

Karina Nicole Sobota

**ANÁLISE DA ESTRATÉGIA DE ENFRENTAMENTO
COMPORTAMENTAL (*COPING STYLE*) DURANTE O
CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO AVERSIVO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Pádua Carobrez.

Florianópolis
2013

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

Sobota, Karina Nicole
Análise da estratégia de enfrentamento comportamental
(coping style) durante o condicionamento olfatório aversivo
/ Karina Nicole Sobota ; orientador, Antonio de Pádua
Carobrez - Florianópolis, SC, 2013.
113 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Condicionamento olfatório aversivo.
3. Estratégias de enfrentamento. 4. Comportamentos
defensivos. 5. Estímulos aversivos. I. Carobrez, Antonio de
Pádua. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

**“Análise da estratégia de enfrentamento comportamental
(coping style) durante o condicionamento olfatório
aversivo”**

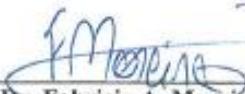
por

Karina Nicole Sobota

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final
pelos membros titulares da Banca Examinadora
(Port. 17/FMC/2013) do Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia - UFSC, composta
pelos Professores Doutores:



Prof. Dr. Antonio de Pádua Carobrez
(Presidente/Orientador/FMC/CCB/UFSC)



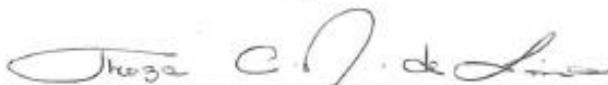
Prof. Dr. Fabricio A. Moreira (Farmacologia/ICB/UFMG)



Prof. Dr. José Marino Neto (CFS/CCB/UFSC)



Prof. Dr. Geison S. Izidoro (BEG/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro De Lima
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 13 de junho de 2013.

Meu avô amado, **Dido Gregório**

(in memoriam)

Por ser meu maior exemplo de luta, superação, otimismo e alegrias. Por sempre me ensinar a encarar os desafios do dia-a-dia com um sorriso no rosto e a sempre levar uma palavra amiga, a quem precisar. Por toda a sua história, que tanto nos orgulha e que embasou a nossa família com todo o amor, ternura e conhecimento!

Minha avó querida, **Baba Laura**

(in memoriam)

Por ter sido a melhor “mãe em dobro” para mim e para a Jana. Não existem palavras suficientes que consigam expressar quão fundamental você foi para o meu crescimento, e como ainda é presente na minha vida. Por ter sido a Baba mais doce, carinhosa, paciente, sincera, fofa, gostosa de abraçar... E por ter me criado com tanto amor e dedicação, me ensinando através do exemplo de mulher guerreira, que sempre foi.

Dedico este trabalho a vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, imensamente, ao professor Dr. Antonio de Pádua Carobrez, por ter confiado em meu trabalho durante esses anos, por ter me passado toda a segurança necessária desde a primeira conversa que tivemos, e por ter me tranquilizado e amparado nos momentos mais difíceis. Agradeço por compartilhar comigo toda a sua experiência e sabedoria, tornando-se elemento essencial em minha formação profissional. Muito obrigada!

A todos os professores do Departamento de Farmacologia da UFSC, por sempre contribuírem com o meu crescimento profissional, permitindo que esse “mundo científico e acadêmico” me encante ainda mais.

Agradeço, particularmente, a professora Dr.^a. Cilene Lino de Oliveira, que colaborou diretamente com esse trabalho. Agradeço pela disponibilidade imediata em nos ajudar, contribuindo imensamente com o seu conhecimento de forma tão generosa.

Aos professores Dr. Fabrício de Araújo Moreira, Dr. José Marino Neto, Dr. Geison de Souza Ezídio e Dr. Carlos Rogério Tonussi, por concordarem em avaliar esse trabalho, aprimorando-o com suas críticas e sugestões tão valiosas.

A grande amiga Juliana Kroon, importante referência que tenho em minha vida. Agradeço pela ajuda imprescindível para a realização desse trabalho, e por ser a profissional exemplar que sempre me ensinou e orientou, desde quando nos conhecemos. Agradeço, também, pela amizade que construímos fora do ambiente profissional. É uma mulher guerreira, que sempre me inspira!

A querida Cris Mochny, mais um presente que ganhei durante esses dois anos! Agradeço por ter estendido sua mão a mim, quando mais precisei, e por ser tão carinhosa e precisa nos seus conselhos. Nossa amizade e parceria começaram durante esse trabalho, e tenho certeza que outros bons frutos virão.

Agradeço aos demais amigos do Laboratório de Neurobiologia Comportamental, Frank, Camila e Juliana Cavalli, pela troca de ideias e

pelo companheirismo, amizade e força de todos os dias. Agradeço por fazer parte de um grupo tão determinado ao bem comum, e por lutarmos juntos pelo que acreditamos e queremos!

Aos membros do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas, onde fiz todas as análises deste trabalho. Agradeço principalmente aos amigos Filipe, Sandro e Paulo, por facilitarem meu acesso ao laboratório.

As amigas que conquistei em Florianópolis, Ana Carol, Maíra, Evelyn e Claudini, que me mostraram quão forte é o poder de uma grande amizade, e como conseguimos ir mais longe quando temos a quem dar a mão e quando temos em quem nos apoiar. Obrigada pela força, pelo carinho, pelas risadas, pelos cafés, pela cumplicidade e irmandade! Amo vocês.

A grande amiga Ana Paula, verdadeira irmã que a vida me deu! Agradeço por estar sempre disponível, me ensinando como podemos viver a vida de uma forma mais leve. Agradeço também por sempre me tirar da minha “zona de conforto” e por me instigar a ir atrás do que acredito. E agradeço imensamente por me mostrar que uma bela amizade é aquela acompanhada por choros, risadas, silêncio, agitos, olhares e desabafos, na certeza de que não estamos sozinhos.

Aos demais colegas da pós-graduação e funcionários do Departamento que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais, Yara e Aloisy, os grandes responsáveis pelas minhas conquistas e superações. Por todo o apoio, paciência e compreensão, e por todos os princípios que me tornam a pessoa que sou hoje! Devo tudo que conquisto a vocês, porque tudo que eu faço é pensando em vocês. Agradeço também a minha irmã, Janayna, meu “porto seguro” e “braço direito” em tudo que faço, e a primeira a me apoiar a ir sempre mais longe. E também, não posso esquecer-me de agradecer ao meu cunhado Angelo, que chegou para completar nossa família, com suas sandices e seu carinho, sempre muito especiais!

Ao governo brasileiro, que financia nossas pesquisas e experimentos através das empresas de fomento CAPES e CNPq, dentre outras, tornando possível o avanço e desenvolvimento de nossa área.

“Pensar é um propor-se em branco”
Luís Kiarí

RESUMO

O enfrentamento comportamental é definido como a estratégia utilizada para reduzir o impacto negativo do estresse sobre o bem estar de um indivíduo. O desenvolvimento de estratégias bem sucedidas para a redução ou eliminação do evento estressante depende de fatores como experiência prévia, processos mediadores, variabilidade individual e previsibilidade. Assim, comportamentos adotados frente a eventos estressantes revelam processos associativos de aprendizado, vulnerabilidade ao ambiente, flexibilidade comportamental e tomada de decisões. Os estudos sobre as estratégias de enfrentamento desenvolvidas por animais de laboratório, visando a resolução de eventos aversivos, favorecem a análise das variações individuais presentes em um grupo, caracterizando padrões comportamentais reconhecíveis. O modelo de condicionamento olfatório aversivo, padronizado por nosso grupo, é muito utilizado para o estudo das memórias aversivas, uma vez que o paradigma envolve processos cognitivos e emocionais. O condicionamento ocorre através da associação entre um estímulo incondicionado e um estímulo olfatório neutro que, após alguns pareamentos, adquire a capacidade de evocar respostas defensivas que tipicamente são expressas na presença de perigo. Como os animais são expostos a situações aversivas tanto para a aquisição do condicionamento quanto para a expressão das respostas defensivas, o modelo se apresenta como uma excelente ferramenta para o entendimento das definições de estratégias comportamentais adotadas. Portanto, o objetivo do presente estudo foi analisar as estratégias de enfrentamento desenvolvidas pelos animais em situações estressantes confrontadas no modelo de condicionamento olfatório aversivo. Para este propósito, a análise dos comportamentos exibidos pelos animais foi ampliada, de acordo com as condições experimentais do laboratório. Em seguida, a análise do novo conjunto de estratégias comportamentais foi realizada em grupos submetidos às condições experimentais Pareado e Não Pareado durante três sessões de teste do protocolo experimental, bem como em grupos tratados com o benzodiazepínico midazolam, administrado antes ou imediatamente após a aquisição do condicionamento, e antes da expressão das respostas defensivas. Os resultados demonstraram que o perfil comportamental analisado nas três sessões de teste apresenta diferenças claras entre as sessões, já que os animais foram capazes de desenvolver uma estratégia de enfrentamento ao ambiente, modificando-a sempre que novos estímulos estressantes foram confrontados. Também, o aparecimento de comportamentos como

agachar-cheirar, agachar, *head-out* e *stretch-attend* se mostrou característico na expressão de comportamentos de defesa no modelo proposto, quando os animais foram expostos ao odor condicionado. Esses resultados levaram a conclusão de que o condicionamento olfatório aversivo é um modelo capaz de avaliar as estratégias comportamentais de enfrentamento em situações estressantes, bem como caracterizar comportamentos defensivos específicos capazes de aprimorar a análise já executada. Os resultados também demonstraram que a estratégia de enfrentamento comportamental pode ser afetada, de acordo com a condição experimental e/ ou tratamento farmacológico utilizado.

Palavras-chave: Condicionamento olfatório aversivo. Definição de estratégia de enfrentamento. Estímulos aversivos. Comportamentos defensivos.

ABSTRACT

The coping style is defined as the strategy used to reduce the negative impact of stress on the individual's welfare. The development of successful strategies for reducing or eliminating the stressful event depends on factors such as previous experience, mediating processes, individual variability and predictability. Thus, behaviors adopted against stressful events reveal associative learning processes, vulnerability to the environment, behavioral flexibility and decision making. Studies focused on coping strategies develop by laboratory animals aimed to resolve aversive events enables the analysis of individual variations on the same group and elucidates recognizable behavioral patterns. The olfactory fear conditioning paradigm, standardized by our group, is largely used for studying aversive memories, since the paradigm involves emotional and cognitive processes. Fear conditioning occurs through the association between an unconditioned stimulus and a neutral olfactory stimulus that, after a few pairings, acquires the ability to evoke defensive responses that typically occur in the presence of danger. As the animals are exposed to aversive situations for the acquisition of the conditioning and for the expression of defensive responses, the model can be used as an excellent tool for the understanding of coping styles. Therefore, the aim of this study was to analyze the coping styles developed in stressful situations confronted in the olfactory fear conditioning paradigm. For this purpose, the analysis of the behaviors exhibited by the animals was enlarged under the experimental conditions of the laboratory. Then, the new set of behavioral strategies was analyzed on groups submitted to the paired and unpaired conditions during three test sessions of the experimental protocol, as well as in groups treated with the benzodiazepine midazolam, administered before or after the acquisition of the conditioning, or before the expression of the defensive responses. The results showed that there were clear differences of the behavioral profile exhibited by animals in the three test sessions, since the animals were able to develop a coping strategy to the environment, modifying it whenever a new stressful stimulus was confronted. Also, the analysis of new behaviors such as crouching-sniffing, crouching, head-out and stretch-attend showed that they can be considered as characteristic expression of defensive behaviors in the proposed model, when the animals were exposed to the conditioned odor. These results led to the conclusion that the olfactory fear conditioning is a model able to evaluate the coping styles in stressful situations, as well as characterize specific defensive behaviors and

improve the analysis. The results also showed that the coping style may be affected, according to the experimental condition and/ or the pharmacological treatment.

Keywords: Olfactory fear conditioning. Coping style. Aversive stimuli. Defensive behaviors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da caixa de odor.....	39
Figura 2. Diagrama esquemático do protocolo experimental do condicionamento olfatório aversivo	46
Figura 3. Ilustração esquemática da nova divisão da caixa de odor.....	48
Figura 4. Efeito das condições experimentais dos grupos Pareado e Não Pareado para o parâmetro tempo gasto nos diferentes ambientes da caixa de odor.....	54
Figura 5. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para as condições experimentais dos grupos Pareado e Não Pareado durante os diferentes dias de teste	61
Figura 6. Evolução temporal da duração dos parâmetros comportamentais no grupo Pareado durante os diferentes dias de teste	63
Figura 7. Evolução temporal da duração dos parâmetros comportamentais no grupo Não Pareado durante os diferentes dias de teste	64
Figura 8. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para a condição experimental do grupo Pareado durante os diferentes dias de teste e divididos em blocos de cinco minutos	66
Figura 9. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para a condição experimental do grupo Não Pareado durante os diferentes dias de teste e divididos em blocos de cinco minutos	67
Figura 10. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para a condição do grupo Pareado e dos grupos controle (salina) durante o teste EC1, em diferentes momentos de administração	69

Figura 11. Evolução temporal do parâmetro tempo gasto pelos animais nos ambientes fechado e/ ou área próxima ao odor, submetidos a diferentes condições experimentais dos grupos salina, Mdz 0.3 e Mdz 0.5, administrados antes do condicionamento.....	70
Figura 12. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para a condição experimental do grupo salina administrada antes do condicionamento, durante os diferentes dias de teste	72
Figura 13. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para as condições experimentais dos grupos Mdz 0.3 e Mdz 0.5 administrados antes do condicionamento, durante os diferentes dias de teste	73
Figura 14. Evolução temporal do parâmetro tempo gasto pelos animais nos ambientes fechado e/ ou área próxima ao odor, submetidos a diferentes condições experimentais dos grupos salina, Mdz 0.3 e Mdz 0.5, administrados após o condicionamento	75
Figura 15. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para a condição experimental do grupo salina administrada após o condicionamento, durante os diferentes dias de teste	77
Figura 16. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para as condições experimentais dos grupos Mdz 0.3 e Mdz 0.5 administrados após o condicionamento, durante os diferentes dias de teste	78
Figura 17. Evolução temporal do parâmetro tempo gasto pelos animais nos ambientes fechado e/ ou área próxima ao odor, submetidos a diferentes condições experimentais dos grupos salina, Mdz 0.3 e Mdz 0.5, administrados antes da sessão de teste EC1	79
Figura 18. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para a condição experimental do grupo salina administrada antes da sessão de teste EC1, durante os diferentes dias de teste	81

Figura 19. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para as condições experimentais dos grupos Mdz 0.3 e Mdz 0.5 administrados antes da sessão de teste EC1, durante os diferentes dias de teste 82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Ordem de prevalência dos parâmetros comportamentais obtidos durante as três sessões de exposição dos animais à caixa de odor	60
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Duração total dos parâmetros comportamentais obtidos durante as três sessões de exposição dos animais à caixa de odor 57

Tabela 2. Frequência dos parâmetros comportamentais obtidos durante as três sessões de exposição dos animais à caixa de odor 58

Tabela 3. Duração média dos parâmetros comportamentais obtidos durante as três sessões de exposição dos animais à caixa de odor 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – análise de variância
C – ambiente fechado
cm – centímetros
COA – condicionamento olfatório aversivo
Cont – contact
Crouch – crouching
C-Sniff – crouch-sniffing
EC – estímulo condicionado
EC1 – estímulo condicionado de primeira ordem
EC2 – estímulo condicionado de segunda ordem
EI – estímulo incondicionado
EUA – Estados Unidos da América
FAM – familiarização
g – gramas
GABA – ácido gama-aminobutírico
Groom – grooming
h – horas
HO – head-out
HPA – hipotálamo-pituitária-adrenal
I – zona intermediária
kg – quilograma
mA – miliampere
MCPdl – matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral
Mdz – midazolam
mg – miligrama
min – minutos
ml – mililitros
NaCl – cloreto de sódio
NMDA – N-metil-D-aspartato
P – área próxima ao odor
Rear – rearing
s – segundos
SA – stretch-attend
Sniff – sniffing

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 Estratégia de Enfrentamento Comportamental: O Termo <i>Coping</i>, Suas Aplicações e Estudos Relacionados	28
1.2 Aplicando os Conceitos de Estratégia de Enfrentamento em Novos Modelos Comportamentais	36
1.3 O Modelo de Condicionamento Olfatório Aversivo	38
2 OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo Geral	43
2.2 Objetivos Específicos	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 Animais	45
3.2 Grupos Experimentais	45
3.3 Paradigma do Condicionamento Olfatório Aversivo	45
3.3.1 <i>Procedimentos gerais</i>	45
3.3.2 <i>Novos parâmetros avaliados e método de análise</i>	47
3.3.3 <i>Etapa I – Análise exploratória de estratégias comportamentais no modelo de condicionamento olfatório aversivo</i>	49
3.3.4 <i>Etapa II – Teste farmacológico</i>	50
3.4 Análise Estatística	50
4 RESULTADOS	53
4.1 Etapa I – Análise Exploratória de Estratégias Comportamentais no Modelo de Condicionamento Olfatório Aversivo	53
4.2 Etapa II – Teste Farmacológico	68
4.2.1 <i>Análise do padrão comportamental dos grupos controle (salina)</i>	68
4.2.2 <i>Verificação do perfil comportamental apresentado pelos ratos administrados com midazolam antes da sessão de condicionamento</i>	70
4.2.3 <i>Verificação do perfil comportamental apresentado pelos ratos administrados com midazolam após a sessão de condicionamento</i>	74
4.2.4 <i>Verificação do perfil comportamental apresentado pelos ratos administrados com midazolam antes da sessão de teste ECI</i>	79
5 DISCUSSÃO	85
6 CONCLUSÃO	99
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1 INTRODUÇÃO

As respostas defensivas, desenvolvidas e adquiridas evolutivamente pelos animais quando esses são confrontados com situações de perigo ou estresse, se originam em disposições comportamentais semelhantes entre os mais diversos animais, apesar de possuírem características particulares de acordo com a espécie observada. O uso destes, inclusive, se torna uma importante ferramenta para o estudo embasado em evidências experimentais, englobando o conhecimento sobre estruturas neurais envolvidas e regulação de comportamentos. O estudo das emoções foi amplamente destacado pelo trabalho pioneiro de Charles Darwin (1872), “A Expressão das Emoções nos Homens e Animais”, onde ele propõe que as posturas e movimentos utilizados para tais expressões estão sujeitas as mesmas leis que transmitem as características ao longo das gerações.

A partir desses fatos, os trabalhos referentes à análise do comportamento de defesa nos animais observaram diferentes estratégias desenvolvidas em resposta a perigos que a espécie estudada encontra em sua vida selvagem, no seu nicho ecológico. Estudos etológicos, desenvolvidos pelo casal Robert e Caroline Blanchard, trazem informações que comprovam que determinadas ameaças são responsáveis pela expressão de um conjunto de respostas comportamentais inatas (BLANCHARD et al., 1986, 1993; BLANCHARD & BLANCHARD, 1988, 1989, 2003). Mais tarde, foram demonstradas que essas mesmas respostas defensivas podem ser exibidas a partir da exposição a um estímulo aversivo aprendido, quando um sinal (que pode ser de qualquer natureza sensorial) inicialmente neutro adquire propriedades semelhantes, após ter sido associado com o mesmo estímulo que possui caráter aversivo por si só (KIM & JUNG, 2006).

Com esses trabalhos iniciais acerca das emoções vivenciadas pelos animais e homens, e a sua relação com os comportamentos específicos adotados, demais estudos destacam conceitos mais aprimorados, que também são necessários para o entendimento dos processos envolvidos. A ciência que enfatiza a cognição e as pesquisas acerca das emoções mostra a relação entre funções psicobiológicas e mecanismos neurais, que regulam e controlam componentes capazes de modificar a natureza das respostas de acordo com as circunstâncias enfrentadas (LEDOUX, 2000). Estudos mais recentes demonstram também que as experiências subjetivas e fatores que controlam a intensidade ou relevância do evento confrontado são determinantes para

o entendimento das emoções e estratégias comportamentais adotadas (FONTAINE et al., 2007).

Nos últimos anos, nota-se um crescimento na quantidade de trabalhos publicados que utilizam modelos animais com o objetivo de elucidar as bases neurais das emoções, especialmente do medo e da ansiedade. A expressão inadequada destas emoções pode levar a psicopatologias que, atualmente, acometem um grande número de pessoas em todo o mundo. Em animais de laboratório, utilizam-se modelos de aprendizado aversivo e a avaliação de comportamentos defensivos como medidas de “medo” e “ansiedade”. Por este motivo, é importante que a análise destes comportamentos seja criteriosa e cuidadosa, pois diferentes fatores podem influenciar a definição de estratégia comportamental em situações de perigo.

Assim, comportamentos adotados frente a diferentes eventos estressantes ou conflitantes podem revelar como as associações emocionais são aprendidas e/ ou modificadas (HARTLEY & PHELPS, 2010). Da mesma forma, a maneira como o indivíduo em questão irá lidar com tal evento envolve diversos fatores relacionados com variabilidade e padrão comportamental, além de previsibilidade e da intensidade do evento (WATSON & HUBBARD, 1996), fatores estes envolvidos tanto com respostas de defesa inatas quanto com respostas aprendidas. Com isso, torna-se necessária a discussão de conceitos que envolvem definição de estratégias de enfrentamento comportamental, já que englobam principalmente a maneira como o indivíduo irá lidar com determinadas situações, e como essa tomada de decisão irá interferir na resolução de um determinado evento estressante.

1.1 Estratégia de Enfrentamento Comportamental: O Termo *Coping*, Suas Aplicações e Estudos Relacionados.

São muitos os estudos e as teorias que englobam conceitos que definem o que são estratégias comportamentais, quais são suas principais características e bases neurobiológicas. A grande maioria dos autores envolvidos define o termo, também conhecido como *coping* (do inglês, *to cope*) e/ ou *coping style*, traduzido neste estudo como estratégia de enfrentamento, de acordo com seus efeitos relacionados à fisiologia do estresse.

A estratégia de enfrentamento define uma série de reações comportamentais que surgem frente a estímulos aversivos e são características para certo grupo de indivíduos (WECHSLER, 1995). Esses estímulos apresentados induziriam reações fisiológicas padronizadas ao estresse, como a resposta de luta e/ ou fuga, descrita por

Cannon (1922), e a ativação do sistema simpático adrenomedular e eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (GOLDSTEIN, 2010). Desta forma, as reações comportamentais apareceriam a fim de minimizar tal desconforto e contornar o evento causado pelas situações aversivas.

A partir dessa primeira definição, muitos estudos surgiram com o objetivo de definir melhor a estratégia de enfrentamento apresentada por várias espécies de animais, inclusive humanos. Um estudo pioneiro, proposto por Weiss, em 1968, demonstrou um experimento padrão desenvolvido em laboratório, onde um grupo de ratos apresentava respostas comportamentais vinculadas a estratégias de enfrentamento. Neste estudo, os animais expressavam comportamentos específicos para evitar os choques elétricos. O grupo de ratos que era capaz de desenvolver uma estratégia adequada para tal situação, apresentava valores mais atenuados para os parâmetros relacionados diretamente com o estresse fisiológico.

Várias outras definições de estratégia de enfrentamento já foram observadas por diversos autores (WECHSLER, 1995), considerando fatores fisiológicos e comportamentais para dominar todo e qualquer tipo de situação, seja ela aversiva ou não. Apesar das poucas divergências apresentadas por várias destas definições, a grande maioria concorda com o conceito de que a percepção animal para esses estímulos apresentados foi moldada pela evolução para reconhecimento de situações aversivas e desconfortáveis. A partir de então, o termo estratégia de enfrentamento passou a ser relacionado não apenas com fatores diretamente ligados ao estresse, mas também à adaptação comportamental.

Quando se trata de estratégia de enfrentamento em humanos, a proposta clássica e mais aceita em psicologia é aquela sugerida por Lazarus e Folkman, em 1984. Sendo muito semelhante ao que já havia sido proposto por outros autores, tal teoria define estratégia de enfrentamento como uma série de esforços cognitivos e comportamentais, que são capazes de mudar constantemente. A razão para o desenvolvimento de tais estratégias seria o controle dos estímulos externos e/ ou internos específicos, quando estes são considerados como excedentes dos recursos próprios e pessoais. O estudo também mostra que a estratégia de enfrentamento pode ser caracterizada de acordo com o seu foco principal: 1) Focado nos problemas: incluiria a busca de informações e a solução propriamente dita dos problemas relacionados; e 2) Focado nas emoções: envolveria a regulação e a expressão de emoções relacionadas com a situação sem, necessariamente, haver uma resolução mais prática do problema em si.

