

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL EM  
CAMUNDONGOS: EFEITO DA INJEÇÃO DE MIDAZOLAM  
NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL**

**BARBARA CAETANO PEREIRA**

São Carlos, SP  
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL EM  
CAMUNDONGOS: EFEITO DA INJEÇÃO DE MIDAZOLAM  
NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL**

**BARBARA CAETANO PEREIRA**

Texto submetido como Exame Geral de Defesa ao  
Curso de Pós-Graduação em Psicologia da  
Universidade Federal São Carlos  
como requisito parcial à obtenção  
do título de mestre em Psicologia

Orientador:  
Profª Dra Azair Liane Matos do Canto de Souza

São Carlos, SP  
2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P436am Pereira, Barbara Caetano.  
Avaliação da memória emocional em camundongos :  
efeito da injeção de midazolam na substância cinzenta  
periaquedutal / Barbara Caetano Pereira. -- São Carlos :  
UFSCar, 2013.  
52 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2012.

1. Neurociência. 2. Memória. 3. Substância cinzenta  
periaquedutal. 4. Ansiedade. 5. Esquiva inibitória. 6.  
Camundongos. I. Título.

CDD: 612.8 (20<sup>a</sup>)

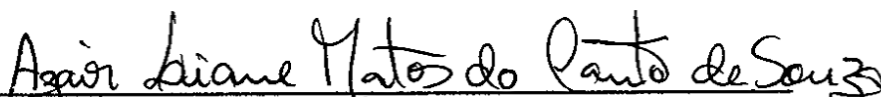



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA**

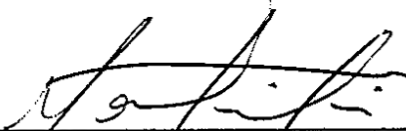
**COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**


**Barbara Caetano Pereira**

**São Carlos, 10/12/2012**

  
Prof.ª Dr.ª Azair Liane Matos do Canto de Souza (Orientadora e Presidente)  
Universidade Federal de São Carlos/UFSCar

  
Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel  
Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho/UNESP

  
Prof.ª Dr.ª Rosana Mattioli  
Universidade Federal de São Carlos/UFSCar

  
Prof.ª Dr.ª Camila Domeniconi  
Universidade Federal de São Carlos/UFSCar

Submetida à defesa em sessão pública  
realizada às 14:00h no dia 10/12/2012.

**Comissão Julgadora:**

Prof.ª Dr.ª Azair Liane Matos do Canto de Souza

Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel

Prof.ª Dr.ª Rosana Mattioli

Prof.ª Dr.ª Camila Domeniconi

Homologada pela CPG-PPGpsi na

ª Reunião no dia 

Prof.ª Dr.ª Rosemeire Aparecida Scopinho  
Vice-Coordenadora do PPGpsi

**“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Não na vitória propriamente dita”.  
(Mahatma Ghandi)**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que nos deu o dom da vida e da sabedoria.

À minha família, Devanir, Miriâm, Patrícia e Matheus, que sempre estiveram ao meu lado, incentivando e apoiando com todo amor e carinho.

À Profª. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza, pela orientação científica, amizade e dedicação.

Aos membros da banca de qualificação, Deisy de Sousa e Luiz Takase , pela contribuição dispensada na preparação desse trabalho.

Aos membros da banca examinadora de defesa, pela atenção dispensada para leitura desse trabalho.

Aos amigos do LPA, que sempre apoiaram nessa trajetória.

À técnica do laboratório, Lara, que nunca mediu esforços para ajudar na realização dos procedimentos deste trabalho.

À secretaria do PPGPsi, Marinéia, pelo apoio e dedicação no programa

À CAPES, pelo auxílio financeiro disponibilizado na execução deste estudo.

## RESUMO

Vários estudos têm demonstrado que os benzodiazepínicos (BDZ), administrados na substância cinzenta periaquedutal (SCP), podem produzir efeito ansiolítico em diferentes modelos animais de ansiedade e também prejudicar a aprendizagem e a memória em roedores. Apesar do já conhecido papel da SCP em modular comportamentos defensivos em modelos animais, pouco se sabe sobre o seu papel na modulação da memória emocional. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do midazolam, intra-SCP, sobre a aquisição, consolidação e evocação da memória aversiva. Para isto, utilizamos camundongos machos da linhagem Suíço-Albino, pesando entre 25-30g (n=7-11/grupo). Os animais após cirurgia estereotáxica com implantação de cânula na SCP, no dia do teste foram distribuídos em três Experimentos para posteriormente serem expostos ao teste de “step-down” (SD), a saber: Experimento 1, injeção intra-SCP com salina e midazolam (MDZ) nas doses de 3,0 e 30 nmol/0,1µl, na condição de pré-treino ao SD para avaliar a aquisição da memória aversiva; Experimento 2, conforme Experimento 1, exceto pela condição de injeção pré-teste ao SD para avaliar a evocação da memória aversiva; Experimento 3, conforme Experimento 1, exceto pela condição de injeção pós-treino ao SD para avaliar a consolidação da memória aversiva. Os animais foram treinados na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA que consistiu em distribuir os animais em dois grupos: S/Ch - sem exposição ao choque; C/Ch - com exposição ao choque (0,5mA) por 10s, para registro da latência de descida (L1). Vinte e quatro horas após, cada animal foi exposto novamente ao SD para registro da latência (L2), mas sem o choque. Os resultados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de três fatores (Fator 1: condição; Fator 2: pré-tratamento; Fator 3: tratamento), durante L1 e L2. Os resultados mostraram que ocorreu aumento de L2, após a exposição de camundongos ao SD sem apresentação de choque, confirmando que o estímulo aversivo (choque) foi forte o suficiente para promover facilitação da memória aversiva. As duas doses (3,0 e 30 nmol) de MDZ intra-SCP diminuíram a avaliação de risco dos camundongos, caracterizada pela rápida descida da plataforma em L1. Este resultado sugere que este agonista GABA-Benzodiazepínico, prejudicou a aquisição, evocação e consolidação da memória aversiva em camundongos. Em conjunto, esses resultados sugerem que os receptores GABAA localizados na SCP participam da modulação das respostas relacionadas à memória aversiva induzida pelo choque.

Palavras-chave: memória, ansiedade, substância cinzenta periaquedutal, midazolam, esQUIVA INIBITÓRIA, camundongos

## ABSTRACT

Several studies have shown that benzodiazepines (BDZ) in periaqueductal gray (PAG) can produce anxiolytic-like effects in different animal models of anxiety. In addition, BDZ drugs also impair learning and memory performance in rodents. Despite the known role of PAG in modulated defensive behaviors in animal models, little is known about its role in modulated of emotional memory. In this sense, the objective of this study was to investigate the effects of midazolam, injected into the PAG, on the acquisition, consolidation and retrieval of aversive memory. For this, we used male mice of the Swiss-Albino weighing between 25-30g (n=7-11). After stereotactic surgery with implantation of a cannula in the PAG, the animals on the test day were divided into three experiments for later exposed to the test "step-down" (SD), as follows: Experiment 1, intra-PAG with saline and midazolam (MDZ) at doses of 3.0 and 30 nmol/0.1µl, in condition of pre-training to evaluate the acquisition of aversive memory; Experiment 2 was like Experiment 1, except for the condition of the injection pre-test to evaluate the retrieval of aversive memory; Experiment 3 was like Experiment 1, except for the condition of injection post training to evaluate the consolidation of aversive memory. The animals were trained in the inhibitory avoidance task that was to distributed the animals into two groups: N/Sh - without exposure to shock, W/Sh - with exposed to shock (0.5 mA) for 10 seconds, to record the latency of descent (L1). Twenty-four hours later, each animal was exposed again on SD to record latency (L2), but without shock. The results were evaluated by analysis of variance (ANOVA) of three factors (Factor 1: condition; Factor 2: pre-treatment Factor 3: treatment) for L1 and L2. The results showed that there was an increase of L2 after exposure of mice to SD without shock, confirming that the aversive stimulus (shock) was strong enough to promote facilitation of aversive memory. The two doses (3.0 and 30 nmol) of MDZ intra-PAG decreased the risk assessment of mice, characterized by the fast descent of the platform in L1. This result suggests that GABA-benzodiazepine agonist impaired the acquisition, consolidation and retrieval of aversive memory in mice. Taken together, these results suggest that GABAA receptors within PAG seem to modulate the response related to aversive memory induced by shock.

Key-words: memory, anxiety, periaqueductal gray matter, midazolam, avoidance inhibitory, mice



## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>9</b>  |
| 1.1 Aprendizagem e memória.....   | 9         |
| 1.2. Plasticidade e memória.....  | 11        |
| 1.3. Esquiva inibitória.....  | 12        |
| 1.4. Substância cinzenta periaquedutal.....   | 15        |
| 1.5. Benzodiazepínicos.....   | 18        |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>   | <b>20</b> |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>21</b> |
| 3.1 Sujeitos.....   | 21        |
| 3.2 Cirurgia e Microinjeção.....  | 21        |
| 3.3 Droga.....  | 22        |
| 3.4 Equipamentos.....   | 22        |
| 3.4.1 Esquiva inibitória - “Step-Down” (SD).....  | 22        |
| 3.5 Procedimento Geral.....   | 24        |
| 3.5. Histologia.....  | 28        |
| <b>4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>   | <b>29</b> |
| <b>5. ÉTICA .....</b>   | <b>29</b> |
| <b>6. RESULTADOS.....</b>   | <b>30</b> |
| 6.1. Experimento 1 – Efeito da injeção pré-treino de salina e midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µl) na SCP de camundongos sobre a aquisição da memória aversiva produzida pela exposição ao “Step-Down”.....    | 31        |
| 6.2. Experimento 2 – Efeito da injeção pré-teste de salina e midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µl) na SCP em camundongos sobre a evocação da memória aversiva produzida pela exposição ao “Step-Down”.....      | 32        |
| 6.3. Experimento 3 – Efeito da injeção pós-treino de salina e midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µl) na SCP de camundongos sobre a consolidação da memória aversiva produzida pela exposição ao “Step-Down”..... | 34        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>7. DISCUSSÃO .....</b>                  | <b>36</b> |
| <b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b> | <b>43</b> |

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Aprendizagem e memória**

A memória pode ser definida como o registro da representação de informações adquiridas através de experiências. Apesar do nosso organismo estar constantemente recebendo informações através de nossos sentidos, apenas uma pequena fração será retida de forma duradoura. A intensidade e a duração da memória são determinadas pela importância da informação, o grau de atenção e a emoção envolvidos no momento da aquisição da mesma (IZQUIERDO, 2002).

Conceitualmente, a memória compreende a aquisição, consolidação, armazenamento e a evocação de informações. Podemos afirmar ‘somos aquilo que recordamos’, pois não podemos fazer aquilo que não sabemos como fazer, nem comunicar nada que desconhecamos, isto é, nada que não esteja na nossa memória. O acervo de nossas memórias faz com que cada um de nós seja o que é, cada indivíduo, um ser para o qual não existe outro idêntico (IZQUIERDO, 2002).

A aprendizagem pode ser definida como uma mudança relativamente duradoura do comportamento, de uma forma sistemática, ou não, adquirida pela experiência, pela observação e pela prática motivada (GONÇALVES, 2001).

Tanto a aprendizagem como a memória são propriedades fundamentais do sistema nervoso central (SNC), sendo que ambas estão intimamente relacionadas. Os indivíduos apresentam capacidade de adaptação e modificação de seu comportamento quando expostos a novas experiências, e a capacidade de aprender e de recordar eventos, depende de modificações induzidas no SNC pela percepção desses eventos (RAMON Y CAJAL, 1911).

Sendo um processo dinâmico, a memória pode ser dividida em quatro etapas definidas como: aquisição, consolidação, armazenamento e evocação:

1ª Etapa - Aquisição da informação, através da exposição a uma experiência, seja ela interna ou externa ao indivíduo. Esse processo se produz de forma rápida e consta essencialmente da associação de estímulos e respostas entre si. Este processo associativo ou não, inicialmente é intenso e se manifesta no fato de ser a memória de uma experiência recém-vivida, que geralmente é fiel e precisa ao estímulo que conduziu sua criação.

Entretanto, com o passar do tempo, essa intensidade e clareza poderão sofrer um decréscimo (CAMMAROTA, 1997). Não recordamos tudo o que nos sucede, e do que recordamos não possuímos todos os detalhes. Só guardamos aquilo que, por determinadas circunstâncias, individuais e do contexto, parecem ser determinantes (necessárias e suficientes) para nos capacitar a recordar.

