

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR
CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS – CECH
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA – PPGPSI

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE DOSES SUB-ANESTÉSICAS DE CETAMINA
SOBRE O MEDO CONDICIONADO À LUZ EM RATOS

MYLENA SILVA MAGALHÃES

São Carlos - SP

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR
CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS – CECH
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA – PPGPSI

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE DOSES SUB-ANESTÉSICAS DE CETAMINA
SOBRE O MEDO CONDICIONADO À LUZ EM RATOS

MYLENA SILVA MAGALHÃES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Psicologia, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Psicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira

São Carlos - SP

2021

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Educação e Ciências Humanas
Programa de Pós-Graduação em Psicologia

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Mylena Silva Magalhães, realizada em 31/08/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira (UFSCar)

Prof. Dr. Tatiana Lima Ferreira (UFABC)

Profa. Dra. Regina Cláudia Barbosa da Silva (UNIFESP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Psicologia.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio do fornecimento de Bolsa de Mestrado (processo no. 88887.611216/2021-00). A pesquisa também contou com apoio financeiro da CAPES por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX; Código de Financiamento 001).

Aos meus pais **Cezar Magalhães** e **Laucideia França** e ao meu irmão **Cezar Junior**, melhores presentes que já recebi na vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus por me guiar até aqui, por dar sentido a minha vida, e por me ajudar a continuar, mesmo quando eu penso que não consigo.

Aos meus pais e irmão por nunca me deixarem desistir e por me amarem de forma incondicional. Aos demais familiares e amigos queridos por sempre me incentivarem e acreditarem em mim. Eu sou mais feliz porque vocês existem!

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira, por toda orientação e paciência. Saiba que você é um exemplo de profissional e ser humano para mim. Muito obrigada!

Aos meus amigos do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem, muito obrigada por cada momento e por tornarem os meus dias no laboratório mais leves e agradáveis.

À coordenação e secretaria do Programa de Pós-Graduação em Psicologia pelo apoio e atendimento.

Magalhães, M.S. (2021). *Efeitos de doses sub-anestésicas de cetamina sobre o medo condicionado à luz em ratos*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Psicologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 73 pp.

RESUMO

O medo e a ansiedade desempenham um papel fundamental na garantia da sobrevivência. Ambas são reações adaptativas que os organismos exibem em resposta a situações ameaçadoras. Embora sejam adaptativas, podem se tornar clinicamente relevantes e se revelar como transtornos de ansiedade. Os tratamentos farmacológicos comumente empregados para esses transtornos aumentam os sintomas de ansiedade na fase terapêutica inicial, característica que pode dificultar a adesão ao tratamento. O sistema glutamatérgico desempenha um papel central no condicionamento aversivo e na patogênese da ansiedade. Assim, agentes farmacológicos capazes de modular essa neurotransmissão podem ser efetivos para o tratamento de transtornos relacionados à ansiedade. Estudos recentes têm demonstrado que a cetamina, um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), tem potencial de atuar sobre sintomas ansiosos, de forma rápida e efetiva quando administrada em doses sub-anestésicas. O objetivo desse trabalho foi avaliar os potenciais efeitos da cetamina, em diferentes doses e momentos de administração, sobre a aquisição, consolidação, expressão e extinção do medo condicionado. Foram utilizados 192 ratos Wistar machos. A cetamina foi administrada por via intraperitoneal, em doses de 0, 10, 20 e 30 mg/kg. O fármaco foi administrado 30 minutos antes do treino (experimento 1), imediatamente após o treino (experimento 2), 30 minutos antes do teste (experimento 3) ou imediatamente após o teste (experimento 4). A cetamina na dose de 30 mg/kg, administrada 30 minutos antes do treino, atenuou a resposta de congelamento na sessão treino e nas sessões teste e reteste seguintes, 24 e 48 horas após o treino. O mesmo efeito não foi observado para as doses de 10 mg/kg ou 20 mg/kg. A cetamina administrada imediatamente após o treino de medo condicionado não apresentou efeito significativo nas sessões teste e reteste seguintes. A administração de cetamina nas doses de 20 mg/kg e 30 mg/kg, 30 minutos antes do teste, prejudicou a extinção, efeito observado na sessão reteste. Por último, a cetamina administrada imediatamente após a sessão teste de medo condicionado não alterou o congelamento na sessão reteste. De maneira geral, esses resultados indicam que a cetamina interfere no processamento de memórias aversivas e, conseqüentemente, na expressão comportamental do medo. Tanto a dose quanto o momento de administração parecem ser fatores importantes para os efeitos da cetamina no medo condicionado. Estudos adicionais são necessários para replicar os achados do presente estudo e para investigar processos moleculares subjacentes aos efeitos da cetamina na aquisição e extinção de memórias aversivas.

Palavras-Chave: Cetamina. Congelamento. Condicionamento aversivo clássico. Ansiedade. Aquisição. Extinção.

Magalhães, M.S. (2021). *Effects of sub-anesthetic doses of ketamine on cued fear conditioning in rats*. Master's Dissertation, Postgraduate Program in Psychology, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP. 73 pp.

ABSTRACT

Fear and anxiety play a key role in ensuring survival. Both are adaptive reactions that organisms exhibit in response to threatening situations. Although they are adaptive, they can become clinically relevant and turn out on anxiety disorders. The pharmacological treatments commonly used for these disorders increase anxiety symptoms in the initial therapeutic phase, a characteristic that can make treatment adherence difficult. The glutamatergic system plays a central role in aversive conditioning and the pathogenesis of anxiety. Thus, pharmacological agents capable of modulating this neurotransmission can be effective for the treatment of anxiety-related disorders. Recent studies have shown that ketamine, an antagonist of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, has the potential to act on anxiety symptoms quickly and effectively when administered in sub-anesthetic doses. The objective of this work was to evaluate the potential effects of ketamine, at different doses and times of administration, on the acquisition, consolidation, expression, and extinction of conditioned fear. For this, 192 male Wistar rats were used. Ketamine was administered intraperitoneally, at doses of 0, 10, 20 and 30 mg/kg. The drug was administered 30 minutes before training (experiment 1), immediately after training (experiment 2), 30 minutes before the test (experiment 3) or immediately after the test (experiment 4). Ketamine at a dose of 30 mg/kg, administered 30 minutes before training, attenuated the freezing response in the training session and in the following test and retest sessions, 24 and 48 hours after training. The same effect was not observed for the 10 mg/kg or 20 mg/kg doses. Ketamine administered immediately after fear conditioning training had no significant effect on the following test and retest sessions. The administration of ketamine at doses of 20 mg/kg and 30 mg/kg, 30 minutes before the test, impaired extinction, an effect observed in the retest session. Finally, ketamine administered immediately after the test session did not alter freezing in the retest session. Overall, these results indicate that ketamine interferes with the processing of aversive memories and, consequently, with the behavioral expression of fear. Both dose and timing of administration appear to be important factors in the effects of ketamine on conditioned fear. Additional studies are needed to replicate the findings of the present study and to investigate molecular processes underlying the effects of ketamine on aversive memory acquisition and extinction.

Keywords: Ketamine. Freezing. Classic aversive conditioning. Anxiety. Acquisition. Extinction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A) Fotografia da caixa experimental utilizada na sessão treino do medo condicionado à luz. B) Fotografia da caixa experimental utilizada nas sessões teste e reteste do medo condicionado à luz. Nessa imagem, é possível visualizar a base de plástico acoplada à caixa, acima das hastes de aço inoxidável.....28
- Figura 2.** Delineamento do experimento 1: Cetamina administrada antes do treino de medo condicionado à luz.....30
- Figura 3.** Delineamento do experimento 2: Cetamina administrada imediatamente após o treino de medo condicionado à luz.....31
- Figura 4.** Delineamento do experimento 3: Cetamina administrada antes do teste de medo condicionado à luz.....31
- Figura 5.** Delineamento do experimento 4: Cetamina administrada imediatamente após o teste de medo condicionado à luz.....32
- Figura 6.** Efeitos da administração de cetamina, 30 minutos antes do treino, sobre o medo condicionado à luz. A) Porcentagem média de congelamento em relação aos 20 segundos de cada apresentação do estímulo condicionado nas fases de Treino, Teste e Reteste. A seta vermelha indica o momento da administração de salina ou cetamina nas diferentes doses. B) Porcentagem média de congelamento em relação ao tempo total de apresentação do estímulo condicionado nas sessões Teste e Reteste.....35
- Figura 7.** Efeitos da administração de cetamina, imediatamente após o treino, sobre o medo condicionado à luz. A) Porcentagem média de congelamento em relação aos 20 segundos de cada apresentação do estímulo condicionado nas fases de Treino, Teste e Reteste. A seta vermelha indica o momento da administração de salina ou cetamina nas diferentes doses. B) Porcentagem média de congelamento em relação ao tempo total de apresentação do estímulo condicionado nas sessões Teste e Reteste.....38
- Figura 8.** Efeitos da administração de cetamina, 30 minutos antes do Teste, sobre o medo condicionado à luz. A) Porcentagem média de congelamento em relação aos 20 segundos de cada apresentação do estímulo condicionado nas fases de Treino, Teste e Reteste. A seta vermelha indica o momento da administração de salina ou cetamina nas diferentes doses. B) Porcentagem média de congelamento em relação ao tempo total de apresentação do estímulo condicionado nas sessões Teste e Reteste.....41
- Figura 9.** Efeitos da administração de cetamina, imediatamente após o Teste, sobre o medo condicionado à luz. A) Porcentagem média de congelamento em relação aos 20 segundos de cada apresentação do estímulo condicionado nas fases de Treino, Teste e Reteste. A seta vermelha indica o momento da administração de salina ou cetamina nas diferentes doses. B) Porcentagem média de congelamento em relação ao tempo total de apresentação do estímulo condicionado nas sessões Teste e Reteste.....44

LISTA DE SIGLAS

CS: Estímulo Aversivo Condicionado

US: Estímulo Aversivo Incondicionado

BLA: Amígdala Basolateral

vmPFC: Córtex Pré-frontal Ventromedial

LTP: Potenciação de Longa Duração

NMDA: N-metil-D-aspartato

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1 Medo e ansiedade.....	12
1.2 Emoção, aprendizagem e memória.....	14
1.3 Transtornos de ansiedade.....	18
1.4 Neurotransmissão glutamatérgica e cetamina.....	21
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Animais.....	27
3.2 Drogas.....	27
3.3 Equipamentos.....	28
3.4 Procedimentos.....	29
3.5 Delineamento experimental.....	29
3.5.1 Experimento 1: Efeitos da cetamina administrada antes do Treino de medo condicionado à luz.....	30
3.5.2 Experimento 2: Efeitos da cetamina administrada imediatamente após o Treino de medo condicionado à luz.....	30
3.5.3 Experimento 3: Efeitos da cetamina administrada antes do Teste de medo condicionado à luz.....	31
3.5.4 Experimento 4: Efeitos da cetamina administrada imediatamente após o Teste de medo condicionado à luz.....	32
3.6 Análise de dados.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1 Experimento 1: Efeitos da cetamina administrada antes do Treino de medo condicionado à luz.....	33
4.2 Experimento 2: Efeitos da cetamina administrada imediatamente após o Treino de medo condicionado à luz.....	36
4.3 Experimento 3: Efeitos da cetamina administrada antes do Teste de medo condicionado à luz.....	39
4.4 Experimento 4: Efeitos da cetamina administrada imediatamente após o Teste de medo condicionado à luz.....	42
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no uso de animais da UFSCar.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 Medo e ansiedade

O medo e a ansiedade desempenham um papel fundamental na garantia da sobrevivência. Ambas são reações adaptativas que os organismos exibem em resposta a situações ameaçadoras que podem comprometer sua sobrevivência ou integridade física (Darwin, 1897). Assim, o medo e a ansiedade funcionam como um sinal de perigo, ameaça, ou conflito motivacional, o que produz respostas adaptativas apropriadas (Steimer, 2002). Embora sejam considerados constructos teóricos intercambiáveis e indistinguíveis por alguns autores (Beck & Emery, 2005; Wolpe, 1987), outros teóricos e pesquisadores têm fornecido explicações que diferenciam esses dois fenômenos (Steimer, 2002; Sylvers, Lilienfeld & LaPrairie, 2011).

O medo é comumente definido como uma reação eliciada pela percepção ou detecção de um estímulo ameaçador específico (Sylvers, Lilienfeld & LaPrairie, 2011; Adolphs, 2013). Entende-se que ele é evocado por ameaças bem definidas. A ansiedade, por outro lado, ocorre em situações em que o evento ameaçador é incerto ou indeterminado (Craig, Brown & Baum, 2000; Rigoli, Ewbank, Dalgleish, & Calder, 2016). Portanto, o medo seria uma resposta que ocorre em face de um perigo real e a ansiedade uma reação a uma ameaça potencial, em que o perigo não é claramente iminente (Barlow, 2000; Grillon, 2008).

Duas condições para que o medo e a ansiedade sejam considerados eventos diferentes são levantadas por Perusini e Fanselow (2015) em uma revisão na qual discutem a utilidade da distinção entre esses dois constructos. A primeira condição é a de que eles devem ser causados por condições antecedentes diferentes. A segunda condição está relacionada a manifestação comportamental do medo e da ansiedade. Eles devem se manifestar como comportamentos diferentes. De acordo com os autores, a teoria da iminência predatória

(Fanselow & Lester, 1988) é a que melhor capta a diferença entre medo e ansiedade, assim como pânico, tanto em termos de causa quanto de efeito.

A teoria da iminência predatória sugere que diferentes padrões de comportamentos defensivos específicos de cada espécie serão adotados em função de alterações na percepção da presa em relação a sua localização em um continuum. Esse continuum corresponde ao ponto em que não há potencial predatório até o ponto em que a presa é morta pelo predador. Entre o ponto inicial e final desse continuum encontram-se três fases: o potencial predatório, a detecção do predador e o momento em que o predador faz contato direto com a presa. Para cada uma dessas fases, haveria um comportamento defensivo correspondente (Fanselow & Lester, 1988; Mobbs & Kim, 2015).

Os comportamentos defensivos são divididos em três estágios. O primeiro estágio, denominado pré-encontro, ocorre quando algum risco é associado ao padrão de atividade preferida do animal, como a procura por alimento, automanutenção, manutenção do ninho e atividades reprodutivas. Se houver um aumento na probabilidade de encontrar um predador enquanto estiver engajado em uma dessas atividades, então o animal irá modificar o seu comportamento de forma a diminuir a probabilidade de tal encontro (Fanselow, Hoffman & Zhuravka, 2019). As reações de pré-encontro são caracterizadas por padrões de respostas como aumento da vigilância e avaliação de risco. São comportamentos relacionados a percepção de uma ameaça potencial, mas distante ou em baixa probabilidade. Respostas como essas caracterizariam melhor a ansiedade (Perusini & Fanselow, 2015).

O estágio de pós-encontro produz modificações drásticas no comportamento. Esse modo de defesa é acionado quando ocorre a detecção de um predador ou uma ameaça iminente. Diferente do estágio de pré-encontro, que acontece diante de um perigo potencial, o pós-encontro envolve a percepção de um estímulo ameaçador real (Mobbs et al., 2009). Portanto, o estado que melhor caracterizaria os comportamentos consequentes do pós-

encontro é o medo. Uma vez que o perigo está presente, o comportamento muda em direção a principal função desse modo defensivo, que é diminuir a probabilidade de detecção e ataque (Fanselow, Hoffman & Zhuravka, 2019). As reações desse estágio compreendem comportamentos como congelamento, fuga ou postura ameaçadora (Bolles, 1970).

O congelamento parece ser a estratégia dominante do comportamento defensivo pós-encontro em ratos, pois mesmo diante da oportunidade de se engajarem em outra resposta defensiva, o congelamento continua sendo sua resposta de primeira escolha. É uma reação que aumenta as chances de sobrevivência, visto que diminui a possibilidade da presa ser detectada e atacada pelo predador (Fanselow & Lester, 1988). Estudos de laboratório demonstram que roedores expressarão intensa resposta de congelamento quando expostos a um predador potencial, como gato (Halonen, Zoladz, Park, & Diamond, 2016; Lester & Fanselow, 1985).

A resposta de congelamento, característica da defesa pós-encontro, é abandonada conforme a iminência predatória aumenta. Esse aumento leva ao padrão defensivo denominado “circa-strike”, que é adotado quando o predador faz contato direto com a presa. Esse terceiro estágio é caracterizado por tentativas de fuga vigorosas, ataques de salto, vocalizações e luta (Fanselow, 1991). A função desse modo defensivo é sobreviver ao contato direto com o predador, e o estado associado é o pânico (Fanselow, Hoffman & Zhuravka, 2019).

1.2 Emoção, aprendizagem e memória

As emoções, de forma geral, desempenham um papel muito importante na modulação de vários aspectos da cognição, incluindo atenção, aprendizagem e memória (Tyng, Amin, Saad & Malik, 2017). Quando um indivíduo recorda fatos de sua história passada, é muito comum que as emoções se manifestem com o conteúdo da memória. Além disso, é mais provável que a experiência emocional lembrada produza sensações diferentes no ato da

recordação do que seria produzido se o indivíduo lembrasse de fatos comuns, sem cunho emocional significativo. Assim, as emoções são importantes para a retenção seletiva da memória e para sua experiência subjetiva (LaBar, 2007).

Um campo de pesquisa que tem sido bastante investigado é aquele que busca compreender quais mecanismos neurais e psicológicos estão envolvidos na influência que as emoções exercem sobre a aprendizagem e memória (Heidig, Müller & Reichelt, 2015; LaBar, 2007; Martijena & Molina, 2012). Muito dessa investigação envolve o estudo de uma emoção particular: o medo. Eventos e estímulos específicos, em conjunto com experiências e aprendizagens individuais, contribuem para evocar o estado de medo. O encéfalo molda como formamos memórias de medo e esse processo é chamado de memória emocional (LeDoux, 1994; Liu et al., 2016).