Ainda segundo esse estudo (LAZARUS & FOLKMAN, 1984), essa seria uma grande diferença constatada entre a estratégia de enfrentamento observada em humanos e outras espécies, já que muitos autores sugerem a impossibilidade de coletar dados referentes à influência das estratégias nas emoções dos animais, sendo que essas são dependentes de experiências prévias, impossíveis de serem acessadas em muitos casos (WESCHLER, 1995; BATESON, 1991). O estudo ainda aponta que a adaptação observada ocorre visando um bem-estar e funcionamento adequados, mesmo que isso não seja definitivo. Tudo porque a estratégia de enfrentamento pode ser ou não bem sucedida, já que o termo salienta o processo completo e não apenas o resultado final. As ações de enfrentamento dirigidas, que também são caracterizadas como episódios distintos interconectados e sequenciais, podem ser independentes e diferenciadas de acordo com o evento estressante envolvido.

A habilidade do organismo em lidar com tais eventos estressores é definida de acordo com a magnitude do impacto do estímulo em questão. Uma estratégia concluída com sucesso, portanto, seria aquela que mantivesse o estressor sob controle por mais tempo ou que fosse capaz, inclusive, de eliminá-lo (URSIN & OLFF, 1993). Nesse caso, a definição de estratégia de enfrentamento estaria diretamente ligada à habilidade do indivíduo em reduzir o fator estressante, não apenas controlando-o, mas mantendo esse controle por mais tempo. Se as respostas observadas resultarem em sucesso, o indivíduo terá a capacidade de armazenar tais informações através de processos de aprendizado e memória, e manter um padrão comportamental frente a tal estímulo (KOOLHAAS et al., 1999).

Da mesma forma, as definições de estratégias comportamentais são muito particulares para cada indivíduo. Além da magnitude do impacto do estímulo, já citado, outros fatores são importantes para definir a estratégia de enfrentamento adequada, de acordo com capacidades próprias. Fatores como o genótipo do indivíduo, experiências prévias, apoio social, aprendizado e manutenção de um padrão comportamental de estratégias passadas, e anatomia e fisiologia do organismo irão interferir na forma particular do indivíduo em lidar com o evento estressante (KOOLHAAS et al., 1999). Da mesma maneira, alterações tanto genótípicas quanto fenotípicas podem ser relevantes para o desempenho em testes comportamentais, bem como variações que podem surgir no ambiente e no próprio procedimento experimental (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005; NOSEK et al., 2008). Portanto, há uma tendência nos estudos relacionados com

definições de estratégia em focar nas características comportamentais básicas, como respostas iniciais ao estímulo, o que, teoricamente, seriam comuns a todos os indivíduos, ao invés de se aprofundar em conceitos como flexibilidade comportamental e variação individual, enfatizando padrões típicos que determinarão a estratégia de enfrentamento apresentada pelo sujeito do estudo (OVERLI et al., 2007). Essas diferenças individuais que podem ser moldadas pelo contexto e/ ou pelo estímulo empregado também são conhecidas como “personalidade” ou “temperamento” (BELL, 2007), englobando combinações comportamentais que levarão a estratégias exclusivas. Vale ressaltar que os devidos termos não tem a mesma implicação que o conceito “personalidade” possui para humanos, sendo, tradicionalmente, entendido de outra forma (DINGEMANSE et al., 2009). Nesse caso, personalidade estaria mais relacionada com plasticidade individual, demonstrando variações evolutivas e fenômenos específicos.

Portanto, o entendimento da variação individual e da vulnerabilidade ao estresse apresentada de acordo com situações ambientais distintas, levou a novas descobertas sobre caracterizações fenotípicas e diferenciações individuais de adaptação neurobiológica (KOOLHAAS et al., 2007). Muitos autores, como Sih e colaboradores (2004), utilizam o termo “síndrome comportamental” para definir tal fenômeno, evidenciando que cada indivíduo é capaz de expressar tipos específicos de comportamentos, dentro de uma mesma população ou espécie. De forma alternativa, mas muito similar, o termo também consegue definir um grupo de espécies que apresentam uma mesma síndrome comportamental, porém cada espécie expressando um comportamento típico e diferenciado. Portanto, este termo pode ser aplicado para qualquer série de comportamentos correlacionados entre si, e consistentes com o passar do tempo e com as diversas situações apresentadas, já que expressa um significado mais generalizado e neutro (KOOLHAAS et al., 2007).

Como a definição primordial de estratégia de enfrentamento indica padrões de respostas alternativas em reação a diferentes estressores, estudos já agregam tais evidências com os conceitos de variação individual e sua real proporção nos comportamentos observados. Inicialmente, Benus e colaboradores propuseram, em 1991, que diferenças individuais que surgem em comportamentos como a agressão podem avaliar estratégias distintas de enfrentamento. De acordo com características particulares de cada indivíduo, respostas mais ou menos agressivas seriam indicativas de formas diferentes de definir estratégias comportamentais. Dessa maneira, os indivíduos mais

agressivos teriam uma tendência maior a responderem de forma ativa frente a situações aversivas, sendo que o contrário seria verdadeiro, para indivíduos menos agressivos. A partir desse estudo (BENUS et al., 1991), foi sugerida a existência de, pelo menos, dois tipos de estratégias comportamentais: 1) Aquelas que levariam a um padrão de respostas mais ativas; e 2) Outras que seriam caracterizadas por comportamentos ditos como mais passivos.

Em seguida, foi estabelecido que os animais que adotavam uma estratégia comportamental caracterizada por comportamentos ativos, tinham certa facilidade no desenvolvimento de rotinas e manutenção destas, apresentando comportamentos de maneira mais intrínseca, com dificuldades de adaptação e reações aos novos estímulos oferecidos pelo ambiente. Já os animais que reagem passivamente, apresentavam uma grande facilidade em obter informações do espaço onde se encontravam, sendo mais maleáveis a alterações ambientais. Por essas novas definições, outra nomenclatura muito utilizada (KOOLHAAS et al., 1999) divide os grupos de animais, classificando-os em: 1) Animais pró-ativos (predições rígidas organizadas, levando a comportamentos pré-estabelecidos e, conseqüentemente, mais impulsivos); e 2) Animais reativos (maior flexibilidade comportamental e uma relação direta com os estímulos apresentados).

Portanto, segundo essa definição, os animais pró-ativos ou reativos podem tanto apresentar comportamentos passivos quanto expressar comportamentos ativos. O fator que influenciaria seria o seu grau de flexibilidade perante as situações confrontadas, o que controlaria as funções comportamentais (COPPENS et al., 2010).

Em todos os momentos, independente da nomenclatura utilizada, a estratégia de enfrentamento característica neste estudo revela a necessidade do animal em reduzir a fonte de estresse, seja através de comportamentos mais impulsivos e ativos (padrão de resposta animal pró-ativo), ou ainda pela redução do fator emocional causado pelo evento estressante, como no caso das estratégias ditas passivas (características para animais com perfil reativo) (BENUS et al., 1991). A execução da ação bem sucedida e a vantagem que o indivíduo levará sobre a situação aversiva dependerão da vulnerabilidade ao ambiente e da flexibilidade dos comportamentos.

Os testes desenvolvidos em laboratório com roedores já determinam padrões de flexibilidade desses animais e, conseqüentemente, conseguem entender se estes respondem de maneira mais pró-ativa ou reativa (BENUS et al., 1990). Levando-se em consideração que os animais ditos reativos são mais flexíveis a

mudanças externas, sendo contrários aos pró-ativos, que tendem a responder de uma maneira mais rígida, muitos estudos já utilizam testes simples para fazer essa triagem inicial nos vários grupos de animais. É possível colocar os sujeitos experimentais em um labirinto e ensiná-los a buscar uma recompensa, como um *pellet* de ração (BENUS et al., 1990). Após alguns treinos, os animais saberão rapidamente localizar onde está a comida. Se, após alguns dias de acerto, o alimento for mudado de lugar, ou o labirinto sofrer alterações com pistas adicionais, será possível distinguir comportamentos específicos para cada tipo de estratégia de enfrentamento. O animal pró-ativo tenderá a não prestar atenção às mudanças efetuadas, seguindo o caminho ao qual já estava habituado; já o animal reativo começará explorando o labirinto novamente, podendo levar muito mais tempo para completar a tarefa. O que comprova, mais uma vez, que animais reativos são muito mais guiados por estímulos externos captados do ambiente, sendo que aceitam mais tranquilamente as novas informações que o cercam sem, necessariamente, expressar formas de mudá-las. Ao contrário dos animais ditos pró-ativos, que apresentam rotinas bem estabelecidas e certa rigidez a mudanças (COPPENS et al., 2010).

Estudos mais específicos, utilizando testes comportamentais bem estabelecidos e padronizados para mensuração de parâmetros como “ansiedade”, relacionam a existência de diferentes estratégias desenvolvidas frente a determinadas situações, permitindo ao animal a chance de escolher entre padrões de respostas distintos. O teste comportamental de “enterrar defensivo condicionado”, descrito por Treit e colaboradores, em 1981, e revisado por De Boer e Koolhaas, em 2003, demonstra as respostas exibidas pelos animais, quando expostos e confrontados a uma sonda eletrificada inserida nas suas caixas-moradia. Assim que o animal em questão encosta na sonda, um leve choque é aplicado, permitindo ao roedor duas opções claras de estratégia comportamental que podem ser adotadas: ou ele automaticamente tenta enterrar o objeto desconhecido e já aversivo, com o intuito de escondê-lo e, de alguma forma, se ver livre desse evento; ou ele apresenta comportamentos típicos de imobilidade ao lado do objeto, também tentando aliviar o desconforto e as emoções aversivas causadas pelo choque. Assim, fica claro definir a primeira alternativa como um típico padrão de comportamentos ativos expressos pelo animal, ao contrário da segunda opção, quando uma resposta mais passiva, caracterizada pela imobilidade foi executada (DE BOER & KOOLHAAS, 2003). É importante salientar que, nas duas alternativas, a opção tomada alcançará bons resultados, atingindo a mesma meta, já que em ambas as

situações os animais conseguirão adotar posturas defensivas de sucesso. Da mesma forma, é interessante ressaltar novamente que o teste em questão é conhecido e geralmente considerado como um teste de ansiedade. Porém, este também pode ser analisado segundo esta interpretação, sugerindo este teste como uma forma de também mensurar características individuais de comportamento (DE BOER & KOOLHAAS, 2003).

Sob a mesma visão, outros testes comportamentais também podem ser reinterpretados. O teste de nado forçado, desenvolvido por Porsolt e colaboradores, em 1977, é um dos modelos mais utilizados para avaliação de drogas com atividade antidepressiva, sendo também conhecido como modelo de desespero comportamental. Neste estudo, Porsolt e colaboradores demonstraram que, quando um animal (rato ou camundongo) é submetido a um estresse inescapável, como sua colocação em um cilindro contendo água, o mesmo desempenhará movimentos de fuga dessa situação supostamente desagradável, como nado e escalada, e, em poucos minutos, adotará postura imóvel, caracterizada pela ausência total de movimentos ou apresentará apenas movimentos muito leves suficientes para deixar a cabeça emersa. O tratamento com antidepressivos, portanto, é capaz de reduzir o tempo de imobilidade apresentados pelos animais submetidos a esse teste. Em 2005, o mesmo teste sofreu uma nova interpretação, desenvolvida por Veenema e colaboradores, onde foi possível analisar que camundongos selvagens geneticamente selecionados para apresentarem uma longa latência de ataque (BROADHURST & BIGNAMI, 1965; VAN OORTMERSSEN & BAKKER, 1981; ESCORIHUELA et al., 1999), que caracterizaria um perfil comportamental de baixa agressividade para não agressivo, apresentavam, no modelo em questão, maior expressão do comportamento de imobilidade. Já os outros animais, que tinham por característica um perfil mais agressivo, apresentando um período mais curto de latência de ataque, expressaram, de maneira mais pronunciada, os comportamentos como nado e escalada (VEENEMA et al., 2005). Esse resultado sugere, mais uma vez, a utilização do teste em questão para averiguação de características precisas no comportamento desses animais.

Portanto, considerando-se os testes comportamentais descritos, nomenclaturas e definições sugeridas, é possível considerar a ampla área que o termo estratégia de enfrentamento vem conquistando nos últimos anos, frente a diversos estudos relacionados com padrões de comportamento. Juntamente com esses estudos, parâmetros

neuroendócrinos e bases neurobiológicas são apresentadas, a fim de complementar e corroborar tais achados.

Com relação a esses estudos complementares neuroendócrinos e neurobiológicos, é possível verificar que a grande maioria enfatiza os hormônios do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), bem como o balanço entre o sistema nervoso autonômico simpático e parassimpático.

Em 1993, Hansen e Damgaard abordaram a ideia de que as ativações do sistema nervoso autonômico iriam de acordo com os padrões comportamentais diferenciados entre si. Isso coincide com o fato de que a estratégia de enfrentamento não é caracterizada apenas por suas respostas comportamentais, mas também, por bases fisiológicas e neuroendócrinas. Neste estudo (HANSEN & DAMGAARD, 1993), animais que se utilizariam de estratégias ativas, sendo, portanto, mais agressivos, teriam uma maior ativação do sistema nervoso simpático, com um aumento evidenciado nos níveis de adrenalina e noradrenalina (DE BOER et al., 1990; KOOLHAAS et al., 2010). Por outro lado, os animais que reagiriam utilizando comportamentos passivos seriam aqueles com maior ativação do sistema nervoso parassimpático (HANSEN & DAMGAARD, 1993). Ainda, o estudo afirma que o responsável pela maior ou menor ativação de tais sistemas envolvidos é o alerta emocional apresentado por cada animal. Já outros estudos relacionados diretamente com o eixo HPA (KOOLHAAS et al., 2010) apontam divergências nos níveis de corticosterona plasmática, de acordo com o teste relacionado e a estratégia de enfrentamento definida (KORTE et al., 1992; VEENEMA et al., 2003, 2004).

Koolhaas e colaboradores (2010) enfatizaram que as diferentes maneiras de definir uma estratégia de enfrentamento devem ser mediadas pelas mesmas bases neurobiológicas. E estas já seriam conhecidas, por fazerem parte de um circuito emocional de áreas límbicas cerebrais, que incluiria núcleo accumbens, amígdala, hipocampo, hipotálamo, entre outras áreas (HARTLEY & PHELPS, 2010). O que definiria qual o estilo de estratégia adotada, podendo ser estratégia pró-ativa ou reativa, seriam as subpopulações de neurônios de uma mesma região; ou então, até a mesma subpopulação neuronal poderia definir diferentes estratégias comportamentais, de acordo com diferentes níveis de neuromodulação (KOOLHAAS et al., 2010), neurotransmissão e ativação de receptores e sistemas específicos envolvidos (GIORGI et al., 2003; VEENEMA et al., 2005; METNALAURENT et al., 2012). Um estudo mais recente já mostra que o aprendizado que ocorre após a estratégia de enfrentamento desenvolvida no contexto no qual o estímulo aversivo é apresentado resulta em

neuroadaptações em certas regiões cerebrais responsáveis por aspectos emocionais, motivacionais e cognitivos (NECHVATAL & LYONS, 2013). Tais modificações, observadas principalmente através de estudos de imagem, seriam responsáveis pela resiliência individual, desenvolvimento de habilidades e regulação emocional necessária para a expressão comportamental em uma evocação futura.

1.2 Aplicando os Conceitos de Estratégia de Enfrentamento em Novos Modelos Comportamentais.

Conforme já citado na seção acima, são muitos os estudos acerca das estratégias utilizadas pelas mais distintas espécies para minimizar ou controlar todo e qualquer tipo de fator estressante. A nova visão que acompanha o conceito de estratégia de enfrentamento permite que inúmeros testes já bem estabelecidos e padronizados possam ser reanalisados e reinterpretados, favorecendo-se das variações individuais presentes em toda população e caracterizando outras maneiras de regulação emocional. Como a maioria das definições visa à resolução de eventos aversivos, o mesmo fator emocional é imprescindível para o bom entendimento das estratégias de enfrentamento adotadas.

Um modelo amplamente utilizado para os estudos sobre medo e defesa frente a estímulos aversivos baseia-se nos experimentos de condicionamento clássico desenvolvido por Ivan Pavlov. Em 1927, o renomado fisiologista mostrou, em seus estudos com cães, que um estímulo considerado emocionalmente neutro (no caso, o som de uma campainha; estímulo sonoro) poderia ser associado com um estímulo que obtivesse alguma relevância emocional. No estudo em questão, o som era emitido imediatamente anterior à apresentação de um alimento, que desencadeava o reflexo de salivação no cão. Inicialmente, o animal salivava apenas quando o alimento estava na sua boca, mas, após diversas associações, a salivação passou a ser observada quando apenas o ruído sonoro era emitido, caracterizando uma resposta condicionada. Quando o mesmo modelo foi utilizado para o estudo de medo, o estímulo incondicionado (EI) apresenta caráter emocional aversivo, gerando respostas defensivas que ocorrem na presença de perigo. Associando-se, da mesma forma, o estímulo inicialmente neutro com um EI aversivo, o estímulo neutro retém a capacidade de desencadear as respostas defensivas, podendo fazê-lo mesmo quando o EI não é apresentado. Tais respostas são ditas como condicionadas e caracterizadas por parâmetros comportamentais, alterações autonômicas e endócrinas (LEDoux, 2000).

Vários estímulos condicionados já foram utilizados em diversos estudos relacionados com condicionamento aversivo, sendo alguns exemplos: som (LEDOUX, 2003; ROOZENDAAL et al., 2006), estímulos táteis (KILPATRICK & CAHILL, 2003; SEVELINGES et al., 2004) e luzes (TAZUMI & OKAICHI, 2002; NEWTON et al., 2004). Além desses, o local onde ocorrem as associações, também chamado de contexto, pode ser utilizado como estímulo neutro (FANSELOW, 2000; RESSTEL et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007), que será posteriormente condicionado.

De forma semelhante, o EI aversivo é aquele capaz de desencadear respostas inatas de medo. O estímulo mais utilizado é o choque elétrico nas patas, já que exhibe resposta emocional condicionada clara e mensurável (SCHAFE et al., 2005). Além deste, outros estímulos podem ser utilizados como incondicionados, como a estimulação química ou elétrica de estruturas cerebrais (PAVESI et al., 2011; KINCHESKI et al., 2012; MOCHNY et al., 2013).

Geralmente, são necessárias algumas associações entre os dois tipos de estímulos para que aquele que se apresentava inicialmente como neutro consiga adquirir o caráter aversivo e desencadear, por si só, respostas defensivas (LEE et al., 2001). A partir dessa associação tem-se, portanto, a formação da memória referente ao evento, que será mensurada no momento da reexposição do estímulo agora condicionado. Assim, o processo pode ser compreendido pela aquisição, que é o primeiro estágio desse aprendizado e pela expressão dessa resposta, quando o estímulo condicionado será novamente exposto, podendo evocar os comportamentos defensivos esperados (MCGAUGH, 2000; PEZZE & FELDON, 2004; GARAKANI et al., 2006).

A evocação de tais memórias irá levar a comportamentos de defesa característicos que poderão ser quantificados adequadamente através de medidas da magnitude da resposta. Os estudos mais clássicos caracterizam a resposta de sobressalto e o comportamento de imobilidade condicionada como importantes medidas de resposta defensiva (FANSELOW & HELMSTETTER, 1988; DAVIS, 1990; RICHMOND et al., 1998). Além desses, outros parâmetros menos convencionais podem ser utilizados para avaliação do condicionamento, o que inclui medidas de aproximação ou esquiva do estímulo aversivo, bem como comportamentos do repertório dos animais em estudo (KILPATRICK & CAHILL, 2003).

Frente a todas essas evidências, é possível constatar que o modelo de condicionamento aversivo se mostra apto para ser analisado através de uma visão definida pelo conceito de estratégia de enfrentamento, já

que os animais deverão ser confrontados com eventos estressantes já na associação entre os estímulos, bem como na reexposição ao estímulo condicionado.

1.3 O Modelo de Condicionamento Olfatório Aversivo.

Um modelo estabelecido passível de ser utilizado nessa nova análise que envolve definições de estratégias defensivas é o modelo de condicionamento olfatório aversivo. Este utiliza estímulos neutros olfatórios, já que este sistema sensorial é um dos mais importantes e essenciais na vida dos roedores, sendo muito mais complexo e sofisticado, se comparado ao mesmo sistema em humanos (BRENNAN & KENDRICK, 1997, 2006; RESTREPO et al., 2004; SILL & SMITH, 2012; WANG et al., 2013). O olfato desses animais é necessário para atividades como identificação de indivíduos, reprodução, procura por alimentos, interação social e reconhecimento de perigo (RESTREPO et al., 2004), enfatizando a importância em estudá-lo.

O modelo de condicionamento olfatório aversivo (COA) foi primeiramente padronizado neste laboratório por Kroon e Carobrez, em 2009, após outros estudos já terem demonstrado tal relevância na associação entre um estímulo aversivo inato e um estímulo olfatório essencialmente neutro, o que sempre resultou em respostas emocionais robustas (OTTO et al., 2000; DIELENBERG & MCGREGOR, 2001). Neste estudo (KROON & CAROBREZ, 2009), o odor de café, utilizado como estímulo olfatório neutro, foi apresentado aos animais e associado ao choque elétrico nas patas, que foi o responsável pelo caráter emocional aversivo. Para expressão e posterior quantificação das respostas emocionais adquiridas, apenas a relevância aversiva do odor foi considerada (excluindo-se as influências contextuais), enfatizando-se o condicionamento olfatório ocorrido através da mensuração de parâmetros relativos.

A partir da padronização e devida validação farmacológica apresentada no mesmo estudo (KROON & CAROBREZ, 2009), outros trabalhos já foram realizados utilizando-se do mesmo modelo. Cavalli e colaboradores demonstraram que o uso de drogas ansiogênicas, como o pentilenotetrazol, também é passível de ser utilizado como EI aversivo, promovendo, da mesma maneira, o condicionamento olfatório em ratos (CAVALLI et al., 2009). Pavesi e colaboradores (2011) relacionaram o envolvimento de certas estruturais encefálicas, como o núcleo pré-mamilar dorsal, através da sua estimulação química direta, a fim de mimetizar a exposição do animal ao seu predador e desencadear as respostas comportamentais defensivas esperadas. Dessa forma, tal

estimulação também pode ser utilizada como estímulo incondicionado no modelo de condicionamento olfatório aversivo (PAVESI et al., 2011). De maneira semelhante, Kincheski e colaboradores (2012) estudaram a estimulação da coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal (MCPdl) no aprendizado associativo com odor. Neste trabalho, a estimulação química da MCPdl com NMDA promoveu a expressão de comportamentos defensivos, sendo esta experiência capaz de promover o condicionamento olfatório (KINCHESKI et al., 2012). O pareamento entre o acetato de amila, um composto sintético com odor característico de banana, e cinco choques nas patas recruta a ativação do eixo HPA, promovendo o aumento nos níveis de corticosterona após o condicionamento e após a exposição ao odor condicionado (SOUZA, 2011).

Os trabalhos acima foram concluídos de acordo com análises efetuadas acerca de parâmetros já estabelecidos, durante a avaliação do comportamento dos animais nos diferentes dias de teste propostos (DOMONTE, 2006; KROON, 2007; SOUZA, 2007). Após a sessão de condicionamento, a avaliação do medo condicionado foi realizada em uma caixa de odor construída em acrílico e dividida em dois compartimentos, conforme mostrado na Figura 1 (KROON, 2007).

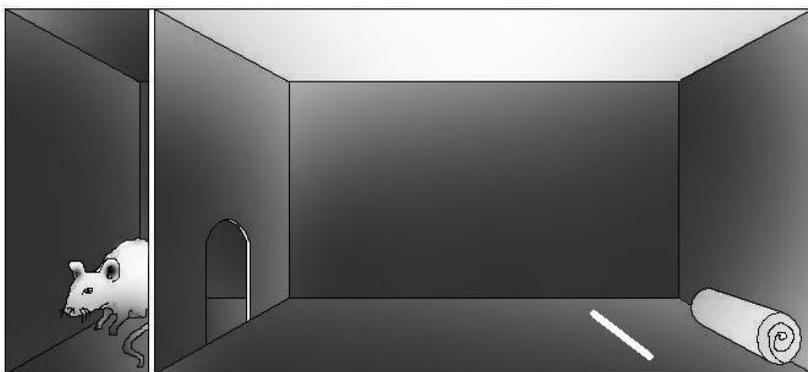


Figura 1. Esquema representativo da caixa de odor utilizada nos trabalhos referentes ao condicionamento olfatório aversivo (KROON, 2007).

Assim, a resposta defensiva era medida nessa caixa através de parâmetros, como: tempo que o animal permaneceu próximo à fonte de odor e/ ou escondido no ambiente fechado, frequência de aproximações

à fonte de odor, número de vezes que o animal se aproximou da flanela somado com o número de entradas no compartimento fechado (frequência de cruzamentos) e o tempo que o animal realizou movimentos corporais anterógrados mantendo a cabeça direcionada para a flanela, com ou sem as patas dianteiras para fora do compartimento fechado, definido como comportamento de *head-out* (DO-MONTE, 2006; KROON, 2007; SOUZA, 2007). Todos os valores eram referentes aos 10 min de sessão e relacionados ao comportamento defensivo exibido frente ao estímulo olfatório condicionado ou ao contexto.

