremidade N extracelular da subunidade NR2A, inibe a atividade deste receptor na pós-sinapse (Choi e col., 2001). Além disso, na pré-sinapse, a S-nitrosilação da serina racemase, uma enzima que transforma L-serina em D-serina (co-agonista do receptor NMDA) diminui a disponibilidade de D-serina modulando assim indiretamente a transmissão glutamatérgica (Mustafa e col., 2007; Wang e col., 2012). Desta forma, a inibição da transmissão sináptica parece prevenir a estimulação excessiva dos NMDAR pós-sinápticos evitando assim possíveis lesões teciduais, excitotoxicidade e morte neuronal (Lipton e Rosenberg, 1994), o que por sua vez prejudica os processos de aprendizagem.

Além disso, proteínas que controlam o tráfego, expressão e funcionalidade dos receptores AMPA, como o fator sensível a N-etilmaleimida (NSF) e stagarzin, também podem ser reguladas pelo NO mediante o mecanismo de S-nitrosilação (Wang e col., 2012). NSF por exemplo, participa da estabilização e reciclagem dos AMPAR na membrana pós-sináptica mediante sua ligação com a subunidade GluR2 (Braithwaite e col., 2002) regulando assim o tráfego de receptores AMPA, processo necessário para o sucesso da LTP e sua manutenção (Yao e col., 2008). A S-nitrosilação deste fator induzida pela presença de NO, incrementa a associação entre NSF-GluR2 levando a uma maior expressão de AMPAR contendo esta subunidade na superfície neuronal (Huang e col., 2005), interferindo desta forma com o processo de plasticidade sináptica.

Este mecanismo de retroalimentação negativa poderia explicar os resultados comportamentais observados após a estimulação da MCPd com altas doses de NMDA (Kinchski e col., 2012; Back e Carobrez, 2018) ou SP neste trabalho. A administração de altas doses de NMDA e SP na MCPd induzem fortes respostas defensivas durante a sessão de condicionamento, porém não são capazes de promover a aquisição do CAO. Back e Carobrez (2018) sugeriram que este prejuízo

na associação entre o EI+EN poderia dever-se a desensibilização dos receptores AMPA.

Assim, podemos reforçar esta hipótese a partir das informações proporcionadas pela literatura, sugerindo que possivelmente, a incapacidade de altas doses para gerar aprendizado sob nossas condições experimentais seja produto da inibição da transmissão glutamatérgica induzida pelo NO perante uma ativação excessiva dos receptores NMDA denotando desta forma um efeito neuroprotetor exercido pelo NO no SNC com o custo de prejudicar o processo de aprendizado (Lipton e Rosenberg, 1994).

#### *Quantificação da liberação de NO induzida pela infusão de Spermine NONOate na MCPd*

A quantificação do NO liberado mediante o uso da sonda DAF-FM DA demonstrou que a maior dose de SP utilizada neste trabalho duplicou o nível de NO liberado em comparação com a menor dose. Mediante a comparação direta entre os comportamentos observados e o nível de NO produzido pelas diferentes doses de NMDA e as doses de SP utilizadas neste trabalho durante a sessão de condicionamento observamos que tanto a maior dose de SP quanto a maior dose de NMDA aqui empregadas, além de gerar RD semelhantes, não foram capazes de induzir aprendizado neste paradigma. Quando comparado o nível de NO produzido por elas observou-se que a maior dose de SP produziu um terço mais de NO que a dose de NMDA, portanto, estes resultados dão suporte à idéia de que a ativação de um mecanismo de retroalimentação negativo induzido pela elevada presença de NO tenha bloqueado o funcionamento normal da neurotransmissão glutamatérgica necessária para indução dos processos de plasticidade sináptica subjacentes ao aprendizado aversivo, prejudicando-o.

Ao comparar os resultados obtidos a partir da administração das doses efetivas de SP e NMDA observamos que apesar de SP induzir RD imediatas mais leves que NMDA na sessão de condicionamento, no dia do teste foi evidenciada a associação com a pista olfatória pareada. No entanto, a quantificação do NO revelou uma maior concentração de NO liberada pelo doador em comparação com o NO produzido a partir da estimulação com NMDA.

O fato de ser observada uma resposta mais robusta por parte do NMDA, apesar de liberar menos NO que SP, confirma que outros sistemas de

neurotransmissão estão envolvidos na modulação da MCPd mediando a estimulação do sistema glutamatérgico.

#### *Participação do NO na expressão de respostas aprendidas durante o CAO*

O processo de aprendizagem e formação de memórias encontram-se intimamente relacionados, porém, não constituem um processo unitário *per se* (Machado e col., 2008; Susswein e col., 2004). Assim, o experimento 8 deste trabalho foi realizado com o intuito de testar a participação do NO na evocação das respostas condicionadas durante a sessão de condicionamento. No dia do teste, foram administrados PBS, 7 NI ou C-PTIO, 10 minutos antes da exposição dos grupos à caixa de odor contendo a pista olfatória associada à estimulação da MCPd com NMDA no dia do condicionamento. Neste experimento o inibidor não foi capaz de bloquear a expressão das respostas condicionadas. Nossos resultados concordam com dados observados em experimentos realizados com outras espécies de animais. As ovelhas, logo após o nascimento dos cordeiros, associam o odor dos filhotes com o parto e se forma uma memória olfatória de reconhecimento seletiva. A administração de um antagonista glutamatérgico  $\gamma$ -D-glutamilglicina (DGG), do inibidor da NOS L-NARG ou da GCs, ODQ, antes do parto prejudica a formação da memória olfatória específica. No entanto, quando o bloqueio da NOS e a GCs se produz após a formação da memória, o reconhecimento específico não se vê afetado, demonstrando que a expressão desta memória olfatória seletiva não depende da síntese de NO (Kendrick e col., 1997). Da mesma forma, a inibição da NOS em abelhas *Apis mellifera* antes do condicionamento olfatório prejudica a aquisição influenciando a resposta de expansão da probóscide (REP), no entanto, quando inibidores da NOS foram administrados antes da sessão de teste deste experimento a fim de avaliar a evocação da memória, a REP não foi influenciada, reforçando a importância do NO para aquisição do condicionamento mas não para expressão das respostas (Müller, 1996).

Por outro lado, observa-se na Figura 20 que só o grupo que recebeu o seqüestrador extracelular C-PTIO apresentou uma interferência na expressão das respostas evocadas pela memória aversiva adquirida durante o CAO. Nossos resultados concordam parcialmente com o observado por Aguiar e colaboradores (2014) que administraram AP7 (antagonista de receptores NMDA), NPLA, C-PTIO e ODQ na MCPdI de roedores antes da exposição a um contexto previamente

condicionado com descargas elétricas. Neste trabalho eles observaram que tanto o bloqueio do receptor NMDA quanto a interferência em cada ponto crítico da via nitrérgica foram capazes de reduzir a expressão de freezing na sessão de teste.

O objetivo de infundir C-PTIO antes da sessão de teste foi sequestrar todo o NO que estava sendo produzido pelas diferentes NOS, já que a ativação de receptores NMDA pós-sinápticos leva a síntese de NO que colabora tanto da modulação funcional de terminais pré-sinápticos quanto em células gliais vizinhas (Garthwaite e col., 1988).

Neste contexto, os astrócitos, as principais células gliais do SNC, expressam as três isoformas de NOS (Gibson e col., 2005), e são os responsáveis pela liberação de NO a partir da iNOS. Na medula ventral de roedores foi observado que 20% do RNAm de NOS correspondia a iNOS (Chang e col., 2003), no córtex o 10% da atividade total da NOS era devida a iNOS (Buskila e col., 2005, 2010). Dentro da MCPd as três isoformas organizam-se para orquestrar a regulação dos níveis de síntese de NO durante eventos de estresse, dor, cardiovasculares, hipersensibilidade e nocicepção, entre outros (Lee e col., 2009; Payne e col., 2010; Chaitoff e col., 2012).

O estresse de restrição induz o incremento da atividade da nNOS (De Oliveira e col., 2000) e iNOS em áreas límbicas (Madrugal e col., 2001, 2003). Da mesma forma, o paradigma de sensibilização dependente do tempo (SDT) gerou um incremento na atividade das NOS no hipocampo de roedores, promovido principalmente pela isoforma iNOS, o qual demonstrou ser estável ao longo de 3 semanas de experimento (Harvey e col., 2003). O tratamento crônico com o inibidor 7NI não foi capaz de reduzir os níveis de NOS detectados após o SDT. No entanto, o tratamento com um inibidor seletivo para iNOS, aminoguanidina, conseguiu bloquear este incremento de NO, confirmando o papel predominante desta isoforma na liberação de NO.

A administração de inibidores da nNOS, iNOS, e C-PTIO intra-MCPdl durante um protocolo de retirada de álcool demonstrou que o NO participa dos comportamentos de tipo ansioso observados neste paradigma. Apesar de ambos inibidores ter diminuído as respostas de tipo ansiosa, o inibidor TRIM, seletivo para nNOS foi menos efetivo que o inibidor específico para iNOS, N-([3-(aminometil)fenil]metil) dihidrocloruro de etanimidamida (1400W), o que sugere que iNOS seria a fonte principal de síntese de NO (Bonassoli e col., 2013). O uso de um

inibidor não específico, L-NAME, diminuiu a expressão das respostas condicionadas gerando o mesmo perfil comportamental que quando utilizado 1400W, o que confirma a forte contribuição de outras isoformas, além da nNOS (Bonassoli e col., 2013).

Além disso, em camundongos *knock-out* para o gene iNOS foi observado um incremento na atividade das NOS constitutivas na amígdala e no córtex, o que sugere que além de uma contribuição das diferentes isoformas para modulação comportamental, existe um mecanismo compensatório para produção de NO ante o déficit de alguma delas (Buskila et al., 2007; Gilhotra and Dhingra, 2009).

Considerando a informação apresentada até agora, provavelmente os resultados observados neste experimento sejam devido a que o inibidor específico da nNOS utilizado aqui não teve a capacidade de bloquear a expressão da memória aversiva adquirida por existir uma contribuição de NO proporcionado pela ativação das outras NOS circundantes. No entanto, C-PTIO, ao interferir com todo o NO circundante conseguiu bloquear a evocação da memória adquirida.

Com o objetivo de desvendar esta hipótese, realizamos a quantificação de NO produzido na MCPd durante a sessão de teste mediante o uso da sonda DAF-FM DA. Como ilustrado na Figura 21, no dia do teste não foi observada uma diferença significativa entre a IF gerada pelo grupo controle e o grupo que foi condicionado com NMDA na sessão de condicionamento. Este resultado indica que a reexposição à pista olfatória nesta sessão não foi capaz de induzir um incremento robusto nos níveis de NO produzidos na MCPd.

No entanto, devemos considerar que para a quantificação de IF o n utilizado é muito menor aquele utilizado nos experimentos comportamentais o que poderia estar mascarando um resultado significativo e portanto estudos mais específicos deveram ser realizados para tentar compreender porque a administração de C-PTIO consegue interferir com esta expressão.