Grande parte do que se conhece sobre as bases neurais subjacentes a relação memória e emoção deve-se aos estudos envolvendo o condicionamento aversivo clássico (LeDoux, 1994; Myers & Davis, 2007). Nesse paradigma, que tipicamente utiliza roedores, um estímulo neutro, como uma luz, um som ou um contexto específico, é pareado a um estímulo aversivo incondicionado (US), como choque nas patas. O estímulo neutro, então, se torna um estímulo aversivo condicionado (CS) e a sua apresentação é suficiente para desencadear respostas de medo condicionadas (Bouton & Bolles, 1980; Lissek et al., 2005; Sigmundi, Bouton & Bolles, 1980). Processos componentes distintos da aprendizagem associativa podem ser investigados utilizando os princípios do condicionamento clássico ou pavloviano (Pavlov, 1927; Clifton, Thomas & Hall, 2018). Esses processos incluem, por exemplo, aquisição, consolidação, expressão e extinção (Suzuki et al., 2004).

A aquisição é o processo inicial da aprendizagem. No condicionamento aversivo clássico, diz respeito ao momento em que o estímulo neutro torna-se associado a uma consequência aversiva e obtém a capacidade de eliciar uma resposta defensiva condicionada

(Garakani, Mathew & Charney, 2006; Sun, Gooch & Sah, 2020). Uma área do cérebro fortemente implicada na criação de memórias emocionais é o complexo amigdalóide (Paré, Quirk & Ledoux, 2004). Especificamente, o complexo basolateral da amígdala é essencial para o condicionamento do medo (Curzon, Rustay & Browman, 2009), processo mediado por mecanismos de plasticidade sináptica, como a potenciação de longa duração (LTP – do inglês Long Term Potentiation) (Maren, 1996). Estudos em animais e em humanos fortalecem o envolvimento dessa área nesse processo (Bechara et al., 1995; Rosen & Donley, 2006; LaBar, LeDoux, Spencer & Phelps, 1995). Além da amígdala, o córtex cingulado anterior, homólogo a área pré-límbica no roedor, juntamente com a ínsula, parece desempenhar uma função importante na fase de aquisição do medo (Maeng & Milad, 2017).

Uma vez que a associação entre o CS e o US é formada, ela será então consolidada. A consolidação é o processo delimitado no tempo que estabiliza a memória de curto prazo, tornando-a mais estável e mais duradoura (Inda, Delgado-García & Carrión, 2005; Suzuki et al., 2004). A ativação do complexo basolateral da amígdala modula a consolidação da memória emocional através da sua associação com várias regiões envolvidas na memória de longa duração, como hipocampo, núcleos da base e córtex (McGaugh, 2002; McGaugh, Cahill & Roozendaal, 1996). O trabalho de Gallagher e colaboradores (1977) foi o primeiro a demonstrar que antagonistas beta-adrenérgicos injetados no complexo amigdalóide de ratos compromete a consolidação em uma tarefa de esquiva passiva. Os bloqueadores beta-adrenérgicos injetados imediatamente após o treino causaram déficit significativo na retenção, mas isso não foi observado quando as drogas foram injetadas com um atraso de 6 horas após o treino. Esses achados apontaram para o papel neuromodulador de sistemas específicos da amígdala atuando sobre a formação da memória de longa duração.

A consolidação sustenta a expressão posterior da aprendizagem. No caso da aprendizagem aversiva pavloviana, o medo é expresso através de uma variedade de

comportamentos defensivos adaptativos semelhantes àqueles observados quando o animal detecta um predador (Lester & Fanselow, 1985; Steimer, 2002). Em laboratório, a principal medida utilizada para avaliar o medo no condicionamento clássico é o congelamento (Bolles, 1970; Davis, 1998). Ele é definido como a supressão de todos os movimentos, exceto os necessários para a respiração (Davis, 1998; Fanselow & Bolles, 1979). Na expressão do congelamento, a apresentação do CS provoca intensa ativação na amígdala lateral que, através de suas projeções para o núcleo central, evoca respostas condicionadas de medo (Paré, Quirk & Ledoux, 2004). Isso porque o núcleo central é a principal região de saída da amígdala para o hipotálamo e tronco encefálico, os quais medeiam respostas de medo, como congelamento (Maren, 2001).

A exposição repetida e/ou prolongada ao CS, na ausência do US, resultará em extinção, que consiste na diminuição gradual da resposta condicionada (VanElzaker, Dahlgren, Davis, Dubois & Shin, 2014). A extinção não implica “apagamento” ou quebra na associação antiga. O que ocorre é uma nova aprendizagem, ou uma nova associação de não ameaça, que irá competir com a aprendizagem anterior e se tornar dominante (Jacoby & Abramowitz, 2016). A amígdala e o córtex pré-frontal ventromedial (vmPFC), homólogo ao córtex infra-límbico no roedor, desempenham papel importante na extinção do medo (Quirk, Russo, Barron, & Lebron, 2000). Durante o estágio inicial da extinção, a apresentação repetida do som ou da luz, na ausência do US, causa diminuição na taxa de disparos de alguns neurônios da amígdala (Sotres-Bayon, Cain & LeDoux, 2006). Posteriormente, na fase de recuperação da extinção, o vmPFC exerce controle inibitório sobre a amígdala, o que resulta na regulação das respostas de medo (Craske et al., 2008).

1.3 Transtornos de ansiedade

Além de contribuir para o entendimento dos mecanismos subjacentes à relação memória-emoção, os modelos animais de condicionamento aversivo têm viabilizado o estudo e compreensão de uma série de transtornos mentais e contribuído significativamente para o desenvolvimento de tratamentos efetivos (Grillon, 2008; King, Scott, Graham & Richardson, 2017; Morgan, Romanski & Ledoux, 1993). Embora o medo condicionado seja uma resposta adaptativa a estímulos potencialmente perigosos, ele pode se transformar em um medo clinicamente relevante. Isso acontece quando a reatividade emocional e comportamental ao CS persiste na ausência do US, levando ao desenvolvimento de transtornos de ansiedade (Michael, Blechert, Vriends, Margraf & Wilhelm, 2007). Disfunções neurais podem levar a uma distorção ou maior percepção de ameaças, de forma que o indivíduo pode apresentar comportamentos defensivos mesmo em atividades cotidianas (Perusine & Fanselow, 2015).

Os transtornos de ansiedade estão entre os quadros psicopatológicos com maiores taxas de prevalência na população em geral, impondo uma sobrecarga intensa às pessoas afetadas e à sociedade (Wittchen, 2003). Os transtornos de ansiedade são caracterizados por medo e/ou ansiedade excessivos, preocupação e pensamentos de perigo imediato, além de perturbações comportamentais associadas à fuga e esquiva. Esses transtornos ocasionam um comprometimento de funções psicológicas, biológicas e de desenvolvimento, o que resulta em intenso sofrimento e dano significativo em áreas sociais, profissionais e em outras atividades relevantes (APA, 2013). De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), os principais transtornos de ansiedade incluem Transtorno de Ansiedade Social, Transtorno de Ansiedade Generalizada, Transtorno do Pânico, Agorafobia e Fobias Específicas (APA, 2013).

Ao longo das últimas três décadas tem crescido de forma significativa o debate a respeito da desregulação de mecanismos neurais subjacentes à neurobiologia do medo e a sua

relação com variados tipos de transtornos de ansiedade (Brandão & Lovick, 2019). As principais estruturas envolvidas na neuroanatomia funcional de respostas de medo adaptativas são as mesmas envolvidas no quadro patológico. Dentre elas é possível destacar amígdala, hipocampo, regiões corticais, tálamo e substância cinzenta periaquedutal (Del-Bem & Graeff, 2009; Garakani, Mathew & Charney, 2006; McNaughton, 2011; Shin & Liberzon, 2010).

Os transtornos de ansiedade envolvem anormalidades na aprendizagem e extinção do medo, e essa é considerada uma característica transdiagnóstica dessas desordens (Maeng & Milad, 2017; Rabinak, Mori, Lyons, Milad, & Phan, 2017). Resultados indicam que pacientes com transtorno do pânico exibem maiores respostas de condutância da pele aos estímulos aversivos condicionados durante a extinção (Michael et al., 2007). Além disso, pacientes com fobia específica apresentam aprendizagem do medo aumentada quando comparados a indivíduos saudáveis (Schweckendiek et al., 2011). Desregulação na aprendizagem aversiva também é uma característica transdiagnóstica observada nos transtornos relacionados ao medo e ansiedade, como o Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) e o Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC). Apesar de não mais pertencerem a categoria dos transtornos de ansiedade, existe uma forte associação entre esses transtornos e alterações nos mecanismos neurobiológicos do medo e da ansiedade (Diniz et al., 2012; Sherin & Nemeroff, 2011).

O TEPT pode resultar de experiências e eventos traumáticos, especialmente aqueles em que um indivíduo testemunha ou sofre diretamente uma situação extrema que ameaça a sua própria vida, ou a vida de outros, ou que representa potencial de lesões corporais graves. Essas experiências podem induzir ou acompanhar respostas de medo intenso, desamparo e horror (Pitman et al., 2012; Sherin & Nemeroff, 2011). Os sintomas característicos desse transtorno incluem memórias e pensamentos intrusivos recorrentes a respeito do trauma, reações físicas e emocionais exacerbadas a pistas que simbolizam algum aspecto do trauma, esquiva, ansiedade aumentada e hipervigilância. O estado emocional negativo e persistente

também é um dos sintomas chave (APA, 2013). A aprendizagem do medo alterada no TEPT é uma das características que levam a uma falha na extinção de respostas emocionais e comportamentais a estímulos associados ao evento traumático (Kirkpatrick & Heller, 2014). Além do TEPT, o TOC é outro transtorno que possui o medo e a ansiedade como componentes importantes (Diniz et al., 2012). Ele é constituído por duas características principais: obsessões e compulsões. Pensamentos intrusivos indesejados e perturbadores fazem parte das obsessões, enquanto as compulsões são comportamentos repetitivos e ações mentais que o indivíduo se sente compelido a realizar em resposta às obsessões (Goodman, Grice, Lapidus & Coffey, 2014; Veale & Roberts, 2014). Embora as características clínicas do TOC sejam diferentes daquelas observadas nos transtornos de ansiedade, pacientes que sofrem com o transtorno apresentam graus mais elevados de ansiedade quando comparados a controles saudáveis (Jahangard et al, 2018). As obsessões podem chegar ao ponto de pânico quando os rituais compulsivos são impedidos (Nutt & Malizia, 2006; Stein et al., 2010). Intervenções baseadas na exposição contínua e prolongada ao estímulo temido ou desencadeador de ansiedade, com prevenção de respostas, se mostraram eficazes para o TOC (Foa et al, 2005; Sousa, Isolan, Oliveira, Manfro & Cordioli, 2006).

Uma característica que está fortemente associada à manutenção dos transtornos que têm como base o medo é a esquiva fóbica (Spurr & Stopa, 2003). Ela é uma resposta emitida pelo sujeito que tem como principal objetivo eliminar ou amenizar o contato com o estímulo temido e preditor de ameaça (Zamignani & Banaco, 2005). No entanto, essa estratégia interfere na extinção do medo, pois limita as possibilidades do sujeito de se expor a contextos de não ameaça e formar uma nova aprendizagem (Kirkpatrick & Heller 2014). Um tratamento adequado para esses transtornos deve levar à remissão completa dos sintomas, diminuir a ansiedade antecipatória, a evitação situacional e o medo (APA, 2009).

O tratamento medicamentoso para vários transtornos de ansiedade e transtornos relacionados, de forma geral, envolve a utilização de fármacos inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS) (Alexander, 2012; Fenske & Schwenk, 2009; Ravindran & Stein, 2010; Weisberg, Dyck, Culpepper & Keller, 2007). No entanto, a terapia com ISRS apresenta limitações. Alguns pacientes experimentam aumento dos sintomas de ansiedade na fase inicial e os efeitos terapêuticos podem ser observados apenas após várias semanas de tratamento ininterrupto. Aspectos como esses podem dificultar a adesão ao tratamento (Nadal-Vicens, Chyung & Turner, 2009). Achados pré-clínicos fortalecem as observações clínicas a respeito do aumento dos sintomas notado em alguns pacientes na fase terapêutica inicial. Enquanto o tratamento crônico com ISRS prejudicou a aquisição do medo por condicionamento auditivo, a administração aguda aumentou a aquisição e as respostas de medo (Burghardt, Sullivan, McEwen, Gorman & LeDoux, 2004). Outros efeitos colaterais dos ISRS incluem perturbações no sono, ganho ou perda de peso e disfunção sexual (Ferguson, 2001). Além disso, apenas cerca de 60% dos pacientes respondem ao tratamento em um grau significativo e muitos desses ainda apresentam sintomas residuais (Bystritsky, 2006). Todos esses fatores relacionados a não resposta ao tratamento tornam urgente o desenvolvimento e estudo de farmacoterapias que tenham capacidade de reduzir, de forma rápida e persistente, a sintomatologia dos transtornos de ansiedade e transtornos relacionados.

1.4 Neurotransmissão glutamatérgica e cetamina

O sistema glutamatérgico desempenha um papel central no condicionamento aversivo e na patogênese dos transtornos de ansiedade. O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais amplamente distribuído do sistema nervoso central e tem envolvimento direto na formação de memórias emocionais e na resposta ao estresse (Feder et al., 2014). A hiperatividade na neurotransmissão glutamatérgica está associada ao desenvolvimento de

sintomas patológicos como pânico e excitotoxicidade, o que resulta em danos aos dendritos (Bergink, van Megen & Westenberg, 2004). A sua disfunção na amígdala basolateral pode levar a hiperexcitabilidade comportamental, aumento da ansiedade e desregulação emocional (Jie et al., 2018). Assim, agentes farmacológicos capazes de modular essa neurotransmissão podem ser efetivos para o tratamento de transtornos relacionados à ansiedade (Simon & Gorman, 2006; Averill et al., 2017).

A cetamina é um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) e ativador dos receptores ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA), ambos receptores glutamatérgicos (McGowan et al., 2017) envolvidos diretamente na formação da memória do medo (Choi, Berman, Zhang, Spencer & Radford, 2020). Estudos recentes têm demonstrado os efeitos da cetamina e revelado o seu potencial de atuar sobre sintomas de depressão, de forma rápida e efetiva em pacientes, quando administrada em doses sub-anestésicas. Os efeitos de uma única dose de cetamina puderam ser notados em poucas horas após a administração e foram sustentados por aproximadamente duas semanas (Berman et al., 2000; Xu et al., 2016). O mesmo efeito benéfico vem sendo observado em transtornos de ansiedade e TEPT (Feder, et al., 2014; Glue, et al., 2017).

Os receptores NMDA e AMPA são canais iônicos controlados por ligantes. Os receptores NMDA, especificamente, são encontrados em grandes quantidades na amígdala (Ledoux, 1994). Para que a abertura dos canais do receptor NMDA ocorra é necessário que haja a ligação do glutamato e da glicina, juntamente com a despolarização da membrana pós-sináptica (Amiel & Mathew, 2007). Assim, a ativação desse receptor requer tanto a atividade pré-sináptica quanto pós-sináptica (Tsien, Huerta & Tonegawa, 1996). Sob ativação, o íon Mg^{++} , que bloqueia o poro central do receptor NMDA, é liberado, o que permite um maior influxo de Na^+ e de Ca^{++} dentro da célula (Nasir et al., 2020). Esse último tem um papel fundamental na plasticidade sináptica, aprendizagem e memória (Dingledine, Borges, Bowie

& Traynelis, 1999). Por outro lado, para que o AMPA seja ativado é necessário que pelo menos dois dos quatro sítios de ligação do glutamato estejam ocupados, mecanismo que permitirá o influxo de Na^+ , K^+ e Ca^{++} (Amiel & Mathew, 2007).

De acordo com a hipótese da desinibição, a cetamina atua bloqueando seletivamente os receptores NMDA dos interneurônios inibitórios GABAérgicos. Tal bloqueio leva a desinibição dos neurônios piramidais e aumento dos disparos glutamatérgicos, o que causa uma ativação dos receptores AMPA pós-sinápticos. Essa ativação resulta na liberação aumentada do fator neurotrófico derivado do cérebro, ativação do receptor de tropomiosina quinase B e síntese protéica através do alvo mecanístico do complexo 1 de rapamicina (Zanos & Gould, 2018). Portanto, embora antagonista NMDA, os efeitos da cetamina estão relacionados ao aumento na liberação de glutamato, mecanismo que parece contribuir significativamente para a plasticidade em áreas importantes, como o córtex pré-frontal medial (Li et al., 2010; Girgenti, Ghosal, LoPresto, Taylor & Duman, 2017).

Grande parte dos avanços alcançados na compreensão dos efeitos e mecanismos de ação da cetamina deve-se aos modelos pré-clínicos em roedores. Os seus efeitos na memória do medo e comportamentos semelhantes ao TEPT têm sido amplamente investigados (Choi et al., 2020). Uma única dose de cetamina administrada 24 horas antes da extinção aumentou a recuperação da extinção em ratos, resultado que foi associado ao aumento da função sináptica no córtex pré-frontal medial (Girgenti et al., 2017). A administração da cetamina imediatamente após a exposição a um evento traumático, como observar coespecíficos recebendo choques elétricos, foi capaz de prevenir o aumento da aprendizagem de esquiva passiva em camundongos (Ito, Erisir & Morozov, 2015).