Dessa maneira, fica claro constatar que o modelo de COA, além de ser próprio para o estudo de aprendizado associativo e comportamentos defensivos evocados, também relaciona de forma precisa o envolvimento de áreas cerebrais atuantes e presentes na circuitaria neural, como áreas corticais, amígdala e outras estruturas particulares.

Os sistemas de neuromodulação e neurotransmissão também são passíveis de serem estudados no modelo proposto, em conjunto com os trabalhos específicos direcionados para o mapeamento dessas estruturas envolvidas. O sistema GABAérgico, por exemplo, já foi amplamente descrito em vários estudos acerca do medo condicionado, já que apresenta amplas redes de interneurônios e projeções neuronais em estruturas envolvidas na modulação da ansiedade e medo, como amígdala, hipocampo e substância cinzenta periaquedutal (CHERUBINI & CONTI, 2001; MILLAN, 2003) . O GABA (ácido gama-aminobutírico) é o principal aminoácido inibitório do sistema nervoso central, sendo capaz de influenciar outros mediadores cerebrais de ações ansiogênicas, quando ativado na tentativa de controlar possíveis atividades exacerbadas presentes no processo de medo condicionado (ISHIDA et al., 2002).

O GABA ativa dois tipos principais de receptores, sendo eles: 1) Receptor GABA_A ionotrópico: glicoproteína transmembrana hetero-oligomérica composta de cinco subunidades, que se arranjam ao redor de um canal permeável a íons cloreto; e 2) Receptor GABA_B metabotrópico: formado por um único peptídeo, possui seu mecanismo de transdução de sinais a partir do acoplamento com o sistema de proteínas G.

O receptor GABA_A está amplamente relacionado com os transtornos de ansiedade, sendo também identificado por sua ação anticonvulsivante, além de atividade sobre processos de amnésia retrógrada e sedação (OLKKOLA & AHONEN, 2008). Tais ações são moduladas por sítios alostéricos específicos, localizados entre as

subunidades alfa e gama do receptor. Os benzodiazepínicos não ativam diretamente o receptor GABA_A, mas necessitam da presença do GABA para expressar os seus efeitos (OLKKOLA & AHONEN, 2008). Tais efeitos são, claramente, dose-dependente, sendo que a indução ao sono necessita de doses altas, enquanto que a sedação e efeito ansiolítico podem ser conseguidos com doses mais baixas.

Já em relação aos paradigmas que avaliam o medo inato, como a exposição ao odor de predador, os benzodiazepínicos atenuam as respostas defensivas tipicamente apresentadas, após administração do benzodiazepínico midazolam, potente agonista do sítio específico relacionado (DIELENBERG et al., 1999; DO-MONTE, 2006). Outros estudos também enfatizam a ação dos benzodiazepínicos na atenuação de respostas defensivas específicas, como comportamento de imobilidade de condicionamento de medo ao contexto, além de redução semelhante no sobressalto potencializado pelo medo (FANSELOW & HELMSTETTER, 1988; SANTOS et al., 2005). Todos esses prejuízos são observados nas respostas condicionadas aversivas, quando os benzodiazepínicos são administrados sistemicamente ou diretamente nas estruturas cerebrais relacionadas à circuitaria do condicionamento.

A participação do GABA nos processos de aprendizado associativo, medo e ansiedade também já foram descritos em trabalhos desenvolvidos neste laboratório. Kroon e Carobrez demonstraram, em 2009, que a administração do benzodiazepínico midazolam foi capaz de prejudicar a etapa inicial da formação da memória aversiva no condicionamento olfatório aversivo, já que aboliu os comportamentos defensivos quando o fármaco foi administrado antes ou imediatamente após a sessão de condicionamento. Porém, a expressão das respostas defensivas não foi afetada, quando o fármaco foi administrado imediatamente antes do teste para verificação da memória emocional (KROON & CAROBREZ, 2009). De forma semelhante, Cavalli e colaboradores demonstraram que a administração do mesmo fármaco é capaz de prejudicar a expressão dos comportamentos defensivos após o condicionamento olfatório aversivo, quando se utilizou o pentilenotetrazol como EI (CAVALLI et al., 2009).

Portanto, considerando as teorias referentes a estratégias comportamentais apresentadas, a utilização do condicionamento Pavloviano também se apresenta como uma excelente ferramenta para o entendimento dos mecanismos neurobiológicos do medo e das definições de estratégias comportamentais adotadas pelos animais, quando expostos a diferentes estímulos estressantes. Desta forma, no presente trabalho, o modelo de COA já padronizado neste laboratório foi

novamente interpretado, através da inclusão de novas medidas comportamentais, propondo uma nova forma de análise, diferente da habitual. A tentativa de elucidar os conceitos como variação individual e personalidade, passíveis ou não de serem reconhecidos no modelo proposto, tem por objetivo avaliar a influência destes parâmetros e fatores nos resultados encontrados, comparando-os aos resultados obtidos com os parâmetros normalmente utilizados. Portanto, os conceitos de estratégia de enfrentamento foram imprescindíveis para a compreensão do perfil comportamental adotado pelos animais nos diferentes dias de teste do protocolo experimental sugerido.

Na etapa inicial do trabalho, que consistiu na análise exploratória dos dados, uma nova forma de análise foi definida durante o condicionamento, com inclusão da avaliação de novos comportamentos relacionados com defesa e atividade geral. Posteriormente, verificou-se como o benzodiazepínico midazolam foi capaz de mudar ou adequar o perfil comportamental defensivo adotado pelos animais submetidos ao condicionamento de medo evocado a partir de um estímulo olfatório.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O principal objetivo de presente estudo é analisar as estratégias comportamentais de enfrentamento em situações estressantes, úteis para a avaliação neuropsicofarmacológica do comportamento defensivo em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Ampliar a análise das estratégias comportamentais exibidas por ratos *Wistar* machos, quando submetidos a um protocolo experimental de condicionamento olfatório aversivo (COA);
- Testar a nova análise no conjunto de estratégias comportamentais desenvolvido por ratos submetidos à situação experimental pareada e não pareada, no protocolo do COA;
- Testar e comparar o desempenho e as estratégias comportamentais desenvolvidas pelos ratos, após receberem o tratamento com um fármaco da classe dos benzodiazepínicos, administrado antes ou imediatamente após a formação da memória associativa entre os estímulos incondicionado (choque nas patas) e condicionado (odor de café).
- Testar e comparar o desempenho e as estratégias comportamentais desenvolvidas pelos ratos, após o tratamento com um fármaco da classe dos benzodiazepínicos, administrado antes da exposição seletiva ao estímulo condicionado no COA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados os dados experimentais gravados em CD-ROM, obtidos a partir de 96 ratos *Wistar* machos, com idade entre 3 e 4 meses, pesando entre 300 e 450 g. Esses dados haviam sido utilizados por Juliana Amorim Vieira Kroon, para o desenvolvimento de sua dissertação de mestrado “Efeitos do midazolam, propranolol e escopolamina em ratos submetidos ao modelo de condicionamento olfatório de medo” (KROON, 2007) e, posteriormente, publicado no periódico *Neurobiology of Learning and Memory* (KROON & CAROBREZ, 2009). Desta forma, todos os cuidados na sua manutenção e uso foram, à época, seguidos e aprovados pelo Comitê de Ética sobre o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (23080.006118/2004-36/UFSC).

3.2 Grupos Experimentais

Os dados de dois grupos experimentais foram utilizados neste trabalho:

1. Experimento 1: Grupo Pareado [associação entre o EI (choque nas patas), juntamente com o estímulo condicionado (EC - odor de café), já que ambos foram apresentados ao mesmo tempo] e Não Pareado (apresentação do EI no dia 1 do protocolo experimental, e apresentação do EC no dia 2);
2. Experimento 2: Todos os três grupos analisados foram pareados (EI+EC) e receberam salina (grupo controle) ou midazolam¹, nos seguintes regimes de infusão: a) Grupo 1, antes da aquisição da associação EI+EC; b) Grupo 2, imediatamente após a aquisição EI+EC; e c) Grupo 3, antes da exposição ao EC.

3.3 Paradigma do Condicionamento Olfatório Aversivo

3.3.1 Procedimentos gerais

O paradigma experimental utilizado nesse trabalho consiste de duas etapas bem definidas: a etapa de aquisição do condicionamento olfatório aversivo (dois primeiros dias) e a etapa de expressão do condicionamento olfatório aversivo (três dias subsequentes), ambas

¹ *Dormonid*®, Roche, Brazil; dissolvido em solução fisiológica (NaCl 0,9 %), e administrado por via intraperitoneal, com um volume de injeção de 1,0 ml/kg, nas doses de 0,375 e 0,5 mg/kg.

destacadas na figura 2. Todas as sessões foram separadas por 24 h. No presente trabalho, é dada ênfase para o estudo das estratégias comportamentais desenvolvidas pelos animais frente aos diferentes estímulos apresentados na segunda etapa do paradigma, ou seja, na expressão das respostas condicionadas.

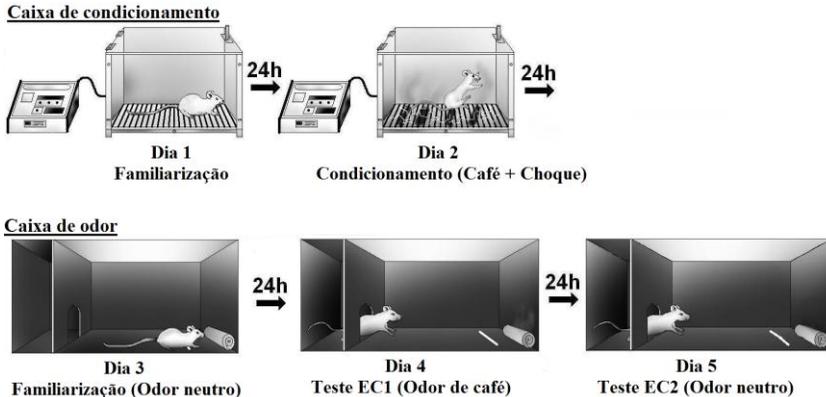


Figura 2. Procedimento esquemático do condicionamento olfatório aversivo (KROON & CAROBREZ, 2009).

Na primeira etapa do procedimento experimental, os animais foram alocados em uma caixa de condicionamento (50 cm x 26 cm x 35 cm), composta por paredes de alumínio, sendo a face frontal e a tampa construída com acrílico transparente, e piso gradeado eletrificado (grades de aço inoxidável com 1 cm de distância, entre si). Esta caixa estava conectada a um gerador de choques (Insight, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) pré-programados, utilizado como EI.

No primeiro dia de protocolo, os animais exploraram livremente este aparato, durante 4 min, em uma sessão de familiarização. Vinte e quatro horas após, ocorreu a sessão de condicionamento, quando foram aplicados cinco pareamentos entre odor de café², uniformemente distribuídos no compartimento abaixo do piso gradeado (EC) com choque elétrico nas patas (0.4 mA, com duração de 2 s cada; e intervalo de 40 s entre cada choque). A caixa de condicionamento estava instalada em uma sala com som atenuado e iluminação controlada de 80 lux.

² 15 g de quantidade de pó de café Melitta®, Brasil, tradicional, torrado e moído.

Na segunda etapa do procedimento experimental, a fim de reduzir qualquer influência contextual, a expressão do medo condicionado e as estratégias comportamentais adotadas frente a esse novo estímulo foram medidas em uma caixa de odor, presente em uma sala com iluminação reduzida de quatro lux. Essa caixa, confeccionada a partir de acrílico escuro, exceto as paredes frontais, construídas a partir de acrílico transparente, possui dois ambientes distintos: um ambiente aberto (40 cm x 26 cm x 40 cm) e um compartimento fechado, inclusive com teto (20 cm x 26 cm x 40 cm). O livre acesso entre os dois compartimentos, ocorria por uma abertura (6 cm x 6 cm), situada na parede divisória entre os compartimentos. Na parede oposta ao ambiente fechado, uma flanela enrolada foi utilizada como pista visual ou fonte de odor.

Desta forma, no terceiro dia do protocolo experimental, os animais exploraram de maneira livre a caixa de odor e os parâmetros comportamentais foram medidos, na ausência de qualquer estímulo olfatório, durante 10 min. Nesta sessão, se procede a avaliação de estratégias e comportamentos adotados pelos animais, em um ambiente totalmente novo e sem estímulo aversivo presente, exceto a novidade. No quarto dia, os ratos foram expostos ao EC durante 10 min em uma sessão denominada como teste EC1. Nessa sessão, os mesmos parâmetros comportamentais foram coletados, e um padrão comportamental estabelecido frente ao estímulo olfatório condicionado (EC1) foi estabelecido. No quinto dia, os ratos retornaram ao mesmo contexto do dia anterior, porém sem a presença do EC, em uma sessão denominada de teste EC2. Nesta sessão, a postura dos animais frente a um possível condicionamento de segunda ordem, estabelecido no dia anterior como resultado de um pareamento entre o odor de café (EC1) e o contexto (EC2) foi observada durante 10 min.

3.3.2 Novos parâmetros avaliados e método de análise

O foco inicial do presente trabalho foi ampliar a análise do repertório comportamental exibida pelos ratos durante a familiarização, a exposição ao EC (EC1) ou ao contexto (EC2), no teste do COA (dias 03, 04 e 05).

A análise de todos os vídeos foi efetuada manual e sistematicamente com o auxílio de um software especializado (ANY-MazeTM Video-Tracking System), sendo que a sessão foi analisada minuto a minuto, totalizando os 10 min já padronizados para cada dia. Desta forma, a caixa de odor foi dividida em três ambientes de tamanhos iguais (20 cm x 26 cm x 40 cm), assim denominados: 1) O ambiente fechado (a partir de agora, chamado de **C**); 2) O ambiente aberto

próximo ao odor (agora chamado **P**), exatamente onde a fonte de odor foi colocada, na parede oposta ao compartimento fechado; e 3) O espaço intermediário (a partir de agora, relacionado como **I**), que se situa exatamente no centro da caixa, entre os dois outros espaços (figura 3).

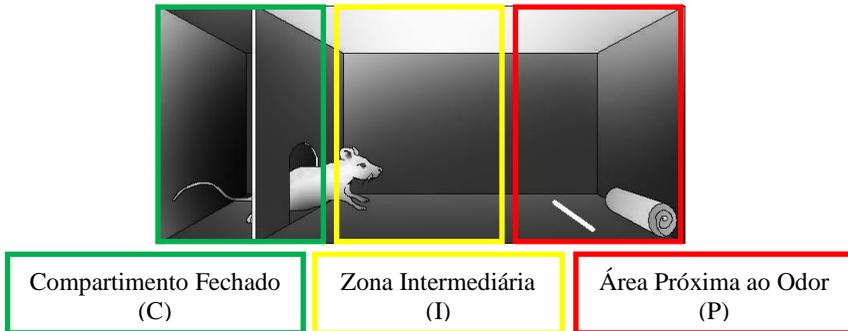


Figura 3. Ilustração esquemática da nova divisão da caixa de odor.

Assim, foram determinados os períodos de tempo em que os animais permaneceram em cada espaço delimitado na caixa (áreas C e P). Além desta variável, outros comportamentos apresentados pelos animais e que se mostraram como característicos para esse ambiente também foram medidos. São eles:

- Levantar (*Rearing*): Postura assumida pelo animal em qualquer um dos três ambientes (C, I ou P), quando este se sustenta apenas nas duas patas traseiras, com as patas dianteiras sem tocar o chão. Este comportamento pode ser adotado estando apoiado em qualquer uma das paredes da caixa, ou não (BLANCHARD et al., 1998).
- Auto-limpeza (*Grooming*): Comportamento de auto-limpeza, quando o animal lambe alguma parte de seu corpo. Também pode apresentá-lo em qualquer um dos três ambientes distintos (BLANCHARD et al., 1998).
- Agachar (*Crouching*): Postura que o animal assume em qualquer um dos três compartimentos (C, I ou P), quando fica em posição agachada, com o dorso curvado e sem extensão das patas dianteiras ou traseiras, sendo considerada praticamente como uma imobilidade (BLANCHARD & BLANCHARD, 1969; BLANCHARD et al., 1998).

- *Head-out (HO)*: Comportamento de avaliação de risco apresentado pelo animal, quando este está localizado no compartimento fechado e coloca sua cabeça ou uma das patas dianteiras na zona intermediária, a fim de buscar informações do ambiente aberto, com movimentos de cabeça e investigação (BLANCHARD & BLANCHARD, 1989).
- *Agachar-cheirar (Crouch-sniffing)*: Postura investigativa que o animal assume quando está no compartimento fechado, ficando em posição agachada com o dorso curvado (*crouching*), acompanhado de qualquer movimento de cabeça, à procura de novas informações do ambiente (BLANCHARD et al., 1998).
- *Stretch-attend (SA)*: Comportamento de aproximação, quando o animal assume uma posição com seu corpo alongado e suas patas traseiras estendidas para trás, orientado para a fonte de odor (BLANCHARD et al., 1997; HUBBARD et al., 2004).
- *Cheirar (Sniffing)*: Comportamento investigativo do animal, apresentado próximo à fonte de odor, quando ele cheira tanto a flanela (com ou sem odor) quanto à área aproximada. Este comportamento apenas é apresentado na área P.
- *Contato (Contact)*: Comportamento também apresentado apenas na área P, quando o animal está cheirando a fonte de odor e coloca uma ou duas patas dianteiras sob a flanela, podendo também mordê-la.

3.3.3 Etapa I – Análise exploratória de estratégias comportamentais no modelo de condicionamento olfatório aversivo.

Conforme descrito em Grupos Experimentais, no Experimento 1, dois grupos foram formados: grupos Pareado e Não Pareado.

Os animais do grupo Pareado foram colocados na caixa de condicionamento e a exploraram livremente no primeiro dia, durante a sessão de familiarização. No dia seguinte, retornaram a mesma caixa, e transcorridos 40 s, receberam cinco choques nas patas, na presença do odor de café, em intervalos de 40 s. Os animais do grupo Não Pareado foram colocados na caixa de condicionamento no primeiro dia de protocolo experimental e, logo após os 40 s iniciais, receberam os mesmos cinco choques descritos para os animais do grupo Pareado, mas sem a presença do odor. No dia seguinte, os animais retornaram a mesma caixa, quando o odor de café estava presente, porém, nenhum choque foi aplicado. Nos três dias subsequentes, durante a etapa de expressão das respostas condicionadas e determinação de estratégias

comportamentais, ambos os grupos passaram pelo mesmo procedimento já descrito anteriormente, sessão de familiarização, teste EC1 e teste EC2.

3.3.4 Etapa II – Teste farmacológico

Após a triagem inicial dos animais necessários para a validação do novo método de análise, procederam-se o teste e a comparação do desempenho, e as estratégias comportamentais desenvolvidas pelos ratos, após o tratamento com um fármaco da classe dos benzodiazepínicos, o midazolam.

Para tanto, foram verificados os efeitos da manipulação farmacológica ocasionada pelo benzodiazepínico midazolam nas doses de 0,375 ou 0,5 mg/ kg, enquanto a solução salina (NaCl, 0,9 %) foi utilizada como grupo controle, nas diferentes etapas:

- Aquisição do condicionamento: Administração sistêmica, 30 min antes da sessão de condicionamento (dia 2);
- Consolidação: Administração sistêmica, 30 min após a sessão de condicionamento (dia 2);
- Expressão das respostas condicionadas: Administração sistêmica, 30 min antes da sessão de teste EC1 (dia 4).

3.4 Análise Estatística

A análise dos dados obtidos no presente estudo foi realizada com o auxílio do programa estatístico Statistica 6.0 (Statsoft, Tulsa, EUA) e a representação dos gráficos através do programa Prisma 5.0 (GraphPad Prism, San Diego, EUA).

Os resultados referentes ao parâmetro período de tempo gasto nos diferentes ambiente do aparato foram representados como média. Já os parâmetros comportamentais obtidos durante os diferentes dias de teste relativos à frequência, duração e duração média foram representados como mediana (intervalo interquartil), já que esses dados foram analisados por testes não paramétricos.

Os dados obtidos para o parâmetro tempo foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) de uma via ou análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, dependendo dos grupos analisados e da comparação esperada. Em todos os casos, o teste *post-hoc* utilizado foi o de Newman-Keuls.

Já os dados referentes aos parâmetros comportamentais foram analisados pelo Teste de Mann-Whitney, quando duas amostras independentes foram comparadas; Teste de Kruskal-Wallis, quando se

compararam mais de duas amostras independentes; e Teste de Friedman, quando duas ou mais variáveis dependentes foram analisadas.

Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

A análise realizada neste estudo se baseou nos dados obtidos e utilizados na dissertação de Mestrado da aluna Juliana Amorim Vieira Kroon (KROON, 2007). Neste trabalho, ficou demonstrado que a associação entre o estímulo neutro (odor de café) e o EI (choque nas patas) foi bem-sucedida após cinco pareamentos. Os parâmetros analisados, já citados anteriormente, consideravam uma divisão da caixa de odor, quando apenas o compartimento fechado e a área próxima a fonte de odor (7 cm de aproximação) eram relevantes (DO-MONTE, 2006; KROON, 2007; SOUZA, 2007; KROON & CAROBREZ, 2009). O teste farmacológico realizado com midazolam verificou que a administração do benzodiazepínico foi capaz de reduzir as respostas defensivas, quando administrado antes ou imediatamente após o condicionamento. Porém, o mesmo fármaco não foi capaz de exercer qualquer efeito na expressão da resposta previamente aprendida. Assim, esses resultados já descritos e publicados constituíram-se no ponto de partida para este estudo, cujo objetivo inicial foi o de ampliar o catálogo de comportamentos exibidos para se definir possíveis estruturas de estratégias de enfrentamento a eventos aversivos que possam ser analisados em conjunto.

4.1 Etapa I - Análise Exploratória de Estratégias Comportamentais no Modelo de Condicionamento Olfatório Aversivo.

A) Período de tempo de permanência nos diferentes compartimentos da caixa de odor.

Encontra-se, na figura 4, a descrição temporal dos dados referentes ao tempo gasto nos compartimentos fechado e próximo da fonte de odor, durante a familiarização, sessão EC1 e EC2. Como é possível verificar, os animais dos grupos Pareado e Não Pareado apresentam diferenças visíveis no período de tempo em que permanecem nos compartimentos distintos, principalmente durante EC1 e EC2.

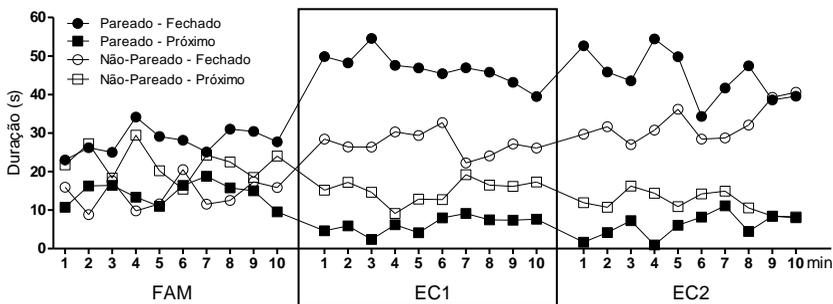


Figura 4. Avaliação do efeito das diferentes condições de condicionamento (grupos Pareado e Não-Pareado) para o parâmetro de tempo gasto nos diferentes ambientes. Próximo: ambiente próximo à fonte de odor; Fechado: ambiente fechado. Valores expressos em média e analisados minuto a minuto. N = 9 animais em cada grupo.

Quando o teste ANOVA para medidas repetidas foi aplicado apenas para o dia de familiarização (primeiros 10 min), uma diferença significativa ($p < 0,05$) foi verificada somente para o fator grupo, quando analisado apenas o ambiente fechado [$F(1,16) = 9,87$], sendo que as outras condições não apresentaram tal diferença [fator repetição: $F(9,144) = 0,62$; $p = 0,77$; fator interação: $F(9,144) = 1,02$; $p = 0,42$]. Durante a familiarização, nenhuma diferença significativa para o tempo de permanência próximo à fonte de odor [fator grupo: $F(1,16) = 3,29$; $p = 0,08$; fator repetição: $F(9,144) = 0,86$; $p = 0,55$; fator interação: $F(9,144) = 1,05$; $p = 0,39$] foi detectada. Isso indica que os animais do grupo Pareado já apresentam uma preferência pelo ambiente fechado, se comparados aos animais do outro grupo, mesmo que nenhum estímulo olfatório esteja presente no devido aparato.