2ª Etapa - O processo de filtração e fixação progressiva da informação adquirida recebe o nome de consolidação, fase em que a informação é adquirida e processada. Esta é a fase do processamento da memória em que a mesma se mostra mais lábil e mais suscetível a modificações (MCGAUGH, 2000).

3ª Etapa - Uma vez consolidada(s), a(s) memória(s) devem ser "guardadas" em algum lugar do encéfalo, como o cortex- pré-frontal, hipocampo e amígdala, e, com o passar do tempo, ocorre o armazenamento da informação (IZQUIERDO, 1989; MCGAUGH, 1996, 2000).

4ª Etapa - A única maneira de estudar e avaliar o armazenamento da informação é através da evocação desta, quando observamos a mudança de comportamento do animal devido ao processo de memorização (IZQUIERDO et al., 1998, 2000; VIANNA et al., 2000).

A consequência das três primeiras etapas envolvidas na memória seria a aprendizagem, que se manifesta por um novo comportamento, ou a modificação de um pré-existente. Entretanto, a maioria dos pesquisadores restringe o processo de aprendizagem somente à aquisição de novos conhecimentos, enquanto que a memória seria a retenção,

codificação dos mesmos (IZQUIERDO et al., 1992; SQUIRE & KANDEL, 2000; MORGADO, 2002). Por definição, não há aprendizagem sem memória e nem memória sem aprendizagem, pois ambos os processos encontram-se intimamente ligados e estão presentes em muitos processos cerebrais, como, por exemplo, o reconhecimento da percepção sensorial (IZQUIERDO et al., 1992).

O aprendizado é quantificado experimentalmente como a probabilidade com que um organismo responderá, diferentemente, ao mesmo estímulo após sua repetição. Devido à dificuldade, e muitas controvérsias, em se definir o que vem a ser literalmente aprendizagem, tem-se optado por um termo mais geral que é a plasticidade.

## **1.2. Plasticidade e memória**

As alterações observadas no processo de aprendizagem e memória ocorrem devido à plasticidade cerebral, fenômeno característico do sistema nervoso central (SNC) (RAMÓN Y CAJAL, 1911). O conceito de plasticidade é extremamente amplo e consiste na capacidade do SNC modificar sua estrutura (SVOBODA & HOLTMAAT, 2009) e função e em decorrência de experiências anteriores e, além disso, inclui todas as formas de reorganização duradoura que ocorrem no encéfalo.

Estas reorganizações podem ser observadas sob diferentes aspectos: a) fisiológico - envolvendo as propriedades funcionais adquiridas pelos neurônios; b) morfológico - determinando a forma e estrutura neuronal e glial; c) bioquímico – relacionado a avaliação das atividades enzimáticas, transdução de sinal e mudanças na expressão gênica. Estas adaptações/reorganizações promovem alterações na eficiência sináptica e podem aumentar ou diminuir a transmissão de impulsos, com a conseqüente modulação do comportamento (AU LOIS et al., 1997; MCMAHON & BARRIONUEVO, 2002).

O encéfalo tem a extraordinária capacidade de desenvolver respostas plásticas durante longos períodos, podendo durar por toda a vida, sendo que a plasticidade funcional está acoplada a mudanças estruturais de longa duração (AU LOIS et al., 1997).

A idéia de que a memória está baseada em modificações dependentes do uso em conexões sinápticas é antiga, remetendo-nos aos trabalhos de Freud (1895), Pavlov (1926), Hebb (1949) e Ramón y Cajal (1911, 1952). Nos últimos anos, essa idéia foi reforçada pelo estudo de fenômenos de plasticidade neuronal, entre eles o potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation* – BLISS & LOMO, 1973; BLISS & COLLINGRIDGE, 1993).

Os fenômenos de potenciação de longa duração e depressão de longa duração- cujas siglas, LTP e LTD, derivam do inglês, respectivamente, *long term potentiation e long term depression*- foram considerados como possíveis bases dos processos de aprendizagem e memória. Consistem de formas persistentes de aumento (LTP) ou diminuição (LTD) da eficiência das respostas neuronais a uma breve estimulação tetânica (no caso da LTD, de baixa frequência) de um axônio ou conjunto de axônios (BEAR et al., 2002). Essa "plasticidade sináptica" é o conjunto de processos fisiológicos em nível subcelular e/ou molecular que explica a capacidade dos neurônios de mudar suas respostas em conformidade a determinados estímulos.

Essas respostas foram apresentadas em estudos demonstrando que o SNC pode exibir plasticidade sináptica sutil e específica em resposta a uma dada atividade, como por exemplo, a aprendizagem de uma nova tarefa (COTMAN et al., 1998).

### **1.3. Esquiva inibitória**

O estudo das bases biológicas da aprendizagem e memória teve início com Ivan Pavlov, em seu tratado "*Conditioned reflexes: an integrated investigation of the physiological*

*activity of the cerebral cortex*” (1927), o qual estabeleceu os preceitos do condicionamento associativo, também denominado condicionamento clássico ou Pavloviano. Ele descreveu que quando um estímulo condicionado (EC), o qual inicialmente não produz uma resposta comportamental significativa, é pareado com um estímulo incondicionado (EI) (biologicamente significante, que produz invariavelmente uma resposta), o mesmo passa a produzir uma resposta condicionada. Ou seja, ocorre uma associação entre os dois estímulos. Se o EC for repetidamente apresentado sem o EI, o animal tenderá a produzir uma nova associação. Além disso, EC sem EI diminui a resposta condicionada.

O condicionamento Pavloviano constitui o fundamento dos paradigmas comportamentais utilizados para o estudo dos processos relacionados às memórias. Entre os modelos mais utilizados, está a tarefa de esquiva inibitória (IZQUIERDO, 1999; CAMMAROTA et al., 2004), no equipamento em que mede a latência de descida da plataforma, do inglês, *Step-Down*, utilizado como paradigma comportamental nesta dissertação.

Nessa tarefa, o animal aprende a associar o contexto do aparato, inicialmente não aversivo, ao recebimento de choque elétrico. Nesse caso, o EC é comumente um determinado contexto, e o EI, o choque nas patas. Após a associação entre o EC e o EI, a exposição ao contexto provoca uma resposta condicionada, usualmente quantificada pela resposta estereotipada, chamada de congelamento (*freezing*), fazendo com que aumente a latência de descida do animal na plataforma.

A tarefa de esquiva inibitória, no teste de *Step-Down*, envolve a aprendizagem de uma tarefa aversiva onde, na sessão de treino, o animal ao descer da plataforma, recebe choque de baixa intensidade. Na sessão de teste, que pode ocorrer em vários tempos pós-treino, o animal é exposto novamente àquele ambiente para avaliação da sua memória ao contexto. Para avaliar o quanto o animal aprendeu durante a reexposição ao aparato, mede-se o tempo que o

animal leva para descer da plataforma (latência de descida). Quanto mais tempo este permanece na plataforma, maior será a latência de descida (GOLD, 1986; IZQUIERDO & MEDINA, 1997), indicando que ocorreu aprendizagem na relação entre o contexto e a ocorrência do choque (estímulo aversivo). Assim, este teste produz aprendizado a partir de uma única tentativa, tornando-o ideal para o estudo de processos envolvidos na aprendizagem e memória (IZQUIERDO & MEDINA, 1997).

Essa tarefa de esquiva inibitória é utilizada para estudar processos de memória iniciados durante e após o treino, por que: a) Em geral pode ser aprendido com uma única sessão de treino; b) Não é contaminado por sessões prévias ou subseqüentes, como ocorre nas tarefas de labirinto aquático, labirinto radial ou esquiva ativa (IZQUIERDO, 1989; IZQUIERDO & McGAUGH, 2000).

Os paradigmas experimentais para a inibição dos comportamentos motivados pelo medo são conhecidos desde Pavlov (1927) e, embora suas bases neurais ainda não estejam adequadamente caracterizadas, seus princípios comportamentais são empregados no tratamento psiquiátrico em humanos. Portanto, o renovado interesse pelas bases biológicas do processo de memórias aversivas tem sido guiado, pelo aumento da prevalência de desordens relacionadas ao medo e a ansiedade na população mundial, e pela busca de mecanismos biológicos que constituem substratos para o tratamento efetivo destes transtornos (MYERS & DAVIS, 2002).

Demonstrações experimentais sugerem que diferentes tipos de paradigmas de aprendizagem envolvem diferentes estruturas cerebrais para o condicionamento inibitório (DUDAI, 2003; CHAN et al., 2009). Essas estruturas cerebrais, tais como, hipocampo, amígdala, córtex entorrinal participam da circuitaria dos processos emocionais e se interligam para a emissão dos comportamentos.



#### 1.4. Substância cinzenta periaquedutal

A substância cinzenta periaquedutal (SCP) é uma estrutura do sistema nervoso central, localizada no mesencéfalo, margeando o aqueduto cerebral, e é apontada como uma estrutura muito importante no controle de diferentes reações emocionais e fisiológicas pois pertence às bases neurais do comportamento emocional e do sistema cerebral aversivo em diversos animais, incluindo o homem (BRANDÃO et al., 1999).

Evidências obtidas em laboratório indicam a existência de circuitos neurais específicos relacionando o comportamento aversivo à ansiedade. São eles, o *sistema encefálico aversivo*, representado pelo hipotálamo medial, SCP dorsal e pela amígdala, que está associado à emissão de respostas incondicionadas (BRANDÃO et al., 1994; BRANDÃO et al., 1999); e o *sistema de inibição comportamental*, representado pelo sistema septo-hipocampal, núcleo mediano da rafe e SCP ventral, que está associado à organização das respostas condicionadas (GRAY & MCNAUGHTON, 2000). A ativação de um ou de outro sistema resulta na experiência emocional a qual denominamos medo/pânico e ansiedade (BRANDÃO et al., 2003).

Em relação a SCP, alguns autores mostraram a existência de quatro principais subdivisões designadas colunas. São elas: coluna dorsomedial (SCPdm), dorsolateral (SCPdl), ventrolateral (SCPvl) e lateral (SCPl) (BANDLER et al., 1991; CARRIVE, 1993). Tem se sugerido que a coluna ventrolateral medeia a resposta de congelamento condicionado, e a coluna lateral está associada ao comportamento de fuga vigorosa, respostas motoras e autonômicas (VIANNA et al., 2001).

As colunas, dorsolateral e dorsomedial, juntas, constituem a SCP dorsal (SCPd). Muitos estudos têm apresentado o envolvimento da SCPd na coordenação dos diferentes aspectos da reação de defesa, tais como comportamento de congelamento e fuga. O congelamento e a fuga têm um valor visível para a sobrevivência das espécies,

particularmente o congelamento, que é apresentado por roedores quando expostos a uma ameaça distal ou quando em contato com predadores em ameaça proximal (CANTERAS et al., 2003).

Estudos têm demonstrado que a estimulação elétrica dessa estrutura elicia respostas aversivas incondicionadas associadas com alterações autonômicas e sensoriais, tais como, ansiedade, pânico, terror e sentimento de iminência de morte, acompanhado de dor no peito, taquicardia, sufocamento, exoftalmia, tremor, calafrios e vertigem, apresentados em humanos (COIMBRA & BRANDÃO, 1993; BRANDÃO et al., 1999; VIANNA et al., 2001; MAGIEREK et al., 2003). Em estudos experimentais, com roedores, têm sido observado que a estimulação desta estrutura provoca os comportamentos relacionados às reações de defesa, tais como, luta, fuga, esquiva e imobilidade (CANTERAS et al., 2003).

Além disso, a localização neuroanatômica, e as abundantes conexões aferentes e eferentes, favorecem a participação da SCP em vários sistemas ascendentes e descendentes do encéfalo (MANTHY, 1992; BEITZ, 1990). Tal condição, do posicionamento favorável, sugere que essa estrutura esteja interligada a um grande número de circuitos neurais responsáveis pela modulação e coordenação de muitas funções fundamentais para a sobrevivência do organismo, como por exemplo, modulação do controle respiratório (SUBRAMANIAN & BALNAVE, 2008), participação no comportamento maternal e predatório (SUKIKARA et al., 2006), processamento de informações dolorosas (HU et al., 2009), reações de defesa relacionadas ao medo e ansiedade (GRAEFF, 1993) e distúrbio do pânico (DEL-BEN & GRAEFF, 2008).

Ainda, evidências relevantes sobre o envolvimento da SCP com o medo, dor e ansiedade, foram e continuam sendo descritas na literatura. Neste sentido, a injeção local de midazolam na SCP de ratos produziu diminuição do efeito antinociceptivo induzido pela morfina (MANTEGAZZA et al., 1982), enquanto em outro estudo, baixas doses de

midazolam impediram a expressão do medo condicionado em ratos, depois de um evento aversivo (PAIN et al., 2002).