Além da sugestão de que a cetamina poderia facilitar a extinção e prevenir consequências patológicas decorrentes de eventos traumáticos, seus efeitos também são observados quando administrada antes do condicionamento aversivo (Calzavara et al., 2009;

McGowan et al., 2017). O uso profilático de uma única dose de cetamina, administrada uma semana antes do condicionamento, foi capaz de reduzir a memória aversiva no primeiro treino de extinção (McGowan et al., 2017). Assim como esse resultado, outras pesquisas têm apontado a eficácia da cetamina em atenuar respostas condicionadas de medo (Duclot, Perez-Taboada, Wright & Kabbaj, 2016; Bolton et al., 2012); no entanto, outros estudos têm apresentado um efeito oposto (Clifton, Thomas & Hall, 2018; Yang, Ju, Zhang & Sun, 2018). Em um deles, foi demonstrado que a cetamina prejudicou seletivamente a extinção em ratos quando administrada 30 minutos antes da extinção (Clifton, Thomas e Hall, 2018). Ao que parece, tanto a dose quanto o tempo são importantes para os efeitos da cetamina.

Conforme apresentado, os modelos animais neurobiológicos têm fornecido uma alternativa para a avaliação dos efeitos de medicamentos e demonstrado capacidade em detectar tratamentos efetivos (Graeff & Zangrossi, 2002; Bourin, Petit-Demoulière, Nic Dhonnchadha, & Hascöet, 2007). Uma vez que o medo desempenha um papel proeminente, direta ou indiretamente, em uma variedade de transtornos mentais (Johansen, Cain, Ostroff & LeDoux, 2011), avaliar os efeitos da cetamina no condicionamento aversivo pode ajudar a encontrar um tratamento mais promissor. Tal avaliação também contribuirá para fortalecer as hipóteses existentes a respeito dos efeitos da cetamina nas diversas etapas do condicionamento aversivo.

É importante observar que grande parte dos estudos realizados até o momento não administraram a cetamina em diferentes doses ou analisou os seus efeitos nas variadas fases do medo condicionado. Por esse motivo, o presente trabalho utilizou as doses de cetamina que foram mais frequentes entre os estudos anteriores, assim como variou os momentos em que a droga foi administrada. Além disso, investigações prévias a respeito dos efeitos da cetamina têm utilizado, na maioria das vezes, o condicionamento aversivo ao contexto, aprendizagem mediada pelo hipocampo. Por outro lado, o condicionamento aversivo a estímulos explícitos,

como uma luz ou um som, uma aprendizagem fortemente mediada pela amígdala, tem sido menos explorado (Phillips & LeDoux, 1992; Sotres-Bayon, Cain & LeDoux, 2006).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os potenciais efeitos da cetamina, em diferentes doses e momentos de administração, sobre o medo condicionado à luz, supondo que a cetamina interferiria no processamento de memórias aversivas e, conseqüentemente, na expressão comportamental do medo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de doses sub-anestésicas de cetamina sobre o medo condicionado à luz em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da cetamina nas doses de 10, 20 e 30 mg/kg, administrada antes do treino de medo condicionado à luz-CS, sobre a aquisição do comportamento de congelamento em ratos.
- Avaliar os efeitos da cetamina nas doses de 10, 20 e 30 mg/kg, administrada imediatamente após o treino de medo condicionado à luz-CS, sobre a consolidação do comportamento de congelamento em ratos.
- Avaliar os efeitos da cetamina nas doses de 10, 20 e 30 mg/kg, administrada antes do teste de medo condicionado à luz-CS, sobre a expressão e aquisição da extinção do comportamento de congelamento em ratos.
- Avaliar os efeitos da cetamina nas doses de 10, 20 e 30 mg/kg, administrada imediatamente após o treino de medo condicionado à luz-CS, sobre a consolidação da extinção do comportamento de congelamento em ratos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Nesse estudo, foram utilizados 192 ratos Wistar machos, da unidade animal do campus da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os animais tinham aproximadamente 8 semanas de idade e peso médio de 320 g quando foram submetidos aos experimentos. Eles foram alojados em grupos de 4 a 6, por caixa, em gaiolas de polipropileno (24 × 39 × 30,5 cm), forradas com maravalha. Alimento e água estiveram livremente disponíveis, exceto durante as sessões experimentais. Os animais foram mantidos sob condições controladas, com temperatura média de 23 °C e ciclo claro/escuro de 12 x 12 horas, iniciando a fase clara às 7:00 h. Os experimentos aconteceram durante a fase clara do ciclo, no período da tarde. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSCar, sob o protocolo n° 9189160919 (ANEXO A).

3.2 Drogas

A cetamina, antagonista do receptor NMDA, foi o fármaco utilizado. A administração se deu por via intraperitoneal, em doses de 10, 20 e 30 mg/kg. O fármaco foi administrado 30 minutos antes do treino (experimento 1), imediatamente após o treino (experimento 2), 30 minutos antes do teste (experimento 3) ou imediatamente após o teste (experimento 4). As injeções sistêmicas foram administradas em um volume constante de 1 ml/kg. O grupo controle foi tratado com um volume equivalente de salina fisiológica. As doses e o tempo de espera foram baseados em estudos anteriores (Clifton, Thomas e Hall 2018; Duclot et al., 2016; McGowan et al., 2017).

3.3 Equipamentos

Na sessão treino, os ratos foram condicionados a uma luz-CS, em uma caixa de condicionamento padrão (20 × 20 × 25 cm), constituída por teto, paredes laterais e traseira de aço inoxidável branco e Plexiglas transparentes na porta da frente (Figura 1A). O piso da caixa é formado por hastes de aço inoxidável, espaçadas por 1,0 cm, que foram eletrizadas por um gerador de choques. A caixa ficou localizada dentro de uma câmara ventilada e com atenuação acústica (66 × 43 × 45 cm). A caixa foi higienizada com álcool na concentração de 20%. Para as sessões teste e reteste, a mesma caixa de condicionamento foi utilizada. Nessas sessões, porém, foi adicionado ruído de fundo, produzido pelo exaustor presente na câmara ventilada, e uma base de plástico, a qual foi acoplada à caixa experimental, acima das hastes de aço inoxidável (Figura 1B). Além disso, a caixa foi higienizada com ácido acético na concentração de 5%. Essas modificações foram realizadas com o objetivo de diminuir potenciais interferências do contexto. Uma câmera de vídeo foi utilizada para registrar todas as sessões experimentais.

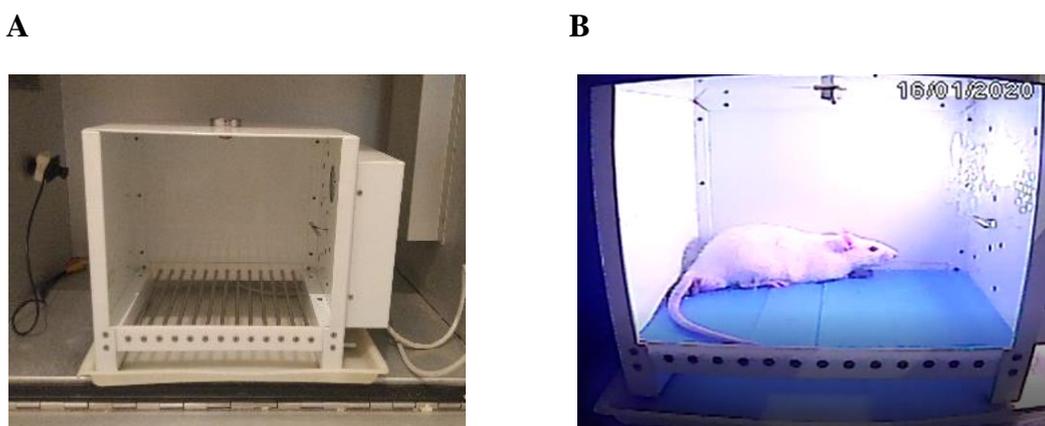


Figura 1. A) Fotografia da caixa experimental que foi utilizada na sessão treino do medo condicionado à luz. B) Fotografia da caixa experimental que foi utilizada nas sessões teste e reteste do medo condicionado à luz. Nessa imagem, é possível visualizar a base de plástico acoplada à caixa, acima das hastes de aço inoxidável. Fonte: Próprio autor.

3.4 Procedimentos

Sessão treino: Antes de iniciar o treino, os ratos passaram por uma fase de habituação e exploração da caixa de condicionamento, que teve duração de 5 minutos. Logo após, ocorreu a apresentação da primeira luz, seguida do choque. A luz de 6-W foi apresentada por 20 segundos e coterminou com o choque de 0,6 mA nas patas, o qual teve duração de 1 segundo. As apresentações dos estímulos foram controladas por um microprocessador e uma placa de entrada/saída. No total, os sujeitos receberam 10 pares de CS-US. O intervalo entre as apresentações variou, aleatoriamente, entre 60 e 90 segundos. Os ratos foram removidos imediatamente após o último pareamento e retornaram para as gaiolas moradia. A sessão teve duração de 20 minutos, aproximadamente.

Sessão teste e sessão reteste: Vinte e quatro e quarenta e oito horas após o treino, as sessões teste e reteste foram realizadas, respectivamente. O tempo de habituação à caixa foi de 5 minutos. Após esse período, os sujeitos receberam 10 apresentações de CS (luz: 20 s, 6 W), sem o US, em intervalos que variaram entre 60 e 90 segundos, aleatoriamente. As sessões teste e reteste tiveram duração de 20 minutos, aproximadamente. Todo o procedimento foi baseado em estudo anterior do nosso laboratório (de Vita, Zapparoli, Reimer, Brandão & de Oliveira, 2021). A medida comportamental utilizada para avaliar o medo condicionado foi o tempo de congelamento durante a apresentação da luz. O congelamento foi operacionalmente definido como ausência total do movimento do corpo e das vibrissas, exceto movimentos respiratórios, conforme observado em estudos anteriores (de Oliveira, Reimer, Reis & Brandão, 2013; de Vita, et al., 2021).

3.5 Delineamento Experimental

Os animais chegaram ao biotério setorial e, após o período de habituação mínimo de três dias, os procedimentos experimentais foram iniciados. Os sujeitos foram divididos em 4

grupos, com $n = 12$ para cada grupo: salina, cetamina 10 mg/kg, cetamina 20 mg/kg e cetamina 30 mg/kg. Foram realizados 4 experimentos.

3.5.1 Experimento 1: Efeitos da cetamina administrada antes do Treino de medo condicionado à luz

O experimento 1 teve a finalidade de investigar os efeitos da cetamina sobre a aquisição do medo condicionado. Os sujeitos receberam as respectivas doses determinadas para cada grupo 30 minutos antes da sessão treino de medo condicionado à luz. Após esse período, a sessão treino foi iniciada. 24 e 48 h após a sessão treino, ocorreram as sessões teste e reteste de medo condicionado, respectivamente. Todas as sessões tiveram uma duração aproximada de 20 minutos. A representação esquemática abaixo torna possível visualizar o experimento 1 (Figura 2).



Figura 2. Delineamento do experimento 1. Fonte: Próprio autor.

3.5.2 Experimento 2: Efeitos da cetamina administrada imediatamente após o Treino de medo condicionado à luz

No experimento 2, as respectivas doses para cada grupo foram administradas imediatamente após a sessão treino. O objetivo foi investigar os efeitos da cetamina sobre a consolidação da aprendizagem aversiva. As sessões teste e reteste ocorreram 24 e 48 h após o

treino, respectivamente, e duraram aproximadamente 20 minutos. Esse delineamento pode ser visualizado no esquema abaixo (Figura 3).

Experimento 2 – Cetamina administrada imediatamente após o treino de medo condicionado à luz

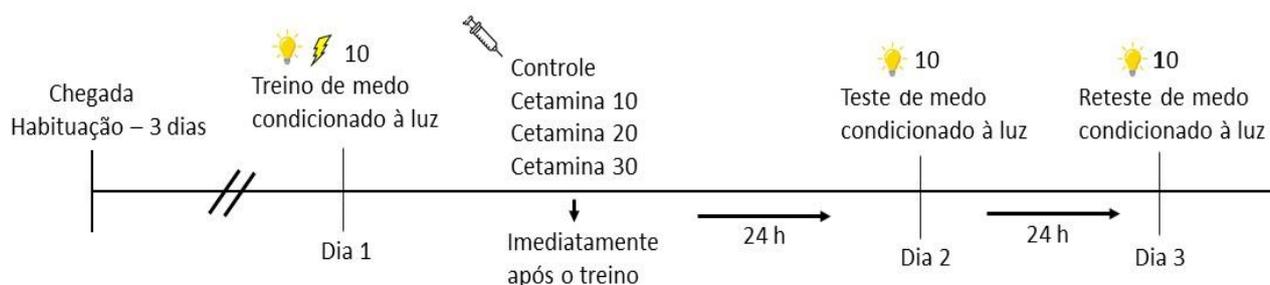


Figura 3. Delineamento do experimento 2. Fonte: Próprio autor.

3.5.3 Experimento 3: Efeitos da cetamina administrada antes do Teste de medo condicionado à luz

No experimento 3, os animais foram submetidos ao treino do medo condicionado à luz e passaram pela sessão teste 24 h depois. A cetamina foi administrada 30 minutos antes do teste, conforme as doses determinadas. O propósito desse experimento foi avaliar os efeitos da cetamina sobre a expressão do congelamento condicionado e aprendizagem de extinção. A sessão reteste ocorreu 24 h após o teste, ou seja, 48 h após o treino. O delineamento pode ser analisado mais detalhadamente na figura 4.

Experimento 3 – Cetamina administrada antes do teste de medo condicionado à luz

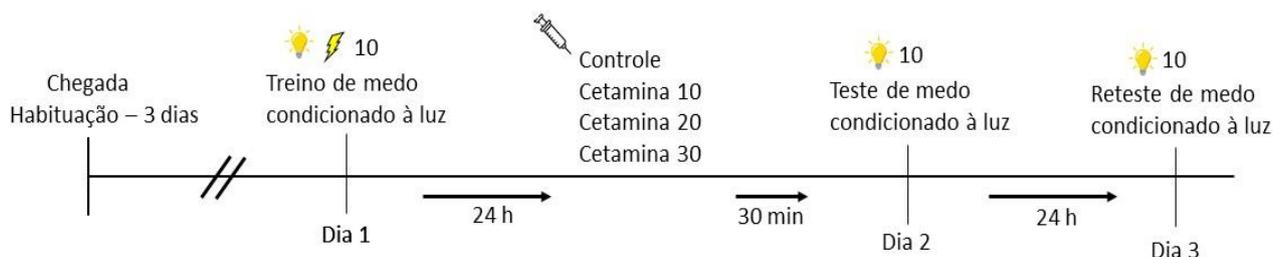


Figura 4. Delineamento do experimento 3. Fonte: Próprio autor.

3.5.4 Experimento 4: Efeitos da cetamina administrada imediatamente após o Teste de medo condicionado à luz

No experimento 4, os animais foram submetidos ao treino de medo condicionado à luz e, 24 h depois, passaram pela sessão teste. Imediatamente após a sessão teste os grupos receberam as respectivas doses previamente especificadas. O reteste ocorreu 24 h após o teste, totalizando 48 h da sessão treino. O objetivo desse experimento foi avaliar os efeitos da cetamina sobre a consolidação da memória de extinção. A representação esquemática pode ser analisada abaixo (Figura 5).

Experimento 4 – Cetamina administrada imediatamente após o teste de medo condicionado à luz



Figura 5. Delineamento do experimento 4. Fonte: Próprio autor.