Durante a sessão de teste EC1 (10 min intermediários destacados na figura 4), o fator grupo também é o único parâmetro que apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$), tanto para o ambiente fechado [$F(1,16) = 16,90$], quanto para a área próxima ao odor [$F(1,16) = 9,37$]. Nenhum dos outros fatores analisados mostrou diferenças significativas, nos dois ambientes: fechado [fator repetição: $F(9,144) = 0,73$; $p = 0,67$; fator interação: $F(9,144) = 0,71$; $p = 0,69$] e próximo à fonte de odor [fator repetição: $F(9,144) = 0,82$; $p = 0,59$; fator interação: $F(9,144) = 0,40$; $p = 0,93$].

Durante a sessão de teste EC2 (últimos 10 min apresentados na figura), o mesmo resultado do teste EC1 foi observado, revelando diferenças significativas ($p < 0,05$) para os ambientes: fechado [$F(1,16) = 15,32$] e próximo [$F(1,16) = 10,81$], apenas no fator grupo. No fator repetição, nenhuma diferença foi constatada nos dois ambientes [fechado: $F(9,144) = 1,28$; $p = 0,24$; próximo: $F(9,144) = 1,21$; $p = 0,29$]. E no fator interação, somente uma tendência foi encontrada para o ambiente fechado [$F(9,144) = 1,77$; $p = 0,07$], sendo não significativa para a área próxima ao odor [$F(9,144) = 1,15$; $p = 0,32$].

Por outro lado, quando se efetua a ANOVA considerando-se tanto os grupos quanto os ambientes distintos nos dois últimos dias de sessão, ou seja, últimos 20 min apresentados no gráfico anterior, foi possível verificar uma diferença significativa apenas no fator grupo [$F(1,16) = 19,30$; $p < 0,05$]. Ou seja, independente do dia de teste ou do ambiente analisado, o grupo Pareado se mostra significativamente distinto ao grupo Não Pareado. O mesmo não acontece para o fator repetição [$F(19,304) = 1,01$; $p = 0,43$] ou para o fator interação, que apresenta apenas uma tendência [$F(19,304) = 1,52$; $p = 0,07$]. Neste caso, o teste *post-hoc* Newman-Keuls aponta algumas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os animais dos grupos Pareado e Não-Pareado na sessão de teste EC1 nos seguintes minutos: 3, 7, 8, 9 e 10; e na sessão de teste EC2 nos minutos: 3 e 4.

B) Avaliação de outros comportamentos característicos desenvolvidos pelos animais quando expostos na caixa de odor e apresentados nos diferentes dias de teste.

De maneira geral, todos os parâmetros comportamentais desenvolvidos pelos animais na caixa de odor foram observados e aqueles que se mostraram mais prevalentes foram destacados. Um estudo mais aprofundado sobre esses comportamentos foi realizado e, após a constatação de que os mesmos já foram relacionados de acordo com seu caráter exploratório e/ ou defensivo em outros estudos, optou-se por utilizá-los neste trabalho, definindo o catálogo comportamental selecionado.

Analisando a tabela 1, é possível observar as medianas da duração total (s) que cada grupo, Pareado ou Não Pareado, gastou em cada comportamento mensurado, nas diferentes áreas do aparato (C, I ou P) e nas diferentes sessões de testes analisadas (FAM, EC1 ou EC2). Já na tabela 2, as medianas das frequências dos mesmos comportamentos já citados foram detalhados.

Os dados da duração e da frequência foram utilizados para o cálculo da duração média (duração média = duração/ frequência) de cada comportamento. Esses dados estão representados na tabela 3.

Assim, todos esses dados foram analisados por testes não paramétricos, já que os grupos não apresentaram distribuição normal. Primeiramente, as comparações entre os grupos Pareado e Não Pareado foram realizadas, a partir da análise de cada comportamento e cada sessão separadamente, através do teste de Mann-Whitney. Logo em seguida, efetuou-se a comparação entre os três dias distintos de sessão, para cada comportamento apresentado em ambos os grupos, através do teste de Friedman. Os resultados dessa análise encontram-se representados nas tabelas 1, 2 e 3.

Com base nos resultados obtidos para o parâmetro duração média, é possível constatar que a maioria dos comportamentos apresentaram diferenças significativas quando comparou-se a sessão de FAM com os dias de teste EC1 e/ ou EC2. Para o grupo Pareado, os efeitos significativos ($p < 0,05$) foram revelados para os comportamentos: *Groom P*; *Crouch I* e *Crouch P*; *C-Sniff C*; e *SA I*. Já para o grupo Não Pareado, os comportamentos que apresentaram diferenças significativas foram: *Groom I* e *P*; *Crouch C*, *I* e *P*; *Sniff P*.

Por outro lado, o fator grupo se mostrou relevante em alguns comportamentos, a partir da constatação de diferenças significativas ($p < 0,05$) expressas quando os dois grupos foram comparados. Os comportamentos foram: *Rear I* e *P* (teste EC1); *Crouch I* (teste EC1 e/ ou EC2); *C-Sniff C* (teste EC2); *SA I* (teste EC1 e/ ou EC2); *Cont P* (teste EC1).

Outra interpretação dos dados mensurados para os grupos Pareado e Não Pareado pode ser observada no quadro 1. Os valores de porcentagem da duração média (duração/ frequência) de todos os comportamentos (totalizando 100%) foram descritos em uma escala sequencial, considerando a sua ordem de prevalência nas diferentes sessões observadas (quadro 1). O comportamento número 1 foi considerado como o mais prevalente, enquanto que o comportamento número 13 representou o menos prevalente, para cada sessão e grupo analisado. Assim, um padrão de atuação de certos comportamentos pôde ser observado.

Tabela 1. Duração Total (s) dos parâmetros comportamentais obtidos durante três sessões subsequentes de 10 min de exposição dos animais à caixa de odor [Familiarização (FAM), Teste EC1 (EC1) e Teste EC2 (EC2)]. Valores expressos pela mediana (intervalo interquartil: Q1-Q3). *p<0,05, diferença significativa entre o comportamento durante a FAM e as sessões de teste EC1 e/ ou EC2; # p<0,05, diferença significativa entre os grupos Pareado (Par) e Não Pareado (N-Par). N = 9 animais em cada grupo.

		FAM	EC1	EC2
<i>Rear C</i>	Par.	54,8 (30,1-59,5) *	22 (15,9-49,4)	26,0 (24,8-33,7)
	N-Par.	18 (16,8-21,1) * #	28,6 (25,3-54,0)	35,7 (19,0-40,2)
<i>Rear I</i>	Par.	27,5 (17,7-34,4) *	10,2 (0,4-12,2)	8,5 (7,0-15,0)
	N-Par.	32,8 (26,4-48,9)	28,9 (10,5-41,0) #	23,2 (17,3-41,8)
<i>Rear P</i>	Par.	25,7 (17,8-37,4) *	8,7 (0,1-15,0)	15,9 (12,4-18,2)
	N-Par.	32,3 (27,2-53,9)	25,7 (15,5-52,3) #	25,7 (10,7-41,2)
<i>Groom C</i>	Par.	19,9 (1,2-25,6)	40,3 (23,0-80,8)	56,3 (23,4-104,9)
	N-Par.	1,6 (0-4,4) *	25,7 (12,4-50,5)	95,9 (38,0-129,8)
<i>Groom I</i>	Par.	0 (0-11,4)	0 (0-0,2)	0 (0-0,2)
	N-Par.	6,5 (0-18,4) *	0,4 (0-3,2)	0 (0-1,1)
<i>Groom P</i>	Par.	3,0 (0-11,3)	0 (0-0)	0 (0-0)
	N-Par.	2,9 (1,7-27,7) *	0 (0-0)	1,1 (0-2,2)
<i>Crouch C</i>	Par.	6,3 (0-33,6)	4,6 (0-46,8)	8,4 (1,8-21,4)
	N-Par.	0 (0-1,6)	2,2 (0-2,9)	2,7 (0,3-8,1)
<i>Crouch I</i>	Par.	7,3 (0,5-8,8) *	0 (0-0)	0 (0-0)
	N-Par.	1,0 (0-4,3) *	0,8 (0-3,0) #	4,6 (1,6-10,6) #
<i>Crouch P</i>	Par.	6,7 (0-16,7) *	0 (0-0)	0 (0-0)
	N-Par.	6,3 (2,6-27,3) *	0 (0-1,2)	0 (0-8,0)
<i>C-Sniff C</i>	Par.	0 (0-0) *	26,6 (2,2-38,8)	16,6 (8,4-31,1)
	N-Par.	0 (0-0)	0 (0-10,4) #	0,6 (0-2,9) #
<i>SA I</i>	Par.	0 (0-0) *	2,8 (0,8-11,1)	3,8 (1,2-7,8)
	N-Par.	0 (0-0)	0 (0-1,0) #	0,6 (0-2,3) #
<i>Sniff P</i>	Par.	36,1 (31,9-42,9) *	18,9 (6,5-35,1)	19,6 (11,3-21,0)
	N-Par.	53,4 (48,4-78,3) *#	43,3 (35,1-47,5) #	37,4 (22,1-40) #
<i>Cont P</i>	Par.	4,7 (0,7-9,6)	0 (0-6,4)	1,7 (1,2-4,2)
	N-Par.	6,7 (1,2-18,9) *	11,0 (9,7-30,5) #	6,0 (4,7-7,8)

Tabela 2. Frequência dos parâmetros comportamentais obtidos durante três sessões subsequentes de 10 min de exposição dos animais à caixa de odor [Familiarização (FAM), Teste EC1 (EC1) e Teste EC2 (EC2)]. Valores expressos pela mediana (intervalo interquartil: Q1-Q3). * $p < 0,05$, diferença significativa entre o comportamento durante a FAM e as sessões de teste EC1 e/ ou EC2; # $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos Pareado (Par) e Não Pareado (N-Par). N = 9 animais em cada grupo.

		FAM	EC1	EC2
<i>Rear C</i>	Par.	20 (13 – 23)	9 (7 – 25)	11 (9 – 13)
	N-Par.	11 (8 – 13) * #	13 (12 – 16)	14 (11 – 16)
<i>Rear I</i>	Par.	11 (10 – 12) *	6 (0 – 7)	5 (3 – 6)
	N-Par.	15 (13 – 17) * #	10 (6 – 15) #	7 (5 – 11)
<i>Rear P</i>	Par.	11 (8 – 14) *	6 (1 – 9)	7 (6 – 9)
	N-Par.	16 (14 – 18)	9 (6 – 17)	7 (5 – 13)
<i>Groom C</i>	Par.	3 (1 – 4)	6 (4 – 7)	5 (4 – 6)
	N-Par.	2 (0 – 3) *	3 (1 – 6)	12 (7 – 14) #
<i>Groom I</i>	Par.	0 (0 – 2)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
	N-Par.	2 (0 – 3) *	1 (0 – 2)	0 (0 – 2)
<i>Groom P</i>	Par.	1 (0 – 3) *	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
	N-Par.	2 (1 – 6) *	0 (0 – 0)	1 (0 – 1)
<i>Crouch C</i>	Par.	2 (0 – 4)	4 (0 – 6)	2 (1 – 4)
	N-Par.	0 (0 – 1)	1 (0 – 2)	1 (1 – 2)
<i>Crouch I</i>	Par.	1 (1 – 4) *	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
	N-Par.	1 (0 – 2)	1 (0 – 2) #	2 (1 – 4) #
<i>Crouch P</i>	Par.	1 (0 – 3) *	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
	N-Par.	2 (1 – 7) *	0 (0 – 3)	0 (0 – 1)
<i>C-Sniff C</i>	Par.	0 (0 – 0) *	9 (1 – 13)	6 (2 – 10)
	N-Par.	0 (0 – 0)	0 (0 – 3) #	1 (0 – 2) #
<i>SA I</i>	Par.	0 (0 – 0) *	2 (1 – 3)	2 (1 – 2)
	N-Par.	0 (0 – 0)	0 (0 – 1) #	1 (0 – 1) #
<i>Sniff P</i>	Par.	16 (14 – 20)	11 (3 – 13)	11 (9 – 12)
	N-Par.	25 (24 – 30) * #	21 (18 – 24) #	15 (12 – 19) #
<i>Cont P</i>	Par.	1 (1 – 3)	0 (0 – 3)	1 (1 – 2)
	N-Par.	2 (1 – 3)	5 (3 – 8) #	2 (1 – 4)

Tabela 3. Duração Média dos parâmetros comportamentais obtidos durante três sessões subsequentes de 10 min de exposição dos animais à caixa de odor [Familiarização (FAM), Teste EC1 (EC1) e Teste EC2)]. Valores referentes à duração média (duração/ frequência), expressos pela mediana (intervalo interquartil: Q1-Q3). *p<0,05, diferença significativa entre o comportamento durante a FAM e as sessões de teste EC1 e/ ou EC2; # p<0,05, diferença significativa entre os grupos Pareado (Par) e Não Pareado (N-Par). N = 9 animais em cada grupo.

		FAM	EC1	EC2
<i>Rear C</i>	Par.	2,8 (2,3 – 2,9)	1,9 (1,9 – 3,0)	2,4 (2,4 – 2,8)
	N-Par.	2,1 (1,6 – 2,7)	2,3 (2,1 – 3,3)	2,4 (1,8 – 2,7)
<i>Rear I</i>	Par.	2,3 (1,7 – 3,0)	1,6 (0,6 – 1,9)	2,2 (1,9 – 2,7)
	N-Par.	2,5 (2,0 – 3,2)	2,7 (2,2 – 2,9) #	3,1 (2,8 – 3,4)
<i>Rear P</i>	Par.	2,5 (2,1 – 2,9)	1,4 (0,1 – 1,9)	2,0 (1,8 – 2,2)
	N-Par.	2,3 (1,9 – 3,0)	3,0 (2,6 – 3,2) #	2,5 (1,7 – 3,1)
<i>Groom C</i>	Par.	4,9 (1,2 – 6,8)	6,8 (4,6 – 11,5)	9,9 (3,9 – 14,9)
	N-Par.	0,8 (0 – 1,4)	8,4 (6,5 – 10,2)	11,5 (6,9 – 13,7)
<i>Groom I</i>	Par.	0 (0 – 5,8)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
	N-Par.	2,6 (0 – 5,0) *	0,4 (0 – 2,1)	0 (0 – 0,5)
<i>Groom P</i>	Par.	1,3 (0 – 1,9) *	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
	N-Par.	1,4 (0,8 – 7,4) *	0 (0 – 0)	1,1 (0 – 1,6)
<i>Crouch C</i>	Par.	2,4 (0 – 8,4)	2,0 (0 – 4,0)	3,5 (1,6 – 5,9)
	N-Par.	0 (0 – 0,8) *	1,0 (0 – 1,4)	2,7 (0,3 – 2,7)
<i>Crouch I</i>	Par.	2,0 (0,5 – 4,4) *	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
	N-Par.	0,6 (0 – 2,1) *	0,8 (0 – 1,5) #	1,7 (1,5 – 3,4) #
<i>Crouch P</i>	Par.	3,5 (0 – 3,8) *	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
	N-Par.	3,0 (2,3 – 3,5) *	0 (0 – 1,0)	0 (0 – 2,3)
<i>C-Sniff C</i>	Par.	0 (0 – 0) *	2,2 (1,8 – 3,1)	3,0 (1,9 – 4,2)
	N-Par.	0 (0 – 0,1)	0 (0 – 3,4)	0,3 (0 – 1,3) #
<i>SA I</i>	Par.	0 (0 – 0) *	1,4 (0,7 – 3,2)	2,0 (0,8 – 3,8)
	N-Par.	0 (0 – 0,1)	0 (0 – 0,9) #	0,6 (0 – 2,0) #
<i>Sniff P</i>	Par.	2,1 (1,7 – 2,6)	1,8 (1,6 – 2,6)	1,6 (1,3 – 1,7)
	N-Par.	2,2 (2,1 – 2,4) *	1,8 (1,8 – 2,2)	1,9 (1,8 – 2,1)
<i>Cont P</i>	Par.	3,1 (0,7 – 4,7)	0 (0 – 2,1)	1,7 (0,6 – 2,5)
	N-Par.	3,1 (1,0 – 6,0)	3,8 (2,7 – 4,1) #	3,8 (2,3 – 4,6)

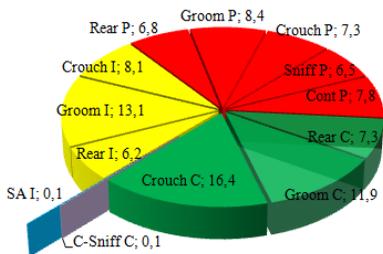
Quadro 1. Ordem de prevalência (Prev.) dos parâmetros comportamentais obtidos durante três sessões subsequentes de 10 min de exposição dos animais à caixa de odor [Familiarização (FAM), Teste EC1 (EC1) e Teste EC2 (EC2)]. Ordem sequencial do comportamento mais prevalente (número 1) ao comportamento menos prevalente (número 13), expressos pelos animais dos grupos Pareado (Par) e Não Pareado (N-Par). N = 9 animais em cada grupo.

Prev.	FAM		EC1		EC2	
	Par.	N-Par.	Par.	N-Par.	Par.	N-Par.
1	Crouch C	Groom P	Groom C	Groom C	Groom C	Groom C
2	Groom I	Groom C	Crouch C	Cont P	Crouch C	Cont P
3	Groom C	Cont P	C-Sniff C	Rear I	C-Sniff C	Rear I
4	Groom P	Groom I	Rear C	Rear P	SA I	Rear P
5	Crouch I	Rear I	SA I	Rear C	Rear I	Crouch C
6	Cont P	Crouch P	Sniff P	Groom I	Rear C	Rear C
7	Rear C	Rear P	Rear P	Sniff P	Rear P	Crouch I
8	Crouch P	Sniff P	Rear I	C-Sniff C	Sniff P	Sniff P
9	Rear P	Rear C	Cont P	Crouch C	Cont P	Groom P
10	Sniff P	Crouch I	Groom P	Crouch I	Groom P	Crouch P
11	Rear I	Crouch C	Crouch P	Crouch P	Groom I	SA I
12	C-Sniff C	C-Sniff C	Groom I	SA I	Crouch P	Groom I
13	SA I	SA I	Crouch I	Groom P	Crouch I	C-Sniff C

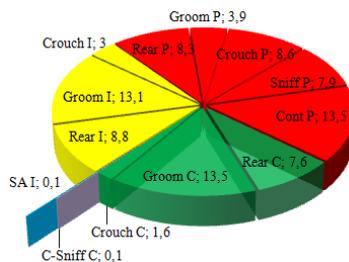
Dessa forma, foi possível observar que o padrão comportamental dos grupos analisados foi modificado, de acordo com a sessão confrontada. Em resumo, os dois grupos expressaram comportamentos muito variados na sessão de familiarização, demonstrando uma falta de preferência por qualquer um dos ambientes. Já nas sessões de teste EC1 e/ ou EC2, os animais do grupo Pareado apresentaram uma prevalência maior de comportamentos expressos no ambiente fechado, o que corrobora com os dados observados para o parâmetro tempo gasto na caixa de odor.

Após essas constatações, as figuras a seguir puderam ser melhor interpretadas, já que nelas foram apresentados os mesmos valores de porcentagem da duração média (duração/ frequência) para cada comportamento mensurado nas diferentes sessões, totalizando 100% em comportamentos executados. Nota-se o aparecimento de determinados parâmetros em momentos diferentes, sendo que isso varia de acordo com as condições experimentais dos grupos Pareado e Não Pareado (figura 5). As cores do gráfico variam de acordo com o ambiente no qual os comportamentos foram mensurados, sendo que os parâmetros *C-Sniff C* e *SA I* estão destacados em todas as figuras.

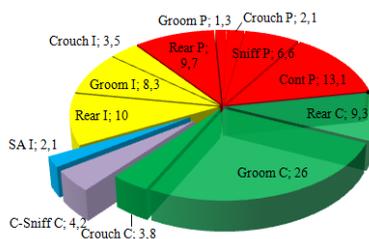
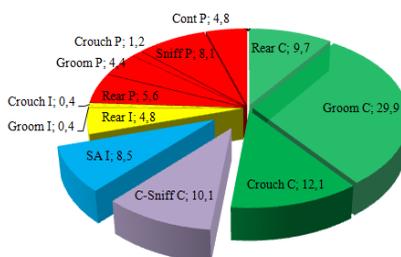
Grupo Pareado FAMILIARIZAÇÃO



Grupo Não Pareado



TESTE EC1



TESTE EC2

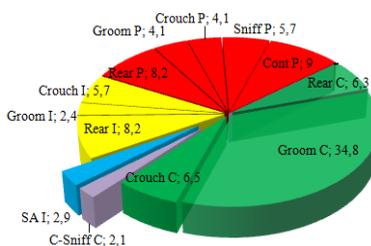
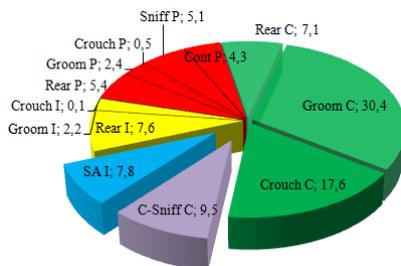


Figura 5. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para as diferentes condições de condicionamento durante a FAM, Teste EC1 e Teste EC2. Gráficos referentes ao grupo Pareado estão exibidos do lado esquerdo da figura, enquanto que os gráficos relativos ao grupo Não Pareado estão agrupados do lado direito da figura. Valores expressos em porcentagem. N = 9 animais em cada grupo. ■ Comportamentos de ocorrência no espaço fechado; ■ Comportamentos na zona intermediária; ■ Comportamentos na área próxima ao odor.

Assim, foi possível constatar que os comportamentos destacados no gráfico (*C-Sniff C* e *SA I*) foram aqueles que apresentaram diferenças estatísticas, quando se efetuou a análise de Mann-Whitney, comparando os dois grupos analisados, Pareado e Não Pareado (tabela 3). Também, observou-se que os comportamentos expressos pelos animais do grupo Pareado na zona intermediária e na área próxima a fonte de odor tem uma diminuição na sua percentagem. Dessa forma, foi possível verificar que o grupo Pareado apresentou uma maior quantidade de comportamentos variáveis entre as sessões de FAM e de testes EC1 e/ ou EC2 (figura 5 – lado esquerdo).

Da mesma forma, nenhum parâmetro comportamental apresentou diferenças significativas para o grupo Não Pareado (figura 5 – lado direito), o que refletiu ainda mais os efeitos distintos das duas condições experimentais impostas.

C) Diferenciação e agrupamento de parâmetros comportamentais sugeridos como defensivos e/ ou não defensivos, característicos para determinadas etapas do procedimento experimental.

A partir da análise anterior, os comportamentos avaliados foram caracterizados de acordo com o momento em que são mais ou menos prevalentes e o agrupamento dos mesmos e a análise minuto a minuto foram feitos, de acordo com sua possível relação com estratégias de enfrentamento em situações adversas.

Desta forma, os comportamentos *Crouch C*, *C-Sniff C*, *HO*, *SA I*, *Cont P*, *Sniff P*, *Rear C* e *Groom C* foram extraídos para uma análise temporal mais pormenorizada. Analisando as figuras 6 e 7 a seguir, algumas diferenças na duração de certos comportamentos foram observadas, de acordo com a condição experimental estabelecida, pareada e não pareada.

Em ambas as figuras, o gráfico relativo ao tempo gasto em cada um dos compartimentos do aparato foi primeiramente apresentado, e os valores dos parâmetros comportamentais mais relevantes foram colocados em seguida, para comparação e acompanhamento do que está ocorrendo durante as sessões.