Em relação ao envolvimento da SCP sobre a ansiedade, tem-se que a administração de midazolam, agonista GABA<sub>A</sub>-benzodiazepínico (MURAI et al., 1994), produziu efeito ansiolítico em ratos avaliados no LCE (MOTTA & BRANDÃO, 1993; RUSSO et al., 1993). Em outras estruturas do SNC, tais como núcleo dorsal da rafe (GONZALEZ & FILE, 1997), amígdala basolateral (GREEN & VALE, 1992; ZANGROSSI & GRAEFF, 1994; PESOLD & TREIT, 1994) e septo (PESOLD & TREIT, 1994, 1996) também produziu efeito ansiolítico no labirinto.

Este efeito ansiolítico foi igualmente observado com injeção deste agonista GABA<sub>A</sub> intra-SCP, em camundongos ingênuos ao labirinto em cruz elevado (REIS & CANTO-DE-SOUZA, 2008). Em outras estruturas, como por exemplo, intra-amígdala, também produziu efeito ansiolítico em camundongos ingênuos e reexpostos no labirinto em cruz elevado (LCE) (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; MENDES-GOMES & NUNES-DE-SOUZA, 2005; BARBALHO, NUNES-DE-SOUZA & CANTO-DE-SOUZA, 2009).

Conforme citado acima, vários estudos em roedores têm demonstrado que a administração de benzodiazepínicos, de forma sistêmica ou em diferentes estruturas do SNC produz efeito ansiolítico. No entanto, apesar dos benzodiazepínicos diminuírem a ansiedade em roedores e humanos, esta classe de fármaco produz como efeito colateral, amnésia anterógrada e prejuízo na memória.

Apesar dos conhecimentos da literatura já terem mostrado que existe uma relação entre ansiedade/medo e memória emocional, bem como o papel da SCP nos processos de ansiedade/medo (PAUL et al., 2005; CURRAN & MINTZER, 2006; SERAFIM et al., 2010), *pouco se conhece sobre o envolvimento desta estrutura na modulação da formação da memória e sua relação com aprendizagem aversiva.*

## 1.5. Benzodiazepínicos

Os ansiolíticos, palavra que significa figuradamente “o que decompõe a ansiedade” (GRAEFF & GUIMARÃES, 1999), surgiram no começo do século XX, mas apenas na década de 60 a classe dos benzodiazepínicos foi introduzida na terapêutica (MILANI & GRAEFF, 1987).

Os principais efeitos destes fármacos são: indução de sono, relaxamento muscular, efeito ansiolítico e anticonvulsivante (LADER & PETURSSON, 1981). Como efeitos colaterais, podemos citar amnésia anterógrada, sedação e dependência (GRAEFF & GUIMARÃES, 1999). Os benzodiazepínicos exercem ações específicas envolvendo o sistema gama-amino-butírico (GABA). O GABA é um neurotransmissor com propriedade inibitória que atua em todo o SNC.

Até o momento, são conhecidos dois tipos de receptores para o GABA: GABA<sub>A</sub>, mais importante e o único relevante na ação dos BZD e o GABA<sub>B</sub>, conhecido como sítio de ação do baclofen, um relaxante muscular de ação central (SIEGHART, 1999). O receptor GABA<sub>A</sub> pertence à superfamília de receptores pentaméricos que é constituída por duas subunidades alfa ( $\alpha$ ), duas subunidades beta ( $\beta$ ) e uma gama ( $\gamma$ ), dispostos ao redor de um canal de cloro (SIEGHART, 1999). Neste receptor GABA<sub>A</sub>, os canais de íons cloreto e os receptores benzodiazepínicos formam um complexo macromolecular, funcionando como sítio de modulação alostérica. Os ligantes dos receptores benzodiazepínicos são capazes de modular as funções de abertura dos canais mediados pelo GABA, mesmo interagindo com o sítio diferente no receptor GABA<sub>A</sub> (HAEFELY, 1990).

Esse fenômeno ocorre por que a ligação dos benzodiazepínicos com o sítio específico do receptor GABA<sub>A</sub> promove mudança do estado conformacional do receptor, produzindo aumento da afinidade deste receptor pelo próprio GABA (GUIDOTTI et al., 1980; HAEFELY, 1990). A ativação dos receptores GABA<sub>A</sub> pelo próprio GABA liberado na

sinapse, provoca um aumento transitório da condutância dos canais de cloreto, que resulta em hiperpolarização da membrana e reduz a probabilidade de geração do potencial de ação (HAEFELY, 1990).

Diversos autores relatam que os medicamentos ansiolíticos da classe GABA-benzodiazepínicos são amplamente utilizados para o tratamento da ansiedade, tanto na clínica como em modelos animais (GRAEFF & GUIMARÃES, 1999).

Estudos prévios em roedores demonstraram que as principais estruturas cerebrais onde os benzodiazepínicos reduzem o quadro de ansiedade são: hipotálamo, amígdala e SCP (BARBALHO, NUNES-DE-SOUZA & CANTO-DE-SOUZA, 2009; MENDES-GOMES & NUNES-DE-SOUZA, 2005; REIS & CANTO-DE-SOUZA, 2008; ZANGROSSI & GRAEFF, 1994).

Em conjunto, os achados evidenciam a participação da SCP na fisiopatologia da ansiedade. No entanto, são escassos os estudos envolvendo a SCP nos processos de aprendizagem e memória e, principalmente, não se sabe o papel dos receptores GABA-benzodiazepínicos nesta resposta comportamental.

## 2. OBJETIVOS

### Geral

Investigar o papel da substância cinzenta periaquedutal de camundongos sobre a aquisição, consolidação e evocação da memória aversiva.

### Específicos

Para isso foram realizados os seguintes experimentos:

- Experimento 1 – Avaliar o efeito da injeção pré-treino de salina e midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µl) na SCP de camundongos sobre a aquisição da memória aversiva produzida pela exposição ao “Step-Down”.
- Experimento 2 – Avaliar o efeito da injeção pré-teste de salina e midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µl) na SCP em camundongos sobre a evocação da memória aversiva produzida pela exposição ao “Step-Down”.
- Experimento 3 – Avaliar o efeito da injeção pós-treino de salina e midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µl) na SCP de camundongos sobre a consolidação da memória aversiva produzida pela exposição ao “Step-Down”.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Sujeitos

Foram utilizados camundongos da cepa Suíço-albino ingênuos, machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos, pesando entre 24 e 30g. Os animais ficaram agrupados em gaiolas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm, 10 animais por gaiola), foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00 horas), com condições controladas de temperatura ( $23 \pm 1$  °C) e umidade ( $55 \pm 5\%$ ).

Todos os sujeitos tiveram livre acesso a comida e água, exceto nas sessões de teste, que foram realizadas durante o período claro do ciclo claro-escuro, entre 8:00 e 18:00 horas.

#### 3.2 Cirurgia e Microinjeção

Os animais receberam implantação craniana de cânula-guia (25-gauge) de 7 mm de comprimento, após anestesia com solução de cloridrato de cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p., respectivamente), com ângulo de 26°, na substância cinzenta periaquedutal. A cânula foi fixada no crânio do animal com cimento acrílico auto polimerizante clássico (JET). As coordenadas esterotáticas (Insight EFF-333-Equipamentos Científicos Ltda, Brasil) para implantação da cânula-guia, definidas pelo Atlas de Franklin e Paxinos (1997), foram: antero-posterior (AP)= -4,1mm; lateral (L)= +1,3mm e ventral (V)= -1,2mm, ao bregma. A ponta da cânula-guia foi posicionada  $\pm 1,0$  mm dorsal à estrutura alvo. O mandril, o qual foi removido durante o procedimento de injeção, foi inserido dentro da cânula-guia para evitar problemas com obstrução e para reduzir contaminação. A agulha de injeção (33-gauge) foi conectada, por meio de tudo de polietileno (PE-10), a microsseringa Hamilton de 10  $\mu$ L. Uma bomba de infusão (Insight BI 2000- Equipamentos Científicos, Ltda, Brasil) foi programada para injetar 0,1  $\mu$ L de solução durante um período de 60 segundos.

O procedimento de microinjeção consistiu na remoção do mandril, inserção da agulha de injeção, injeção da solução por 60 segundos, permanência da agulha de injeção por 90 segundos e, após o término da injeção e inserção do mandril, enquanto o animal foi contido manualmente pelo pesquisador. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois da injeção confirmou o fluxo da solução (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000). Foi realizado duas injeções intra-SCP, na primeira exposição, treino, e na segunda exposição, teste.

### **3.3 Droga**

Midazolam (MDZ) (8-Cloro-6-(2-fluorofenil)-1-metil-4H-imidazo[1,5-a][1,4] maleato de benzodiazepina), PM: 441,8g, dissolvido em salina (0,9% NaCl), nas doses de 3,0 e 30 nmol/0,1µL (Roche, Brasil). A dose utilizada foi selecionada com base em estudos prévios do nosso grupo (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; REIS & CANTO-DE-SOUZA, 2008; BARBALHO et al., 2009) e foi mantida sob refrigeração em tubos codificados. Os códigos somente foram revelados após a análise das fitas gravadas.

### **3.4 Equipamentos**

#### **3.4.1 Esquiva inibitória - “Step-Down” (SD)**

O aparelho utilizado para o treino na tarefa de esquiva inibitória, o “Step-Down”, consiste em uma caixa de ferro (30 x 5,0 x 15 cm) com a parede frontal de vidro removível; possui o assoalho formado por 13 barras paralelas de aço inoxidável, separadas 1,0 cm de distância. Sobre as barras, ao centro do aparelho, está fixada uma plataforma de madeira 5x5cm (Figura 1). O aparato é conectado a um painel que permite ao experimentador ter controle sobre a intensidade da estimulação elétrica, o qual o animal será submetido



(ARDENGI et al., 1997; BERNABEU et al., 1997; BEVILAQUA et al., 1997; IZQUIERDO et al., 1997).



**Figura 1:** Fotografia da caixa de esquiva inibitória.

Os animais foram inicialmente submetidos a uma sessão de treinamento individual na qual eram cuidadosamente colocados sobre a plataforma fixa no centro da caixa de esquiva inibitória para que explorassem a mesma. Quando desciam da plataforma com as quatro patas sobre as barras de aço, que constituem o assoalho da caixa, recebiam o choque de 0,5mA por 10 segundos (CAMMAROTA et al., 2003). Posteriormente eram retirados e retornavam para a gaiola moradia.

Para avaliar a retenção da memória de esquiva de longa duração os animais foram submetidos a uma sessão de teste comportamental 24 horas após o treino. O procedimento utilizado na sessão de teste foi idêntico àquele empregado na sessão de treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebia o choque. Para ambas as sessões, foi adotado como tempo máximo de descida da plataforma 300 segundos. Aqueles animais que durante a sessão de treino não desceram da plataforma antes de transcorridos 300 segundos foram eliminados do estudo.

### 3.5 Procedimento Geral

Os animais foram aleatoriamente distribuídos nos seguintes experimentos a saber:

- Experimento 1 – avaliação dos efeitos da salina e midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µL) injetado na SCP de camundongos no pré-treino ao SD, para verificar a aquisição da memória.
- Experimento 2 – avaliação dos efeitos da injeção pré-teste ao SD de salina e midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µL) na SCP de camundongos, para verificar a evocação da memória.
- Experimento 3 – avaliação dos efeitos da salina e midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µL) injetado na SCP de camundongos no pós-treino ao SD, para verificar a consolidação da memória.

Para a realização dos três experimentos os camundongos foram distribuídos durante a primeira (Treino) e a segunda exposição (Teste) ao SD, a saber:

#### 3.4.2.1 Primeira Exposição ao SD (Treino)

- Sem estimulação elétrica (SCh) - Cada animal foi colocado individualmente sobre a plataforma de madeira e o tempo (segundos) de permanência na mesma foi registrado (latência de treino – L1). Assim que o animal colocou as quatro patas nas barras de aço foi retirado da caixa e alojado em gaiolas coletivas (10 por gaiola) e mantido no biotério por 24 horas.
- Com estimulação elétrica (CCh) - Semelhante ao grupo SCh, exceto que quando o animal desceu da plataforma com as quatro patas, recebeu choque nas mesmas, na intensidade de 0,5 mA, com duração de dez segundos (um choque por segundo).

#### 3.4.2.2 Segunda Exposição ao SD (Teste)

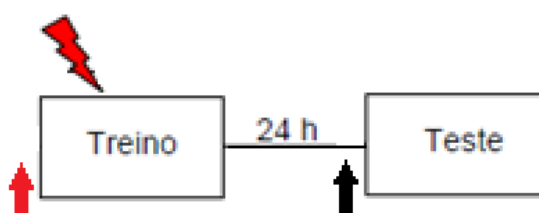
O procedimento na sessão de teste foi idêntico à sessão treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebeu choque. O teste foi realizado 24 horas após o treino.