3.6 Análise de dados

Os dados são apresentados como média \pm EPM. Para análise dos dados, foram utilizadas análises de variância (ANOVAs) de duas vias com medidas repetidas. Um fator correspondeu aos tratamentos (Controle \times Cet 10 \times Cet 20 \times Cet 30) e o outro à fase ou sessão do protocolo (L1 \times L2 \times L3 \times L4 \times L5 \times L6 \times L7 \times L8 \times L9 \times L10 ou Teste \times Reteste). Após as ANOVAs, em caso de significância estatística, foi utilizado o teste post hoc de Tukey. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

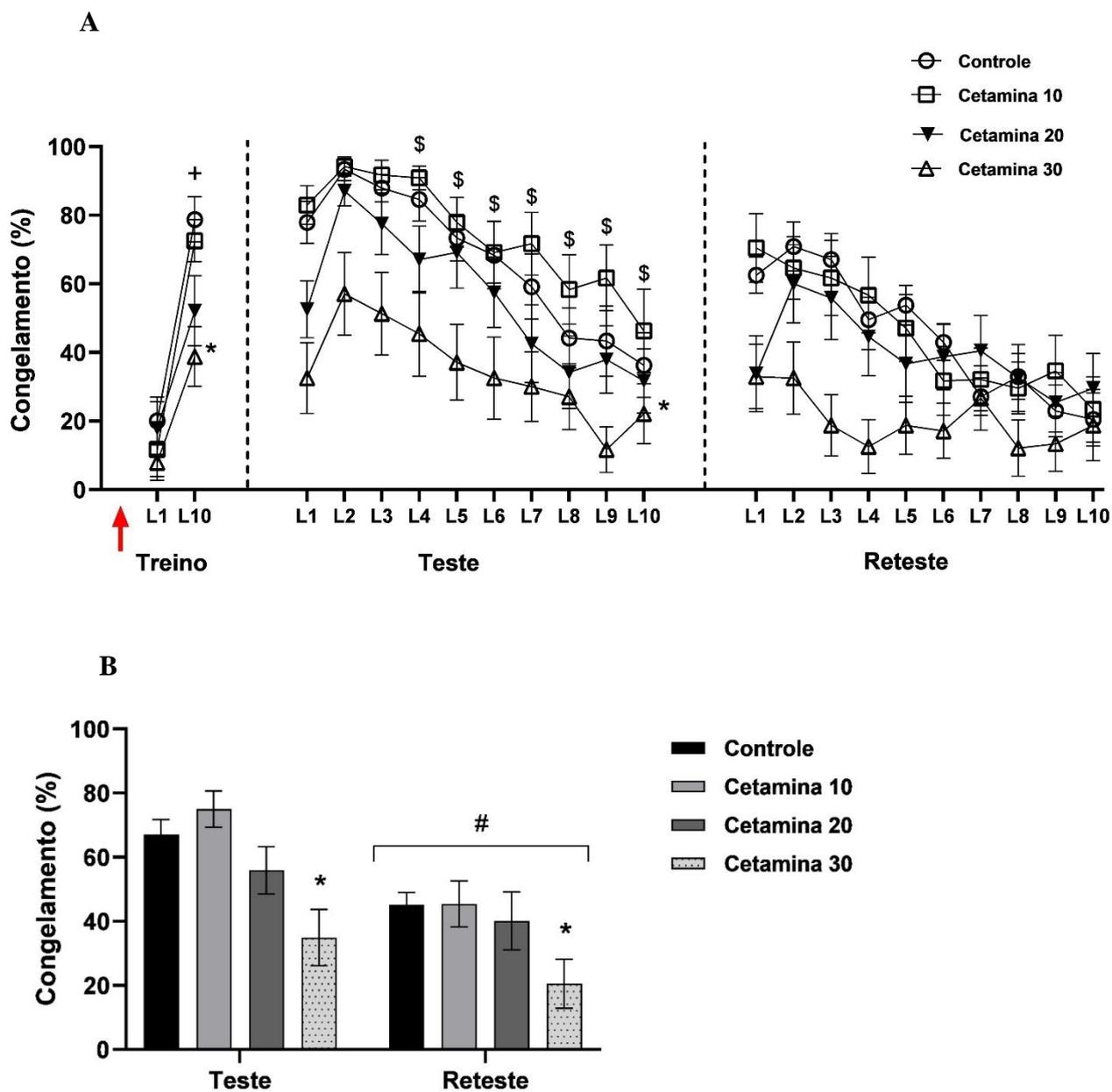
4.1 Experimento 1: Efeitos da cetamina administrada antes do Treino de medo condicionado à luz

A figura 6 apresenta os efeitos da cetamina, administrada 30 minutos antes do treino, sobre a resposta de congelamento em ratos expostos ao protocolo de medo condicionado à luz. Na figura 6A podem ser observadas as porcentagens médias de congelamento, por grupo, em relação aos 20 segundos de cada apresentação de luz durante o início e final do Treino, durante o Teste e o Reteste. Para o Treino, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo para o fator fase ($L1 \times L10$; $F_{1,44} = 103,20$; $p < 0,05$), para o tratamento (Controle \times Cet 10 \times Cet 20 \times Cet 30; $F_{3,44} = 3,36$; $p < 0,05$) e interação entre os fatores (fase \times tratamento; $F_{3,44} = 3,04$; $p < 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou aumento do congelamento ao final do treino, para todos os grupos, em relação ao congelamento observado antes do pareamento da luz com os choques ($p < 0,05$). O teste também revelou uma diminuição do congelamento do grupo Cet 30, em relação ao grupo Controle, ao final do treino ($p < 0,05$).

Para a sessão Teste, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo para os fatores fase ($L1 \times L2 \times L3 \times L4 \times L5 \times L6 \times L7 \times L8 \times L9 \times L10$; $F_{9,396} = 28,64$; $p < 0,05$) e tratamento (Controle \times Cet 10 \times Cet 20 \times Cet 30; $F_{3,44} = 6,90$; $p < 0,05$). Não foi observada interação entre os fatores (fase \times tratamento; $F_{27,396} = 0,82$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou diminuição do congelamento do grupo Cet 30 em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). A análise também apontou diminuição do congelamento em L4-L10 em relação ao pico de congelamento observado em L2 ($p < 0,05$), independente do tratamento utilizado.

Para a sessão Reteste, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas apontou efeito significativo para o fator fase ($L1 \times L2 \times L3 \times L4 \times L5 \times L6 \times L7 \times L8 \times L9 \times L10$; $F_{9,396} = 16,00$; $p < 0,05$) e interação entre os fatores (fase \times tratamento; $F_{27,396} = 2,29$; $p < 0,05$). Não houve efeito significativo para o fator tratamento (Controle \times Cet 10 \times Cet 20 \times Cet 30; $F_{3,44} = 2,68$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença para o grupo Controle na fase L7 em relação a fase L1 e nas fases L7-L10 em relação a L2 e L3 ($p < 0,05$). O grupo Cet10 diminuiu o congelamento nas fases L7, L8 e L10 em relação a L1, em L7 em relação a L2 e em L7 e L8 em relação a L3 ($p < 0,05$).

Na figura 6B estão apresentadas as porcentagens médias de congelamento em relação ao tempo total de apresentação da luz durante as sessões Teste e Reteste, realizadas 24 e 48 horas após o Treino. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas apontou efeito significativo para o fator sessão (Teste \times Reteste; $F_{1,44} = 62,06$; $p < 0,05$) e para o fator tratamento (Controle \times Cet 10 \times Cet 20 \times Cet 30; $F_{3,44} = 4,93$; $p < 0,05$). Não houve interação significativa entre os fatores (sessão \times tratamento; $F_{3,44} = 1,78$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou menor congelamento no grupo Cet30 em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$). Houve também uma diminuição significativa do congelamento na sessão Reteste em relação a sessão Teste ($p < 0,05$).



4.2 Experimento 2: Efeitos da cetamina administrada imediatamente após o Treino de medo condicionado à luz

A figura 7 apresenta os efeitos da cetamina administrada imediatamente após o treino, sobre a resposta de congelamento em ratos expostos ao protocolo de medo condicionado à luz. Na figura 7A podem ser observadas as porcentagens médias de congelamento, por grupo, em relação aos 20 segundos de cada apresentação de luz durante o início e final do Treino, durante o Teste e o Reteste. Na sessão Treino, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas apontou efeito significativo para o fator fase ($L1 \times L10$; $F_{1,44} = 15,35$; $p < 0,05$), mas não para o tratamento (Controle \times Cet 10 \times Cet 20 \times Cet 30; $F_{3,44} = 2,75$; $p > 0,05$) ou interação entre os fatores (fase \times tratamento; $F_{3,44} = 0,09$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou aumento do congelamento ao final do treino, em relação ao congelamento observado antes do condicionamento ($p < 0,05$).

Em relação a sessão Teste, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo para o fator fase ($L1 \times L2 \times L3 \times L4 \times L5 \times L6 \times L7 \times L8 \times L9 \times L10$; $F_{9,396} = 19,19$; $p < 0,05$), mas não para o fator tratamento (Controle \times Cet 10 \times Cet 20 \times Cet 30; $F_{3,44} = 1,52$; $p > 0,05$). Não foi observada interação entre os fatores (fase \times tratamento; $F_{27,396} = 0,83$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou diminuição do congelamento nas fases L5-L10 em relação ao pico de congelamento observado em L2 ($p < 0,05$), independente do tratamento utilizado. Para a sessão Reteste, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas apontou efeito significativo apenas para o fator fase ($L1 \times L2 \times L3 \times L4 \times L5 \times L6 \times L7 \times L8 \times L9 \times L10$; $F_{9,396} = 18,83$; $p < 0,05$). Não houve efeito significativo para o fator tratamento (Controle \times Cet 10 \times Cet 20 \times Cet 30; $F_{3,44} = 1,15$; $p > 0,05$) ou interação entre os fatores (fase \times tratamento; $F_{27,396} = 0,98$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença do congelamento, independente do grupo, nas fases L2 e L7-L10 em relação a L1, L4-L10 em

relação a L2, L7-L10 em relação a L3, L8-L10 em relação a L4, e L8 e L10 em relação a L5 ($p < 0,05$).

Na figura 7B estão apresentadas as porcentagens médias de congelamento em relação ao tempo total de apresentação da luz durante as sessões Teste e Reteste, realizadas 24 e 48 horas após o Treino. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas apontou efeito significativo para o fator sessão (Teste \times Reteste; $F_{1,44} = 70,39$; $p < 0,05$), mas não para o fator tratamento (Controle \times Cet 10 \times Cet 20 \times Cet 30; $F_{3,44} = 1,50$; $p > 0,05$) ou interação entre os fatores (sessão \times tratamento; $F_{3,44} = 0,42$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou diminuição significativa do congelamento na sessão Reteste em relação a sessão Teste ($p < 0,05$).

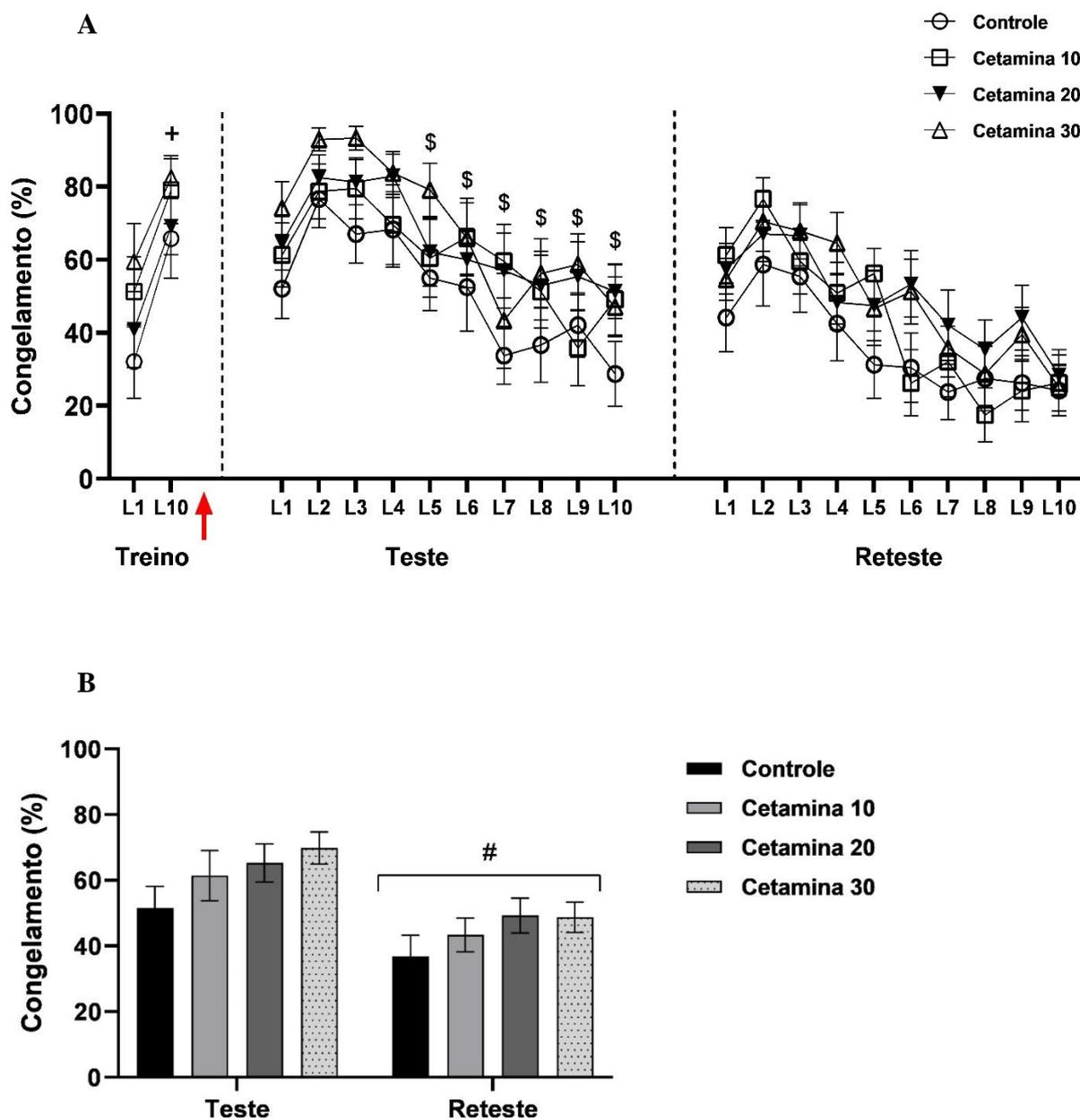


Figura 7. Efeitos da administração de cetamina, imediatamente após o treino, sobre o medo condicionado à luz. **A)** Porcentagem média de congelamento em relação aos 20 segundos de cada apresentação do estímulo condicionado nas fases de Treino, Teste e Reteste. A seta vermelha indica o momento da administração de salina ou cetamina nas diferentes doses. **B)** Porcentagem média de congelamento em relação ao tempo total de apresentação do estímulo condicionado nas sessões Teste e Reteste. + $p < 0,05$: diferente do início do treino (L1); \$ $p < 0,05$: diferente da fase L2 na sessão teste; # $p < 0,05$: diferente da sessão Teste; Média \pm EPM. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey. $n = 12$ para todos os grupos.

4.3 Experimento 3: Efeitos da cetamina administrada antes do Teste de medo condicionado à luz

A figura 8 apresenta os efeitos da cetamina administrada 30 minutos antes do Teste sobre a resposta de congelamento em ratos expostos ao protocolo de medo condicionado à luz. Na figura 8A estão apresentadas as porcentagens médias de congelamento, por grupo, em relação aos 20 segundos de cada apresentação de luz durante o início e final do Treino, durante o Teste e o Reteste. Na sessão Treino, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas apontou efeito significativo para o fator fase ($L1 \times L10$; $F_{1,44} = 52,20$; $p < 0,05$), mas não para o tratamento (Controle \times Cet 10 \times Cet 20 \times Cet 30; $F_{3,44} = 0,63$; $p > 0,05$) ou interação entre os fatores (fase \times tratamento; $F_{3,44} = 1,08$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou aumento do congelamento ao final do treino em relação ao congelamento observado antes do condicionamento ($p < 0,05$).

Para a sessão Teste, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo para o fator fase ($L1 \times L2 \times L3 \times L4 \times L5 \times L6 \times L7 \times L8 \times L9 \times L10$; $F_{9,396} = 14,44$; $p < 0,05$), mas não para o fator tratamento (Controle \times Cet 10 \times Cet 20 \times Cet 30; $F_{3,44} = 1,70$; $p > 0,05$). Não foi observada interação entre os fatores (fase \times tratamento; $F_{27,396} = 1,04$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou diminuição do congelamento nas fases L6-L10 em relação a L2 e L3, fases com pico da resposta de congelamento durante o teste ($p < 0,05$), independente do tratamento utilizado. Na sessão Reteste, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas apontou efeito significativo para o fator fase ($L1 \times L2 \times L3 \times L4 \times L5 \times L6 \times L7 \times L8 \times L9 \times L10$; $F_{9,396} = 33,70$; $p < 0,05$) e para o fator tratamento (Controle \times Cet 10 \times Cet 20 \times Cet 30; $F_{3,44} = 4,62$; $p < 0,05$). Não houve interação entre os fatores (fase \times tratamento; $F_{27,396} = 0,99$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey revelou um aumento significativo no congelamento dos grupos Cet20 e Cet30 em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$). A análise também indicou diferença do congelamento nas fases L2 e L7-L10 em

relação a L1, L4-L10 em relação a L2, L6-L10 em relação a L3 e L4, L9 e L10 em relação a L5 e L6, e L9 em relação a L7 ($p < 0,05$).

Na figura 8B estão apresentadas as porcentagens médias de congelamento em relação ao tempo total de apresentação da luz durante as sessões Teste e Reteste, realizadas 24 e 48 horas após o Treino. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas apontou interação entre os fatores (sessão \times tratamento; $F_{3,44} = 7,23$; $p < 0,05$), mas não revelou efeito significativo para os fatores sessão (Teste \times Reteste; $F_{1,44} = 0,82$; $p > 0,05$) e tratamento (Controle \times Cet 10 \times Cet 20 \times Cet 30; $F_{3,44} = 1,74$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou diminuição significativa no congelamento do grupo Controle no Reteste em relação ao Teste ($p < 0,05$). Na sessão Reteste houve um aumento no congelamento do grupo Cet20 em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$).