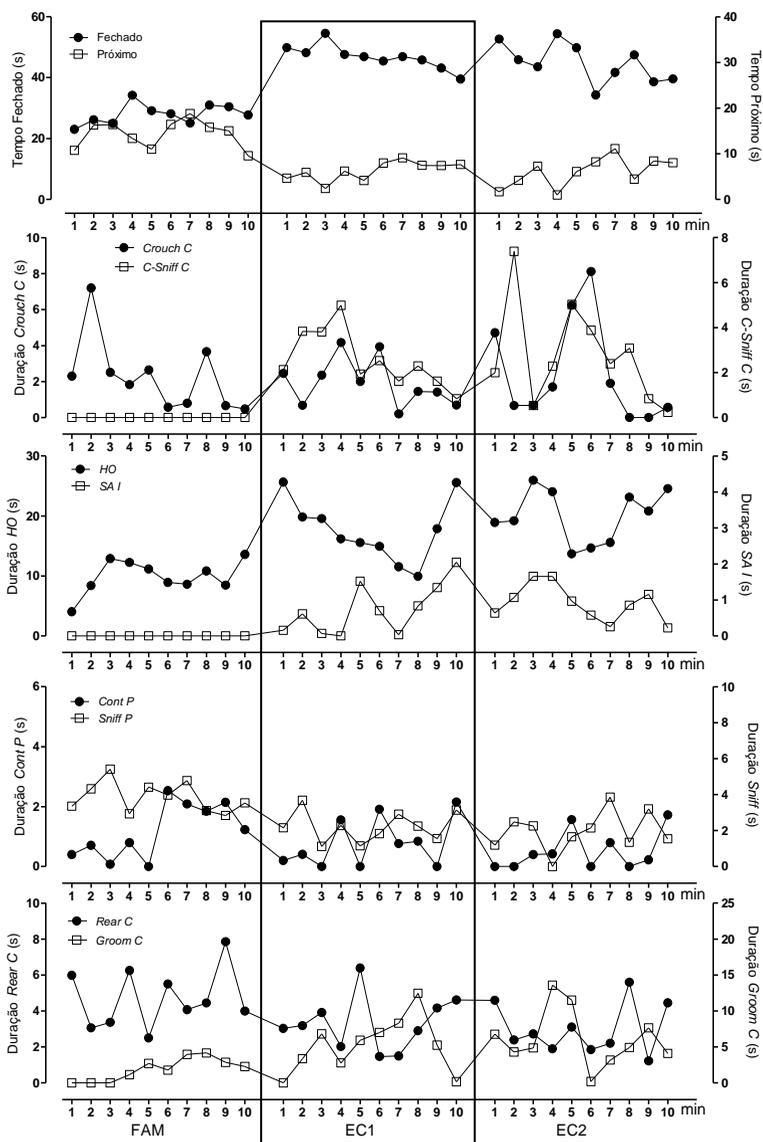


Figura 6. Evolução temporal da duração (s) dos parâmetros comportamentais no Grupo Pareado durante a Familiarização (FAM), Teste EC1 (EC1) e Teste EC2 (EC2). Os valores estão representados pela média. N = 9 animais.

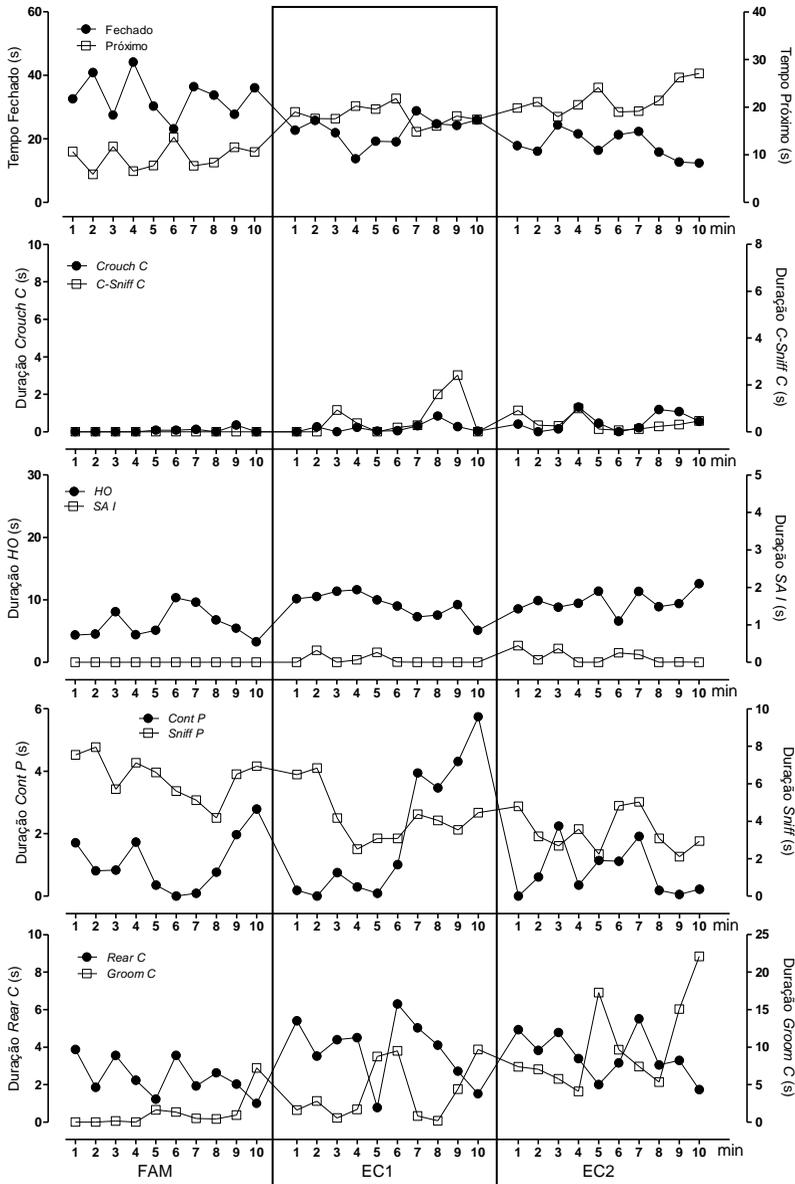


Figura 7. Evolução temporal da duração (s) dos parâmetros comportamentais no Grupo Não Pareado durante a Familiarização (FAM), Teste EC1 (EC1) e Teste EC2 (EC2). Os valores estão representados pela média. N = 9 animais.

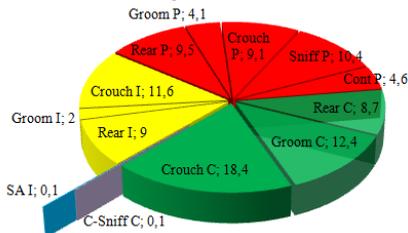
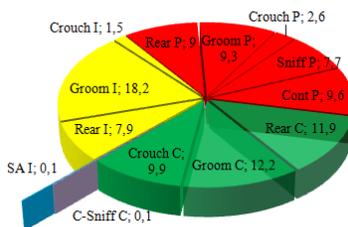
Com base nos dados analisados, foi possível verificar que os grupos possuem perfis comportamentais distintos no decorrer das três sessões observadas, de acordo com a condição experimental imposta. Também, a observação da evolução temporal dos dados permitiu uma melhor análise e constatação de como as estratégias de enfrentamento seriam desenvolvidas no decorrer dos 10 min, suportando a ideia de que um tempo reduzido da sessão seria suficiente para o total conhecimento da caixa de odor e posterior desenvolvimento de estratégias bem sucedidas.

D) Verificação do perfil comportamental apresentado pelos animais, quando as sessões analisadas foram divididas em intervalos de cinco minutos cada.

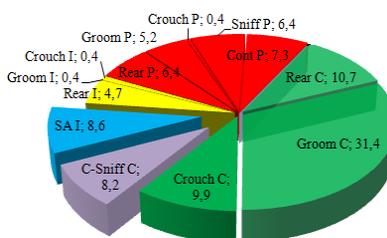
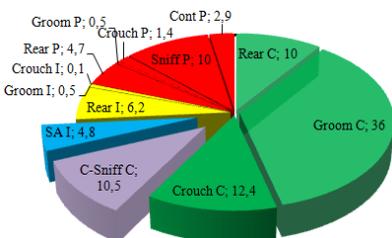
Os mesmos parâmetros comportamentais já apresentados foram analisados em blocos de cinco minutos, quando se esperou verificar uma similaridade entre os perfis comportamentais no início e no término das sessões, dependendo das condições empregadas nos grupos Pareado (figura 8) e Não Pareado (figura 9).

De acordo com o apresentado na figura 8, é possível verificar que a maioria dos parâmetros comportamentais apresentados pelos animais do grupo Pareado foi expressa com a mesma prevalência, seja nos cinco minutos iniciais ou finais de cada sessão. A figura 9 também demonstrou uma similaridade muito grande entre os valores de certos comportamentos pelo grupo Não Pareado, nos cinco minutos iniciais e finais das sessões apresentadas. Isso sugere que apenas cinco minutos já possam ser suficientes para que o animal desenvolva sua estratégia de enfrentamento sobre estímulos externos.

GRUPO PAREADO

Minutos 1 a 5
FAMILIARIZAÇÃOMinutos 6 a 10

TESTE EC1



TESTE EC2

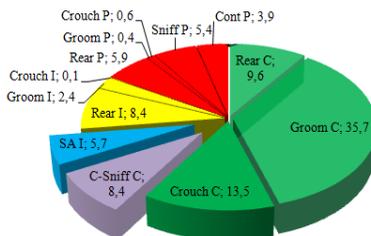
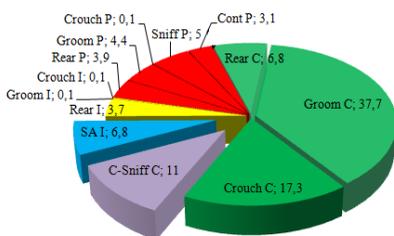
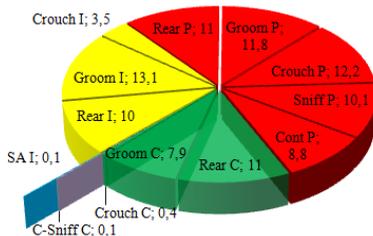


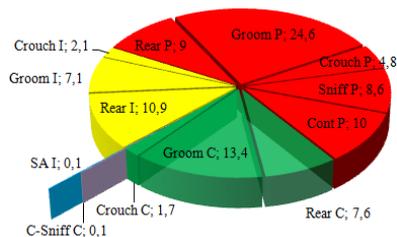
Figura 8. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para a condição do grupo Pareado durante a FAM, Teste EC1 e Teste EC2. Gráficos referentes aos cinco primeiros minutos estão exibidos do lado esquerdo da figura, enquanto os gráficos relativos aos cinco minutos finais estão agrupados do lado direito da figura. Valores expressos em porcentagem. N = 9 animais. ■ Comportamentos de ocorrência no espaço fechado; ■ Comportamentos na zona intermediária; ■ Comportamentos na área próxima ao odor.

GRUPO NÃO PAREADO

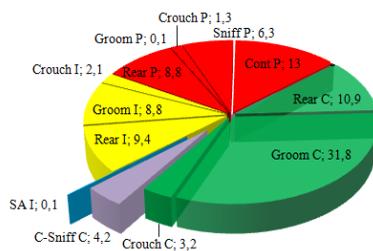
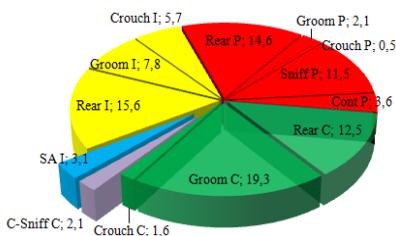
Minutos 1 a 5 FAMILIARIZAÇÃO



Minutos 6 a 10



TESTE EC1



TESTE EC2

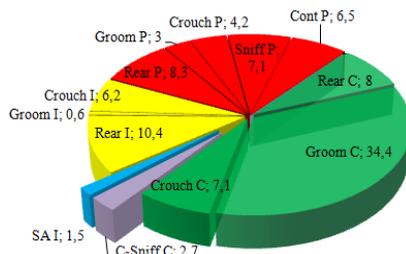
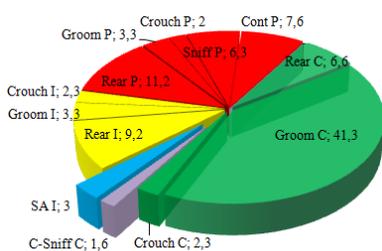


Figura 9. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para a condição do grupo Não Pareado durante a FAM, Teste EC1 e Teste EC2. Gráficos referentes aos cinco primeiros minutos estão exibidos do lado esquerdo da figura, enquanto os gráficos relativos aos cinco minutos finais estão agrupados do lado direito da figura. Valores expressos em porcentagem. N = 9 animais. ■ Comportamentos de ocorrência no espaço fechado; ■ Comportamentos na zona intermediária; ■ Comportamentos na área próxima ao odor.

Assim, os resultados da etapa I demonstraram uma distinção entre os perfis comportamentais evocados pelos animais, de acordo com a condição experimental imposta e os diferentes dias de teste. Da mesma forma, os grupos apresentaram prevalências diferentes em determinados parâmetros comportamentais, o que sugeriu uma definição de estratégias que podem ser modificadas de acordo com a apresentação de estímulos estressores, dependendo da sua relevância emocional. Também, foi possível constatar uma similaridade dos perfis comportamentais observados para os cinco minutos iniciais e cinco minutos finais da sessão, o que sugeriu que a primeira metade do tempo habitual da sessão já seria suficiente para a definição das estratégias desenvolvidas.

4.2 Etapa II – Teste Farmacológico

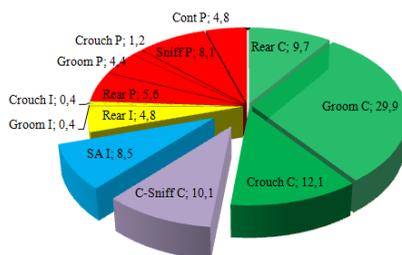
Nesta etapa, os ratos foram injetados com salina ou midazolam em três momentos previamente definidos: 1) 30 min antes do condicionamento (EI+EC); 2) Imediatamente após o condicionamento; e 3) 30 min antes da sessão de teste EC1.

4.2.1 Análise do padrão comportamental dos grupos controle (salina).

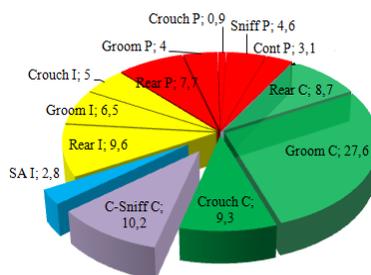
Procedeu-se, inicialmente, uma comparação geral entre os grupos controle, tratados com salina, comparados com o grupo Pareado, sem tratamento, para verificar possível efeito da injeção na expressão do comportamento. Para isso, todos os gráficos foram relacionados na figura 10, apresentando os comportamentos mensurados na sessão de teste EC1, já que na mesma é apresentado o padrão comportamental defensivo e possível definição de estratégia de enfrentamento esperados.

De acordo com esses resultados, verificou-se que os grupos analisados apresentaram perfis comportamentais semelhantes, de acordo com a observação dos comportamentos expressos. O aparecimento dos parâmetros destacados *C-Sniff C* e *SA I* também foi significativo em todos os gráficos e poucos comportamentos variaram em porcentagem dependendo da condição experimental ou da experiência prévia. Dessa forma, acreditou-se que os grupos salina poderiam ser utilizados como controle, para posterior comparação com os grupos tratados com o benzodiazepínico midazolam.

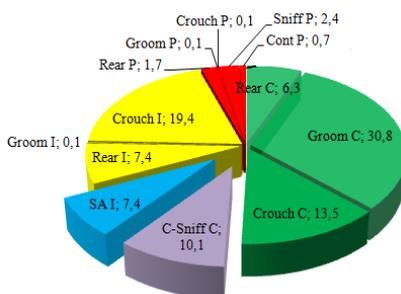
GRUPO PAREADO



GRUPO SALINA (ANTES DO CONDICIONAMENTO)



GRUPO SALINA (APÓS O CONDICIONAMENTO)



GRUPO SALINA (ANTES DO TESTE)

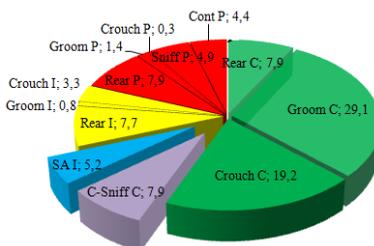


Figura 10. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para as diferentes condições de tratamento durante o Teste EC1 para o grupo Pareado e grupos controle (salina), em diferentes momentos de administração. Valores expressos em porcentagem. N = 7-10 animais.

■ Comportamentos de ocorrência no espaço fechado; ■ Comportamentos na zona intermediária; ■ Comportamentos na área próxima ao odor.

4.2.2. Verificação do perfil comportamental apresentado pelos ratos administrados com midazolam antes da sessão de condicionamento.

A) Período de tempo de permanência nos diferentes compartimentos da caixa de odor.

Nesta etapa de resultados, os grupos de animais tratados com midazolam ou salina, administrados antes da sessão de condicionamento, foram analisados. Inicialmente, o parâmetro tempo gasto pelos animais no ambiente fechado e/ ou área próxima ao odor foi averiguado, sendo que a sua evolução temporal pode ser analisada na figura 11.

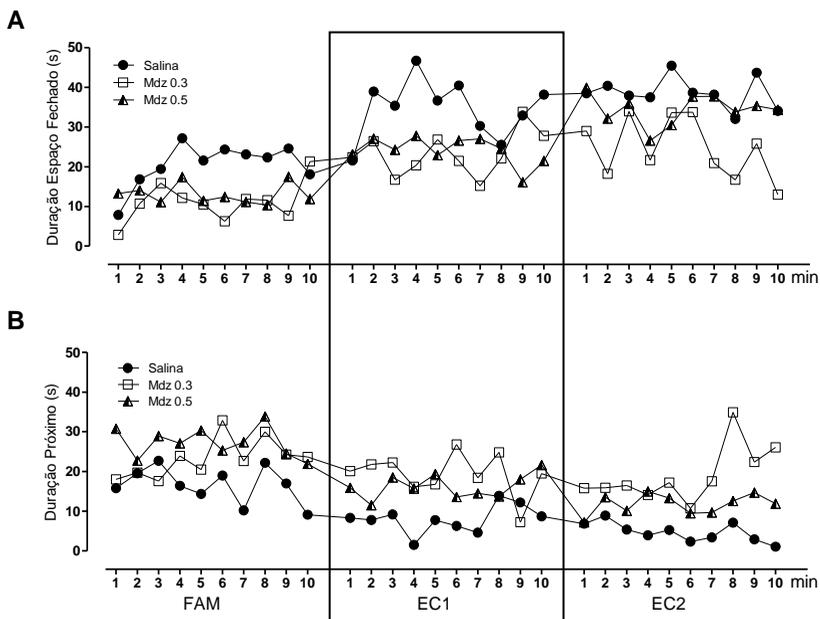


Figura 11. Evolução temporal do tempo (s) gasto pelos ratos nos ambientes fechado (A) ou área próxima do odor (B) submetidos a diferentes condições de tratamento de Mdz 0.3 (midazolam 0,375 mg/kg/ml), Mdz 0.5 (midazolam 0,5 mg/kg/ml) e salina administrados antes do condicionamento. Familiarização (FAM), Teste EC1 (EC1) e Teste EC2 (EC2). Valores expressos pela média e analisados minuto a minuto. N = 7-8 animais.

A ANOVA para o parâmetro tempo de permanência no espaço fechado (figura 11 – painel A) não detectou efeito significativo ($p < 0,05$)

para nenhuma das sessões avaliadas, sendo elas: familiarização [fator grupo: $F(2,17) = 1,95$; $p = 0,17$; fator repetição: $F(9,153) = 0,92$; $p = 0,50$; fator interação: $F(18,153) = 0,70$; $p = 0,80$], sessão de teste EC1 [fator grupo: $F(2,17) = 1,93$; $p = 0,17$; fator repetição: $F(9,153) = 0,92$; $p = 0,50$; fator interação: $F(18,153) = 1,03$; $p = 0,42$] e sessão de teste EC2 [fator grupo: $F(2,17) = 2,33$; $p = 0,12$; fator repetição: $F(9,153) = 1,67$; $p = 0,10$; fator interação: $F(18,153) = 0,82$; $p = 0,67$].

Para o parâmetro tempo de permanência na área próxima a fonte de odor (figura 11 – painel B), foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) para a sessão de teste EC2, nos fatores: grupo [$F(2,17) = 7,60$] e repetição [$F(9,153) = 2,00$]; para o fator interação, nenhuma diferença significativa foi encontrada [$F(18,153) = 1,43$; $p = 0,12$]. O teste *post-hoc* Newman-Keuls indicou que o grupo Mdz 0.3 apresentou um aumento no período de permanência na área, principalmente no minuto 8. Nas demais sessões, nenhum efeito significativo pôde ser constatado: sessão de familiarização [fator grupo: $F(2,17) = 1,93$; $p = 0,17$; fator repetição: $F(9,153) = 0,81$; $p = 0,60$; fator interação: $F(18,153) = 0,50$; $p = 0,95$] e sessão de teste EC1 [fator grupo: $F(2,17) = 3,17$; $p = 0,06$; fator repetição: $F(9,153) = 0,82$; $p = 0,59$; fator interação: $F(18,153) = 1,15$; $p = 0,30$].

B) Verificação do perfil comportamental apresentado pelos animais.

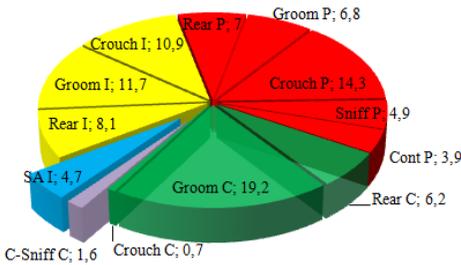
A verificação dos comportamentos expressos pelos animais também foi efetuada nesse caso, de acordo com as diferentes condições experimentais propostas e os diferentes dias de sessão. O teste de Kruskal-Wallis foi executado para análise estatística de todos os parâmetros já citados, e apenas o comportamento *Groom* I apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na sessão de teste EC2, quando comparados os grupos salina, Mdz 0.3 e Mdz 0.5 [$H(2, N = 20) = 6,89$].

O grupo controle (salina), representado na figura 12, apresentou um padrão comportamental semelhante àquele apresentado pelo grupo Pareado do Experimento 1, considerando-se as diferentes sessões de teste analisadas. Em resumo, os valores dos parâmetros comportamentais observados variaram após o condicionamento, enfatizando uma modificação na estratégia definida, de acordo com o evento estressante enfrentado.

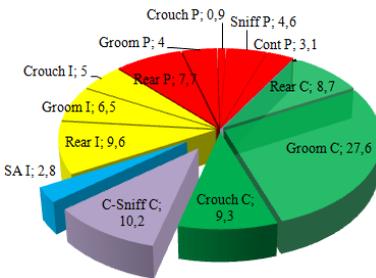
Os grupos Mdz 0.3 (figura 13 – lado esquerdo) e Mdz 0.5 (figura 13 – lado direito) revelaram diferenças significantes em determinados comportamentos, quando estes foram comparados com os mesmos apresentados pelos animais do grupo salina (controle).

Grupo Salina

FAMILIARIZAÇÃO



TESTE EC1



TESTE EC2

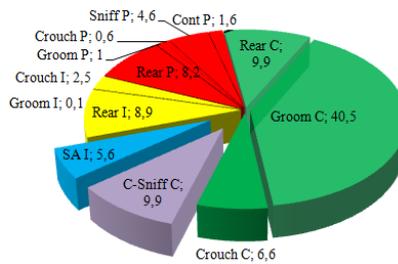


Figura 12. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para a condição experimental do grupo salina administrada antes do condicionamento, durante a FAM, Teste EC1 e Teste EC2. Valores expressos em porcentagem. N = 7-8 animais. ■ Comportamentos de ocorrência no espaço fechado; ■ Comportamentos na zona intermediária; ■ Comportamentos na área próxima ao odor.

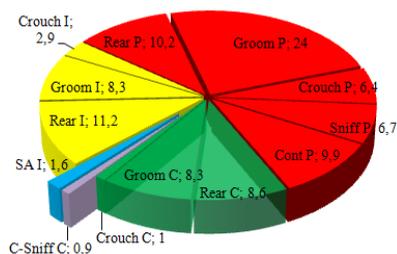
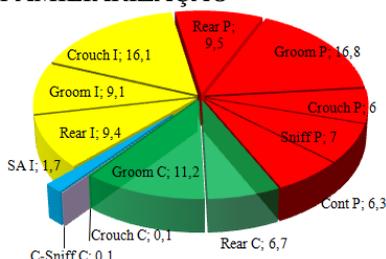
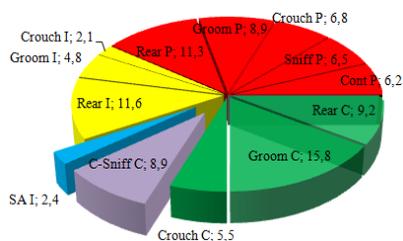
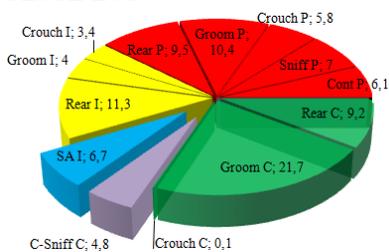
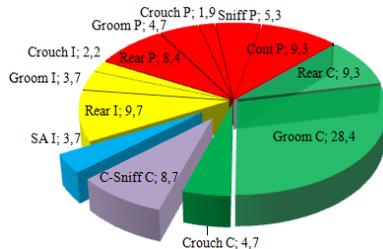
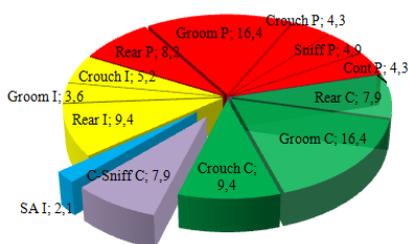
Grupo Mdz 0.3**Grupo Mdz 0.5****FAMILIARIZAÇÃO****TESTE EC1****TESTE EC2**

Figura 13. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para as condições experimentais dos grupos Mdz 0.3 (midazolam 0,375 mg/kg/ml – lado esquerdo) e Mdz 0.5 (midazolam 0,5 mg/kg/ml – lado direito) administrados antes de condicionamento, durante a FAM, Teste EC1 e Teste EC2. Valores expressos em porcentagem. N = 7-8 animais.

■ Comportamentos de ocorrência no espaço fechado; ■ Comportamentos na zona intermediária; ■ Comportamentos na área próxima ao odor.

Portanto, foi possível concluir que certos parâmetros comportamentais foram afetados após o tratamento com o benzodiazepínico midazolam, de acordo com os resultados apresentados. Os animais dos grupos Mdz 0.3 e Mdz 0.5 expressaram uma quantidade significativa de comportamentos na zona intermediária e na área próxima ao odor durante os testes EC1 e EC2, sendo que o mesmo não foi verificado para os animais do grupo salina. Da mesma forma, os comportamentos destacados *C-Sniff C* e *SA I* já puderam ser notados no dia da FAM e a sua porcentagem variou muito pouco nos outros dias de teste, para os grupos já citados. Porém, apenas o comportamento *Groom I* apresentou diferenças estatísticas, sendo que a maioria das diferenças destacadas anteriormente foi apenas verificada por comparação visual.

4.2.3. Verificação do perfil comportamental apresentado pelos ratos administrados com midazolam após a sessão de condicionamento.

A) Período de tempo de permanência nos diferentes compartimentos da caixa de odor.

Após a verificação das alterações comportamentais provocadas pela administração de midazolam antes da sessão de condicionamento, a mesma análise foi efetuada para um grupo independente de animais tratados com o mesmo benzodiazepínico imediatamente após a mesma sessão, no dia 2 do protocolo experimental. O tempo gasto nos diferentes ambientes da caixa de odor foi o primeiro parâmetro analisado (figura 14).

A análise de variância de medidas repetidas executada para os valores de tempo relativo ao espaço fechado (figura 14 – painel A) não apontou diferenças significativas para o dia de teste EC1 [fator grupo: $F(2,22) = 1,10$; $p = 0,34$; fator repetição: $F(9,198) = 1,08$; $p = 0,37$; fator interação: $F(18,198) = 0,71$; $p = 0,79$] e nem para o dia da sessão de teste EC2, nos seguintes fatores: fator grupo: $F(2,22) = 0,14$; $p = 0,86$ e fator repetição: $F(9,198) = 1,07$; $p = 0,37$. Este último apenas apresentou uma tendência para o fator interação [$F(18,198) = 1,63$; $p = 0,07$]. Já na sessão de familiarização, diferenças significativas ($p < 0,05$) foram constatadas para o fator repetição [$F(9,198) = 2,19$], também apontando uma tendência para o fator grupo [$F(2,22) = 2,99$; $p = 0,07$]; porém, o fator interação não apresentou nenhuma diferença [$F(18,198) = 1,24$; $p = 0,22$]. O teste *post-hoc* Newman-Keuls efetuado para o dia da familiarização constatou que os valores para os minutos 4 e 5 diferem daquele apresentado pelo minuto 1.

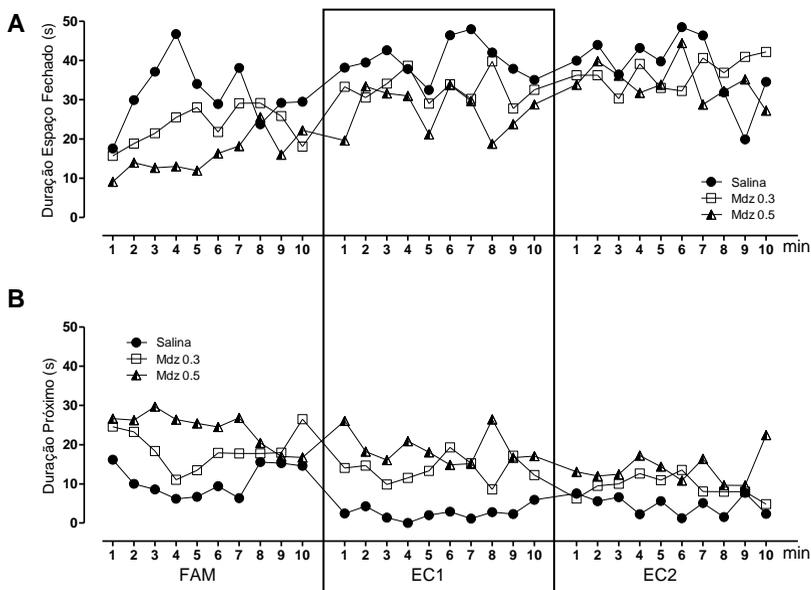


Figura 14. Evolução temporal do tempo (s) gasto pelos ratos nos ambientes fechado (A) ou área próxima do odor (B) submetidos a diferentes condições de tratamento de Mdz 0.3 (midazolam 0,375 mg/kg/ml), Mdz 0.5 (midazolam 0,5 mg/kg/ml) e salina administrados após o condicionamento. Familiarização (FAM), Teste EC1 (EC1) e Teste EC2 (EC2). Valores expressos pela média e analisados minuto a minuto. N = 8-10 animais.

Quando efetuado o mesmo teste estatístico para os valores referentes à área próxima ao odor (figura 14 – painel B), diferenças significativas não foram detectadas para nenhum momento, em nenhum dos dias de teste analisados: familiarização [fator grupo: $F(2,22) = 2,66$; $p = 0,09$; fator repetição: $F(9,198) = 0,73$; $p = 0,68$; fator interação: $F(18,198) = 1,08$; $p = 0,36$], sessão de teste EC1 [fator grupo: $F(2,22) = 2,10$; $p = 0,14$; fator repetição: $F(9,198) = 0,48$; $p = 0,88$; fator interação: $F(18,198) = 1,30$; $p = 0,18$] e sessão de teste EC2 [fator grupo: $F(2,22) = 1,21$; $p = 0,31$; fator repetição: $F(9,198) = 0,37$; $p = 0,94$; fator interação: $F(18,198) = 1,16$; $p = 0,29$].

B) Verificação do perfil comportamental apresentado pelos animais.

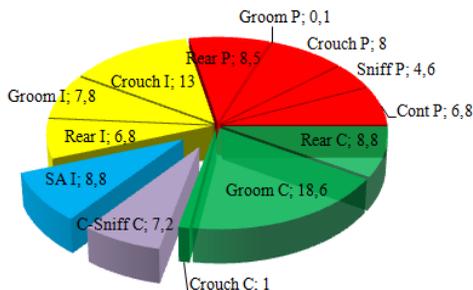
A análise para verificação do padrão comportamental apresentado pelos animais, nas diferentes condições de tratamento, bem como nos diferentes dias de teste também apontou diferenças significativas ($p < 0,05$) em alguns parâmetros comportamentais observados. Durante a sessão de familiarização, apenas o comportamento *Groom P* [$H(2, N = 25) = 12,22$] se mostrou diferente significativamente, quando comparados os grupos salina, Mdz 0.3 e Mdz 0.5. Já na sessão de teste EC1, os comportamentos que também apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) foram: *Rear P* [$H(2, N = 25) = 6,04$], *Groom I* [$H(2, N = 25) = 5,26$], *Crouch C* [$H(2, N = 25) = 4,97$], *Crouch P* [$H(2, N = 25) = 6,61$], *Sniff P* [$H(2, N = 25) = 6,67$] e *Cont P* [$H(2, N = 25) = 6,10$]. E na sessão de teste EC2, apenas o comportamento *SA I* se mostrou significativamente diferente, quando comparados os grupos salina, Mdz 0.3 e Mdz 0.5 [$H(2, N = 25) = 7,26$].

Da mesma forma, essas e outras diferenças comportamentais significantes expressas pelos diferentes grupos experimentais podem ser observadas nas figuras 15 (grupo salina) e 16 (grupos Mdz 0.3 – lado esquerdo da figura; e Mdz 0.5 – lado direito da figura).

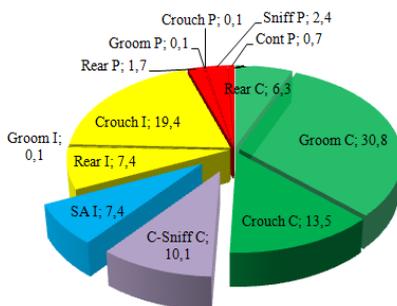
Portanto, os últimos grupos de animais observados, tratados com midazolam e/ ou salina imediatamente após a sessão de condicionamento, também apresentaram diferenças significantes nos parâmetros comportamentais avaliados para os diferentes dias de teste. Um padrão comportamental distinto havia sido observado para os grupos de animais tratados com midazolam antes da sessão de condicionamento, já que os comportamentos que variaram de forma significante nos dois momentos de administração não foram os mesmos. Dessa forma, foi possível concluir que o segundo momento de administração do benzodiazepínico também foi capaz de alterar a expressão de determinados comportamentos, porém, de forma distinta, mesmo que os resultados apresentados não suportem a informação de como essa alteração estaria sendo processada.

Grupo Salina

FAMILIARIZAÇÃO



TESTE EC1



TESTE EC2

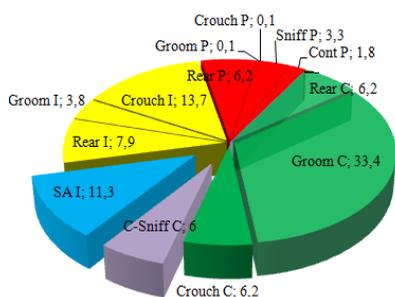


Figura 15. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para a condição experimental do grupo salina administrada após o condicionamento, durante a FAM, Teste EC1 e Teste EC2. Valores expressos em porcentagem. N = 8-10 animais. ■ Comportamentos de ocorrência no espaço fechado; ■ Comportamentos na zona intermediária; ■ Comportamentos na área próxima ao odor.

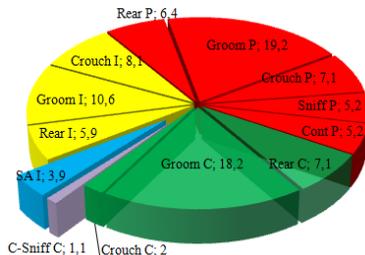
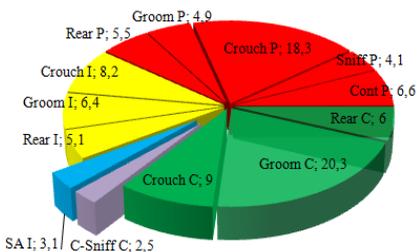
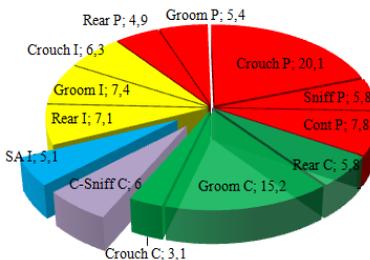
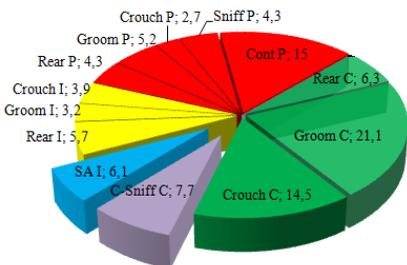
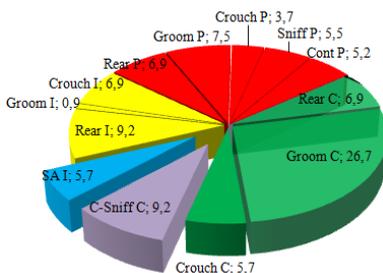
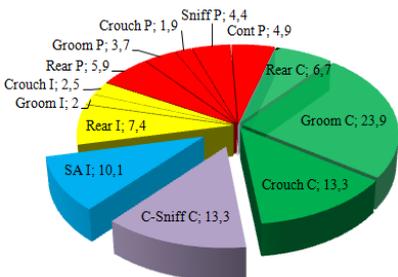
Grupo Mdz 0.3**Grupo Mdz 0.5****FAMILIARIZAÇÃO****TESTE EC1****TESTE EC2**

Figura 16. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para as condições experimentais dos grupos Mdz 0.3 (midazolam 0,375 mg/kg/ml – lado esquerdo) e Mdz 0.5 (midazolam 0,5 mg/kg/ml – lado direito) administrados após o condicionamento, durante a FAM, Teste EC1 e Teste EC2. Valores expressos em porcentagem. N = 8-10 animais.

■ Comportamentos de ocorrência no espaço fechado; ■ Comportamentos na zona intermediária; ■ Comportamentos na área próxima ao odor.

4.2.4. Verificação do perfil comportamental apresentado pelos ratos administrados com midazolam antes da sessão de teste EC1.

A) Período de tempo de permanência nos diferentes compartimentos da caixa de odor.

A última série de resultados apresentados demonstrou o perfil comportamental dos animais tratados com midazolam e/ ou salina 30 min antes da sessão de teste EC1. A evolução temporal do primeiro parâmetro analisado, o tempo gasto pelos animais dos diferentes grupos no ambiente fechado e/ ou área próxima ao odor durante as sessões de FAM, teste EC1 e teste EC2, pode ser observada na figura 17.

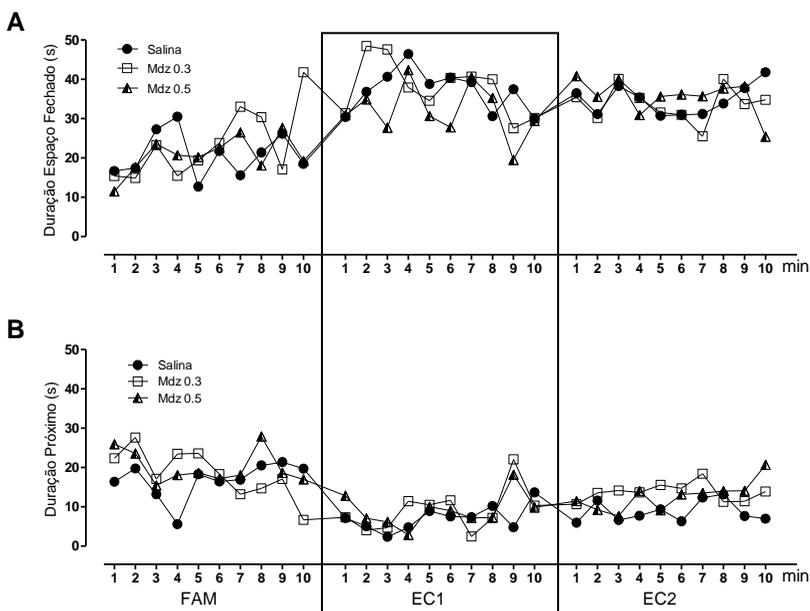


Figura 17. Evolução temporal do tempo (s) gasto pelos ratos nos ambientes fechado (A) ou área próxima do odor (B) submetidos a diferentes condições de tratamento de Mdz 0.3 (midazolam 0,375 mg/kg/ml), Mdz 0.5 (midazolam 0,5 mg/kg/ml) e salina administrados antes da sessão de teste EC1. Familiarização (FAM), Teste EC1 (EC1) e Teste EC2 (EC2). Valores expressos pela média e analisados minuto a minuto. N = 9 animais para cada grupo.

O teste ANOVA de medidas repetidas executado apenas para o espaço fechado (figura 17 – painel A) na sessão de FAM apontou diferenças significativas ($p < 0,05$) nos fatores repetição [$F(9,216) = 2,39$] e interação [$F(18,216) = 2,15$], mas não para o fator grupo [$F(2,24) = 0,17$; $p = 0,84$]. O teste *post-hoc* Newman-Keuls comprovou este achado, mostrando que o aumento no tempo apresentado pelo grupo Mdz 0.3 no minuto 10 foi responsável por tal diferença. Já na sessão de teste EC1, apenas foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) no fator repetição [$F(9,216) = 2,57$], sendo que não foi encontrada nenhum efeito significativo para os demais fatores: grupo [$F(2,24) = 0,66$; $p = 0,52$] e interação [$F(18,216) = 1,00$; $p = 0,45$]. E na sessão de teste EC2, nenhuma diferença foi encontrada para esta análise [fator grupo: $F(2,24) = 0,04$; $p = 0,96$; fator repetição: $F(9,216) = 0,87$; $p = 0,54$; fator interação: $F(18,216) = 0,58$; $p = 0,91$].

Quando efetuou-se a análise para os valores apresentados na figura 17 – painel B, relativos ao tempo gasto na área próxima a fonte de odor, para a sessão de FAM, nenhum efeito significativo foi apontado [fator grupo: $F(2,24) = 0,32$; $p = 0,72$; fator repetição: $F(9,216) = 1,57$; $p = 0,12$; fator interação: $F(18,216) = 1,27$; $p = 0,20$]. O mesmo ocorreu na sessão de teste EC2, quando não se encontrou nenhuma diferença estatística [fator grupo: $F(2,24) = 0,52$; $p = 0,59$; fator repetição: $F(9,216) = 0,73$; $p = 0,67$; fator interação: $F(18,216) = 0,71$; $p = 0,79$]. Já na sessão de teste EC1, apenas encontrou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) para o fator repetição [$F(9,216) = 2,55$], sendo que nenhum resultado foi significativamente expressivo nos demais fatores [fator tratamento: $F(2,24) = 0,21$; $p = 0,80$; fator interação: $F(18,216) = 1,16$; $p = 0,29$]. O teste *post-hoc* Newman-Keuls comprovou essa constatação, demonstrando que o grupo Mdz 0.3 apresentou valores mais elevados no minuto 9, quando comparado ao minuto 7 do mesmo grupo.

B) Verificação do perfil comportamental apresentado pelos animais.

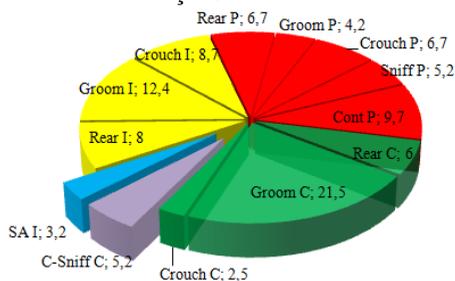
A análise para verificação do padrão comportamental apresentado pelos animais, nas diferentes condições de tratamento, bem como nos diferentes dias de teste também apontou diferenças significativas ($p < 0,05$) em alguns parâmetros comportamentais observados. Durante a sessão de familiarização, apenas o comportamento *Rear I* [$H(2, N = 27) = 10,68$] se mostrou diferente significativamente, quando comparados os grupos salina, Mdz 0.3 e Mdz 0.5. Na sessão de teste EC1, nenhum parâmetro apresentou diferenças significativas, ao contrário da sessão de

teste EC2, quando os comportamentos *Rear P* [$H(2, N = 27) = 6,88$] e *Groom C* [$H(2, N = 27) = 4,98$] se mostraram significativamente diferentes ($p < 0,05$).

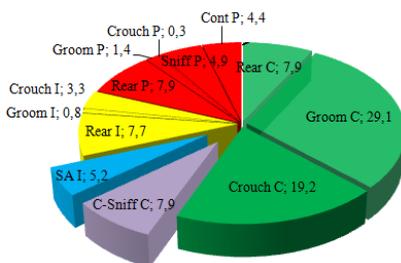
De forma semelhante, os gráficos demonstrados para cada grupo desta etapa podem ser observados nas figuras 18 (grupo salina) e 19 (grupo Mdz 0.3 – lado esquerdo da figura; e grupo Mdz 0.5 – lado direito da figura), onde algumas diferenças passíveis de serem discutidas foram analisadas.

Grupo Salina

FAMILIARIZAÇÃO



TESTE EC1



TESTE EC2

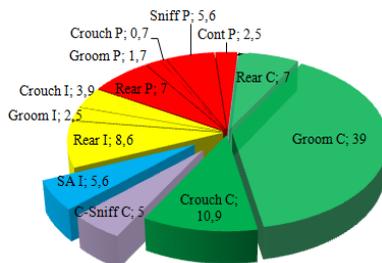


Figura 18. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para a condição experimental do grupo salina administrada antes da sessão de teste EC1, durante a FAM, Teste EC1 e Teste EC2. Valores expressos em porcentagem. $N = 9$ animais para cada grupo. ■ Comportamentos de ocorrência no espaço fechado; ■ Comportamentos na zona intermediária; ■ Comportamentos na área próxima ao odor.

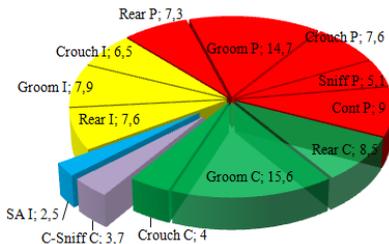
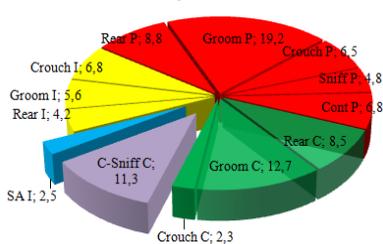
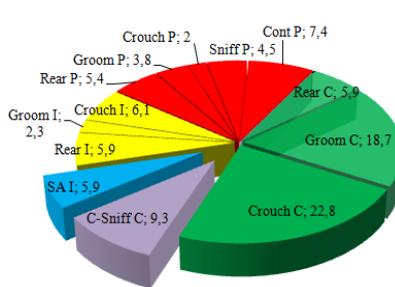
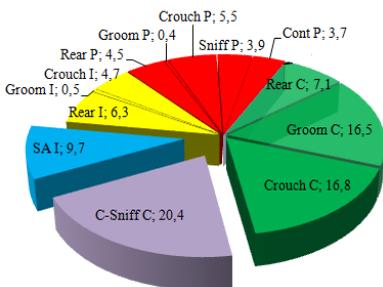
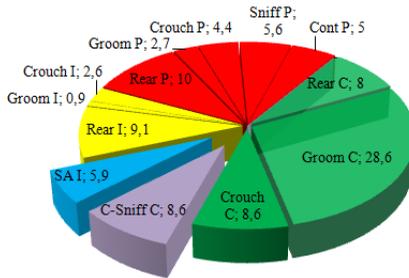
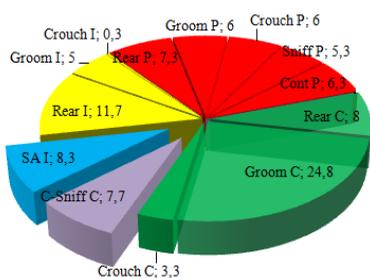
Grupo Mdz 0.3**Grupo Mdz 0.5****FAMILIARIZAÇÃO****TESTE EC1****TESTE EC2**

Figura 19. Porcentagem da duração média dos parâmetros comportamentais avaliados para as condições experimentais dos grupos Mdz 0.3 (midazolam 0,375 mg/kg/ml – lado esquerdo) e Mdz 0.5 (midazolam 0,5 mg/kg/ml – lado direito) administrados antes da sessão de teste EC1 e durante a FAM, Teste EC1 e Teste EC2. Valores expressos em porcentagem. N = 9 animais.

■ Comportamentos de ocorrência no espaço fechado; ■ Comportamentos na zona intermediária; ■ Comportamentos na área próxima ao odor.

Assim, os últimos resultados apresentados confirmaram, mais uma vez, que o benzodiazepínico midazolam poderia estar interferindo nos processos de definição dos comportamentos defensivos, já que os grupos Mdz 0.3 e Mdz 0.5 apresentaram diferenças significantes nos parâmetros comportamentais mensurados para os diferentes dias de teste.

Portanto, todos os resultados apresentados para a segunda etapa de experimentos dizem respeito a possíveis alterações comportamentais causadas pelo tratamento com o benzodiazepínico midazolam nos diferentes dias de teste do protocolo experimental. Os grupos de animais foram tratados com o fármaco e/ ou salina em diferentes etapas do protocolo, e cada momento de administração levou a uma modificação em parâmetros comportamentais diferentes.

5 DISCUSSÃO

Os estudos atuais acerca de processos envolvidos na regulação emocional, seus parâmetros neurobiológicos e alterações fisiológicas e endócrinas subsequentes, têm descrito o comportamento de defesa de várias espécies de animais, através da utilização e apresentação de estímulos ameaçadores reais e potenciais. A forma como os animais irão enfrentar tais estímulos e as estratégias comportamentais adotadas a fim de minimizar ou excluir o desconforto causado por estes é o que fundamenta os estudos sobre a definição de estratégias de enfrentamento comportamental (URSIN & OLFF, 1993).

Como descrito anteriormente, grande parte das definições referentes ao tema trata sobre a resolução de eventos aversivos, justificando o uso de modelos comportamentais que tenham como principal elemento o confronto direto com esse tipo de estímulo. Dessa forma, o modelo de condicionamento aversivo se mostra como uma grande ferramenta para estes estudos, compreendendo as estratégias de enfrentamento adotadas pelos animais. No presente trabalho, o modelo de condicionamento olfatório aversivo foi utilizado e a análise dos grupos experimentais foi efetuada, de acordo com os conceitos de estratégia comportamental.

Os animais que compuseram os grupos para a coleta de dados foram os mesmos já utilizados no trabalho de Kroon, em 2007. Neste estudo anterior, foi possível constatar a necessidade de cinco associações entre o odor de café, inicialmente considerado como neutro para o animal (EC), e o choque elétrico nas patas (EI), o que conferiu o caráter aversivo necessário para o condicionamento. Os resultados apresentados (KROON, 2007; KROON & CAROBREZ, 2009) foram os parâmetros referentes ao tempo que o animal permaneceu próximo à fonte de odor e/ ou escondido no ambiente fechado, a frequência de aproximações à fonte de odor, o número de vezes que o animal se aproximou da flanela somado ao número de entradas no compartimento fechado (frequência de cruzamentos) e o tempo que o animal gastou no comportamento de *head-out*, mantendo a cabeça direcionada para a flanela, com ou sem as patas dianteiras para fora do compartimento fechado. Os mesmos parâmetros também foram estabelecidos e utilizados em outros trabalhos (DO-MONTE, 2006, SOUZA, 2007).

Nos animais, os processos que envolvem aprendizado associativo não podem ser diretamente mensurados, mas inferidos através de seus comportamentos expressos (CAHILL et al., 2001). Assim, outros parâmetros foram incluídos na análise do condicionamento olfatório

aversivo, já que os comportamentos defensivos podem ser descritos e relacionados com o perfil apresentado pelos animais e expresso de acordo com a situação exposta e confrontada. Portanto, no presente trabalho, uma análise exploratória inicial foi executada (experimento 1) nos grupos de animais que comprovaram o sucesso da associação entre os dois estímulos (EI-EC) no trabalho anterior já citado, considerando-se as condições experimentais pareada e não pareada (KROON, 2007).

A) Análise Exploratória

Como já explicado, o aparato conhecido foi dividido de forma distinta para este trabalho, compreendendo um novo compartimento e reordenando os anteriores já destacados. Porém, inicialmente, constatou-se que o compartimento intermediário não se mostrou relevante para a verificação das respostas defensivas expressas na caixa de odor (dados não relatados). O perfil comportamental e de locomoção dos animais na zona intermediária da caixa se mostrou muito semelhante ao apresentado na área próxima à fonte de odor. Tal constatação sugere que os dois ambientes possam ser novamente considerados como um ambiente só, enfatizando a relevância para o animal das duas áreas (fechada e aberta) que são bem características e claramente distintas, onde as respostas defensivas podem ser evocadas e expressas. A área intermediária se revelou apenas como uma área de transição entre os dois ambientes, sendo que poucos comportamentos ali expressos se mostraram relevantes para a análise do medo condicionado e definição de estratégias comportamentais.

Dessa forma, foram apresentados apenas os valores referentes ao tempo que os animais dos diferentes grupos permaneceram no ambiente fechado e/ ou na área próxima à fonte de odor, sendo este o primeiro parâmetro analisado. Também, a releitura dos vídeos foi executada com o auxílio de um Software especializado, diferentemente da forma habitual de análise, que era estritamente manual. Por esse motivo, os valores iniciais do parâmetro tempo foram essenciais para a verificação de um mesmo padrão de respostas defensivas observado no trabalho anterior (KROON, 2007; KROON & CAROBREZ, 2009).

Constatou-se que os dois grupos observados permaneceram nos dois ambientes durante um período de tempo muito semelhante do que já havia sido averiguado anteriormente, no trabalho de Kroon (2007), e a análise minuto a minuto, efetuada nesse trabalho, permitiu um detalhamento maior do que aconteceu durante a sessão. Observando apenas a sessão de familiarização, verificou-se uma diferença significativa, quando se compararam os dois grupos analisados no

ambiente fechado. Através desse resultado, foi possível concluir que os animais do grupo Pareado apresentaram uma preferência pelo ambiente fechado, mesmo sem a exposição a algum estímulo olfatório nessa sessão.

Os animais do grupo Pareado foram submetidos à sessão de condicionamento (choque elétrico nas patas + exposição ao odor) no dia 2 do protocolo experimental, ou seja, 24 h antes da sessão de familiarização na caixa de odor. Já os animais do grupo Não Pareado, por sua vez, também foram submetidos à exposição aos mesmos estímulos que o outro grupo de animais, porém, em dias distintos. Esses últimos receberam os cinco choques nas patas no dia 1 do protocolo experimental (48 h antes da sessão de familiarização na caixa de odor), enquanto que o odor apenas foi apresentado no dia 2. Por este motivo, acredita-se que a relevância aversiva dos choques nas patas recebidos pelos animais do grupo Pareado apenas 24 h antes da sessão de familiarização, foi capaz de conferir caráter emocional diferenciado e, talvez, mais relevante, que ficou evidenciado por uma permanência maior no ambiente fechado. Mesmo que trabalhos anteriores demonstrem que o condicionamento olfatório aversivo ocorre apenas quando o EC precede o EI (OTTO et al., 1997), e que a sequência de eventos é imprescindível para a ocorrência da associação, não se pode excluir o fato de que os grupos de animais conheceram a caixa de odor carregando experiências emocionais prévias distintas, mesmo que os estímulos expostos tenham sido os mesmos. Vale ressaltar que a sessão de familiarização é relevante tanto para o animal tomar conhecimento da caixa e evitar respostas comportamentais desencadeadas por eventos neofóbicos, quanto para que seja efetuada a mensuração dos parâmetros comportamentais expressos pelos animais sem qualquer estímulo olfatório (DIELENBERG et al., 1999). Os resultados desse presente trabalho mostraram que a sessão é extremamente relevante com base nas justificativas apresentadas, mas que a experiência prévia também deve ser levada em consideração.

Por outro lado, foi possível verificar algumas respostas comportamentais iniciais no dia do teste EC1, quando os animais foram expostos ao odor anteriormente condicionado. Quando se comparou o período de permanência dos dois grupos de animais no ambiente fechado, foi possível constatar que os animais do grupo Pareado permaneceram ali durante a maior parte da sessão. Também, o tempo de permanência próximo à fonte de odor foi significativamente reduzido, o que revelou uma preferência desses animais em evitar o odor condicionado. Tal resultado corrobora o que já foi verificado por Kroon,

em 2007, sendo este um dos principais parâmetros que caracterizaram o perfil defensivo dos animais pareados com cinco choques nas patas (KROON, 2007; KROON & CAROBREZ, 2009). Por outro lado, o grupo de animais Não Pareado não apresentou diferenças no tempo de permanência em qualquer um dos ambientes.

Conforme o esperado, o perfil de ambos os grupos se manteve para a sessão de teste EC2, quando o odor condicionado não estava mais presente, mas a relevância emocional do contexto era outra. O ambiente foi condicionado a partir do momento em que o odor de café com caráter aversivo foi exposto ali, sendo este fenômeno interpretado como um novo condicionamento contextual. Assim, considerando-se esse caráter aversivo desencadeado, agora, pelo contexto, os animais do grupo Pareado mantiveram o mesmo perfil visualizado no dia anterior, quando o estímulo olfatório encontrava-se presente. O grupo Não Pareado não apresentou esse perfil, o que reforça a propriedade neutra do odor de café, já que este não foi condicionado para o grupo de animais.

O vasto repertório de comportamentos expressos em situações que possuem caráter exploratório e/ ou defensivo tem sido amplamente detalhado na literatura (BLANCHARD & BLANCHARD, 1971, 1988; BLANCHARD et al., 1974, 1975; CARERE et al., 1999), trazendo informações condizentes com a maneira com que o animal irá se portar em determinadas situações. De forma semelhante, alguns comportamentos podem ser agrupados, caracterizando um padrão comportamental para enfrentamento dos eventos estressantes (BENUS et al., 1987). Portanto, para o aprimoramento da análise e posterior caracterização das formas de enfrentamento adotadas pelos animais frente aos diferentes estímulos apresentados durante o condicionamento olfatório aversivo, uma gama de comportamentos foi mensurada, na tentativa de compreendê-la como um padrão característico de respostas expressas no modelo proposto (BLANCHARD & BLANCHARD, 1969, 1989; BLANCHARD et al., 1997, 1998; HUBBARD et al., 2004).

Os comportamentos defensivos e exploratórios expressos pelos animais durante as três sessões na caixa de odor foram os seguintes: comportamentos de levantar, auto-limpeza e agachar (todos expressos nos três compartimentos analisados), *head-out*, agachar-cheirar, *stretch-attend*, cheirar e contato (os dois últimos apenas observados próximos à fonte de odor). As medidas iniciais apresentadas foram referentes à duração e a frequência de cada comportamento. Fazendo uma análise mais apurada de tais valores, foi possível constatar que muitos variavam entre si. Comportamentos que se apresentavam mais prevalentes em

determinadas sessões para o parâmetro duração, induziam a interpretações opostas, quando o parâmetro frequência era observado. Também, a análise visual dos vídeos revelou detalhes importantes: alguns animais expressavam determinados comportamentos apenas uma vez, mas por um período de tempo extremamente prolongado; enquanto outros apresentavam o mesmo comportamento diversas vezes, por períodos de tempo mais curtos. Analisando o tempo final, a duração dos comportamentos seria praticamente a mesma, porém com uma frequência muito distinta. Para tanto, constatou-se que a melhor forma de representação dos dados seria através do parâmetro duração média (duração média = duração/ frequência), onde tanto os valores da duração quanto da frequência seriam importantes, revelando, talvez, medidas mais confiáveis.

Portanto, analisando apenas os valores referentes ao parâmetro duração média, foi possível verificar que os animais exploraram toda a caixa de odor de maneira livre durante o dia da familiarização, já que todos os parâmetros comportamentais apresentaram valores de porcentagem muito semelhantes, o que confirmou a importância da sessão para o conhecimento da caixa.

Comparando-se o dia da familiarização com as duas sessões de testes subsequentes, algumas variações na expressão de certos comportamentos puderam ser observadas. As modificações mais visíveis foram aquelas que dizem respeito ao aparecimento dos comportamentos agachar-cheirar e *stretch-attend*.

Estudos clássicos já demonstram a postura de agachar (*crouching*) expressa pelos animais como um possível índice de medo. Sendo esta diferente das posturas de imobilidade adquiridas, acredita-se também ser evocada por estímulos associados com eventos aversivos (BLANCHARD & BLANCHARD, 1969). A postura de agachar pode ser dividida em outras categorias, de acordo com o grau de curvatura observado no dorso do animal. O comportamento de agachar-cheirar se enquadra em uma dessas, caracterizando qualquer comportamento de agachar acompanhado com movimentos de cabeça investigativos (BLANCHARD et al., 1998). De forma semelhante, o comportamento *stretch-attend*, que representa a ambivalência entre a esquiva de um estímulo aversivo e a aproximação deste para fins investigativos, está relacionado com conceitos de ansiedade, medo e aversão (KAESERMANN, 1986; MOLEWIJK et al., 1995).

Ambos os comportamentos foram amplamente expressos pelos animais do grupo Pareado no dia da sessão de teste EC1, sendo que o mesmo não se observou para a outra condição experimental não

pareada. A relevância emocional condicionada ao odor pode ter sido a responsável por tal aparecimento, caracterizando comportamentos específicos apresentados quando o animal foi confrontado com o estímulo condicionado.

Os animais do grupo Não Pareado, como não foram submetidos ao processo de associação EC+EI, não expressaram qualquer comportamento relevante de defesa, quando o mesmo estímulo foi reapresentado na sessão de teste EC1.

Houve uma diferença significativa entre os dois grupos, quando os comportamentos destacados foram comparados; o grupo Não Pareado apresentou valores significativamente menores do que o grupo Pareado, enfatizando ainda mais a ausência de relevância nos comportamentos propostos como importantes para a expressão de respostas defensivas no modelo. Como o conceito de estratégia de enfrentamento sugere uma série de comportamentos desenvolvidos em resposta a um evento estressante (KOOLHAAS et al., 1999; COPPENS et al., 2010), este pode ser a primeiro indício de uma definição de estratégia distinta desenvolvida pelos animais, quando confrontados com o estímulo aversivo associado.

Ainda, os animais do grupo Não Pareado demonstraram a mesma prevalência nos três dias de teste para os comportamentos apresentados nos ambientes: intermediário e área próxima ao odor. O mesmo não aconteceu para o grupo Pareado, quando esses valores foram reduzidos, considerando-se, também, a queda do tempo de permanência dos animais desse grupo nos dois compartimentos abertos.

Também, o mesmo perfil comportamental expresso no dia de teste EC1 foi mantido, quando analisado o dia de teste EC2. Os comportamentos de agachar-cheirar e *stretch-attend*, passíveis de serem reconhecidos na sessão de teste EC1 para o grupo Pareado, mantiveram os valores elevados durante a sessão de teste EC2, mesmo sem a presença do estímulo olfatório condicionado. No protocolo experimental averiguado, essa sessão já foi amplamente descrita por sua capacidade em avaliar o medo associativo ao contexto, após a exposição ao odor condicionado neste ambiente (KROON, 2007; KROON & CAROBREZ, 2009; CAVALLI et al., 2009; SOUZA, 2011; PAVESI et al., 2011; KINCHESKI et al., 2012).

Após essas constatações iniciais, o agrupamento dos comportamentos defensivos e/ ou não defensivos foi efetuado, na tentativa de tornar as diferenças expressas pelos animais de ambos os grupos ainda mais visíveis, além de detalhar como se dá o desenrolar desses parâmetros durante os 10 min de sessão.

Os comportamentos que apresentaram maiores diferenças significantes, colocando-se de forma mais prevalente no grupo Pareado, quando comparado ao grupo Não Pareado foram: agachar no ambiente fechado e agachar-cheirar, além de *head-out* e *stretch-attend*. Como detalhado anteriormente, muitos estudos relacionam essas medidas como parâmetros comportamentais de expressão de medo, de defesa e ansiedade (BLANCHARD et al., 1998; MOLEWIJK et al., 1995; HUBBARD et al., 2004). Além desses, outra diferença significativa apareceu quando se analisou apenas os comportamentos contato e cheirar, ambos apresentados próximos a fonte de odor. Foi possível constatar que os animais do grupo Não Pareado já apresentaram uma expressão elevada de tais comportamentos no dia da familiarização, sendo que esse perfil foi mantido nos outros dias de teste. Foi possível notar, também, que os mesmos comportamentos não são tão visíveis no grupo Pareado, ainda se considerar que esses animais se aproximaram muito pouco da fonte de odor, quando o mesmo foi exposto. A única semelhança capaz de ser verificada entre os dois grupos diz respeito aos comportamentos de levantar e auto-limpeza que, apesar de variarem consideravelmente no decorrer das três sessões analisadas, apresentaram um perfil muito parecido.

Com estes dados coletados, também foi possível analisar qual foi o perfil comportamental dos animais apresentado nos primeiros e nos últimos cinco minutos de sessão. Tal informação se mostrou relevante para uma possível readaptação no período de tempo analisado. O padrão de comportamentos expresso pelos grupos Pareado e Não Pareado se mostrou muito semelhante daquele que já havia sido descrito, tanto nos cinco minutos iniciais, quanto nos cinco minutos finais da sessão. Os comportamentos relevantes para o grupo Pareado, durante a análise de toda a sessão, foram os mesmos relevantes (*C-Sniff C* e *SA I*) para a sessão dividida em dois blocos. Relacionando esse resultado com aqueles expressos para o tempo de permanência nos compartimentos (análise minuto a minuto), concluiu-se que a preferência dos animais do grupo Pareado pelo ambiente fechado nos dias de teste EC1 e EC2 foi bem clara nos primeiros minutos de análise, sendo mantida ao longo de toda a sessão. Dessa forma, pode-se entender que apenas a primeira metade do tempo de sessão já é suficiente para o desenvolvimento de estratégias comportamentais de enfrentamento. Como os animais do grupo Não Pareado não expressaram nenhum parâmetro comportamental defensivo na sessão analisada como um todo, também nenhuma diferença foi observada nos cinco minutos iniciais ou finais de análise.

Portanto, essa primeira etapa exploratória dos dados coletados (experimento 1) comprovou que as três sessões ocorridas na caixa de odor possuem características emocionais distintas. Relacionando os dados obtidos com as definições de enfrentamento comportamental discutidas, pode-se entender que as diferentes sessões apresentadas levaram a diferentes estratégias de enfrentamento desenvolvidas, principalmente devido ao aparecimento de comportamentos específicos expressos pelos animais que foram condicionados ao odor.

B) Teste Farmacológico

No trabalho pioneiro sobre a padronização do condicionamento olfatório aversivo neste laboratório (KROON, 2007), a etapa farmacológica executada foi imprescindível para a validação do modelo proposto. Ali, constatou-se que a administração do benzodiazepínico midazolam foi capaz de prejudicar a aquisição da memória de medo, bem como a sua consolidação, através da redução das respostas de defesa apresentadas frente ao odor condicionado. No presente trabalho, a nova análise foi efetuada sobre os grupos tratados com esse fármaco (experimento 2), na tentativa de verificar se o mesmo está envolvido em processos referentes à definição da estratégia de enfrentamento comportamental. Também, o objetivo do desenvolvimento desta segunda etapa foi constatar se o benzodiazepínico em questão seria capaz de inibir ou alterar as respostas defensivas caracterizadas e expressas frente ao estímulo condicionado.

Para isso, primeiramente efetuou-se a verificação dos perfis comportamentais apresentados pelos grupos salina (controle), administrado nos três momentos distintos, comparando-os com o grupo Pareado. A sessão de teste EC1 foi analisada, já que nela houve a observação da maior quantidade de comportamentos relevantes para a caracterização do perfil defensivo. Todos os grupos possuem uma grande similaridade entre os padrões de comportamento verificados, sendo que poucos parâmetros variaram em porcentagem. A manipulação dos animais e o desconforto causado pelas injeções para administração do fármaco e/ ou do controle podem ter sido suficientes para desencadear comportamentos distintos nos grupos observados, da mesma forma que a experiência prévia ao choque elétrico nas patas conferiu padrões diferenciados aos animais dos grupos Pareado e Não Pareado no experimento 1. Estudos acerca da estratégia de enfrentamento comportamental enfatizam a importância das experiências anteriores para o desenvolvimento da estratégia adequada (KOOLHAAS et al., 1999). Da mesma forma, o reconhecimento de

determinadas situações já enfrentadas e a memória a elas estabelecida auxiliam na resolução de eventos estressantes similares (ROTH et al., 2012).

Após isso, a administração de midazolam ocorreu em três momentos distintos e a caracterização comportamental dos animais foi efetuada.

No primeiro momento de administração (30 min antes da sessão de condicionamento), o grupo salina apresentou um perfil comportamental muito semelhante ao grupo Pareado, do experimento 1, como já detalhado anteriormente, apesar da interferência estressante da injeção sofrida por esses animais. Considerando-se, então, os grupos que receberam as doses de 0,375 e 0,5 mg/kg/ml de midazolam, algumas diferenças podem ser observadas. Nas sessões de teste EC1 e EC2, os comportamentos apresentados na área intermediária e na área próxima a fonte de odor não diminuíram em porcentagem em relação a sessão de familiarização, como aconteceu tanto no grupo controle quanto no grupo Pareado do experimento 1. Com relação à análise estatística efetuada, o único comportamento com perfil distinto para os três grupos observados foi o comportamento de auto-limpeza, expresso no ambiente intermediário. Apesar do perfil comportamental dos grupos Mdz 0.3 e Mdz 0.5 serem muito semelhantes visualmente ao padrão de comportamentos apresentado pelo grupo Não Pareado, os testes estatísticos aplicados não revelaram nenhuma outra diferença.

Já no segundo momento de administração, em um grupo independente (imediatamente após a sessão de condicionamento), o perfil apresentado pelos animais dos grupos Mdz 0.3 e Mdz 0.5 se mostrou diferente significativamente do grupo controle (salina). Os comportamentos que variaram de acordo com o grupo observado foram: levantar na área próxima a fonte de odor, auto-limpeza na zona intermediária e na área próxima a fonte de odor, agachar no ambiente fechado e na área próxima a fonte de odor, *stretch-attend*, cheirar e contato. Vale ressaltar que apenas o comportamento *stretch-attend* foi caracterizado anteriormente como um parâmetro importante para o comportamento defensivo, de acordo com os resultados observados no experimento 1. Também, os comportamentos no ambiente fechado não foram expressivos para as sessões de teste EC1 e EC2, nos animais do grupo Mdz 0.5, apesar desse resultado não apresentar efeito significativo.

No terceiro momento de administração do benzodiazepínico, 30 min antes da sessão de teste EC1, poucas diferenças foram encontradas entre o perfil comportamental dos grupos observados. Também, poucos

parâmetros variaram, quando se analisou cada comportamento de maneira isolada. As diferenças estatísticas apareceram para o comportamento de levantar na zona intermediária e na área próxima a fonte de odor, bem como para o comportamento de auto-limpeza no ambiente fechado. Da mesma maneira, nenhum comportamento dito como defensivo apresentou qualquer variação entre os grupos.

Como já descrito anteriormente, estudos mostram que os benzodiazepínicos atenuam as respostas defensivas tipicamente apresentadas nos modelos que avaliam o medo inato, por exemplo. Dessa forma, os benzodiazepínicos atuantes nos receptores GABAérgicos são bem conhecidos por suas propriedades ansiolíticas envolvidas (FILE & ARANKO, 1988; DIELENBERG et al., 1999). Outros estudos também confirmam a participação do benzodiazepínico em processos de memórias e em processos emocionais (CURRAN & BIRCH, 1991; SALONEN et al., 1992; POLSTER et al., 1993; TIMIC et al., 2013), através da constatação de que o midazolam é capaz de suprimir o medo condicionado através da ruptura na formação do traço de memória durante o condicionamento, ou através da alteração do caráter emocional que constitui o evento aversivo (PAIN et al., 2002). Portanto, a diminuição das respostas condicionadas após a administração de benzodiazepínicos é atribuída à sua ação ansiolítica, mas o seu caráter amnésico não pode ser esquecido ou descartado.

Considerando o grande repertório de comportamentos defensivos apresentados pelos roedores, Blanchard e colaboradores (1989) verificaram se os benzodiazepínicos seriam capazes de reduzir ou até modificar reações de defesa. Para isso, uma bateria de testes comportamentais foi utilizada, sendo que esta enfatiza os comportamentos de medo naturalmente apresentados pelos animais, utilizando uma série de estímulos não-dolorosos e baseados nas reações de ratos selvagens. Neste caso (BLANCHARD et al., 1989), foi possível verificar que os benzodiazepínicos não incluem uma inibição global de comportamentos defensivos nos animais, e sim alteram suas estratégias defensivas desenvolvidas. Estudos mais recentes começam a pesquisar um possível envolvimento entre as ações de benzodiazepínicos e as explicações defensivas sobre transtornos de ansiedade em humanos, trazendo conceitos mais atuais que envolvem personalidade, percepção geral da intensidade do fator aversivo, variação individual e efeitos observados de acordo com a situação estudada (PERKINS et al., 2013).

Outra interpretação passível de ser executada, nesse caso, diz respeito ao conceito de variabilidade individual. Estudos já confirmam que os animais confrontados com o mesmo evento poderão responder de

maneiras distintas (“personalidade” do animal), considerando suas experiências prévias e maneiras de lidar com a situação (BELL & STAMPS, 2004; SIH et al., 2004; DINGEMANSE et al., 2009; COPPENS et al., 2010). Assim, comprova-se a importância de que, em muitos casos, uma avaliação mais detalhada e particular para um determinado grupo de animais seja relevante.

Outro conceito válido é aquele que afirma que a qualidade das respostas comportamentais expressas é distinta da magnitude dessas respostas (KOOLHAAS et al., 2007). Essa definição suporta estudos que relacionam diferentes dimensões envolvidas para o entendimento da variabilidade individual e tipos de estratégias definidas. O modelo de dois eixos, que comporta respostas inseridas em um plano com duas dimensões, qualitativas e quantitativas, tem sido sugerido por vários autores (STEIMER et al., 1997; VAN REENEN et al., 2005; FONTAINE et al., 2007; KOOLHAAS et al., 2007, 2010; COOPENS et al., 2010). Nesse modelo, a dimensão qualitativa, representada pela estratégia adotada para enfrentamento, reflete como o animal irá responder frente aos novos desafios; já a dimensão quantitativa, que é representada pela reatividade emocional, mostra quão forte é tal resposta apresentada. Dessa forma, tem sido possível caracterizar diferentes indivíduos em grupos semelhantes, de acordo com perfil fenotípico, variação individual e qualidade da resposta. Ainda, através de tal modelo, é possível caracterizar determinados grupos genéticos de várias espécies, que apresentam diferentes níveis de variação entre esses dois eixos dimensionais.

A partir do momento em que as duas dimensões forem caracterizadas para o modelo de condicionamento olfatório aversivo, os animais analisados poderão ser agrupados nos quadrantes dos eixos, esclarecendo o porquê de determinados comportamentos expressos, de acordo com as valências emocionais sugeridas.

Também, os conceitos de pró-atividade e reatividade se tornam essenciais para um melhor entendimento dos perfis comportamentais, já que tais características distintas dos animais irão definir a forma de enfrentamento desenvolvida (WECHSLER, 1995; KOOLHAAS et al., 1999; KOOLHAAS et al., 2007). Uma maneira simples de verificar um possível perfil intrínseco apresentado pelo animal é aquela sugerida por Benus e colaboradores (1990), e já descrita neste trabalho. O comportamento expresso pelo animal após a alteração de uma tarefa simples, como a procura por um *pellet* de ração, pode sugerir a forma como esse animal enfrentará outras situações estressantes, caracterizando um perfil pró-ativo ou reativo (BENUS et al., 1990).

Dessa forma, os animais poderão passar por uma triagem inicial em um teste semelhante, uma semana antes de serem submetidos ao protocolo de condicionamento olfatório aversivo. O perfil característico sugerido na triagem poderá ser relacionado com o comportamento defensivo e/ ou não defensivo expresso nos dias de testes, esclarecendo possíveis diferenças ou semelhanças entre os grupos.

Concluindo, o presente trabalho analisou as diferentes sessões de teste ocorridas na caixa de odor durante o condicionamento olfatório aversivo. Conforme a verificação já detalhada de que as três sessões são bem diferentes entre si, com caráter e relevância emocionais distintos, é possível entender que os animais são capazes de desenvolver uma estratégia de enfrentamento ao novo ambiente, assim que entram em contato com o mesmo, no dia da familiarização. Vale ressaltar que essa sessão já é imprescindível para o desenvolvimento da melhor estratégia de enfrentamento, sendo que qualquer experiência emocional prévia é capaz de alterar os comportamentos apresentados pelos animais. Dessa forma, acredita-se que modificações no tempo da sessão de familiarização ou, até mesmo, a sua exclusão do protocolo experimental, serão suficientes para uma melhor verificação do quão importante é essa sessão para o desenvolvimento da estratégia. Nos outros dias de teste subsequentes, os animais deverão modificar a estratégia já adquirida, de acordo com o acréscimo de novos estímulos aversivos no decorrer do protocolo, se os mesmos apresentarem relevância emocional suficiente para isso. O aparecimento de comportamentos como agachar-cheirar, agachar no compartimento fechado, *head-out* e *stretch-attend* se mostrou característico na expressão das respostas defensivas, quando os animais foram expostos ao odor condicionado. Tal aparecimento leva a conclusão de que os comportamentos relatados devem ser mais bem explorados em análises posteriores, sendo importantes parâmetros para a mensuração do caráter defensivo expresso pelos animais. Também, é imprescindível a triagem para caracterização inicial do perfil dos animais que serão submetidos ao protocolo de condicionamento, para uma melhor constatação da forma como os mesmos poderão lidar com os novos estímulos do ambiente e melhor compreensão dos resultados obtidos. Nesse sentido, o conhecimento acerca da variabilidade individual será necessário para que as diferenças expressas por cada animal sejam favorecidas.

A análise acerca dos animais tratados com o benzodiazepínico midazolam também foi executada, mas os resultados apresentados não permitem uma conclusão total de como o fármaco estaria interferindo no desenvolvimento de novas estratégias. Como a análise deste trabalho foi

feita em cima de dados anteriormente coletados para outro estudo, não foi possível adequar o protocolo ou acrescentar novos grupos experimentais para solucionar todas as dúvidas que ficaram sem esclarecimento. De qualquer forma, acredita-se que as características ansiolíticas e mnemônicas do fármaco relacionado sejam interferentes para um desenvolvimento de estratégias de enfrentamento adequado. Estudos posteriores e novas formas de análise poderão solucionar essas dúvidas.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, evidenciou-se que o condicionamento olfatório aversivo é um modelo capaz de avaliar as estratégias comportamentais de enfrentamento em situações estressantes, bem como caracterizar comportamentos defensivos específicos. Também, o modelo se mostrou passível em detectar modificações no perfil comportamental, de acordo com a condição experimental e/ ou tratamento farmacológico utilizado.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATESON, P. Assessment of pain in animals. **Animal Behaviour**, v. 42; p. 827-839, 1991.
- BELL, A.M. Future directions in behavioural syndromes research. **Proceedings of the Royal Society**, v. 274, p. 755-761, 2007.
- BELL, A.M.; STAMPS, J.A. Development of behavioural differences between individuals and populations of sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. **Animal Behaviour**, v. 68, p. 1339-1348, 2004.
- BENUS, R.F.; KOOLHAAS, J.M.; VAN OORTMERSEN, G.A. Individual differences in behavioural reactions to a changing environment in mice and rats. **Behaviour**, v. 100, p. 105-122, 1987.
- BENUS, R.F.; DEN DAAS, S.; KOOLHAAS, J.M.; VAN OORTMERSEN, G.A. Routine formation and flexibility in social and non-social behaviour of aggressive and non-aggressive male mice. **Behaviour**, v. 112, p. 176-193, 1990.
- BENUS, R.F.; BOHUS, B.; KOOLHAAS, J.M.; VAN OORTMERSEN, G.A. Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies. **Experientia**, v. 47, n. 10, p. 1008-1019, 1991.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Crouching as an index of fear. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 67, n. 3, p. 370-375, 1969.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Defensive reactions in the albino rat. **Learning and Motivation**, v. 2, p. 351-362, 1971.
- BLANCHARD, R.J.; KELLEY, M.J.; BLANCHARD, D.C. Defensive reactions and exploratory behavior in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 87, n. 6, p. 1129-1133, 1974.
- BLANCHARD, R.J.; MAST, M.; BLANCHARD, D.C. Stimulus control of defensive reactions in the albino rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 88, n. 1, p. 81-88, 1975.

BLANCHARD, R.J.; FLANNELLY, K.J.; BLANCHARD, D.C. Defensive behaviors of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. **Journal of Comparative Psychology**, v. 100, n. 2, p. 101-107, 1986.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Reviews of Psychology**, v. 39, p. 43-68, 1988.

BLANCHARD, D.C.; HORI, K.; RODGERS, R.J.; HENDRIE, C.A.; BLANCHARD, R.J. Attenuation of defensive threat and attack in wild rats (*Rattus rattus*) by benzodiazepines. **Psychopharmacology**, v. 97, p. 392-401, 1989.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry** 13: S3-S4, 1989.

BLANCHARD, R.J.; YUDKO, E.B.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, D.C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 58, p. 155-165, 1993.

BLANCHARD, R.J.; GRIEBEL, G.; HENRIE, J.A.; BLANCHARD, D.C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs of effects on rat and mouse defense test batteries. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 783-789, 1997.

BLANCHARD, R.J.; NIKULINA, J.N.; SAKAI, R.R.; MCKITTRICK, C.; MCEWEN, B.; BLANCHARD, D.C. Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress. **Physiology and Behavior**, v. 63, n. 4, p. 561-569, 1998.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Bringing natural behaviors into the laboratory: a tribute to Paul MacLean. **Physiology and Behavior**, v. 79, p. 515-524, 2003.

BRENNAN, P.A.; KENDRICK, K.M. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. **Progress in Neurobiology**, v. 51, p. 457-481, 1997.

BRENNAN, P.A.; KENDRICK, K.M. Mammalian social odours: Attraction and individual recognition. **Philosophical Transactions of The Royal Society**, v. 361, p. 2061-2078, 2006.

BROADHURST, P.L.; BIGNAMI, G. Correlative effects of psychogenetic selection: A study of the Roman high and low avoidance strains of rats. **Behaviour Research and Therapy**, v. 2, p. 273-280, 1965.

CAHILL, L.; MCGAUGH, J.L.; WEINBERGER, N.M. The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. **Trends in Neuroscience**, v. 24, n. 10, p. 578-581, 2001.

CANNON, W.B. **Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage**. New York and London: D. Appleton and Company, 1922.

CARERE, C.; CASETTI, R.; DE ACETIS, L.; PERRETTA, G.; CIRULLI, F.; ALLEVA, E. Behavioural and nociceptive response in male and female spiny mice (*Acomys cahirinus*) upon exposure to snake odour. **Behavioural Processes**, v. 47, p. 1-10, 1999.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1193-1205, 2005.

CAVALLI, J.; BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P. Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 92, p. 512-518, 2009.

CHERUBINI, E.; CONTI, F. Generating diversity at GABAergic synapses. **Trends in Neuroscience**, v. 24, p. 155-162, 2001.

COPPENS, C.M.; DE BOER, S.F.; KOOLHAAS, J.M. Coping styles and behavioural flexibility: towards underlying mechanisms. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 365, p. 4021-4028, 2010.

CURRAN, H.V.; BIRCH, B. Differentiating the sedative, psychomotor and amnesic effects of benzodiazepines: a study with midazolam and the benzodiazepine antagonist, flumazenil. **Psychopharmacology**, v. 103, p. 519-523, 1991.

DARWIN, C.R. **The expression of emotions in man and animals**. John Murray, London, 1872.

DAVIS, M. Animal models of anxiety based on classical conditioning: the conditioned emotional response (CER) and the fear-potentiated startle effect. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 47, p. 147-165, 1990.

DE BOER, S.F.; SLANGEN, J.L.; VAN DER GUGTEN, J. Plasma catecholamine and corticosterone levels during active and passive shock-prod avoidance behavior in rats: Effects of chlordiazepoxide. **Physiology and Behavior**, v. 47, p. 1089-1098, 1990.

DE BOER, S.F.; KOOLHAAS, J.M. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 145-161, 2003.

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.; MCGREGOR, I.S. Defensive behavior in rats toward predatory odors: A review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 597-609, 2001.

DINGEMANSE, N.J.; KAZEM, A.J.N.; RÉALE, D.; WRIGHT, J. Behavioural reaction norms: animal personality meets individual plasticity. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 2, p. 81-89, 2009.

DO-MONTE, F.H.M. **Participação do receptor beta-adrenérgico na modulação do comportamento defensivo de ratos expostos ao odor de gato**. (Dissertação de mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.

ESCORIHUELA, R.M.; FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; GIL, L.; AGUILAR, R.; TOBEÑA, A.; DRISCOLL, P. Inbred Roman high- and low-avoidance rats: Differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors. **Physiology and Behavior**, v. 67, n. 1, p. 19-26, 1999.

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

FANSELOW, M.S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 110, n. 1-2, p. 73-81, 2000.

FILE, S.E.; ARANKO, K. Sodium valproate and chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test of anxiety in the rat. **Neuropsychobiology**, v. 20, p. 82-86, 1988.

FONTAINE, J.R.J.; SCHERER, K.R.; ROESCH, E.B.; ELLSWORTH, P.C. The world of emotions is not two-dimensional. **Psychological Science**, v. 18, n. 12, p. 1050-1057, 2007.

GARAKANI, A.; MATHEW, S.J.; CHARNEY, D.S. Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. **The Mount Sinai Journal of Medicine**, v. 73, n. 7, p. 941-949, 2006.

GIORGI, O.; LECCA, D.; PIRAS, G.; DRISCOLL, P.; CORDA, M.G. Dissociation between mesocortical dopamine release and fear-related behaviours in two psychogenetically selected lines of rats that differ in coping strategies to aversive conditions. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 2716-2716, 2003.

GOLDSTEIN, D.S. Adrenal responses to stress. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 30, p. 1433-1440, 2010.

HANSEN, S.W.; DAMGAARD, B.M. Behavioural and adrenocortical coping strategies and the effect on eosinophil leucocyte level and heterophil/ lymphocyte-ratio inn beech marten (*Martes foina*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 35, p. 369-388, 1993.

HARTLEY, C.A.; PHELPS, E.A. Changing fear: The neurocircuitry of emotion regulation. **Neuropsychopharmacology Reviews**, v. 35, p. 136-146, 2010.

HUBBARD, D.T.; BLANCHARD, D.C.; YANG, M.; MARKHAM, C.M.; GERVACIO, A.; CHUN-I, L.; BLANCHARD, R.J. Development of defensive behavior and conditioning to cat odor in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 80, p. 525-530, 2004.

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

KAESERMANN, H.P. Stretched attend posture, a non-social form of ambivalence, is sensitive to a conflict-reducing drug action. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 89, n. 1, p. 31-37, 1986.

KILPATRICK, L.; CAHILL, L. Modulation of memory consolidation for olfactory learning by reversible inactivation of the basolateral amygdala. **Behavioral Neuroscience**, v. 117, n. 1, p. 184-188, 2003.

KIM, J.J.; JUNG, M.W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, p. 188-202, 2006.

KINCHESKI, G.C.; MOTA-ORTIZ, S.R.; PAVESI, E.; CANTERAS, N.S.; CAROBREZ, A.P. The dorsolateral periaqueductal gray and its role in mediating fear learning to life threatening events. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, e50361, 2012.

KOOLHAAS, J.M.; KORTE, S.M.; DE BOER, S.F.; VAN DER VEGT, B.J.; VAN REENEN, C.G.; HOPSTER, H.; DE JONG, I.C.; RUIS, M.A.W.; BLOKHUIS, H.J. Coping style in animals: Current status in behavior and stress-physiology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 925-935, 1999.

KOOLHAAS, J.M.; DE BOER, S.F.; BUWALDA, B.; VAN REENEN, K. Individual variation in coping with stress: A multidimensional approach of ultimate and proximate mechanisms. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 70, p. 218-226, 2007.

KOOLHAAS, J.M.; DE BOER, S.F.; COPPENS, C.M.; BUWALDA, B. Neuroendocrinology of coping styles: Towards understanding the biology of individual variation. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 31, p. 307-321, 2010.

KORTE, S.M.; BOUWS, G.A.; KOOLHAAS, J.M.; BOHUS, B. Neuroendocrine and behavioral responses during conditioned active and passive behavior in the defensive burying/ probe avoidance paradigm: effects of ipsapirone. **Physiology and Behavior**, v. 52, n. 2, p. 355-361, 1992.

KROON, J.A.V. **Efeitos do midazolam, propranolol e escopolamina em ratos submetidos ao modelo de condicionamento olfatório de medo.** (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007.

KROON, J.A.V.; CAROBREZ, A.P. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: Effects of midazolam, propranolol or scopolamine. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 91, p. 32-40, 2009.
LAZARUS, R.; FOLKMAN, S. **Stress, Appraisal and Coping.** New York: Springer, 1984.

LEDOUX, J.E. Emotion circuits in the brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 23, p. 155-184, 2000.

LEDOUX, J.E. The emotional brain, fear, and the amygdala. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 23, n. 4/5, p. 727-738, 2003.

LEE, H.J.; BERGER, S.Y.; STIEDL, O. SPIESS, J.; KIM, J.J. Post-training injections of catecholaminergic drugs do not modulate fear conditioning in rats and mice. **Neuroscience Letters**, v. 303, p. 123-126, 2001.

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

METNA-LAURENT, M.; SORIA-GÓMEZ, E.; VERRIER, D.; CONFORZI, M.; JÉGO, P.; LAFENÊTRE, P.; MARSICANO, G. Bimodal control of fear-coping strategies by CB₁ cannabinoid receptors. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 21, p. 7109-7118, 2012.

MILLAN, M.J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress in Neurobiology**, v. 70, p. 83-244, 2003.

MOCHNY, C.R.; KINCHESKI, G.C.; MOLINA, V.A.; CAROBREZ, A.P. Dorsolateral periaqueductal gray stimulation prior to retrieval potentiates a contextual fear memory in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 237, p. 76-81, 2013.

MOLEWIJK, H.E.; VAN DER POEL, A.M.; OLIVIER, B. The ambivalent behavior “stretched approach posture” in the rat as a paradigm to characterize anxiolytic drugs. **Psychopharmacology**, v. 121, p. 81-90, 1995.

NECHVATAL, J.M.; LYONS, D.M. Coping changes the brain. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 3, 2013.

NEWTON, J.R.; ELLSWORTH, C.; MIYAKAWA, T.; TONEGAWA, S.; SUR, M. Acceleration of visually cued conditioned fear through the auditory pathway. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 968-973, 2004.

NOSEK, K.; DENNIS, K.; ANDRUS, B.M.; AHMADIYEH, N.; BAUM, A.E.; WOODS, L.C.S.; REDEI, E.E. Context and strain-dependent behavioral response to stress. **Behavioral and Brain Functions**, v. 4, n. 23, 2008.

OLIVEIRA, L.C.; BROIZ, A.C.; MACEDO, C.E.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M.L. 5-HT₂ receptor mechanisms of the dorsal periaqueductal gray in the conditioned and unconditioned fear in rats. **Psychopharmacology**, v. 191, p. 253-262, 2007.

OLKKOLA, K.T.; AHONEN, J. Midazolam and other benzodiazepines. **Handbook of Experimental Pharmacology** 182, p. 335-360, 2008.

OTTO, T.; COUSENS, G.; RAJEWSKI, K. Odor-guided fear conditioning in rats: acquisition, retention, and latent inhibition. **Behavioral Neuroscience**, v. 111, n. 6, p. 1257-1264, 1997.

- OTTO, T.; COUSENS, G.; HERZOG, C. Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. **Behavioral Brain Research**, v. 110, p. 119-128, 2000.
- OVERLI, O.; SORENSEN, C.; PULMAN, K.G.T; POTTINGER, T.G.; KORZAN, W.; SUMMERS, C.H.; NILSSON, G.E. Evolutionary background for stress-coping styles: Relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, p. 396-412, 2007.
- PAIN, L.; LAUNOY, A.; FOUQUET, N.; OBERLING, P. Mechanisms of action of midazolam on expression of contextual fear in rats. **British Journal of Anaesthesia**, v. 89, n. 4, p. 614-621, 2002.
- PAVESI, E.; CANTERAS, N.S.; CAROBREZ, A.P. Acquisition of Pavlovian fear conditioning using β -adrenoceptor activation of the dorsal preammyllary nucleus as an unconditioned stimulus to mimic live predator-threat exposure. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, p. 926-939, 2011.
- PAVLOV, I.P. **Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex**. Oxford University Press, London, 1927.
- PERKINS, A.M.; ETTINGER, U.; WEAVER, K.; SCHMECHTIG, A.; SCHRANTEE, A.; MORRISON, P.D.; SAPARA, A.; KUMARI, V.; WILLIAMS, S.C.R.; CORR, P.J. Advancing the defensive explanation for anxiety disorders: lorazepam effects on human defense are systematically modulated by personality and threat-type. **Translational Psychiatry**, v. 3, e246, 2013.
- PEZZE, M.A.; FELDON, J. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. **Progress in Neurobiology**, v. 74, p. 301-320, 2004.
- 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 and Cognition**, v. 22, p. 244-265, 1993.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 229, n. 2, p. 327-336, 1977.

RESSTEL, L.B.M.; JOCA, S.R.L.; MOREIRA, F.A.; CÔRREA, F.M.A.; GUIMARÃES, F.S. Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 172, p. 294-298, 2006.

RESTREPO, D.; ARELLANO, J.; OLIVA, A.M.; SCHAEFER, M.L.; LIN, W. Emerging views on the distinct but related roles on the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. **Hormones and Behavior**, v. 46, p. 247-256, 2004.

RICHMOND, M.A.; MURPHY, C.A.; POUZET, B.; SCMID, P.; RAWLINS, J.N.; FELDON, J. A computer controlled analysis of freezing behavior. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 86, p. 91-99, 1998.

ROOZENDAAL, B.; HUI, G.K.; HUI, I.R.; BERLAU, D.J.; MCGAUCH J.L.; WEINBERGER, N.M. Basolateral amygdala noradrenergic activity mediates corticosterone-induced enhancement of auditory fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 86, p. 249-255, 2006.

ROTH, M.K.; BINGHAM, B.; SHAH, A.; JOSHI, A.; FRAZER, A.; STRONG, R.; MORILAK, D.A. Effects of chronic plus acute prolonged stress on measures of coping style, anxiety, and evoked HPA-axis reactivity. **Neuropharmacology**, v. 63, p. 118-1126, 2012.

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.M.; 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, n. 2, p. 239-246, 2005.

SCHAFE, G.E.; BAUER, E.P.; ROSIS, S.; FARB, C.R.; RODRIGUES, S.M.; LEDOUX, J.E. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 201-211, 2005.

SEVELINGES, Y.; GERVAIS, R.; MESSAOUDI, B.; GRANJON, L.; MOULY, A. Olfactory fear conditioning induces field potential potentiation in rat olfactory cortex and amygdala. **Learning and Memory**, v. 11, p. 761-769, 2004.

SIH, A.; BELL, A.; JOHNSON, J.C. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 19, n. 7, p. 372-378, 2004.

SILL, O.C.; SMITH, D.M. A Comparison of the effects of temporary hippocampal lesions on single and dual context versions of the olfactory sequence memory tasks. **Behavioral Neuroscience**, v. 126, n. 4, p. 588-592, 2012.

SOUZA, R.R. **Dupla dissociação da função dos receptores NMDA da substância cinzenta periaquedutal rostral e caudal no medo inato e condicionado ao odor de gato.** (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007.

SOUZA, R.R. **Papel dos corticosteroides no processamento de memórias aversivas: consequências bidirecionais no condicionamento olfatório de medo.** (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011.

STEIMER, T.; IA FLEUR, S.; SCHULZ, P.E. Neuroendocrine correlates of emotional reactivity and coping in male rats from the Roman high (RHA/ Verh)- and low (RLA/ Verh)-avoidance lines. **Behavior Genetics**, v. 27, n. 6, p. 503-512, 1997.

TAZUMI, T.; OKAICHI, H. Effect of lesions in the lateral nucleus of the amygdala on fear conditioning using auditory and visual conditioned stimuli in rats. **Neuroscience Research**, v. 43, p. 163-170, 2002.

TIMIC, T.; JOKSIMOVIC, S.; MILIC, M.; DIVLJAKOVIC, J.; BATINIC, B.; SAVIC, M.M. Midazolam impairs acquisition and retrieval, but not consolidation of reference memory in the Morris water maze. **Behavioural Brain Research**, v. 241, p. 198-205, 2013.

TREIT, D.; PINEL, J.P.J.; FIBIGER, H.C. Conditioned defensive burying: A new paradigm for the study of anxiolytic agents. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 15, p. 619-626, 1981.

URSIN, H.; OLFF, M. Psychobiology of coping and defence strategies. **Neuropsychobiology**, v. 28, p. 66-71, 1993.

VAN OORTMERSSEN, G.A.; BAKKER, T.M.C. Artificial selection for high and low attack latencies in wild *Mus musculus domesticus*. **Behavior Genetics**, v. 11, p. 115-126, 1981.

VAN REENEN, C.G.; O'CONNELL, N.E.; VAN DER WERF, J.T.N.; KORTE, S.M.; HOPSTER, H.; JONES, R.B.; BLOKHUIS, H.J. Responses of calves to acute stress: Individual consistency and relations between behavioral and physiological measures. **Physiology and Behavior**, v. 85, p. 557-570, 2005.

VEENEMA, A.H.; MEIJER, O.C.; DE KLOET, E.R.; KOOLHAAS, J.M.; BOHUS, B.G. Differences in basal and stress-induced HPA regulation of wild house mice selected for high and low aggression. **Hormones and Behavior**, v. 43, n. 1, p. 197-204, 2003.

VEENEMA, A.H.; KOOLHAAS, J.M.; DE KLOET, E.R. Basal and stress-induced differences in HPA axis, 5-HT responsiveness and hippocampal cell proliferation in two mouse lines. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 255-265, 2004.

VEENEMA, A.H.; CREMERS, T.I.F.H.; JONGSMA, M.E.; STEENBERGEN, P.J.; DE BOER, S.F.; KOOLHAAS, J.M. Differences in the effects of 5-HT_{1A} receptor agonists on forced swimming behavior and brain 5-HT metabolism between low and high aggressive mice. **Psychopharmacology**, v. 178, p. 151-160, 2005.

WANG, Y.-J.; OKUTANI, F.; MURATA, Y.; TANIGUCHI, M.; NAMBA, T.; KABA, H. Histone acetylation in the olfactory bulb of young rats facilitates aversive olfactory learning and synaptic plasticity. **Neuroscience**, v. 232, p. 21-31, 2013.

WATSON, D.; HUBBARD, B. Adaptational style and dispositional structure: Coping in the context of the five-factor model. **Journal of Personality**, v. 64, n. 4, p. 737-774, 1996.

WECHSLER, B. Coping and coping strategies: A behavioural review. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 43, p. 123-134, 1995.

WEISS, J.M. Effects of coping responses on stress. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 65, p. 251-260, 1968.