



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

Letícia Corrêa Nakatsukasa Takasumi

Modulação Glutamatérgica da Matéria Cinzenta Periaquedutal no Processamento Emocional Negativo: Influências do Sexo em Modelos de Condicionamento Aversivo

Florianópolis

2025

Letícia Corrêa Nakatsukasa Takasumi

Modulação Glutamatérgica da Matéria Cinzenta Periaquedutal no Processamento Emocional Negativo: Influências do Sexo em Modelos de Condicionamento Aversivo

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de doutora em Farmacologia.
Orientador: Prof. Antônio de Pádua Carobrez, Dr.

Florianópolis

2025

Corrêa Nakatsukasa Takasumi, Letícia
Modulação Glutamatérgica da Matéria Cinzenta
Periaquedutal no Processamento Emocional Negativo:
Influências do Sexo em Modelos de Condicionamento
Aversivo/Corrêa Nakatsukasa Takasumi ; orientador,
Antônio de Pádua Carobrez, 2025.
94 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Farmacologia. 3. Neurociência. 4.
Comportamento defensivo. 5. Diferenças sexuais. I. de
Pádua Carobrez, Antônio . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.
III. Título.

Letícia Corrêa Nakatsukasa Takasumi

Modulação Glutamatérgica da Matéria Cinzenta Periaquedutal no Processamento Emocional Negativo: Influências do Sexo em Modelos de Condicionamento Aversivo

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora no dia 29 de maio de 2025 composta pelos seguintes membros:

Dr. Antonio de Pádua Carobrez
FMC/CCB/UFSC

Dr. Newton Sabino Canteras
Universidade de São Paulo

Dr. Geison de Souza Izídio
BEG/CCB/UFSC

Dr. Jose Marino Neto
CFS/CCB/UFSC

Dr^a. Eloisa Pavesi
MOR/CCB/UFSC

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



Documento assinado digitalmente
Jose Eduardo da Silva Santos
Data: 16/10/2025 11:41:23-0300
CPF: ***.948.289-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Coordenação do Programa de Pós-
Graduação



Documento assinado digitalmente
Antonio de Padua Carobrez
Data: 13/10/2025 14:38:20-0300
CPF: ***.306.398-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Antônio de Pádua Carobrez, Dr.
Orientador

Florianópolis
2025

AGRADECIMENTOS

Em especial aos auxílios financeiros: CNPq e CAPES. E ao departamento de Farmacologia e ao LAMEB pela estrutura e equipamentos. Ao Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez, meu orientador, pelas discussões científicas e divagações sobre a vida. Agradeço por apoiar um projeto novo e desafiador e confiar no meu trabalho para realizá-lo. À Luciane, que me apoiou e ajudou durante todo o doutorado, abrindo mão do seu tempo para que eu não precisasse passar por tudo sozinha. A todos que participaram dessa tese, direta ou indiretamente, inclusive aos animais, todos que fizeram com que esse projeto se transformasse no meu trabalho de doutorado e no meu projeto de vida.

Aos docentes, discentes e funcionários do Departamento de Farmacologia UFSC, no auxílio e compreensão durante todo tempo de convivência. E, também, a todos os professores e tantas outras pessoas que contribuíram em minha formação e na concretização deste trabalho. Ressalto toda a equipe do Lafinim UEL, minha primeira morada científica, minha antiga orientadora Prof^a Dra^a Thaís Zaia, co-orientadores, parceiros de laboratório, principalmente Renato e Andressa, que me iniciaram cientificamente e para quem devo muito do que sei.

Aos meus pais, Bárbara e Fabio, por tudo o que sou. Vocês são minha essência, os maiores amores da minha vida e sem vocês eu jamais chegaria onde estou. Meus pais me ensinaram a ter garra, persistência, e que o caminho não é fácil, mas que não importa quantas vezes eu caia, eles estarão lá para me levantar. Se hoje conquistei esse título, é porque eles nunca deixaram meu lado. Um agradecimento especial para a Pandirene e a Ponyo, que trouxeram luz e motivação para que eu continuasse e me amaram incondicionalmente. A toda minha grande família, avós, avôs, tias, tios e primos, de sangue ou de coração por terem participado dessa minha jornada que começou desde que eu era criancinha e por serem acento em inúmeros momentos.

Aos meus amigos, aos novos e aos antigos, aos que passaram e, principalmente, aos que ficaram. Ainda bem que a vida me presenteou com tantas pessoas boas, não tenho ideia do que seria sem vocês. Aqui deixo alguns nomes para que fiquem gravados como uma parte tão importante da minha existência: Ana Júlia, Thayli, Christian, Good, Arissa, Walison, Hugo, Lucas, Roberta, Marcella, Felipe, Blenda, Weillher, Luciane, Laís, e tantos outros, obrigada infinitamente.

Esse trabalho é fruto de uma jornada muito longa, um caminho que comecei aos quatro anos, quando inventei de ser cientista. Enfrentei muitas batalhas e barreiras que não foram fáceis

de vencer. Cada pessoa que passou pelo meu caminho deixou algo de si, e eu agradeço por cada pedacinho de conhecimento e de vida que me deixaram.

Marie Curie disse: *“A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Precisamos ter perseverança e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos dotados para algo e que esse algo deve ser alcançado.”*

Agora, devo seguir novos caminhos, enfrentar novas batalhas, sem saber o que me espera. Mas, por ora, olho para o caminho que trilhei até aqui com muito orgulho, e posso deixar apenas o meu humilde e sincero: muito obrigada.

Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido. Agora é a hora de entender mais, para que possamos temer menos.

Marie Curie

RESUMO

Comportamentos defensivos são fundamentais para a sobrevivência e resultam de processos neurobiológicos que envolvem avaliação de risco, aprendizagem associativa e resposta a ameaças. Este estudo investigou os mecanismos comportamentais e neurobiológicos que sustentam a formação e a expressão de respostas defensivas em ratos, com foco nas diferenças sexuais e no papel da neurotransmissão glutamatérgica na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl). Para isso, foram utilizados ratos machos e fêmeas submetidos a protocolos de condicionamento aversivo olfatório com estimulação glutamatérgica (NMDA) da MCPdl ou choque nas patas como estímulos incondicionados. Foram avaliados comportamentos defensivos e de avaliação de risco nas sessões de condicionamento e teste. Os resultados indicaram que a ativação dos receptores NMDA na MCPdl induziu respostas defensivas imediatas compatíveis com o processamento de ameaça de maneira sexo-dependente. As fêmeas apresentaram maior variabilidade comportamental e maior expressão de comportamentos de avaliação de risco. Os protocolos de condicionamento aversivo também apresentaram resultados diferentes: o primeiro protocolo facilitou a visualização da resposta defensiva imediata, mas não gerou uma memória associativa robusta. No condicionamento com choque nas patas, o bloqueio de receptores NMDA com AP5 não alterou a resposta imediata ao estímulo aversivo, mas dificultou formação da memória associativa nos machos. Em fêmeas, o AP5 não interferiu na expressão comportamental, reforçando a presença de diferenças sexuais no processamento de experiências traumáticas. Esses achados reforçam a ideia da MCP como um hub integrativo no circuito de defesa, participando tanto da coordenação motora da resposta defensiva como dos aspectos associativos e mnemônicos da experiência aversiva. Em conjunto, esta tese contribui para o entendimento das bases neurais da resposta defensiva, destacando como as diferenças sexuais na MCPdl afetam a construção de respostas adaptativas a experiências traumáticas. Além disso, os resultados encorajam a reavaliação dos paradigmas e critérios de avaliação em estudos sobre processamento emocional, incluindo o sexo como uma variável biológica.

Palavras-chave: Congelamento. NMDA. Comportamento defensivo. Dimorfismo Sexual

ABSTRACT

Defensive behaviors are fundamental for survival and result from neurobiological processes involving risk assessment, associative learning, and threat response. This study investigated the behavioral and neurobiological mechanisms underlying the formation and expression of defensive responses in rats, focusing on sex differences and the role of glutamatergic neurotransmission in the dorsolateral periaqueductal gray (dlPAG). For this purpose, male and female rats underwent olfactory aversive conditioning protocols with glutamatergic (NMDA) stimulation of the dlPAG or footshock as unconditioned stimuli. Defensive and risk-assessment behaviors were evaluated during conditioning and test sessions. Results indicated that activation of NMDA receptors in the dlPAG induced immediate defensive responses consistent with threat processing in a sex-dependent manner. Females exhibited greater behavioral variability and higher expression of risk-assessment behaviors. The aversive conditioning protocols also yielded distinct outcomes: the first protocol facilitated the observation of immediate defensive responses but did not generate robust associative memory. In the footshock conditioning, blockade of NMDA receptors with AP5 did not alter the immediate response to the aversive stimulus but impaired associative memory formation in males. In females, AP5 did not interfere with behavioral expression, reinforcing the presence of sex differences in the processing of traumatic experiences. These findings support the idea of the PAG as an integrative hub in the defense circuit, participating both in the motor coordination of defensive responses and in the associative and mnemonic aspects of aversive experiences. Taken together, this thesis contributes to understanding the neural bases of defensive responses, highlighting how sex differences in the dlPAG affect the construction of adaptive responses to traumatic experiences. Moreover, the results encourage the reevaluation of paradigms and assessment criteria in studies of emotional processing, including sex as a biological variable.

Keywords: Freezing. NMDA. Defensive behavior. Sexual Dimorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1 - Linha do tempo destacando publicações teóricas e empíricas seminais sobre indicadores das respostas defensivas em roedores.....	22
Figure 2 - Representação esquemática das principais estruturas envolvidas no processamento do condicionamento aversivo.	24
Figure 3 - Matéria cinzenta periaquedutal.....	25
Figure 4 - Representação esquemática do papel da Matéria Cinzenta Periaquedutal (MCP) no processamento de estímulos aversivos e emoções negativas....	26
Figure 6 - Representação da Caixa A utilizada no protocolo de condicionamento aversivo olfatório.....	35
Figure 7 - Representação da Caixa B usada no protocolo de condicionamento aversivo olfatório.....	36
Figure 8 - Representação da Caixa Odor usada no protocolo de condicionamento aversivo olfatório.....	37
Figure 9 – Esquema representativo do Protocolo 1 de condicionamento aversivo olfatório com estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral.	38
Figure 10 - Esquema representativo do Protocolo 2 de condicionamento aversivo olfatório com estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral.	39
Figure 11 - Esquema representativo do Protocolo 3 de condicionamento aversivo olfatório por choque nas patas.....	40
Figure 12 - Fotomicrografia e diagramas representativos dos pontos de microinjeção na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) de encéfalos de ratos.	43
Figure 13 - Efeitos da ativação de receptores NMDA na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral sobre os comportamentos defensivos (a e b) e de avaliação de risco (c e d) de ratos machos e fêmeas nas etapas da sessão de condicionamento do condicionamento aversivo olfatório.....	46
Figure 14 - Efeitos da ativação de receptores NMDA na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral sobre os comportamentos defensivos (a) e de avaliação de risco (b) de ratos machos e fêmeas após microinjeção.....	47

Figure 15 - Distribuição percentual dos comportamentos observados após estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl).	48
Figure 16 – Tempo dos comportamentos defensivos (a) e de avaliação de risco (b) de ratos machos e fêmeas durante a sessão de Familiarização 2 (F2) e Teste (TE) do condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral.	49
Figure 17 – Diferença (Δ) entre a sessão de teste e familiarização 2 do condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral para expressão de comportamentos.	50
Figure 18 - Preferência ao espaço fechado (a) e próximo ao odor (b) de ratos machos e fêmeas durante a sessão de Familiarização 2 (F2) e Teste (TE) do condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral.	52
Figure 19 - Diferença (Δ) entre a sessão de teste e familiarização 2 do condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral para preferência a local.	53
Figure 20 – Comparação dos comportamentos defensivos (DEF) e de avaliação de risco (RISCO) na sessão de condicionamento entre protocolos de condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral.	55
Figure 21 - Comparação da preferência ao espaço fechado ou próximo ao odor na sessão de teste entre protocolos de condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral.	57
Figure 22 - Comparação da diferença (Δ) entre a sessão de teste e familiarização 2 para preferência a local entre protocolos de condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral.	59
Figure 23 - Efeitos do antagonismo de receptores NMDA por AP5 na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral sobre os comportamentos defensivos (a) e de avaliação de risco (b) de ratos machos e fêmeas durante a sessão de condicionamento do condicionamento aversivo olfatório por choque nas patas.	61
Figure 24 - Tempo dos comportamentos defensivos (a) e de avaliação de risco (b) de ratos machos e fêmeas durante a sessão de Familiarização 2 (F2) e Teste (TE) do condicionamento aversivo olfatório por choque nas patas antagonismo por AP5.	62

Figure 25 - Diferença (Δ) entre a sessão de teste e familiarização 2 do condicionamento aversivo olfatório por choque nas patas antagonismo por AP5 para expressão de comportamentos. Barras representam a mediana e intervalo interquartil do delta. 64

Figure 26 - Preferência ao espaço fechado (a) e próximo ao odor (b) de ratos machos e fêmeas durante a sessão de Familiarização 2 (F2) e Teste (TE) do condicionamento aversivo olfatório por choque nas patas antagonismo por AP5. 66

Figure 27 - Diferença (Δ) entre a sessão de teste e familiarização 2 do condicionamento aversivo olfatório por choque nas patas com antagonismo por AP5 para preferência a local. Barras representam a mediana e intervalo interquartil do delta. ... 67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	RAZÕES E EMOÇÕES	15
1.2	CONDICIONAMENTO AVERSIVO ATRAVÉS DO TEMPO	18
1.3	BASES NEURAIS DO CONDICIONAMENTO AVERSIVO: O PAPEL DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL	22
1.4	NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NA MCP E SEU PAPEL NO CONDICIONAMENTO AVERSIVO	27
1.5	DIFERENÇAS SEXUAIS E RESPOSTA DEFENSIVA DE RATAS	29
1.6	HIPÓTESE	31
1.7	OBJETIVOS	31
1.7.1	<i>Objetivo Geral</i>	31
1.7.2	<i>Objetivos Específicos</i>	31
2	MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1	ANIMAIS	32
2.2	ODOR	32
2.3	SISTEMA DE VÍDEO	32
2.4	DROGAS	32
2.5	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	33
2.6	MICROINJEÇÃO INTRACEREBRAL	34
2.7	EQUIPAMENTOS	34
2.7.1	<i>Caixa de Condicionamento A (Caixa A) (tempo-real)</i>	35
2.7.2	<i>Caixa de Condicionamento B (Caixa B)</i>	35
2.7.3	<i>Caixa de Teste (Caixa Odor)</i>	36
2.8	PROTOCOLOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	37
2.8.1	<i>Experimento 1: Observação de diferenças sexuais durante o condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da MCPdl</i>	37
2.8.2	<i>Experimento 2: Comparação dos protocolos de condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da MCPdl</i>	38
2.8.3	<i>Experimento 3: Avaliação do efeito do antagonista AP5 de receptores NMDA na MCPdl no condicionamento aversivo olfatório por choque nas patas</i>	39
2.9	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	40
2.10	PERFUSÃO E HISTOLOGIA	43
2.11	PONTOS FINAIS HUMANITÁRIOS	43
2.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
2.13	USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL	45
3	RESULTADOS	45

3.1	EXPERIMENTO 1: OBSERVAÇÃO DE DIFERENÇAS SEXUAIS DURANTE O CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO POR ESTIMULAÇÃO GLUTAMATÉRGICA DA MCPDL	45
3.2	EXPERIMENTO 2. COMPARAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO POR ESTIMULAÇÃO GLUTAMATÉRGICA DA MCPDL	54
3.3	EXPERIMENTO 3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ANTAGONISTA AP5 DE RECEPTORES NMDA NA MCPDL NO CAO POR CHOQUE NAS PATAS	60
4	DISCUSSÃO.....	68
4.1	OBSERVAÇÃO DE DIFERENÇAS SEXUAIS DURANTE O CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO POR ESTIMULAÇÃO GLUTAMATÉRGICA DA MCPDL	68
4.2	COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO POR ESTIMULAÇÃO GLUTAMATÉRGICA DA MCPDL	72
4.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ANTAGONISTA AP5 DE RECEPTORES NMDA NA MCPDL NO CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO POR CHOQUE NAS PATAS	74
5	CONCLUSÃO	76
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
7	APÊNDICES	92
7.1	APÊNDICE A – DADOS ESTATÍSTICOS BÁSICOS	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 RAZÕES E EMOÇÕES

Desde o início da história humana, a humanidade busca compreender e expressar as complexidades do mundo emocional (Esperidião-Antonio et al., 2017). Essa exploração, inclusive, se manifesta em diversas formas de arte, expressando emoções e evocando respostas emocionais (Cowen et al., 2020). Podemos observar esse fenômeno em diversas esferas da cultura, como nos livros de terror de Stephen King (Luckhurst, 2008) e no uso de trilhas sonoras para intensificar emoções em filmes, tal como a angustiante música de *Psicose* (“*Psycho*”, 1960). O motivo do fascínio é a influência das emoções sobre o comportamento. Como pode um simples sentimento moldar nossas ações, relacionamentos e até mesmo identidade? Essa questão tem inspirado artistas, filósofos e cientistas ao longo da história, levando a uma infinidade de interpretações e teorias (Esperidião-Antonio et al., 2017).

Nos estágios iniciais da evolução humana, o *Homo sapiens sapiens* desenvolveu suas características físicas para garantir sua sobrevivência e proliferação da espécie (Montag; Panksepp, 2017). No entanto, imagine um indivíduo que não soubesse identificar uma fruta podre, não tivesse motivação para caçar, ignorasse sinais de perigo emitidos por animais selvagens ou não reconhecesse a fragilidade de sua prole. Esse indivíduo teria dificuldades em sobreviver e, conseqüentemente, em transmitir seus genes para as próximas gerações. Logo, além de melhorias adaptativas físicas, comportamentos e estados emocionais, motivacionais e cognitivos também são essenciais para a adaptação do indivíduo ao ambiente e situações (DARWIN, 1872; PANKSEPP, 2016).

A emoção é um estado psicológico induzido por um estímulo externo ou interno e que gera uma resposta que pode ser fisiológica, cognitiva, comportamental e de expressão facial (Anderson; Adolphs, 2014; Gross; Feldman Barrett, 2011; Panksepp, 2016). O estado psicológico é uma condição temporária da mente e cognição com configurações definidas que controla o modo que a informação externa será interpretada pelo encéfalo para formar a melhor estratégia para responder ao estímulo (Greene et al., 2023). Por exemplo, a fome pode tornar apetitoso um prato de frituras frias, enquanto a saciedade pode causar repulsa ao mesmo prato. Esses sentimentos subjetivos, como fome ou saciedade, são a experiência consciente dos estados psicológicos, e esses estados são o que, de fato, controlam o comportamento (Greene et al., 2023). Os estados psicológicos, podem, inclusive, inibir respostas. Durante o sono, o

cérebro processa os estímulos sensoriais de forma diferente, suprimindo respostas a ruídos sutis que seriam percebidos no estado acordado, mesmo inconscientemente (Weigand; Michael; Schulz, 2007).

Uma teoria de como funcionam as emoções é a Teoria das Emoções Construídas de Barrett que desafia a ideia de emoções básicas distintas e sugere que as emoções são construídas no encéfalo com base em experiências passadas, contexto e conceitos (Coppini et al., 2023). A teoria enfatiza a integração de recursos perceptuais, cognitivos, interoceptivos e motores no processamento de situações emocionais e em seu enfrentamento eficaz (Bauer-Wu et al., 2017). Essa visão holística do processamento de emoções sugere que os estados emocionais surgem da atividade coordenada de várias regiões do encéfalo, em vez de serem localizados em substratos neurais específicos. A teoria também ressalta a influência de experiências passadas, interações sociais e fatores contextuais na formação de respostas emocionais (Barrett, 2016).

Lisa F. Barret conta em seu livro "How emotions are made" (BARRETT, 2018): "Quando falo para plateias em conferências (...), algumas pessoas ficam incrédulas: 'Você está dizendo que em uma situação frustrante e humilhante, nem todo mundo ficará tão zangado a ponto de o sangue ferver, as palmas das mãos suarem e as bochechas corarem?' E minha resposta é sim. (...) dando minha primeira palestra sobre essas ideias, era possível ver a variação da raiva em tempo real nos membros da audiência que não gostaram mesmo das evidências. (...) Nesses exemplos, meus colegas demonstraram a variabilidade da raiva de forma muito mais eficaz do que minha apresentação." (tradução livre)

De maneira geral, a teoria de Barrett estabelece as emoções como construções dependentes de experiências prévias, diferenças individuais e fatores ambientais que surgem da interação e processamento de vários processos cognitivos e sensoriais no encéfalo (Coppini et al., 2023). Independentemente da perspectiva teórica, o medo, por exemplo, não é controlado por uma única região encefálica ou sistema de neurotransmissão, mas sim por circuitos neurais complexos que integram e processam informações sensoriais relevantes para esse estado emocional (Vytal; Hamann, 2010).

Com base nesse entendimento, a investigação dos mecanismos neurobiológicos das emoções em modelos animais tornou-se uma abordagem central na neurociência. Estudos em espécies como roedores e moscas são fundamentais, pois os circuitos neurais que controlam respostas emocionais são amplamente conservados entre as espécies (Anderson, 2016). Além de possibilitar o mapeamento preciso de circuitos e neurotransmissores envolvidos nos estados

emocionais, a pesquisa em animais contribui para a identificação de novos alvos terapêuticos para transtornos psiquiátricos, como ansiedade e depressão (Anderson; Adolphs, 2014).

No entanto, a translação dos achados de modelos animais para humanos exige cautela. Embora os animais possam apresentar estados emocionais básicos, suas experiências subjetivas não podem ser medidas diretamente (Anderson; Adolphs, 2014). Animais não possuem a mesma capacidade humana de introspecção e categorização das emoções, tornando necessária uma abordagem baseada em comportamento e fisiologia para inferir estados emocionais. Estudos demonstram que roedores apresentam respostas emocionais, como agressão e comportamentos defensivos, mas a interpretação desses comportamentos não deve ser confundida com a experiência emocional humana (Anderson, 2016; Anderson; Adolphs, 2014; Panksepp, 2016).

David J. Anderson sugere que o estudo das emoções em animais deve focar em estados internos e não apenas em comportamentos imediatos (Anderson; Adolphs, 2014). Esses estados internos persistem ao longo do tempo e modulam o comportamento de forma contínua, independentemente da presença imediata de estímulos externos. Essa ideia se aproxima da teoria do processamento preditivo proposta por Barrett (2016), em que o encéfalo antecipa e interpreta informações com base em estados internos e experiências anteriores. Essa perspectiva permite uma abordagem mais objetiva para estudar as emoções, utilizando técnicas e modelos reprodutíveis e validados (Anderson, 2016).

O condicionamento aversivo é uma das abordagens mais empregadas para estudar emoções negativas relacionadas ao medo e ansiedade, pois permite a manipulação controlada de estímulos e a observação de respostas comportamentais e fisiológicas associadas à aprendizagem aversiva (LeDoux, 2012; LeDoux; Pine, 2016). Em roedores, esse paradigma tem sido essencial para a identificação das redes neurais envolvidas na detecção, processamento e resposta a ameaças, incluindo a amígdala, o hipocampo, o córtex pré-frontal e a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) (Tovote et al., 2016; Tovote; Fadok; Lüthi, 2015).

O estudo das emoções em animais, especialmente por meio do condicionamento aversivo, tem sido fundamental para compreender os circuitos neurais envolvidos no medo e na ansiedade. Esse paradigma permite identificar como estímulos ameaçadores moldam o comportamento e a memória emocional, fornecendo insights valiosos sobre mecanismos conservados entre espécies. Ao longo do tempo, diferentes abordagens foram desenvolvidas para investigar esse processo, refinando nosso entendimento sobre a aprendizagem aversiva e sua relevância para transtornos emocionais.

1.2 CONDICIONAMENTO AVERSIVO ATRAVÉS DO TEMPO

Imagine que está vagando por um novo ambiente. De repente, um som alto aparece seguido de um choque elétrico. Se isso acontecer algumas vezes, na próxima vez que esse som tocar, o seu estado de alerta será evocado, esperando um choque desagradável. Esta forma de aprendizagem foi por anos entendida como condicionamento de medo ou aversivo, um processo amplamente estudado há mais de um século (Fanselow; Sterlace, 2014). E tudo começou com um caso de serendipidade (i.e., descoberta acidental enquanto se procura outra coisa).

No final da década de 1890, Ivan Pavlov, um fisiologista russo, buscava entender reações salivares usando apresentação de comida a cães. No entanto, ele percebeu que logo ao avistar os experimentadores, os animais já salivavam, pois aprenderam que eram eles que forneciam a comida. Pavlov começou a explorar esse fenômeno usando uma variedade de estímulos (visuais, sonoros e olfatórios), sendo a sua descoberta do condicionamento clássico um pilar para a compreensão da aprendizagem associativa. Seu estudo, publicado em 1927 (Pavlov, 2010), demonstrou que um estímulo neutro ou condicionado (EC; como uma campainha) podia ser associado a um estímulo incondicionado (EI; comida) para provocar uma resposta condicionada (salivação). Embora tenha apenas comentado sobre estímulos aversivos, os seus princípios abriram caminho para estudos sobre estados emocionais e motivacionais.

Na década de 1920, apesar do experimento de Pavlov ter sido conduzido em cães, outros estudos estavam sendo desenvolvidos em humanos, o que ressaltaria a validade do condicionamento aversivo em animais não humanos como ferramenta para o estudo de comportamentos emocionais (Anderson; Adolphs, 2014). Por volta da mesma época, John B. Watson e Rosalie Rayner (Watson; Rayner, 1920) condicionaram uma criança pequena a ter respostas negativas (choro e esquiva) frente a um rato branco, associando a apresentação do rato a um ruído alto e assustador. O experimento que viria a ser conhecido como "*Little Albert*" mostrou que o aprendizado associativo para o condicionamento aversivo também acontecia em humanos.

O interessante do experimento *Little Albert* (Watson; Rayner, 1920) é que ressalta vários aspectos que compõem o condicionamento aversivo, amplamente aplicados até os dias atuais. Por exemplo, os autores conduziram primeiro uma apresentação do EC (rato branco) junto com outros estímulos (e.g., cão, coelho e máscara) e a criança não apresentou nenhuma resposta negativa, determinando, assim, a linha de base. Após a aquisição do condicionamento,

ou seja, da memória associativa, a criança começou a apresentar respostas negativas para estímulos além do rato branco, como cães, coelhos e casaco de pele. Esse fenômeno é hoje conhecido como generalização e indica uma discriminação baixa entre os estímulos (Bayer; Bertoglio, 2020; Keiser et al., 2017; Poulos et al., 2016). Por fim, e não tão explorado por conta da interrupção do estudo, foi o processo de extinção. Se o EC fosse apresentado repetidamente sem o EI, as respostas condicionadas poderiam diminuir gradualmente (Graham; Milad, 2013; Zhu et al., 2018), o que foi observado em menor intensidade ao fim do experimento.

A partir de então, surgiu uma área de pesquisa que visava estabelecer um modelo de condicionamento que permitisse o estudo aprofundado de neurociência com validade e translação. Nas décadas de 1930 e 1940, B. F. Skinner (1941) revolucionou a investigação comportamental com o desenvolvimento da câmara de condicionamento operante, ou "caixa de Skinner". Esse tipo de condicionamento demanda um aprendizado associativo entre estímulos e um comportamento operacional (*e.g.*, apertar um botão). A sua metodologia permitiu medir sistematicamente respostas defensivas e estado motivacional em roedores machos ao observar como eles ajustavam suas ações para obter recompensas ou evitar punições, como choque elétrico.

No entanto, foi apenas a partir da década de 1970 que os estudos sobre comportamentos defensivos de roedores foram aprofundados o suficiente para estabelecer os critérios de avaliação usados até hoje para o condicionamento aversivo (Bao et al., 2024). Robert Bolles, em 1970, introduziu o conceito de reações defensivas espécie-específicas (Bolles, 1970). Esse conceito leva em consideração os comportamentos defensivos inatos de cada espécie animal adaptados aos seus nichos ecológicos. Na natureza, roedores podem congelar em resposta a ameaças, uma vez que a imobilidade reduz a detecção por predadores (Crawford; Masterson, 1982). Esta ideia desafiou a visão tradicional da época de que todos os comportamentos eram aprendidos (condicionados), realçando o papel da evolução para os comportamentos defensivos. O trabalho de Bolles incentivou a ideia de que, para compreender o que chamavam de respostas de medo (na realidade, resposta frente a ameaças ou defensivas), seria necessário entender os comportamentos naturais das espécies estudadas (Bolles, 1970).

Seguindo o raciocínio de Bolles, o Laboratório Blanchard, liderado por Robert J. e D. Caroline Blanchard (que fora aluna de Bolles), foi pioneiro em estabelecer modelos laboratoriais para o estudo de respostas defensivas em roedores (Blanchard, 2023; Blanchard; Blanchard, 1989). O princípio era desenvolver modelos que mimetizassem situações naturais aos roedores para maximizar a visualização e o estudo dos comportamentos. O experimento

inicial do laboratório envolvia dar choques elétricos nas patas de ratos e observar o que eles faziam (Blanchard; Blanchard, 1969). No entanto, na leitura de comportamento, observaram que os ratos faziam “nada” na caixa após o choque. Surge, então, um dos primeiros estudos do comportamento de congelamento, chamado inicialmente de “*crouching*” (Blanchard, 2023; Blanchard; Blanchard, 1969).

O congelamento é um comportamento defensivo caracterizado pela imobilidade do roedor em postura arqueada, contando apenas com movimentos de respiração (Blanchard; Blanchard, 1969; Crawford; Masterson, 1982). Esse comportamento foi validado como comportamento defensivo após ser observado em diferentes espécies e linhagens de roedores (*e.g.*, ratos selvagens, ratos long-evans, hooded, camundongos e esquilos) expostos a choque nas patas e a predadores (gato e cobra) (Blanchard; Blanchard; Griebel, 2005; Blanchard; Blanchard, 1989; Blanchard; Flannelly; Blanchard, 1986; Goldthwaite; Coss; Owings, 1990). Posteriormente, o comportamento de congelamento, foi validado como uma resposta condicionada para avaliar o condicionamento aversivo. Isso porque era expresso tanto durante a aprendizagem (pareamento de estímulos EC-EI) quanto no teste dias após (apresentação somente do EC) (Bolles; Fanselow, 1980; Fanselow; Sigmundi, 1986).