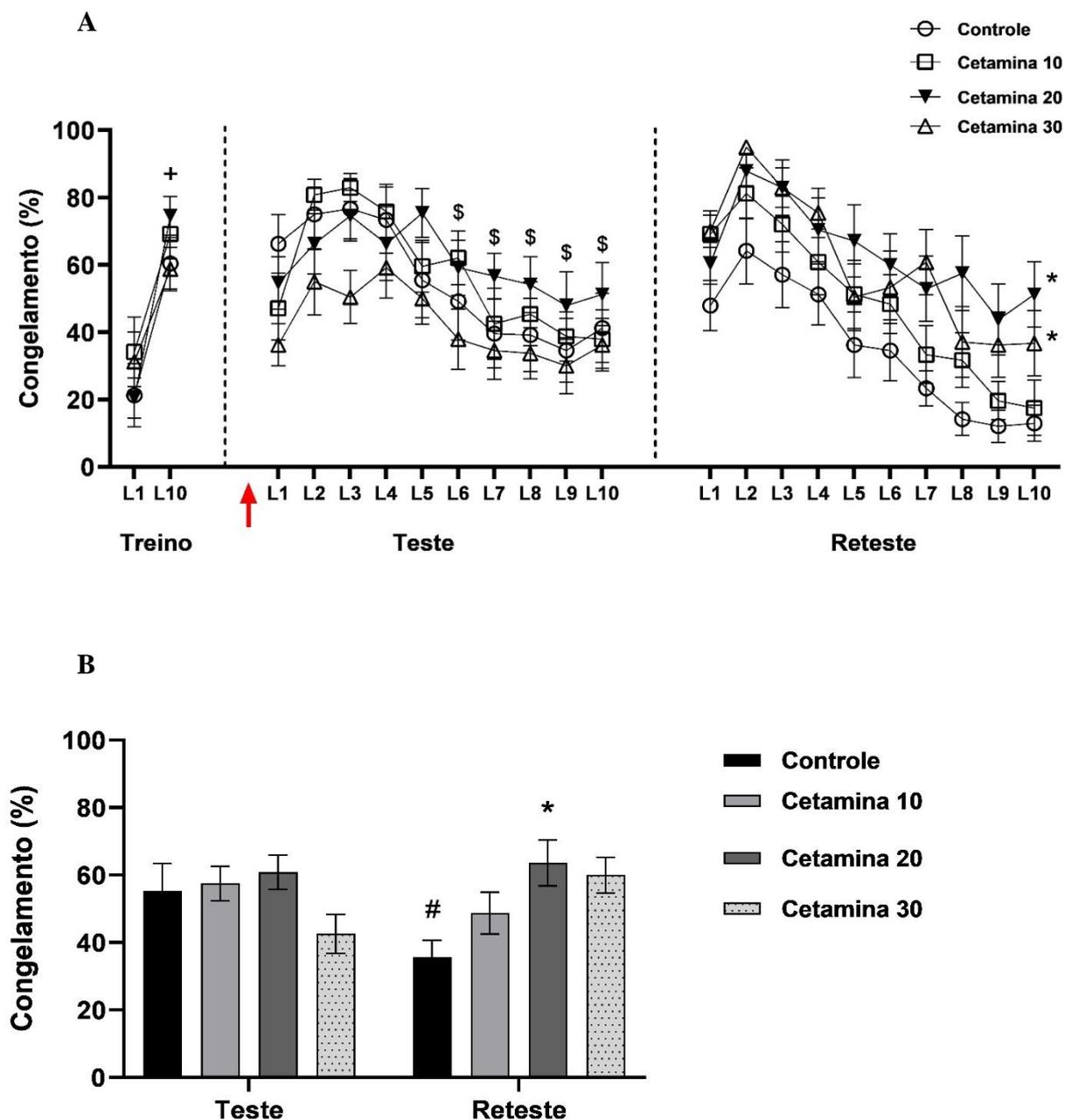


Figura 8. Efeitos da administração de cetamina, 30 minutos antes do Teste, sobre o medo condicionado à luz. **A)** Porcentagem média de congelamento em relação aos 20 segundos de cada apresentação do estímulo condicionado nas fases de Treino, Teste e Reteste. A seta vermelha indica o momento da administração de salina ou cetamina nas diferentes doses. **B)** Porcentagem média de congelamento em relação ao tempo total de apresentação do estímulo condicionado nas sessões Teste e Reteste. + $p < 0,05$: diferente do início do treino (L1); * $p < 0,05$: diferente do grupo Controle na mesma sessão; \$ $p < 0,05$: diferente das fases L2 e L3 no teste; # $p < 0,05$: diferente da sessão Teste; Média \pm EPM. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey. $n = 12$ para todos os grupos.

4.4 Experimento 4: Efeitos da cetamina administrada imediatamente após o Teste de medo condicionado à luz

A figura 9 apresenta os efeitos da cetamina administrada imediatamente após o Teste, sobre a resposta de congelamento em ratos expostos ao protocolo de medo condicionado à luz. Na figura 9A é possível observar as porcentagens médias de congelamento, por grupo, em relação 20 segundos de cada apresentação de luz durante o início e final do Treino, durante o Teste e o Reteste. Na sessão Treino, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas apontou efeito significativo para o fator fase ($L1 \times L10$; $F_{1,44} = 61,00$; $p < 0,05$), mas não para o tratamento (Controle \times Cet 10 \times Cet 20 \times Cet 30; $F_{3,44} = 1,79$; $p > 0,05$) ou interação entre os fatores (fase \times tratamento; $F_{3,44} = 0,67$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou aumento do congelamento ao final do treino, para todos os grupos, em relação ao congelamento observado antes do condicionamento ($p < 0,05$).

Em relação a sessão Teste, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo apenas para o fator fase ($L1 \times L2 \times L3 \times L4 \times L5 \times L6 \times L7 \times L8 \times L9 \times L10$; $F_{9,396} = 16,63$; $p < 0,05$). Não houve efeito para o fator tratamento (Controle \times Cet 10 \times Cet 20 \times Cet 30; $F_{3,44} = 2,74$; $p > 0,05$) ou interação entre os fatores (fase \times tratamento; $F_{27,396} = 1,41$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou diminuição do congelamento nas fases L5-L10, em relação a L2 ($p < 0,05$). Para a sessão Reteste, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas apontou efeito significativo para o fator fase ($L1 \times L2 \times L3 \times L4 \times L5 \times L6 \times L7 \times L8 \times L9 \times L10$; $F_{9,396} = 17,50$; $p < 0,05$), mas não para o fator tratamento (Controle \times Cet 10 \times Cet 20 \times Cet 30; $F_{3,44} = 1,30$; $p > 0,05$) ou interação entre os fatores (fase \times tratamento; $F_{27,396} = 0,59$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença do congelamento nas fases L2 e L8-L10 em relação a L1, L5-L10 em relação a L2, L6-L10 em relação a L3 e L4, e L8 e L10 em relação a L5 ($p < 0,05$).

Na figura 9B estão apresentadas as porcentagens médias de congelamento em relação ao tempo total de apresentação da luz durante as sessões Teste e Reteste, realizadas 24 e 48 horas após o Treino. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas apontou efeito significativo para o fator sessão (Teste \times Reteste; $F_{1,44} = 112,71$; $p < 0,05$), mas não para o fator tratamento (Controle \times Cet 10 \times Cet 20 \times Cet 30; $F_{3,44} = 1,97$; $p > 0,05$) ou interação entre os fatores (sessão \times tratamento; $F_{3,44} = 1,62$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou diminuição significativa do congelamento na sessão Reteste em relação a sessão Teste ($p < 0,05$).

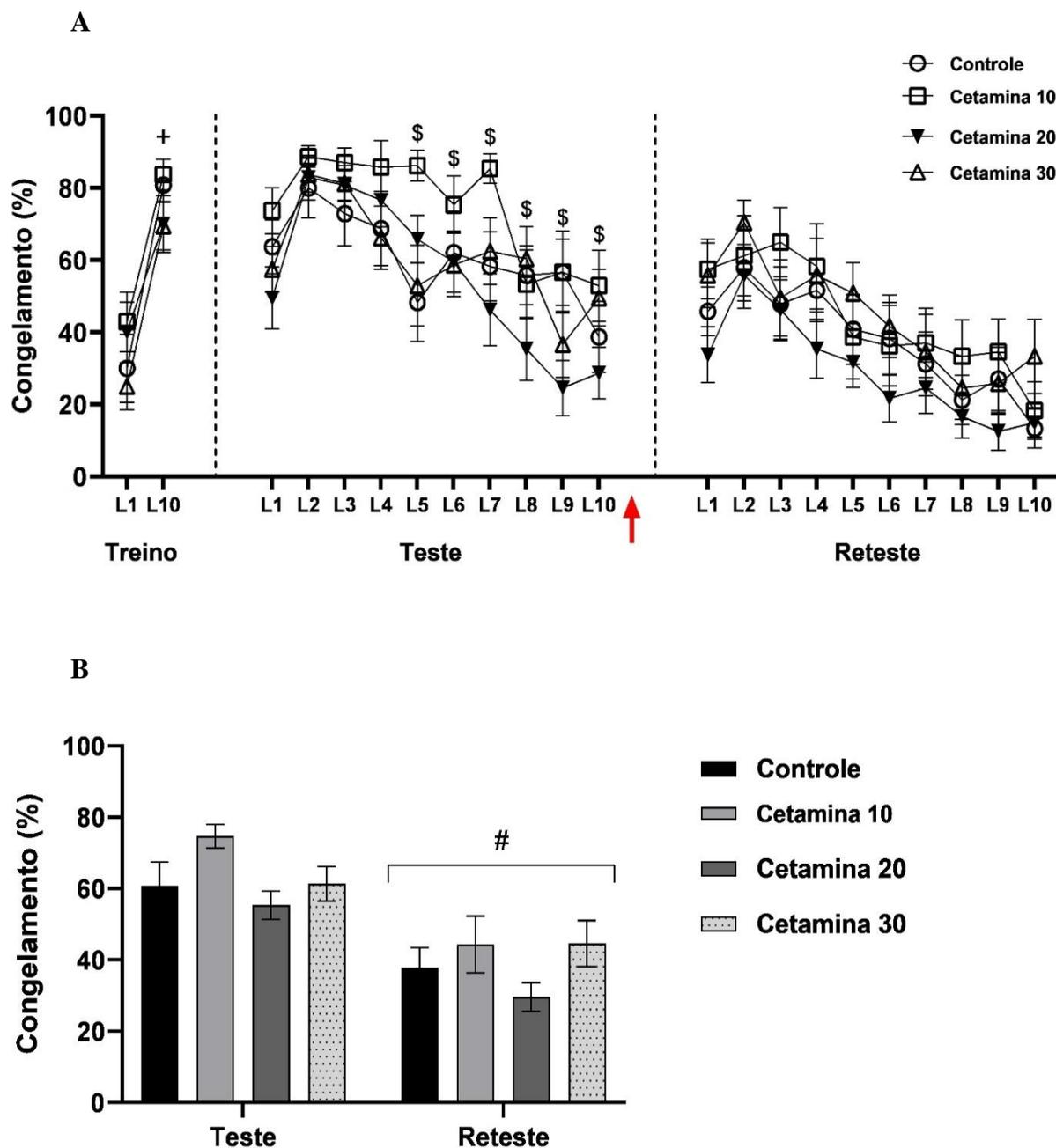


Figura 9. Efeitos da administração de cetamina, imediatamente após o Teste, sobre o medo condicionado à luz. **A)** Porcentagem média de congelamento em relação aos 20 segundos de cada apresentação do estímulo condicionado nas fases de Treino, Teste e Reteste. A seta vermelha indica o momento da administração de salina ou cetamina nas diferentes doses. **B)** Porcentagem média de congelamento em relação ao tempo total de apresentação do estímulo condicionado nas sessões Teste e Reteste. + $p < 0,05$: diferente do início do treino (L1); \$ $p < 0,05$: diferente da fase L2; # $p < 0,05$: diferente da sessão Teste; Média \pm EPM. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey. $n = 12$ para todos os grupos.

5. DICUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes doses sub-anestésicas de cetamina em diferentes momentos de administração sobre o medo condicionado à luz em ratos. Nós mostramos que uma única dose de cetamina de 30 mg/kg, administrada 30 minutos antes do condicionamento aversivo, atenuou a resposta de congelamento na sessão treino e nas sessões teste e reteste seguintes, 24 e 48 horas após o treino. O mesmo efeito não foi observado para as doses de 10 mg/kg ou 20 mg/kg. A cetamina administrada imediatamente após o treino de medo condicionado não apresentou efeito significativo nas sessões teste e reteste seguintes. A administração de cetamina nas doses de 20 mg/kg e 30 mg/kg, 30 minutos antes do teste, prejudicou a extinção, efeito observado na sessão reteste. Por último, a cetamina administrada imediatamente após a sessão teste de medo condicionado não alterou o congelamento na sessão reteste. Assim, tanto a dose quanto o momento de administração foram fatores importantes para os efeitos da cetamina no medo condicionado.

Em relação ao protocolo de medo condicionado utilizado, as análises gerais e a análise temporal para cada apresentação da luz (20 s) permitem notar a sua efetividade. Para essa observação, serão consideradas apenas as respostas dos grupos controle, em que não há interferência dos tratamentos. Na fase de treino, em todos os experimentos, houve um aumento considerável da porcentagem de tempo de congelamento ao final da sessão em comparação ao início. Isso indica que o estímulo inicialmente neutro (luz) foi associado ao US (choque) e se tornou um CS, o que demonstra aprendizagem. Na fase inicial do teste, os grupos controle de todos os experimentos apresentam congelamento maior do que aquele observado no início do treino, outra manifestação da aprendizagem que ocorreu anteriormente. Essa é uma evidência de que houve consolidação da memória da associação CS-US. Além disso, ao longo da sessão teste, nota-se uma diminuição gradual das respostas

de congelamento, o que indica aprendizagem de que o CS não mais prediz o US, uma evidência de extinção. No reteste, as respostas de congelamento continuaram diminuindo gradualmente ao longo da sessão. A análise comparativa entre teste e reteste, em todos os experimentos, demonstra que os grupos controle apresentaram congelamento menor na sessão reteste em relação a sessão teste, o que também indica a ocorrência de extinção. Assim, de forma semelhante a estudos anteriores, demonstramos que o protocolo utilizado é válido para o estudo do medo condicionado em suas diferentes fases (Radford et al., 2018; de Vita et al., 2021; de Oliveira, Reimer e Brandão, 2009).

Conforme observado no experimento 1, as doses de 10 e 20 mg/kg de cetamina não afetaram a aprendizagem aversiva quando administradas 30 minutos antes do treino de medo condicionado. No entanto, estudos prévios demonstram que doses de 8, 10 e 16 mg/kg de cetamina, administradas antes do treino, foram suficientes para bloquear a aprendizagem aversiva em diversas modalidades do medo condicionado (Pietersen et al., 2006; Pietersen et al., 2007; Calzavara et al., 2009; Bolton et al., 2012; Ali et al., 2020). Essa divergência entre os resultados parece depender do tipo de protocolo de condicionamento aversivo, das doses utilizadas, do momento de administração e/ou do período para a avaliação da memória aversiva (Choi et al., 2020; Silote et al., 2020). Por exemplo, doses de 8 e 10 mg/kg de cetamina, administradas 30 e 15 minutos antes do treino, no paradigma de condicionamento de traço, bloquearam a resposta condicionada ao som, avaliada 24 h depois (Bolton et al., 2012; Ali et al., 2020). No entanto, esse efeito não foi observado no procedimento padrão de condicionamento com atraso (Bolton et al., 2012; Ali et al., 2020). Ainda, a dose de 10 mg/kg de cetamina, administrada 1 h antes do treino de medo condicionado ao som, não afetou a aquisição da memória aversiva, avaliada em um teste 10 dias depois (Kulyk, 2017). Além disso, Yang et al., (2018) demonstraram que a dose de 5 mg/kg de cetamina, administrada 1 dia antes do condicionamento, aumentou a memória do medo contextual. Contudo, esse

aumento foi um indicativo de que a cetamina atenuou o comprometimento da memória causado pelo estresse crônico de derrota social em camundongos que expressavam um fenótipo tipo depressivo. Logo, diferentes características dos estudos podem influenciar nos efeitos produzidos pela cetamina administrada antes do condicionamento aversivo.

Ainda no experimento 1, todos os grupos apresentaram aumento do congelamento ao final da sessão treino em comparação ao início. Porém, o grupo tratado com cetamina na dose de 30 mg/kg apresentou congelamento substancialmente menor em relação ao grupo controle, indicativo de que a cetamina prejudicou a aquisição da memória aversiva. Uma hipótese alternativa é de que a cetamina tenha afetado a locomoção na sessão treino, visto que é bem estabelecido que antagonistas NMDA podem alterar a atividade locomotora (De Leonibus, Mele, Oliverio & Pert, 2001; Lorrain, Baccei, Bristow, Anderson & Varney 2003). Contudo, a diminuição do congelamento, notada 24 e 48 h depois no teste e reteste, não pode ser atribuída aos efeitos da cetamina na locomoção. É improvável que esses efeitos tenham durado 24 h (Imre, Fokkema, Boer & Ter Horst 2006). Estudos mostram que a cetamina possui uma meia vida de aproximadamente 1 h a 1,3 h em ratos (Wang et al., 2012; Veilleux-Lemieux, Castel, Carrier, Beaudry & Vachon, 2013). Uma outra questão a ser levantada é o potencial da cetamina para indução de analgesia (Zanos et al., 2018). Visto que na sessão treino o grupo cetamina 30 mg/kg apresentou um menor congelamento em relação ao grupo controle, há a sugestão de que essa dose tenha interferido na responsividade ao choque devido a potenciais efeitos analgésicos. Em função disso, a associação entre estímulo neutro e US estaria prejudicada, o que explicaria a diminuição do congelamento desse grupo, observada no treino, no teste e no reteste. Essa possibilidade não pode ser descartada, mas uma das principais características da analgesia é o aumento da imobilidade (Sonner et al., 2003; Brosnan & Thiesen, 2012; Petrenko, Yamakura, Sakimura & Baba, 2014).

Diferente dos nossos achados, o estudo de McGowan et al. (2017) mostrou que a cetamina administrada 1 h antes do condicionamento, na dose de 30 mg/kg, aumentou o congelamento durante a sessão treino. Além disso, diminuiu a distância percorrida durante a apresentação do choque. No entanto, na extinção, que ocorreu 4 dias depois do condicionamento, os grupos controle e de tratamento exibiram níveis iguais de congelamento durante quase toda a sessão (McGowan et al., 2017). Em outra investigação, a dose de 30 mg/kg de cetamina, administrada 1 h e 1 semana antes do condicionamento aversivo, não amenizou a generalização do medo ou diminuiu o congelamento em relação ao estímulo condicionado, com teste realizado 24 h depois (Asim et al., 2020). Porém, a dose de 30 mg/kg, administrada 1 semana antes do medo contextual, amenizou expressivamente o congelamento na extinção, realizada 4 dias depois (McGowan et al., 2017).