Durante o teste no SD o tempo de permanência dos sujeitos na plataforma foi registrado (latência de teste – L2). A diferença entre o tempo que o animal permaneceu sobre a plataforma na sessão de teste (latência de teste, L2) e o tempo que permaneceu sobre a mesma, na sessão de treino (latência de treino, L1), foi estabelecido como sendo o valor utilizado para a medida que permitiu inferir se ocorreu ou não a aprendizagem. Nos casos onde ocorreu aprendizagem/memória, a latência de teste for maior que a de treino, ou seja, o animal recordou da exposição ao contexto (choque).

Para ambas as sessões, foi estabelecido como tempo máximo de descida da plataforma 300s. Se o animal ultrapassasse este limite, era excluído do estudo. Todos os testes no SD foram filmados por uma câmera, e os resultados foram analisados posteriormente por observação na televisão e vídeo.

### 3.4.2.3 Experimento 1 - Aquisição da Memória

Para avaliar o efeito sobre a aquisição da memória, os animais dos grupos SCh e CCh foram aleatoriamente separados nos subgrupos para a administração de salina ou midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1 $\mu$ L). A injeção intra-SCP foi realizada imediatamente antes do treino e pré-teste (Figura 2), formando os seguintes grupos experimentais (Tabela 1):



**Figura 2.** Esquema do protocolo utilizado no experimento 1.

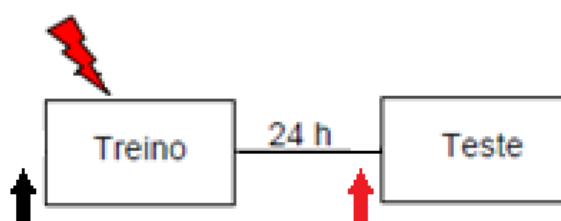


**Tabela 1. Descrição dos grupos experimentais na aquisição da memória**

| Condição Experimental | Treino            |      | Teste           |    |
|-----------------------|-------------------|------|-----------------|----|
|                       | Injeção intra-SCP | Dose | N               |    |
| Sem choque            | SAL               | SAL  | 0,9% NaCl/0,1µL | 11 |
| Sem choque            | MDZ               | SAL  | 3,0 nmol/0,1µL  | 9  |
| Sem choque            | MDZ               | SAL  | 30 nmol/0,1µL   | 9  |
| Com choque            | SAL               | SAL  | 0,9% NaCl/0,1µL | 10 |
| Com choque            | MDZ               | SAL  | 3,0 nmol/0,1µL  | 10 |
| Com choque            | MDZ               | SAL  | 30 nmol/0,1µL   | 10 |

#### 3.4.2.4 Experimento 2 - Evocação da Memória

Para avaliar o efeito sobre a evocação da memória, os animais dos grupos SCh e CCh foram aleatoriamente separados nos subgrupos com administração de salina e midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µL). A injeção intra-SCP foi realizada imediatamente antes do treino e pré-teste (Figura 3), formando os seguintes grupos experimentais (Tabela 2):

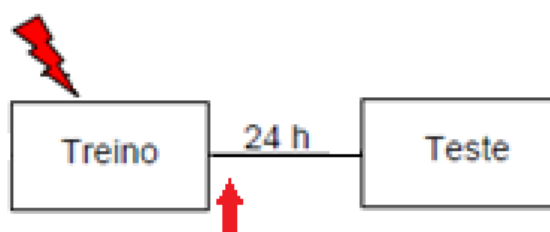
**Figura 3.** Esquema do protocolo utilizado no experimento 2.

**Tabela 2. Descrição dos grupos experimentais na evocação da memória**

| Condição Experimental | Treino     |     | Teste             |                 |   |
|-----------------------|------------|-----|-------------------|-----------------|---|
|                       |            |     | Injeção intra-SCP | Dose            | N |
|                       | Sem choque | SAL | SAL               | 0,9% NaCl/0,1µL | 9 |
| Sem choque            | SAL        | MDZ | 3,0 nmol/0,1µL    | 7               |   |
| Sem choque            | SAL        | MDZ | 30 nmol/0,1µL     | 10              |   |
| Com choque            | SAL        | SAL | 0,9% NaCl/0,1µL   | 10              |   |
| Com choque            | SAL        | MDZ | 3,0 nmol/0,1µL    | 9               |   |
| Com choque            | SAL        | MDZ | 30 nmol/0,1µL     | 8               |   |

### 3.4.2.5 Experimento 3 - Consolidação da Memória

Para avaliar o efeito sobre a consolidação da memória, os animais dos grupos SCh e CCh foram aleatoriamente separados nos subgrupos com administração de salina e midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µL). A injeção intra-SCP foi realizada imediatamente pós-treino (Figura 4), formando os seguintes grupos experimentais (Tabela 3):



**Figura 4.** Esquema do protocolo utilizado no Experimento 3.



**Tabela 3. Descrição dos grupos experimentais na consolidação da memória**

| Condição Experimental | Teste             |                 |   |
|-----------------------|-------------------|-----------------|---|
|                       | Injeção intra-SCP | Dose            | N |
| Sem choque            | SAL               | 0,9% NaCl/0,1µL | 8 |
| Sem choque            | MDZ               | 3,0 nmol/0,1µL  | 9 |
| Sem choque            | MDZ               | 30 nmol/0,1µL   | 7 |
| Com choque            | SAL               | 0,9% NaCl/0,1µL | 9 |
| Com choque            | MDZ               | 3,0 nmol/0,1µL  | 9 |
| Com choque            | MDZ               | 30 nmol/0,1µL   | 7 |

### 3.5. Histologia

Após o término dos experimentos os animais receberam injeção intra-SCP de 0,1 µl de uma solução de 1% de azul de metileno, de acordo com o procedimento descrito para a injeção de drogas. Os animais receberam uma dose maior de anestésico, cetamina e xilazina (300 mg/kg e 30 mg/kg, i.p, respectivamente), foram decapitados, seus cérebros removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%), para posteriormente sofrerem secções coronais ao longo do trajeto da cânula com auxílio de um criostato.

As secções foram inspecionadas com o uso de um microscópio e a visualização da dispersão do azul de metileno indicou o local da injeção de acordo com o Atlas de Franklin e Paxinos (1997). Apenas os animais com canulação positiva na SCP, verificado pela histologia, foram incluídos na análise estatística dos dados.

#### 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) e foram submetidos ao teste de Levene para verificar a homogeneidade da amostra. O teste de Levene foi negativo para todos os valores de L1, renomeado para latência de treino, portanto a análise pode ser paramétrica. Em L2, renomeado para teste, o dado depende do treino e portanto não precisamos repetir o teste de Levene. Em seguida foi realizada uma análise paramétrica, análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de 3 fatores (Fator 1: condição; Fator 2: pré-tratamento; Fator 3: tratamento) para a avaliação da latência de treino (L1) e latência de teste (L2) no experimento I e II. E a ANOVA de 2 fatores (Fator 1: condição; Fator 2: tratamento) para avaliação da latência no experimento III.

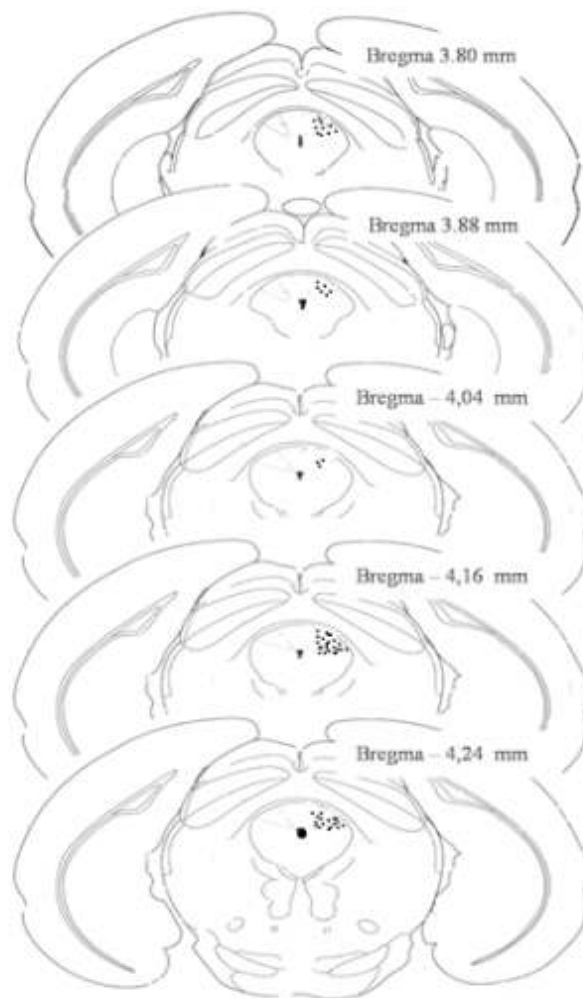
Quando os valores de F foram significativos foi realizado o *post hoc* de Duncan. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

#### 5. ÉTICA

Os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) e aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de São Carlos, sob o número: 195/2011.

## 6. RESULTADOS

A análise histológica confirmou que a inserção da cânula na SCP ocorreu em um total de 161 animais. No Experimento 1 foram 29 animais expostos ao SD SCh e 30 ao SD CCh; no Experimento 2 foram 26 animais expostos ao SD SCh e 27 ao SD CCh e no Experimento 3 foram 24 animais expostos ao SD SCh e 25 ao SD CCh.

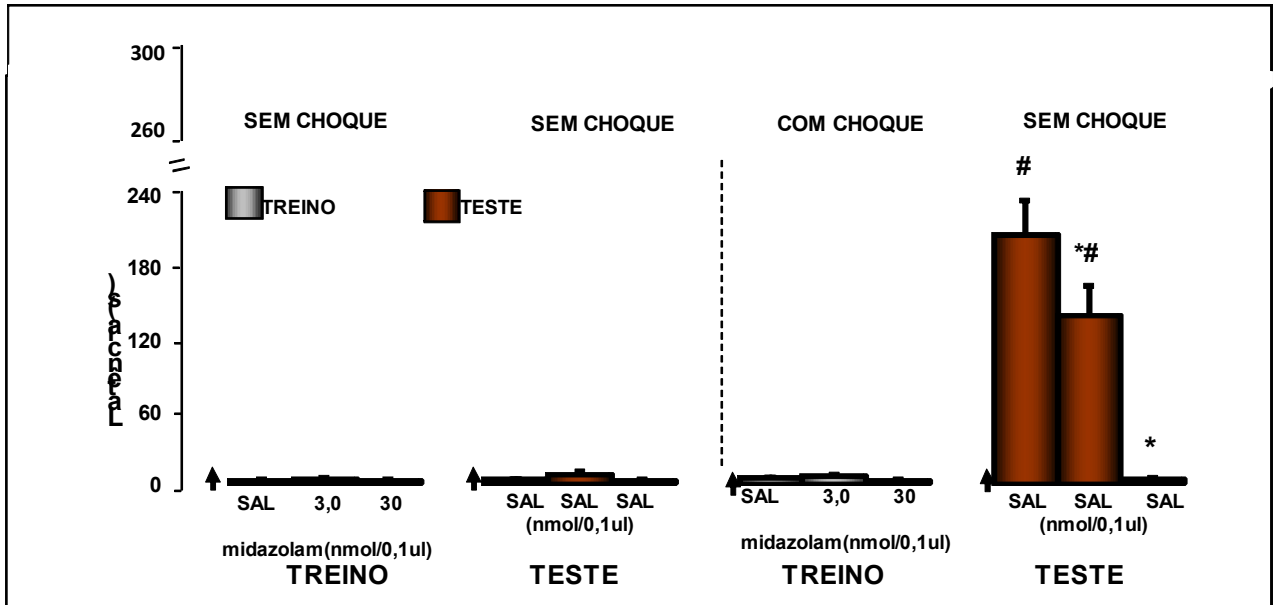


**Figura 5.** Representação de secção coronal do mesencéfalo mostrando os sítios de injeção na substância cinzenta periaquedutal (SCP) de camundongos. As secções correspondem à medida de -3,80 mm a -4,24 mm a partir do bregma no Atlas de Franklin e Paxinos (1997). O número de pontos é inferior ao número total de animais devido à sobreposição.