*O NO e sua participação na modulação da MCPd: possíveis vias para sua contribuição à aquisição do CAO*

O envolvimento do sistema glutamatérgico nos comportamentos observados em paradigmas de condicionamento aversivo é uma área da neurofarmacologia de intensa investigação. No nosso laboratório, a estimulação química da MCPd por NMDA vem sendo utilizada rotineiramente com o intuito de melhor compreender

como diversos sistemas de neurotransmissores desta região interagem para promover RD e a aquisição do CAO.

Considerando que a produção de óxido nítrico é principalmente desencadeada pela ativação de receptores NMDA, e que, pelas suas características de difusão o NO pode agir tanto no sítio de sua síntese (pós-sinapse) quanto em células vizinhas, como outros neurônios, células da glia ou na pré-sinapse como mensageiro retrógrado, onde pode modular a liberação de outros neurotransmissores, esforços para compreender como a via nitrérgica participa desta complexa rede de comunicação foram realizados mediante a interpretação dos resultados obtidos neste trabalho e a informação disponível na literatura.

A estimulação do receptor NMDA gera um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, o qual ao interagir com a proteína Calmodulina leva a ativação tanto da NOS (enzima encarregada de sintetizar NO) quanto da quinase dependente de CaM II, CamKII, a qual sabe-se que incrementa a função do receptor AMPA através de fosforilação, a inserção de receptores AMPA na membrana sináptica e a formação de espinhas dendríticas (Robison, 2014), eventos importantes para o aprendizado e formação de memórias. Em relação à via nitrérgica, CamKII é capaz de regular a síntese de NO, ao fosforilar o resíduo de serina S487 da nNOS (Rameau e col, 2004) o que deixa a nNOS em um estado “inativo”.

Além disso, a ativação do NMDAR leva a fosforilação de outro resíduo de serina na nNOS, o S1412, a qual é mediada pela enzima Akt, regulada pela quinase PI3, levando a nNOS a um estado “ativo”. Organismos apresentando S1412 fosforilado mostraram um incremento da expressão na superfície da membrana de subunidades GluR2 de receptores AMPA, este incremento provavelmente se deve a S-nitrosilação da NSF que recruta estas subunidades para a superfície neuronal (Rameau e col., 2007).

Por outro lado, o NO ativa a via GCs-GMPc que leva a ativação da proteína quinase C (PKC), uma proteína que participa da fosforilação da MAPK (proteína mitógena ativada por quinase) a qual resulta crítica para a plasticidade e formação de memórias (Willard e col., 2013).

Outra forma pela qual o NO pode agir é mediante a difusão para a pré-sinapse onde ativa a enzima GCs a qual desencadeia mecanismos de segundos mensageiros que levam a facilitação da liberação de glutamato para fenda sináptica gerando um ciclo de retroalimentação positiva.

A ativação da GCs mediada pelo NO na pós-sinapse, também leva a ativação da quinase dependente de GMPc II, cGKII, a qual é capaz de fosforilar a S845 da subunidade GluR1 o que leva a um incremento da expressão desta subunidade na membrana plasmática, participando também desta forma com o tráfego AMPA (Serulle e col., 2008).

Por tanto, com base nas informações apresentadas observamos algumas das vias pelas quais o NO participa da modulação do tráfego de receptores AMPA e outros processos associados a eventos de plasticidade sináptica necessários para aquisição do CAO.

Além disso, dados da literatura têm demonstrado que a modulação da atividade da nNOS por parte de Akt e CamKII mantem o equilíbrio de síntese de NO. Enquanto a ativação adequada de nNOS influencia na funcionalidade, tráfego e inserção de receptores AMPA na membrana sináptica, eventos necessários para o sucesso dos processos de plasticidade sináptica envolvidos no aprendizado, uma estimulação excessiva dos receptores NMDA pode levar a fosforilação de resíduos S1412 mas não de S847 produzindo-se um desbalanço no equilíbrio de síntese do NO e do sistema glutamatérgico levando a célula a um estado de excitotoxicidade e morte celular (Rameau e col., 2007). Nestos casos a S-nitrosilação de grupos tiol de resíduos cisteína induzida por NO, inibem a atividade do receptor NMDA evitando assim o possível dano tisular, o que poderia explicar porque altas doses de NMDA e SP apesar de gerar fortes RD não são capazes de induzir aquisição do CAO.

Considerando a íntima relação do NO com o sistema de neurotransmissão glutamatérgico, e as informações apresentadas até aqui, podemos dizer que apesar do NO ser um radical livre de meia vida muito curta, é um fator importante para modulação da MCPd já que participa de complexos eventos colaborando para a manutenção da homeostase e ótimos níveis de ativação necessários para a aquisição do CAO como encontra-se resumido na Figura 22.

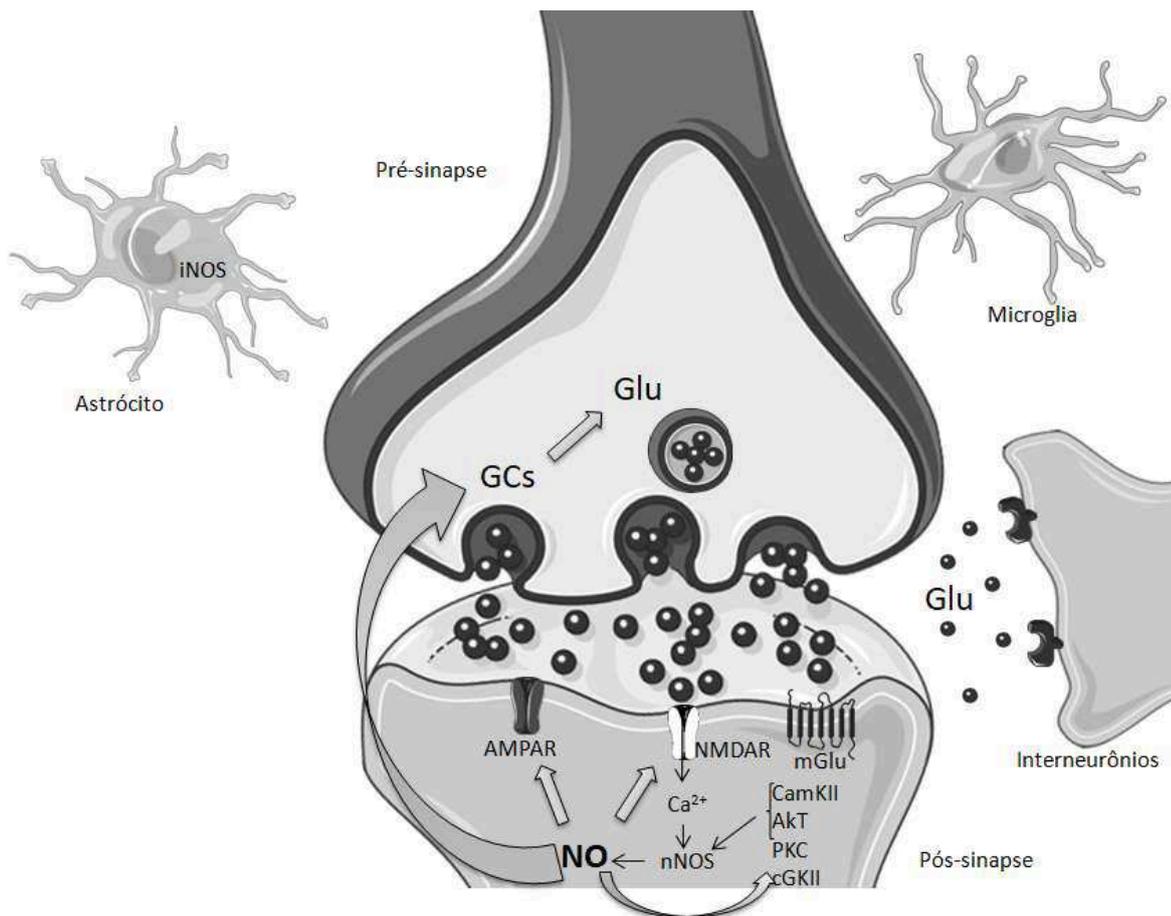


Figura 22. Esquema representativo da interação entre o sistema glutamatérgico e o nitrérgico na modulação da MCPd durante a aquisição do CAO. A ativação de receptores NMDA leva ao influxo de  $Ca^{2+}$  e ativação da nNOS, CamKII e Akt. O NO sintetizado por sua vez leva a ativação de PKC e cGKII via GMPC. A difusão do NO para a pré-sinapse ativa a GCs que por sua vez facilita a liberação de glutamato pré-sináptico gerando um *feedback* positivo. O NO influencia no tráfego de receptores AMPA e regula a ativação dos receptores NMDA mediante o processo de S-nitrosilação de resíduos de cisteína. Adaptado de Back (2016).

## 9. Conclusão

---

Os resultados encontrados neste trabalho contribuem para o entendimento das interações dos sistemas de neurotransmissão envolvidos no processamento de informações aversivas na MCPd. O uso de ferramentas farmacológicas combinadas com o uso de uma sonda fluorescente nos permitiu estudar as respostas comportamentais e obter medidas bioquímicas diretas dos níveis de NO produzidos pela estimulação química desta estrutura o que nos forneceu evidências para formular as seguintes conclusões:

1. A intensidade das respostas defensivas imediatas eliciadas pela estimulação química da MCPd é diretamente proporcional as concentrações de NO obtidas pela administração de diferentes doses de NMDA e Spermine NONOate.

2. Dependendo da intensidade do estímulo, a quantidade de NO liberado pode levar a duas situações fisiológicas, fortes estímulos levam a robustas respostas defensivas que prejudicam a aquisição do CAO devido provavelmente a ativação de um mecanismo neuroprotetor por parte da sinalização nitrérgica, enquanto estímulos de menor intensidade levam a uma ativação adequada que mediante a retroalimentação positiva do sistema glutamatérgico são capazes de induzir a aprendizagem aversiva.

3. O processo de aprendizagem coordenado pela MCPd precisa de um equilíbrio neuroquímico entre os múltiplos sistemas de neurotransmissão envolvidos neste evento, o desequilíbrio do mesmo leva a um prejuízo na aquisição de memórias aversivas.

Neste contexto, os dados obtidos neste trabalho são parcialmente compatíveis com a nossa hipótese inicial de que “o NO modula as estratégias comportamentais de defesa imediata coordenadas pela matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPd); no entanto a aprendizagem mediada por ela durante a aquisição de um condicionamento aversivo olfatório (CAO) ocorre de forma independente do sistema nitrérgico”, já que foi observada a participação do NO tanto nas RD imediatas quanto no processo de aquisição do condicionamento aversivo.

## 10. Referências

---

Aguiar, D. C., Moreira, F. A., Guimaraes, F. S. Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-d-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. Pharmacol Biochem Behav. v.83, n.2, p.296-301. 2006. DOI:10.1016/j.pbb.2006.02.010.

Aguiar, D. C., Guimaraes, F. S. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. J Neurosci Res. V.87, n.11, p.2418-2429. 2009. DOI: 10.1002/jnr.22082.

Aguiar, D. C., Guimaraes, F. S. Blockade of NMDA or NO in the dorsal premammillary nucleus attenuates defensive behaviors. Physiol Behav. v.103, n.3-4, p.279–283. 2011. DOI: 10.1016/j.physbeh.2011.02.034.

Aguiar, D. C., Hott, S. C., *et al.* The dorsolateral periaqueductal grey N-methyl-D-aspartate/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway modulates the expression of contextual fear conditioning in rats. J Psychopharmacol. v.28, n.5, p.479-485. 2014. DOI:10.1177/0269881113504012.

Ahern, G. P., Klyachko, V. A., Jackson, M. B. cGMP and Snitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. Trends Neurosci. v.25, n.10, p.510–517. 2002. DOI:10.1016/S0166-2236(02)02254-3.

Albin, R. L., Makowiec, R. L. *et al.* Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. Neuroscience Letters. v.118, n.1, p.112-115. 1990. DOI:10.1016/0304-3940(90)90261-7.

Alexander, S., Davenport, A., *et al.* The Concise Guide to Pharmacology 2015/16: G protein-coupled receptors. British Journal of Pharmacology, v.172, n.24, p.5744-5869. 2015. DOI:10.1111/bph.13348.

An, X., Bandler, R., *et al.* Prefrontal cortical projections to longitudinal columns in the midbrain periaqueductal gray in macaque monkeys. J Comp Neurol. v.401, n.4, p.455–479. 1998. DOI:10.1002/(SICI)1096-9861(19981130)401:4<455::AID-CNE3>3.0.CO;2-6.

Assareh, N., Sarrami, M., *et al.* The organization of defensive behavior elicited by optogenetic excitation of rat lateral or ventrolateral periaqueductal gray. Behav Neurosci. v.130, n.4, p.406–414. 2016. DOI: 10.1037/bne0000151.

Babai, P., Anokhin, K. V., *et al.* Characteristics of c-fos gene expression in the brains of rats with different investigative and defensive behaviors. Neurosci Behav Physiol, v.31, n.6, p.583-8. 2001. DOI:10.1023/A:1012360809183.

Back, F. P. Interferência da sinalização endocanabinoide cb1 e vaniloide trpv1 na reação de defesa incondicionada produzida pelo n-metil-d-aspartato aplicado na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral e na consequente aquisição de um condicionamento aversivo olfatório. *Farmacologia*. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2016.

Back, F. P., Carobrez, A. P. Periaqueductal gray glutamatergic, cannabinoid and vanilloid receptor interplay in defensive behavior and aversive memory formation. Neuropharmacology. V.135, p.399-411. 2018. DOI:10.1016/j.neuropharm.2018.03.032.

Baez, M. V., Cercato, M. C., Jerusalinsky, D. A. NMDA Receptor Subunits Change after Synaptic Plasticity Induction and Learning and Memory Acquisition. Neural Plasticity. v.2018, n.5093048, 11 p. 2018. DOI:10.1155/2018/5093048. 2018.

Bandler, R., Carrive, P. In: A. Depaulis e R. Bandler (Ed.). The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization. New York: Plenum Publishing Corporation. v.213, p.1-8. 1991. DOI:10.1007/978-1-4615-3302-3.

Bandler, R., Keay, K. *et al.* Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. emotional coping. Brain Res. Bull. v.53, n.1, p.95–104. 2000. DOI:10.1016/S0361-9230(00)00313-0.

Behbehani, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. Prog Neurobiol. v.46, n.6, p.575–605. 1995. DOI:10.1016/0301-0082(95)00009-K.

Bender, A. T. & Beavo, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. Pharmacol. Rev. v.58, n.3, p.488–520. 2006. DOI:10.1124/pr.58.3.5.

Beijamini, V., Guimarães, F. S. Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. Brain Research Bulletin. v.69, n.4, p.347–355. 2006. DOI:10.1016/j.brainresbull.2006.02.006.

Beijamini, V., Guimarães, F. S. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. Behavioural Brain Research. v.170, n.1, p.52–61. 2006. DOI:10.1016/j.bbr.2006.01.025.

Beitz, A. J. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal grey of the rat. Neuroscience. v.7. n.1. p.33-59. 1982. DOI:10.1016/0306-4522(82)90157-9.

Benarroch, E. E. Periaqueductal gray: an interface for behavioral control. Neurology. v.78. n.3. p.210-7. 2012. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31823fcdee.

Bender, A. T., Beavo, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. Pharmacol Rev. v.58, n.3, p.488–520. 2006. DOI:10.1124/pr.58.3.5.

Ben-shaul, Y., Katz, L. C., *et al.* *In vivo* vomeronasal stimulation reveals sensory encoding of conspecific and allo specific cues by the mouse accessory olfactory bulb. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v.107, n.11, p.5172–5177. 2010. DOI: 10.1073/pnas.0915147107.

Bernal-gamboa, R., Carranza-jasso, R., *et al.* Contextual Modulation of Extinction: Recovery of Taste-Aversion Conditioning in a Third Context. Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. Rev colomb psicol. v.20, n.2, p.209-218. 2011. ISSN 0121-5469.

Besson, J. M., Fardin, V., Oliveras, J. L. Analgesia produced by stimulation of the periaqueductal gray matter: true antinociceptive effects versus stress effects. In: Depaulis, A., Bandler, R. (Eds.). *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. Plenum Press, New York. v.213, p. 121–138. 1991. DOI:10.1007/978-1-4615-3302-3\_8.

Blackshaw, S., Eliasson, M. J., *et al.* Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxide-dependent synaptic plasticity. Neurosci. v. 119, n.4, p.979–90. 2003. DOI:10.1016/S0306-4522(03)00217-3.

Blanchard, D. C., Blanchard, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. Annu Rev Psychol. v.39, p.43-68. 1988. DOI:10.1146/annurev.ps.39.020188.000355.

Blanchard, D. C., Blanchard, R. J. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. J Comp Psychol. v.103, n.1, p.70-82. 1989. DOI:10.1037/0735-7036.103.1.70.

Bliss, T. V., Gardner-medwin, A. R. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J. Physiol. v.232, n.2, p.357–374. 1973. DOI:10.1113/jphysiol.1973.sp010274.

Böhme, G. A., Bon, C., *et al.* Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v.90, n.9, p.9191–9194. 1993. DOI:10.1073/pnas.90.19.9191.

Bon, C. L., Garthwaite, J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. J. Neurosci. v.23, n.5, p.1941–1948. 2003. DOI:10.1523/JNEUROSCI.23-05-01941.

Bonassoli, V. T., Contardi, E. B., *et al.* Effects of nitric oxide synthase inhibition in the dorsolateral periaqueductal gray matter on ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior in rats. Psychopharmac. v.228, n.3, p.487–498. 2013. DOI:10.1007/s00213-013-3049-1.

Bortoloci, J. G. T. Caracterização da reação de defesa produzida pela ativação do receptor ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (ampa) na região dorsolateral da matéria cinzenta periaqueductal de ratos. Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2019.

Braga, A. A., Aguiar, D. C., Guimarães, F.S. NOC-9, a selective nitric oxide donor, induces flight reactions in the dorsolateral periaqueductal gray of rats by activating soluble guanylate cyclase. Neurosc Letters. v.459, n.2, p.79–83. 2009. DOI:10.1016/j.neulet.2009.05.009.

Braithwaite, S. P., Xia, H., Malenka, R. C. Differential roles for NSF and GRIP/ABP in AMPA receptor cycling. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v.99, n.10, p.7096–7101. 2002. DOI:10.1073/pnas.102156099.

Brechbühl, J., Klaey, M., Broillet, M. C. Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. Science. v.321, n.5892, p.1092–1095. 2008. DOI: 10.1126/science.116077.

Brechbühl, J., Moine, F., *et al.* Mouse alarm pheromone shares structural similarity with predators cents. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v.110, n.12, p.4762–4767. 2013. DOI:10.1073/pnas.1214249110.

Bredt, D. S., Snyder, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v.86, n.22, p.9030–9033. 1989. DOI:10.1073/pnas.86.22.9030.

Bredt, D. S., Snyder, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase a calmodulin-requiring enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v.87, n.2, p.682-685. 1990. DOI:10.1073/pnas.87.2.682.

Bredt, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. Free Radic Res. v.31, n.6, p.577–596. 1999. DOI:10.1080/10715769900301161.

Breer, H., Fleischer, J., Strotmann, J. The sense of smell: multiple olfactory subsystems. Cell Mol Life Sci. v.63, n.13, p.1465–1475. 2006. DOI:10.1007/s00018-006-6108-5.

Brenman, J. E., Christopherson, K. S., *et al.* Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. J Neurosci. v.16, n.23, p.7407–7415. 1996. DOI:10.1523/JNEUROSCI.16-23-07407.

Brenman, J. E., Chao, D. S., *et al.* Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. Cell. v.84, n.5, p.757–767. 1996. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81053-3.

Broillet, M. C., Randin, O., Chatton, J-Y. Photoactivation and calcium sensitivity of the fluorescent NO indicator 4,5-diaminofluorescein (DAF-2): implications for cellular NO imaging. FEBS Letters. v.491, n.3, p.227-232. 2001. DOI:10.1016/s0014-5793(01)02206-2.

Burman, M. A., Erickson, K. J., *et al.* Contextual and Auditory Fear Conditioning Continue to Emerge during the Periweaning Period in Rats. PLoS One. v.9, n.6, 100807. 2014. DOI:10.1371/journal.pone.0100807.

Buskila, Y., Farkash, S., *et al.* Rapid and reactive nitric oxide production by astrocytes in mouse neocortical slices. Glia. v.52, n.3, p.169-176. 2005. DOI:10.1002/glia.20217.

Buskila, Y., Abu-Ghanem, Y., *et al.* Enhanced astrocytic nitric oxide production and neuronal modifications in the neocortex of a NOS2 mutant mouse. PloS one. v.2, n.9, p.843. 2007. DOI: 10.1371/journal.pone.0000843.

Buskila, Y., Amitai, Y. Astrocytic iNOS-dependent enhancement of synaptic release in mouse neocortex. J Neurophysiol. v.103, n.3, p.1322-1328. 2010. DOI: 10.1152/jn.00676.2009.

Calixto, A. V., Duarte, F. S., *et al.* Nitric oxide involvement and neural substrates of the conditioned and innate fear as evaluated in the T-maze test in rats. Behav Brain Res. v.189, n.2, p.341–349. 2008. DOI:10.1016/j.bbr.2008.01.018.

Campos, A. C., Piorino, E. M., *et al.* Increased nitric oxide-mediated neurotransmission in the medial prefrontal cortex is associated with the long lasting

anxiogenic-like effect of predator exposure. Behav Brain Res. v.256, p.391–397. 2013b. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.08.006.

Canteras, N. S., Swanson, L. W. The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. v.89, n.21, p.10089-93. 1992. DOI:10.1073/pnas.89.21.10089.

Canteras, N. S., Simerly, R. B., Swanson, L. W. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. J Comp Neurol. v.360, n.2, p.213–245. 1995. DOI:10.1002/cne.903480103.

Canteras, N. S., Chiavegatto, S., *et al.* Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. Brain Res Bull. v.44, n.3, p.297-305. 1997. DOI:10.1016/s0361-9230(97)00141-x.

Canteras, N. S., Goto, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. Neuroreport. v.10, n.2, p.413-8. 1999. DOI:10.1097/00001756-199902050-00037.

Canteras, N. S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. Pharm Biochem Behav. v.71, n.3, p.481–491. 2002. DOI:10.1016/S0091-3057(01)00685-2.

Canteras, N. S., Kroon, J. A., *et al.* Sensing danger through the olfactory system: the role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. Neurosci Biobehav Rev. v.32, n.7, p.1228-35. 2008. DOI:10.1016/j.neubiorev.2008.05.009.

Canteras, N. S., Pavesi, E., Carobrez, A. P. Olfactory instruction for fear: neural system analysis. Frontiers in Neurosc. v.9, n.276. 2015. DOI:10.3389/fnins.2015.00276.

Carobrez, A. P., Schenberg, L. C., Graeff, F. G. Neuroeffector mechanisms of the defense reaction in the rat. Physiol & Behav. v.31, n.4, p.439-444. 1983. DOI:10.1016/0031-9384(83)90063-X.

Carrive, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. Behav Brain Res. v. 58, n.1-2, p. 27-47. 1993. DOI:10.1016/0166-4328(93)90088-8.

Carvalho-Netto, E. F. Gomes, K. S., *et al.* Role of glutamate NMDA receptors and nitric oxide located within the periaqueductal gray on defensive behaviors in mice confronted by predator. Psychopharmac. v.204, n.4, p.617–625. 2009. DOI:10.1007/s00213-009-1492-9.

Castillo, P. E., Thomas J., *et al.* Endocannabinoid signaling and synaptic function. Neuron. v.76, n.1, p.70-81. 2012. DOI:10.1016/j.neuron.2012.09.020.

Cavalli, J., Bertoglio, L. J., Carobrez, A. P. Pentylentetrazole as na unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. Neurobiol Learn Mem. v.92, n.4, p.512-8. 2009. DOI:10.1016/j.nlm.2009.06.010.

Cezario, A. F., Ribeiro-Barbosa, E. R., *et al.* Hypothalamic sites responding to predator threats--the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. Eur J Neurosci. v.28, n.5, p. 1003-15. 2008. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2008.06392.x.

Chaitoff, K. A., Toner, F., *et al.* Effects of inducible nitric oxide synthase blockade within the periaqueductal gray on cardiovascular responses during mechanical, heat, and cold nociception. Neurol Sci. v.33, n.1, p.69–78. 2012. DOI:10.1007/s10072-011-0661-x.

Chan, S. H., Wang, L. L., Chan, J. Y. Differential engagements of glutamate and GABA receptors in cardiovascular actions of endogenous nNOS or iNOS at rostral ventrolateral medulla of rats. Br J Pharmacol. v.138, n.4, p.584-593. 2003. DOI:10.1038/sj.bjp.0705081.

Chan, J., Chang, C. J. Reaction-based small-molecule fluorescent probes for chemoselective bioimaging. Nature Chemistry. v.4, p.973–984. 2012. DOI:10.1038/nchem.1500.

Chen, X., Tian, X., *et al.* Fluorescent and luminescent probes for detection of reactive oxygen and nitrogen species. Chem Soc Rev. v.40, n.9, p.4783-4804. 2011. DOI:10.1039/c1cs15037e.

Chiavegatto, S., Scavone, C., Canteras, N. S. Nitric oxide synthase in the dorsal periaqueductal gray of rats expressing innate fear responses. Neuro Report. v.9, n.4, p.571–576. 1998. DOI:10.1097/00001756-199803090-00002.

Choi, Y. B., Chen, H. V., Lipton, S. A. Three pairs of cysteine residues mediate both redox and Zn<sup>2+</sup> modulation of the NMDA receptor. J Neurosci. v.21, n.2, p.392–400. 2001. DOI:10.1523/JNEUROSCI.21-02-00392.

Coimbra, N. C., Brandão, M. L. Effects of 5-HT<sub>2A</sub> receptors blockade on fear induced analgesia elicited by electrical stimulation of deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. Behav Brain Res. v.87, n.1, p.97-103. 1997. DOI:10.1016/s0166-4328(96)02267-x.

Collingridge, G. L., Lester, R. A. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. Pharmacol Reviews. v.41, n.2, p.143-210. 1989. Online ISSN 1521-0081.

Contestabile, A. Regulation of transcription factors by nitric oxide in neurons and in neural-derived tumor cells. Prog Neurobiol. v.84, n.4, p.317–28. 2008. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2008.01.002.

Craven, K. B., Zagotta, W. N. CNG and HCN channels: two peas, one pod. Annu Rev Physiol. v.68, p.375–401. 2006. DOI:10.1146/annurev.physiol.68.040104.134728.

Damasio, A. En busca de Spinoza: neurobiología de la emoción y los sentimientos. Barcelona: Booket. 978-84-233-4615-8. 2014. ISBN 978-84-233-4615-8.

Darwin, C. R. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. London: John Murray. 5th edition. 1869.

Darwin, C. R. The expression of emotions in man and animals. London: John Murray. 1872. DOI:<http://dx.doi.org/10.1037/10001-000>.

Deng, H., Xiao, X., Wang, Z. Periaqueductal gray neuronal activities underlie different aspects of defensive behaviors. The Journal of Neurosc. v.36, n.29, p.7580-7588. 2016. DOI:10.1523/JNEUROSCI.4425-15.

De Oliveira, C. L., Del Bel, E. A., Guimaraes, F. S. Effects of L-NOARG on plus-maze performance in rats. Pharmacol Biochem Behav. v.56, n.1, p.55-9. 1997. DOI:10.1016/S0091-3057(96)00156-6.

De Oliveira, R. W., Guimarães, F. S. Anxiolytic effect of methylene blue microinjected into the dorsal periaqueductal gray. Braz J Med Biol Res. v.32, n.12, p.1529–1532. 1999. DOI: 10.1590/S0100-879X1999001200012.

De Oliveira, R. W., Del Bel, E. A., Guimarães, F. S. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. Brain Res Bull. v.51, n.6, p.457–464. 2000a. DOI:10.1016/S0361-9230(99)00248-8.

De Oliveira, R. W., Del Bel, E. A., *et al*. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint stress. Neurosci Lett. v.289, n.2, p.123–126. 2000b. DOI:10.1016/S0304-3940(00)01287-8.

De Oliveira, R. W., Del Bel, E. A., Guimarães, F. S. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsal periaqueductal gray. Neurosci Biobehav. Rev. v.25, n.7-8, p.679–685. 2001. DOI:10.1016/S0149-7634(01)00050-1.

De Oliveira Galvão, B., Costa Larrubia, B., *et al.* Effects of contextual fear conditioning and pentylentetrazol on panic-like reactions induced by dorsal periaqueductal gray stimulation with N-methyl-D-aspartate. Psychology & Neurosc. v.3, n.1, p.67 – 72. 2010. DOI: 10.3922/j.psns.2010.1.008.

De Petrocellis, L., Cascio, M.G., Di Marzo, V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. Br J Pharmacol. v.141, n.5, p.765-774. 2004. DOI:10.1038/sj.bjp.0705666.

Dielenberg, R. A., Hunt, G. E., McGregor, I. S. "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. Neurosc. v.104, n.4, p.1085-97. 2001. DOI: 10.1016/S0306-4522(01)00150-6.

Dielenberg, R. A., McGregor, I. S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. Neurosci Biobehav Rev. v.25, n.7-8, p.597-609. 2001. DOI:10.1016/S0149-7634(01)00044-6.

Di Franco, C., Elia, A., *et al.* Optical and Electronic NOx Sensors for Applications in Mechatronics. Sensors. v.9, n.5, p.3337-3356. 2009. DOI:10.3390/s90503337.

Di Scala, G., Mana, M. J., *et al.* Evidence of Pavlovian conditioned fear following electrical stimulation of the periaqueductal grey in the rat. Physiol Behav. v.40, n.1, p.55–63. 1987. DOI:10.1016/0031-9384(87)90185-5.

Do Monte, F. H., Canteras, N. S., *et al.* New perspectives on beta-adrenergic mediation of innate and learned fear responses to predator odor. J Neurosci. v.28, n.49, p.13296-302. 2008. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2843-08.2008.

Dubey, M., Bernasek, S. L., Schwartz, J. Highly sensitive nitric oxide detection using X-ray photoelectron spectroscopy. J Am Chem Soc. v.129, n.22, p.6980–6981. 2007. DOI:10.1021/ja070943x.

Dulac, C., Torello, A. T. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. Nat Rev Neurosci. v.4, n.7, p.551–562. 2003. DOI: 10.1038/nrn1140.

Ekman, P. ¿Qué dice ese gesto? Barcelona: RBA202. Integral. 978-84-7871-202-1. 2004. ISBN:978-84-7871-202-1

Fanselow, M. S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: Depaulis, A., Bandler, R. (Eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. Plenum Press, New York. p. 151–173. 1991. DOI:10.1007/978-1-4615-3302-3\_10.

Fanselow, M. S. Ponnusamy, R. The use of conditioning tasks to model fear and anxiety. In R. J. Blanchard, D. C. Blanchard, G. Griebel, & D. Nutt (Eds.), *Handbook of behavioral neuroscience: Vol. 17. Handbook of anxiety and fear* (pp. 29-48). San Diego, CA, US: Elsevier Academic Press. 2008. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/S1569-7339(07)00003-3.

Feelisch, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. v.358, n.1, p.113–122. 1998. DOI:10.1007/PL00005231.

Feil, R., Hofmann, F., Kleppisch, T. Function of cGMP-dependent protein kinases in the nervous system. Rev Neurosci. v.16, n.1, p.23–41. 2005. DOI: 0.1515/REVNEURO.2005.16.1.23.

Ferrero, D. M., Lemona, J. K., *et al.* Detection and avoidance of a carnivore odor by prey. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v.108, n.27, p.11235–11240. 2011. DOI:10.1073/pnas.1103317108.

File, S. E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: Elliott, J.M., Heal, D.J., Marsden, C.A. (Eds.), Experimental Approaches to Anxiety and Depression. Wiley, New York, p. 25–44. 1992.

Firestein, S. How the olfactory system makes sense of scents. Nature. v.413, n.6852, p.211–218. 2001. DOI:10.1038/35093026.

Fogaça, M. V., Lisboa, S. F., *et al.* Fine-tuning of defensive behaviors in the dorsal periaqueductal gray by atypical neurotransmitters. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. v.45, n.4, p.357-365. 2012. DOI:10.1590/S0100-879X2012007500029.

Garakani, A., Mathew, S. J., Charney, D. S. Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. The Mount Sinai Journal of Medicine. v.73, n.7, p.941-949. 2006.

Garthwaite, J., Charles, S.L., Chess-Williams, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular

messenger in the brain. Nature. v.336, n.6197. p.385–388. 1988. DOI:10.1038/336385a0.

Garthwaite, J., Garthwaite, G., *et al.* NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. Eur J Pharmacol. v.172, n.4-5, p.413–416. 1989. DOI:10.1016/0922-4106(89)90023-0.

Garthwaite, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. TINS. v.14, n.2. 1991. DOI:10.1016/0166-2236(91)90022-M.

Garthwaite, J., Boulton, C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. Annu Rev Physiol. v.57, p.683–706. 1995. DOI:10.1146/annurev.ph.57.030195.003343.

Garthwaite, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. Eur J Neurosci. v.27, n.11, p.2783–2802. 2008. DOI:10.1111/j.1460-9568.2008.06285.x.

Garthwaite, J. From synaptically localized to volume transmission by nitric oxide. The Journal of Physiology Neuroscience. J Physiol. v.594, n.1, p. 9–18. 2016. DOI:10.1113/JP270297.

Gertz I. L. Nitric Oxide Analysis in Biology and Biomedicine. Modern Trends and Outlook. International Journal of Biochemistry Research. v.3. 2018. ISSN: 2534-8825.

Giachero, M., Carobrez, A. P. Muscimol applied to the dorsolateral periaqueductal gray matter impairs the negative valence instruction from a stressful experience. International Behavioral Neuroscience Society. British Columbia, Canada. 2016.

Gibson, C. L., Coughlan, T. C., Murphy, S. P. Glial nitric oxide and ischemia. Glia. v.50, n.4, p.417–426. 2005. DOI:10.1002/glia.20143.

Gilhotra, N., Dhingra, D. Involvement of NO-cGMP pathway in anti-anxiety effect of aminoguanidine in stressed mice. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych. v.33, n.8, p.1502–1507. 2009. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2009.08.012.

Guimarães, F. S., Aguiar, J. C., *et al.* Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitor microinjected into the dorsal central grey. Neuro Report. v.5, n.15, p.1929–1932. 1994. DOI:10.1097/00001756-199410270-00022.

Guimarães, F. S., Bejjamini, V., *et al.* Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. Neurosc and Biobehav Reviews. v.29, n.8, p.1313–1322. 2005. DOI:10.1016/j.neubiorev.2005.03.026.

Gladding, C. M., Fitzjohn, S. M., Molnár, E. Metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression: molecular mechanisms. Pharmacological Reviews. v.61, n.4, p.395-412. 2009. DOI:10.1124/pr.109.001735.

Goebel, D. J., Poosch, M. S. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1Com, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. Molecular Brain Research. v.69, n.2, p. 164–170. 1999. DOI:10.1016/S0169-328X(99)00100-X.

Goto, M., Canteras, N. S., *et al.* Projections from the subfornical region of the lateral hypothalamic area. J Comp Neurol. v.493, n.3, p.412–438. 2005. DOI:10.1002/cne.20764.

Graeff, F. G., Carobrez, A. P., Silveira, M. C. L. Excitatory amino acids and the brain aversive system. In: Frontiers in Excitatory Amino Acid Research. 1988.

Graeff, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. Braz J Med Biol Res. v.27, n.4, p.811-29. 1994.

Graeff, F. G., Sant'ana, A. B., *et al.* New Findings on the Neurotransmitter Modulation of Defense in the Dorsal Periaqueductal Gray. CNS & Neurological Disorders - Drug Targets. v.14, n.8, p.988-995. 2015. DOI:10.2174/1871527314666150909114558.

Griess, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselky und Benedikt Ueber einige Azoverbindungen. Ber Deutsch Chem Ges. v.12, n.1, p.426-428. 1879. DOI: 10.1002/cber.187901201117.

Gross, C. T., Canteras, N. S. The many paths to fear. Nat Rev Neurosci. v.13, n.9, p.651-658. 2012. DOI:10.1038/nrn3301.

Gruber-Dujardin, E. Role of the periaqueductal gray in expressing vocalization. In: Brudzynski, S.M. (Ed.), The Handbook of Mammalian Vocalization: an Integrative Neuroscience Approach. Elsevier, Amsterdam. p.313–327. 2010. DOI:10.1016/B978-0-12-374593-4.00030-9.

Harvey, B. H., Oosthuizen, F., *et al.* Stress–restress evokes sustained iNOS activity and altered GABA levels and NMDA receptors in rat hippocampus. Psychopharmacology. v.175, n.4, p.494–502. 2004. DOI:10.1007/s00213-004-1836-4.

Hebb, D. O. The organization of behavior. Wiley, New York. **1949**. ISBN-13: 978-0805843002.

Hemmens, B., Mayer, B. Enzymology of nitric oxide synthases. In: Titheradge MA (ed). Methods in Molecular Biology. Humana Press. p.1-32, Totowa. 1998. DOI:10.1385/1-59259-749-1:1.

Hemmens, B., Goessler, W., *et al.* Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase. J Biol Chem. v.275, n.46, p.35786–35791. 2000. DOI:10.1074/jbc.M005976200.

Henley, J. M., Wilkinson, K. A. Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. Nat Rev Neurosci. v.17, n.6, p.337-350. 2016. DOI:10.1038/nrn.2016.37.

Hetem, L. A. B.; Graeff, F. G. Ansiedade e Transtornos de Ansiedade. Editora Científica Nacional. Rio de Janeiro. 1997.

Hofmann, F., Feil, R., *et al.* Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. Physiol Rev. v.86, n.1, p.1–23. 2006. DOI:10.1152/physrev.00015.2005.

Hua, Y., Huang, X. Y., *et al.* DETA/NONOate, a nitric oxide donor, produces antidepressant effects by promoting hippocampal neurogenesis. Psychopharmac. v.200, n.2, p.231– 242. 2008. DOI: 10.1007/s00213-008-1200-1.

Huang, Y., Man, H. Y., *et al.* S-nitrosylation of N-ethylmaleimide sensitive factor mediates surface expression of AMPA receptors. Neuron. v.46, n.4, p.533–540. 2005. DOI:10.1016/j.neuron.2005.03.028.

Hubbard, D. T., Blanchard, D. C., *et al.* Development of defensive behavior and conditioning to cat odor in the rat. Physiol Behav. v.80, n.4, p.525–530. 2004. DOI:10.1016/j.physbeh.2003.10.006.

Huili, L., Ajun, W. Fluorescent probes for real-time measurement of nitric oxide in living cells. Analyst. v.140, n.21, p.7129-41. 2015. DOI:10.1039/c5an01628b.

Ignarro, L., Buga, G. M., *et al.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci USA. v.84, n.24, p.9265-9. 1987. DOI:10.1073/pnas.84.24.9265.

Islam, A. T., Kuraoka, A., Kawabuchi, M. Morphological basis of nitric oxide production and its correlation with the polysialylated precursor cells in the dentate

gyrus of the adult guinea pig hippocampus. Anat Sci Int. v.78, n.2, p.98–103. 2003. DOI:10.1046/j.0022-7722.2003.00045.x.

Isogai, Y., Si, S., *et al.* Molecular organization of vomeronasal chemoreception. Nature. v.478, n.7368, p.241-5. 2011. DOI: 10.1038/nature10437.

Itoh, Y., Ma, F.H., *et al.* Determination and bioimaging method for nitric oxide in biological specimens by diaminofluorescein fluorometry. Anal Biochem. v.287, n.2, p.203-209. 2000. DOI: 10.1006/abio.2000.4859.

Jansen, A. S. P., Farkas, E., *et al.* Local connections between the columns of the periaqueductal gray matter: a case for intrinsic neuromodulation. Brain Res. v.797, n.2, p.329-336. 1998. DOI:10.1016/s0006-8993(97)01293-6.

Johansen, J. P., Tarpley, J. W. *et al.* Neural substrates for expectation modulated fear learning in the amygdala and periaqueductal gray. Nat Neurosci. v.13, n.8, p.979-86. 2010. DOI: 10.1038/nn.2594.

Johnson, M. D., Ma, P. M. Localization of NADPH diaphorase activity in monoaminergic neurons of the rat brain. J Comp Neurol. v.332, n.4, p.391–406. 1993. DOI:10.1002/cne.903320402.

Jurgens, U. The role of the periaqueductal grey in vocal behavior. Behav Brain Res. v.62, n.2, p.107–117. 1994. DOI:10.1016/0166-4328(94)90017-5.

Kandel, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. Science. v.294, n.5544, p.1030–8. 2001. DOI:10.1126/science.1067020.

Kats, L. B., Dill, L. M. The scent of death: Chemosensory assessment of predation risk by prey animals. Ecoscience. v.5, n.3, p.361–394. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1080/11956860.1998.11682468>.

Katzoff, A., Ben-Gedalya, T., Susswein, A. J. Nitric oxide is necessary for multiple memory processes after learning that a food is inedible in *Aplysia*. J Neurosci. v.22, n.21, p.9581–94. 2002. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-21-09581.

Kaupp, U. B., Seifert, R. Cyclic nucleotide-gated ion channels. Physiol Rev. v.82, n.3, p.769–824. 2002. DOI:10.1152/physrev.00008.2002.

Kavaliers, M., Choleris, E. Antipredator responses and defensive behavior: ecological and ethological approaches for the neurosciences. Neurosci Biobehav

Rev. v.25, n.7-8, p.577–586. 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00042-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00042-2).

Kelley, J. B., Anderson, K. L., Itzhak, Y. Pharmacological modulators of nitric oxide signaling and contextual fear conditioning in mice. Psychopharmacology. v.210, n.1, p.65–74. 2010. DOI:10.1007/s00213-010-1817-8.

Kelley, J. B., Anderson, K. L., *et al.* Long-term memory of visually cued fear conditioning: Roles of the neuronal nitric oxide synthase gene and cyclic AMP response element-binding protein. Neurosci. v.174, p.91–103. 2011. DOI:10.1016/j.neuroscience.2010.11.005.

Kendrick, K. M., Guevara-Guzman, R., *et al.* Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. Nature. v.388, p.670–674. 1997. DOI:10.1038/41765.

Kleppisch, T., Pfeifer, A., *et al.* Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase. J Neurosci. v.19, n.1, p.48–55. 1999. DOI:10.1523/JNEUROSCI.19-01-00048.

Kerwin, J., Heller, M. The Arginine-nitric oxide pathway: A target for new drugs. Med Res Rev. v.14, n.1, p.23-74. 1994. DOI:10.1002/med.2610140103.

Kim, J. J., Jung, M. W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. Neurosci & Biobehav Reviews. v.30, n.2, p.188-202. 2006. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2005.06.005.

Kincheski, G. C., Mota-Ortiz, S. R., *et al.* The dorsolateral periaqueductal gray and its role in mediating fear learning to life threatening events. PLoS ONE. v.7, n.11, p50361. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0050361.

Ko, G. Y., Kelly, P. T. Nitric oxide acts as a postsynaptic signaling molecule in calcium/calmodulin-induced synaptic potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. J Neurosci. v.19, n.16, p.6784–94. 1999. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-16-06784.

Kojima, H., Nakatsubo, N., *et al.* Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins. Anal Chem. v.70, n.13, p.2446-2453. 1998. DOI:10.1021/ac9801723.

Kojima, H., Urano, Y., *et al.* Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. Angew Chem Int Ed Engl. v.38, n.21, p.3209-3212. 1999. DOI:10.1002/(SICI)15213773(19991102)38:21<3209::AIDANIE3209>3.0.CO;2-6.

Kokras, N., Baltas, D., *et al.* Kinoscope: An Open-Source Computer Program for Behavioral Pharmacologists. Frontiers in Behavioral Neurosci. v.11. n.88. 2017. DOI: 10.3389/fnbeh.2017.00088.

Krieger, J. E., Graeff, F. G. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. v.18, n.1, p.61-67. 1985.

Kroon, J. A., Carobrez, A. P. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, propranolol or scopolamine. Neurobiol Learn Mem. v.91, n.1, p.32-40. 2009. DOI: 10.1016/j.nlm.2008.10.007.

Kroon, J. A. V. O hipocampo e o condicionamento olfatório aversivo: mediação por receptores glutamatérgicos subtipo NMDA. Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

Lancaster, JR. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. Nitric Oxide. v.1, n.1, p.18–30. 1997. DOI:10.1006/niox.1996.0112.

Laurie, D. J., Seeburg, P. H. Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. J Neurosci. v.14, n.5, p.3180-94. 1994. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.14-05-03180.

Leaton, R. N., Cranney, J. Potentiation of the acoustic startle response by a conditioned stimulus paired with acoustic startle stimulus in rats. J Exp Psychol Anim Behav Process. v.16, n.3, p.279-87, 1990. DOI:10.1037/0097-7403.16.3.279.

Lee, J. S., Zhang, Y., Ro, J. Y. Involvement of neuronal, inducible and endothelial nitric oxide synthases in capsaicin induced muscle hypersensitivity. Eur J Pain. v.13, n.9, p.924–928. 2009. DOI: 10.1016/j.ejpain.2008.11.009.

Leman, S., Dielenberg, R. A., Carrive, P. Effect of dorsal periaqueductal gray lesion on cardiovascular and behavioural responses to contextual conditioned fear in rats. Behavioural Brain Research. v.143, n.2, p.169-176. 2003. DOI:10.1016/S0166-4328(03)00033-0.

Leone, A. M., Furst, V. W., *et al.* Visualisation of nitric oxide generated by activated murine macrophages. Biochem Biophys Res Commun. v.221, n.1, p.137-41. 1996. DOI: 10.1006/bbrc.1996.0557.

Lev-Ram, V., Jiang, T., *et al.* Synergies and coincidence requirements between NO, cGMP, and  $\text{Ca}^{2+}$  in the induction of cerebellar long-term depression. Neuron. v.18, n.6, p.1025–38. 1997. DOI:10.1016/S0896-6273(00)80340-2.

Lepiller, S., Laurens, V., *et al.* Imaging of nitric oxide in a living vertebrate using a diaminofluorescein probe. Free Radical Biology & Medicine. v.43, n.4, p.619–627. 2007. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.025.

Li, H., Wan, A. Fluorescent probes for real-time measurement of nitric oxide in living cells. Analyst. v.140, n.21, p.7129-7141. 2015. DOI:10.1039/c5an01628b.

Ligresti, A., Cascio, M.G., Di Marzo, V. Endocannabinoid metabolic pathways and enzymes. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. v.4, n.6, p.615-623. 2005. DOI:10.2174/156800705774933104.

Linden, D. J. A protein synthesis–dependent late phase of cerebellar long-term depression. Neuron. v.17, n.3, p.483–90. 1996. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80180-4.

Linnman, C., Moulton, E. A., *et al.* Neuroimaging of the Periaqueductal Gray: State of the Field. Neuroimage. v.60, n.1, p.505–522. 2012. DOI:10.1016/j.neuroimage.2011.11.095.

Lipton, S. A., Rosenberg, P. A. Mechanism of disease: excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. N Engl J Med. v.330, n.9, p.613-622. 1994. DOI:10.1056/NEJM199403033300907.

Lisboa, S. F., Guimaraes, F. S. Differential role of CB1 and TRPV1 receptors on anandamide modulation of defensive responses induced by nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray. Neuropharmac. v.62, n.8, p.2455–2462. 2012. DOI:10.1016/j.neuropharm.2012.02.008.

Lisboa, S. F., Magesto, A. C., *et al.* Complex interaction between anandamide and the nitric oxide system in the dorsolateral periaqueductal gray to modulate anxiety-like behavior in rats. Neuropharmac. v.75, p.86–94. 2013. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.07.008.

Lisboa, S. F., Camargo, L. H. A., *et al.* Cannabinoid modulation of predator fear: involvement of the dorsolateral periaqueductal gray. International Journal of Neuropsychophar. v.17, n.8, p.1193. 2014. DOI: 10.1017/S1461145713001788.

Lomo, T. Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation. Acta Physiol Scand. v.68, n.128. 1966.

Lonstein, J. S., Stern, J. M. Role of the midbrain periaqueductal gray in maternal nurturance and aggression: c-fos and electrolytic lesion studies in lactating

rats. J Neurosci. v.17, n.9, p.3364–3378. 1997. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-09-03364>.

Lonstein, J. S., Stern, J. M. Site and behavioral specificity of periaqueductalgray lesions on postpartum sexual, maternal, and aggressive behaviors in rats. Brain Res. v.804, n.1, p.21–35. 1998. DOI:10.1016/s0006-8993(98)00642-8.

Lovick, T. A., Paul, N. L. Co-localization of GABA with nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent diaphorase in neurones in the dorsolateral periaqueductal grey of the rat. Neurosci Lett. v.272, n.3, p.167–170. 1999. DOI:10.1016/S0304-3940(99)00607-2.

Machado, S., Portella, C., *et al.* Aprendizaje y memoria implícita: mecanismos y neuroplasticidad. Rev Neurol. v.46, n.9, p.543-549. 2008. DOI: 10.33588/rn.4609.2007092.

Madrigal, J. L., Moro, M. A., *et al.* Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms. J Neurochem. v.76, n.2, p.532– 538. 2001. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00108.x.

Madrigal, J. L., Moro, M. A., *et al.* Induction of cyclooxygenase-2 accounts for restraint stress-induced oxidative status in rat brain. Neuropsychopharmac. v.28, n.9, p.1579–1588. 2003. DOI:10.1038/sj.npp.1300187.

Mantyh, P. W. Forebrain projections to the periaqueductal gray in the monkey, with observations in the cat and rat. J Comp Neurol. v.206, n.2, p.146-58. 1982. DOI:10.1002/cne.902060205.

McGaugh, J. L. Memory – a century of consolidation. Science. v.287, n.5451, p.248-251, 2000. DOI:10.1126/science.287.5451.248.

McManus, J. B., Nelson, D. D., *et al.* Comparison of cw and pulsed operation with a TE-cooled quantum cascade infrared laser for detection of nitric oxide at 1900 cm<sup>-1</sup>. Appl Phys B. v.85, n.2, p.235–241. 2005. DOI: 10.1007/s00340-006-2407-7.

McNamara, A. M., Magidson, P. D., *et al.* Distinct neural mechanisms mediate olfactory memory formation at different timescales. Learn Mem. v.15, n.3, p.117–125. 2008. DOI: 10.1101/lm.785608.

Matynia, A., Kushner, S. A., Silva, A. J. Genetic Approaches to Molecular And Cellular Cognition: A Focus on LTP and Learning and Memory. Annu Rev Genet. v.36, p.687–720. 2002. DOI: 10.1146/annurev.genet.36.062802.091007.

Mauk, M. D., Garcia, K. S., *et al.* Does cerebellar LTD mediate motor learning? Toward a resolution without a smoking gun. Neuron. v.20, n.3, p.359–62. 1998. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80978-2.

Mechoulam, R., Hanus, L. O., *et al.* Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. Nat Rev Neurosci. v.15, n.11, p.757-764. 2014. DOI:10.1038/nrn3811.

Meredith, M. Sensory processing in the main and accessory olfactory systems: comparisons and contrasts. J Steroid Biochem Mol Biol. v.39, n.4, p.601–614. 1991. DOI:10.1016/0960-0760(91)90258-7.

Miguel, T. T., Nunes-De-Souza, R. L. Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. Brain Res. v.1076, n.1, p.42-48. 2006. DOI:10.1016/j.brainres.2005.12.095.

Miguel, T. T., Nunes-De-Souza, R. L. Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice. Brain Research. v.1240, p.39–46. 2008. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.08.068.

Möller, M., Botti, H., *et al.* Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein. J Biol Chem. v.280, n.10, p.8850–8854. 2005. DOI:10.1074/jbc.M413699200.

Moncada, S., Bolaños, J. P. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. J Neurochem. v.97, n.6, p.1676–1689. 2006. DOI:10.1111/j.1471-4159.2006.03988.x.

Monfort, P., Muñoz, M. D., *et al.* Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase, and cGMPdegrading phosphodiesterase. J Neurosci. v.22, n.23, p.10116–22. 2002. DOI:10.1523/JNEUROSCI.22-23-10116.

Morato, G. S., Ortiga, R. M., Ferreira, V. M. M. Involvement of nitric oxide dependent pathways of dorsolateral periaqueductal gray in the effects of ethanol in rats submitted to the elevated plus-maze test. Behavioural Brain Research. v.153, n.2, p.341–349. 2004. DOI:10.1016/j.bbr.2003.12.010.

Moreira, F. A., Molchanov, M. L., Guimaraes, F. S. Ionotropic glutamate receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the

dorsolateral periaqueductal gray of rats. Psychopharmac. v.171, n.2, p.199–203. 2004. DOI 10.1007/s00213-003-1569-9.

Moreira, F. A., Aguiar, D. C., *et al.* Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? Neurosci. v.204, p.186-192. 2012. DOI:10.1016/j.neuroscience.2011.08.046.

Morris, R. G., Anderson, E., *et al.* Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. Nature. v.319, n.6056, p.774–776. 1986. DOI:10.1038/319774a0.

Motta, S. C., Goto, M., *et al.* Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. Proc Natl Acad Sci USA. v.106, n.12, p.4870-5. 2009. DOI:10.1073/pnas.0900939106.

Motta, S. C., Carobrez, A. P., Canteras, N. S. The periaqueductal gray and primal emotional processing critical to influence complex defensive responses, fear learning and reward seeking: Neuroscience Biobehavioral Reviews. v.76, p.39-47. 2016. DOI:10.1016/j.neubiorev.2016.10.012.

Müller, U. Inhibition of nitric oxide synthase impairs a distinct form of long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. Neuron. v.16, n.3, p.541–9. 1996. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80073-2.

Müller, U. Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. Neuron. v.27, n.1, p.159–68. 2000. DOI:10.1016/S0896-6273(00)00017-9.

Murphy, K. P., Bliss, T. V. Photolytically released nitric oxide produces a delayed but persistent suppression of LTP in area CA1 of the rat hippocampal slice. J Physiol. v.515, pt.2, p.453–62. 1999. DOI:10.1111/j.1469-7793.1999.453ac.x.

Mustafa, A. K., Kumar, M., *et al.* Nitric oxide S-nitrosylates serine racemase, mediating feedback inhibition of D-serine formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v.104, n.8, p.2950–2955. 2007. DOI:10.1073/pnas.0611620104.

Nader, K., Schafe, G.E., Ledoux, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. Nature. v.406, n.6797, p.722-726. 2000. DOI:10.1038/35021052.

Nagano, T. Bioimaging Probes for Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species. J Clin Biochem Nutr. v.45, n.2, p.111–124. 2009. DOI: 10.3164/jcbrn.R09-66.

Nakatsubo, N., Kojima, H., *et al.* Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. FEBS Lett. v.427, n.2, p.263-266. 1998. DOI:10.1016/s0014-5793(98)00440-2.

Nakazawa, K., Mikawa, S., *et al.* Transient and persistent phosphorylation of AMPA-type glutamate receptor subunits in cerebellar Purkinje cells. Neuron. v.15, n.3, p.697–709. 1995. DOI:10.1016/0896-6273(95)90157-4.

Namin, S. M., Nofallah, S., *et al.* Kinetic analysis of DAF-FM activation by NO: Toward calibration of a NO-sensitive fluorescent dye. Nitric Oxide. v.28, p. 39–46. 2013. DOI:10.1016/j.niox.2012.10.001.

Neumann, D. L., Waters, A. M., *et al.* The use of an unpleasant sound unconditional stimulus in an aversive conditioning procedure with 8- to 11-year-old children. Biologic Psychol. v.79, n.3, p.337-342. 2008. DOI:10.1016/j.biopsycho.2008.08.005.

Noguchi, T., Sagami, I., *et al.* Important role of tetrahydrobiopterin in NO complex formation and interdomain electron transfer in neuronal nitric-oxide synthase. Biochem Biophys Res Commun. v.282, n.5, p.1092–1097. 2001. DOI:10.1006/bbrc.2001.4697.

Okere, C. O., Kaba, H., Higuchi, T. Formation of an olfactory recognition memory in mice: reassessment of the role of nitric oxide. Neurosci. v.71, n.2, p.349-54. 1996a. DOI: 10.1016/0306-4522(95)00467-X.

Onstot, D., Mayer, B., Beitz, A. J. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy. Brain Research. v.610, n.2, p.317-324. 1993. DOI:10.1016/0006-8993(93)91416-p.

Ostrosky, F., Vélez, A. Neurobiología de las emociones. Revista Neuropsicología, Neuropsiquiatría y Neurociencias. v.13, n.1, p.1-13. 2013. ISSN: 0124-1265.

Overeem, K. A., Ota, K. T., *et al.* A role for nitric oxide-driven retrograde signaling in the consolidation of a fear memory. Front Behav Neurosci. v.4, n.2. 2010. DOI:10.3389/neuro.08.002.2010.

Palmer, R., Ferrige, A. G., Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. v.327, n.6122, p.524-6. 1987. DOI:10.1038/327524a0.

Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. Nature Reviews Neurosci. v.14, n.6, p.383–400. 2013. DOI:10.1038/nrn3504.

Papes, F., Logan, D. W., Stowers, L. The vomero nasal organ mediate sinter species defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. Cell. v.141, n.4, p.692–703. 2010. DOI:10.1016/j.cell.2010.03.037.

Paul, V., Ekambaram, P. Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. Indian J Med Res. v.133, p.471-478. 2011. PMC3121276.

Paupard, M. C., Friedman, L. K., Zukin, R. S. Developmental regulation and cell-specific expression of N-methylD-aspartate receptor splice variants in rat hippocampus. Neurosci. v.79, n.2, p.399–409. 1997. DOI:10.1016/S0306-4522(96)00677-X.

Pavesi, E., Canteras, N.S., Carobrez, A. P. Acquisition of pavlovian fear conditioning using beta-adrenoceptor activation of the dorsal preammillary nucleus as an unconditioned stimulus to mimic live predator-threat exposure. Neuropsychopharmac. v.36, n.5, p.926-939. 2011. DOI:10.1038/npp.2010.231.

Pavesi, E., Heldt, S. A., Fletcher, M. L. Neuronal nitric-oxide synthase deficiency impairs the long-term memory of olfactory fear learning and increases odor generalization. Learning & Memory. v.20, p.482–490. 2013. DOI:10.1101/lm.031450.113.

Pavlov, I. P. Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. Ann Neurosci. 2010. v.17, n.3, p.136–141. 1927. DOI: 10.5214/ans.0972-7531.1017309.

Paxinos, G., Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press. 1998. eBook ISBN: 9780080475134.

Paxinos, G., Mai, J. K. The human nervous system. 2. Elsevier Academic Press. Amsterdam ; Boston: 2004. eBook ISBN: 9780080495316.

Payne, J. E., Bonnefous, C., *et al.* Discovery of dual inducible/neuronal nitric oxide synthase (iNOS/nNOS) inhibitor development candidate 4-((2-Cyclobutyl-1H-imidazo[4,5-b] pyrazin-1-yl)methyl)-7,8-difluoroquinolin-2(1H)-one (KD7332). Part 2: Identification of a novel, potent, and selective series of benzimidazole-Quinolinone iNOS/nNOS dimerization inhibitors that are orally active in pain models. J Med Chem. v.53, n.21, p.7739–7755. 2010. DOI: 10.1021/jm100828n.

Peiris, W., Pubudu, M. New Generation of Electrochemical Sensors for Nitric Oxide; Ruthenium/Carbon-Based Nanostructures and Colloids as Electrocatalytic Platforms ETD. Archive 234. 2009.

Pertwee, R. G. Cannabinoid Receptor Ligands. Tocris Cookson. v.27. 2010. DOI:10.1517/13543784.9.7.1553.

Ramamurthi, A., Lewis, R. S. Measurement and Modeling of Nitric Oxide Release Rates for Nitric Oxide Donors. Chem Res Toxicol. v.10, n.4, p.408-413. 1997. DOI:10.1021/tx960183w.

Rameau, G. A., Chiu, L. Y., Ziff, E. B. Bidirectional regulation of neuronal nitric-oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the *N*-methyl-D-aspartate receptor. J Biol Chem. v.279, n.14, p.14307–14314. 2004. DOI:10.1074/jbc.M311103200.

Rameau, G. A., Tukey, D. S. Biphasic Coupling of Neuronal Nitric Oxide Synthase Phosphorylation to the NMDA Receptor Regulates AMPA Receptor Trafficking and Neuronal Cell Death. The Journal of Neuroscience. v.27, n.13, p. 3445–3455. 2007. DOI:10.1523/JNEUROSCI.4799-06.2007.

Richardson, R., Paxinos, G., Lee, J. The ontogeny of conditioned odor potentiation of startle. Behavioral Neurosci. v.114, n.6, p.1167-1173. 2000. DOI: 10.1037//0735-7044.114.6.1167.

Risold, P. Y., Canteras, N. S., Swanson, L. W. Organization of projections from the anterior hypothalamic nucleus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. J Comp Neurol. v.348, n.1, p.1–40. 1994. DOI:10.1002/cne.903480102.

Risold, P.Y., Swanson, L.W. Connections of the rat lateral septal complex. Brain Res Brain Res Rev. v.24, n.2-3, p.115–195. 1997. DOI:10.1016/S0165-0173(97)00009-X.

Rizvi, T. A., Ennis, M., *et al*. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. J Comp Neurol. v.303, n.1, p.121–131. 1991. DOI:10.1002/cne.903030111.

Robison, A. J. Emerging role of CaMKII in neuropsychiatric disease. Cell Press. TINS – 1072, p.1-10. 2014. DOI: 10.1016/j.tins.2014.07.001.

Roman, L. J., Masters, B. S. Electron transfer by neuronal nitric-oxide synthase is regulated by concerted interaction of calmodulin and two intrinsic regulatory elements. J Biol Chem. v.281, n.32, p.23111–23118. 2006. DOI:10.1074/jbc.M603671200.

Romero-Grimaldi, C., Moreno-López, B., Estrada, C. Age-dependent effect of nitric oxide on subventricular zone and olfactory bulb neural precursor proliferation. J Comp Neurol. v.506, n.2, p.339–346. 2008. DOI:10.1002/cne.21556.

Rosen, J. B., Schulkin, J. From normal fear to pathological anxiety. Psychol Rev. v.105, n.2, p.325–350. 1998. DOI:10.1037/0033-295X.105.2.325.

Rosen, J. B., Asok, A., Chakraborty, T. The smell of fear: innate threat of 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline, a single molecule component of a predator odor. Front Neurosci. v.9, n.292. 2015. DOI: 10.3389/fnins.2015.00292.

Rufino, R. A., Mota-Ortiz, S. R., *et al.* The rostradorsal periaqueductal gray influences both innate fear responses and acquisition of fear memory in animals exposed to a live predator. Brain Struct Funct. v.224, n.4, p.1537. 2019. DOI:10.1007/s00429-019-01852-6.

Sagami, I., Daff, S., Shimizu, T. Intra-subunit and inter-subunit electron transfer in neuronal nitric-oxide synthase: effect of calmodulin on heterodimer catalysis. J Biol Chem. v.276, n.32, p.30036–30042. 2001. DOI:10.1074/jbc.M104123200.

Sakuma, Y., Paff, D. W. Facilitation of female reproductive behavior from mesencephalic central gray in the rat. Am J Physiol. v.237, n.5, p.78–284. 1979. DOI:10.1152/ajpregu.1979.237.5.r278.

Salerno, J. C. Neuronal nitric oxide synthase: Prototype for pulsed enzymology. FEBS Letters. v.582, n.10, p.1395–1399. 2008. DOI: 10.1016/j.febslet.2008.03.051.

Sandner, G., Di Scala, G., *et al.* C-fos immunoreactivity in the brain following unilateral electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray in freely moving rats. Brain Research. v.573, n.2, p.276-283. 1992. DOI:10.1016/0006-8993(92)90773-3.

Sanz-Clemente, A., Nicoll, R. A., Roche, K. W. Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. The Neuroscientist. v.19, n.1, p. 62–75. 2013. DOI:10.1177/1073858411435129.

Schafe, G. E., Bauer, E. P., *et al.* Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. Eur J Neurosci. v.22, n.1, p.201–211. 2005. DOI:10.1111/j.1460-9568.2005.04209.x.

Schenberg, L. C., Graeff, F. G. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. Pharmacology Biochemistry and Behavior. v.9, n.3, p.287-295. 1978. DOI:10.1016/0091-3057(78)90287-3.

Schuman, E. M., Madison, D. V. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. Science. v.254, n.5037, p.1503–6. 1991. DOI:10.1126/science.1720572.

Schuman, E. M., Meffert, M. K., *et al.* An ADP-ribosyltransferase as a potential target for nitric oxide action in hippocampal long-term potentiation. Proc Natl Acad Sci USA. v.91, n.25, p.11958–62. 1994. DOI:10.1073/pnas.91.25.11958.

Seeburg, P. H., Burnashev, N., *et al.* The NMDA receptor channel: molecular design of a coincidence detector. Recent Progress in Hormone Research. v.50, p.19–34. 1995. DOI:10.1016/B978-0-12-571150-0.50006-8.

Selvakumar, B., Huganir, R. L., Snyder, S. H. S-nitrosylation of stargazin regulates surface expression of AMPA glutamate neurotransmitter receptors. Proc Natl Acad Sci USA. v.106, n.38, p.16440–5. 2009. DOI:10.1073/pnas.0908949106.

Sen, N., Snyder, S. H. Protein modifications involved in neurotransmitter and gasotransmitter signaling. Trends Neurosci. v.33, n.11, p.493–502. 2010. DOI:10.1016/j.tins.2010.07.004.

Serulle, Y., Arancio, O., Ziff, E. B. A role for cGMP-dependent protein kinase II in AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. Channels. v.2, n.4, p.230–2. 2008. DOI:10.4161/chan.2.4.6391.

Shibuki, K. An electrochemical microprobe for detecting nitric oxide release in brain tissue. Neurosci Res. v.9, n.1, p.69–76. 1990. DOI: 10.1016/0168-0102(90)90048-J.

Silva, B. A., Gross, C. T., Gräff, J. The neural circuits of innate fear: detection, integration, action, and memorization. Learn Mem. v.23, n.10, p. 544-55. 2016. DOI: 10.1101/lm.042812.116.

Son, H., Lu, Y. F., *et al.* The specific role of cGMP in hippocampal LTP. Learn Mem. v.5, n.3, p.231–45. 1998.

Spencer, H. The Principles of Biology. v.1. William and Norgate. 1864.

Sperandio, M. Â. Efeitos da administração sistêmica de agonista ou antagonista mineralocorticóide sobre o condicionamento aversivo olfatório induzido

pela estimulação química da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral. *Farmacologia*. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2016.

Spolidório, P. C. M., Echeverry, M. B., *et al.* Anxiolytic effects induced by inhibition of the nitric oxide–cGMP pathway in the rat dorsal hippocampus. *Psychopharmac.* v.195, n.2, p.183–192. 2007. DOI:10.1007/s00213-007-0890-0.

Stamler, J. S., Lamas, S., Fang, F. C. Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell.* v.106, n.6, p.675–683. 2001. DOI:10.1016/S0092-8674(01)00495-0.

Staples, L. G., McGregor, I. S., *et al.* Cat odor, but not trimethylthiazoline (fox odor), activates accessory olfactory and defense-related brain regions in rats. *Neuroscience.* v.151, n.4, p.937-47. 2008. DOI:10.1016/j.neuroscience.2007.11.039.

Steinert, J. R., Kopp-Scheinflug, C., *et al.* Nitric oxide is a volume transmitter regulating postsynaptic excitability at a glutamatergic synapse. *Neuron.* v.60, n.4, p.642–656. 2008. DOI:10.1016/j.neuron.2008.08.025.

Steinert, J. R., Chernova, T., Forsythe, I. D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist.* v.16, n.4, p.435–452. 2010. DOI:10.1177/1073858410366481.

Shioda, K., Nisijima, K., Kasai, M. Risperidone attenuates the increase of extracellular nitric oxide and glutamate levels in serotonin syndrome animal models. *Neurosci Lett.* v.528, n.1, p.22–26. 2012. DOI:10.1016/j.neulet.2012.08.083.

Slotnick, B. Animal cognition and the rat olfactory system. *Trends Cogn Sci.* v.5, n.5, p.216–222. 2001. DOI:10.1016/S1364-6613(00)01625-9.

Sun, Y., Jin, K., *et al.* Neuronal nitric oxide synthase and ischemia-induced neurogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab.* v.25, n.4, p.485–492. 2005. DOI:10.1038/sj.jcbfm.9600049.

Stuehr, D. J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* v.37, p.339-59. 1997. DOI:10.1146/annurev.pharmtox.37.1.339.

Stuehr, D., Pou, S., Rosen, G.M. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem.* v.276, p.14533-6. 2001. DOI:10.1074/jbc.R100011200.

Sweatt, J. D. Neural plasticity and behavior- sixty years of conceptual advances. International Society for Neurochemistry, J Neurochem. s.2, p.179-199. 2016. DOI:10.1111/jnc.13580.

Susswein, A. J., Katzoff, A., *et al.* Nitric Oxide and Memory. Neuroscientist. v.10, n.2, p.153–162. 2004. DOI:10.1177/1073858403261226.

Takahashi, M., Izumi, R., Kaneto, H. Comparative studies on morphine- and stress-induced analgesia and the development of tolerance to the effects: implication of protein synthesis mechanism in the process. Jpn. J Pharmacol. v.37, n.2, p.197–202. 1985. DOI:10.1254/jjp.37.197.

Takahashi, L. K., Hubbard, D. T., *et al.* Predator odor-induced conditioned fear involves the basolateral and medial amygdala. Behav Neurosci. v.121, n.1, p.100–110. 2007. DOI:10.1037/0735-7044.121.1.100.

Takahashi, L. K. Olfactory systems and neural circuits that modulate predator odor fear. Front Behav Neurosci. v.8, n.72. 2014. DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00072.

Talavera-Cuevas, E., Condes-Lara, M., Martínez-Lorenzana, G. Aspectos sobre las funciones del óxido nítrico como mensajero celular en el sistema nervioso central. Salud Mental. v.26, n.2, p.42-50. 2003. ISSN 0185-3325.

Teixeira, K. V., Carobrez, A. P. Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plus-maze task. Behav Neurosci. v.113, n.1, p.196-203. 1999. DOI:10.1037/0735-7044.113.1.196.

Teyke, T. Nitric oxide, but not serotonin, is involved in acquisition of food-attraction conditioning in the snail *Helix pomatia*. Neurosci Lett. v.206, n.1, p.29–32. 1996. DOI:10.1016/0304-3940(96)12434-4.

Tinbergen, N. On aims and methods of ethology. Ethology. v.20, n.4, p.41–433. 1963. DOI:10.1111/j.1439-0310.1963.tb01161.x.

Trabace, L., Kendrick, K. M. Nitric oxide can differentially modulate striatal neurotransmitter concentrations via soluble guanylate cyclase and peroxynitrite formation. J Neurochem. v.75, n.4, p.1664–1764. 2000. DOI:10.1046/j.1471-4159.2000.0751664.x.

Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. Pharmacolog Reviews. v.62, n.3, p.405-496. 2010. DOI:10.1124/pr.109.002451.

Uliana, D., Hott, S., *et al.* Dorsolateral periaqueductal gray matter CB1 and TRPV1 receptors exert opposite modulation on expression of contextual fear conditioning. Neuropharmac. v.103, p.257-269. 2016. DOI:10.1016/j.neuropharm.2015.12.020.

Vaandrager, A. B., Hogema, B. M., De Jonge, H. R. Molecular properties and biological functions of cGMP-dependent protein kinase II. Front Biosci. v.10, p.2150–2164. 2005. DOI:10.2741/1687.

Valtschanoff, J. G., Weinberg, R. J. Lamina organization of the NMDA receptor complex within the postsynaptic density. J Neurosci. v.21, n.4, p.1211–1217. 2001. DOI:10.1523/JNEUROSCI.21-04-01211.

Van Dogen, A. Biology of the NMDA receptor: CRC Press/Taylor & Francis. 2009. ISBN-13: 978-1-4200-4414-0.

Vila-Verde, C., Marinho, A. L. Z., *et al.* Nitric oxide in the prefrontal medial cortex is involved in the anxiogenic-like effect induced by acute restraint stress in rats. Neurosci. v.320. p.30–42. 2016. DOI:10.1016/j.neuroscience.2016.01.040.

Vincent, S., Kimura, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthases in the rat brain. Neurosci. v.46, n.4, p.755–784. 1992. DOI:10.1016/0306-4522(92)90184-4.

Wang, J. Q., Chu, X-P., *et al.* Modulation of ionotropic glutamate receptors and acid-sensing ion channels by nitric oxide. Frontier Fisiol. v.3. n.164. p.1-7. 2012. DOI:10.3389/fphys.2012.00164.

Webeer, C. F. Papel dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> da matéria cinzenta periaqueductal dorsal na aquisição do condicionamento aversivo olfatório. Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2017.

Wiedenmayer, C. P. Plasticity of defensive behavior and fear in early development. Neurosci Biobehav Rev. v.33, n.3, p.432–441. 2009. DOI:10.1016/j.neubiorev.2008.11.004.

Willard, S. S., Koochekpour, S. Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. International Journal of Biological Sciences. v. 9, p. 948 – 959. 2013. DOI: 10.7150/ijbs.6426.

Woldman, Y. Y., Sun, J., *et al.* Direct chemiluminescence detection of nitric oxide aqueous solutions using the natural nitric oxide target soluble guanylyl cyclase. Free Radical Biology & Medicine. v.47, n.10, p.1339–1345. 2009. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.007.

Wolff, D. J., Gribbin, B. J. The inhibition of the constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms by indazole agents. Arch. Biochem Biophys. v.311, n.2, p.300–306. 1994. DOI:10.1006/abbi.1994.1241.

Woolley, J. F., Stanicka, J., Cotter, T. G. Recent advances in reactive oxygen species measurement in biological systems. Trends Biochem Sci. v.38, n.11, p.556-565. 2013. DOI:10.1016/j.tibs.2013.08.009.

Wotjak, C. T. Role of endogenous cannabinoids in cognition and emotionality. Mini Reviews in Medicinal Chemistry. v.5, n.7, p.659-670. 2005. DOI :10.2174/1389557054368763.

W.P., A., Mittal, C.K., *et al.* Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5' -cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v.74, p.3203–3207. 1977.

Wu, J., Wang, Y., *et al.* Evidence for involvement of the cGMP-protein kinase G signaling system in the induction of long-term depression, but not long-term potentiation, in the dentate gyrus *in vitro*. J Neurosci. v.18, n.10, p.3589–96. 1998. DOI:10.1523/JNEUROSCI.18-10-03589.

Xing, J., Li, D., Li, J. Role of GABA Receptors in Nitric Oxide Inhibition of Dorsolateral Periaqueductal Gray Neurons. Neuropharmac. v.54, n.4, p.734–744. 2008. DOI:10.1016/j.neuropharm.2007.12.008.

Yang, M., Augustsson, H., *et al.* The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. Physiol Behav. v.81, n.3, p.465–473. 2004. DOI:10.1016/j.physbeh.2004.02.010.

Yang, Y., Zhao, Q., *et al.* Luminescent chemodosimeters for bioimaging. Chem Rev. v.113, n.1, p.192-270. 2013. DOI:10.1021/cr2004103.

Yildiz, A. E., Ulak, G., *et al.* 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor impairs passive-avoidance and elevated plus-maze memory performance in rats. Pharmacol Biochem Behav. v.87, n.4, p.434-43. 2007. DOI:10.1016/j.pbb.2007.05.019.

Yao, Y., Kelly, M. T., *et al.* PKM $\zeta$  maintains late-LTP by NSF/GluR2-dependent trafficking of postsynaptic AMPARs. J Neurosci. v.28, n.31, p.7820- 7827. 2008. DOI:10.1523/JNEUROSCI.0223-08. 2008

Yoshimura, T., Yokoyama, H., *et al.* In vivo EPR detection and imaging of endogenous nitric oxide in lipopolysaccharide-treated mice. Nat Biotechnol. v.14, n.8, p.992-994. 1996. DOI:10.1038/nbt0896-992.

Zanela, C. Â. Efeito da microinjeção de bicuculina na matéria cinzenta periaquedutal dorsal em ratos submetidos a um condicionamento olfatório aversivo. Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2015.

Zhao, Y., Brandish, P. E., *et al.* A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. PNAS. v.96, n.26, p.14753–14758. 1999. DOI: 10.1073/pnas.96.26.14753.

Zhou, Q. G., Hu, Y., *et al.* Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. J Neurochem. v.103, n.5, p.1843–1854. 2007. DOI:10.1111/j.1471-4159.2007.04914.x.

Zhou, L., Zhu, D.Y. Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. Nitric Oxide. v.20, n.4, p.223–230. 2009. DOI:10.1016/j.niox.2009.03.001.

Zhuo, M., Hu, Y., *et al.* Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. Nature. v.368, n.6472, p.635–9. 1994a. DOI:10.1038/368635a0.