Mais próximo dos nossos resultados, o trabalho de Clifton, Thomas e Hall (2018) demonstrou que a dose de 25 mg/kg de cetamina, administrada 30 minutos antes do treino de medo condicionado ao contexto, diminuiu significativamente o congelamento numa sessão de *recall* realizada 48 h depois. Contudo, quando a droga foi administrada novamente em uma sessão subsequente, a resposta condicionada foi restabelecida. A sugestão fornecida pelos autores é de que a cetamina atuaria para ajudar na recuperação da memória do medo condicionado, de modo que essa expressão dependeria tanto de pistas exteroceptivas quanto interoceptivas, um efeito dependente de estado. Além desse estudo, outros demonstram o potencial da cetamina para dependência de estado (Jackson, Koek & Colpaert 1992; Aguado, Antonio, Pérez, Valle & Gómez 1994). Em nosso trabalho, utilizamos vários grupos e avaliamos os efeitos da cetamina em diferentes momentos, o que permite que os seus efeitos sejam explorados em diversos fenômenos relacionados à memória. Apesar disso, nós não exploramos detalhadamente a dependência de estado. Mas, especificamente para os resultados do experimento 1, esse fenômeno pode ser descartado, uma vez que a diminuição do

congelamento foi observada tanto na sessão em que houve o tratamento com cetamina (treino) quanto nas sessões subsequentes (teste e reteste), sem droga.

Embora alguns achados apontem outros mecanismos, que não processos de memória mediando os efeitos da cetamina observados no experimento 1, outras evidências sugerem que a diminuição do congelamento pode estar, de fato, relacionada ao caráter da cetamina como antagonista NMDA. Durante a aquisição do medo, a ativação do receptor NMDA é o primeiro passo para a cascata bioquímica que resultará em plasticidade sináptica (Maren, 2001). Os receptores NMDA estão altamente expressos na amígdala. Especialmente na amígdala basolateral, centro de mudanças associativas durante o condicionamento, os receptores NMDA atuam mediando a LTP (Maren, Aharonov, Stote & Fanselow, 1996). A sugestão é de que a LTP, produzida pela ativação desse receptor, aumenta a eficácia das sinapses, o que culmina em aprendizagem (Pare, Quirk & Ledoux, 2004). O antagonismo do receptor NMDA, nesse sentido, prejudica esse mecanismo, o que resulta em falha na aquisição e estabelecimento da aprendizagem aversiva (Lee & Kim, 1998). Microinjeção de outros antagonistas NMDA, como o AP5, diretamente no complexo basolateral da amígdala, prejudica a aquisição da memória aversiva em diversas modalidades do medo condicionado (Campeau, Miserendino & Davis, 1992; Lee & Kim, 1998; Roesler et al., 2000; Laurent & Westbrook, 2009). Além disso, a diminuição do medo condicionado, resultado da administração de AP5 na amígdala basolateral, não foi devida a uma insensibilidade ao choque (Miserendino, Sananes, Melia & Davis, 1990).

Em doses mais baixas, é provável que antagonistas NMDA atuem de forma preferencial em neurônios GABAérgicos, ação que levaria a uma desinibição de neurônios excitatórios e resultaria em plasticidade sináptica (Cohen, Tsien, Goff & Halassa, 2015; Ali et al., 2020). Porém, a hipótese é de que em concentrações mais altas, essa ação seria menos restrita e inibiria, também, neurônios excitatórios glutamatérgicos (Lisman, et al., 2008).

Assim, é possível que a diminuição do congelamento com a dose 30 mg/kg de cetamina, no protocolo utilizado em nosso estudo, esteja relacionada ao bloqueio dos receptores NMDA na amígdala, e conseqüentemente, inibição da plasticidade sináptica subjacente aos processos de memória e aprendizagem aversiva. Complementarmente, quando a cetamina foi administrada imediatamente após o condicionamento aversivo, no experimento 2, não foram notados efeitos em nenhuma das doses utilizadas. Esses resultados sugerem que, em nossa pesquisa, a cetamina deve ter interferido em mecanismos neurobiológicos necessários para a aquisição da memória aversiva durante o condicionamento, e não na consolidação dessa aprendizagem. Pesquisas futuras poderiam avaliar processos moleculares relacionados aos efeitos da cetamina durante a aquisição do medo condicionado.

A não observação de efeitos significativos da cetamina no experimento 2, em que a administração ocorreu imediatamente após o treino de medo condicionado, indica que a cetamina não interferiu na consolidação da memória aversiva. O congelamento dos grupos tratados com cetamina não diferiu do grupo controle na sessão teste seguinte. Resultados anteriores demonstram que doses de 25 e 30 mg/kg de cetamina, administradas imediatamente após o condicionamento aversivo ao contexto e ao som, não interferiram no comportamento de congelamento, avaliado 24 e 48 h depois (Clifton, Thomas e Hall; Asim et al., 2020). Uma outra investigação não encontrou efeito significativo da dose de 30 mg/kg de cetamina administrada 1 h depois do condicionamento. Na sessão de extinção, que ocorreu 4 dias depois, os grupos salina e cetamina expressaram níveis iguais de congelamento (McGowan et al., 2017). Contudo, a administração de 10 mg/kg de cetamina, logo após o condicionamento, atenuou a expressão da resposta condicionada ao som na primeira metade da extinção, avaliada 10 dias depois. Ainda, a cetamina não influenciou a expressão da extinção em um reteste seguinte (Kulyk, 2017). Ao que parece, um atraso mais longo entre a administração imediata da cetamina e a extinção pode exercer um efeito na consolidação da aprendizagem

aversiva. Em nosso estudo, a avaliação dos efeitos da cetamina na consolidação do medo condicionado ocorreu 24 e 48 h após as injeções. Assim, não observamos se a cetamina poderia ter interferido em fases mais tardias da consolidação da memória aversiva. Além desses achados, resultados sugerem que os efeitos da cetamina no medo condicionado podem ser diferentes em função da via e duração da administração. Radford et al. (2018) encontrou que a dose de 10 mg/kg de cetamina, administrada imediatamente após o condicionamento, mas por via intravenosa durante 2 h, aumentou a expressão da memória aversiva, avaliada 2 dias depois. Por outro lado, a mesma dose administrada por via intraperitoneal, após o condicionamento, não teve efeito na recuperação do medo condicionado, avaliado 2 dias mais tarde.

Existe a premissa de que a cetamina administrada após uma experiência traumática poderia aumentar a probabilidade de desenvolver TEPT devido aos seus efeitos psicoativos (McGhee, Maani, Garza, Gaylord & Black 2008). McGhee et al. (2008) encontraram um efeito contrário em seu estudo. Foi demonstrado que soldados do serviço americano que haviam sofrido queimaduras, e que receberam cetamina durante cirurgias, tiveram uma menor prevalência de TEPT do que aqueles que não receberam. Contudo, em um segundo estudo, não foi encontrada uma menor incidência de TEPT entre os soldados. Também não foi observado um aumento na prevalência decorrente da administração de cetamina (McGhee et al., 2014). Portanto, é possível notar que divergências nos resultados dos estudos que utilizam a cetamina imediatamente após uma experiência traumática não se limitam apenas às pesquisas pré-clínicas. Em concordância com o estudo conduzido por McGhee e com achados pré-clínicos, nós também não observamos efeitos da cetamina na memória aversiva quando administrada imediatamente após o condicionamento.

No experimento 3, o objetivo foi avaliar os efeitos da cetamina na expressão do medo condicionado e na aprendizagem da extinção. Mostramos que a cetamina administrada 30

minutos antes do teste de medo condicionado não interferiu na expressão da memória aversiva e não afetou a extinção da resposta condicionada dentro da própria sessão teste. Pesquisas anteriores têm encontrado achados inconsistentes a respeito dos efeitos da cetamina na expressão do medo condicionado. Uma investigação mostrou que a dose de 30 mg/kg de cetamina, administrada 4 dias após o condicionamento e 1 h antes do teste de extinção, não alterou a expressão da memória aversiva e não afetou a extinção dentro da sessão (McGowan et al, 2017). Por outro lado, Radford et al. (2018) reportaram que a dose de 10 mg/kg de cetamina, administrada 24 h antes da extinção, e por via intravenosa durante 2 h, aumentou a expressão do medo condicionado, e conseqüentemente, prejudicou a extinção. Contrariamente, o tratamento com 10 mg/kg de cetamina, 1 h antes do teste de extinção, atenuou a expressão inicial do medo condicionado, avaliado 10 dias depois (Kulyk, 2017). Efeitos a longo prazo da cetamina foram notados por Asim et al. (2020) em um protocolo de generalização do medo. A administração de 30 mg/kg de cetamina 22 h depois do condicionamento, e 2 h antes do teste, não atenuou a expressão do congelamento ao estímulo condicionado, mas diminuiu a generalização do medo, efeito que se estendeu por duas semanas.

Embora a cetamina não tenha afetado a expressão do congelamento condicionado em nosso estudo, e não tenha interferido na extinção dentro da sessão teste, foi notado um comprometimento da extinção na sessão reteste, 24 h depois. As doses de 20 e 30 mg/kg aumentaram o congelamento na sessão reteste. Esse prejuízo na extinção pode estar relacionado a uma falha na aprendizagem da extinção, pois quando a cetamina foi administrada imediatamente após o teste, no experimento 4, não houve comprometimento na expressão da extinção no reteste. Esse resultado é, de certa forma, similar ao obtido no experimento 1, em que a cetamina na dose de 30 mg/kg parece ter comprometido a aquisição da memória aversiva quando administrada 30 minutos antes do treino. Mais uma vez, o efeito

visto no experimento 3 não pode ser atribuído a um comprometimento na atividade locomotora, pois foi observado 24 h após a administração da cetamina. Logo, a administração da cetamina nas doses de 20 e 30 mg/kg, 30 minutos antes do teste, pode ter prejudicado a aquisição da memória de extinção.

Uma explicação potencial para o aumento do congelamento notado no reteste, quando a cetamina foi administrada antes do teste, é que o seu uso prejudicou a aquisição da extinção através da sua ação como antagonista dos receptores NMDA na amígdala. Como uma nova forma de aprendizagem, a extinção implica processos de plasticidade sináptica que envolvem o fortalecimento de determinadas conexões neurais (Davis & Myers, 2007; Laurent, Marchand & Westbrook, 2008; Davis, 2011). O estabelecimento da plasticidade sináptica relacionado a extinção necessita de excitação, ao invés de inibição das células alvo (Makkar, Zhang & Cranney, 2010). Esse mecanismo envolve a despolarização da membrana do neurônio e ativação dos receptores NMDA por meio do glutamato, o que permite o influxo de Ca^{++} e desencadeia processos que levarão ao fortalecimento das sinapses em regiões específicas (Dingledine et al., 1999). A amígdala e o vmPFC, dentre outras estruturas, desempenham papel importante na extinção e inibição do medo condicionado a estímulos explícitos, como uma luz ou um som (Sotres-Bayon, Cain & LeDoux, 2006). Os receptores NMDA na amígdala parecem estar envolvidos com a iniciação da extinção, enquanto no vmPFC estão envolvidos com a consolidação da extinção (Davis, 2011). Dentre os circuitos de inibição dentro da amígdala, as células intercaladas desempenham um papel fundamental na extinção do medo condicionado (Quirk & Mueller, 2007). Esse conjunto de neurônios GABAérgicos recebe transmissão glutamatérgica da amígdala basolateral (Royer & Paré, 2002) e limita a transmissão excitatória entre os núcleos basolateral e central, o que resulta em supressão das respostas de medo (Maren, 2015). A ação do glutamato nos receptores NMDA tem uma função importante na plasticidade neural que permite aos neurônios GABAérgicos

mediarem a inibição quando apropriado (Davis & Myers, 2002). A nossa sugestão é de que a cetamina em doses mais altas, e administrada em um tempo relativamente próximo à extinção, pode ter interferido na atividade excitatória inicial do glutamato na amígdala basolateral. Isso conseqüentemente pode ter prejudicado processos de plasticidade sináptica necessários para a extinção do medo condicionado em áreas inibitórias. Em apoio a esta possibilidade, estudos mostram que antagonistas NMDA administrados sistemicamente ou diretamente no complexo basolateral da amígdala, antes da extinção, impedem a extinção do congelamento e do sobressalto potencializado pelo medo (Falls, Miserendino & Davis, 1992; Baker & Azorlosa, 1996; Lin, Yeh, Lu & Gean, 2003; Suzuki et al., 2004).

O fato de não termos observado efeito no congelamento quando a cetamina foi administrada imediatamente após a extinção, no experimento 4, indica que a sua atuação foi inicialmente na aquisição dessa aprendizagem, quando a administração ocorreu 30 minutos antes da sessão teste, no experimento 3. Porém, não notamos interferência da cetamina na expressão do congelamento durante a extinção, no experimento 3, o que sugere que o envolvimento dos receptores NMDA na extinção também é dependente do tempo. A consolidação da extinção envolve forte ativação mediada pelos receptores NMDA no córtex infralímbico, região do vmPFC (Burgos-Robles, Vidal-Gonzalez, Santini & Quirk 2007; Quirk & Mueller, 2009). Infusão de CPP, um antagonista NMDA, no vmPFC, antes ou imediatamente após a extinção, comprometeu a recuperação da extinção, avaliada 24 h depois (Burgos-Robles et al., 2007). Além disso, o bloqueio sistêmico dos receptores NMDA reduziu a ativação de alta frequência em neurônios do vmPFC. Em um experimento posterior, animais que apresentaram ativação diminuída no córtex infralímbico, 30 minutos após a extinção, falharam em recuperar a extinção 24 h depois (Burgos-Robles et al., 2007). A sugestão é de que a ativação produzida pelos receptores NMDA no córtex infralímbico desencadeia correntes de cálcio necessárias para a iniciação de processos moleculares que estabilizam a

memória de extinção (Quirk, Garcia & González-Lima, 2006). Semelhante ao nosso estudo, Clifton, Thomas e Hall (2018) demonstraram que doses de 8 e 25 mg/kg de cetamina, administradas 30 minutos antes do teste, não afetaram a expressão do medo condicionado. Além disso, a extinção dentro da sessão não foi influenciada pelo tratamento. No entanto, em um teste subsequente, realizado 48 h após, as doses utilizadas prejudicaram a recuperação da extinção, mas esse efeito não foi notado quando a cetamina foi administrada imediatamente após o primeiro teste (Clifton, Thomas & Hall, 2018). Em conjunto, esses resultados sugerem que a ativação inicial dos receptores NMDA durante a aquisição da extinção é necessária para a posterior estabilização e consolidação dessa memória. Estudos mostram que a D-cicloserina, um agonista parcial dos receptores NMDA, facilita a extinção do medo condicionado (Gabriele & Packard, 2007; Bouton, Vurbic & Woods, 2008).

Estudos anteriores apresentam resultados controversos a respeito dos efeitos da cetamina na extinção de memórias aversivas. Em algumas investigações a cetamina atua para facilitar a extinção (Girgenti et al., 2017; Kulyk, 2017), e em outras pesquisas, assim como no nosso estudo, a sua ação parece prejudicar essa aprendizagem (Clifton, Thomas e Hall, 2018; Radford et al., 2018). Os efeitos terapêuticos da cetamina são atribuídos, em grande parte, ao bloqueio seletivo que ela exerce nos receptores NMDA dos interneurônios GABAérgicos no córtex pré-frontal (Ali et al., 2020). Tal bloqueio leva a desinibição de neurônios piramidais e aumento dos disparos glutamatérgicos, o que causa uma ativação dos receptores AMPA pós-sinápticos. Essa ativação resulta na liberação aumentada do fator neurotrófico derivado do cérebro, ativação do receptor de tropomiosina quinase B e síntese protéica através do alvo mecanístico do complexo 1 de rapamicina (Zanos & Gould, 2018). Uma única dose de cetamina, administrada 24 horas antes da extinção, aumentou a recuperação da extinção em ratos, resultado que foi associado ao aumento da função sináptica no córtex pré-frontal medial (Girgenti et al., 2017).

Não notamos facilitação da extinção com a menor dose, mas grande parte dos estudos que demonstram que a cetamina atua para aumentar a extinção do medo condicionado utilizam doses mais baixas do que 10 mg/kg. Características metodológicas e resultados obtidos a respeito dos efeitos da cetamina na memória aversiva são muito diversos, o que torna a comparação direta entre os estudos algo difícil. Esses dados demonstram que existem estágios específicos em que a cetamina pode influenciar a memória aversiva. Além disso, a administração da cetamina muito próximo ao momento da extinção parece problemática, já que esse fator pode ter contribuído para o prejuízo na extinção, observado no experimento 3. Esses achados possuem implicações clínicas. Para o nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro a investigar os efeitos da cetamina em diferentes estágios do medo condicionado à luz e em um número variado de doses. No entanto, o nosso trabalho apresenta limitações. Primeiro, os efeitos da cetamina foram avaliados apenas a nível comportamental, sem investigar mecanismos neurais subjacentes aos resultados obtidos. Segundo, diferenças sexuais não foram consideradas, pois foram utilizados apenas ratos machos.

Visto que uma grande dificuldade de indivíduos que sofrem com transtornos de ansiedade, e transtornos relacionados, é extinguir e recuperar a extinção de memórias aversivas, administrar a cetamina em um momento muito próximo de terapias de exposição, por exemplo, pode comprometer a aprendizagem de extinção. Em estudos com humanos, os efeitos da cetamina na ansiedade foram medidos através de escalas de avaliação de sintomatologia (Feder et al., 2014; Glue et al., 2017). Apesar desses efeitos terem sido notados com o tratamento agudo e em poucas horas após a administração, o que não é observado com os tratamentos disponíveis atualmente, os efeitos da cetamina na extinção de memórias aversivas em humanos ainda não foram explorados. Nesse sentido, a pesquisa pré-clínica poderá contribuir significativamente para nortear possíveis investigações dessa natureza.