### **6.1. Experimento 1 – Efeito da injeção pré-treino de salina e midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µl) na SCP de camundongos sobre a aquisição da memória aversiva produzida pela exposição ao “Step-Down”.**

Os resultados em relação ao experimento I, aquisição, podem ser observados na figura 6, apresentando a média da latência de descida da plataforma, no treino (L1) e teste (L2), na tarefa de esQUIVA inibitória em camundongos. Na aquisição a ANOVA para medidas repetidas (condição x tratamento) revelou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para condição [ $F(1,48) = 64,76$ ], pré-tratamento [ $F(2,48) = 17,99$ ] e para interação dos três fatores [ $F(2,48) = 17,65$ ]. Análises posteriores no teste *post hoc* de Duncan, observados no experimento I, revelaram que o efeito da condição ocorreu entre os grupos (SAL+SAL, CCh) quando comparado ao grupo (SAL+SAL, SCh), mostrando aumento da latência de descida para os animais que receberam choque 24 horas antes da reexposição ao SD e também houve efeito da condição para o grupo tratado na dose de 3,0 nmol, comparando-se a latência do teste no grupo (MDZ 3,0+SAL, SCh) ao grupo (MDZ 3,0+SAL, CCh), sendo a maior latência observada no grupo CCh. O efeito do MDZ sobre a memória emocional foi observado nos grupos tratados com MDZ na dose de 3,0 e 30,0 nmol, (MDZ3,0+ SAL; MDZ30,0+SAL, CCh), apenas quando os camundongos foram submetidos ao evento aversivo, ou seja, o efeito foi dependente do contexto. Esse efeito do MDZ na dose de 3,0 e 30,0 nmol, na condição aversiva, indica amnésia uma vez que a latência de descida foi menor quando comparado ao grupo salina na mesma condição e ao grupo sem choque com o mesmo tratamento farmacológico.



**Figura 6.** Efeito da injeção intra-SCP de midazolam (MDZ, 3,0 e 30nmol/0,1 $\mu$ L) ou salina (SAL, 0,9%NaCl/ 0,1 $\mu$ L), administrado pré-treino, e salina (SAL, 0,9%NaCl/ 0,1 $\mu$ L) pré-teste, sobre o comportamento de camundongos na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA. Os valores representam a média e o erro padrão da média (M+EPM) da latência de descida durante o treino e no teste nos grupos: Sem choque-SCh {salina+salina [SAL+SAL (n=11)];}; midazolam 3,0+salina [MDZ 3,0+SAL (n=9)]; midazolam 30+salina [MDZ 30+SAL (n=9)]; e Com Choque- CCh {salina+salina [SAL+SAL (n=10)]; midazolam 3,0+salina [MDZ 3,0+SAL (n=10)]; midazolam 30+salina [MDZ 30+SAL (n=10)]}.

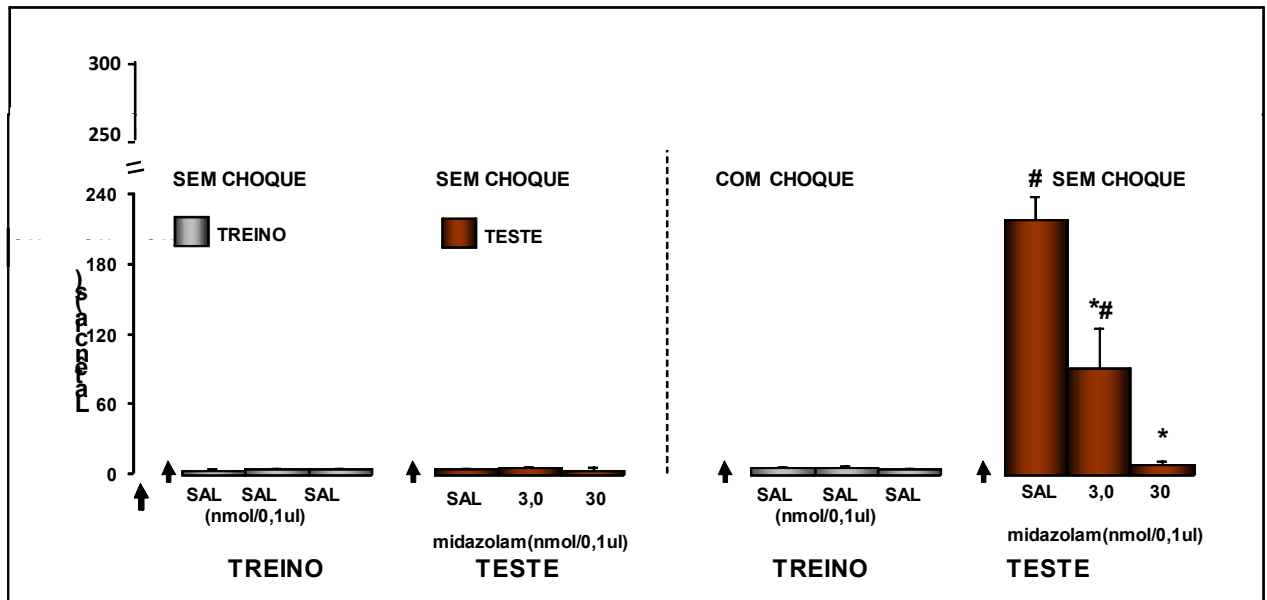
\* $p < 0,05$  comparado a salina teste no grupo CCh após o treino (ANOVA para medidas repetidas, seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan).

# $p < 0,05$  comparado ao respectivo salina teste no grupo SCh após o treino (ANOVA para medidas repetidas, seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan).

## 6.2. Experimento 2 – Efeito da injeção pré-teste de salina e midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1 $\mu$ L) na SCP em camundongos sobre a evocação da memória aversiva produzida pela exposição ao “Step-Down”.

Os resultados em relação ao experimento II, evocação, podem ser observados na figuras 7, apresentando a média da latência de descida da plataforma, no treino (L1) e teste (L2), na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA em camundongos. Na evocação a ANOVA para medidas

repetidas (condição x tratamento) também revelou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para condição [ $F(1,47) = 41,81$ ], tratamento [ $F(2,47) = 16,36$ ] e para interação dos três fatores [ $F(2,47) = 16,16$ ].



**Figura 7.** Efeito da injeção intra-SCP de salina (SAL, 0,9%NaCl/ 0,1 $\mu$ L), administrado pré-treino, e midazolam (MDZ, 3,0 e 30nmol/0,1 $\mu$ L) ou salina (SAL, 0,9%NaCl/ 0,1 $\mu$ L), administrado pré-teste, sobre o comportamento de camundongos na tarefa de esquivas inibitória. Os valores representam a média e o erro padrão da média (M+EPM) da latência de descida durante o treino e no teste nos grupos: Sem choque - SCh {salina+salina [SAL+SAL (n=9)]; salina+midazolam 3,0 [SAL+MDZ 3,0 (n=7)]; salina+midazolam 30 [SAL+MDZ 30 (n=10)]; e Com Choque - CCh {salina+salina [SAL+SAL (n=10)]; salina+midazolam 3,0 [SAL+MDZ 3,0 (n=9)]; salina+midazolam 30 [SAL+MDZ 30 (n=8)]}.

\* $p < 0,05$  comparado a salina teste no grupo CCh após o treino (ANOVA para medidas repetidas, seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan).

# $p < 0,05$  comparado ao respectivo salina teste no grupo SCh após o treino (ANOVA para medidas repetidas, seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan).

Análises posteriores no teste *post hoc* de Duncan, observados no experimento II, revelaram que o efeito da condição ocorreu entre os grupos (SAL+SAL, CCh) quando comparado ao grupo (SAL+SAL, SCh), apresentando aumento da latência de descida para os

animais que receberam choque 24 horas antes da reexposição ao SD e igualmente foi observado aumento da latência de teste nos animais tratados com midazolam na dose de 3,0 nmol do grupo (MDZ 3,0+SAL, CCh) quando comparado ao grupo (MDZ 3,0+SAL, SCh).

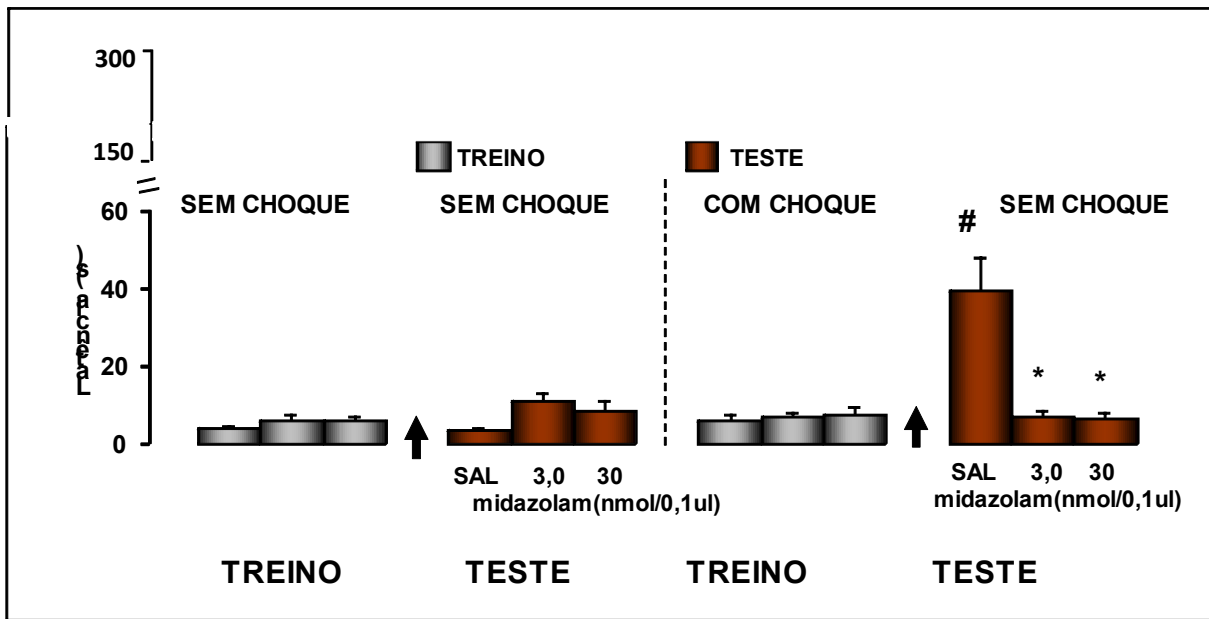
O efeito do MDZ sobre a memória emocional foi observado nos grupos tratados com MDZ na dose de 3,0 e 30,0 nmol, (MDZ3,0+ SAL; MDZ30,0+SAL, CCh), apenas quando os camundongos foram submetidos ao evento aversivo, ou seja, o efeito do MDZ foi dependente do contexto. Esse efeito do MDZ, na condição aversiva, indica amnésia uma vez que a latência de descida foi menor quando comparado ao grupo salina na mesma condição e ao grupo sem choque com o mesmo tratamento farmacológico.

### **6.3. Experimento 3 – Efeito da injeção pós-treino de salina e midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µl) na SCP de camundongos sobre a consolidação da memória aversiva produzida pela exposição ao “Step-Down”.**

Nossos dados, no experimento I e II, apontaram estatisticamente para um efeito amnésico do MDZ na dose de 30,0 nmol. Deste modo, para nos certificarmos da existência do efeito sobre a aprendizagem e memória, iniciamos experimento III com a injeção pós-treino de MDZ na dose de 3,0 e 30,0 nmol/região.

Os resultados em relação ao Experimento 3, podem ser observados na figura 8 apresentando a média da latência de descida da plataforma referente ao treino e ao teste. A ANOVA para medidas repetidas (condição x tratamento) revelou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para condição [ $F(1,43) = 5,78$ ], tratamento [ $F(2,43) = 7,96$ ] e para interação dos dois fatores [ $F(2,43) = 12,97$ ]. Análises posteriores de *post hoc* de Duncan revelaram que o efeito da condição ocorreu apenas entre os grupos (SAL, CCh) quando comparado ao grupo (SAL, SCh), mostrando aumento da latência de descida para os animais que receberam choque 24 horas antes da reexposição ao SD. O efeito do MDZ sobre a consolidação da memória

emocional foi observado nos grupos tratados com MDZ na dose de 3,0 e 30,0 nmol, (MDZ 3,0, CCh; MDZ 30,0, CCh), apenas quando os camundongos foram submetidos ao evento aversivo, ou seja, o efeito foi dependente do contexto.



**Figura 8.** Efeito da injeção intra-SCP de salina (SAL, 0,9%NaCl/ 0,1 $\mu$ L) ou midazolam (MDZ, 3,0 e 30nmol/0,1 $\mu$ L) administrado pós-treino, sobre o comportamento de camundongos na tarefa de esQUIVA inibitória. Os valores representam a média e o erro padrão da média (M+EPM) da latência de descida durante o treino e no teste nos grupos: Sem choque - SCh {salina [SAL, (n=8)]; midazolam 3,0 [MDZ 3,0 (n=9)]; midazolam 30 [MDZ 30 (n=7)]; e Com Choque - CCh {salina [SAL, (n=9)]; midazolam 3,0 [MDZ 3,0 (n=9)]; midazolam 30 [MDZ 30 (n=7)]}.

\* $p < 0,05$  comparado a salina teste no grupo CCh após o treino (ANOVA para medidas repetidas, seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan).

#  $p < 0,05$  comparado ao respectivo salina teste no grupo SCh após o treino (ANOVA para medidas repetidas, seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan).

Esse efeito do MDZ nas doses de 3,0 e 30,0 nmol apresenta um efeito amnésico uma vez que a latência de descida foi menor quando comparado ao grupo salina na mesma condição e ao grupo sem choque com o mesmo tratamento farmacológico.

## 7. DISCUSSÃO

Neste estudo, analisamos a interação entre aumento da atividade gabaérgica na substância cinzenta periaquedutal (SCP), e seus efeitos sobre a memória, demonstrando que o midazolam nas doses de 3,0 e 30 nmol intra-SCP pré-treino, pré-teste e pós-treino, ou seja, na aquisição, evocação e consolidação, respectivamente, apresenta efeito amnésico para as memórias de curta e longa duração, associadas com a tarefa de esquiva inibitória de uma única sessão em camundongos.

A modulação da memória e a elucidação dos processos envolvidas na aquisição/formação tem sido assunto de diversos estudos (IZQUIERDO et al., 2002; IZQUIERDO & GRAUDENZ, 1980; FERRY et al., 1999), entretanto o envolvimento da SCP de camundongos neste contexto são pouco conhecidos .

Neste sentido, nos Experimentos 1 e 2, verificamos que o agonista dos receptores GABA<sub>A</sub>-Benzodiazepínico, midazolam (MDZ), administrado pré-treino e pré-teste, exerceu efeito dependente do contexto, prejudicando a aquisição e evocação da memória na tarefa de esquiva inibitória. Este agonista aumenta a liberação de GABA nos terminais sinápticos, aumentando, portanto, o tônus gabaérgico no SNC, reduzindo a excitabilidade neuronal e a atividade das projeções colinérgicas (ZARRINDAST, 2012).

No que se refere aos efeitos do aumento ou diminuição de GABA nos terminais sinápticos, eles podem ser dependentes da via e local de administração dos compostos. Em experimentos com animais, os efeitos do midazolam tanto sistêmico quanto central, no modelo de esquiva inibitória, são escassos. No modelo de condicionamento clássico de medo contextual, Santos e colaboradores (2005) após a administração de midazolam, sistêmico, relataram uma redução da imobilidade e do sobressalto potencializado pelo medo, em ratos, e Gafford e colaboradores (2005) observaram que a administração hipocampal de midazolam imediatamente após a sessão de treino prejudicou o condicionamento clássico de medo.

Além desses estudos, Davidson & Weidley (1976) e Rodriguez (1992), observaram que os benzodiazepínicos quando administrados sistemicamente, promoveram diminuição nas respostas de esquiva no procedimento de pressão à barra. Outros autores, também observaram diminuição da resposta de esquiva ativa após a injeção sistêmica de doses altas de benzodiazepínicos (BARBEE, 1993; LISTER, 1985; THIEBOT, 1985).

Alguns estudos apresentaram diminuição da avaliação de risco, após injeção local de midazolam na porção dorsolateral da SCP e inibição significativa do comportamento de imobilidade no modelo de condicionamento clássico de medo contextual (CASTILHO et al., 2002; FANSELOW & HELMSTETTER, 1988), mas no nosso estudo não avaliamos com detalhes este tipo de comportamento.

A diminuição da expressão das respostas condicionadas pela administração de benzodiazepínicos é geralmente atribuída à sua ação ansiolítica (LADER & PETURSSON, 1981). Este efeito também pode ser observado em outros estudos, envolvendo diferentes modelos, como o labirinto em cruz elevado (LCE), que mede o nível de ansiedade, e estruturas diferentes, como o núcleo dorsal da rafe (GONZALEZ & FILE, 1997), hipotálamo dorsomedial (JARDIM & GUIMARÃES, 2004), septo (PESOLD & TREIT, 1994, 1996), substância cinzenta periaquedutal (BRANDÃO et al., 1994; RUSSO et al., 1993; MENDES-GOMES & NUNES-DE-SOUZA, 2005; REIS & CANTO-DE-SOUZA, 2008) e amígdala (PESOLD & TREIT, 1995; FILE et al., 1998; ZANGROSSI & GRAEFF, 1999; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BARBALHO et al., 2009) demonstraram que a injeção de midazolam promoveu diminuição da ansiedade, efeito ansiolítico.

Apesar do efeito ansiolítico, a propriedade amnésica é relevante para o modelo que testamos, uma vez que o condicionamento de medo Pavloviano situa-se na interface entre as respostas referentes a memória e a emoção (MAREN, 2001). Sendo assim, o efeito amnésico do midazolam, encontrado nos Experimentos 1 e 2, pode ser atribuído a diminuição da

avaliação de risco produzido por este fármaco. Com o objetivo de certificarmos de que o efeito amnésico era devido aos mecanismos relacionados a aprendizagem e memória, foi realizado o Experimento 3.

No Experimento 3, os resultados apontaram para um efeito amnésico do midazolam, administrado pós-treino, sobre a consolidação da memória e dependente da condição/choque na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA. O resultado deste experimento nos aponta evidências de que o efeito é amnésico e atribuído aos mecanismos envolvidos na aprendizagem e memória e não aos efeitos ansiolíticos do midazolam.

Nos três experimentos verificamos que a condição, ou seja, a exposição ao estímulo aversivo (choque) foi fundamental para produzir aumento na latência de descida da plataforma. Além disso, o efeito do midazolam foi contexto dependente, porque a diminuição da latência de descida em L2, só ocorreu para os animais expostos previamente a condição de choque nas patas. Os nossos resultados corroboram com outros estudos onde foi demonstrado que roedores expostos a estímulos aversivos, como por exemplo a aplicação de estimulação elétrica nas patas, recordam do estímulo em subsequente reexposição, sem que haja repetição do choque. Neste sentido, vários trabalhos descritos na literatura têm utilizado o condicionamento aversivo (choque nas patas) para o estudo da memória e aprendizagem em roedores (STEENBERGEN, 1990; FARR, 1995; PODHORNA, 2002; CAMMAROTA, 2005).

A memória emocional permite que o animal evite uma situação potencialmente aversiva em determinado momento, por exemplo, choque nas patas, possa ser repetida em experiência futura (CURRAN & MINTZER, 2006). No nosso estudo, os resultados obtidos com a injeção de midazolam, intra-SCP, nas duas doses em camundongos, pré-treino, pré-teste e pós-treino, e que foram expostos ao choque, demonstrou que os animais foram incapazes de lembrar da experiência prévia à esQUIVA INIBITÓRIA, quando comparados aos



animais que não receberam choque. Diante desses resultados, sugerimos que o midazolam intra-SCP provocou déficit de memória dependente do contexto.

Outros autores observaram que a ação dos benzodiazepínicos sobre o condicionamento de medo parece envolver interações entre processos mnemônicos e emocionais. Desta forma, o midazolam exibe efeitos amnésicos (POLSTER et al.,1993; THOMAS-ANTERION et al.,1999; HIRSHMAN et al.,1999) bem como propriedades ansiolíticas potenciais (SALONEN et al., 1992), resultados semelhantes foram obtidos neste estudo, conforme apresentado nos três experimentos.

Nossos resultados são similares àqueles previamente encontrados por outros autores que utilizaram paradigmas para avaliar o medo inato, como a exposição ao odor de predador, e observaram atenuação das respostas defensivas do rato frente ao odor de gato, após a administração do benzodiazepínico midazolam (DIELENBERG et al., 1999; DO-MONTE, 2010).

Evidências da literatura têm apontado para a ação dos benzodiazepínicos sobre o condicionamento clássico de medo é exclusivamente mnemônica (PAIN et al., 2002). No entanto, estudo utilizando ratos Wistar no paradigma de esquiva ativa, demonstrou que o midazolam produziu efeito ansiolítico enquanto o zolpidem, agonista GABA<sub>A</sub> na subunidade  $\alpha 1$ , não apresentou efeito na aquisição de memória. Porém, na evocação, o midazolam e o zolpidem produziram efeito amnésico. Isso pode ser atribuído ao fato de que a subunidade  $\alpha 1$  dos receptores GABA<sub>A</sub>-benzodiazepínicos esteja envolvida nos processos de memória e não nos de ansiedade, ou seja, as subunidades desse receptor parecem modular respostas comportamentais diferentes (SÁVIC et al., 2005).

Porém, outros tipos de receptores e neurotransmissores estão envolvidos na modulação da memória aversiva e da ansiedade e que as vias gabaérgicas são ubiqüitárias no sistema nervoso central, portanto, todos os sistemas de neurotransmissão, inclusive

mediadores de ações ansiogênicas podem ser influenciados pela neurotransmissão gabaérgica. Neste sentido, estudos envolvendo a avaliação de ratos Wistar, com infusão intra-SCP de antagonistas NMDA (AP5 ou ifenprodil), pré-teste na tarefa de esQUIVA inibitória demonstrou que ambos os antagonistas reduziram a latência de descida da plataforma na tarefa de esQUIVA inibitória, e que interneurônios gabaérgicos localizados em grupos celulares do *locus coeruleus* são ativados na tentativa de controlar a atividade noradrenérgica exacerbada no medo condicionado (ISHIDA et al., 2002). Sendo assim, alguns autores sugerem que a SCP é uma estrutura chave na modulação do comportamento em contextos aversivos e para a formação da memória emocional (KINCHESKI & CAROBREZ, 2010).

Além disso, outros sistemas de neurotransmissores podem promover prejuízos ou melhora da memória emocional. Neste sentido, a injeção de histamina no hipocampo de ratos, melhorou a consolidação da memória na tarefa de esQUIVA inibitória (DA SILVA et al., 2006). Entretanto, outros estudos têm demonstrado que a L-histidina, precursor da histamina, promove prejuízo estado dependente na evocação da memória emocional em camundongos (SERAFIM et al., 2010; GIANLORENÇO et al., 2011a; 2011b; GIANLORENÇO et al., 2012).

Outras estruturas do sistema nervoso central (SNC), como a amígdala e hipocampo, também foram estudadas para verificar a ação dos benzodiazepínicos sobre os processos de memória. As vias do GABA no encéfalo são de fato longas e complexas. Algo importante a se mencionar é que o hipocampo é uma estrutura rica em neurônios gabaérgicos (KALLUEF & NUTT, 2006; BANKS, WHITE & PEARCE, 2000) e que a injeção de bicuculina, antagonista gabaérgico, na região CA1 do hipocampo imediatamente ou 1,5h após o treino, favoreceu a consolidação da memória (LUFT et al, 2004). Este efeito mnemônico deve-se ao aumento da expressão de BDNF e fatores de crescimento no hipocampo (KATOH-SEMBA et al, 2001). No entanto, quando a estrutura alvo foi a amígdala, vários autores observaram que a injeção

de midazolam, no teste de esquiva inibitória ativa, prejudicou a memória (DICKINSON-ANSON & MCGAUGH, 1993; ZANATTA et al., 1997).

Alguns estudos têm sido feitos para compreender melhor a participação das diferentes estruturas cerebrais e dos diferentes receptores no processo de formação da memória, uma vez que experimentos demonstraram que a memória certamente não é formada ou consolidada somente em um local do encéfalo (SQUIRE & KNOWLTON, 1994; BARROS et al., 2000).

Neste sentido, vias de ligação entre estruturas e as projeções de neurotransmissores são fundamentais para o processamento da informação e a emissão de comportamento. Dentre estas vias de ligação existe a via amígdala-SCP que foi sugerida, por Martinez & Canteras (2011), por participar da formação de memória contextual e ser crítica para a ocorrência de associação ao contexto. Além da via amígdala-SCP, outros autores sugeriram outra via de ligação envolvendo a SCP e os processos de aprendizagem e memória, em que a SCP emitiria projeções para o tálamo, via hipotálamo anterior, e modularia os mecanismos mnemônicos (DIELENBERG et al., 2001; WILENT et al., 2010, 2011). Estes trabalhos, juntamente com outros descritos neste estudo, reforçam a ideia de que a substância cinzenta periaquedutal é uma estrutura fundamental na modulação dos processos relacionados à memória emocional.

## 8. CONCLUSÃO

Diante do exposto acima concluímos que:

- A reexposição dos camundongos ao ambiente aversivo, caixa de “Step-Down”, produziu aumento da permanência na plataforma durante L2 nos animais do grupo controle que haviam recebido choque (CCh) no treino, caracterizando que o estímulo (choque) foi suficientemente forte para produzir alteração na memória emocional desses animais.
- As injeções intra-SCP de midazolam (3,0 e 30,0nmol/0,1µL) produziram diminuição da latência de descida em L2, efeito este que pode ser caracterizado como efeito amnésico.
- O efeito amnésico do midazolam é dependente do contexto, ou seja, a diminuição da latência de descida em L2 só foi observada nos animais que receberam injeção de midazolam e que receberam o estímulo aversivo (choque).
- Portanto, a aquisição, evocação e a consolidação da memória foram prejudicadas pela injeção das duas doses de midazolam intra-SCP na condição aversiva.

Os resultados apresentados neste trabalho nos permitem sugerir que os receptores GABAA-benzodiazepínicos da SCP parecem modular os processos relacionados à memória emocional avaliada na tarefa de esquiva inibitória.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDENGHI, P.; BARROS, D.; BEVILAQUA, L.; SCHRODER, N.; QUEVEDO, J.; RODRIGUES, C.; MADRUGA, M.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, L.A. Late and prolonged post-training memory modulation in entorhinal and parietal cortex by drugs acting on the cAMP/protein kinase A signalling pathway. **Behavioural Pharmacol.**, v.8, n8, p. 745-751, 1997.
- AU LOIS, N.C.; NIQUET, J.; BEN-ARI, Y.; REPRESA, A. Cellular plasticity. In: **Epilepsy: a comprehensive textbook**. Ed. Lippincott- Raven Publishers, p. 387-396, 1997.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P.; DEPAULIS, A. Emerging principles of organization of the midbrain periaqueductal gray matter. **Plenum Press**, New York, p.1-8, 1991.
- BANKS, M.I.; WHITE, J.A.; PEARCE, R, A. Interactions between distinct GABA (A) circuits in hippocampus. **Neuron.**, v. 25, p. 449-457, 2000.
- BARBALHO, C.A.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: Evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. **Brain Research**, v.1267, p. 65-76, 2009.
- BARBEE, J.G. Memory, benzodiazepines and anxiety: Integration of theoretical and clinical perspectives. **Journal of clinical Psychiatry**, v.54, p 86-101, 1993.
- BARROS, D.M.; IZQUIERDO, L.A.; MELO E SOUZA, T.; ARDENGHI, P.G.; PEREIRA, P.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Molecular signalling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 114, p. 183-192, 2000.
- BEAR, MF.; CONNORS, B.W.E.; PARADISO, M.A. **Neurociências: Desvendando o sistema nervoso**. Segunda edição, Artmed, Porto Alegre, 2002.
- BEITZ , A.J. Central Gray. In: Paxinos, G. The human nervous system. **Academic Press**, New York, 1990.
- BERNABEU, R.; BEVILAQUA, L.; ARDENGHI, P.; BROMBERG, E.; SCHIMITZ, P.; BIANCHIN, M. Involvement of hippocampal D1/D5 receptor –cAMP signaling pathway in a late memory consolidation phase of an aversively motivated task in rats . **Proc. Natl Acad Sci**, v.94, p.7041-7046, 1997.
- BEVILAQUA, L.; BERNABEU, R.; ARDENGHI, P.; BROMBERG, E.; SCHIMITZ, P.; SHAEFFER, E.; QUEVEDO, J. Drugs action upon the protein kinase A/CREB pathway modulate memory consolidation when given late after training into rat hippocampus but not amygdala. **Behavioral Pharmacology**. v.8, p.331-338, 1997.
- BLISS, T.V.P; LOMO T. – Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **J Physiol.**, v.232, p. 331-356, 1973.

BLISS, T.V.P.; COLLINGRIDGE, G.L. – A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v.361, p.31-39, 1993.

BRADLER, J.E.; BARRIONUEVO, G. Heterosynaptic correlates of long-term potentiation induction in hippocampal CA3 neurons. **Neuroscience**, v.35, p.265-71, 1990.

BRANDÃO, M.L., CARDOSO, S.H., MELO, L.L., MOTTA, V., COIMBRA, N.C. The neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.18, p.339-346, 1994.

BRANDÃO, M.L.; ANSELONI, V.Z.; PANDÓSSIO, J.E.; DE ARAÚJO, J.E.; CASTILHO, V.M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience Biobehavior Review**, v.1, p.863-75, 1999.

BRANDÃO, M.L.; VIANNA, D.M.; MASSON, S.; SANTOS, J. Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. **Revista brasileira de Psiquiatria**, v.25, p.36-41, 2003.

CAMMAROTA, M.; PARATCHA, G.; LEVI DE STEIN, M.; BERNABEU, R.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. B50/GAP43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance learning. **Neurochem Res.**, v.22, p.499-505, 1997.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. **Jornal of Neuroscience**, v. 23, p. 737-741, 2003.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. **Learn Memory**, v.11, p.572-578, 2004.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.; ROSSATO, J.; RAMIREZ, M.; MEDINA J.; IZQUIERDO, I. Relationship between short and long term memory and short and long term extinction. **Neurobiology of learning and memory**, v.84, p.25-32, 2005.

CANTERAS, N.S. Análise crítica dos sistemas neurais envolvidos nas respostas de medo inato. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, p. 21-24, 2003.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: Functional representation and neural organization. **Behavioural Brain Research**, v.58 (1-2), p. 27-47, 1993.

CASTILHO, V.M.; MACEDO, C.E.; BRANDÃO, M.L. Role of benzodiazepine and serotonergic mechanisms in conditioned freezing and antinociception using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray as unconditioned stimulus in rats. **Psychopharmacology**, v. 166, p 77-85, 2002.

CHAN, J.C.K. When does retrieval induce forgetting and when does it induce facilitation? Implications for retrieval inhibition, testing effect, and text processing. **Journal of Memory and Language**, v.61, n.2, p.153-170, 2009.

COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. GABAergic nigrocollicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. **Behavioral Brain Research**, v. 59, p. 131-139, 1993.

COTMAN, C.W.; AZIZEH, B.Y.; CRIBBS, D.H.; KRENG, V.M. Cross-linking of NCAM receptors on neurons induces programmed cell death. **Brain Research**, v.796, p. 20-26, 1996.

COTMAN, C.W. AXONAL SPROUTING. In: **Basic neurochemistry: Molecular cellular and medical aspects**, Eds. Lippincott-Raven Publishers, p. 589-612, 1998.

CURRAN, H.V.; MINTZER, M.Z. Psychopharmacology og memory. *Psychopharmacology*, v. 188, p. 393-396, 2006.

DA SILVA, W.C.; BONINI, J.S.; BEVILAQUA, L.R.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation throught a H2 receptor-dependent mechanism. **Neurobiology Learn and Memory**, v. 86, p.100-106, 2006.

DAVIDSON, A.B.; WEIDLEY, E. Differential effects of neuroleptic and other psychotropic agents on acquisition of avoidance in rats. **Life Sciences**, v. 18, n.11,p. 1279-1284,1976.

DEAKIN, J.W.F.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defense. **Journal of Psychopharmacology**, v.5, p.305-315, 1991.

DEL-BEN, C.; GRAEFF, F.G. Neurobiology of panic disorder: From animal models to brain neuroimaging. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.32, n.7, p.1326-1335, 2008.

DIELENBERG, R.A.; ARNOLD, J.C.; MCGREGOR, I.S. Low-dose midazolam attenuates predatory odor avoidance in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.62, p.197-201, 1999.

DIELENBERG, R.A.; HUNT, G.E.; MCGREGOR, I.S. "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. **Neuroscience**, v.104, p.1085-1097, 2001.

DICKINSON-ANSON, H.; MESCHES, M.H.; COLEMAN, K.; MCGAUGH, J.L. Bicuculline administered into the amygdala blocks benzodiazepine-induced amnesia. **Behavioral and Neural Biology**, v. 60, p. 1-4, 1993.

DO-MONTE, F.H.M.; KINCHESKI, G.C.; PAVESI, E.; SORDI, R.; ASSREUY, J.; CAROBREZ, A.P. Role of beta-adrenergic receptors in the ventromedial prefrontal cortex during contextual fear extinction in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, p. 318-328, 2010.

DUDAI, Y. Reconsolidation: the advantage of being refocused. **Current Opinion in Neurobiology**, v.16, p.174-178, 2003.

FANSELOW, M.S.; HELMSTETTER, F.J. Conditional analgesia, defensive freezing, and benzodiazepines. **Behavioral Neuroscience**, v. 102, p. 233-243, 1988.

FARR, S.A.; FOOD, J.; SCHERRER, J.; KAISER, F.; TAYLOR, G.; MORLEY, J. Effects of ovarian steroids on footshock avoidance learning and retention in female mice. **Physiology and Behavior**, v.58, n.4, p.715-723, 1995.

FERRY, B.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J.L. Involvement of the  $\alpha$ -adrenergic receptors in the basolateral amygdala in modulation of memory storage. **Eur J Pharmacol**, v.372, p.9-16, 1999a.

FILE, S.E.; GONZALEZ, L.E.; GALLANT, R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. **Neuropsychopharmacology**, v. 19, p.397-405, 1998.

FRANKLIN, K. B.; PAXINOS, G. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. **Ed. USA, Academic Press**. Califórnia, 1997.

FREUD, S. – Proyecto de una psicología para neurólogos, In: S. **Freud obras completas**, v.I, p.323-487,1895.

GAFFORD, G.M.; PARSONS, R.G.; HELMSTETTER, F.J. Effects of post-training hippocampal injections of midazolam on fear conditioning. **Learning and Memory**, v.12, p.573-578, 2005.

GIANROLENÇO, A.C.; CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. L-histidine induces state-dependent memory deficit in mice mediated by H1 receptor. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.35, p.91-95, 2011a.

GIANROLENÇO, A.C.; CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. Microinjection of histamine into the cerebellar vermis impairs emotional memory consolidation in mice. **Brain Research Bulletin**, v.86, p.134-138, 2011b.

GIANLORENÇO, A.C.L.; SERAFIM, K. R.; CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. Emotional memory consolidation impairment induced by histamine is mediated by H1 but not H2 receptors. **Brain Research Bulletin**, v.89, p. 197-202, 2012.

GOLD, P.E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behav. Neural Biol.*, v. 46, p. 87-98, 1986.

GONÇALVES, S. **Teorias da aprendizagem, praticas de ensino**. ESEC, 2001.

GONZALEZ, L.E.; FILE, S.E. A five-minutes experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. **Journal Neuroscience**, v. 11, p. 1505-1511, 1997.

GRAEFF, F.G.; SILVEIRA, M.C.L.; NOGUEIRA, R.L.; AUDI, E.A.; OLIVEIRA, R.M.W.. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behav. Brain Res.**, v.58, p 123–131, 1993.

GRAEFF, F.G.; GUIMARAES, F.S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo, editora Ateneu, 1999.



GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI JR, H. **Animal models of anxiety**. In: D'HAENEN, H.; DEN BOER, J.A.; WILLNER, P. Eds. *Biological Psychiatry*. John Wiley e Sons Ltd. p.1-15, 1999.

GRAY, J.A.; MCNAUGAHTON, N. *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. 2<sup>nd</sup> ed. **Oxford University Press**, London, England, 2000.

GREEN, S.; VALE, A.L. Role of amygdaloid nuclei in the anxiolytic effects benzodiazepines in rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 3, p. 261-264, 1992.

GUIDOTTI, A.; BARALDI, M.; LEON, A.; COSTA, E. Benzodiazepines: a tool to explore the biochemical and neurophysiological basis of anxiety. **Biochemical journal**, v. 39, p. 3039-3042, 1980.

HAEFELY, W.E. The GABAA-benzodiazepine receptor: biology and pharmacology. In: BURROWS, G.D.; ROTH,R.; NOYES,J.R: *Handbook of anxiety*, v.3. **The Neurobiology of anxiety**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 165-188, 1990.

HEBB, D.O. – *The Organisation of Behaviour: A Neuropsychological Theory*. New York, Wiley, 1949.

HIRSHMAN, E.; PASSANANTE, A.; ARNDT, J. The effect of midazolam on the modality-match effect in implicit memory. **Brain Res. Cogn. Brain Res.**, v.7, p. 473-479, 1999.

HU, J.; WANG, Z.; GUO, Y.; et al. A role of periaqueductal grey NR2B-containing NMDA receptor in mediating persistent inflammatory pain. **Molecular Pain**, v.5, p.71-81, 2009.

ISHIDA, Y.; HASHIGUCHI, H.; TAKEDA, R.; ISHIZUKA, Y.; MITSUYAMA, Y.; KANNAN, H. Conditioned-fear stress increases Fos expression in monoaminergic and GABAergic neurons in the locus coeruleus and dorsal raphe nuclei. **Synapse**, v.45, p.46–51, 2002.

IZQUIERDO, I.; GRAUDENZ, M. Memory facilitation by naloxone is due to release of dopaminergic and beta-adrenergic systems from tonic inhibition. **Psychopharmacology**, v. 67, p.265-268, 1980.

IZQUIERDO, I. Different forms of post-training memory processing. **Beh. Neural Biol.** v. 51, p. 171-202, 1989.

IZQUIERDO, I. The Neurobiology of memory consolidation. **Neurosci.** v.18, p.1-11, 1992.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology Learning Memory**, v.68, p.285-316, 1997.

IZQUIERDO, I. MEDINA, J.H, IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M.; DE SOUZA, M.M.; MELLO E SOUZA, T. Short and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 69, p. 219-224, 1998a.

IZQUIERDO, J.; BARROS, D.M.; MELLO E SOUZA, T.; DE SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, L.A.; MEDINA, J.H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, p.635-636, 1998b.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; VIANNA, M.R, IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M. Separate mechanisms for short and long-term memory. **Behavioral Brain Research**, v.103, p. 1-11, 1999.

IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J.L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Beh. Pharmacol.** v. 11, p-517-534, 2000.

IZQUIERDO, I. Memória. Artmed: Porto Alegre, p.95, 2002.

JARDIM, M.C.; GUIMARÃES, F.S. Role of glutamate ionotropic receptors in the dorsomedial hypothalamic nucleus on anxiety and locomotor behavior. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.79, p. 541-546, 2004.

KALUEFF, AV.; NUTT, DJ. Role of GABA in anxiety and depression. **Depress Anxiety** p.11--23, 2006.

KATOH-SEMBA, R.; TAKEUCHI, I.K.; INAGUNA, Y.; ICHISAKA, S.; et al. Induction of brain-derived neurotrophic factor by convulsant drugs in the brain: involvement of region-specific voltage-dependent calcium channels. **J Neurochem**, v. 7, p. 71-83, 2001.

KINCHESKI, G.C.; CAROBREZ, A. P.. The dorsal periaqueductal gray modulates the increased fear-like behavior exhibited by experienced rats in the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 206, p.120-126, 2010.

LADER, M.H.; PETURSSON, H. Benzodiazepine derivatives – side effects and dangers. **Biological Psychiatry**, v.16, p. 1195-1201, 1981.

LISTER, R.G. The amnesic action of benzodiazepines in man. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.9, n.1,p.87-94,1985.

LUFT, A.R.; BUITRAGO, M.M.; RINGER, T.; DICHGANS, J.; SCHULZ, J.B. Motor skill learning depends on protein synthesis in motor cortex after training. **J Neurosci.**, v.24, p.6515-6520, 2004.

MAGIEREK, V.; RAMOS, P.L.; SIKVEIRA-FILHO, N.G.; NOGUEIRA, R.L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Context fear conditioning inhibits panic-like behavior elicited by electrical stimulation of dorsal periaqueductal Gray. **Neuro Report**, v.14, n12, p. 1641-1644, 2003.

MANTEGAZZA, P.; PARENTI, M.; et al. Modification of the antinociceptive effect of morphine by centrally administered diazepam and midazolam. **Br. J. Pharmac.**, v.75, p.569-572, 1982.

MANTHY, P.H. The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat and monkey: a nissl, weiss and golgi analysis. **The J. Comp Neurol.**, v.204, p.146-158, 1982.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annu. Rev. Neurosci.** v.24, p. 897-931, 2001.

MARTINEZ, R.C.R.; CARVALHO-NETTO, E.F.; RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; BALDO, M.V.C.; CANTERAS, N.S. Amygdalar roles during exposure to a live predator and to a predator-associated context. **Neuroscience**, v. 172, p.314-328, 2011.

MCGAUGH, J.L.; CAHILL, L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends in Neurosciences**, v.21, n.7, p.294-299, 1998.

MCGAUGH, J.L. Memory –a century of consolidation. **Science**, v. 287, p.248-251, 2000.

MCGAUGH, J.L.; IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.21, n.6, p.208-210, 2000.

MCMAHON, D.B.; BARRIONUEVO, G. Short- and long-term plasticity of the perforant path synapse in hippocampal area CA3. **J Neurophysiol**, v.88, p.528-533, 2002.

MENDES-GOMES, J.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. **Brain Res.**, v.1047, p.97–104, 2005.

MILANI, H. e GRAEFF, F.G. GABA-benzodiazepine modulation of aversion in the medial hypothalamus of the rat. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.28, p.21-7, 1987.

MORGADO, B.I.; REDOLAR-RIPOLL, D.; ALDAVERT-VERA, L.; SORIANO-MAS, C.; SEGURA-TORRES, P. Intracranial self-stimulation facilitates memory consolidation, but not retrieval: its effects are more effective than increased training. **Behavioural Brain Research**, v.129, p.65-75,2002.

MOTTA, V.; BRANDÃO, M. L. Aversive and antiaversive effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 44, p. 119-25, 1993.

MURAI, T.; KOSHIKAWA, N.; KANAYAMA, T.; TAKADA, K.; TOMYAMA, K.; KOBAYASHI, M. Opoosite effects of midazolam and beta-carboline-3-carboxylate ethylester on the release of dopamine from rat nucleus accumbens measured by in vivo microdialysis. **European Journal Pharmacology**, v.11, n. 261, p. 65-71, 1994.

MYERS, K.M.; DAVIS, M. Systems-Level Reconsolidation: Reengagement of the Hippocampus with Memory Reactivation. **Neuron**, v.36, p.340-343, 2002.

NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; DA COSTA, M.; FORNARI, R.V.; GRAEDD, F.G.; PELÁ, I.R. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology**, v. 150, p. 300-310, 2000.

NUNES-DE-SOUZA, V.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; RODGERS, R.J.; CANTO-DE-SOUZA, A. 5-HT<sub>2</sub> receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. **Behav Brain Res.**, v.1, p.72-79, 2008.

PAIN, L.; LAUNOY, A.; FOUQUET, N.; OBERLING, P. Mechanisms of action of midazolam on expression of contextual fear in rats. **British J. Anaesth.**, v.89, p.614-621, 2002.

PAUL, E.S.; HARDING, E.J.; MENDEL, M. Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach, **Neuroscience and Behavior Reviews**, v.29, p.269-491,2005.

PAVLOV, I.P. **Conditioned reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex** . Oxford Univ. Press, London, 1927.

PESOLD, C.; TREIT, D. The septum and amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Brains Research**, v. 638, p. 213-221, 1994.

PESOLD, C.E.; TREIT, D. The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Brain Research**, v. 671, p. 213-221, 1996.

POLSTER, M.R.; MCCARTHY, R.A.; O'SULLIVAN, G.; GRAY, P.A.; PARK, G.R. Midazolam-induced amnesia: implications for the implicit/explicit memory distinction. **Brain Cogn.** v. 22, p. 244-65, 1993.

PODHORNA, J.; MCCBE, S.; BROWN, R.E. Male and female C57BL/6 mice respond differently to diazepam challenge in avoidance learning tasks. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.72, p.13-21, 2002.

RAMÓN Y CAJAL, S. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. **Madrid: Instituto Ramón y Cajal**, v.2,1911.

REIS, L.M.; CANTO-DE-SOUZA, A. Intra-periaqueductal gray matter injections of midazolam fail to alter anxiety in plus-maze experienced mice. **Brain Research**, v.1231, p.93-102, 2008.

RODRIGUEZ, R. Effects of various psychotropic drugs on the performance of avoidance and escape behavior in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 43, p. 1155-1159, 1992.

RUSSO, A.S.; GUIMARÃES, F.S.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Role of Benzodiazepines Receptors Located in the Dorsal Periaqueductal Gray of Rats in Anxiety. **Psychopharmacology Berl**, v. 110, p. 198-202, 1993.

SALONEN, M.; ONAIVI, E.S.; MAZE, M. Dexmedetomidine synergism with midazolam in the elevated plus-maze test in rats. **Psychopharmacology**, v. 108, p. 229-234, 1992.

SANTOS, J.A.; GÁRGARO, A.C.; OLIVEIRA, A.R.; MASSON, S.; BRANDÃO, M.L. Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing behavior and fear potentiated-startle. **European Neuropsychopharmacology**, v.15, p. 239-246, 2005.

SAVIC, M.M.; OBRADOVI, D.I.; UGRESI, N.D.; COOK, J.M.; YIN, W.; BOKONJI, D.R. Bidirectional effects of benzodiazepine binding site ligands in the passive avoidance task: differential antagonism by flumazenil and  $\alpha$ -CCt. **Behavioural Brain Research**, v. 158, p. 293–300, 2005.

SERAFIM, K.R.; KISHI, M.; CANTO-DE-SOUZA, A. MATTIOLI, R.. L-histidine provokes a state-dependent memory retrieval deficit in mice re-exposed to the elevated plus-maze. **Braz J Med Biol Research**, v.43, n.1, p. 100-106, 2010.

SIEGHART, W.; FUCHS, K.; TRETTER, V.; EBERT, V.; JECHLINGER, M.; HÖGER, H.; ADAMIKER, D. Structure and subunit composition of GABA<sub>A</sub> receptors. **Neurochemistry International**, v.34, n.5, p.379-385, 1999.

SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. **Memory: From mind to molecules**. New York, W.H. Freeman, 2000.

SQUIRE, L.R.; KNOWLTON, B. Memory, hippocampus and brain systems. In: **The Cognitive Neurosciences**. MIT Press, 1994

STEENBERGEN, H.; HEISBROEK, R.; HEST, A.; POLL, N. Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. **Physiology and Behavior**, v.48, p.571-576, 1990.

SUBRAMANIAN, H.H.; BALNAVE, R.J.; HOLSTEGE, G. The midbrain periaqueductal gray control of respiration. **J. Neurosci**, v.28, n.47, p.122274-122283, 2008.

SUKIKARA, M.H.; MOTA-ORTIZ, S.R.; BALBO, M.V.; FELICIO, L.F. A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. **J Neurosci.**, v.26, p.2583-9, 2006.

THIÉBOT, M.H. Some evidence for amnesic-like effects of benzodiazepines in animals. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 9, p 95-100, 1985.

THOMAS-ANTERION, C.; KOENING, O.; NAVEZ, M.; LAURENT, B. Midazolam effects on implicit and explicit memory process in healthy subjects. **Psychopharmacology**, v.145, p.139-143, 1999.

VIANNA, M.R.; BARROS, D.M.; SILVA, T.; CHOI, H.; MADCHIE, C.; RODRIGUES, C.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Pharmacological demonstration of the differential involvement of protein kinase C isoforms in short and long-term memory formation and retrieval of one-trial avoidance in rats. **Psychopharmacology**, v. 150, p 77-84, 2000.

VIANNA, D.M.L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M.L. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.25, p.711-719, 2001.

ZANATTA, M.S.; QUILLFELDT, J.H.; SCHAEFFER, E.; SCHMITZ, P.K.; QUEVEDO, J.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Involvement of the hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and posterior parietal cortex in memory consolidation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 235-240, 1997.

ZANGROSSI Jr, H.; GRAEFF, F.G. Behavioural effects of intra-amygdala injections of GABA and 5-HT acting drugs in the elevated plus-maze. **Braz. J. Med. Biol Res.**, v.27, p.2453–2456, 1994.

ZANGROSSI Jr, H.; VIANA, M.B.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic effect of intra-amygdala injection of midazolam and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin in the elevated T-maze. **European Journal of Pharmacology**, v. 369, p. 267-270, 1999.

ZARRINDAST, M.R.; YOUSEFI, B.; NASEHI, M.; KHAKPAI, F. Possible interaction of cholinergic and GABAergic systems between MS and CA1 upon memory acquisition in rats. **Behav Brain Res.**, v.235, p. 231-241, 2012

WILENT, W.B.; OH, M.Y.; BUETEFISCH, C.; BAILES, J.E.; CANTELLA, D.; ANGLE, C.; WHITING, D.M. Mapping of microstimulation evoked responses and unit activity patterns in the lateral hypothalamic area recorded in awake humans. **J Neurosurg.**, v.115, p.295-300, 2011.

WILENT, W.B.; OH, M.Y.; BUETEFISCH, C.; BAILES, J.E.; CANTELLA, D.; ANGLE, C.; WHITING, D.M. Induction of panic attack by stimulation of the ventromedial hypothalamus. **J Neurosurg.**, v.112, p.1295-1298, 2010.