A partir da validação do congelamento como resposta defensiva e condicionada, a neurociência passou por uma mudança chave, deixando de usar múltiplos indicadores de aversão (respostas instrumentais ou operantes, reflexo de sobressalto, atividade e respostas fisiológicas) e adotando apenas o congelamento como critério determinante do condicionamento aversivo (Figura 1). Essa transformação foi observada por Bao e colaboradores (2024) em uma revisão sistemática que incluiu mais de cinco mil estudos usando condicionamento aversivo desde 1935. Essa revisão também conduziu uma meta-análise que mostrou correlações positivas entre congelamento e vocalizações ultrassônicas (22 kHz) e pressão arterial, além de correlação negativa com frequência cardíaca (Bao et al., 2024). Os resultados da revisão corroboram a relação entre comportamentos defensivos e respostas fisiológicas, amplamente estudada até hoje (Signoret-Genest et al., 2023; Tovote et al., 2005).

No entanto, as respostas comportamentais frente ao condicionamento aversivo e situações ameaçadoras de roedores não se limita ao congelamento. Roedores expressam diferentes comportamentos frente a ameaças dependendo da iminência e distância da ameaça e do contexto em que se encontram (tamanho da caixa teste, possibilidade de fuga, possibilidade de se esconder, lugares fechados e presença de paredes) (Augustsson, 2004; Blanchard et al., 1993; Blanchard; Blanchard, 1989; De Molina; Hunsperger, 1962; Zanoveli; Nogueira;

Zangrossi, 2003). Fuga, escape, corrida (*darting*) e comportamentos de avaliação de risco, como agachar-cheirar (*crouch-sniffing*), varredura (*scanning*), investigação vertical (*rearing*), postura de estiramento (*stretch attend*) e rastejar (*stretch approach*) são alguns dos comportamentos que roedores apresentam frente a ameaças, além do congelamento (Augustsson, 2004; Bandler et al., 2000; Bittencourt et al., 2004; Blanchard; Blanchard, 1989; De Andrade Rufino et al., 2019; Gruene et al., 2015; Hubbard et al., 2004; Mitchell et al., 2022).

Esses comportamentos são observados em diferentes tipos de condicionamento aversivo. Ademais, o condicionamento aversivo olfatório tem se destacado como um modelo robusto para a investigação das bases neurais do medo e da aprendizagem associativa (Canteras; Pavesi; Carobrez, 2015; Otto; Cousens; Herzog, 2000). Diferentemente de estímulos auditivos ou visuais, os odores têm a capacidade de evocar memórias emocionais intensas e persistentes, tornando-os uma ferramenta valiosa para o estudo da memória traumática (Otto; Cousens; Herzog, 2000; Richardson, 2002). Estudos demonstram que associações entre odores e experiências aversivas geram respostas comportamentais e fisiológicas duradouras, moduladas por estruturas como a MCP (Canteras; Pavesi; Carobrez, 2015; Kroon; Carobrez, 2009). Dado que o olfato é o principal sentido dos roedores, o condicionamento aversivo olfatório se mostra particularmente relevante para compreender a aprendizagem e a memória traumática nessas espécies.

A partir da década de 1990, rápidos avanços nas técnicas moleculares e genéticas permitiram estudos aprofundados sobre os mecanismos celulares da aprendizagem e da memória (Kandel, 2001). Em estudos com roedores, a engenharia genética permitiu a manipulação de genes envolvidos nas respostas defensivas para melhor compreensão dos seus fundamentos moleculares (Van Dam et al., 2000). Atualmente, técnicas como a optogenética (técnica que usa luz para ativar ou inibir circuitos ou neurotransmissões) (Johansen et al., 2012) e DREADDs (técnica que usa drogas para ativar ou inibir circuitos ou neurotransmissões) (Whissell; Tohyama; Martin, 2016) revolucionaram a investigação sobre estados emocionais e motivacionais. No entanto, apesar dessas inovações, os mecanismos que regulam a aprendizagem e a memória traumática ainda não estão completamente esclarecidos, evidenciando a complexidade desses processos.

comportamentos defensivos e de avaliação de risco em roedores e comportamentos de medo e ansiedade em humanos (Caroline Blanchard et al., 2001). Por volta das décadas de 1980 e 1990, estudos revelaram que a lesão da amígdala prejudicava o aprendizado associativo traumático, realçando sua importância para o condicionamento aversivo e orquestração de respostas defensivas (LeDoux et al., 1990).

O processamento emocional envolve diferentes estruturas encefálicas. Inicialmente, se via a amígdala, particularmente seus núcleos lateral e central, como crucial no condicionamento aversivo. Isso porque essa estrutura recebe estímulos sensoriais, estabelecendo a associação EC–EI e projetando para o hipotálamo e o tronco encefálico, de onde se organizam respostas defensivas autonômicas e comportamentais (Johansen et al., 2011; Kim; Jung, 2006) (Figura 2). No entanto, estudos demonstraram que essa estruturação é mais aplicável a situações específicas, como aquelas envolvendo estímulos aversivos somatossensoriais (Gross; Canteras, 2012). Logo, outras vias podem predominar em diferentes modalidades de ameaça.

O hipocampo também foi indicado como fundamental no condicionamento aversivo, controlando a consolidação de memórias e os mecanismos no córtex pré-frontal e estriado que orquestram a resposta defensiva (Johansen et al., 2012; Maren; Quirk, 2004). Outras regiões encefálicas, como a ínsula e o córtex cingulado, têm sido implicadas no processamento e extinção do condicionamento aversivo (Kuruppath, 2024; Williams et al., 2022). Nesse sentido, a MCP possui um papel como núcleo efetor essencial para a expressão dos comportamentos defensivos desde sua descrição clássica em 1962 (De Molina; Hunsperger, 1962).

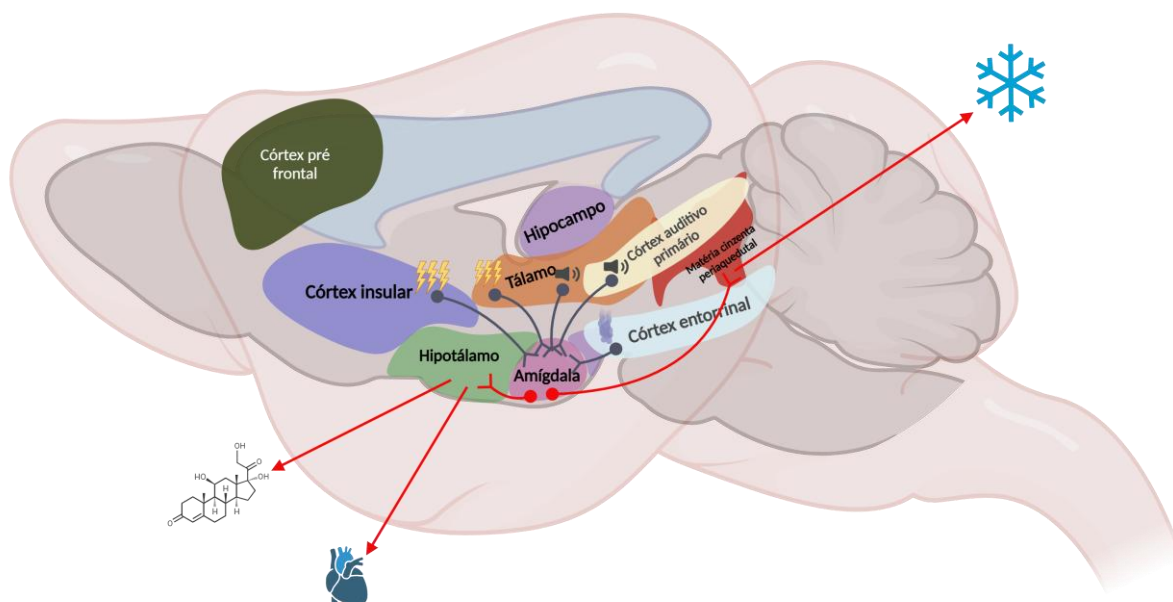


Figure 2 - **Representação esquemática das principais estruturas envolvidas no processamento do condicionamento aversivo.** A amígdala central integra informações sensoriais (auditivas, visuais e contextuais) de regiões como tálamo, hipocampo, córtex entorrinal e córtex auditivo, além de sinais fisiológicos do hipotálamo e da ínsula. Sua ativação desencadeia respostas defensivas comportamentais (como o congelamento) e autonômicas, além de favorecer a consolidação da memória aversiva via conexões com o hipocampo e o córtex pré-frontal. O estímulo aversivo ativa múltiplas vias neurais e periféricas, moduladas por fatores hormonais e estados emocionais prévios. Nesse circuito, a matéria cinzenta periaquedutal é essencial para a expressão final das respostas defensivas, coordenando ajustes autonômicos e comportamentos de sobrevivência. (Johansen et al., 2011; Kim; Jung, 2006; LeDoux et al., 1990). Feito em <https://BioRender.com>.

A MCP é uma estrutura do mesencéfalo altamente conservada em todos os vertebrados, situada entre o colículo superior e o núcleo dorsal da rafe (Reis et al., 2023; Stempel, 2024). Anatomicamente, a MCP se divide em quatro colunas ao redor do aqueduto cerebral, dispostas de forma rostrocaudal: dorsomedial (dm), dorsolateral (dl), lateral (l) e ventrolateral (vl) (Bandler et al., 2000) (Figura 3). Esta estrutura desempenha um papel fundamental em diversas vias descendentes que regulam comportamentos como o sexual e maternal, além de modulação da dor, alterações autonômicas, vocalização e respostas defensivas (Motta; Carobrez; Canteras, 2017).

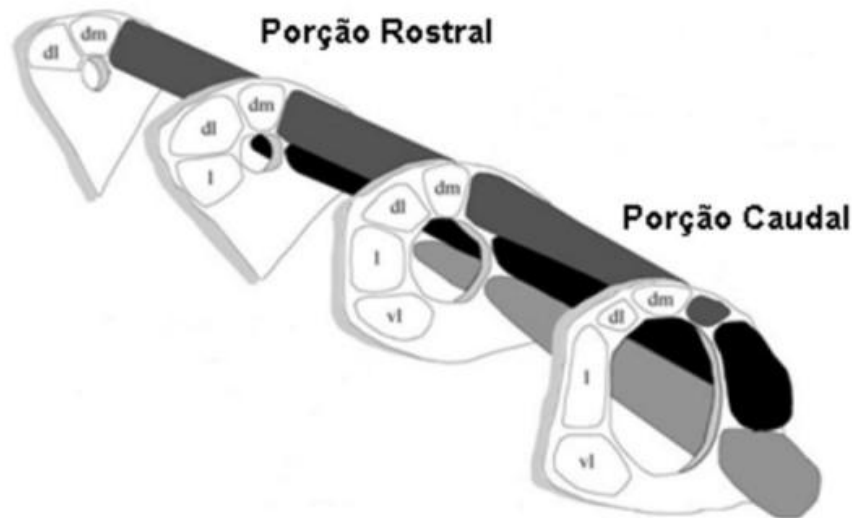


Figure 3 - **Matéria cinzenta periaquedutal**. Divisão anatômica e funcional das colunas no eixo rostro-caudal. O espaço central representa o aqueduto cerebral. Dm = dorsomedial, dl = dorsolateral, l = lateral, vl = ventrolateral. Adaptado de (BANDLER *et al.*, 2000).

O papel da MCP nas respostas defensivas tem sido amplamente estudado em roedores, mostrando que ela exerce sua função por receber projeções neuronais de estruturas ativadas por situações ameaçadoras, como o córtex pré-frontal, a área cingulada anterior, o hipotálamo anterior, o colículo superior, o núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) do hipotálamo e a amígdala central (Albin *et al.*, 1990; Back; Carobrez, 2018; Bittencourt *et al.*, 2004; Giachero *et al.*, 2019; Gross; Canteras, 2012; Lowery-Gionta *et al.*, 2018). Além de suas conexões aferentes, a MCP também projeta para estruturas do prosencéfalo como o hipotálamo anterior, tálamo e amígdala central, que participam do processamento do condicionamento aversivo (Kinchski *et al.*, 2012; Motta; Carobrez; Canteras, 2017; Pavesi; Canteras; Carobrez, 2011). Em humanos, a MCP está conectada a regiões como tálamo, hipotálamo, amígdala e córtex pré-frontal, sendo funcionalmente ativada com a amígdala e outras áreas durante situações ameaçadoras, ressaltando seu envolvimento nos mecanismos de defesa (Hadjipavlou *et al.*, 2006; Mobbs *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010) (Figura 4).

Interface para emoções negativas

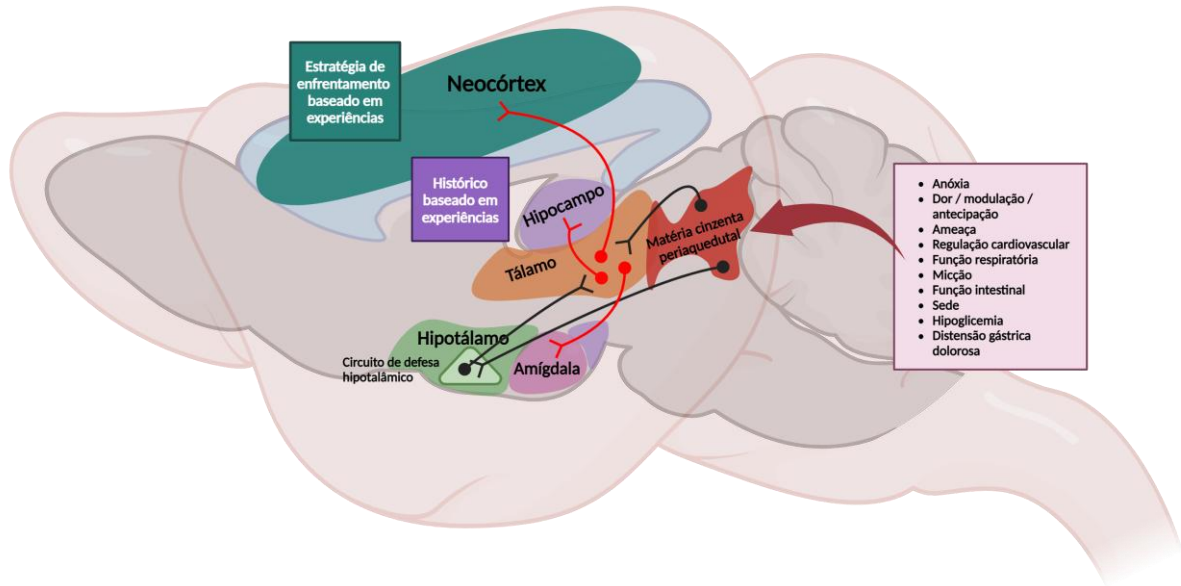


Figure 4 - **Representação esquemática do papel da Matéria Cinzenta Periaquedutal (MCP) no processamento de estímulos aversivos e emoções negativas.** A MCP integra informações sensoriais, contextuais e emocionais oriundas de múltiplas regiões encefálicas, como o neocórtex, hipocampo, tálamo, amígdala e hipotálamo. A partir dessa integração, a MCP coordena respostas comportamentais e autonômicas diante de ameaças ou desconfortos fisiológicos. Além de sua atuação em estratégias defensivas, a MCP está envolvida na mediação de funções essenciais como regulação cardiovascular, respiração, micção, sede, e na modulação da dor e da antecipação de estímulos aversivos. A via representada na figura evidencia o papel da memória e da experiência prévia na modulação dessas respostas (Barrett, 2016; Linnman et al., 2012; Motta; Carobrez; Canteras, 2017). Feito em <https://BioRender.com>.

A ativação da MCP durante situações de ameaça não regula apenas a resposta defensiva imediata, mas também modula processos de aprendizagem e memória traumática. No entanto, essa estrutura não é homogênea; suas diferentes colunas, como a dorsolateral (MCPdl), lateral e ventrolateral, estão associadas a distintos padrões comportamentais (BANDLER; KEAY, 1996; VIANA; TOMAZ; BRANDÃO, 1994). A MCP também desempenha um papel na modulação emocional de estados internos. Sua ativação pode influenciar circuitos límbicos e autonômicos, resultando em alterações na frequência cardíaca, pressão arterial e reatividade ao estresse (HEMMERLE et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2021). Esses efeitos são parcialmente

mediados por suas conexões com o hipotálamo e o tronco encefálico, que integram sinais relacionados à homeostase e à percepção de risco no ambiente (BASSO; PACKARD, 2022).

Do ponto de vista comportamental, a MCP, especialmente a MCPdl, influencia processos do condicionamento aversivo, como aquisição e extinção, possivelmente por meio de sua conectividade funcional com estruturas corticais e subcorticais (Barrett; Gonzalez-Lima, 2018; Netzer et al., 2011). Estudos indicam que manipulações neurofarmacológicas da MCPdl podem facilitar ou inibir a extinção da memória traumática, reforçando sua participação nesse mecanismo (Lawrenson et al., 2022; Nunes-de-Souza et al., 2010).

Investigações eletrofisiológicas usando o condicionamento aversivo mostram que os padrões de atividade neuronal na MCP estão diretamente associados à expressão das respostas defensivas (Kinkead, 2014; Watson et al., 2016). Essa atividade, principalmente da MCPdl, impacta tanto respostas inatas quanto aprendidas, evidenciando essa estrutura como um ponto de convergência para diferentes tipos de memórias emocionais negativas (Anstey et al., 2022; Kim et al., 2013). A integração de estímulos sensoriais e fatores contextuais processados pela MCP ressalta sua importância no condicionamento aversivo, conectando a relevância emocional de um evento a respostas defensivas apropriadas (Butler et al., 2011; De Lima et al., 2022).

Portanto, a MCP, especialmente sua coluna dorsolateral, possui grande importância para os circuitos neurais envolvidos no condicionamento aversivo, conectando múltiplas regiões encefálicas para orquestrar respostas defensivas, regular estados emocionais e influenciar a aprendizagem aversiva. Entre os mecanismos neuroquímicos que sustentam essas funções, destaca-se a neurotransmissão glutamatérgica, essencial para a plasticidade sináptica e a modulação das respostas comportamentais. O glutamato desempenha um papel central na comunicação entre a MCP e outras estruturas envolvidas no condicionamento aversivo, regulando a transmissão de sinais excitatórios e a formação de memórias traumáticas (Back; Carobrez, 2018; Kincheski et al., 2012).

1.4 NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NA MCP E SEU PAPEL NO CONDICIONAMENTO AVERSIVO

A neurotransmissão glutamatérgica é o principal mecanismo excitatório do sistema nervoso central. Esse processo envolve a liberação de glutamato, um aminoácido que atua sobre diferentes receptores, incluindo os ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA) e α -amino-3-

hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), além dos receptores metabotrópicos de glutamato (mGLU). A complexidade da sinalização glutamatérgica se evidencia por sua participação em diversos processos fisiológicos, como plasticidade sináptica, aprendizagem, memória e regulação emocional (Li; Yang; Lin, 2019; Mutluay; Karataş, 2022). A liberação de glutamato ocorre predominantemente nos terminais pré-sinápticos, gerando respostas pós-sinápticas que podem excitar ou modular a atividade neuronal, demonstrando a interação dinâmica entre neurotransmissão excitatória e inibitória (Croarkin et al., 2016; Kontić et al., 2023; Mutluay; Karataş, 2022).

A neurotransmissão glutamatérgica é influenciada por diversos fatores, incluindo a densidade de receptores, vias de sinalização intracelular e a atividade de células gliais que desempenham um papel fundamental na homeostase do glutamato e na comunicação neuronal (Baek et al., 2024; Croarkin et al., 2016; Kontić et al., 2023). A desregulação desse sistema tem sido associada a transtornos neuropsiquiátricos, como esquizofrenia, demência, depressão e ansiedade, destacando sua relevância tanto na função encefálica normal quanto em condições patológicas (Barnes; Paton, 2011; Bi et al., 2015; Boinon et al., 2021; Li; Yang; Lin, 2019; Pantelis; Barnes; Nelson, 1992).

O glutamato também é importante para o funcionamento da MCP. Foi visto que a ativação optogenética de projeções glutamatérgicas vindas do hipotálamo lateral e ventromedial, PMd, e colículo superior para a MCPdl e vl induz fuga (Evans et al., 2018; Li et al., 2018) e congelamento (Wang; Chen; Lin, 2015) em roedores. Agonistas do receptor NMDA na MCPdl provocam comportamentos defensivos (Back; Carobrez, 2018), enquanto antagonistas, como o DL-2-Amino-5-fosfonoaléico (AP5), reduzem essas respostas (Back; Carobrez, 2018; Souza; Carobrez, 2016). Esses dados reforçam a importância da MCPdl para expressão de comportamentos defensivos, mediada principalmente por receptores NMDA.

Adicionalmente, a estimulação química da MCPdl com N-metil-D-aspartato (NMDA; agonista de receptores NMDA) foi validada como um EI no condicionamento aversivo olfatório (Back; Carobrez, 2018; Kincheski et al., 2012; Souza; Carobrez, 2016). Portanto, a MCPdl possui um papel importante para a instrução de valência negativa necessária para modular o condicionamento aversivo sendo essa modulação orquestrada pela neurotransmissão glutamatérgica (Back; Carobrez, 2018; Giachero et al., 2019).

Observando os estudos citados até o momento, nota-se uma diferença substancial no uso de animais machos e fêmeas. Essa observação reflete o que é visto na literatura em estudos sobre neurociência, farmacologia e comportamento, com a proporção alcançando

aproximadamente cinco trabalhos em machos para um em fêmeas (Bao et al., 2024; Beery; Zucker, 2011; Mamlouk et al., 2020; Rechlin et al., 2022; Shansky; Woolley, 2016). Portanto, os critérios para a avaliação do condicionamento aversivo e os estudos por trás de sua neurobiologia e interferentes possuem vieses relacionados ao sexo por beneficiar e enfatizar as respostas de sujeitos machos como padrão. Esse cenário acaba por negligenciar possíveis diferenças sexuais na neurobiologia do processamento emocional negativo e na fisiopatologia de transtornos relacionados (transtornos de medo e ansiedade), bem como nas respostas frente aos tratamentos farmacológicos.

1.5 DIFERENÇAS SEXUAIS E RESPOSTA DEFENSIVA DE RATAS

Na biologia, as diferenças sexuais, ou seja, as diferenças fenotípicas entre indivíduos do sexo masculino e feminino da mesma espécie, se manifesta em múltiplos níveis, incluindo comportamento, fisiologia, morfologia e genética (Archer, 1975). Essas diferenças são moldadas por processos evolutivos, como a seleção sexual e os cuidados parentais (Janicke et al., 2016), além de serem influenciadas por fatores hormonais, genéticos e ambientais (McCarthy; Arnold, 2011).

Dadas essas semelhanças biológicas entre humanos e ratos, incluindo o compartilhamento de circuitos neurais fundamentais para o processamento emocional (Ressler, 2020), os roedores representam um modelo valioso para investigar os mecanismos subjacentes às diferenças sexuais no comportamento defensivo (Shansky; Woolley, 2016). Além disso, a possibilidade de manipulação experimental controlada em ratos permite explorar hipóteses neurobiológicas com maior precisão (Kokras; Dalla, 2014), justificando sua escolha para o presente estudo.

Em relação ao comportamento, ratos machos e fêmeas exibem padrões distintos de resposta defensiva, desempenho cognitivo e comportamento social (Drago et al., 1980; Gruene et al., 2015; Keiser et al., 2017; Mitchell et al., 2022). Ratas geralmente apresentam extinção mais rápida e robusta do que ratos no condicionamento aversivo (Milad et al., 2009; Zeidan et al., 2011). Além disso, a resposta ao condicionamento aversivo contextual tende a ser menos intensa em fêmeas, com menor discriminação de estímulos e níveis reduzidos de congelamento (Colon et al., 2018; Foilb et al., 2018; Trask et al., 2020).

Contudo, novas perspectivas surgiram ao se observar que o congelamento não é o único comportamento defensivo relevante em fêmeas. Gruene e colaboradores (2015)

destacaram que fêmeas frequentemente exibem corrida (*darting*; ratas darters) durante a aquisição do condicionamento aversivo, em vez de congelamento. Esses achados foram reforçados por estudos recentes que validaram a corrida como um comportamento defensivo condicionado relevante (Mitchell et al., 2022). Portanto, a avaliação das diferenças sexuais no condicionamento aversivo deve ir além da medida exclusiva de congelamento, integrando estratégias ativas e passivas de enfrentamento.

Em paralelo ao comportamento, neurotransmissões envolvidas na resposta defensiva também exibem diferenças sexuais. Na MCP, diferenças sexuais na ativação neuronal já foram relatadas (Yu et al., 2021), embora associadas principalmente à via de processamento da nocicepção. No entanto, ainda são escassos os estudos que investigam diretamente as diferenças sexuais no papel da MCP para o processamento de estímulos aversivos e modulação de respostas defensivas.

Diante desse cenário, é fundamental considerar o sexo como uma variável biológica em estudos neurocomportamentais. Tradicionalmente, os modelos animais para o estudo das respostas defensivas, como o condicionamento aversivo, focaram quase que exclusivamente em animais machos (Bale; Epperson, 2016; Beery; Zucker, 2011; Mamlouk et al., 2020), negligenciando as estratégias comportamentais e cognitivas apresentadas por fêmeas. Assim, para uma compreensão mais completa e translacional, torna-se necessário reavaliar os paradigmas experimentais, incluindo a análise de comportamentos alternativos ao congelamento e a consideração de estratégias de enfrentamento sexo-específicas.

1.6 HIPÓTESE

A neurotransmissão glutamatérgica na MCPdl modula a expressão de respostas defensivas e a formação da memória de eventos aversivos, exibindo diferenças sexuais nas estratégias de enfrentamento.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo Geral

Investigar as diferenças sexuais na modulação glutamatérgica na MCPdl sobre a expressão de respostas defensivas e formação de memórias traumáticas de ratos e ratas submetidas a um protocolo de condicionamento aversivo olfatório e possíveis intervenções desse sistema.

1.7.2 Objetivos Específicos

- Traçar o perfil comportamental de ratos e ratas durante as sessões do condicionamento aversivo olfatório após receberem uma microinjeção de NMDA na MCPdl;
- Verificar diferenças sexuais na estratégia de enfrentamento durante o condicionamento aversivo olfatório após receberem uma microinjeção de NMDA na MCPdl;
- Avaliar o efeito de alterações nos protocolos de condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da MCPdl usando NMDA;
- Comparar as respostas defensivas em diferentes protocolos de condicionamento aversivo olfatório após receberem uma microinjeção de NMDA na MCPdl;
- Analisar o efeito do antagonista AP5 de receptores NMDA na MCPdl.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Ratos Wistar machos (n = 47; peso > 250 g) e fêmeas (n = 89; peso > 180 g) de 90 a 100 dias foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e aclimatados no biotério do Laboratório de Neurobiologia Comportamental por pelo menos uma semana antes dos experimentos. Os animais foram acondicionados em caixas plásticas forradas com maravalha, em grupos de cinco animais pré-cirurgia e três pós-cirurgia, com livre acesso à água e comida e controle de temperatura ($24 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro (12 horas, com fase clara iniciando às 7:00 horas). Os animais e disposição das caixas foram alocados de maneira aleatória durante todo o experimento. Esse trabalho foi aprovado pelo comitê de ética para uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA nº 1374200921).

2.2 ODOR

Acetato de amila (Aldrich Chemical®, EUA), odor sintético de banana. A solução de acetato de amila (amil acetato) foi diluída em propilenoglicol a 5%, mantida em congelador a -20 °C e levada à temperatura ambiente para ser usada nos experimentos, sendo aplicados 100 µL em papel filtro como o odor.

2.3 SISTEMA DE VÍDEO

Todos os experimentos foram registrados através de um sistema videocâmera, permitindo desta forma a avaliação independente dos comportamentos exibidos durante as diferentes sessões. As análises de comportamento foram feitas utilizando o programa Ethowatcher® (Crispim Junior et al., 2012) para todos os dias de protocolo.

2.4 DROGAS

Para tratamento farmacológico, as seguintes drogas foram utilizadas:

➤ N-metil-D-Aspartato (NMDA) 25 ou 50 pmol/0,2 µl intra-MCPdl (Sigma, St. Louis, EUA): agonista dos receptores NMDA de glutamato; O veículo dessa solução foi solução tampão fosfato-salina (PBS);

➤ DL-2-Amino-5-fosfonoaléico (AP5) 6 nmol/0,2 µl intra-MCPdl (Sigma, St. Louis, EUA): antagonista competitivo de receptores NMDA de glutamato; O veículo dessa solução foi solução tampão fosfato-salina (PBS).

As doses foram escolhidas a partir de trabalhos anteriores do laboratório (Back; Carobrez, 2018; Kincheski et al., 2012), e protocolos piloto.

2.5 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Todos os animais foram submetidos à cirurgia de estereotaxia para implantação de uma cânula guia que permitisse a microinjeção na MCPdl. A cirurgia se deu de 7 a 10 dias antes do primeiro dia de CAO. Para a cirurgia, 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 (2:3; 1,0 ml/kg); 30 min antes da anestesia receberam também uma dose de tramadol (10 mg/kg) pela mesma via. Foi feita a verificação das respostas reflexas nos animais com uma pinça “dente-de-rato” e após ausência das mesmas, os animais receberam anestesia local via subcutânea acima da calota craniana (Lidocaína/Norepinefrina 0,002 mg) e foram posicionados cuidadosamente no aparelho estereotáxico (Stoelting Co®, Wood Dale, EUA). Após assepsia da pele com álcool 70%, foi feita a incisão para exposição da calota craniana e visualização dos pontos de intersecção entre as suturas coronal e sagital (Bregma) e lambdoide e sagital (Lambda). Mais uma assepsia foi feita com iodo 3% e água oxigenada e o tecido conjuntivo da região foi removido. A implantação das cânulas guia (13,0 mm) direcionadas para a região dorsolateral da MCP seguiu as seguintes coordenadas: ântero-posterior (AP): -5,8 mm; médio-lateral (ML): +2,3 mm e dorso-ventral (DV): -4,0 mm; ângulo de 22°, de acordo com experimentos piloto feitos no laboratório e baseados no atlas estereotáxico para ratos (Goerzen et al., 2020). Além da cânula guia unilateral, foram inseridos dois parafusos de aço inoxidável para melhor aderência do acrílico, e para que fossem inseridos, uma broca odontológica foi utilizada para os furos na calota craniana. Após a inserção da cânula e dos parafusos, a superfície craniana foi recoberta por acrílico auto-polimerizante, de forma a produzir uma prótese sólida para isolamento da área. Para preservar o caminho interno da cânula, foi inserido um fio de aço inoxidável (mandril, nº

28, 0,30 mm) em cada cânula guia e o mesmo teve uma das pontas aderida ao acrílico. Logo após a cirurgia, os animais receberam por via subcutânea (2,5 mg/kg; 0,2 ml), uma solução antipirética, analgésica e anti-inflamatória de flunixinameglumina (Banamine®; Schering-Plough, Brasil) e uma solução antibiótica de benzilpenicilina e estreptomicina (Pentabiótico®, Fort Dodge, Brasil) por via intramuscular (10 mg/kg; 0,2 ml). Essa mesma solução Banamine® foi administrada por três dias após a cirurgia, uma vez por dia. Após todo o procedimento cirúrgico, os animais foram retirados do aparelho estereotáxico, alocados nas caixas e cobertos por maravalha até acordarem da anestesia. Seguiu-se o período de 7 a 10 dias para recuperação dos animais e só então foram realizados os experimentos de análise de comportamento.

2.6 MICROINJEÇÃO INTRACEREBRAL

Para a microinjeção intracerebral foi usada uma agulha injetora (14,5 x 0,30 mm) conectada a uma microseringa (Hamilton®, 5µl) por um tubo de polietileno (PE-10) preenchido com água destilada e a solução a ser injetada. A microseringa por sua vez foi acoplada a uma bomba de perfusão (modelo B12000, Insight® Ltda., Ribeirão Preto, Brasil) para melhor controle do volume (0,2 µl) e velocidade (0,4 µl/s) da injeção. Uma bolha de ar entre a água destilada e a solução no tubo de polietileno permitiu a verificação da injeção. Quanto à manipulação animal, o procedimento foi feito o mais rápido e cuidadosamente possível: com um alicate o mandril da cânula guia foi retirado, uma lima odontológica foi utilizada para desobstruir a cânula guia e logo a agulha injetora foi aplicada.

Para a microinjeção pré-exposição à caixa de condicionamento, a imobilização dos animais foi feita com auxílio de uma flanela enquanto a microinjeção acontecia. Após o volume de 0,2 µl ser injetado, foram contados 20 segundos até a retirada da agulha para que a solução fosse melhor infundida na região. Para a avaliação em tempo-real, a agulha injetora foi adaptada com uma peça de PE-10 e conectada à cânula para permitir o livre movimento dos animais sem prejudicar a fixação da agulha ou a microinjeção no local desejado. Um aparato de PVC e uma mola foram usados para apoiar o tubo de PE-10 para evitar acidentes e obstruções durante a microinjeção e aumentar o espaço de movimento dos animais.

2.7 EQUIPAMENTOS

2.7.1 Caixa de Condicionamento A (Caixa A) (tempo-real)

A caixa de condicionamento para avaliação em tempo real (Insight Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) mede 40 x 35 x 25 cm, com paredes de alumínio, com exceção da face frontal e tampa confeccionadas em acrílico transparente (Figura 6). O assoalho da caixa é composto de grades metálicas distanciadas 1 cm entre si. O condicionamento foi realizado num ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$). Para o condicionamento aversivo olfatório, uma placa de petri contendo papel filtro com 100 μL de acetato de amila foi posicionada abaixo das grades.

Caixa A

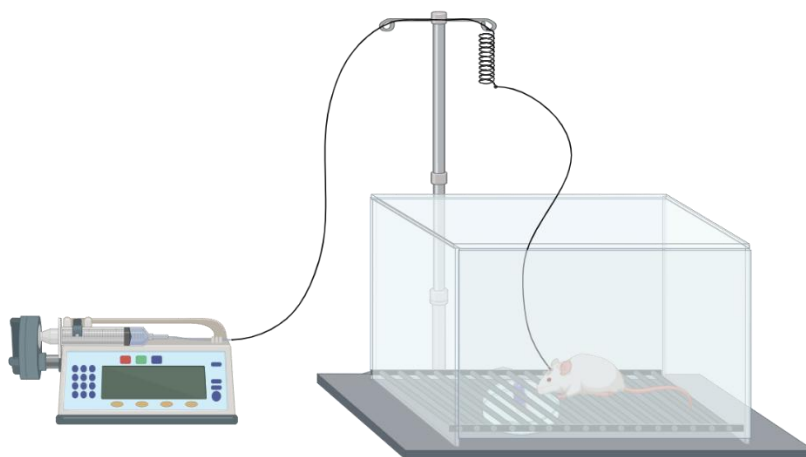


Figure 5 - **Representação da Caixa A utilizada no protocolo de condicionamento aversivo olfatório.** Caixa A – Tempo real: exposição direta ao odor (acetato de amila) com monitoramento comportamental. Feito em <https://BioRender.com>.

2.7.2 Caixa de Condicionamento B (Caixa B)

O condicionamento por choque nas patas foi realizado em uma caixa (Insight Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) medindo 50 x 26 x 35 cm, com paredes de alumínio, com exceção da face frontal e tampa confeccionadas em acrílico transparente (Figura 7). O assoalho da caixa é composto de grades metálicas distanciadas 1 cm entre si. O condicionamento foi realizado num ambiente com som atenuado, temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e intensidade de luz de 80 lux. Para o condicionamento aversivo olfatório, uma placa de petri contendo papel filtro com 100 μL

de acetato de amila foi posicionada abaixo das grades como estímulo olfatório a ser condicionado.

Caixa B

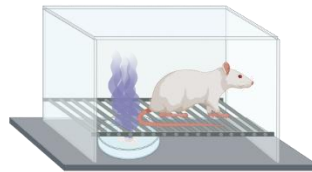


Figure 6 - **Representação da Caixa B usada no protocolo de condicionamento aversivo olfatório.** Caixa B: pareamento do odor ao choque nas patas para indução do condicionamento. Feito em <https://BioRender.com>.

2.7.3 Caixa de Teste (Caixa Odor)

Para reduzir influências contextuais, a avaliação do medo condicionado foi realizada em uma caixa distinta da caixa de condicionamento, instalada em uma sala, com luminosidade atenuada (4 luxes), diferente daquela utilizada para o condicionamento (80 luxes) (Figura 8). Este aparato, inteiramente construído em acrílico, é dividido em dois compartimentos, um aberto (40 x 26 x 40 cm) e um fechado (20 x 26 x 40 cm) com cobertura. Para permitir a visualização dos animais no aparato, as paredes frontais, tanto do compartimento aberto quanto do fechado, foram construídas em acrílico transparente. Uma pequena abertura (6 x 6 cm), situada na parede divisória, permite o livre acesso do animal a ambos os compartimentos. Na parede lateral do compartimento aberto, um aparato de plástico contendo papel filtro com 100

μL de acetato de amila é utilizado como fonte do EC olfatório. No piso da caixa, uma marcação localizada a 7 cm da parede, serve como referência para delimitar a área proximal ao odor.

Caixa Odor

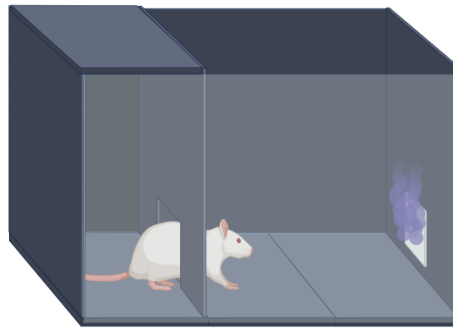


Figure 7 - **Representação da Caixa Odor usada no protocolo de condicionamento aversivo olfatório.** Caixa Odor – Teste: avaliação da memória condicionada ao odor em ambiente neutro com três compartimentos: próximo ao odor, aberto e fechado. Feito em <https://BioRender.com>.

2.8 PROTOCOLOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

2.8.1 Experimento 1: Observação de diferenças sexuais durante o condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da MCPdl

O Experimento 1 foi conduzido utilizando o Protocolo 1 de condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da MCPdl. Esse protocolo utilizou a Caixa A para a sessão de condicionamento, dividida em três etapas sequenciais: (1) familiarização de 1 minuto (F1), com os animais explorando livremente a caixa; (2) período de injeção (IN), com duração de 30 segundos, durante o qual o animal já estava exposto ao estímulo condicionado (EC) e com a agulha injetora acoplada; e (3) período pós-injeção (PIN), com duração de 4,5 minutos a partir do término da administração. Durante essa sessão, ratos machos e fêmeas receberam microinjeções na MCPdl de PBS ou agonista NMDA nas doses de 25 ou 50 pmol; a amostra por grupos está detalhada no Apêndice A.

Após 24 horas, os animais foram submetidos à Caixa Odor por 5 minutos sem o EC, para avaliação de generalização (F2). No dia seguinte, foram reexpostos ao EC na mesma caixa,

para o teste de evocação do condicionamento (TE) (Figura 9). Todos os aparatos foram higienizados com etanol 10% e secos com papel toalha entre os animais. As sessões de comportamento foram filmadas para análise posterior, e após a sessão de teste, os animais foram eutanasiados para coleta dos encéfalos e verificação da posição das cânulas.

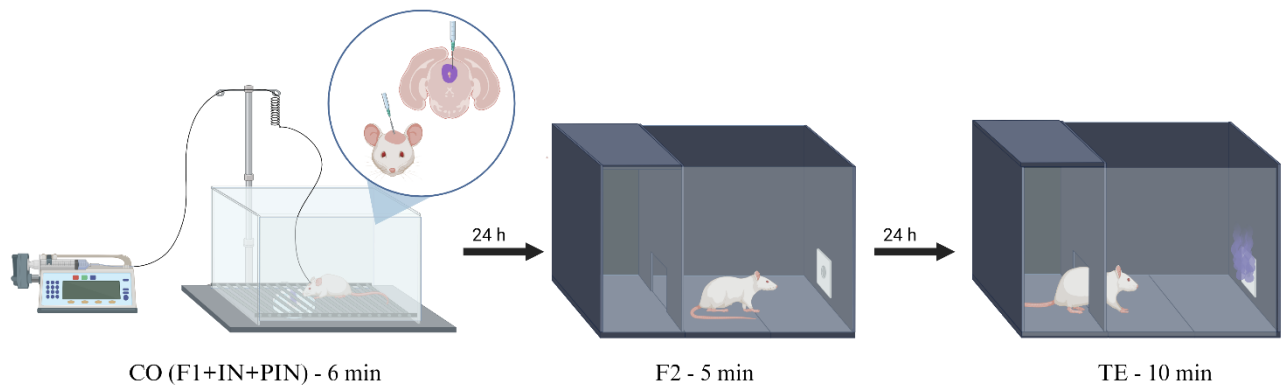


Figure 8 – Esquema representativo do Protocolo 1 de condicionamento aversivo olfatório com estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral. O estímulo condicionado (odor amil acetato 5%) foi apresentado ao animal durante as sessões de condicionamento (CO) nas etapas de microinjeção (IN) e pós-microinjeção (PIN) e sessão de teste (TE). F1: familiarização 1; F2: familiarização 2. Feito em <https://BioRender.com>.

2.8.2 Experimento 2: Comparação dos protocolos de condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da MCPdl

O Experimento 2 foi conduzido com ratos machos e fêmeas submetidos aos Protocolos 1 ou 2 de condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da MCPdl. As sessões comportamentais foram filmadas para análise posterior, e após o teste de evocação (TE), os animais foram eutanasiados e seus encéfalos coletados para verificação da posição da cânula.

O Protocolo 2 foi adaptado de estudos anteriores do Laboratório de Neurobiologia Comportamental (Back; Carobrez, 2018; Kincheski et al., 2012; Kroon; Carobrez, 2009; Souza; Carobrez, 2016). O primeiro dia consiste em uma familiarização (F1) na qual os animais exploraram livremente a Caixa B por 3 minutos. No segundo dia se deu a sessão de condicionamento. Os animais foram novamente colocados na Caixa B por 5 minutos e receberam uma microinjeção intra-MCPdl imediatamente antes da exposição ao estímulo

condicionado (EC; acetato de amila), enquanto estavam fisicamente contidos. As microinjeções intra-MCPdl foram de PBS ou do agonista NMDA (25 ou 50 pmol), conforme o grupo experimental descrito no Apêndice A. No dia seguinte, foi feita a familiarização na Caixa Odor (F2), com os animais expostos por 5 minutos, sem o EC, para avaliação de generalização. No quarto dia, foram reexpostos ao EC na mesma caixa para a sessão de teste do condicionamento aversivo (TE) por 10 minutos (Figura 10). Todos os aparatos foram higienizados com etanol 10% e secos com papel toalha entre os animais. As sessões de comportamento foram filmadas para análise posterior, e após a sessão de teste, os animais foram eutanasiados para coleta dos encéfalos e verificação da posição das cânulas.

A principal diferença entre os dois protocolos está no contexto de microinjeção e exposição ao EC: no Protocolo 1, a administração foi realizada com o animal em livre movimentação e já em contato com o EC; no Protocolo 2, a microinjeção foi feita com o animal fisicamente restrito, imediatamente antes da exposição ao EC.

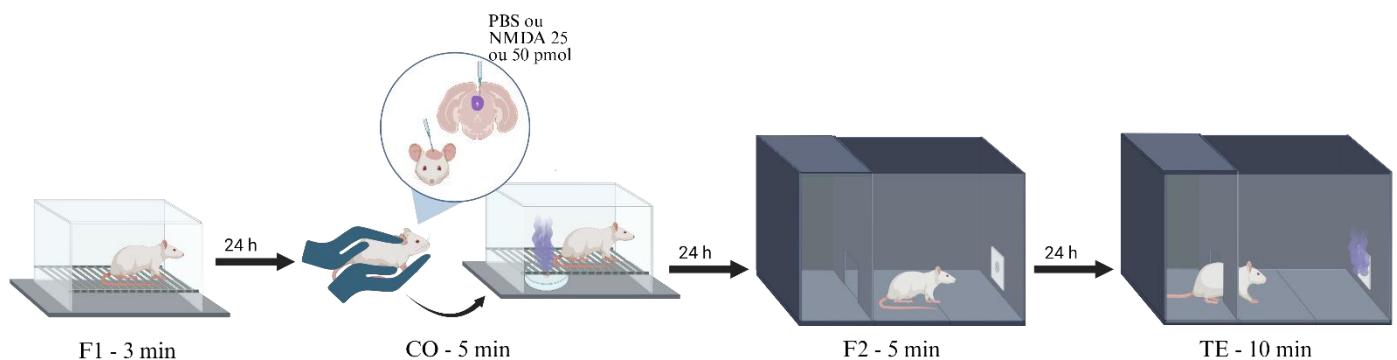


Figure 9 - Esquema representativo do Protocolo 2 de condicionamento aversivo olfatório com estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral. O estímulo condicionado (odor amil acetato 5%) foi apresentado ao animal durante as sessões de condicionamento (CO) e teste (TE). F1: familiarização 1; F2: familiarização 2. Feito em <https://BioRender.com>.

2.8.3 Experimento 3: Avaliação do efeito do antagonista AP5 de receptores NMDA na MCPdl no condicionamento aversivo olfatório por choque nas patas

O Experimento 3 avaliou o condicionamento aversivo olfatório induzido por choque nas patas, utilizando o Protocolo 3: O primeiro dia consiste em uma familiarização (F1) na qual

os animais exploraram livremente a Caixa B por 3 minutos. No segundo dia se deu a sessão de condicionamento. Nessa sessão, ratos machos e fêmeas receberam microinjeções na MCPdl de PBS ou do antagonista competitivo de receptores NMDA, AP5 (6 nmol), imediatamente antes da exposição ao estímulo condicionado (EC; acetato de amila) na Caixa B. O número de animais por grupo está descrito no Apêndice A. Após 1 minuto de habituação, foram submetidos ou não ao estímulo incondicionado (EI), composto por cinco ciclos de choque nas patas (0,8 mA, 2 s de duração, com intervalos de 40 s entre os ciclos).

No terceiro dia (F2), os animais foram colocados na Caixa Odor por 5 minutos, sem o EC, para familiarização e avaliação de generalização. No quarto dia, foram reexpostos ao EC para a sessão de teste do condicionamento aversivo (TE) (Figura 11). As sessões comportamentais foram registradas em vídeo para análise posterior, e todos os aparatos foram higienizados com solução de etanol a 10% e secos com papel toalha entre os animais. Após o TE, os animais foram eutanasiados e seus encéfalos coletados para verificação da posição da cânula.

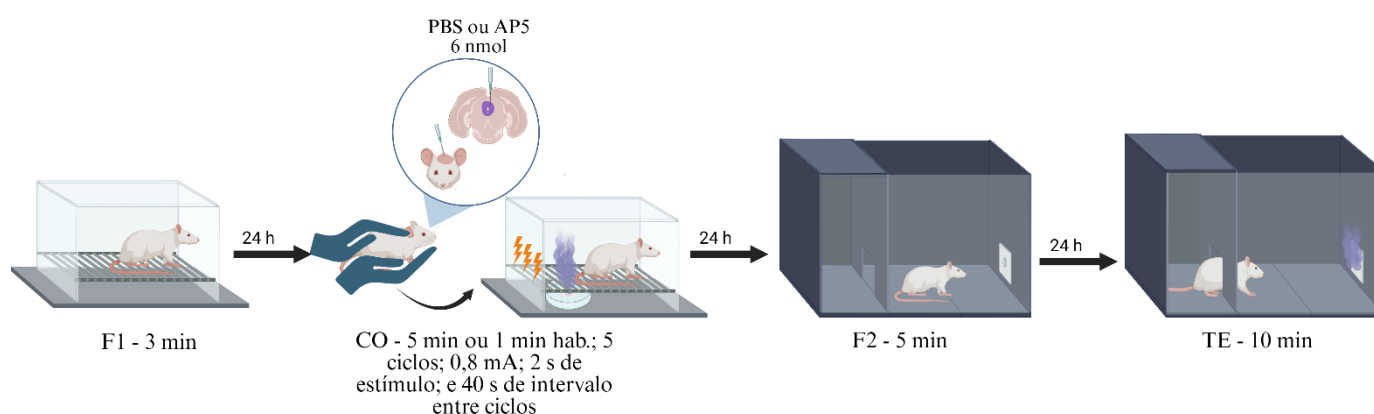


Figure 10 - **Esquema representativo do Protocolo 3 de condicionamento aversivo olfatório por choque nas patas.** O estímulo condicionado (odor amil acetato 5%) foi apresentado ao animal durante as sessões de condicionamento (CO) e teste (TE). F1: familiarização 1; F2: familiarização 2; hab: habituação; mA: miliampere. Feito em <https://BioRender.com>.

2.9 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

A avaliação comportamental seguiu um catálogo de comportamentos baseados na literatura e trabalhos anteriores do laboratório (Augustsson, 2004; Back; Carobrez, 2018; Bandler et al., 2000; Bittencourt et al., 2004; Blanchard et al., 1993; Blanchard; Blanchard,

1989; De Andrade Rufino et al., 2019; De Molina; Hunsperger, 1962; Gruene et al., 2015; Kincheski et al., 2012; Kroon; Carobrez, 2009; Mitchell et al., 2022; Pavesi; Canteras; Carobrez, 2011; Souza; Carobrez, 2016; Zanoveli; Nogueira; Zangrossi, 2003). Os comportamentos foram classificados de acordo com sua natureza e validade biológica em três grupos comportamentais: comportamentos não defensivos (NDEF: ambulação, autolimpeza, imobilidade, contato e tempo próximo ao odor), comportamentos de avaliação de risco (RISCO: levantar, agachar-cheirar, postura de estiramento, rastejar e head-out) e comportamentos defensivos (DEF: congelamento, sobressalto, fuga, corrida e tempo escondido). O Quadro 1 lista os comportamentos, suas definições, classificação e sessão do CAO que foram avaliados. Todos os comportamentos foram expressos em porcentagem de tempo para standardização dos dados.

Quadro 1. Catálogo de comportamentos, suas definições, classificação e caixas que foram avaliados no condicionamento aversivo olfatório.

Comportamento	Descrição	CX A e B	CX Odor	Ndef	Risco	Def
Ambulação (Sniffing)	Comportamento de exploração do animal. Animal caminha pela caixa, com movimentos das vibrissas e da cabeça, cheirando o ambiente.	X	X	X		
Imobilidade	Animal imóvel, sem movimentos além da respiração e em decúbito ventral, esteja ele acordado ou não. Diferente do congelamento, o animal não apresenta postura de atenção, ataque ou alarme.	X	X	X		
Auto-Limpeza (Grooming)	Comportamento em que com as patas dianteiras e a boca, os ratos limpam o pelo da cabeça e do restante do corpo.	X	X	X		
Contato	Quando o animal está cheirando e/ou interagindo com a fonte de odor. Nesse caso, o animal pode estar com as patas no aparato ou até mordendo-o.		X	X		
Levantar (Rearing)	Postura do animal sustentada pelas duas patas traseiras e sem que as patas dianteiras toquem o chão, mas podendo se apoiar nas paredes. Comportamento de avaliação de risco, caracterizado pelo ato de levantar-se, acompanhado com movimentos de vibrissas.	X	X		X	
Agachar-Cheirar (Crouch-sniffing)	Considerado um comportamento de avaliação de risco. O animal assume postura imóvel com dorso arqueado acompanhado de movimentos das vibrissas e cabeça.	X	X		X	
Postura de estiramento (Stretch attend)	Animal apresentando alongamento da cabeça e ombros para frente.	X	X		X	
Rastejar (Stretch approach):	Animal se movendo em postura de estiramento.	X	X		X	
Head-out	Comportamento de avaliação de risco em que o animal estando no compartimento fechado, coloca a cabeça no ambiente aberto e investiga o ambiente. O tempo de head out começa a ser contabilizado quando o focinho passa da linha entre os espaços aberto e fechado e só deixa de ser contado quando as duas patas traseiras estiverem no espaço aberto ou quando o focinho retorna ao espaço fechado.		X		X	
Congelamento (Freezing)	O animal apresenta postura imóvel apenas com movimentos de respiração, com pelos eriçados, cauda contraída e orelhas para trás. É considerada uma resposta defensiva clássica em roedores.	X	X			X
Salto (Jumping)	Tentativa do animal de escapar da caixa por cima da caixa.	X				X
Fuga (Escape)	Esquiva da fonte de odor ou tentativa de fuga da caixa de condicionamento.	X	X			X
Corrida (Darting)	Corrida pelas paredes da caixa.	X				X
Tempo Escondido	Tempo em que o animal permaneceu dentro do compartimento menor (fechado), contado a partir do momento em que as quatro patas entravam no compartimento e encerrado somente quando todas as quatro patas saíam do compartimento. Medida relacionada à esquiva, mantendo a maior distância possível.		X			X
Tempo de Espaço Aberto	Tempo que o animal ficou no espaço intermediário entre o compartimento fechado e a zona de aproximação.		X			X
Próximo à fonte de Odor	Tempo de permanência na zona delimitada entre o odor e uma marcação a sete centímetros. O cronômetro foi acionado a partir do momento em que o animal cruzava a linha com o focinho, e parado somente quando todas as patas estavam fora da área delimitada.		X			X

Legenda: CX A e B: caixas de condicionamento; CX Odor: caixa de teste; NDef: comportamentos não defensivos; Risco: comportamentos de avaliação de risco; Def: comportamentos defensivos.

2.10 PERFUSÃO E HISTOLOGIA

Após os testes comportamentais, os ratos foram eutanasiados por isoflurano ($0,8 \text{ L/m}^3$) até perda total de movimentos e reflexos. Após a verificação, os animais foram microinjetados com $0,2 \mu\text{l}$ de corante Azul de Evans para marcação do sítio de injeção. Em seguida, aconteceu a perfusão intracardíaca com uma solução salina ($0,9\% \text{ NaCl}$) até que não houvesse mais sangue no sistema seguida por uma solução paraformaldeído (4%) até fixação dos tecidos, quando os músculos enrijeciam. Os encéfalos perfundidos foram removidos e colocados em frascos contendo solução formaldeído 10% , onde ficaram imersos por pelo menos 24 horas e mantidos na geladeira. Para os cortes histológicos, os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose 30% pelo menos 72 horas antes de serem cortados. Cortes histológicos de $50 \mu\text{m}$ de espessura foram obtidos com o auxílio de um criostato (LAMEB) e dispostos em lâminas de vidro previamente gelatinizadas. Os animais cujas injeções não atingiram a MCPdl foram excluídos da análise (Figura 12).

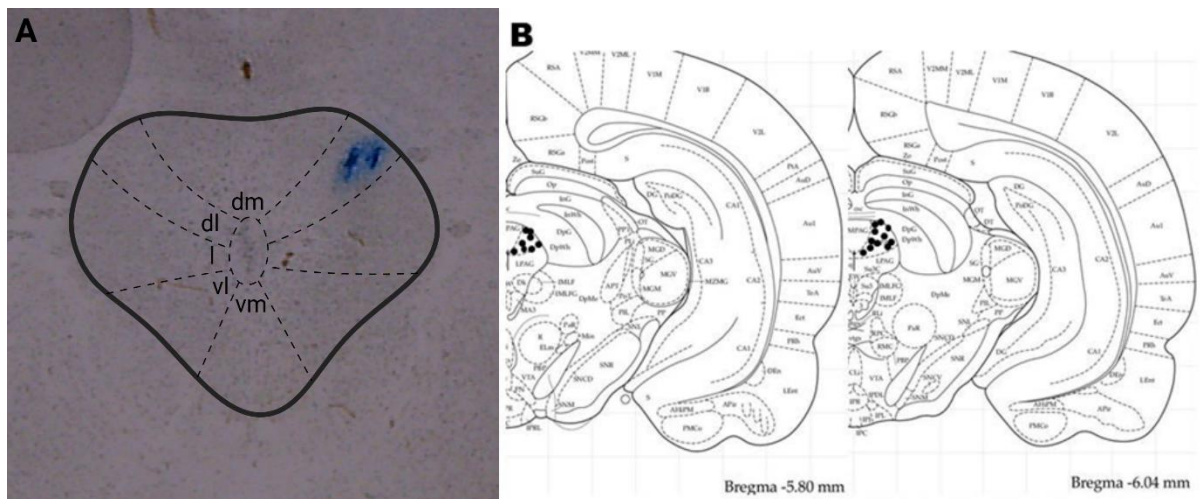


Figure 11 - Fotomicrografia e diagramas representativos dos pontos de microinjeção na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) de encéfalos de ratos. Cortes coronais no eixo anteroposterior nas coordenadas $-5,8$ a $-6,04$: distância em mm a partir da bregma. Em (A) fotomicrografia representando um caso de injeção na MCPdl por própria autora. Em (B), diagramas adaptados de Paxinos e Watson (1998); os pontos pretos indicam a posição da agulha na microinjeção na MCPdl. Os pontos estão em menor quantidade que animais utilizados por conta da sobreposição das injeções.

2.11 PONTOS FINAIS HUMANITÁRIOS

Em caso de dor, desconforto ou estresse do animal, causados principalmente por infecção pós-cirúrgica, alterações fisiológicas ou sinais físicos como perda de peso ou de reflexos, foi feita a interrupção imediata do protocolo e a eutanásia do animal foi realizada.

2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as medidas comportamentais foram convertidas em porcentagem em relação ao tempo total da sessão. A normalidade de distribuição dos dados foi testada pelo teste Shapiro-Wilk, dados que não seguiram distribuição normal foram tratados por testes estatísticos não paramétricos.

Para comparações entre múltiplos grupos experimentais, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de comparações múltiplas com base em médias ranqueadas. Para comparações entre dois grupos independentes, aplicou-se o teste U de Mann-Whitney. O nível de significância adotado para todas as análises foi de $p \leq 0,05$.

As análises foram conduzidas no software Statistica® (versão 10.0; StatSoft®, Tulsa, EUA), e os gráficos foram elaborados no Prism® (versão 7.0; GraphPad®, San Diego, EUA). Os resultados são apresentados como mediana [intervalo de confiança de 95% (IC95)].

A notação estatística adotada foi a seguinte:

- Kruskal-Wallis: $H(k) = \text{valor}, p = \dots$
 - H: estatística do teste
 - k : número de grupos comparados
 - p : valor de significância associado
 - Exemplo: $H(3) = 8,5; p < 0,01$
- Mann-Whitney U: $U = \text{valor}, z = \dots, p = \dots$
 - U: estatística de teste
 - z : escore padrão (quando aplicável)
 - p : valor de significância associado
 - Exemplo: $U = 15, z = -2,5; p = 0,01$

Essas análises permitiram avaliar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto à expressão de comportamentos e preferência a local. Para diminuir a variabilidade individual, também foram adotados e analisados os valores de Delta (Δ) =

diferença entre a sessão de Teste e F2. Os Deltas foram analisados para expressão de comportamentos e preferência a local.

2.13 USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

Este trabalho contou com o apoio de ferramentas de inteligência artificial: ChatGPT, utilizado exclusivamente para revisão e correção da escrita, e Scite.AI, empregado como suporte na busca inicial por referências bibliográficas. Todas as interpretações, análises e conclusões são de responsabilidade integral da autora, que também verificou a precisão e a pertinência das fontes utilizadas.

3 RESULTADOS

Todos os dados não atingiram normalidade de distribuição e foram tratados por estatística não paramétrica.

3.1 EXPERIMENTO 1: OBSERVAÇÃO DE DIFERENÇAS SEXUAIS DURANTE O CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO POR ESTIMULAÇÃO GLUTAMATÉRGICA DA MCPdl

A Figura 13 mostra os dados comportamentais de Defesa (DEF) e Avaliação de Risco (RISCO) durante as diferentes etapas da sessão de condicionamento após a administração intra-MCPdl de diferentes doses de NMDA em ratos machos e fêmeas. Ratos machos apresentaram diferenças em DEF durante ($H(2) = 11,91$; $p = 0,003$) e após ($H(2) = 14,81$; $p < 0,001$) a microinjeção. O grupo NMDA 25 pmol exibiu maior DEF do que o grupo controle (PBS) em ambas as etapas ($p = 0,002$; $p < 0,001$, respectivamente). Não houve diferença nos comportamentos de RISCO.

Nas fêmeas, comportamentos de DEF apresentaram diferenças no pós-microinjeção ($H(2) = 16,04$; $p = 0,003$) e comportamentos de RISCO durante ($H(2) = 7,36$; $p = 0,025$) e pós-microinjeção ($H(2) = 12,09$; $p = 0,002$). Fêmeas NMDA 25 ($p = 0,003$) e 50 pmol ($p = 0,006$) exibiram mais DEF no pós-microinjeção do que Fêmeas PBS. Fêmeas NMDA 50 pmol também expressaram mais comportamentos de RISCO do que Fêmeas PBS (durante: $p = 0,020$; pós-microinjeção: $p = 0,004$).

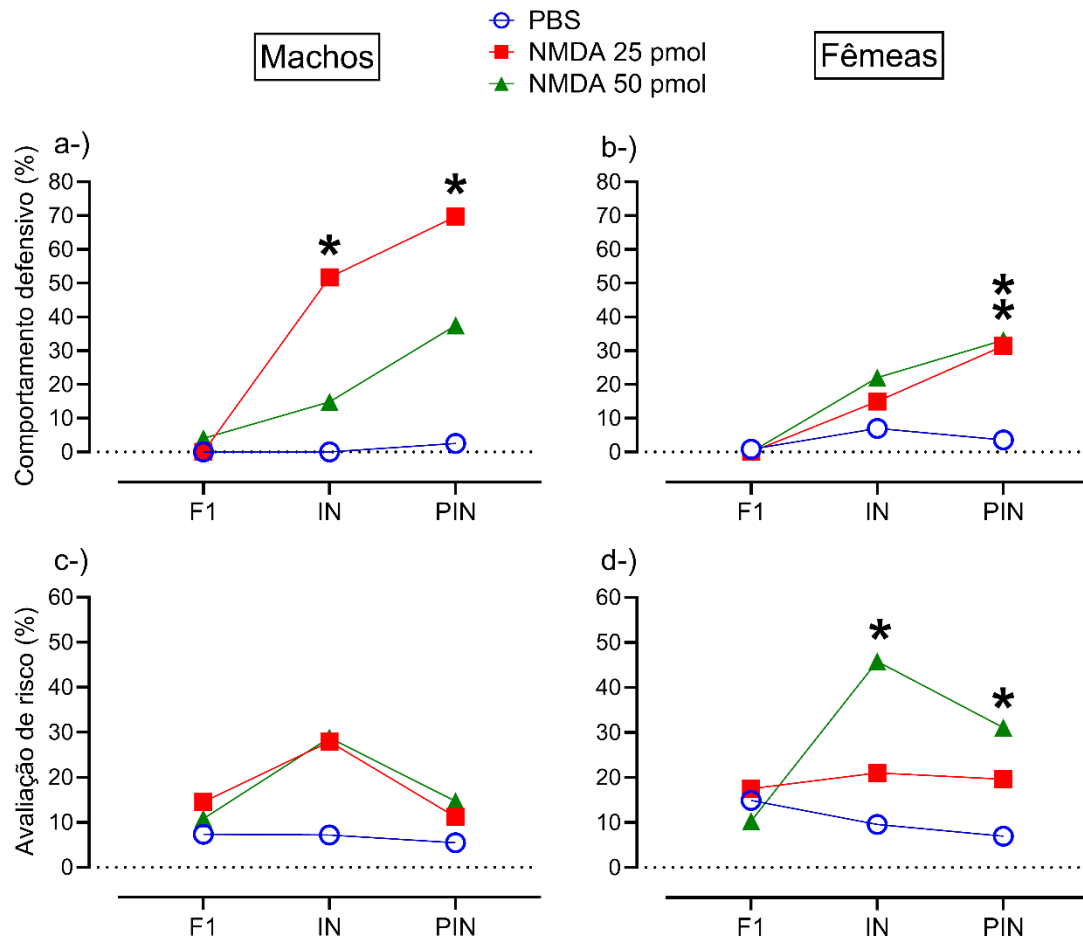


Figure 12 - Efeitos da ativação de receptores NMDA na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral sobre os comportamentos defensivos (a e b) e de avaliação de risco (c e d) de ratos machos e fêmeas nas etapas da sessão de condicionamento do condicionamento aversivo olfatório. Os grupos estão divididos em machos PBS ($n = 12$), NMDA 25 ($n = 7$) e NMDA 50 ($n = 6$) e fêmeas PBS ($n = 23$), NMDA 25 ($n = 9$) e NMDA 50 ($n = 7$). Os dados são expressos como mediana. F1: familiarização 1; IN: momento da injeção; PIN: pós injeção. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo PBS no teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de médias ranqueadas.

A Figura 14 apresenta a comparação entre machos e fêmeas para os comportamentos de DEF e RISCO após a administração intra-MCPdl de NMDA. Não houve diferenças sexuais nos comportamentos de DEF. Por outro lado, as doses de NMDA 25 pmol ($U = 12$; $Z = 2,01$;

$p = 0,044$) e 50 pmol ($U = 6$; $Z = 2,07$; $p = 0,038$) induziram maior expressão de RISCO em fêmeas do que em machos.

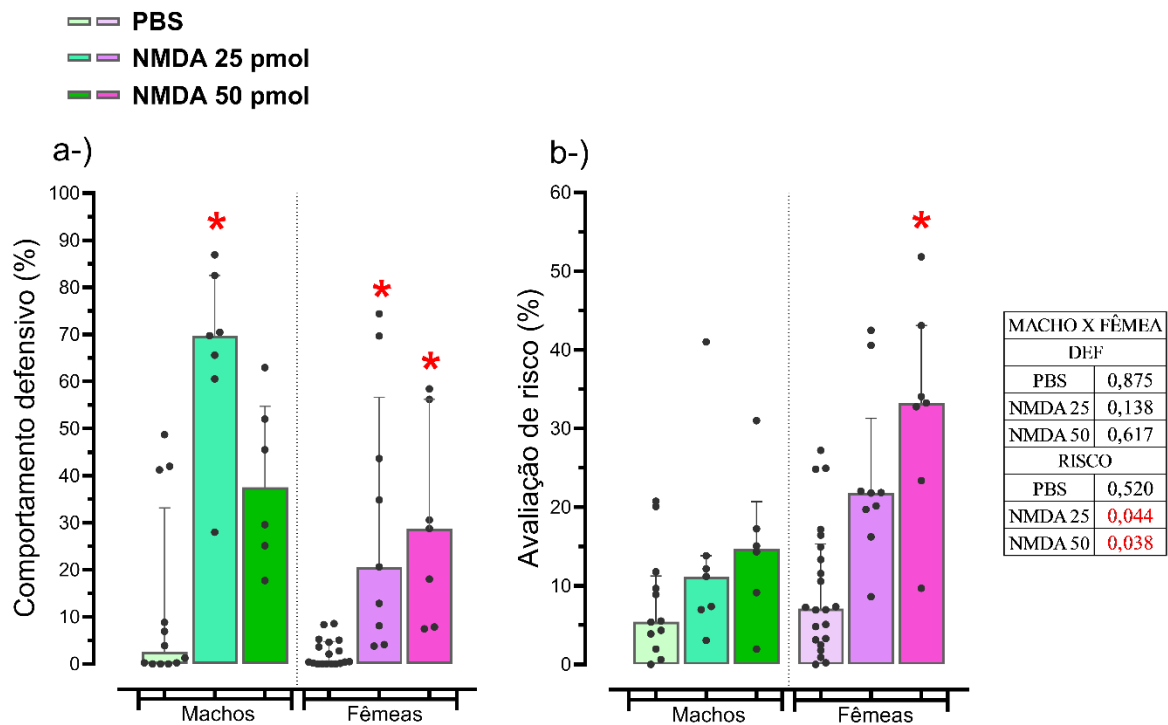


Figure 13 - Efeitos da ativação de receptores NMDA na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral sobre os comportamentos defensivos (a) e de avaliação de risco (b) de ratos machos e fêmeas após microinjeção. Barras representam a mediana e intervalo interquartil da porcentagem de tempo do comportamento. Os grupos estão divididos em machos PBS ($n = 12$), NMDA 25 ($n = 7$) e NMDA 50 ($n = 6$) e fêmeas PBS ($n = 23$), NMDA 25 ($n = 9$) e NMDA 50 ($n = 7$). * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo PBS no teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de médias ranqueadas. A tabela representa os valores de p das comparações entre os sexos feita por teste de Mann-Whitney U. DEF: comportamentos defensivos; RISCO: comportamentos de avaliação de risco.

A Figura 15 representa a distribuição percentual por grupo dos comportamentos observados após estimulação glutamatérgica da MCPdl. Observou-se que no grupo NMDA 25, machos apresentaram um perfil comportamental predominantemente DEF (75,35%), enquanto que as fêmeas expressaram um perfil mais equilibrado entre os três agrupamentos comportamentais (NDEF: 25,57%; RISCO: 28,52%; DEF: 45,91%). No grupo NMDA 50, machos e fêmeas apresentaram porcentagens similares de DEF (Machos: 43,37%; Fêmeas: 47,32%). No entanto, os comportamentos de RISCO foram predominantes nas fêmeas (Machos: 16,53%; Fêmeas: 45,73%).

A Figura 16 representa a expressão dos comportamentos DEF e RISCO de ratos machos e fêmeas durante a sessão de F2 e Teste. Durante a sessão de teste, os comportamentos avaliados não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais. No entanto, a análise entre os sexos revelou que machos apresentaram maior frequência de DEF do que fêmeas em todos os grupos (PBS: $Z = -2,41$; $p = 0,015$; NMDA 25: $Z = -3,17$; $p = 0,001$; NMDA 50: $Z = -2,92$; $p = 0,003$).

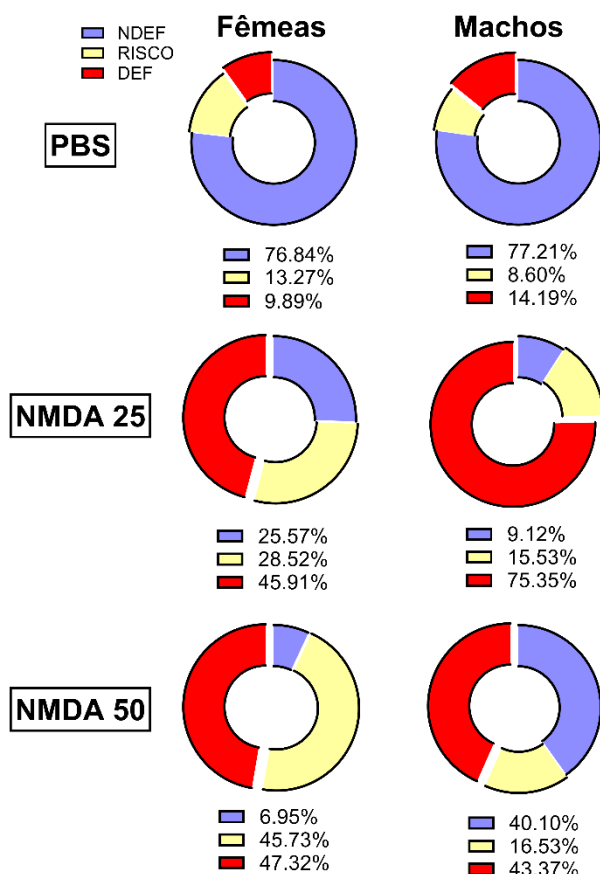


Figure 14 - Distribuição percentual dos comportamentos observados após estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl). Os gráficos circulares representam a proporção média de comportamentos não defensivos (NDEF; azul), de avaliação de risco (RISCO; amarelo) e defensivos (DEF; vermelho) em ratos machos (esquerda) e fêmeas (direita), submetidos à microinjeção de PBS, agonista NMDA 25 ou 50 pmol na MCPdl.

Para diminuir a variabilidade individual, também foram adotados e analisados os valores de Delta (Δ) representado pela diferença entre a sessão de Teste e F2. A Figura 17 representa os valores de Δ Comportamentos. Na análise dos Δ Comportamentos, foram encontradas diferenças na expressão de comportamentos não-defensivos (NDEF) entre os grupos em machos ($H [2] = 7,14$; $p = 0,028$) e fêmeas ($H [2] = 16,60$; $p = 0,002$). Comportamentos de DEF e RISCO não apresentaram diferenças. Fêmeas NMDA 25 ($p < 0,001$) e machos NMDA 50 ($p = 0,036$) expressaram menos NDEF do que seus respectivos grupos controles. Na comparação entre os sexos, o grupo NMDA 25 apresentou diferenças nos comportamentos DEF ($U = 10$; $Z = -2,22$, $p = 0,026$) e NDEF ($U = 9$; $Z = -2,32$; $p = 0,020$), ambos mais expressos por machos.

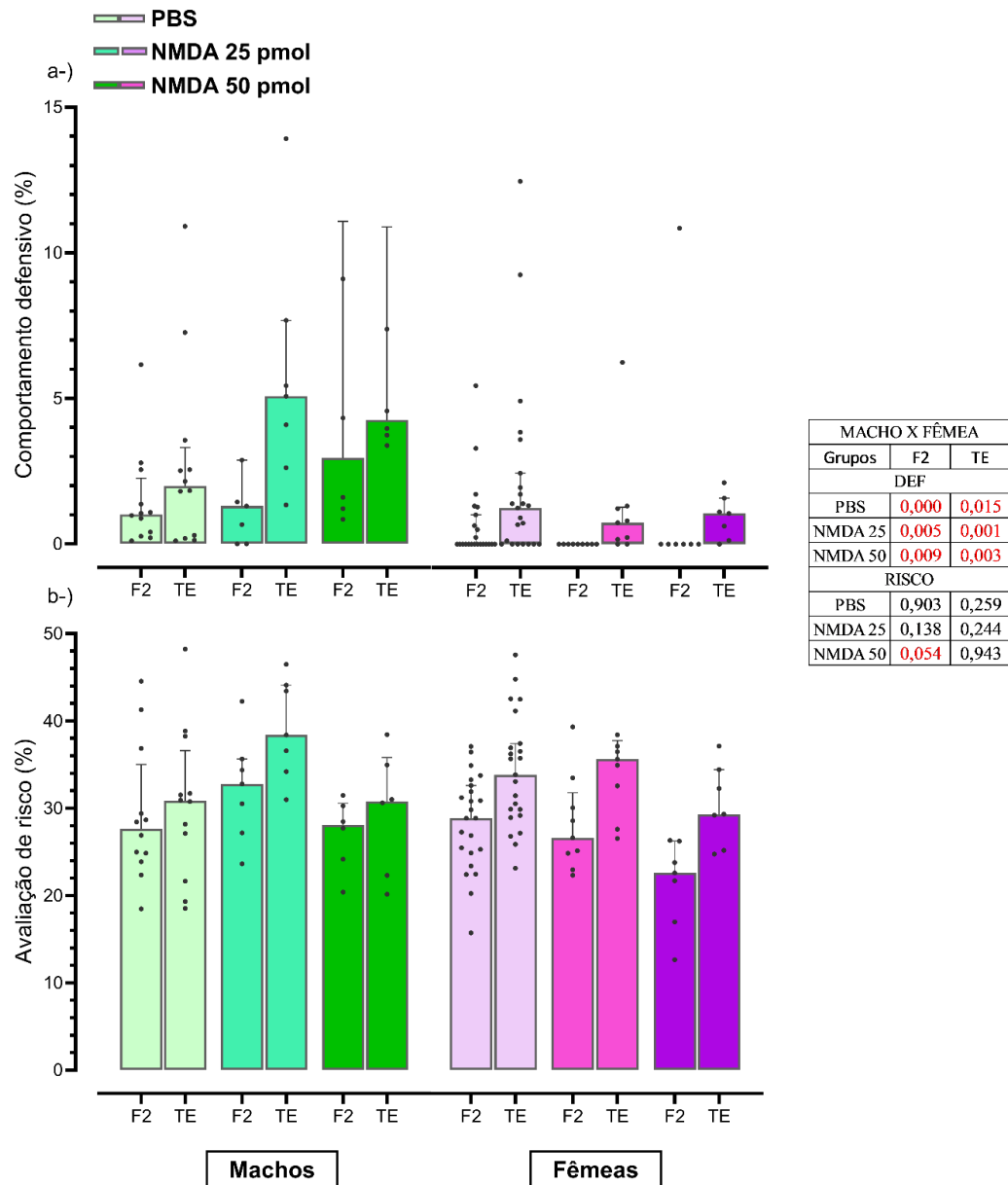


Figure 15 – Tempo dos comportamentos defensivos (a) e de avaliação de risco (b) de ratos machos e fêmeas durante a sessão de Familiarização 2 (F2) e Teste (TE) do condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral. Barras representam a mediana e intervalo interquartil da porcentagem de tempo do comportamento. Os grupos estão divididos em machos PBS (n = 12), NMDA 25 (n = 7) e NMDA 50 (n = 6) e fêmeas PBS (n = 23), NMDA 25 (n = 9) e NMDA 50 (n = 7). Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de médias ranqueadas. A tabela representa os valores de p das comparações entre os sexos feita por teste de Mann-Whitney U. DEF: comportamentos defensivos; RISCO: comportamentos de avaliação de risco.

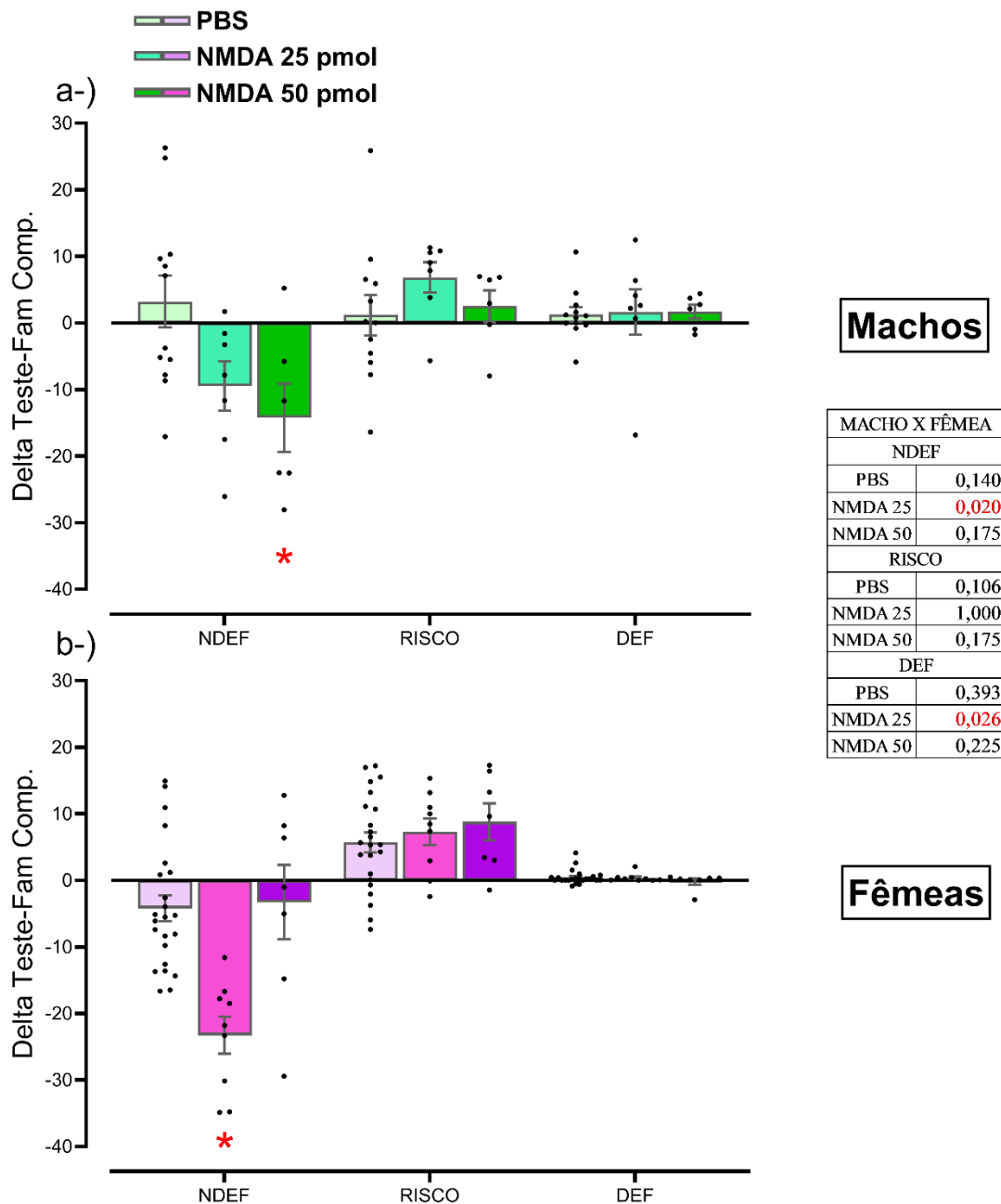


Figure 16 – Diferença (Δ) entre a sessão de teste e familiarização 2 do condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral para expressão de comportamentos. Barras representam a mediana e intervalo interquartil do delta. Os grupos estão divididos em machos PBS (n = 12), NMDA 25 (n = 7) e NMDA 50 (n = 6) e fêmeas PBS (n = 23), NMDA 25 (n = 9) e NMDA 50 (n = 7). * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo PBS no teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de médias ranqueadas. A tabela representa os valores de p das comparações entre os sexos feita por teste de Mann-Whitney U. NDEF: comportamentos não defensivos; RISCO: comportamentos de avaliação de risco; DEF: comportamentos defensivos.

A Figura 18 representa a preferência ao espaço fechado e próximo ao odor de ratos machos e fêmeas durante a sessão de F2 e Teste. Os grupos não apresentaram diferenças na preferência ao local. As comparações entre sexos mostraram que durante a sessão de teste, machos PBS ($U = 52$; $Z = -2,97$; $p = 0,003$) e NMDA 25 ($U = 4$; $Z = -2,85$; $p = 0,004$) passaram mais tempo no espaço fechado do que as fêmeas do mesmo grupo. Fêmeas PBS também permaneceram mais tempo próximas ao odor do que machos PBS ($U = 77$; $Z = 2,10$; $p = 0,036$).

A Figura 19 mostra os valores de Δ Preferência a local. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados para nenhum espaço da Caixa Odor. Entretanto, a comparação entre os sexos revelou que, no grupo NMDA 25, machos passaram menos tempo próximo ao EC ($U = 12$; $Z = 2,01$; $p = 0,044$) e mais tempo no espaço fechado ($U = 13$; $Z = -1,90$; $p = 0,057$) em comparação às fêmeas. Além disso, no grupo NMDA 50, fêmeas passaram mais tempo no espaço aberto do que os machos ($U = 5$; $Z = 2,21$; $p = 0,027$).

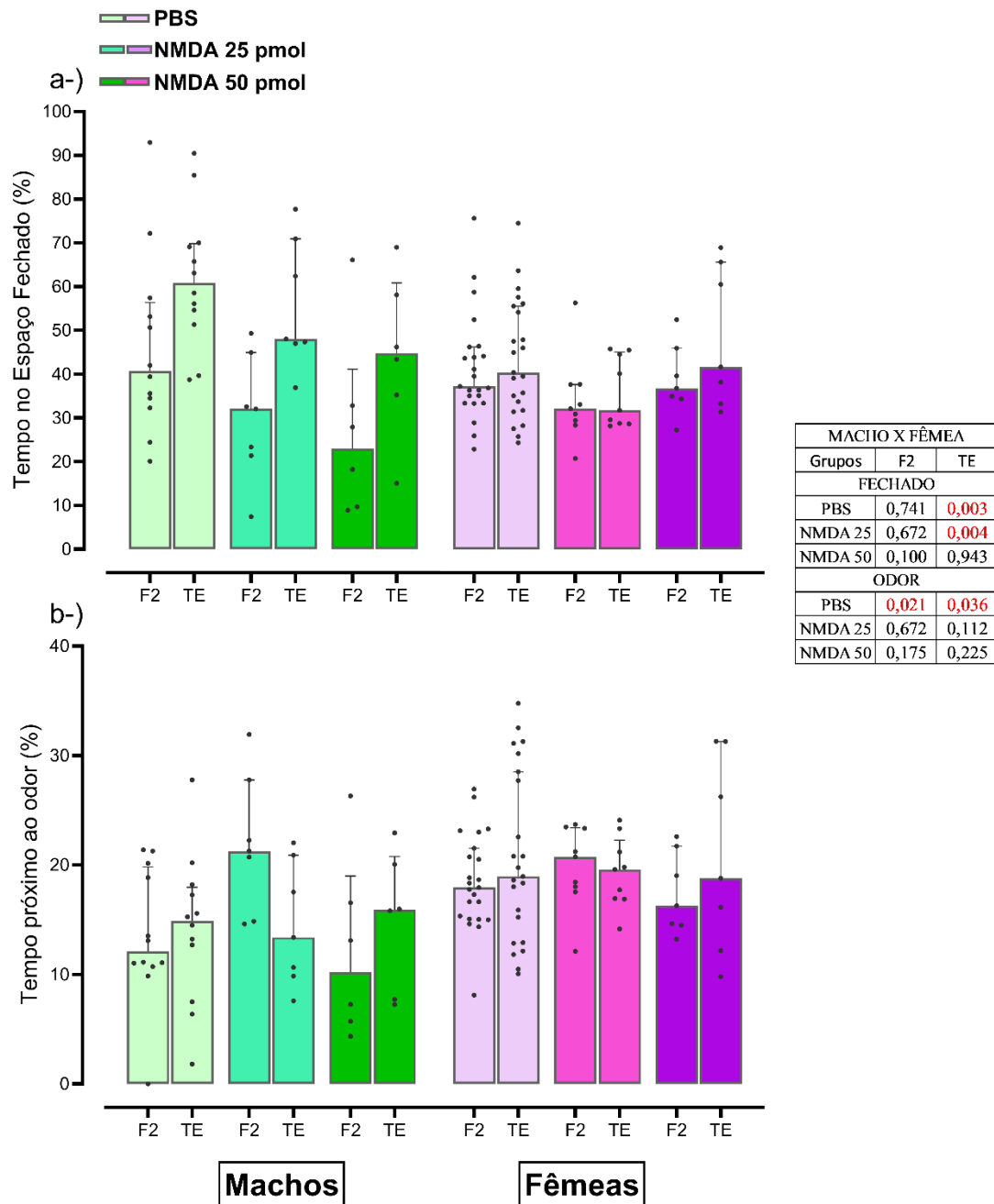


Figure 17 - Preferência ao espaço fechado (a) e próximo ao odor (b) de ratos machos e fêmeas durante a sessão de Familiarização 2 (F2) e Teste (TE) do condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral. Barras representam a mediana e intervalo interquartil da porcentagem de tempo no espaço. Os grupos estão divididos em machos PBS (n = 12), NMDA 25 (n = 7) e NMDA 50 (n = 6) e fêmeas PBS (n = 23), NMDA 25 (n = 9) e NMDA 50 (n = 7). * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo PBS no teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de médias ranqueadas. A tabela representa os valores de p das comparações entre os sexos feita por teste de Mann-Whitney U.

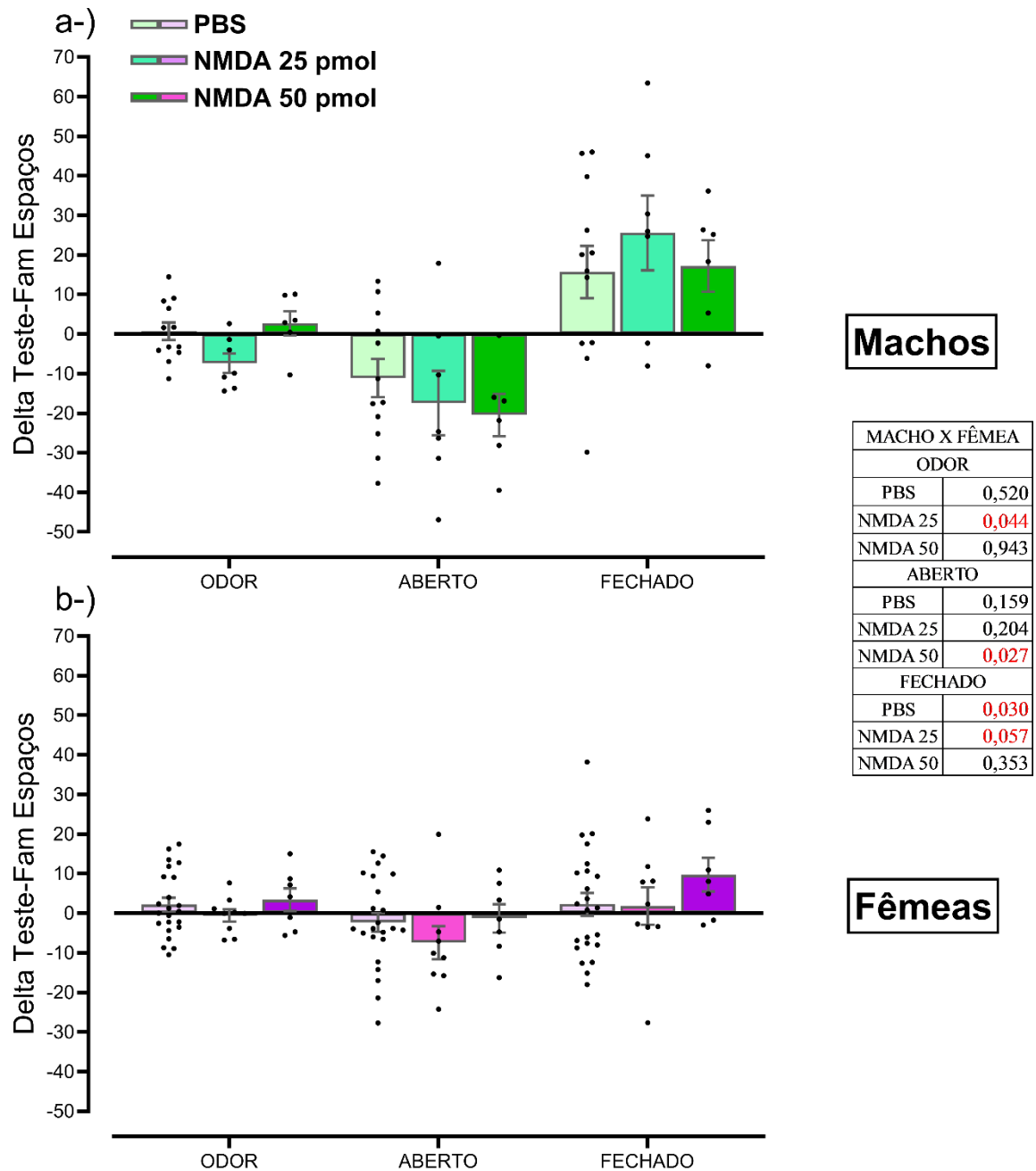


Figure 18 - Diferença (Δ) entre a sessão de teste e familiarização 2 do condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral para preferência a local. Barras representam a mediana e intervalo interquartil do delta. Os grupos estão divididos em machos PBS (n = 12), NMDA 25 (n = 7) e NMDA 50 (n = 6) e fêmeas PBS (n = 23), NMDA 25 (n = 9) e NMDA 50 (n = 7). Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de médias ranqueadas. A tabela representa os valores de p das comparações entre os sexos feita por teste de Mann-Whitney U. ODOR: espaço próximo ao odor.

Os resultados indicam que a ativação dos receptores NMDA na MCPdl provoca respostas comportamentais imediatas compatíveis com o processamento de ameaça, com diferenças entre os sexos. No entanto, o protocolo utilizado no Experimento 1 não gerou aprendizado condicionado robusto, sugerindo limitações metodológicas na detecção de memória aversiva. Ainda assim, foram observadas diferenças sexuais consistentes, reforçando o papel modulador da MCPdl de forma sexo-dependente. Diante disso, o Experimento 2 foi conduzido com um protocolo mais consolidado, visando testar se ajustes metodológicos ampliariam a sensibilidade à manipulação da MCPdl e a expressão de respostas aprendidas.

3.2 EXPERIMENTO 2. COMPARAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO POR ESTIMULAÇÃO GLUTAMATÉRGICA DA MCPDL

A fim de investigar potenciais limitações metodológicas do protocolo de condicionamento utilizado no Experimento 1, realizamos uma comparação entre dois protocolos de condicionamento aversivo olfatório com microinjeção de NMDA na MCPdl. A Figura 20 representa a comparação entre protocolos de condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da MCPdl dos comportamentos DEF e de RISCO durante a sessão de condicionamento. Como já mencionado, no Protocolo 1, os grupos tratados com NMDA apresentaram diferenças em comportamentos DEF em relação ao controle. Essas diferenças não foram observadas nas Fêmeas do Protocolo 2, somente em machos ($H[2] = 10,50$; $p = 0,005$). Os machos NMDA 50 apresentaram mais DEF do que machos PBS (0,003).

Ao comparar os protocolos diretamente, fêmeas NMDA 50 apresentaram mais comportamentos DEF no Protocolo 1 do que no Protocolo 2 ($U = 4$; $Z = 2,73$; $p = 0,006$). Além disso, machos PBS ($U = 7$; $Z = -3,12$; $p = 0,002$) e NMDA 25 ($U = 8$; $Z = -2,26$; $p = 0,024$) expressaram menos comportamento de RISCO no Protocolo 1, e machos NMDA 25 apresentaram mais DEF ($U = 2$; $Z = 2,95$; $p = 0,003$).

Assim como no Protocolo 1, diferenças sexuais foram observadas no Protocolo 2. Fêmeas PBS ($U = 10$; $Z = -2,26$; $p = 0,024$) e NMDA 25 ($U = 9$; $Z = -2,55$; $p = 0,011$) expressaram menos RISCO que os machos correspondentes, e fêmeas NMDA 50 exibiram menos DEF ($U = 2$; $Z = -2,96$; $p = 0,003$) que os machos do mesmo grupo.

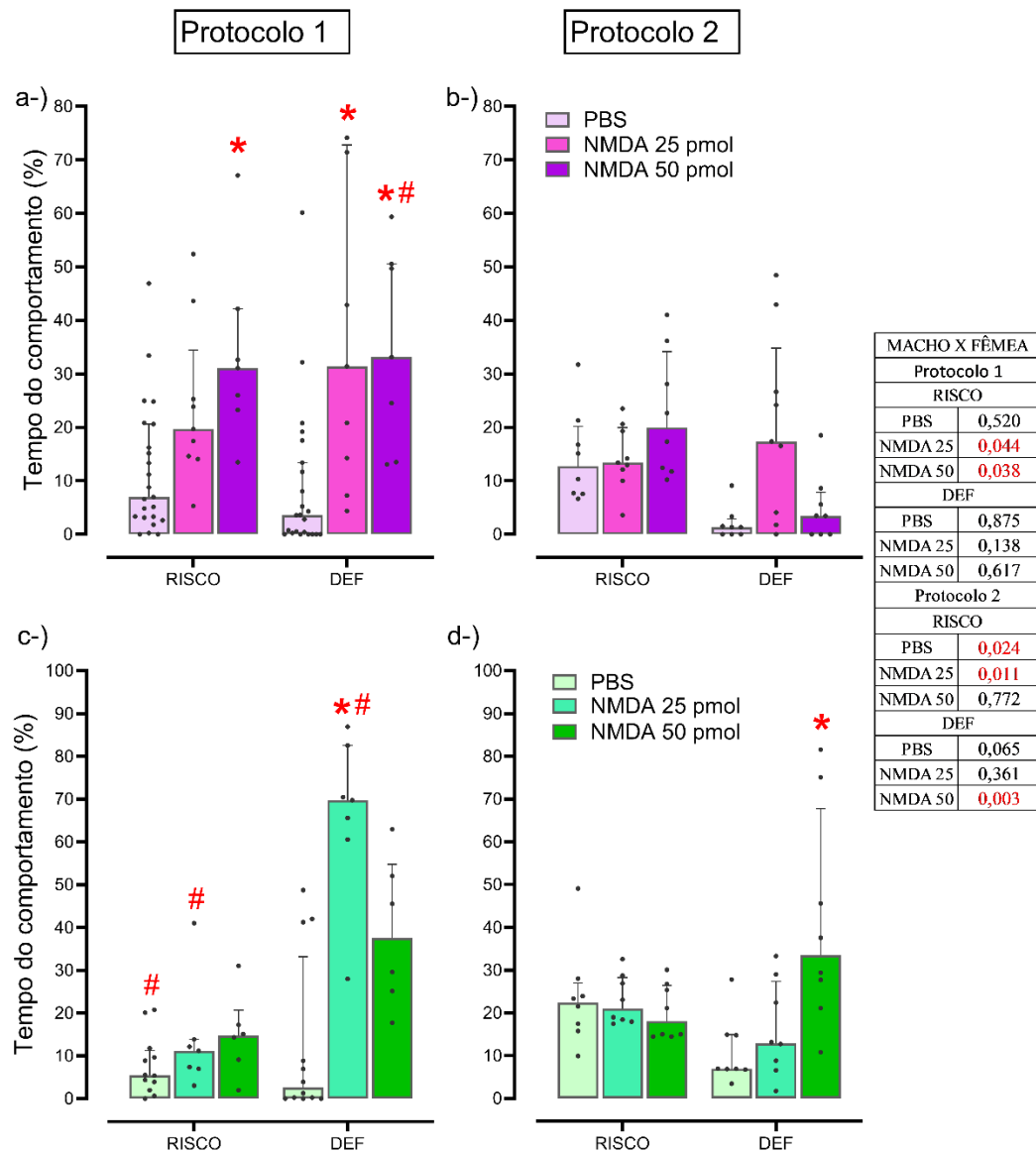


Figure 19 – Comparação dos comportamentos defensivos (DEF) e de avaliação de risco (RISCO) na sessão de condicionamento entre protocolos de condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral. Protocolo 1 (a – fêmeas, c – machos) consistiu em microinjeção com o animal contido pré-exposição ao estímulo condicionado (odor amil acetato). Protocolo 2 (b – fêmeas, d – machos) os animais receberam a microinjeção em livre movimento durante exposição ao estímulo condicionado. Barras representam a mediana e intervalo interquartil da porcentagem de tempo do comportamento. Os grupos estão divididos em Protocolo 1: machos PBS (n = 8), NMDA 25 (n = 8) e NMDA 50 (n = 8) e fêmeas PBS (n = 8), NMDA 25 (n = 7) e NMDA 50 (n = 8); Protocolo 2: PBS (n = 12), NMDA 25 (n = 7) e NMDA 50 (n = 6) e fêmeas PBS (n = 23), NMDA 25 (n = 9) e NMDA 50 (n = 7). * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo PBS no teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de médias ranqueadas. # $p \leq 0,05$ para comparação do mesmo grupo entre protocolos por teste de Mann-Whitney U. A tabela representa os valores de p das comparações entre os sexos feita por teste de Mann-Whitney U.

A Figura 21 representa a comparação da preferência ao espaço fechado ou próximo ao odor na sessão de teste entre protocolos. No Protocolo 2, não foram observadas diferenças entre os grupos de fêmeas. No entanto, os machos apresentaram diferenças no tempo no espaço fechado ($H [2] = 13,82$; $p = 0,001$) e próximo ao odor ($H [2] = 14,98$; $p < 0,001$). Machos NMDA 50 passaram mais tempo no espaço fechado ($p = 0,001$) e menos tempo próximo ao odor ($p = 0,001$) do que Machos PBS.

A comparação direta entre protocolos revelou que Fêmeas NMDA 25 passaram menos tempo no espaço fechado no Protocolo 1 do que no Protocolo 2 ($U = 14$; $Z = -2,29$; $p = 0,022$). Machos PBS passaram menos tempo próximo ao EC ($U = 6$; $Z = -3,20$; $p = 0,001$) e mais tempo no espaço fechado ($U = 13$; $Z = 2,66$; $p = 0,008$) no Protocolo 1. Além disso, Machos NMDA 25 passaram menos tempo próximo odor ($U = 7$; $Z = -2,37$; $p = 0,018$) e machos NMDA 50 passaram menos tempo no espaço fechado ($U = 2$; $Z = -2,77$; $p = 0,006$) no Protocolo 1.

Na comparação entre os sexos no Protocolo 2, machos NMDA 50 passaram mais tempo no espaço fechado ($U = 6$; $Z = -2,68$; $p = 0,007$) e menos tempo próximo odor ($U = 1$; $Z = 3,20$; $p = 0,001$) do que as fêmeas do mesmo grupo, reforçando a presença de dimorfismos sexuais na resposta à estimulação da MCPdl.

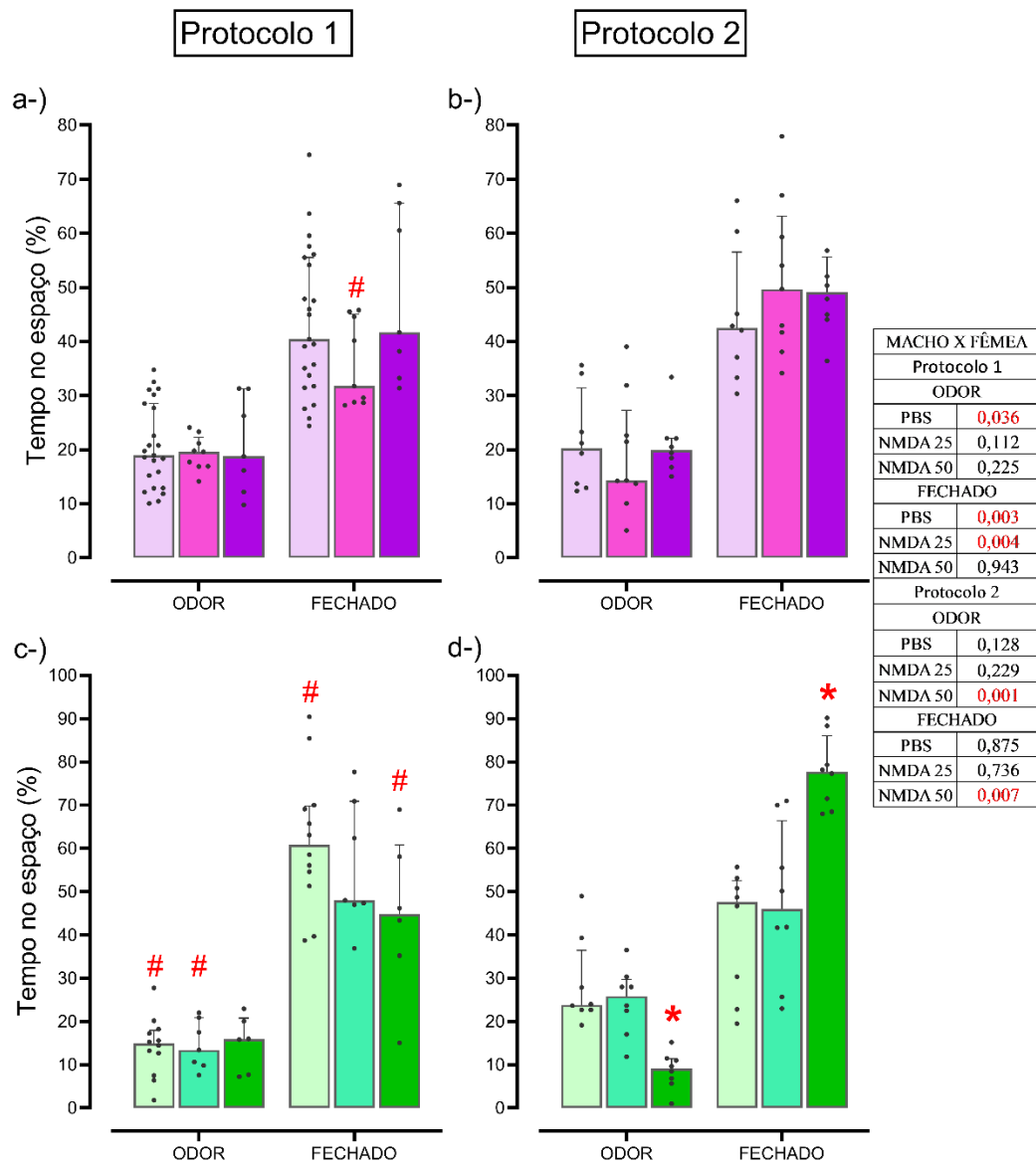


Figure 20 - Comparação da preferência ao espaço fechado ou próximo ao odor na sessão de teste entre protocolos de condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral. Protocolo 1 (a – fêmeas, c – machos) consistiu em microinjeção com o animal constringido pré-exposição ao estímulo condicionado (odor amil acetato). Protocolo 2 (b – fêmeas, d – machos) os animais receberam a microinjeção em livre movimento durante exposição ao estímulo condicionado. Barras representam a mediana e intervalo interquartil da porcentagem de tempo em cada espaço. Os grupos estão divididos em Protocolo 1: machos PBS (n = 8), NMDA 25 (n = 8) e NMDA 50 (n = 8) e fêmeas PBS (n = 8), NMDA 25 (n = 7) e NMDA 50 (n = 8); Protocolo 2: PBS (n = 12), NMDA 25 (n = 7) e NMDA 50 (n = 6) e fêmeas PBS (n = 23), NMDA 25 (n = 9) e NMDA 50 (n = 7). * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo PBS no teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de médias ranqueadas. # $p \leq 0,05$ para comparação do mesmo grupo entre protocolos por teste de Mann-Whitney U. A tabela representa os valores de p das comparações entre os sexos feita por teste de Mann-Whitney U.

A Figura 22 representa a comparação entre protocolos de condicionamento aversivo olfatório para Δ Preferência por local ($\Delta = TE - F2$). No Protocolo 2, fêmeas apresentaram diferenças entre os grupos para tempo no espaço aberto ($H [2; 25] = 7,77; p = 0,020$). Fêmeas NMDA 25 passaram menos tempo no espaço aberto do que fêmeas PBS ($p = 0,019$). Esse grupo também apresentou diferenças sexuais: fêmeas ficaram menos tempo no espaço aberto do que machos ($U = 12; Z = -2,26; p = 0,024$). A comparação direta entre protocolos revelou que machos NMDA 25 ($U = 11; Z = -1,91; p = 0,056$) e NMDA 50 ($U = 5; Z = -2,39; p = 0,017$) passaram menos tempo no espaço aberto, e machos PBS ($U = 22; Z = 1,97; p = 0,049$) e NMDA 50 ($U = 8; Z = 2,00; p = 0,045$) ficaram mais tempo no espaço fechado no Protocolo 1.

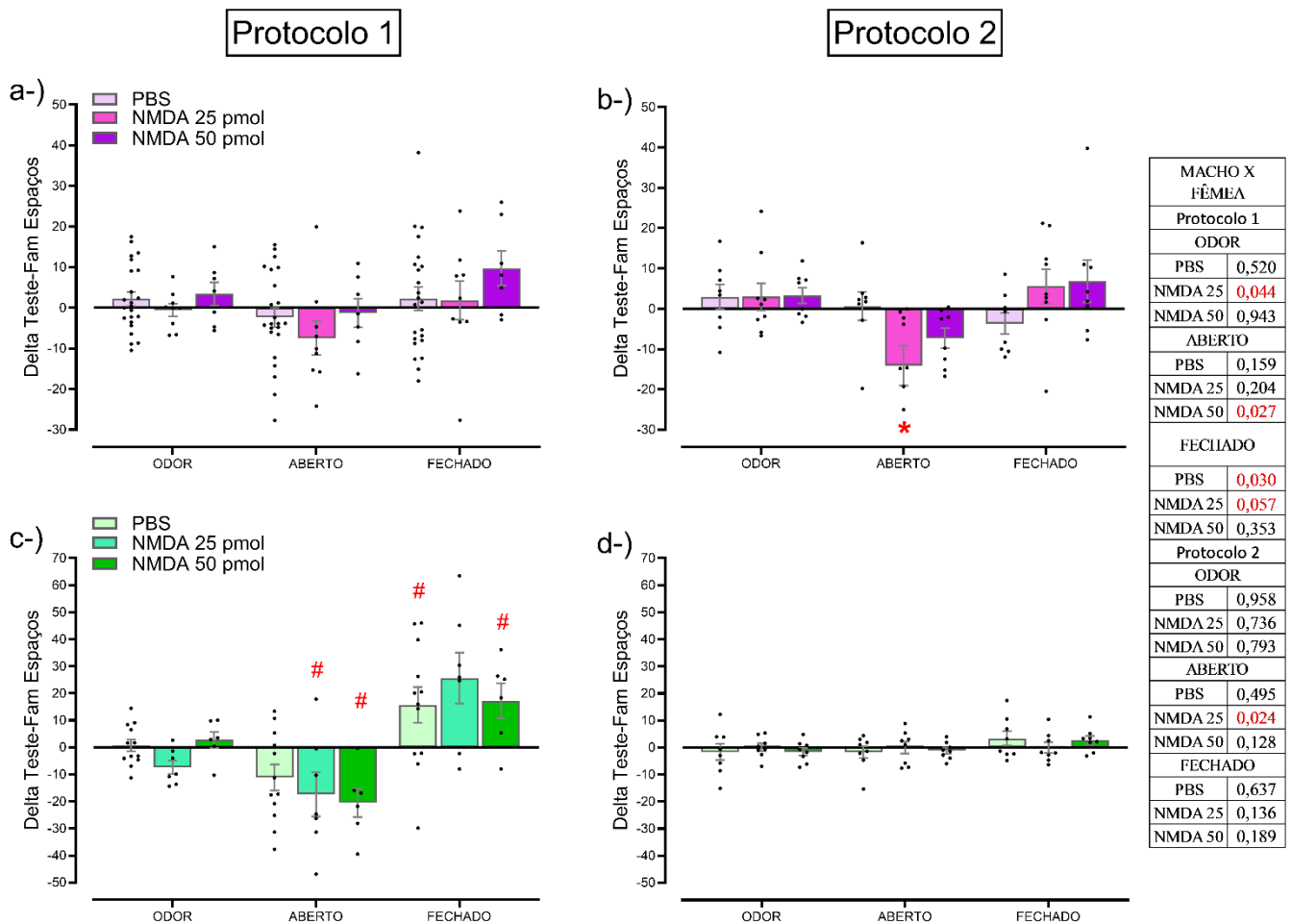


Figure 21 - Comparação da diferença (Δ) entre a sessão de teste e familiarização 2 para preferência a local entre protocolos de condicionamento aversivo olfatório por estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral. Protocolo 1 (a – fêmeas, c – machos) consistiu em microinjeção com o animal constringido pré-exposição ao estímulo condicionado (odor amil acetato). Protocolo 2 (b – fêmeas, d – machos) os animais receberam a microinjeção em livre movimento durante exposição ao estímulo condicionado. Barras representam a mediana e intervalo interquartil do delta. Os grupos estão divididos em Protocolo 1: machos PBS (n = 8), NMDA 25 (n = 8) e NMDA 50 (n = 8) e fêmeas PBS (n = 8), NMDA 25 (n = 7) e NMDA 50 (n = 8); Protocolo 2: PBS (n = 12), NMDA 25 (n = 7) e NMDA 50 (n = 6) e fêmeas PBS (n = 23), NMDA 25 (n = 9) e NMDA 50 (n = 7). * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo PBS no teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de médias ranqueadas. # $p \leq 0,05$ para comparação do mesmo grupo entre protocolos por teste de Mann-Whitney U. A tabela representa os valores de p das comparações entre os sexos feita por teste de Mann-Whitney U.

3.3 EXPERIMENTO 3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ANTAGONISTA AP5 DE RECEPTORES NMDA NA MCPDL NO CAO POR CHOQUE NAS PATAS

Com o objetivo de investigar o papel dos receptores NMDA da MCPdl na modulação do condicionamento aversivo com choque nas patas, avaliamos os efeitos da microinjeção do antagonista AP5 realizada antes da sessão de condicionamento sobre os comportamentos imediatos (DEF e RISCO) e sobre a consolidação da memória associativa traumática.

A Figura 23 mostra os comportamentos de DEF e RISCO durante a sessão de condicionamento após o bloqueio dos receptores NMDA na MCPdl com AP5, em ratos machos e fêmeas. Machos ($H [2] = 10,46$; $p = 0,005$) e fêmeas ($H [2] = 7,38$; $p = 0,025$) apresentaram diferenças entre os grupos para o comportamento DEF. Em ambos os sexos, a presença do estímulo incondicionado (choque) aumentou os comportamentos de DEF, independentemente do tratamento (fêmeas PBS choque: $p = 0,032$; fêmeas AP5 choque: $p = 0,051$; machos PBS choque: $p = 0,025$; machos AP5 choque: $p = 0,009$). Fêmeas também apresentaram diferenças nos comportamentos de RISCO ($H [2] = 7,85$; $p = 0,020$): fêmeas AP5 choque expressaram mais RISCO que AP5 NO choque ($p = 0,020$).

A análise entre sexos revelou que fêmeas tratadas com AP5 apresentaram menos DEF que os machos, tanto no grupo com ($U = 9$; $Z = -2,14$; $p = 0,032$) quanto no grupo sem choque ($U = 3,5$; $Z = -2,20$; $p = 0,028$). No entanto, fêmeas PBS choque ($U = 18$; $Z = 2,28$; $p = 0,023$) e AP5 choque ($U = 2$; $Z = -2,95$; $p = 0,003$) demonstraram mais comportamentos de RISCO que os machos dos mesmos grupos.

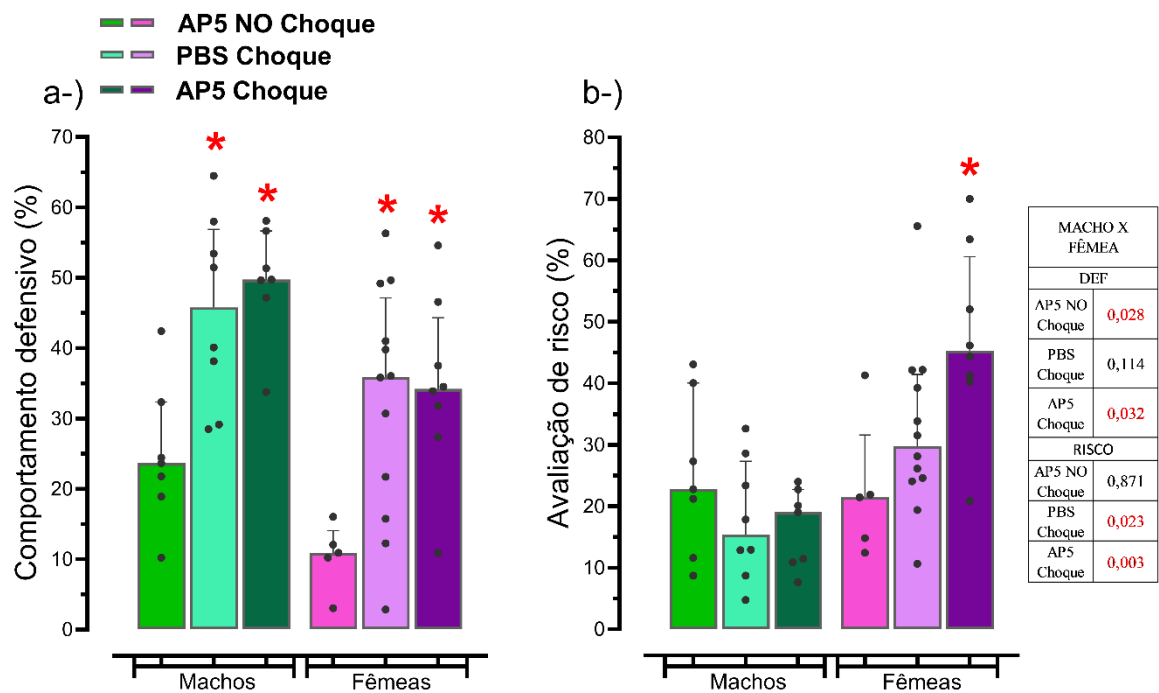


Figure 22 - Efeitos do antagonismo de receptores NMDA por AP5 na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral sobre os comportamentos defensivos (a) e de avaliação de risco (b) de ratos machos e fêmeas durante a sessão de condicionamento do condicionamento aversivo olfatório por choque nas patas. Barras representam a mediana e intervalo interquartil da porcentagem de tempo do comportamento. Os grupos estão divididos em machos AP5 No Choque ($n = 7$), PBS choque ($n = 8$) e AP5 choque ($n = 7$) e fêmeas PBS AP5 No Choque ($n = 5$), PBS choque ($n = 12$) e AP5 choque ($n = 8$). * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo AP5 No choque no teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de médias ranqueadas. A tabela representa os valores de p das comparações entre os sexos feita por teste de Mann-Whitney U. DEF: comportamentos defensivos; RISCO: comportamentos de avaliação de risco.

A Figura 24 mostra o tempo dos comportamentos DEF e RISCO durante a sessão de F2 e teste. Não foram observadas diferenças entre os grupos na expressão geral de comportamentos. No entanto, diferenças sexuais foram encontradas em F2, com machos PBS Choque apresentando mais DEF ($U = 8$; $Z = -2,47$; $p = 0,002$) e menos RISCO ($U = 17$; $Z = -3,05$; $p = 0,013$) que fêmeas PBS Choque, o que pode refletir maior generalização da ameaça nos machos.

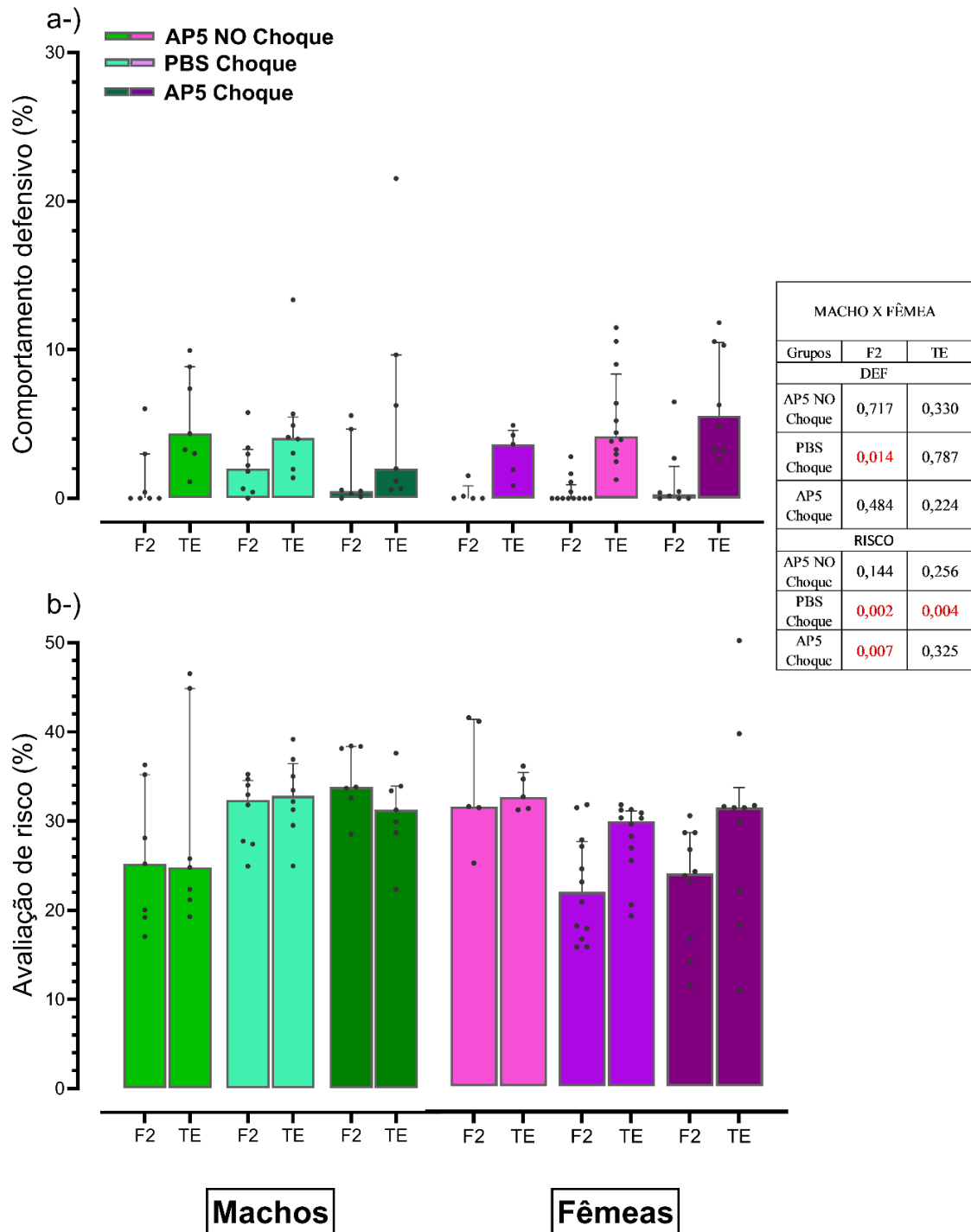


Figure 23 - Tempo dos comportamentos defensivos (a) e de avaliação de risco (b) de ratos machos e fêmeas durante a sessão de Familiarização 2 (F2) e Teste (TE) do condicionamento aversivo olfatório por choque nas patas antagonismo por AP5. Barras representam a mediana e intervalo interquartil da porcentagem de tempo do comportamento. Os grupos estão divididos em machos AP5 No Choque (n = 7), PBS choque (n = 8) e AP5 choque (n = 7) e fêmeas PBS AP5 No Choque (n = 5), PBS choque (n = 12) e AP5 choque (n = 8). A tabela representa os valores de p das comparações entre os sexos feita por teste de Mann-Whitney U. DEF: comportamentos defensivos; RISCO: comportamentos de avaliação de risco.

A Figura 25 mostra os valores de Δ Comportamentos em relação à fase de familiarização ($\Delta = TE - F2$), utilizados para reduzir a variabilidade individual. Machos não apresentaram diferenças entre os grupos para essas variáveis. No entanto, fêmeas apresentaram diferenças entre os grupos para NDEF ($H [2] = 10,10$; $p = 0,006$): fêmeas PBS Choque apresentaram menos NDEF do que fêmeas AP5 NO choque ($p = 0,005$).

Diferenças sexuais também foram encontradas para Δ NDEF e Δ RISCO. Machos AP5 NO choque mostraram diminuição nos comportamentos NDEF mais pronunciado do que em fêmeas AP5 NO choque ($U = 3$; $Z = 2,27$; $p = 0,023$). Além disso, fêmeas AP5 Choque apresentaram maior aumento no comportamento de RISCO do que machos do mesmo grupo ($U = 11$; $Z = 1,91$; $p = 0,056$), sugerindo uma maior sensibilidade comportamental ao estímulo aversivo em fêmeas sob bloqueio de NMDA.

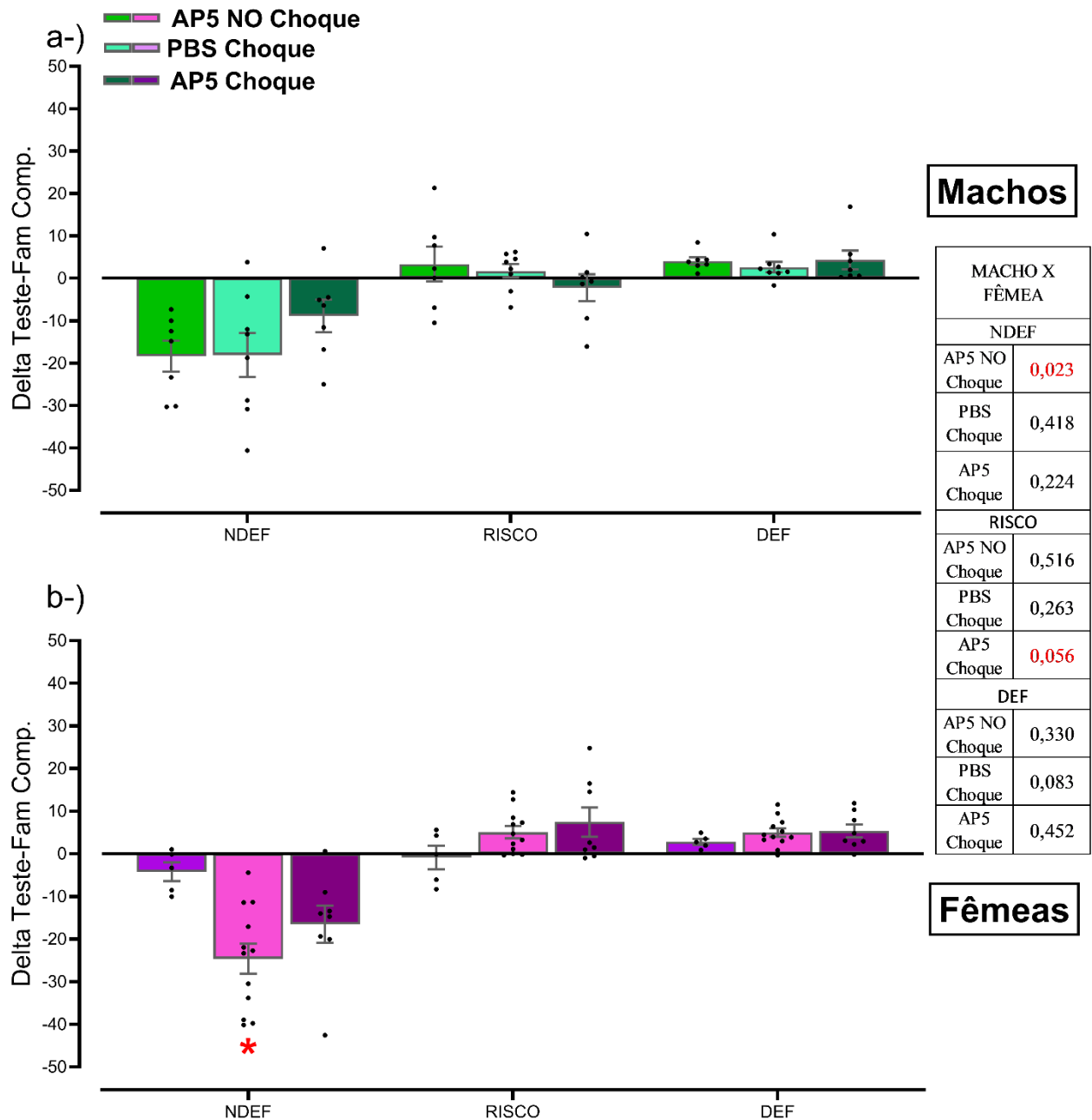


Figure 24 - Diferença (Δ) entre a sessão de teste e familiarização 2 do condicionamento aversivo olfatório por choque nas patas antagonismo por AP5 para expressão de comportamentos. Barras representam a mediana e intervalo interquartil do delta. Os grupos estão divididos em machos AP5 No Choque ($n = 7$), PBS choque ($n = 8$) e AP5 choque ($n = 7$) e fêmeas PBS AP5 No Choque ($n = 5$), PBS choque ($n = 12$) e AP5 choque ($n = 8$). * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo AP5 No choque no teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de médias ranqueadas. A tabela representa os valores de p das comparações entre os sexos feita por teste de Mann-Whitney U. NDEF: comportamentos não defensivos; RISCO: comportamentos de avaliação de risco; DEF: comportamentos defensivos.

A Figura 26 representa o tempo no espaço fechado e próximo ao odor de ratos machos e fêmeas durante a sessão de F2 e teste. Não foram observadas diferenças entre os grupos na preferência ao local. No entanto, diferenças sexuais foram encontradas para o tempo no espaço fechado durante a sessão de teste, com fêmeas PBS Choque permanecendo mais no espaço fechado que machos PBS Choque ($U = 20$; $Z = 2,12$; $p = 0,033$).

A Figura 27 mostra os valores de Δ Preferência por local (TE – F2). Diferenças entre os grupos foram encontradas em machos para tempo no espaço aberto ($H [2] = 8,86$; $p = 0,013$) e em fêmeas para tempo no espaço aberto ($H [2] = 5,96$; $p = 0,056$) e fechado ($H [2] = 6,03$; $p = 0,049$). Nos machos, o grupo AP5 Choque passou mais tempo no espaço aberto do que os demais grupos (PBS choque: $p = 0,022$; AP5 NO choque: $p = 0,022$). Além disso, machos tratados apenas com AP5, sem exposição ao choque, exibiram padrão de resposta semelhante ao grupo PBS Choque, sugerindo possível efeito isolado do AP5 sobre a consolidação da memória. Nas fêmeas, os grupos PBS choque e AP5 choque não apresentaram diferenças entre si, mas o grupo AP5 choque permaneceu mais tempo no espaço fechado ($p = 0,046$) e menos no espaço aberto ($p = 0,056$), indicando um efeito comportamental oposto ao observado nos machos.

Diferenças sexuais foram encontradas também para Δ Preferência por local: fêmeas AP5 choque passaram mais tempo no espaço fechado ($U = 5$; $Z = 2,60$; $p = 0,009$) e menos no aberto ($U = 4$; $Z = 2,72$; $p = 0,006$) que machos AP5 choque. Fêmeas PBS choque também passaram mais tempo no espaço fechado do que machos PBS choque ($U = 19$; $Z = 2,20$; $p = 0,028$).

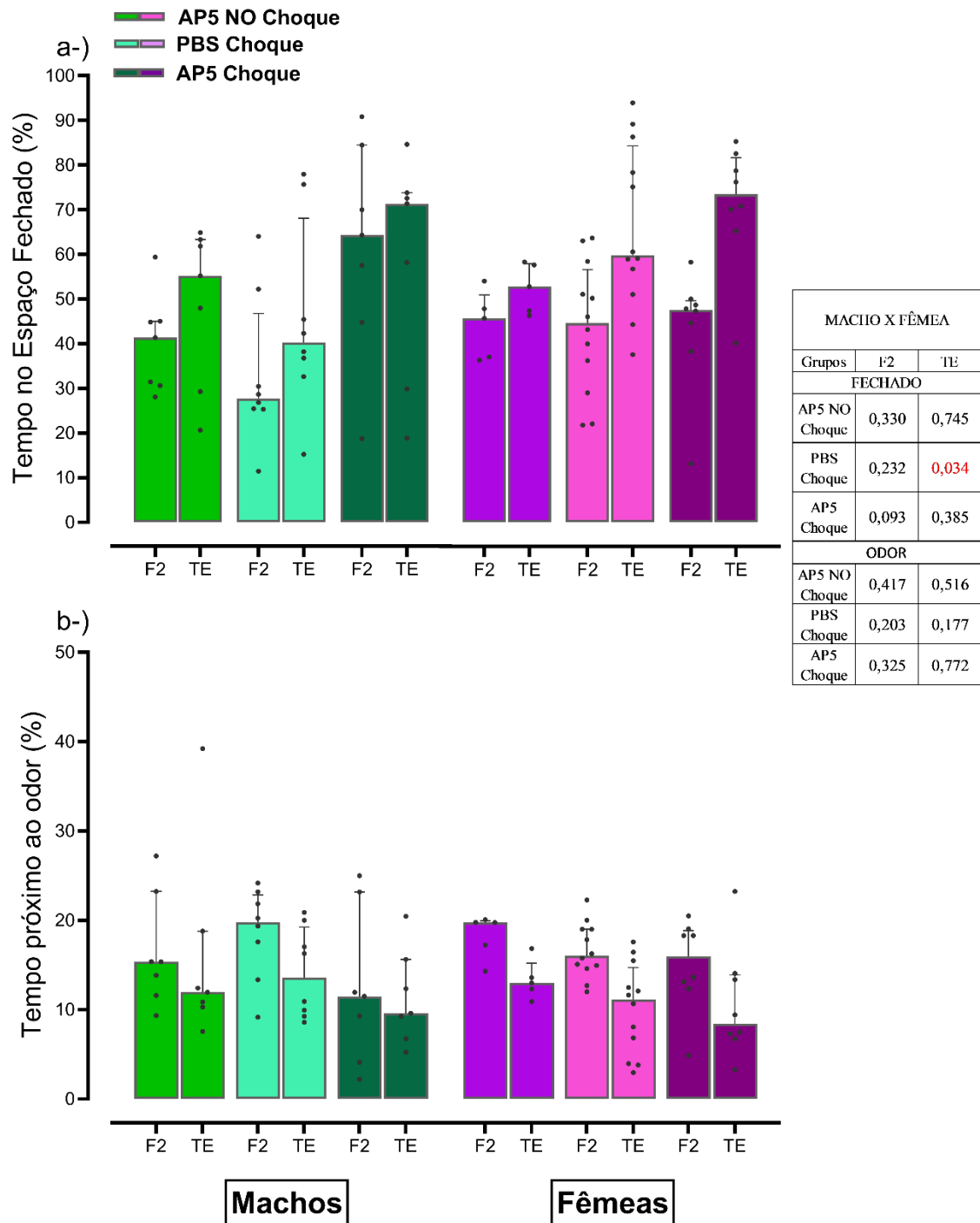


Figure 25 - Preferência ao espaço fechado (a) e próximo ao odor (b) de ratos machos e fêmeas durante a sessão de Familiarização 2 (F2) e Teste (TE) do condicionamento aversivo olfatório por choque nas patas antagonismo por AP5. Barras representam a mediana e intervalo interquartil da porcentagem de tempo no espaço. Os grupos estão divididos em machos AP5 No Choque ($n = 7$), PBS choque ($n = 8$) e AP5 choque ($n = 7$) e fêmeas PBS AP5 No Choque ($n = 5$), PBS choque ($n = 12$) e AP5 choque ($n = 8$). A tabela representa os valores de p das comparações entre os sexos feita por teste de Mann-Whitney U. DEF: comportamentos defensivos; RISCO: comportamentos de avaliação de risco.

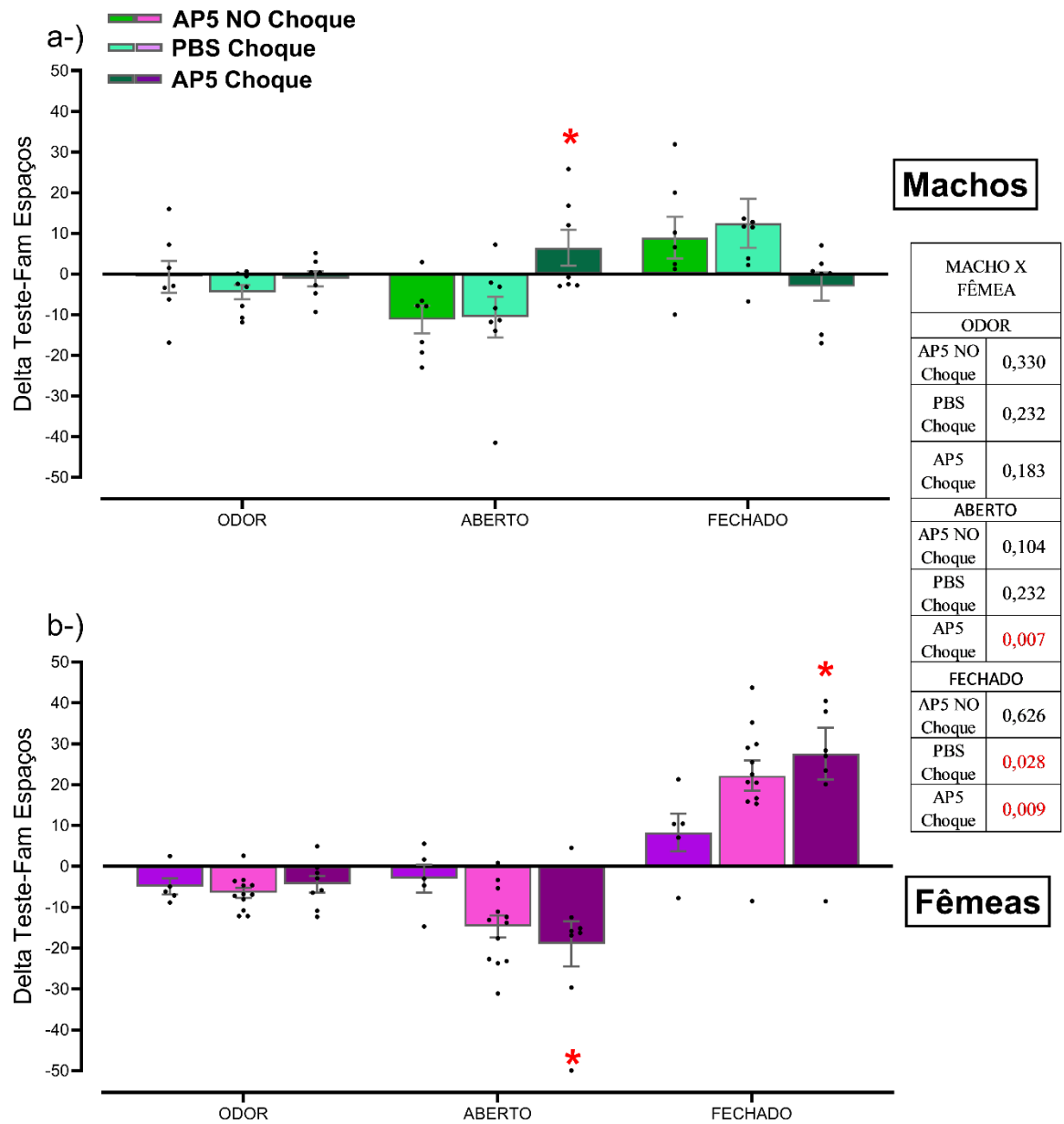


Figure 26 - Diferença (Δ) entre a sessão de teste e familiarização 2 do condicionamento aversivo olfatório por choque nas patas com antagonismo por AP5 para preferência a local. Barras representam a mediana e intervalo interquartil do delta. Os grupos estão divididos em machos AP5 No Choque ($n = 7$), PBS choque ($n = 8$) e AP5 choque ($n = 7$) e fêmeas PBS AP5 No Choque ($n = 5$), PBS choque ($n = 12$) e AP5 choque ($n = 8$). * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo AP5 No choque no teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de médias ranqueadas. A tabela representa os valores de p das comparações entre os sexos feita por teste de Mann-Whitney U.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo analisou como a neurotransmissão glutamatérgica na MCPdl influencia a expressão de respostas defensivas e a formação de memória traumática em ratos machos e fêmeas. A partir dos resultados obtidos, avaliamos as alterações comportamentais decorrentes das diferentes estratégias desenvolvidas durante o condicionamento aversivo olfatório, seja por manipulação prévia ou junto ao EC, e se essas variações refletiriam diferenças sexuais nas estratégias de enfrentamento. Essa análise abrangeu, de forma integrada, o perfil comportamental durante as sessões do condicionamento aversivo olfatório, os efeitos da estimulação com NMDA e a modulação pelo antagonista AP5, permitindo avaliar criticamente os mecanismos subjacentes à formação de memórias traumáticas e suas implicações para o entendimento dos transtornos relacionados ao medo e ansiedade.

4.1 OBSERVAÇÃO DE DIFERENÇAS SEXUAIS DURANTE O CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO POR ESTIMULAÇÃO GLUTAMATÉRGICA DA MCPDL

Os nossos dados demonstram que a ativação dos receptores NMDA na MCPdl induz um aumento claro e dose-dependente dos comportamentos defensivos em ratos machos, enquanto em fêmeas esse mesmo estímulo não só eleva a defesa, mas também promove uma maior avaliação de risco. Essa dissociação revela que, embora ambos os sexos recrutem a MCPdl para detectar e responder a uma ameaça, as estratégias comportamentais são diferentes, com as fêmeas adotando um perfil mais exploratório e ativo, e os machos privilegiando reações de imobilidade.

Além disso, observamos que o protocolo de condicionamento olfatório usado inicialmente não foi suficiente para estabelecer memórias aversivas robustas em nenhum dos sexos, o que reforça a necessidade de paradigmas mais consolidados para revelar o impacto da manipulação da MCPdl sobre o aprendizado associativo aversivo. De forma geral, esses achados sustentam a ideia de que a transmissão glutamatérgica via NMDA na MCPdl é essencial tanto para a expressão imediata de comportamentos de defesa quanto para moldar a escolha de estratégias adaptativas de enfrentamento, em um padrão que se diferencia entre machos e fêmeas.

A MCPdl é uma região do mesencéfalo altamente responsiva a estímulos aversivos, integrando informações sensoriais e coordenando comportamentos defensivos apropriados,

como a fuga e a avaliação de risco (Gross; Canteras, 2012; Kincheski et al., 2012; Lefler; Campagner; Branco, 2020; Li et al., 2018; Reis et al., 2023). A transmissão glutamatérgica na MCPdl ocorre predominantemente via ativação de receptores NMDA, que desencadeiam cascatas intracelulares envolvidas na geração e manutenção dos comportamentos defensivos (Aguilar; Guimarães, 2009; Back; Carobrez, 2018; Bertoglio; Zangrossi, 2006). Estudos demonstram que o bloqueio farmacológico desses receptores reduz a expressão de respostas de fuga e de avaliação de risco frente a ameaças (Aguilar; Guimarães, 2009). Esse achado sugere que a excitação glutamatérgica da MCPdl é necessária para a expressão dessas respostas, corroborando a hipótese de que esta região atua como um centro integrador para a seleção de estratégias defensivas apropriadas (Asok et al., 2021; La-Vu et al., 2022; Reis et al., 2023).

Além da mediação de respostas defensivas imediatas, a MCPdl também está implicada na consolidação de memórias traumáticas. Estudos indicam que a ativação glutamatérgica desta região pode potencializar memórias de condicionamento aversivo contextual, sugerindo um papel crítico na reconsolidação de experiências aversivas (Deng; Xiao; Wang, 2016; Mochny et al., 2013; Yeh; Ozawa; Johansen, 2021). Essa função de armazenamento e reforço de memórias emocionais negativas pode ser atribuída à interação entre a MCPdl e outras estruturas envolvidas no processamento emocional, como a amígdala e o córtex pré-frontal (Evans et al., 2018; Kincheski et al., 2012). No entanto, o protocolo de condicionamento aversivo olfatório utilizado no Experimento 1 não resultou em um aprendizado condicionado robusto, o que sugere possíveis limitações metodológicas para detecção de memória aversiva.

Embora a estimulação glutamatérgica da MCPdl tenha aumentado a resposta defensiva, a estratégia de enfrentamento foi diferente entre machos e fêmeas, que apresentaram aumento de comportamentos defensivos e de avaliação de risco. Diferenças sexuais nos comportamentos defensivos e de avaliação de risco já foram observados e reportados anteriormente (Blanchard et al., 1991; Greiner et al., 2018; Gruene et al., 2015; Imhof, 1993; Mitchell et al., 2022) e refletem uma interação complexa entre circuitos neurais, influências hormonais e estratégias comportamentais. Estudos indicam que a exposição a ameaças predatórias ativa circuitos encefálicos semelhantes em machos e fêmeas, incluindo o núcleo PMd do hipotálamo, sugerindo uma organização conservada para a iniciação de respostas defensivas (De Lima et al., 2022).

Analisando os padrões comportamentais dessa resposta, observa-se que fêmeas costumam adotar comportamentos mais ativos, como a corrida ou respostas de fuga, enquanto machos demonstram uma maior propensão a estratégias passivas, como o congelamento

(Greiner et al., 2018; Gruene et al., 2015; Mitchell et al., 2022). Essa diferença comportamental é evidenciada por dados que mostram que aproximadamente 40% das ratas executam a corrida durante o condicionamento aversivo, em contraste com apenas 10% dos ratos (Greiner et al., 2018).

A literatura tem consistentemente demonstrado que os comportamentos defensivos e de avaliação de risco não são homogêneos nem fixos, mas sim dinâmicos e influenciados por múltiplos fatores, incluindo o sexo (Endres; Fendt, 2007; Hager et al., 2014). Os comportamentos de avaliação de risco, em especial, têm sido interpretados como parte essencial da resposta ao condicionamento aversivo, refletindo não apenas a intensidade da ameaça percebida, mas também a estratégia de enfrentamento adotada (Augustsson, 2004; Blanchard, 2023). Assim, o aumento de comportamentos defensivos e de avaliação de risco observado nas fêmeas pode refletir uma maior avaliação ativa do ambiente ameaçador, ao invés da imobilidade ou congelamento, predominante nos machos.

Essas diferenças sexuais no comportamento são evidenciadas ao longo do desenvolvimento. Enquanto os machos aumentam a frequência de congelamento com a maturidade, as fêmeas reduzem essa resposta (Colon et al., 2018; Keiser et al., 2017). Essa diferença comportamental pode ser devido a diferenças sexuais na ativação de regiões encefálicas envolvidas na consolidação e extinção do condicionamento aversivo, como o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal (Day; Stevenson, 2020; Keiser et al., 2017). Adicionalmente, embora ambos os sexos compartilhem substratos encefálicos para avaliação de risco e resposta defensiva, as estratégias comportamentais finais podem ser moduladas por diferenças neuroendócrinas (Day; Stevenson, 2020).

Outra possível explicação para diferenças sexuais no comportamento é o papel social desempenhado por cada sexo na colônia. Machos possuem maior tamanho corporal, o que lhes confere vantagens na competição por hierarquia, acasalamento e defesa do território (Schweinfurth, 2020). Em contraste, fêmeas, menores e mais ágeis, tendem a priorizar a socialização e a interação com outros membros do grupo (Djerdjaj et al., 2023), o que pode favorecer comportamentos de fuga e avaliação de risco em situações ameaçadoras.

O ambiente social nos primeiros estágios de desenvolvimento também influencia a estruturação dos circuitos encefálicos responsáveis por respostas defensivas (Meaney; Stewart, 1979), e as diferenças nessa estruturação se traduzem na forma como machos e fêmeas respondem a ameaças. A escolha dos machos no congelamento e comportamentos passivos pode ser uma estratégia para evitar detecção, minimizar interações, e reter energia para caso

necessitem engajar em confrontos ou fuga (Burke; Miczek, 2015; Crawford; Masterson, 1982). Fêmeas, por outro lado, priorizam estratégias dinâmicas de escape e exploração, possivelmente como forma de evitar predação e garantir a continuidade da linhagem da colônia (Greiner et al., 2018; Gruene et al., 2015).

Fêmeas demonstram melhor discriminação entre sinais de ameaça e segurança (Foilb et al., 2018; Villalon et al., 2024), o que pode explicar sua menor resposta ao EC no teste. O ciclo estral também interfere: flutuações hormonais favorecem comportamentos mais ativos em fases específicas (Pyeon et al., 2023) e alteram a sensibilidade olfatória (Kinsley; Bridges, 1990), afetando a saliência do odor e seu valor aversivo. Além disso, vias olfatórias dedicadas à memória traumática podem ser moduladas de forma distinta em fêmeas, influenciando não só a força da memória, mas também sua generalização e extinção (Hakim et al., 2019). Portanto, a diferença observada entre os sexos nos nossos dados pode refletir, não apenas estratégias comportamentais distintas, mas também diferenças na forma como o estímulo olfatório é inicialmente codificado e mantido como representação de ameaça.

Outro aspecto a ser levado em consideração é a diferença no perfil comportamental de ratas virgens e ratas grávidas ou mães. Durante a gravidez e no período pós-partum, ratas grávidas apresentam profundas remodelações em várias áreas cerebrais, incluindo hipocampo e circuitos emocionais, mediadas por estrógeno e progesterona (Galea et al., 2013; Kinsley; Amory-Meyer, 2011; Pawluski; Galea, 2005). Embora nosso estudo tenha usado apenas ratas virgens, é importante reconhecer que a MCPdl, rica em receptores de ocitocina (Vázquez-León et al., 2023), também regula comportamentos maternos adaptativos, como agressão protetora e cuidado dos filhotes (Bosch et al., 2005; Gryksa et al., 2019). Lesões em colunas específicas da MCP prejudicam esses comportamentos, evidenciando sua anatomia funcional na maternidade (Lonstein; Stern, 1997; Sukikara et al., 2006).

Além disso, sub-regiões da MCPdl exibem diferenças sexuais na nocicepção: machos tem menos projeções para o bulbo rostral ventromedial, via antinociceptiva alvo de opioides, que fêmeas (Bobeck; McNeal; Morgan, 2009; Loyd; Murphy, 2009). Fêmeas também apresentam maior densidade de receptores CB1 e PPAR γ na MCP, moduladores da memória e da inflamação (Llorente-Berzal et al., 2022), e vias dopaminérgicas distintas que afetam mobilidade e dor (Yu et al., 2021). Esses achados sugerem que, além das diferenças comportamentais observadas em ratas virgens, a MCPdl de fêmeas estaria estruturalmente e quimicamente preparada para integrar tanto a resposta defensiva quanto os cuidados maternos.

Estudos de neuroimagem também revelam que a conectividade da MCP com o hipotálamo e a amígdala difere entre sexos, sugerindo impacto não só na percepção da dor, mas também em respostas emocionais e defensivas (Gecse et al., 2021). Revisões apontam a MCP como uma das regiões encefálicas com maior variação sexual em número celular, volume e estrutura sináptica (Conklin; Polemics, 1997), influenciada pelos esteroides sexuais ao longo do desenvolvimento (Buwalda; Koolhaas; De Boer, 2017). No entanto, faltam estudos direcionados a essas diferenças na conectividade da MCP em circuitos emocionais, reforçando a necessidade de investigações futuras.

Os resultados do presente estudo mostram que a ativação dos receptores NMDA na MCPdl gera respostas defensivas imediatas sexo-dependentes. No entanto, o protocolo usado no Experimento 1 não gerou um aprendizado aversivo robusto, sugerindo limitações metodológicas. Por isso, o Experimento 2 utilizou um protocolo mais consolidado para avaliar se mudanças no condicionamento influenciam a sensibilidade à manipulação da MCPdl e fortalecem as respostas condicionadas.

4.2 COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO POR ESTIMULAÇÃO GLUTAMATÉRGICA DA MCPdl

Os resultados deste estudo indicam que a forma de administração do NMDA na MCPdl influencia a expressão das respostas defensivas durante o condicionamento aversivo olfatório. O Protocolo 2, que envolve manipulação e contenção manual dos animais antes da exposição ao EC, parece facilitar a formação da memória traumática, ao contrário do Protocolo 1, no qual a manipulação e a contenção foram rápidas.

O Protocolo 1 aumentou a sensibilidade para detecção de respostas defensivas à microinjeção de NMDA na MCPdl, especialmente durante a sessão de condicionamento, permitindo uma expressão mais robusta desses comportamentos. No entanto, embora a administração de NMDA durante a exposição ao EC tenha intensificado a resposta imediata, esse protocolo não parece fortalecer a codificação da memória de longo prazo. Hoffman e colaboradores (2014) sugerem que a intensidade do estresse desempenha um papel fundamental na retenção da memória traumática, o que pode explicar o nosso resultado.

O Protocolo 2 gerou a formação de memória associativa em machos, representado pelo aumento de respostas defensivas na sessão de teste. Estudos demonstram que a exposição a estressores agudos pode modular a memória traumática, potencializando-a em contextos

diretamente relacionados ao estímulo estressor (Inoue et al., 2017; Schneider et al., 2014). No presente trabalho, a contenção manual no Protocolo 2 pode ter atuado como um fator estressor adicional, modulando circuitos encefálicos associados ao aprendizado aversivo (Souza et al., 2014). Evidências sugerem que alterações na transmissão inibitória na amígdala podem intensificar a memória traumática após a exposição ao estresse (Rodriguez Manzanares et al., 2005), o que pode explicar a maior retenção da memória observada no Protocolo 2.

Além disso, estudos demonstram que a exposição a condições estressantes induz alterações neurobiológicas associadas ao aumento da expressão e retenção da memória traumática (Giachero et al., 2019; Souza; Carobrez, 2016). A estimulação da MCPdl antes da reativação de uma memória traumática previamente adquirida potencializa a sua retenção e a expressão de comportamentos defensivos (Giachero et al., 2019; Souza; Carobrez, 2016). Além disso, a inibição da MCPdl com muscimol antes da exposição ao estresse preveniu esse aumento, enquanto a administração após o evento estressor não teve efeito na memória traumática (Giachero et al., 2019). Esse achado sugere que a MCPdl interfere no efeito do estresse sobre a memória traumática (Zoladz et al., 2023).

Além disso, a estrutura do ambiente experimental também influencia a expressão da resposta condicionada (Mitchell et al., 2022; Portugal et al., 2012). As caixas para a sessão de condicionamento foram diferentes entre os protocolos, sendo a Caixa A (Protocolo 1) mais espaçosa. Estudos demonstram que condições experimentais, como o tamanho da caixa experimental e a presença de outros estímulos sensoriais, podem alterar a associação entre EC e resposta defensiva (Hegoburu et al., 2011; Mitchell et al., 2022; Pavesi; Canteras; Carobrez, 2011). Assim, a interação entre timing da injeção e condições experimentais deve ser levada em consideração para evitar potenciais vieses interpretativos.

A ampliação da resposta de avaliação de risco em fêmeas submetidas ao Protocolo 2 reforça as diferenças sexuais previamente documentadas na avaliação ativa de perigo (Gruene et al., 2015; Mitchell et al., 2022). Enquanto machos tendem a favorecer o congelamento como estratégia passiva, fêmeas combinam comportamentos defensivos e de avaliação de risco em proporções maiores (Blanchard et al., 1991; Greiner et al., 2018). Esse padrão sugere que, sob condições de maior estresse pré-exposição (contenção, manipulação), fêmeas mobilizam circuitos de vigilância contextual e avaliação de risco dependentes de MCPdl de modo mais acentuado que machos, porém sem gerar uma memória associativa robusta.

Por fim, a ausência de fortalecimento da memória aversiva no Protocolo 1, apesar do aumento de comportamentos defensivos imediatos, indica que a simples excitação

glutamatérgica da MCPdl associado ao EC não basta para consolidar traços duradouros de condicionamento. Isso alinha-se com evidências de que o timing da intervenção e o contexto emocional, como a intensidade e natureza do estressor, são cruciais para a plasticidade sináptica em circuitos de defesa (Conway et al., 2024).

4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ANTAGONISTA AP5 DE RECEPTORES NMDA NA MCPDL NO CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO POR CHOQUE NAS PATAS

Esse estudo também buscou entender o efeito do antagonismo dos receptores NMDA na MCPdl para o condicionamento aversivo olfatório por choque nas patas, objetivando compreender a participação desses receptores para o condicionamento com um estímulo naturalmente aversivo que envolve nocicepção. O tratamento com AP5 na MCPdl gerou respostas contexto- e sexo-dependentes. Nos machos, o bloqueio dos receptores NMDA dificultou a formação da memória associativa traumática, evidenciado pela diminuição de respostas defensivas na sessão de teste. No entanto, o tratamento com AP5 sem pareamento com choque, facilitou a formação dessa memória. Esse efeito não foi observado nas fêmeas. No mais, houve aumento da expressão da resposta defensiva na sessão de condicionamento frente ao EC, o que sugere que o AP5 afetou os processos de aquisição e consolidação da memória, mas não a resposta imediata e percepção do choque.

O AP5, um antagonista seletivo competitivo dos receptores NMDA, tem sido utilizado para investigar a influência da transmissão glutamatérgica nos processos de aprendizagem aversiva, particularmente na MCP (Back; Carobrez, 2018; Nascimento Häckl; Carobrez, 2007; Pavesi; Canteras; Carobrez, 2011; Souza; Carobrez, 2016). O bloqueio dos receptores NMDA pelo AP5 tem efeitos distintos sobre diferentes fases do condicionamento aversivo. Foi visto que a administração do AP5 na amígdala e no hipocampo prejudica a aquisição e consolidação da memória traumática, sem interferir a expressão da resposta condicionada (Campeau; Miserendino; Davis, 1992; Roesler et al., 2000; Schenberg; Menezes Oliveira, 2008). O papel dos receptores NMDA na consolidação da memória também é evidenciada por alterações na fosforilação da proteína CREB na amígdala, o que sugere uma base molecular para a interferência do AP5 no aprendizado associativo (Coelho et al., 2013).

A administração do AP5 na MCPd interfere na aquisição de memórias traumáticas, reduzindo a expressão de respostas defensivas condicionadas durante o teste do

condicionamento aversivo (Pavesi; Canteras; Carobrez, 2011). Essa observação é consistente com estudos demonstrando que a manipulação da sinalização glutamatérgica na MCP modula os comportamentos defensivos e de avaliação de risco (Guimarães et al., 1991). A distribuição diferencial dos receptores NMDA nas colunas funcionais da MCP também sugere que o AP5 pode impactar diferentes componentes dos circuitos defensivos, influenciando a integração de respostas autonômicas e motoras a ameaças (Bittencourt et al., 2004).

No contexto da modulação da dor, o AP5 em regiões medulares reduz a transmissão nociceptiva, contribuindo para um efeito antinociceptivo (Xu et al., 2007), sugerindo um papel importante dos receptores NMDA na sensibilização central da dor. Porém, esse antagonismo na MCP, não parece surtir o mesmo efeito. Além disso, De Abreu e colaboradores (2015) relataram que a infusão de antagonistas glutamatérgicos em regiões conectadas à MCP reduz o aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca induzido pela ativação da MCP_l e MCP_{dl}, reforçando a interação entre os circuitos de defesa e controle autonômico.

Essa dissociação entre a preservação da resposta sensorial ao EI (choque nas patas) e a perturbação da resposta condicionada corrobora a hipótese de que a MCP_{dl} está envolvida de maneira mais específica na integração e modulação de circuitos mnemônicos do que na percepção direta da dor ou ameaça imediata. Apesar disso, a codificação do valor aversivo do estímulo e a formação da associação entre o contexto ou pista (EC) e o EI parecem envolver a interação entre múltiplas colunas da MCP, especialmente I e VI. Estudos demonstram que, após o pareamento do choque com um contexto ou pista, ocorre aumento da expressão de genes de atividade neuronal, como o c-Fos, nessas subregiões (Canteras; Goto, 1999), evidenciando sua ativação durante a aquisição da memória traumática. Nesse sentido, a manipulação farmacológica restrita à MCP_{dl} pode ter afetado a capacidade dessa região de participar da comunicação com áreas-chave da via para processamento de ameaças, como a amígdala, o hipotálamo e estruturas talâmicas, prejudicando a consolidação da memória traumática sem impactar diretamente a percepção do estímulo nocivo.

Além disso, o antagonismo de receptores NMDA na MCP_{dl} pode ter comprometido mecanismos de plasticidade sináptica, como a potenciação de longa duração (LTP), fundamentais para a estabilização das representações mnemônicas do evento traumático (Bazzari; Parri, 2019). Considerando que os receptores NMDA são cruciais para a indução de LTP em diversas regiões do circuito, incluindo a própria MCP, sua inibição local pode ter reduzido a eficácia das vias que sinalizam a relevância aversiva do estímulo, limitando a formação da associação EC-EI mesmo diante da experiência comportamental do choque.

Portanto, os dados do presente estudo apoiam a visão da MCP como uma estrutura integrativa e não exclusivamente motora no circuito de defesa, e sugerem que a MCPdl, por meio de sua conectividade com outras colunas da MCP e regiões límbicas, participa da codificação e expressão da memória aversiva de forma crítica. A ausência de efeitos sobre a percepção nociceptiva, aliada à modulação da resposta condicionada, reforça a ideia de que a MCPdl atua como uma ponte funcional entre a recepção de sinais aversivos e a expressão de respostas defensivas baseadas em aprendizagem.

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que a MCPdl tem papel relevante na expressão de respostas defensivas e na modulação do condicionamento aversivo, com participação direta dos receptores NMDA. A comparação entre protocolos mostrou que pequenas alterações metodológicas podem recrutar circuitos distintos, impactando a magnitude das respostas. Além disso, tanto a estimulação quanto o bloqueio glutamatérgico da MCPdl revelaram diferenças sexuais consistentes, indicando que machos e fêmeas processam informações aversivas por vias neurobiológicas distintas. Os dados apresentados reforçam a hipótese de que a MCPdl possui um papel importante na mediação de respostas defensivas e que o sexo biológico afeta sua atuação. Assim, este estudo fornece subsídios relevantes para futuras investigações que possam empregar abordagens complementares, como análises neurofisiológicas e moleculares, a fim de aprofundar a compreensão sobre os mecanismos neurais subjacentes às respostas defensivas e às diferenças sexuais no processamento de experiências emocionais negativas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, Daniele C.; GUIMARÃES, Francisco Silveira. 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. **Journal of Neuroscience Research**, 2009.

ALBIN, Roger L. *et al.* Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. **Neuroscience Letters**, v. 118, n. 1, p. 112–115, out. 1990.

ANDERSON, David J. Circuit modules linking internal states and social behaviour in flies and mice. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 11, p. 692–704, nov. 2016.

ANDERSON, David J.; ADOLPHS, Ralph. A Framework for Studying Emotions across Species. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 187–200, mar. 2014.

ANSTEY, Natasha *et al.* Imbalance of Flight–freeze Responses and Their Cellular Correlates in the Nlgn3–/Y Rat Model of Autism. **Molecular Autism**, 2022.

ARCHER, John. Rodent sex differences in emotional and related behavior. **Behavioral Biology**, v. 14, n. 4, p. 451–479, ago. 1975.

ASOK, Arun *et al.* A Multisensory Circuit for Gating Intense Aversive Experiences. 2021.

AUGUSTSSON, Hanna. **Ethoexperimental studies of behaviour in wild and laboratory mice: risk assessment, emotional reactivity and animal welfare**. Uppsala: Dept. of Large Animal Clinical Sciences, Swedish Univ. of Agricultural Sciences, 2004.

BACK, Franklin P.; CAROBREZ, Antonio P. Periaqueductal gray glutamatergic, cannabinoid and vanilloid receptor interplay in defensive behavior and aversive memory formation. **Neuropharmacology**, v. 135, p. 399–411, jun. 2018.

BAEK, Ji Hyeong *et al.* The Role of Glutamine Homeostasis in Emotional and Cognitive Functions. **International Journal of Molecular Sciences**, 2024.

BALE, Tracy L.; EPPERSON, C. Neill. Sex as a Biological Variable: Who, What, When, Why, and How. **Neuropsychopharmacology**, 2016.

BANDLER, Richard *et al.* Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. **Brain Research Bulletin**, v. 53, n. 1, p. 95–104, set. 2000.

BAO, Lili *et al.* Decoding the language of fear: Unveiling objective and subjective indicators in rodent models through a systematic review and meta-analysis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 157, p. 105537, fev. 2024.

BARNES, Thomas R. E.; PATON, Carol. Antipsychotic Polypharmacy in Schizophrenia: Benefits and Risks. **CNS Drugs**, v. 25, n. 5, p. 383–399, maio 2011.

BARRETT, Douglas W.; GONZALEZ-LIMA, F. Prefrontal-limbic Functional Connectivity during Acquisition and Extinction of Conditioned Fear. **Neuroscience**, v. 376, p. 162–171, abr. 2018.

BARRETT, Lisa Feldman. The theory of constructed emotion: an active inference account of interoception and categorization. **Social Cognitive and Affective Neuroscience**, p. nsw154, 19 out. 2016.

BARRETT, Lisa Feldman. **How Emotions Are Made: The Secret Life of the Brain**. 1. ed. New York: First Mariner Books, 2018.

BAUER-WU, Susan *et al.* Experienced Meditators, Cancer Survivors, and Matched Controls Assemble Different Neural Resources to Process Emotion. 2017.

BAYER, Hugo; BERTOGLIO, Leandro Jose. Infralimbic cortex controls fear memory generalization and susceptibility to extinction during consolidation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 15827, 28 set. 2020.

BAZZARI, Amjad; PARRI, H. Neuromodulators and Long-Term Synaptic Plasticity in Learning and Memory: A Steered-Glutamatergic Perspective. **Brain Sciences**, v. 9, n. 11, p. 300, 31 out. 2019.

BEERY, Annaliese K.; ZUCKER, Irving. Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 565–572, jan. 2011.

BERTOGLIO, Leandro J.; ZANGROSSI, Hélio. Involvement of Dorsolateral Periaqueductal Gray N-Methyl-D-Aspartic Acid Glutamate Receptors in the Regulation of Risk Assessment and Inhibitory Avoidance Behaviors in the Rat Elevated T-Maze. **Behavioural Pharmacology**, 2006.

BI, Linlin *et al.* Infralimbic Endothelin1 Is Critical for the Modulation of Anxiety-Like Behaviors. **Molecular Neurobiology**, 2015.

BITTENCOURT, A. S. *et al.* Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-METHYL-d-aspartic acid glutamate receptors. **Neuroscience**, v. 125, n. 1, p. 71–89, jan. 2004.

BLANCHARD, D. Caroline *et al.* Sex effects in defensive behavior: Baseline differences and drug interactions. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 15, n. 4, p. 461–468, dez. 1991.

BLANCHARD, D. Caroline. Sex, defense, and risk assessment: Who could ask for anything more? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 144, p. 104931, jan. 2023.

BLANCHARD, D. Caroline; BLANCHARD, Robert J.; GRIEBEL, Guy. Defensive Responses to Predator Threat in the Rat and Mouse. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 30, n. 1, jan. 2005.

BLANCHARD, Robert J. *et al.* Defense system psychopharmacology: An ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 58, n. 1–2, p. 155–165, dez. 1993.

BLANCHARD, Robert J.; BLANCHARD, D. Caroline. Crouching as an index of fear. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 67, n. 3, p. 370–375, 1969.

BLANCHARD, Robert J.; BLANCHARD, D. Caroline. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **Journal of Comparative Psychology**, v. 103, n. 1, p. 70–82, 1989.

BLANCHARD, Robert J.; FLANNELLY, Kevin J.; BLANCHARD, D. Caroline. Defensive behaviors of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. **Journal of Comparative Psychology**, v. 100, n. 2, p. 101–107, 1986.

BOBECK, Erin N.; MCNEAL, Amy L.; MORGAN, Michael M. Drug Dependent Sex-Differences in Periaqueductal Gray Mediated Antinociception in the Rat. **Pain**, 2009.

BOINON, Lisa *et al.* Conditional Knockout of CRMP2 in Neurons, but Not Astrocytes, Disrupts Spinal Nociceptive Neurotransmission to Control the Initiation and Maintenance of Chronic Neuropathic Pain. **Pain**, 2021.

BOLLES, Robert C. Species-specific defense reactions and avoidance learning. **Psychological Review**, v. 77, n. 1, p. 32–48, jan. 1970.

BOLLES, Robert C.; FANSELOW, Michael S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 3, n. 2, p. 291–301, jun. 1980.

BOSCH, Oliver J. *et al.* Brain Oxytocin Correlates With Maternal Aggression: Link to Anxiety. **Journal of Neuroscience**, 2005.

BURKE, Andrew R.; MICZEK, Klaus A. Escalation of cocaine self-administration in adulthood after social defeat of adolescent rats: role of social experience and adaptive coping behavior. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 16, p. 3067–3079, ago. 2015.

BUTLER, Ryan K. *et al.* Fear-Induced Suppression of Nociceptive Behaviour and Activation of Akt Signalling in the Rat Periaqueductal Grey: Role of Fatty Acid Amide Hydrolase. **Journal of Psychopharmacology**, 2011.

BUWALDA, Bauke; KOOLHAAS, Jaap M.; DE BOER, Sietse F. Trait Aggressiveness Does Not Predict Social Dominance of Rats in the Visible Burrow System. **Physiology & Behavior**, 2017.

CAMPEAU, Serge; MISERENDINO, Mindy J. D.; DAVIS, Michael. Intra-Amygdala Infusion of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist AP5 Blocks Acquisition but Not Expression of Fear-Potentiated Startle to an Auditory Conditioned Stimulus. **Behavioral Neuroscience**, 1992.

CANTERAS, Newton S.; GOTO, Marina. Fos-Like Immunoreactivity in the Periaqueductal Gray of Rats Exposed to a Natural Predator. **Neuroreport**, 1999.

CANTERAS, Newton S.; PAVESI, Eloisa; CAROBREZ, Antonio P. Olfactory instruction for fear: neural system analysis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, 6 ago. 2015.

CAROLINE BLANCHARD, D. *et al.* Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7–8, p. 761–770, dez. 2001.

COELHO, Cesar A. O. *et al.* Hippocampal NMDA Receptor Blockade Impairs CREB Phosphorylation in Amygdala After Contextual Fear Conditioning. **Hippocampus**, 2013.

COLON, Lorianna *et al.* Sexual differentiation of contextual fear responses. **Learning & Memory**, v. 25, n. 5, p. 230–240, maio 2018.

CONKLIN, Heather; POLEMICS, J. Brain Dimorphisms and Sex: A Review. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 10, n. 1, 1997.

CONWAY, Mark *et al.* Perceptual Constancy for an Odor Is Acquired Through Changes in Primary Sensory Neurons. **Science Advances**, 2024.

COPPINI, Sara *et al.* Experiments on Real-Life Emotions Challenge Ekman's Model. **Scientific Reports**, 2023.

COWEN, Alan S. *et al.* What music makes us feel: At least 13 dimensions organize subjective experiences associated with music across different cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 4, p. 1924–1934, 28 jan. 2020.

CRAWFORD, Mary; MASTERSON, Fred A. Species-specific defense reactions and avoidance learning: An evaluative review. **The Pavlovian Journal of Biological Science**, v. 17, n. 4, p. 204–214, out. 1982.

CRISPIM JUNIOR, Carlos Fernando *et al.* ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. **Computers in Biology and Medicine**, v. 42, n. 2, p. 257–264, fev. 2012.

CROARKIN, Paul E. *et al.* Transcranial Magnetic Stimulation Potentiates Glutamatergic Neurotransmission in Depressed Adolescents. **Psychiatry Research Neuroimaging**, 2016.

DAY, Harriet L. L.; STEVENSON, Carl W. The neurobiological basis of sex differences in learned fear and its inhibition. **European Journal of Neuroscience**, v. 52, n. 1, p. 2466–2486, jul. 2020.

DE ABREU, A. R. *et al.* Amygdalar neuronal activity mediates the cardiovascular responses evoked from the dorsolateral periaqueductal gray in conscious rats. **Neuroscience**, v. 284, p. 737–750, jan. 2015.

DE ANDRADE RUFINO, Rodrigo *et al.* The rostradorsal periaqueductal gray influences both innate fear responses and acquisition of fear memory in animals exposed to a live predator. **Brain Structure and Function**, v. 224, n. 4, p. 1537–1551, maio 2019.

DE LIMA, Miguel Antonio Xavier *et al.* The anterior cingulate cortex and its role in controlling contextual fear memory to predatory threats. **eLife**, v. 11, p. e67007, 5 jan. 2022.

DE MOLINA, A. Fernandez; HUNSPERGER, R. W. Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat. **The Journal of Physiology**, v. 160, n. 2, p. 200–213, fev. 1962.

DENG, H.; XIAO, X.; WANG, Z. Periaqueductal Gray Neuronal Activities Underlie Different Aspects of Defensive Behaviors. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 29, p. 7580–7588, 20 jul. 2016.

DJERDJAJ, Anthony *et al.* Social Affective Behaviors Among Female Rats Involve the Basolateral Amygdala and Insular Cortex. **Plos One**, 2023.

DRAGO, Filippo *et al.* Sexual Dimorphism in Passive Avoidance Behavior of Rats: Relation to Body Weight, Age, Shock Intensity and Retention Interval. **Physiology & Behavior**, 1980.

ENDRES, Thomas; FENDT, Markus. Conditioned Behavioral Responses to a Context Paired With the Predator Odor Trimethylthiazoline. **Behavioral Neuroscience**, 2007.

ESPERIDIÃO-ANTONIO, Vanderson *et al.* Neurobiology of emotions: an update. **International Review of Psychiatry**, v. 29, n. 3, p. 293–307, 4 maio 2017.

ESTES, W. K.; SKINNER, B. F. Some quantitative properties of anxiety. **Journal of Experimental Psychology**, v. 29, n. 5, p. 390–400, nov. 1941.

EVANS, Dominic A. *et al.* A synaptic threshold mechanism for computing escape decisions. **Nature**, v. 558, n. 7711, p. 590–594, jun. 2018.

FANSELOW, Michael S.; SIGMUNDI, Ronald A. Species-specific danger signals, endogenous opioid analgesia, and defensive behavior. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v. 12, n. 3, p. 301–309, 1986.

FANSELOW, Michael S.; STERLACE, Sarah R. Pavlovian Fear Conditioning. *In*: MCSWEENEY, Frances K.; MURPHY, Eric S. (Orgs.). **The Wiley Blackwell Handbook of Operant and Classical Conditioning**. 1. ed. [S.l.]: Wiley, 2014. p. 117–141.

FOILB, Allison R. *et al.* Sex differences in fear discrimination do not manifest as differences in conditioned inhibition. **Learning & Memory**, v. 25, n. 1, p. 49–53, jan. 2018.

GALEA, Liisa A. M. *et al.* Sex, Hormones and Neurogenesis in the Hippocampus: Hormonal Modulation of Neurogenesis and Potential Functional Implications. **Journal of Neuroendocrinology**, 2013.

GECSE, Kinga *et al.* Sex Differences of Periaqueductal Grey Matter Functional Connectivity in Migraine. **Frontiers in Pain Research**, v. 2, p. 767162, 30 nov. 2021.

GIACHERO, Marcelo *et al.* Inactivation of the dorsolateral periaqueductal gray matter impairs the promoting influence of stress on fear memory during retrieval. **Brain Structure and Function**, v. 224, n. 9, p. 3117–3132, dez. 2019.

GOERZEN, Dana *et al.* An MRI-Derived Neuroanatomical Atlas of the Fischer 344 Rat Brain. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6952, 24 abr. 2020.

GOLDTHWAITE, Ronald O.; COSS, Richard G.; OWINGS, Donald H. Evolutionary Dissipation of an Antisnake System: Differential Behavior By California and Arctic Ground Squirrels in Above- and Below-Ground Contexts. **Behaviour**, v. 112, n. 3–4, p. 246–268, 1990.

GRAHAM, Bronwyn M.; MILAD, Mohammed R. Blockade of Estrogen by Hormonal Contraceptives Impairs Fear Extinction in Female Rats and Women. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 4, p. 371–378, fev. 2013.

GREENE, Abigail S. *et al.* Why is everyone talking about brain state? **Trends in Neurosciences**, v. 46, n. 7, p. 508–524, jul. 2023.

GREINER, Eliza M. *et al.* Sex differences in fear regulation and reward seeking behaviors in a fear-safety-reward discrimination task. , 13 ago. 2018. Disponível em: <<http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/390377>>. Acesso em: 8 jul. 2024

GROSS, Cornelius T.; CANTERAS, Newton Sabino. The many paths to fear. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 651–658, set. 2012.

GROSS, James J.; FELDMAN BARRETT, Lisa. Emotion Generation and Emotion Regulation: One or Two Depends on Your Point of View. **Emotion Review**, v. 3, n. 1, p. 8–16, jan. 2011.

GRUENE, Tina M. *et al.* Sexually divergent expression of active and passive conditioned fear responses in rats. **eLife**, v. 4, p. e11352, 14 nov. 2015.

GRYKSA, Katharina *et al.* Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 7 Controls Maternal Care, Maternal Motivation and Maternal Aggression in Mice. **Genes Brain & Behavior**, 2019.

GUIMARÃES, F. S. *et al.* Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. **Psychopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 91–94, jan. 1991.

HADJIPAVLOU, George *et al.* Determining anatomical connectivities between cortical and brainstem pain processing regions in humans: A diffusion tensor imaging study in healthy controls. **Pain**, v. 123, n. 1, p. 169–178, jul. 2006.

HAGER, Torben *et al.* Display of Individuality in Avoidance Behavior and Risk Assessment of Inbred Mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2014.

HAKIM, Marziah *et al.* Pavlovian Olfactory Fear Conditioning: Its Neural Circuitry and Importance for Understanding Clinical Fear-Based Disorders. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, p. 221, 19 set. 2019.

HEGOBURU, Chloé *et al.* The RUB Cage: Respiration–Ultrasonic Vocalizations–Behavior Acquisition Setup for Assessing Emotional Memory in Rats. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 5, 2011.

HOFFMAN, Ann N. *et al.* Chronic Stress Disrupts Fear Extinction and Enhances Amygdala and Hippocampal Fos Expression in an Animal Model of Post-Traumatic Stress Disorder. **Neurobiology of Learning and Memory**, 2014.

HUBBARD, D. T. *et al.* Development of defensive behavior and conditioning to cat odor in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 80, n. 4, p. 525–530, jan. 2004.

IMHOF, J. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. **Behavioural Brain Research**, v. 56, n. 2, p. 177–180, 30 set. 1993.

INOUE, Ran *et al.* Glucocorticoid Receptor-Mediated Amygdalar Metaplasticity Underlies Adaptive Modulation of Fear Memory by Stress. 2017.

JANICKE, Tim *et al.* Darwinian sex roles confirmed across the animal kingdom. **Science Advances**, v. 2, n. 2, p. e1500983, 5 fev. 2016.

JOHANSEN, Joshua P. *et al.* Molecular Mechanisms of Fear Learning and Memory. **Cell**, v. 147, n. 3, p. 509–524, out. 2011.

JOHANSEN, Joshua P. *et al.* Controlling the Elements: An Optogenetic Approach to Understanding the Neural Circuits of Fear. **Biological Psychiatry**, v. 71, n. 12, p. 1053–1060, jun. 2012.

KANDEL, Eric R. The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1030–1038, 2 nov. 2001.

KEISER, Ashley A. *et al.* Sex Differences in Context Fear Generalization and Recruitment of Hippocampus and Amygdala during Retrieval. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 2, p. 397–407, jan. 2017.

KIM, Eun Joo *et al.* Dorsal Periaqueductal Gray-Amygdala Pathway Conveys Both Innate and Learned Fear Responses in Rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2013.

KIM, Jeansok J.; JUNG, Min Whan. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 2, p. 188–202, jan. 2006.

KINCHESKI, Grasielle C. *et al.* The Dorsolateral Periaqueductal Gray and Its Role in Mediating Fear Learning to Life Threatening Events. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e50361, 28 nov. 2012.

KINKEAD, Richard. The Periaqueductal Grey and Its Role in Respiratory Regulation. **Acta Physiologica**, 2014.

KINSLEY, Craig H.; AMORY-MEYER, E. Why the Maternal Brain? **Journal of Neuroendocrinology**, 2011.

KINSLEY, Craig H.; BRIDGES, Robert S. Morphine Treatment and Reproductive Condition Alter Olfactory Preferences for Pup and Adult Male Odors in Female Rats. **Developmental Psychobiology**, 1990.

KOKRAS, Nikolaos; DALLA, Christina. Sex Differences in Animal Models of Psychiatric Disorders. **British Journal of Pharmacology**, 2014.

KONTIĆ, Marina Zarić *et al.* Prolonged Alprazolam Treatment Alters Components of Glutamatergic Neurotransmission in the Hippocampus of Male Wistar Rats—The

Neuroadaptive Changes Following Long-Term Benzodiazepine (Mis)Use. **Pharmaceuticals**, 2023.

KROON, Juliana A. V.; CAROBREZ, Antonio Pádua. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: Effects of midazolam, propranolol or scopolamine. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 91, n. 1, p. 32–40, jan. 2009.

KURUPPATH, Praveen. **Integrating Optogenetic Stimulation of Olfactory Bulb Glomeruli with Foot Shock Fear Conditioning: A Robust Method for Investigating Olfactory-based Fear Conditioning.** , 29 mar. 2024. Disponível em: <<http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.03.25.586672>>. Acesso em: 27 jun. 2024

LA-VU, Mimi Q. *et al.* Sparse Genetically Defined Neurons Refine the Canonical Role of Periaqueductal Gray Columnar Organization. **Elife**, 2022.

LAWRENSON, Charlotte L. *et al.* Cerebellar Modulation of Memory Encoding in the Periaqueductal Grey and Fear Behaviour. **Elife**, 2022.

LEDOUX, Je *et al.* The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. **The Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 4, p. 1062–1069, 1 abr. 1990.

LEDOUX, Joseph. Rethinking the Emotional Brain. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 653–676, fev. 2012.

LEDOUX, Joseph E.; PINE, Daniel S. Using Neuroscience to Help Understand Fear and Anxiety: A Two-System Framework. **American Journal of Psychiatry**, v. 173, n. 11, p. 1083–1093, nov. 2016.

LEFLER, Yaara; CAMPAGNER, Dario; BRANCO, Tiago. The Role of the Periaqueductal Gray in Escape Behavior. **Current Opinion in Neurobiology**, 2020.

LI, Cheng-Ta; YANG, Kai-Chun; LIN, Wei-Chen. Glutamatergic Dysfunction and Glutamatergic Compounds for Major Psychiatric Disorders: Evidence From Clinical Neuroimaging Studies. **Frontiers in Psychiatry**, 2019.

LI, Yi *et al.* Hypothalamic Circuits for Predation and Evasion. **Neuron**, v. 97, n. 4, p. 911–924.e5, fev. 2018.

LINNMAN, Clas *et al.* Sex similarities and differences in pain-related periaqueductal gray connectivity. **Pain**, v. 153, n. 2, p. 444–454, fev. 2012.

LLORENTE-BERZAL, Alvaro *et al.* Sexually Dimorphic Expression of Fear-conditioned Analgesia in Rats and Associated Alterations in the Endocannabinoid System in the Periaqueductal Grey. **Neuroscience**, v. 480, p. 117–130, jan. 2022.

LONSTEIN, Joseph S.; STERN, Judith M. Role of the Midbrain Periaqueductal Gray in Maternal Nurture and Aggression: c-Fos and Electrolytic Lesion Studies in Lactating Rats. **Journal of Neuroscience**, 1997.

LOWERY-GIONTA, Emily G. *et al.* GABA neurons of the ventral periaqueductal gray area modulate behaviors associated with anxiety and conditioned fear. **Brain Structure and Function**, v. 223, n. 8, p. 3787–3799, nov. 2018.

LOYD, Dayna R.; MURPHY, Anne Z. The Role of the Periaqueductal Gray in the Modulation of Pain in Males and Females: Are the Anatomy and Physiology Really that Different? **Neural Plasticity**, v. 2009, p. 1–12, 2009.

LUCKHURST, Roger. The Uncanny After Freud: The Contemporary Trauma Subject and the Fiction of Stephen King. *In*: COLLINS, Jo; JERVIS, John (Orgs.). **Uncanny Modernity**. London: Palgrave Macmillan UK, 2008. p. 128–145.

MAMLOUK, Gabriella M. *et al.* Sex bias and omission in neuroscience research is influenced by research model and journal, but not reported NIH funding. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 57, p. 100835, abr. 2020.

MAREN, Stephen; QUIRK, Gregory J. Neuronal signalling of fear memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 844–852, nov. 2004.

MCCARTHY, Margaret M.; ARNOLD, Arthur P. Reframing sexual differentiation of the brain. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 677–683, jun. 2011.

MEANEY, Michael J.; STEWART, Jane. Environmental Factors Influencing the Affiliative Behavior of Male and Female Rats (*Rattus Norvegicus*). **Animal Learning & Behavior**, 1979.

MILAD, M. R. *et al.* Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. **Neuroscience**, v. 164, n. 3, p. 887–895, dez. 2009.

MITCHELL, Julia R. *et al.* Darting across space and time: parametric modulators of sex-biased conditioned fear responses. **Learning & Memory**, v. 29, n. 7, p. 171–180, jul. 2022.

MOBBS, Dean *et al.* From Threat to Fear: The Neural Organization of Defensive Fear Systems in Humans. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 39, p. 12236–12243, 30 set. 2009.

MOCHNY, Cristiane R. *et al.* Dorsolateral periaqueductal gray stimulation prior to retrieval potentiates a contextual fear memory in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 237, p. 76–81, jan. 2013.

MONTAG, Christian; PANKSEPP, Jaak. Primary Emotional Systems and Personality: An Evolutionary Perspective. **Frontiers in Psychology**, v. 8, 11 abr. 2017.

MOTTA, Simone C.; CAROBREZ, Antônio P.; CANTERAS, Newton 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, maio 2017.

MUTLUAY, Sevgi Uğur; KARATAŞ, Hülya. A Review of Glutamate and Its Receptors: Their Roles in Brain Physiology and Pathology. **Acta Medica**, 2022.

NASCIMENTO HÄCKL, Luciane Pereira; CAROBREZ, Antônio Pádua. Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 88, n. 2, p. 177–185, set. 2007.

NETZER, Florence *et al.* Brain Circuits Mediating Baroreflex Bradycardia Inhibition in Rats: An Anatomical and Functional Link Between the Cuneiform Nucleus and the Periaqueductal Grey. **The Journal of Physiology**, 2011.

NUNES-DE-SOUZA, Ricardo Luiz *et al.* Role of Nitric Oxide in the Periaqueductal Gray in Defensive Behavior in Mice: Influence of Prior Local N-Methyl-D-Aspartate Receptor Activation and Aversive Condition. **Psychology & Neuroscience**, 2010.

OTTO, Tim; COUSENS, Graham; HERZOG, Christopher. Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. **Behavioural Brain Research**, v. 110, n. 1–2, p. 119–128, jun. 2000.

PANKSEPP, Jaak. The cross-mammalian neurophenomenology of primal emotional affects: From animal feelings to human therapeutics. **Journal of Comparative Neurology**, v. 524, n. 8, p. 1624–1635, jun. 2016.

PANTELIS, Christos; BARNES, Thomas R. E.; NELSON, Hazel E. Is the Concept of Frontal–Subcortical Dementia Relevant to Schizophrenia? **British Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 4, p. 442–460, abr. 1992.

PAVESI, Eloisa; CANTERAS, Newton S.; CAROBREZ, Antônio P. Acquisition of Pavlovian Fear Conditioning Using β -Adrenoceptor Activation of the Dorsal Premammillary Nucleus as an Unconditioned Stimulus to Mimic Live Predator-Threat Exposure. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 5, p. 926–939, abr. 2011.

PAVLOV, Ivan P. Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. **Annals of neurosciences**, v. 17, n. 3, 1 jun. 2010.

PAWLUSKI, Jodi L.; GALEA, Liisa A. M. Hippocampal Morphology Is Differentially Affected by Reproductive Experience in the Mother. **Journal of Neurobiology**, 2005.

PEREIRA, Erlick A. C. *et al.* Ventral periaqueductal grey stimulation alters heart rate variability in humans with chronic pain. **Experimental Neurology**, v. 223, n. 2, p. 574–581, jun. 2010.

PORTUGAL, George S. *et al.* Developmental Effects of Acute, Chronic, and Withdrawal From Chronic Nicotine on Fear Conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, 2012.

POULOS, Andrew M. *et al.* Conditioning- and time-dependent increases in context fear and generalization. **Learning & Memory**, v. 23, n. 7, p. 379–385, jul. 2016.

Psicose (Psycho). Universal Pictures, , 16 jun. 1960.

PYEON, Gyeong Hee *et al.* Conditioned Flight Response in Female Rats to Naturalistic Threat Is Estrous-Cycle Dependent. **Scientific Reports**, 2023.

RECHLIN, Rebecca K. *et al.* An analysis of neuroscience and psychiatry papers published from 2009 and 2019 outlines opportunities for increasing discovery of sex differences. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 2137, 19 abr. 2022.

REIS, Fernando M. C. V. *et al.* Orchestration of innate and conditioned defensive actions by the periaqueductal gray. **Neuropharmacology**, v. 228, p. 109458, maio 2023.

RESSLER, Kerry J. Translating Across Circuits and Genetics Toward Progress in Fear- and Anxiety-Related Disorders. **American Journal of Psychiatry**, v. 177, n. 3, p. 214–222, 1 mar. 2020.

RICHARDSON, R. Extinction of Conditioned Odor Potentiation of Startle. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 78, n. 2, p. 426–440, set. 2002.

RODRIGUEZ MANZANARES, Pablo Andrés *et al.* Previous Stress Facilitates Fear Memory, Attenuates GABAergic Inhibition, and Increases Synaptic Plasticity in the Rat Basolateral Amygdala. **Journal of Neuroscience**, 2005.

ROESLER, Rafael *et al.* Infusions of AP5 Into the Basolateral Amygdala Impair the Formation, but Not the Expression, of Step-Down Inhibitory Avoidance. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2000.

SCHENBERG, Eduardo Ekman; MENEZES OLIVEIRA, Maria Gabriela. Effects of Pre or Posttraining Dorsal Hippocampus D-AP5 Injection on Fear Conditioning to Tone, Background, and Foreground Context. **Hippocampus**, 2008.

SCHNEIDER, Allen M. *et al.* Stress-Dependent Opioid and Adrenergic Modulation of Newly Retrieved Fear Memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, 2014.

SCHWEINFURTH, Manon K. The social life of Norway rats (*Rattus norvegicus*). **eLife**, v. 9, p. e54020, 9 abr. 2020.

SHANSKY, Rebecca M.; WOOLLEY, Catherine S. Considering Sex as a Biological Variable Will Be Valuable for Neuroscience Research. **The Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 47, p. 11817–11822, 23 nov. 2016.

SIGNORET-GENEST, J  r  my *et al.* Integrated cardio-behavioral responses to threat define defensive states. **Nature Neuroscience**, v. 26, n. 3, p. 447–457, mar. 2023.

SOUZA, Rimenez R. *et al.* Paradoxical mineralocorticoid receptor-mediated effect in fear memory encoding and expression of rats submitted to an olfactory fear conditioning task. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 201–211, abr. 2014.

SOUZA, Rimenez R.; CAROBREZ, Antonio P. Acquisition and expression of fear memories are distinctly modulated along the dorsolateral periaqueductal gray axis of rats exposed to predator odor. **Behavioural Brain Research**, v. 315, p. 160–167, dez. 2016.

STEMPEL, A. Vanessa. A conserved brainstem region for instinctive behaviour control: The vertebrate periaqueductal gray. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 86, p. 102878, jun. 2024.

SUKIKARA, Marcia Harumi *et al.* A Role for the Periaqueductal Gray in Switching Adaptive Behavioral Responses. **Journal of Neuroscience**, 2006.

TOVOTE, Philip *et al.* Dissociation of Temporal Dynamics of Heart Rate and Blood Pressure Responses Elicited by Conditioned Fear but Not Acoustic Startle. **Behavioral Neuroscience**, v. 119, n. 1, p. 55–65, 2005.

TOVOTE, Philip *et al.* Midbrain circuits for defensive behaviour. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 206–212, 9 jun. 2016.

TOVOTE, Philip; FADOK, Jonathan Paul; LÜTHI, Andreas. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 317–331, jun. 2015.

TRASK, Sydney *et al.* Decreased cued fear discrimination learning in female rats as a function of estrous phase. **Learning & Memory**, v. 27, n. 6, p. 254–257, jun. 2020.

VAN DAM, Debby *et al.* Spatial learning, contextual fear conditioning and conditioned emotional response in *Fmr1* knockout mice. **Behavioural Brain Research**, v. 117, n. 1–2, p. 127–136, dez. 2000.

VÁZQUEZ-LEÓN, Priscila *et al.* Defensive and Emotional Behavior Modulation by Serotonin in the Periaqueductal Gray. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 43, n. 4, p. 1453–1468, maio 2023.

VILLALON, Stephanie A. *et al.* Impacts of Social Isolation Stress in Safety Learning and the Structure of Defensive Behavior During a Spatial-Based Learning Task Involving Thermal Threat. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2024.

VYTAL, Katherine; HAMANN, Stephan. Neuroimaging Support for Discrete Neural Correlates of Basic Emotions: A Voxel-Based Meta-Analysis. **Journal of Cognitive Neuroscience**, 2010.

WANG, Li; CHEN, Irene Z.; LIN, Dayu. Collateral Pathways from the Ventromedial Hypothalamus Mediate Defensive Behaviors. **Neuron**, v. 85, n. 6, p. 1344–1358, mar. 2015.

WATSON, John B.; RAYNER, Rosalie. Conditioned emotional reactions. **Journal of Experimental Psychology**, v. 3, n. 1, p. 1–14, fev. 1920.

WATSON, Thomas C. *et al.* Neural Correlates of Fear in the Periaqueductal Gray. **Journal of Neuroscience**, 2016.

WEIGAND, Doreen; MICHAEL, Lars; SCHULZ, Hartmut. When sleep is perceived as wakefulness: an experimental study on state perception during physiological sleep. **Journal of Sleep Research**, v. 16, n. 4, p. 346–353, dez. 2007.

WHISSELL, Paul D.; TOHYAMA, Sarasa; MARTIN, Loren J. The Use of DREADDs to Deconstruct Behavior. **Frontiers in Genetics**, v. 7, 17 maio 2016.

WILLIAMS, Stuart A. *et al.* Hippocampal Disinhibition Reduces Contextual and Elemental Fear Conditioning While Sparing the Acquisition of Latent Inhibition. **eneuro**, v. 9, n. 1, p. ENEURO.0270-21.2021, jan. 2022.

XU, Mei *et al.* NMDA Receptor-Mediated Activation of Medullary Pro-Nociceptive Neurons Is Required for Secondary Thermal Hyperalgesia. **Pain**, 2007.

YEH, Li-Feng; OZAWA, Takaaki; JOHANSEN, Joshua P. Functional organization of the midbrain periaqueductal gray for regulating aversive memory formation. **Molecular Brain**, v. 14, n. 1, p. 136, dez. 2021.

YU, Waylin *et al.* Periaqueductal gray/dorsal raphe dopamine neurons contribute to sex differences in pain-related behaviors. **Neuron**, v. 109, n. 8, p. 1365- 1380.e5, abr. 2021.

ZANOVELI, Janaina M.; NOGUEIRA, Regina L.; ZANGROSSI, Hédio. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. **European Journal of Pharmacology**, v. 473, n. 2–3, p. 153–161, jul. 2003.

ZEIDAN, Mohamed A. *et al.* Estradiol Modulates Medial Prefrontal Cortex and Amygdala Activity During Fear Extinction in Women and Female Rats. **Biological Psychiatry**, v. 70, n. 10, p. 920–927, nov. 2011.

ZHU, Lei *et al.* Memory reconsolidation and extinction of fear conditioning induced different Arc/Arg3.1 expression. **NeuroReport**, v. 29, n. 12, p. 1036–1045, 15 ago. 2018.

ZOLADZ, Phillip R. *et al.* Pre-Learning Stress That Is Temporally Removed From Acquisition Impairs Fear Learning. **Biology**, 2023.

7 APÊNDICES

7.1 APÊNDICE A – DADOS ESTATÍSTICOS BÁSICOS

Tabela 1 – Dados de número amostral, mediana e intervalo de confiança 95% da porcentagem de tempo de comportamentos expressos por ratos machos e fêmeas em diferentes sessões do condicionamento aversivo olfatório com estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl). Os dados representam o Protocolo 2, em que os animais estavam em livre movimento durante a microinjeção. Legenda: NDEF: comportamentos não defensivos; RISCO: comportamentos de avaliação de risco; DEF: comportamentos defensivos; ODOR: tempo no espaço próximo ao odor; ABERTO: tempo no espaço aberto; FECHADO: tempo no espaço fechado; F1: familiarização 1; IN: momento da microinjeção; PIN: pós microinjeção; F2: familiarização 2; TE: sessão de teste.

		PBS		NMDA 25		NMDA 50	
		FÊMEA	MACHO	FÊMEA	MACHO	FÊMEA	MACHO
Comp	Sessão	n = 23	n = 12	n = 9	n = 7	n = 7	n = 6
NDEF	F1	77,44 [15,63; 28,61]	81,28 [15,75; 37,74]	75,50 [7,61; 21,59]	78,17 [4,23; 14,45]	76,33 [7,67; 26,20]	81,94 [13,23; 51,98]
	IN	41,11 [26,64; 48,76]	83,89 [22,69; 54,37]	22,22 [21,27; 60,31]	0,00 [7,52; 25,69]	9,56 [12,70; 43,40]	34,28 [8,04; 31,59]
	PI	80,25 [20,61; 37,71]	76,03 [20,05; 48,05]	17,33 [15,98; 45,31]	9,36 [4,47; 15,26]	5,47 [3,19; 10,91]	44,12 [16,92; 66,49]
	F2	57,52 [5,17; 9,46]	42,97 [6,28; 15,06]	65,23 [6,36; 18,03]	42,10 [5,19; 17,73]	54,09 [6,89; 23,56]	43,61 [8,22; 32,30]
	TE	52,79 [5,90; 10,80]	43,28 [6,70; 16,06]	38,08 [5,85; 16,58]	32,27 [3,64; 12,43]	53,07 [4,49; 15,33]	29,40 [3,34; 13,14]
RISCO	F1	14,94 [6,96; 12,73]	7,33 [5,24; 12,55]	17,56 [5,69; 16,14]	14,50 [2,73; 9,32]	10,28 [4,53; 15,47]	10,78 [4,78; 18,77]
	IN	9,56 [13,95; 25,53]	7,22 [7,57; 18,14]	21,00 [14,84; 42,10]	27,89 [12,66; 43,27]	45,78 [19,13; 65,36]	28,78 [7,24; 28,43]
	PI	6,97 [9,33; 17,07]	5,46 [4,89; 11,71]	19,67 [10,11; 28,67]	11,19 [8,12; 27,75]	31,08 [11,07; 37,84]	14,71 [6,02; 23,66]
	F2	28,66 [4,16; 7,61]	27,67 [5,54; 13,29]	26,41 [3,68; 10,44]	32,79 [3,90; 13,32]	22,42 [3,21; 10,96]	28,09 [2,57; 10,11]
	TE	33,59 [4,96; 9,08]	30,85 [6,08; 14,57]	35,36 [4,65; 13,20]	38,40 [3,67; 12,55]	29,12 [2,94; 10,04]	30,82 [4,44; 17,43]
DEF	F1	0,89 [10,26; 18,77]	0,00 [7,58; 18,18]	0,00 [0,46; 1,31]	0,00 [2,10; 7,18]	0,00 [1,79; 6,11]	4,06 [2,90; 11,40]
	IN	7,00 [23,49; 42,99]	0,00 [12,60; 30,20]	15,00 [24,25; 68,77]	51,78 [16,96; 57,96]	22,00 [15,36; 52,50]	14,83 [13,88; 54,53]
	PI	3,58 [10,94; 20,03]	2,57 [13,54; 32,46]	31,42 [20,43; 57,95]	69,72 [12,40; 42,37]	33,14 [12,08; 41,26]	37,54 [10,88; 42,74]
	F2	0,00 [0,34; 0,62]	1,02 [1,20; 2,89]	0,00 [0,00; 0,00]	1,30 [5,20; 17,78]	0,00 [0,87; 2,99]	2,96 [3,96; 15,58]
	TE	0,41 [0,80; 1,46]	1,99 [2,30; 5,52]	0,24 [0,44; 1,24]	5,07 [2,67; 9,12]	0,35 [0,16; 0,55]	4,27 [4,38; 17,19]
Espaços	Sessão	FÊMEA	MACHO	FÊMEA	MACHO	FÊMEA	MACHO
ODOR	F2	17,93 [3,34; 6,10]	12,10 [4,36; 10,45]	20,77 [2,54; 7,21]	21,28 [4,07; 13,91]	16,29 [2,40; 8,19]	10,19 [5,20; 20,41]
	TE	18,95 [6,01; 11,00]	14,88 [4,83; 11,57]	19,61 [2,18; 6,18]	13,38 [3,64; 12,46]	18,79 [5,71; 19,51]	15,90 [3,98; 15,64]
ABERTO	F2	38,59 [8,39; 15,35]	34,31 [9,90; 23,72]	45,70 [5,75; 16,31]	48,94 [9,07; 30,99]	31,97 [2,69; 9,21]	60,22 [13,23; 51,98]
	TE	36,01 [6,02; 11,02]	24,41 [6,99; 16,75]	37,35 [6,41; 18,17]	31,76 [6,38; 21,79]	35,45 [5,15; 17,60]	31,51 [12,05; 47,35]
FECHADO	F2	37,22 [9,32; 17,06]	40,71 [14,67; 35,15]	32,16 [6,61; 18,74]	32,04 [9,24; 31,58]	36,81 [5,33; 18,22]	23,05 [13,29; 52,20]
	TE	40,44 [10,44; 19,10]	60,82 [11,18; 26,81]	31,78 [5,36; 15,19]	48,01 [9,55; 32,62]	41,68 [10,30; 35,21]	44,78 [11,65; 45,76]
Deltas	Sessão	FÊMEA	MACHO	FÊMEA	MACHO	FÊMEA	MACHO
NDEF	TE-F2	-5,52 [7,24; 13,24]	1,67 [9,56; 22,90]	-21,80 [5,60; 15,87]	-7,81 [6,30; 21,51]	-1,02 [9,51; 32,50]	-17,10 [7,83; 30,75]
RISCO	TE-F2	5,38 [5,52; 10,10]	0,13 [7,47; 17,89]	8,47 [4,06; 11,53]	9,07 [3,91; 13,37]	9,62 [4,70; 16,05]	4,70 [3,66; 14,38]
DEF	TE-F2	0,22 [0,83; 1,51]	0,92 [2,71; 6,50]	0,24 [0,44; 1,24]	2,62 [5,81; 19,87]	0,21 [0,77; 2,64]	2,45 [1,56; 6,15]
ODOR	TE-F2	0,42 [6,37; 11,66]	-0,79 [5,40; 12,94]	-0,02 [3,14; 8,89]	-9,89 [4,21; 14,38]	4,16 [4,88; 16,67]	3,21 [4,68; 18,38]
ABERTO	TE-F2	-3,87 [8,84; 16,17]	-14,29 [11,81; 28,30]	-10,09 [8,51; 24,14]	-24,67 [13,87; 47,41]	-1,48 [6,07; 20,76]	-19,36 [8,20; 32,21]
FECHADO	TE-F2	1,34 [10,61; 19,42]	18,01 [16,19; 38,80]	2,34 [9,56; 27,12]	25,97 [16,10; 55,03]	8,04 [7,26; 24,81]	21,73 [10,00; 39,28]

Tabela 2 - Dados de número amostral, mediana e intervalo de confiança 95% da porcentagem de tempo de comportamentos expressos por ratos machos e fêmeas em diferentes sessões do condicionamento aversivo olfatório com estimulação glutamatérgica da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl). Os dados representam o Protocolo 1, no qual os animais receberam a microinjeção em contenção e antes da exposição ao estímulo condicionado. Legenda: RISCO: comportamentos de avaliação de risco; DEF: comportamentos defensivos; ODOR: tempo no espaço próximo ao odor; ABERTO: tempo no espaço aberto; FECHADO: tempo no espaço fechado; CO: sessão de condicionamento; F2: familiarização 2; TE: sessão de teste.

		Protocolo 1					
		PBS		NMDA 25		NMDA 50	
		FÊMEA n = 8	MACHO n = 8	FÊMEA n = 9	MACHO n = 8	FÊMEA n = 8	MACHO n = 8
Comp	Sessão						
DEF	CO	1,33 [9,80; 30,17]	6,92 [5,51; 16,97]	16,53 [10,53; 29,86]	17,77 [6,72; 20,67]	3,45 [4,77; 14,67]	37,60 [17,15; 58,62]
RISCO	CO	12,72 [3,95; 12,17]	22,45 [7,98; 24,55]	13,41 [3,84; 10,89]	21,03 [3,08; 9,48]	25,36 [7,69; 23,66]	15,00 [4,08; 13,94]
Espaços							
ODOR	TE	20,26 [6,04; 18,58]	23,83 [6,78; 20,88]	14,32 [7,30; 20,70]	25,83 [5,14; 15,83]	19,96 [3,70; 11,40]	9,08 [2,83; 8,70]
FECHADO	TE	42,48 [8,30; 25,56]	47,67 [9,54; 29,36]	49,69 [9,73; 27,60]	46,00 [11,91; 36,67]	49,13 [9,46; 29,11]	77,75 [5,52; 17,01]
Deltas							
ODOR	TE-F2	3,95 [5,73; 17,64]	0,92 [5,09; 15,66]	1,14 [6,76; 19,18]	-1,92 [3,61; 11,12]	3,18 [3,70; 11,38]	2,75 [2,95; 9,07]
ABERTO	TE-F2	2,02 [6,59; 20,30]	-0,25 [4,13; 12,71]	-14,65 [10,12; 28,70]	1,75 [4,10; 12,62]	-6,14 [4,62; 14,23]	-1,25 [2,11; 6,50]
FECHADO	TE-F2	-4,47 [5,01; 15,42]	-1,83 [5,62; 17,29]	3,63 [8,68; 24,62]	-0,17 [2,64; 8,13]	3,06 [9,83; 30,25]	-1,33 [2,66; 8,19]

Tabela 3 - Dados de número amostral, mediana e intervalo de confiança 95% da porcentagem de tempo de comportamentos expressos por ratos machos e fêmeas em diferentes sessões do condicionamento aversivo olfatório com choque nas patas após bloqueio glutamatérgico da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl). Legenda: RISCO: comportamentos de avaliação de risco; DEF: comportamentos defensivos; ODOR: tempo no espaço próximo ao odor; ABERTO: tempo no espaço aberto; FECHADO: tempo no espaço fechado; CO: sessão de condicionamento; F2: familiarização 2; TE: sessão de teste.

		AP5 NO Choque		PBS Choque		AP5 Choque	
		FÊMEA	MACHO	FÊMEA	MACHO	FÊMEA	MACHO
Comp	Sessão	n = 12	n = 8	n = 5	n = 7	n = 8	n = 7
NDEF	CO	61,30 [7,79; 37,35]	40,90 [8,29; 28,34]	17,71 [13,84; 33,17]	16,13 [2,90; 8,93]	9,73 [5,02; 15,45]	15,02 [2,46; 8,40]
	F2	47,60 [5,09; 24,41]	49,51 [7,56; 25,85]	58,50 [9,08; 21,77]	42,15 [4,42; 13,60]	50,46 [4,61; 14,19]	38,24 [4,51; 15,40]
	TE	40,37 [3,77; 18,08]	32,03 [4,76; 16,27]	29,67 [4,48; 10,73]	20,28 [8,00; 24,64]	33,31 [9,03; 27,81]	31,84 [4,48; 15,32]
RISCO	CO	21,45 [6,80; 32,62]	22,79 [8,41; 28,73]	29,83 [9,95; 23,86]	15,40 [6,46; 19,89]	45,27 [9,96; 30,67]	19,02 [4,15; 14,19]
	F2	29,47 [3,95; 18,95]	25,22 [4,97; 16,99]	20,48 [3,94; 9,43]	32,38 [2,56; 7,89]	21,90 [4,23; 13,03]	33,69 [3,90; 13,34]
	TE	30,51 [1,20; 5,77]	24,80 [7,38; 25,21]	27,93 [2,79; 6,70]	32,83 [2,93; 9,03]	29,41 [7,68; 23,63]	31,27 [3,07; 10,50]
DEF	CO	10,90 [2,83; 13,56]	23,65 [6,58; 22,48]	35,93 [11,66; 27,94]	45,79 [8,85; 27,25]	34,21 [8,56; 26,36]	49,76 [5,14; 17,56]
	F2	0,00 [0,40; 1,93]	0,00 [1,51; 5,15]	0,00 [0,64; 1,55]	2,01 [1,26; 3,88]	0,28 [1,52; 4,68]	0,49 [1,53; 5,22]
	TE	3,66 [1,01; 4,85]	4,36 [2,14; 7,32]	4,20 [2,34; 5,60]	4,06 [2,47; 7,61]	5,56 [2,48; 7,63]	2,00 [4,93; 16,85]
Espaços	Sessão	FÊMEA	MACHO	FÊMEA	MACHO	FÊMEA	MACHO
ODOR	F2	19,78 [1,49; 7,14]	15,34 [4,12; 14,07]	16,03 [2,17; 5,21]	19,79 [3,38; 10,42]	15,97 [3,39; 10,42]	11,50 [5,62; 19,22]
	TE	12,99 [1,32; 6,32]	11,94 [7,00; 23,90]	11,16 [3,58; 8,58]	13,58 [3,31; 10,18]	8,44 [4,11; 12,65]	9,61 [3,41; 11,65]
ABERTO	F2	34,48 [3,26; 15,64]	40,58 [4,89; 16,70]	38,05 [6,19; 14,83]	49,44 [9,79; 30,14]	32,01 [10,66; 32,81]	21,21 [7,49; 25,58]
	TE	36,14 [2,84; 13,61]	23,44 [9,00; 30,77]	24,45 [9,16; 21,94]	37,93 [12,26; 37,75]	15,77 [5,71; 17,59]	21,62 [11,28; 38,55]
FECHADO	F2	45,72 [4,50; 21,57]	41,38 [7,11; 24,31]	44,67 [10,30; 24,69]	27,75 [11,11; 34,20]	47,63 [8,91; 27,42]	64,30 [15,76; 53,86]
	TE	52,81 [3,34; 16,02]	55,22 [11,33; 38,71]	59,87 [12,96; 31,07]	40,26 [14,10; 43,39]	73,54 [9,39; 28,89]	71,34 [15,94; 54,47]
Deltas	Sessão	FÊMEA	MACHO	FÊMEA	MACHO	FÊMEA	MACHO
NDEF	TE-F2	-3,33 [2,96; 14,20]	-14,84 [6,15; 21,00]	-23,03 [8,60; 20,62]	-15,98 [9,73; 29,94]	-14,39 [8,17; 25,14]	-6,40 [6,57; 22,46]
RISCO	TE-F2	-0,09 [3,69; 17,72]	2,31 [6,91; 23,63]	3,98 [3,54; 8,49]	3,04 [3,02; 9,30]	2,04 [6,45; 19,86]	-0,75 [5,43; 18,56]
DEF	TE-F2	2,73 [0,93; 4,44]	3,92 [1,44; 4,91]	4,20 [2,40; 5,74]	1,91 [2,29; 7,04]	3,94 [2,80; 8,62]	2,00 [3,80; 12,99]
ODOR	TE-F2	-6,19 [2,64; 12,66]	-2,94 [6,72; 22,96]	-6,87 [2,98; 7,14]	-2,83 [3,30; 10,15]	-4,37 [3,75; 11,54]	0,33 [3,16; 10,80]
ABERTO	TE-F2	-2,99 [4,59; 22,01]	-7,90 [5,75; 19,65]	-13,43 [6,67; 15,98]	-9,89 [9,41; 28,96]	-16,02 [10,31; 31,74]	-0,80 [7,54; 25,75]
FECHADO	TE-F2	10,36 [6,26; 30,01]	6,59 [8,78; 30,01]	21,56 [9,10; 21,82]	11,56 [11,31; 34,81]	27,69 [11,86; 36,51]	0,17 [5,90; 20,16]