6. CONCLUSÕES

Em conclusão, doses sub-anestésicas de cetamina interferiram na aquisição e extinção do medo condicionado, dependendo da dose utilizada e momento de administração. Nossos resultados demonstram que a cetamina interfere no processamento de memórias aversivas e, conseqüentemente, na expressão comportamental do medo. Estudos adicionais são necessários para replicar os achados do presente estudo e para investigar processos moleculares subjacentes aos efeitos da cetamina na aquisição e extinção de memórias aversivas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adolphs R. (2013). The biology of fear. *Current biology: CB*, 23(2), R79–R93.
- Aguado, L., Antonio, A. S., Pérez, L., Valle, R. del, & Gómez, J. (1994). Effects of the NMDA receptor antagonist ketamine on flavor memory: Conditioned aversion, latent inhibition, and habituation of neophobia. *Behavioral and Neural Biology*, 61(3), 271–281.
- Alexander W. (2012). Pharmacotherapy for Post-traumatic Stress Disorder In Combat Veterans: Focus on Antidepressants and Atypical Antipsychotic Agents. *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*, 37(1), 32–38.
- Ali, F., Gerhard, D. M., Sweasy, K., Pothula, S., Pittenger, C., Duman, R. S., & Kwan, A. C. (2020). Ketamine disinhibits dendrites and enhances calcium signals in prefrontal dendritic spines. *Nature Communications*, 11(1), 72.
- American Psychiatric Association. (2009). *Practice guideline for the treatment of patients with panic disorder*. (2. ed). Apa Practice Guidelines.
- American Psychiatric Association, (Orgs.). (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5* (5th ed). American Psychiatric Association.
- Amiel, J. M., & Mathew, S. J. (2007). Glutamate and anxiety disorders. *Current Psychiatry Reports*, 9(4), 278–283.
- Asim, M., Hao, B., Yang, Y.-H., Fan, B.-F., Xue, L., Shi, Y.-W., Wang, X.-G., & Zhao, H. (2020). Ketamine Alleviates Fear Generalization Through GluN2B-BDNF Signaling in Mice. *Neuroscience Bulletin*, 36(2), 153–164.
- Averill, L. A., Purohit, P., Averill, C. L., Boesl, M. A., Krystal, J. H., & Abdallah, C. G. (2017). Glutamate dysregulation and glutamatergic therapeutics for PTSD: Evidence from human studies. *Neuroscience Letters*, 649, 147–155.
- Baker, J. D., & Azorlosa, J. L. (1996). The NMDA antagonist MK-801 blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning. *Behavioral neuroscience*, 110(3), 618–620.
- Barlow D. H. (2000). Unraveling the mysteries of anxiety and its disorders from the perspective of emotion theory. *The American psychologist*, 55(11), 1247–1263.
- Bechara, A., Tranel, D., Damasio, H., Adolphs, R., Rockland, C., & Damasio, A. R. (1995).

- Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science*, 269(5227), 1115–1118.
- Beck, A. T., Emery, G., & Greenberg, R. L. (2005). *Anxiety disorders and phobias: A cognitive perspective*. Basic Books.
- Bergink, V. (2004). Glutamate and anxiety. *European Neuropsychopharmacology*, 14(3), 175–183.
- Berman, R. M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D. A., Heninger, G. R., Charney, D. S., & Krystal, J. H. (2000). Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biological Psychiatry*, 47(4), 351–354.
- Bolles, R. C. (1970). Species-specific defense reactions and avoidance learning. *Psychological Review*, 77(1), 32–48.
- Bolles, R. C., & Beecher, M. D. (Orgs.). (2013). A Functional Behavioristic Approach to Aversively Motivated Behavior: Predatory Imminence as a Determinant of the Topography of Defensive Behavior. In *Evolution and Learning* (0 ed, p. 197–224). Psychology Press.
- Bolton, M. M., Heaney, C. F., Sabbagh, J. J., Murtishaw, A. S., Magcalas, C. M., & Kinney, J. W. (2012). Deficits in emotional learning and memory in an animal model of schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, 233(1), 35–44.
- Bourin, M., Petit-Demoulière, B., Nic Dhonnchadha, B., & Hascöet, M. (2007). Animal models of anxiety in mice. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 21(6), 567–574.
- Bouton, M. E., & Bolles, R. C. (1980). Conditioned fear assessed by freezing and by the suppression of three different baselines. *Animal Learning & Behavior*, 8(3), 429–434.
- Bouton, M. E., Vurbic, D., & Woods, A. M. (2008). D-Cycloserine facilitates context-specific fear extinction learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(3), 504–510.
- Brandão, M. L., & Lovick, T. A. (2019). Role of the dorsal periaqueductal gray in posttraumatic stress disorder: Mediation by dopamine and neurokinin. *Translational Psychiatry*, 9(1), 232.
- Brosnan, R. J., & Thiesen, R. (2012). Increased NMDA receptor inhibition at an increased Sevoflurane MAC. *BMC Anesthesiology*, 12(1), 9.
- Burghardt, N. S., Sullivan, G. M., McEwen, B. S., Gorman, J. M., & LeDoux, J. E. (2004).

- The selective serotonin reuptake inhibitor citalopram increases fear after acute treatment but reduces fear with chronic treatment: A comparison with tianeptine. *Biological Psychiatry*, 55(12), 1171–1178.
- Burgos-Robles, A., Vidal-Gonzalez, I., Santini, E., & Quirk, G. J. (2007). Consolidation of Fear Extinction Requires NMDA Receptor-Dependent Bursting in the Ventromedial Prefrontal Cortex. *Neuron*, 53(6), 871–880.
- Bystritsky A. (2006). Treatment-resistant anxiety disorders. *Molecular psychiatry*, 11(9), 805–814.
- Calzavara, M. B., Medrano, W. A., Levin, R., Kameda, S. R., Andersen, M. L., Tufik, S., Silva, R. H., Frussa-Filho, R., & Abilio, V. C. (2009). Neuroleptic Drugs Revert the Contextual Fear Conditioning Deficit Presented by Spontaneously Hypertensive Rats: A Potential Animal Model of Emotional Context Processing in Schizophrenia? *Schizophrenia Bulletin*, 35(4), 748–759.
- Campeau, S., Miserendino, M. J., & Davis, M. (1992). 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*, 106(3), 569–574.
- Choi, K. H., Berman, R. Y., Zhang, M., Spencer, H. F., & Radford, K. D. (2020). Effects of Ketamine on Rodent Fear Memory. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7173.
- Clifton, N. E., Thomas, K. L., & Hall, J. (2018). The effect of ketamine on the consolidation and extinction of contextual fear memory. *Journal of Psychopharmacology*, 32(2), 156–162.
- Cohen, S. M., Tsien, R. W., Goff, D. C., & Halassa, M. M. (2015). The impact of NMDA receptor hypofunction on GABAergic neurons in the pathophysiology of schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 167(1–3), 98–107.
- Craig, K.J., Brown, K.J., & Baum, A. (2000) Environmental Factors in the Etiology of Anxiety. *Archives of General Psychiatry*.
- Craske, M. G., Kircanski, K., Zelikowsky, M., Mystkowski, J., Chowdhury, N., & Baker, A. (2008). Optimizing inhibitory learning during exposure therapy. *Behaviour Research and Therapy*, 46(1), 5–27.

- Curzon, P., Rustay, N. R., & Browman, K. E. (2009). Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. In J. J. Buccafusco (Ed.), *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. (2nd ed.). CRC Press/Taylor & Francis.
- Darwin, C. (1897). *The Expression of the Emotions in Man and Animals*. New York, NY: D. Appleton and Company.
- Davis, M. (1998). Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biological Psychiatry*, *44*(12), 1239–1247.
- Davis, M., & Myers, K. M. (2002). The role of glutamate and Gamma-Aminobutyric acid in fear extinction: Clinical implications for exposure therapy. *Biological Psychiatry*, *52*(10), 998–1007.
- Davis M. (2011). NMDA receptors and fear extinction: implications for cognitive behavioral therapy. *Dialogues in clinical neuroscience*, *13*(4), 463–474.
- Del-Ben, C. M., & Graeff, F. G. (2009). Panic disorder: Is the PAG involved? *Neural Plasticity*, 2009, Article 108135
- De Leonibus, E., Mele, A., Oliverio, A., & Pert, A. (2001). Locomotor activity induced by the non-competitive N-methyl-d-aspartate antagonist, MK-801: Role of nucleus accumbens efferent pathways. *Neuroscience*, *104*(1), 105–116.
- de Oliveira, A. R., Reimer, A. E., Reis, F. M. C. V., & Brandão, M. L. (2013). Conditioned fear response is modulated by a combined action of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and dopamine activity in the basolateral amygdala. *European Neuropsychopharmacology*, *23*(5), 379–389.
- de Vita, V. M., Zapparoli, H. R., Reimer, A. E., Brandão, M. L., & de Oliveira, A. R. (2021). Dopamine D2 receptors in the expression and extinction of contextual and cued conditioned fear in rats. *Experimental brain research*, *239*(6), 1963–1974.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews*, *51*(1), 7–61.
- Diniz, J. B., Miguel, E. C., de Oliveira, A. R., Reimer, A. E., Brandão, M. L., de Mathis, M. A., Batistuzzo, M. C., Costa, D. L. C., & Hoexter, M. Q. (2012). Outlining new frontiers for the comprehension of obsessive-compulsive disorder: A review of its relationship with fear and anxiety. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, *34*, S81–S103

- Duclot, F., Perez-Taboada, I., Wright, K. N., & Kabbaj, M. (2016). Prediction of individual differences in fear response by novelty seeking, and disruption of contextual fear memory reconsolidation by ketamine. *Neuropharmacology*, *109*, 293–305.
- Falls, W., Miserendino, M., & Davis, M. (1992). Extinction of fear-potentiated startle: Blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *The Journal of Neuroscience*, *12*(3), 854–863.
- Fanselow M.S. (1991) The Midbrain Periaqueductal Gray as a Coordinator of Action in Response to Fear and Anxiety. In: Depaulis A., Bandler R. (eds) *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter*. NATO ASI Series (Series A: Life Sciences), vol 213. Springer, Boston, MA.
- Fanselow, M. S., & Bolles, R. C. (1979). Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *Journal of comparative and physiological psychology*, *93*(4), 736–744.
- Fanselow, M. S., Hoffman, A. N., & Zhuravka, I. (2019). Timing and the transition between modes in the defensive behavior system. *Behavioural Processes*, *166*, 103890.
- Feder, A., Parides, M. K., Murrough, J. W., Perez, A. M., Morgan, J. E., Saxena, S., Kirkwood, K., van der Rot, M., Lapidus, K. A. B., Wan, L.-B., Iosifescu, D., & Charney, D. S. (2014). Efficacy of Intravenous Ketamine for Treatment of Chronic Posttraumatic Stress Disorder: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Psychiatry*, *71*(6), 681.
- Fenske, J. N., & Schwenk, T. L. (2009). Obsessive compulsive disorder: diagnosis and management. *American family physician*, *80*(3), 239–245.
- Ferguson J. M. (2001). SSRI Antidepressant Medications: Adverse Effects and Tolerability. *Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry*, *3*(1), 22–27.
- Foa, E. B., Liebowitz, M. R., Kozak, M. J., Davies, S., Campeas, R., Franklin, M. E., Huppert, J. D., Kjnisted, K., Rowan, V., Schmidt, A. B., Simpson, H. B., & Tu, X. (2005). Randomized, Placebo-Controlled Trial of Exposure and Ritual Prevention, Clomipramine, and Their Combination in the Treatment of Obsessive-Compulsive Disorder. *Am J Psychiatry*, *11*.
- Gabriele, A., & Packard, M. G. (2007). D-Cycloserine enhances memory consolidation of hippocampus-dependent latent extinction. *Learning & Memory*, *14*(7), 468–471.
- Gallagher, M., Kapp, B., Musty, R., & Driscoll, P. (1977). Memory formation: Evidence for a

- specific neurochemical system in the amygdala. *Science*, 198(4315), 423–425.
- Garakani, A., Mathew, S. J., & Charney, D. S. (2006). Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. *The Mount Sinai journal of medicine*, New York, 73(7), 941–949.
- Girgenti, M. J., Ghosal, S., LoPresto, D., Taylor, J. R., & Duman, R. S. (2017). Ketamine accelerates fear extinction via mTORC1 signaling. *Neurobiology of Disease*, 100, 1–8.
- Glue, P., Medlicott, N. J., Harland, S., Neehoff, S., Anderson-Fahey, B., Le Nedelec, M., Gray, A., & McNaughton, N. (2017). Ketamine's dose-related effects on anxiety symptoms in patients with treatment refractory anxiety disorders. *Journal of Psychopharmacology*, 31(10), 1302–1305.
- Goodman, W. K., Grice, D. E., Lapidus, K. A. B., & Coffey, B. J. (2014). Obsessive-Compulsive Disorder. *Psychiatric Clinics of North America*, 37(3), 257–267.
- Graeff, Frederico G., Zangrossi, Hélio. (2003). Animal Models of Anxiety Disorders. *Biological Psychiatry*. 877-893.
- Grillon, C. (2008). Models and mechanisms of anxiety: Evidence from startle studies. *Psychopharmacology*, 199(3), 421–437.
- Halonen, J. D., Zoladz, P. R., Park, C. R., & Diamond, D. M. (2016). Behavioral and Neurobiological Assessments of Predator-Based Fear Conditioning and Extinction. *Journal of Behavioral and Brain Science*, 06(08), 337–356.
- Heidig, S., Müller, J., & Reichelt, M. (2015). Emotional design in multimedia learning: Differentiation on relevant design features and their effects on emotions and learning. *Computers in Human Behavior*, 44, 81–95.
- Imre, G., Fokkema, D. S., Boer, J. A. D., & Ter Horst, G. J. (2006). Dose–response characteristics of ketamine effect on locomotion, cognitive function and central neuronal activity. *Brain Research Bulletin*, 69(3), 338–345.
- Inda, M. C. (2005). Acquisition, Consolidation, Reconsolidation, and Extinction of Eyelid Conditioning Responses Require De Novo Protein Synthesis. *Journal of Neuroscience*, 25(8), 2070–2080.
- Ito, W., Erisir, A., & Morozov, A. (2015). Observation of Distressed Conspecific as a Model of Emotional Trauma Generates Silent Synapses in the Prefrontal-Amygdala Pathway

- and Enhances Fear Learning, but Ketamine Abolishes those Effects. *Neuropsychopharmacology*, *40*(11), 2536–2545.
- Jackson, A., Koek, W., & Colpaert, F. C. (1992). NMDA antagonists make learning and recall state-dependent. *Behavioural pharmacology*, *3*(4), 415–421.
- Jacoby, R. J., & Abramowitz, J. S. (2016). Inhibitory learning approaches to exposure therapy: A critical review and translation to obsessive-compulsive disorder. *Clinical Psychology Review*, *49*, 28–40.
- Jahangard, L., Fadaei, V., Sajadi, A., Haghghi, M., Ahmadpanah, M., Matinnia, N., Bajoghli, H., Sadeghi Bahmani, D., Lang, U., Holsboer-Trachsler, E., & Brand, S. (2018). Patients with OCD report lower quality of life after controlling for expert-rated symptoms of depression and anxiety. *Psychiatry Research*, *260*, 318–323.
- Jie, F., Yin, G., Yang, W., Yang, M., Gao, S., Lv, J., & Li, B. (2018). Stress in Regulation of GABA Amygdala System and Relevance to Neuropsychiatric Diseases. *Frontiers in Neuroscience*, *12*, 562.
- Johansen, J. P., Cain, C. K., Ostroff, L. E., & LeDoux, J. E. (2011). Molecular Mechanisms of Fear Learning and Memory. *Cell*, *147*(3), 509–524.
- King, G., Scott, E., Graham, B. M., & Richardson, R. (2017). Individual differences in fear extinction and anxiety-like behavior. *Learning & Memory*, *24*(5), 182–190.
- Kirkpatrick, H. A., & Heller, G. M. (2014). Post-Traumatic Stress Disorder: Theory and Treatment Update. *The International Journal of Psychiatry in Medicine*, *47*(4), 337–346.
- Kulyk, B. D. (2017). Antidepressant-Like Effects of Ketamine on Fear Conditioning and Extinction. *Ph.D. Thesis*. 235.
- LaBar, K., LeDoux, J., Spencer, D., & Phelps, E. (1995). Impaired fear conditioning following unilateral temporal lobectomy in humans. *The Journal of Neuroscience*, *15*(10), 6846–6855.
- LaBar, K. S. (2007). Beyond Fear: Emotional Memory Mechanisms in the Human Brain. *Current Directions in Psychological Science*, *16*(4), 173–177.
- Laurent, V., Marchand, A. R., & Westbrook, R. F. (2008). The basolateral amygdala is necessary for learning but not relearning extinction of context conditioned fear.

Learning & Memory, 15(5), 304–314.

Laurent, V., & Westbrook, R. F. (2009). Infusion of the NMDA receptor antagonist, DL-APV, into the basolateral amygdala disrupts learning to fear a novel and a familiar context as well as relearning to fear an extinguished context. *Learning & Memory*, 16(1), 96–105.

LeDoux J. E. (1994). Emotion, memory and the brain. *Scientific American*, 270(6), 50–57.

Lee, H., & Kim, J. J. (1998). Amygdalar NMDA Receptors are Critical for New Fear Learning in Previously Fear-Conditioned Rats. *The Journal of Neuroscience*, 18(20), 8444–8454.

Lester, L. S., & Fanselow, M. S. (1985). Exposure to a cat produces opioid analgesia in rats. *Behavioral neuroscience*, 99(4), 756–759.

Li, N., Lee, B., Liu, R.-J., Banasr, M., Dwyer, J. M., Iwata, M., Li, X.-Y., Aghajanian, G., & Duman, R. S. (2010). MTOR-Dependent Synapse Formation Underlies the Rapid Antidepressant Effects of NMDA Antagonists. *Science*, 329(5994), 959–964.

Lin, C.-H., Yeh, S.-H., Lu, H.-Y., & Gean, P.-W. (2003). The Similarities and Diversities of Signal Pathways Leading to Consolidation of Conditioning and Consolidation of Extinction of Fear Memory. *The Journal of Neuroscience*, 23(23), 8310–8317.

Lisman, J. E., Coyle, J. T., Green, R. W., Javitt, D. C., Benes, F. M., Heckers, S., & Grace, A. A. (2008). Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends in Neurosciences*, 31(5), 234–242.

Lissek, S., Powers, A. S., McClure, E. B., Phelps, E. A., Woldehawariat, G., Grillon, C., & Pine, D. S. (2005). Classical fear conditioning in the anxiety disorders: A meta-analysis. *Behaviour Research and Therapy*, 43(11), 1391–1424.

Liu, Y., Lin, W., Liu, C., Luo, Y., Wu, J., Bayley, P. J., & Qin, S. (2016). Memory consolidation reconfigures neural pathways involved in the suppression of emotional memories. *Nature Communications*, 7(1), 13375.

Lorrain, D. S., Bacceti, C. S., Bristow, L. J., Anderson, J. J., & Varney, M. A. (2003). Effects of ketamine and n-methyl-d-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: Modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *Neuroscience*, 117(3), 697–706.

- Maeng, L. Y., & Milad, M. R. (2017). Post-Traumatic Stress Disorder: The Relationship Between the Fear Response and Chronic Stress. *Chronic Stress, 1*, 247054701771329.
- Makkar, S. R., Zhang, S. Q., & Cranney, J. (2010). Behavioral and Neural Analysis of GABA in the Acquisition, Consolidation, Reconsolidation, and Extinction of Fear Memory. *Neuropsychopharmacology, 35*(8), 1625–1652.
- Maren, S. (1996). Synaptic transmission and plasticity in the amygdala: An emerging physiology of fear conditioning circuits. *Molecular Neurobiology, 13*(1), 1–22.
- Maren, S., Aharonov, G., Stote, D. L., & Fanselow, M. S. (1996). N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. *Behavioral neuroscience, 110*(6), 1365–1374.
- Maren, S. (2001). Neurobiology of Pavlovian Fear Conditioning. *Annual Review of Neuroscience, 24*(1), 897–931.
- Maren, S. (2015). Out with the old and in with the new: Synaptic mechanisms of extinction in the amygdala. *Brain Research, 1621*, 231–238.
- Martijena, I. D., & Molina, V. A. (2012). The influence of stress on fear memory processes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 45*(4), 308–313.
- McGaugh, J. L. (2002). Memory consolidation and the amygdala: A systems perspective. *Trends in Neurosciences, 25*(9), 456–461.
- McGaugh, J. L., Cahill, L., & Roozendaal, B. (1996). Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brain systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 93*(24), 13508–13514.
- McGhee, L. L., Maani, C. V., Garza, T. H., Gaylord, K. M., & Black, I. H. (2008). The Correlation Between Ketamine and Posttraumatic Stress Disorder in Burned Service Members. *Journal of Trauma: Injury, Infection & Critical Care, 64*(2), S195–S199.
- McGhee, L. L., Maani, C. V., Garza, T. H., Slater, T. M., Petz, L. N., & Fowler, M. (2014). The Intraoperative Administration of Ketamine to Burned U.S. Service Members Does Not Increase the Incidence of Post-Traumatic Stress Disorder. *Military Medicine, 179*(8S), 41–46.
- McGowan, J. C., LaGamma, C. T., Lim, S. C., Tsitsiklis, M., Neria, Y., Brachman, R. A., & Denny, C. A. (2017). Prophylactic Ketamine Attenuates Learned Fear.

- Neuropsychopharmacology*, 42(8), 1577–1589.
- McNaughton, N. (2011). Fear, anxiety and their disorders: Past, present and future neural theories. *Psychology & Neuroscience*, 4(2), 173–181.
- Michael, T., Blechert, J., Vriends, N., Margraf, J., & Wilhelm, F. H. (2007). Fear conditioning in panic disorder: Enhanced resistance to extinction. *Journal of Abnormal Psychology*, 116(3), 612–617.
- Miserendino, M. J., Sananes, C. B., Melia, K. R., & Davis, M. (1990). Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature*, 345(6277), 716–718.
- Mobbs, D., & Kim, J. J. (2015). Neuroethological studies of fear, anxiety, and risky decision-making in rodents and humans. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 5, 8–15.
- Mobbs, D., Marchant, J. L., Hassabis, D., Seymour, B., Tan, G., Gray, M., Petrovic, P., Dolan, R. J., & Frith, C. D. (2009). From Threat to Fear: The Neural Organization of Defensive Fear Systems in Humans. *Journal of Neuroscience*, 29(39), 12236–12243.
- Morgan, M. A., Romanski, L. M., & LeDoux, J. E. (1993). Extinction of emotional learning: Contribution of medial prefrontal cortex. *Neuroscience Letters*, 163(1), 109–113.
- Myers, K. M., & Davis, M. (2007). Mechanisms of fear extinction. *Molecular Psychiatry*, 12(2), 120–150.
- Nadal-Vicens, M., Chyung, J. H. & Turner, T. J. (2009) Farmacologia da neurotransmissão serotoninérgica e adrenérgica central. In: Golan, D. E. (2. ed.) *Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia* (Chap. 13. pp. 186-202). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Nasir, M., Trujillo, D., Levine, J., Dwyer, J. B., Rupp, Z. W., & Bloch, M. H. (2020). Glutamate Systems in DSM-5 Anxiety Disorders: Their Role and a Review of Glutamate and GABA Psychopharmacology. *Frontiers in Psychiatry*, 11, 548505.
- Nutt, D., & Malizia, A. (2006). Anxiety and OCD – the chicken or the egg? *Journal of Psychopharmacology*, 20(6), 729–731.
- Oliveira, A. R. de, Reimer, A. E., & Brandão, M. L. (2009). Role of dopamine receptors in the ventral tegmental area in conditioned fear. *Behavioural Brain Research*, 199(2), 271–277.

- Paré, D., Quirk, G. J., & Ledoux, J. E. (2004). New Vistas on Amygdala Networks in Conditioned Fear. *Journal of Neurophysiology*, *92*(1), 1–9.
- Pavlov, P. I. (2010). Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. *Annals of neurosciences*, *17*(3), 136–141.
- Perusini, J. N., & Fanselow, M. S. (2015). Neurobehavioral perspectives on the distinction between fear and anxiety. *Learning & Memory*, *22*(9), 417–425.
- Petrenko, A. B., Yamakura, T., Sakimura, K., & Baba, H. (2014). Defining the role of NMDA receptors in anesthesia: Are we there yet? *European Journal of Pharmacology*, *723*, 29–37.
- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral neuroscience*, *106*(2), 274–285.
- Pietersen, C. Y., Bosker, F. J., Doorduyn, J., Jongasma, M. E., Postema, F., Haas, J. V., Johnson, M. P., Koch, T., Vladusich, T., & den Boer, J. A. (2007). An Animal Model of Emotional Blunting in Schizophrenia. *PLoS ONE*, *2*(12), e1360.
- Pietersen, C. Y., Bosker, F. J., Postema, F., Fokkema, D. S., Korf, J., & den Boer, J. A. (2006). Ketamine administration disturbs behavioural and distributed neural correlates of fear conditioning in the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *30*(7), 1209–1218.
- Pitman, R. K., Rasmusson, A. M., Koenen, K. C., Shin, L. M., Orr, S. P., Gilbertson, M. W., Milad, M. R., & Liberzon, I. (2012). Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(11), 769–787.
- Quirk, G. J., Garcia, R., & González-Lima, F. (2006). Prefrontal Mechanisms in Extinction of Conditioned Fear. *Biological Psychiatry*, *60*(4), 337–343.
- Quirk, G. J., & Mueller, D. (2008). Neural Mechanisms of Extinction Learning and Retrieval. *Neuropsychopharmacology*, *33*(1), 56–72.
- Quirk, G. J., Russo, G. K., Barron, J. L., & Lebron, K. (2000). The Role of Ventromedial Prefrontal Cortex in the Recovery of Extinguished Fear. *The Journal of Neuroscience*, *20*(16), 6225–6231.
- Rabinak, C. A., Mori, S., Lyons, M., Milad, M. R., & Phan, K. L. (2017). Acquisition of CS-

- US contingencies during Pavlovian fear conditioning and extinction in social anxiety disorder and posttraumatic stress disorder. *Journal of Affective Disorders*, 207, 76–85.
- Radford, K. D., Park, T. Y., Jaiswal, S., Pan, H., Knutsen, A., Zhang, M., Driscoll, M., Osborne-Smith, L. A., Dardzinski, B. J., & Choi, K. H. (2018). Enhanced fear memories and brain glucose metabolism (^{18}F -FDG-PET) following sub-anesthetic intravenous ketamine infusion in Sprague-Dawley rats. *Translational Psychiatry*, 8(1), 263.
- Ravindran, L. N., & Stein, M. B. (2010). The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. *The Journal of clinical psychiatry*, 71(7), 839–854.
- Rigoli, F., Ewbank, M., Dalgleish, T., & Calder, A. (2016). Threat visibility modulates the defensive brain circuit underlying fear and anxiety. *Neuroscience Letters*, 612, 7–13.
- Roesler, R., Vianna, M. R. M., de-Paris, F., Quevedo, J., Walz, R., & Bianchin, M. (2000). 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*, 33(7), 829–834.
- Rosen, J. B., & Donley, M. P. (2006). Animal studies of amygdala function in fear and uncertainty: Relevance to human research. *Biological Psychology*, 73(1), 49–60.
- Royer, S., & Paré, D. (2002). Bidirectional synaptic plasticity in intercalated amygdala neurons and the extinction of conditioned fear responses. *Neuroscience*, 115(2), 455–462.
- Sherin, J. E., & Nemeroff, C. B. (2011). Post-traumatic stress disorder: the neurobiological impact of psychological trauma. *Dialogues in clinical neuroscience*, 13(3), 263–278.
- Schweckendiek, J., Klucken, T., Merz, C. J., Tabbert, K., Walter, B., Ambach, W., Vaitl, D., & Stark, R. (2011). Weaving the (neuronal) web: Fear learning in spider phobia. *NeuroImage*, 54(1), 681–688.
- Shin, L. M., & Liberzon, I. (2010). The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 169–191.
- Sigmundi, R. A., Bouton, M. E., & Bolles, R. C. (1980). Conditioned freezing in the rat as a function of shock intensity and CS modality. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 15(4), 254–256.

- Silote, G. P., de Oliveira, S. F. S., Ribeiro, D. E., Machado, M. S., Andreatini, R., Joca, S. R. L., & Beijamini, V. (2020). Ketamine effects on anxiety and fear-related behaviors: Current literature evidence and new findings. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *100*, 109878.
- Simon, A. B., & Gorman, J. M. (2006). Advances in the treatment of anxiety: Targeting glutamate. *NeuroRX*, *3*(1), 57–68.
- Sonner, J. M., Antognini, J. F., Dutton, R. C., Flood, P., Gray, A. T., Harris, R. A., Homanics, G. E., Kendig, J., Orser, B., Raines, D. E., Trudell, J., Vissel, B., & Eger, and E. I. (2003). Inhaled Anesthetics and Immobility: Mechanisms, Mysteries, and Minimum Alveolar Anesthetic Concentration: *Anesthesia & Analgesia*, 718–740.
- Sotres-Bayon, F., Cain, C. K., & LeDoux, J. E. (2006). Brain Mechanisms of Fear Extinction: Historical Perspectives on the Contribution of Prefrontal Cortex. *Biological Psychiatry*, *60*(4), 329–336.
- Sousa, M. B., Isolan, L. R., Oliveira, R. R., Manfro, G. G., & Cordioli, A. V. (2006). A randomized clinical trial of cognitive-behavioral group therapy and sertraline in the treatment of obsessive-compulsive disorder. *The Journal of clinical psychiatry*, *67*(7), 1133–1139.
- Spurr, J. M., & Stopa, L. (2003). The observer perspective: Effects on social anxiety and performance. *Behaviour Research and Therapy*, *41*(9), 1009–1028.
- Steimer, T. (2002). The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *4*(3), 19.
- Stein, D. J., Fineberg, N. A., Bienvenu, O. J., Denys, D., Lochner, C., Nestadt, G., Leckman, J. F., Rauch, S. L., & Phillips, K. A. (2010). Should OCD be classified as an anxiety disorder in DSM-V? *Depression and Anxiety*, *27*(6), 495–506.
- Sun, Y., Gooch, H., & Sah, P. (2020). Fear conditioning and the basolateral amygdala. *F1000Research*, *9*, 53.
- Suzuki, A., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., Masushige, S., Silva, A. J., & Satoshi, K. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *Journal of Neuroscience*, *24*(20), 4787- 4795.
- Sylvers, P., Lilienfeld, S. O., & LaPrairie, J. L. (2011). Differences between trait fear and trait anxiety: Implications for psychopathology. *Clinical Psychology Review*, *31*(1), 122–

137.

- Tsien, J. Z., Huerta, P. T., & Tonegawa, S. (1996). The Essential Role of Hippocampal CA1 NMDA Receptor–Dependent Synaptic Plasticity in Spatial Memory. *Cell*, 87(7), 1327–1338.
- Tyng, C. M., Amin, H. U., Saad, M. N. M., & Malik, A. S. (2017). The Influences of Emotion on Learning and Memory. *Frontiers in Psychology*, 8, 1454.
- VanElzakker, M. B., Dahlgren, M. K., Davis, F. C., Dubois, S., & Shin, L. M. (2014). From Pavlov to PTSD: the extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. *Neurobiology of learning and memory*, 113, 3–18.
- Veale, D., & Roberts, A. (2014). Obsessive-compulsive disorder. *BMJ (Clinical research ed.)*, 348, g2183.
- Veilleux-Lemieux, D., Castel, A., Carrier, D., Beaudry, F., & Vachon, P. (2013). Pharmacokinetics of Ketamine and Xylazine in Young and Old Sprague–Dawley Rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 52(5), 4.
- Wang, J., Goffer, Y., Xu, D., Tukey, D. S., Shamir, D. B., Eberle, S. E., Zou, A. H., Blanck, T. J. J., & Ziff, E. B. (2011). A Single Subanesthetic Dose of Ketamine Relieves Depression-like Behaviors Induced by Neuropathic Pain in Rats. *Anesthesiology*, 115(4), 812–821.
- Weisberg, R. B., Dyck, I., Culpepper, L., & Keller, M. B. (2007). Psychiatric treatment in primary care patients with anxiety disorders: a comparison of care received from primary care providers and psychiatrists. *The American journal of psychiatry*, 164(2), 276–282.
- Wittchen, H. U., Beesdo, K., Bittner, A., & Goodwin, R. D. (2003). Depressive episodes--evidence for a causal role of primary anxiety disorders?. *European psychiatry: the journal of the Association of European Psychiatrists*, 18(8), 384–393.
- Wolpe, J. (1987). The promotion of scientific psychotherapy: A long voyage. In J. K. Zeig (Ed.), *The evolution of psychotherapy* (pp. 133–142). New York: Routledge.
- Xu, Y., Hackett, M., Carter, G., Loo, C., Gálvez, V., Glozier, N., Glue, P., Lapidus, K., McGirr, A., Somogyi, A. A., Mitchell, P. B., & Rodgers, A. (2016). Effects of Low-Dose and Very Low-Dose Ketamine among Patients with Major Depression: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of*

Neuropsychopharmacology, 19(4), pyv124.

- Yang, Y., Ju, W., Zhang, H., & Sun, L. (2018). Effect of Ketamine on LTP and NMDAR EPSC in Hippocampus of the Chronic Social Defeat Stress Mice Model of Depression. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12, 229.
- Zamignani, Denis Roberto, & Banaco, Roberto Alves. (2005). Um panorama analítico-comportamental sobre os transtornos de ansiedade. *Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva*, 7(1), 77-92
- Zanos, P., & Gould, T. D. (2018). Mechanisms of ketamine action as an antidepressant. *Molecular Psychiatry*, 23(4), 801–811.
- Zanos, P., Moaddel, R., Morris, P. J., Riggs, L. M., Highland, J. N., Georgiou, P., Pereira, E. F. R., Albuquerque, E. X., Thomas, C. J., Zarate, C. A., & Gould, T. D. (2018). Ketamine and Ketamine Metabolite Pharmacology: Insights into Therapeutic Mechanisms. *Pharmacological Reviews*, 70(3), 621–660.

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no uso de animais da UFSCar

Pró Reitoria
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE DOSES SUB-ANESTÉSICAS DE CETAMINA SOBRE O MEDO CONDICIONADO À LUZ EM RATOS", protocolada sob o CEUA nº 9189160919 (09/09/2019), sob a responsabilidade de **Amanda Ribeiro de Oliveira** e equipe; Mylena Silva Magalhães - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 16/09/2019.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE EFFECTS OF KETAMINE SUB-ANESTHETIC DOSES ON FEAR CONDITIONING TO A LIGHT IN RATS", utilizing 192 Heterogenics rats (192 males), protocol number CEUA 9189160919 (09/09/2019), under the responsibility of **Amanda Ribeiro de Oliveira** and team; Mylena Silva Magalhães - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 09/16/2019.

Finalidade da Proposta: *Pesquisa*

Vigência da Proposta: de 10/2019 a 12/2021 Área: *Psicologia*

Origem: *Biotério Central da UFSCar*

Espécie: *Ratos heterogênicos*

sexo: *Machos*

Idade: *60 a 90 dias*

N: *192*

Linhagem: *Wistar*

Peso: *270 a 290 g*

Local do experimento: Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA) - DPsi

São Carlos, 18 de outubro de 2019

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos