

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR BETA-ADRENÉRGICO NA  
MODULAÇÃO DO COMPORTAMENTO DEFENSIVO DE RATOS  
EXPOSTOS AO ODOR DE GATO

FABRÍCIO HOFFMANN MARTINS DO MONTE

Florianópolis, SC

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR BETA-ADRENÉRGICO NA  
MODULAÇÃO DO COMPORTAMENTO DEFENSIVO DE RATOS  
EXPOSTOS AO ODOR DE GATO**

**FABRÍCIO H. M. DO MONTE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.  
Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Florianópolis, SC

2006

*"Uma longa viagem começa com um único passo".  
(Lao-Tsé)*

*...Dedico os frutos de todo o meu esforço aos meus pais e a minha querida irmã pelas palavras de carinho, incentivo e conforto e pelo apoio emocional e financeiro que me concederam durante estes anos de estudo...*

# AGRADECIMENTOS

---

Ao Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez, pela grande oportunidade cedida em seu laboratório, por sua orientação, sugestões e idéias e, principalmente, pela sua amizade neste início de minha caminhada científica;

A todos os professores do Departamento de Farmacologia que me concederam seus ensinamentos ou, ao menos, se esforçaram para tal durante estes anos;

Em especial, ao Prof. Dr. Jamil Assreuy e ao prestativo amigo doutorando Daniel Fernandes, pela ajuda na realização de parte dos meus experimentos;

Ao Prof. Dr. Newton Sabino Canteras e a Prof. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima Nogueira, pela gentileza de avaliarem e contribuírem para o aprimoramento desta dissertação;

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia Comportamental ou que por aqui passaram: Cladis, Cláudia, Cris, Grasi, Ju, Leandro, Lu, Nelson e Xima por todo o apoio nas tarefas e experimentos, pela amizade, pelas distrações e pela paciência durante as brincadeiras;

Aos demais colegas da pós-graduação e aos funcionários do departamento por não medirem esforços em me ajudar ou prestar favores;

Aos meus parentes, vizinhos e amigos, pelos elogios que me fortaleceram e pelas boas recepções quando eu retornava para casa;

A minha carinhosa namorada Cristiani L. Barão, pelo afeto e companheirismo e por dividir comigo as alegrias, angústias e incertezas deste desafio;

Aos amigos e professores Dr. J. Guilherme dos Santos Jr. e Dra. Vanusa M.N.B. Lanzioti, por terem me direcionado para a pesquisa e para a farmacologia e por, mesmo distantes, continuarem comigo em todos os momentos;

A clínica veterinária Cão de Ló pelo empréstimo do gato mascote "Pelé" que, incansável, forneceu o seu odor para realização dos meus experimentos;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

Enfim, a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

---

LISTA DE ABREVIACÕES-----	VII
LISTA DE FIGURAS-----	VIII
LISTA DE TABELAS-----	X
RESUMO-----	XI
ABSTRACT-----	XII
<b>1- INTRODUÇÃO-----</b>	<b>1</b>
1.1 Comportamento Defensivo-----	2
1.2 O odor do predador como fonte de aversão-----	3
1.3 Características do Sistema Olfatório-----	5
1.4 Odor de Gato X Comportamento Defensivo-----	7
1.4.1 Especificidade do odor de gato na expressão do comportamento defensivo-----	8
1.4.2 Habituação da resposta defensiva-----	10
1.4.3 Influências do odor de gato sobre outros modelos comportamentais-----	12
1.5 Sistema Noradrenérgico e Resposta Defensiva-----	13
1.5.1 Agentes bloqueadores beta adrenérgicos-----	15
1.5.2 Bloqueadores beta: Centrais x Periféricos-----	17
1.6 Substrato Neuroanatômico do comportamento defensivo-----	18
1.6.1 Papel do núcleo Pré-Mamilar dorsal do hipotálamo (PMd) no comportamento de defesa-----	22
<b>2- OBJETIVOS-----</b>	<b>26</b>
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS-----</b>	<b>28</b>
3.1 Animais-----	29
3.2 Drogas-----	29
3.3 Modelos Experimentais-----	30
3.3.1 Modelo do Odor de Gato-----	30
3.3.2 Labirinto em Cruz Elevado-----	32
3.3.3 Esquiva Inibitória-----	33
3.4 Monitoramento Cardíaco-----	34
3.5 Cirurgia Estereotáxica-----	35
3.6 Microinjeção Cerebral-----	36
3.7 Perfusão e Histologia-----	37

3.8	Análise Estatística-----	38
3.9	Procedimentos e Protocolos Experimentais-----	39
<b>4-</b>	<b>RESULTADOS-----</b>	<b>46</b>
4.1	Experimentos I-----	47
	A) Comparação da resposta defensiva frente ao odor de gato entre as linhagens Wistar e Hooded-----	47
	B) Padronização farmacológica do modelo do odor de gato com Midazolam e Medo Condicionado Contextual-----	48
4.2	Experimento II-----	52
	A) Interferências da exposição ao odor de gato sobre o comportamento defensivo no LCE-----	52
	B) Interferências da exposição ao odor de gato sobre a aprendizagem no modelo da esquiva inibitória-----	54
4.3	Experimento III	
	Avaliação do comportamento defensivo em ratos administrados com bloqueadores beta centrais ou periféricos expostos ao odor de gato-----	55
4.4	Experimento IV	
	Efeitos comportamentais da administração do bloqueador beta 1 Atenolol no PMd de ratos expostos ao odor de gato-----	59
<b>5-</b>	<b>DISCUSSÃO-----</b>	<b>68</b>
<b>6-</b>	<b>CONCLUSÕES-----</b>	<b>82</b>
<b>7-</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----</b>	<b>84</b>
<b>8-</b>	<b>APÊNDICE</b>	



# LISTA DE ABREVIACÕES

---

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

ANOVA - Análise de variância

AMPC - Adenosina monofosfato cíclico

ATP - Adenosina tri-fosfato

b.p.m - batimentos por minuto

BH- Barreira hematoencefálica

e.p.m. - erro padrão da média

FC - Frequência cardíaca

i.q. - intervalo interquartil

i.p.- intraperitoneal

LC- *Locus Coeruleus*

LCE- Labirinto em cruz elevado

MDZ - Midazolam

PA - Pressão arterial

PBS - Salina tamponada

PMd - núcleo Pré-Mamilar dorsal

P - Propranolol

N - Nadolol

NTS- Núcleo do Trato Solitário

mmHg - milímetros de mercúrio

SIC - Sistema de Inibição Comportamental

SAL - Salina

SCD - Sistema Cerebral de Defesa

SCP - Substância Cinzenta Periaquedutal

TMT - 2,5-dihidro-2,4,5-trimetiltiazolina

ZHM - Zona Hipotalâmica Medial

# LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 - Esquema representativo mostrando o modelo do odor de gato com um animal em posição de <i>head-out</i> -----	31
Figura 2 - Fotografia do Labirinto em Cruz Elevado-----	32
Figura 3. Fotografia do modelo da Esquiva Passiva-----	33
Figura 4. Avaliação comportamental dos grupos controle, salina e midazolam durante a exposição ao odor e ao contexto nos parâmetros tempo de aproximação, escondido em porcentagem-----	49
Figura 5. Atividade exploratória geral e comportamento de avaliação de risco nos grupos controle, salina e midazolam durante a exposição ao odor e ao contexto, respectivamente para os parâmetros número de aproximações, número de cruzamentos e <i>head-out</i> -----	50
Figura 6. Traçado minuto a minuto dos parâmetros tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de <i>head-out</i> , durante a exposição ao odor de gato, dos grupos controle, salina e midazolam-----	51
Figura 7. Porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos, número de tentativas e número de entradas nos braços fechados do LCE no grupo controle e nos grupos expostos ao LCE 48 h e 7 dias após o odor de gato-----	53
Figura 8. Latência para descida (s) durante a fase de treino e teste no grupo controle e nos grupos submetidos ao treino 48 h e 7 dias após a exposição ao odor de gato-----	54
Figura 9. Variação na frequência cardíaca em b.p.m. ocasionada pela administração de doses crescentes de dopamina antes (controle) ou após a injeção de propranolol ou nadolol -----	56
Figura 10. Registro fisiológico da frequência cardíaca em b.p.m. em ratos administrados com dopamina antes ou após a administração de propranolol ou nadolol -----	57
Figura 11. Variação na pressão arterial em milímetros de mercúrio (mmHg) ocasionada pela administração de propranolol ou nadolol -----	58
Figura 12. Avaliação do comportamento defensivo dos grupos Salina, propranolol e nadolol durante a exposição ao odor de gato e ao contexto nos parâmetros tempo de aproximação (%) e tempo escondido (%)-----	60

Figura 13. Avaliação da atividade exploratória geral e do comportamento de avaliação de risco dos grupos salina, propranolol e nadolol durante a exposição ao odor de gato e ao contexto, respectivamente para os parâmetros número de aproximações, número de cruzamentos e tempo de <i>head-out</i> -----	61
Figura 14. Traçado minuto a minuto dos parâmetros tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de <i>head-out</i> , durante a exposição ao odor de gato, nos grupos salina, propranolol e nadolol-----	62
Figura 15. Representação gráfica do corte transversal do cérebro de um rato, demonstrando os núcleos Pré-Mamilares dorsais (PMds) esquerdo e direito, com a localização dos sítios de injeção-----	63
Figura 16. Avaliação do comportamento defensivo dos grupos PBS, Atenolol 10 nmol, Atenolol 40 nmol e Atenolol fora durante a exposição ao odor de gato e ao contexto nos parâmetros tempo de aproximação (%) e Tempo escondido (%)-----	64
Figura 17. Atividade exploratória geral e comportamento de avaliação de risco dos grupos PBS, atenolol 10 nmol, atenolol 40 nmol e atenolol fora durante a exposição ao odor de gato e ao contexto, respectivamente para os parâmetros número de aproximações, número de cruzamentos e tempo de <i>head-out</i> -----	65
Figura 18. Traçado minuto a minuto dos parâmetros tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de <i>head-out</i> , durante a exposição ao odor de gato, nos grupos PBS, atenolol 10 nmol, atenolol 40 nmol e atenolol fora-----	66
Figura 19. Avaliação comportamental dos grupos controle, salina e midazolam durante a exposição ao odor e ao contexto nos parâmetros tempo de aproximação (s) e tempo escondido (s)-----	Apêndice
Figura 20. Traçado minuto a minuto dos parâmetros % de entradas e de tempo nos braços abertos e número de tentativas efetuadas no LCE no grupo controle e nos grupos expostos ao LCE 48 h e 7 dias após o odor de gato-----	Apêndice
Figura 21. Avaliação do comportamento defensivo dos grupos salina propranolol e nadolol durante a exposição ao odor de gato e ao contexto nos parâmetros tempo de aproximação (s) e tempo escondido (s)-----	Apêndice
Figura 22. Avaliação do comportamento defensivo dos grupos PBS, atenolol 10 nmol, atenolol 40 nmol e atenolol fora durante a exposição ao odor de gato e ao contexto nos parâmetros tempo de aproximação (s) e tempo escondido (s)-----	Apêndice

# LISTA DE TABELAS

---

- Tabela 1 - Esquema representativo das drogas e  
Momento de injeção dos diferentes grupos  
Experimentais formados no Experimento III-----Apêndice
- Tabela 2 - Comparação da resposta defensiva frente  
ao odor de gato entre as linhagens  
Wistar e Hooded-----47
- Tabela 3 - Comparação da resposta defensiva entre  
os grupos controle, salina e midazolam-----Apêndice
- Tabela 4 - Comparação da resposta defensiva entre os  
grupos salina, propranolol e nadolol durante  
a familiarização e a exposição ao odor-----Apêndice
- Tabela 5 - Comparação da resposta defensiva entre  
os grupos SS, SP, PP, PS, SN, NN e SN  
durante a exposição ao contexto-----Apêndice
- Tabela 6 - Comparação da resposta defensiva entre os  
grupos PBS, A10, A40 e Afo durante  
a familiarização e a exposição ao odor-----Apêndice
- Tabela 7 - Comparação da resposta defensiva entre  
os grupos PBS, A10, A40 e Afo durante  
o contexto-----Apêndice

## RESUMO

---

Estudos têm demonstrado que o odor do predador é um potente estímulo ansiogênico, fornecendo elementos para a avaliação do comportamento defensivo natural em roedores. Durante situações de estresse ou perigo potencial, a liberação de adrenalina ocasiona ativação de receptores beta-adrenérgicos nas vias ascendentes do vago para estruturas do SNC envolvidas na expressão e consolidação do medo e de suas respostas defensivas. O objetivo principal do presente estudo foi avaliar a participação do sistema beta-adrenérgico no comportamento defensivo de ratos expostos ao modelo do odor de gato. Para este propósito, realizamos inicialmente uma validação biológica e farmacológica do modelo dentro das condições experimentais de nosso laboratório. Em seguida, avaliamos o papel da neurotransmissão beta-adrenérgica central e periférica na resposta defensiva de ratos submetidos a este modelo. Nesta etapa, utilizamos em nossos estudos antagonistas beta-adrenérgicos como o propranolol, com ações farmacológicas centrais e periféricas, e o nadolol, com ações restritas à periferia. Por fim, avaliamos o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do núcleo PMd - uma estrutura hipotalâmica amplamente relacionada ao comportamento defensivo inato - sobre a resposta defensiva de ratos expostos ao odor de gato, através da microinjeção de atenolol, um bloqueador beta1 seletivo, diretamente nesta estrutura. Nossos resultados demonstraram que a injeção sistêmica de propranolol, bem como as microinjeções de atenolol no PMd, foram eficazes na redução da resposta defensiva. Estes achados sugerem uma participação do sistema beta-adrenérgico central, além de reforçar o papel chave do PMd no comportamento de defesa inato frente ao odor de gato.

# ABSTRACT

---

Substantial evidences have been showing that predator odor is a powerful anxiogenic stimulus, providing insights into natural defensive behavior evaluation in rodents. During situations of stress or potential danger, epinephrine release activates beta-adrenoreceptors on the ascending vagus, projecting to central nervous system structures, which are believed to be important in the expression and consolidation of the fear and its defensive responses. The main aim of this study was to verify the beta-adrenergic system participation, in the behavior response of rats toward cat odor model. For this purpose, firstly we have realized the biological and pharmacological validation of the cat odor model in accordance to the experimental conditions of our laboratory. Next, the role of central and peripheral beta-adrenergic neurotransmission in rats submitted to this model was evaluated. Whereas propranolol was used to block beta-adrenoceptor at central and peripheral sites of action, nadolol, did it predominantly at the peripheral system. Finally, we have checked the noradrenergic involvement of the PMd - a hypothalamic structure that takes part in the innate defensive behavior - in the defensive response of rats exposed to cat odor, using atenolol, a selective beta1-blocker, microinjected directly into this structure. Our results demonstrate that either propranolol systemic injection or atenolol microinjections into PMd, were able to reduce the defensive behavior of rats exposed to cat odor. These findings suggest a central beta-adrenergic system participation in the innate defensive behavior toward cat odor strengthening the key role of the PMd on this behavior.

## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1 Comportamento Defensivo

Muitas das respostas adaptativas do organismo como dor, febre, tosse e medo são defesas que permanecem latentes até que sejam despertadas por uma pista que indique a presença de uma ameaça (NESSE, 2005). Em muitas ocasiões estas respostas são evocadas sem que haja uma real necessidade. Falsos alarmes são produzidos quando o custo para expressar uma resposta de defesa é menor do que o perigo em potencial contra o qual ela está sendo expressa. Um claro exemplo disto é a ansiedade no homem e as respostas de defesa presentes nos animais frente a estímulos ameaçadores (NESSE, 2001).

A ansiedade é um dos clássicos tipos de emoções que, assim como o medo, provavelmente já foi experimentada por todos nós algumas vezes durante a vida. Porém, enquanto o medo é fruto de uma ameaça definida, na ansiedade a fonte de perigo é incerta ou desconhecida. No estado normal, a ansiedade é um estímulo vital que motiva a realização de funções e a vivência de novas situações. Quando se torna inapropriada ou patológica, interfere habitualmente no comportamento da espécie em questão (CHATTOPADHYAY *et al*, 1980).

Dentro de uma perspectiva evolucionária, a ansiedade e o medo têm suas raízes nas reações de defesa dos animais frente a estímulos que representam perigo ou ameaça à sobrevivência, ao bem-estar ou à integridade física das diferentes espécies (HETEM & GRAEFF, 1997).

O perigo ou a ameaça para os animais podem estar representados, por exemplo, por predadores ou estímulos associados a estes. Frente a estas situações, os animais procuram responder segundo quatro estratégias comportamentais básicas: fuga, imobilização, ataque defensivo e submissão (BLANCHARD *et al*, 1993).

As tentativas de se correlacionar o comportamento defensivo dos animais nos testes experimentais com os níveis de diferentes indicadores fisiológicos e neuroquímicos das reações de medo/ansiedade são cada vez mais frequentes (GRAEFF & GUIMARÃES, 2001).

## **1.2 O odor do predador como fonte de aversão**

A relação presa-predador entre roedores e gatos é conhecida há muitos anos e, devido a sua característica inata, tem possibilitado aos pesquisadores uma excelente oportunidade para compreender com clareza os aspectos



neurocomportamentais envolvidos nesta relação (DIELENBERG & MCGREGOR, 2001).

Na década de 80, foi realizada a primeira descrição detalhada da resposta comportamental de ratos frente ao odor de gato. Na oportunidade, os pesquisadores utilizaram um sistema de tocas que permitia a observação dos animais tanto em uma área aberta, como em um esconderijo. Os animais foram avaliados antes, durante ou após a apresentação de um gato ou de uma fonte de odor de gato - um bloco de madeira recoberto por um pano previamente friccionado contra a pele de um gato - como estímulo aversivo. Algumas diferenças foram distinguidas entre as respostas exibidas pelos animais diante de um gato vivo ou diante da fonte de odor. A apresentação do animal vivo produziu uma forte resposta defensiva, a qual foi verificada por um aumento no tempo de permanência no esconderijo, vocalização ultrassônica e congelamento (*freezing*). Já o odor de gato, ocasionou um aumento no tempo de permanência no esconderijo com o aparecimento de comportamentos de avaliação de risco, denominados *head-out* (ver figura 1), os quais permitem aos animais a obtenção de maiores informações acerca do ambiente e do estímulo (BLANCHARD & BLANCHARD, 1989, 1989a; BLANCHARD *et al*, 1989).

Nos últimos anos diversos estudos farmacológicos e comportamentais têm documentado a indução de estados de

ansiedade e comportamentos defensivos em roedores expostos ao odor do predador (ZANGROSSI & FILE,1992; KAVALIERS *et al*, 1994; MCGREGOR & DIELENBERG,1999; BLANCHARD *et al*, 2003,2003a; MCGREGOR *et al*, 2004; PERROT-SINAL *et al*, 2004). A resposta de ratos ao odor de gato é imediata, intensa e duradoura, ocorrendo apesar destes animais de laboratório nunca terem sido expostos a um gato.

### **1.3 Características do Sistema Olfatório**

Os animais podem reconhecer e discriminar sinais químicos no ambiente essenciais para sobrevivência e suficientes para causar influências profundas em seus comportamentos. Pistas químicas são necessárias não somente para encontrar alimentos ou presas, detectar predadores ou identificar parceiros sexuais, como também para a comunicação intraespecífica (CARLETON *et al*, 2002).

Para grande parte dos animais, o olfato, seu sentido mais desenvolvido, tem importância capital, ditando a maioria de seus reflexos comportamentais e determinando sua própria sobrevivência. Nos seres humanos, no entanto, como as principais reações são pautadas pelas imagens e pelos sons, o sistema olfatório parece não ocasionar a mesma dependência (KANDEL *et al*, 2000).

De fato, as áreas cerebrais destinadas ao processamento olfatório são extremamente maiores em roedores quando comparados ao homem, o que presumivelmente reflete a relevância do sistema olfatório nestas espécies (CARLETON *et al*, 2002)

A cavidade nasal de roedores apresenta dois diferentes epitélios quimiossensoriais que permitem a distinção de dois sistemas olfatórios: o sistema olfatório principal e o acessório (RESTREPO *et al*, 2004). Diferenças anatômicas entre estes dois sistemas refletem a natureza das informações que eles processam. Enquanto o sistema olfatório principal permite a discriminação entre uma enorme variedade de odores voláteis presentes no ambiente, o sistema olfatório acessório tem sido associado à detecção de odores não-voláteis, responsáveis pela comunicação intra ou interespecífica, denominados de feromônios ou alomônios respectivamente (BRENNAN & KEVERNE, 1997; BAXI *et al*, 2005).

Na grande maioria dos mamíferos, os feromônios/alomônios são detectados por quimiorreceptores localizados em uma estrutura tubular especializada que recebe o nome de órgão vômeronasal. Esta estrutura, localizada na porção anterior e ventral da cavidade nasal, faz parte do sistema olfatório acessório e, ao contrário do epitélio olfativo, depende de um

mecanismo de transporte (semelhante a uma bomba de muco) para a detecção do estímulo olfatório (TIRINDELLI *et al*, 1998).

#### **1.4 Odor de Gato X Comportamento Defensivo**

Uma série de estudos comportamentais têm demonstrado que estímulos olfatórios novos ou nocivos, bem como o odor de animais não predadores como os coelhos por exemplo, não ocasionam a mesma resposta comportamental observada em ratos expostos ao odor de gato (KAVALIERS *et al*, 1994; MCGREGOR *et al*, 2002).

Enquanto odores aversivos ocasionam apenas a esquivas em roedores, o odor de gato tem a propriedade de causar redução na atividade locomotora; aumento do comportamento de avaliação de risco; aumento do tempo de congelamento ou imobilidade (BLANCHARD & BLANCHARD, 1971, 1989; DIELENBERG & MCGREGOR, 2001) e aumento na secreção de hormônios do estresse (FILE *et al*, 1993). Quando reexpostos ao ambiente na ausência do odor de gato (contexto), vinte e quatro horas após uma breve exposição de 10 minutos ao odor de gato, os animais expressam um visível aumento na resposta defensiva com sinais evidentes de medo condicionado (DIELENBERG *et al*, 1999; HUBBARD *et al*, 2004).

Estudos cardiovasculares com radiotelemetria revelaram um aumento da pressão arterial imediatamente após a exposição de ratos ao odor de gato. Este aumento manteve-se presente também quando os animais foram reexpostos ao contexto, confirmando, desta forma, evidências comportamentais prévias que caracterizam a formação de uma memória aversiva (DIELENBERG *et al*, 2001). Ainda, outros comportamentos não defensivos como o consumo de água e alimentos, bem como a atividade exploratória e sexual, mantêm-se reduzidos por um longo período após a exposição ao odor de gato (BLANCHARD & BLANCHARD, 1989a; DIELENBERG *et al*, 1999).

#### **1.4.1 Especificidade do odor de gato na expressão do comportamento defensivo**

Uma série de estudos utilizando desde coleiras (DIELENBERG & MCGREGOR, 2001) ou panos impregnados com o odor de gato (ZANGROSSI & FILE, 1992a; TAKAHASHI *et al*, 2005) até urina ou fezes destes animais (DICKMAN, 1992; BERDOY *et al*, 2000) têm sido realizados em diversos centros de pesquisa em todo o mundo. Odores sintéticos, derivados de fezes ou glândulas anais de predadores como doninhas ou raposas, também despertaram interesse nesta última década (PERROT-SINAL *et al*, 1999; FUNK & AMIR, 2000; WALLACE & ROSEN, 2000).

Desta forma, os pesquisadores têm se questionado se todos os tipos de odores de predadores evocam um padrão comum de resposta defensiva.

Em especial, o TMT (2,5 dihidro- 2,4,5-trimetiltiazolina)- um odor sintético, semelhante aquele extraído das fezes de raposas vermelhas - tem sido utilizado em uma série de estudos comportamentais, revelando-se eficaz na modificação da resposta defensiva de roedores (ENDRES *et al*, 2005; FENDT *et al*, 2005). Entretanto, alguns estudos demonstram que a resposta comportamental de roedores diante de um odor sintético, como o TMT, é menos clara e robusta do que aquela verificada quando os animais são expostos ao odor de gato.

Em um estudo comparativo com diferentes odores, MCGREGOR e colaboradores (2002) constataram que o aparecimento de medo condicionado contextual ocorre exclusivamente em animais expostos ao odor de gato, estando, portanto, ausente em animais submetidos a odores sintéticos ou aversivos (BLANCHARD *et al*, 2001; MCGREGOR *et al*, 2002). De forma semelhante, uma redução na atividade locomotora e um aumento na avaliação de risco foram visualizados apenas em animais expostos ao odor de gato, quando comparados ao grupo de animais expostos ao TMT (MCGREGOR *et al*, 2002; BLANCHARD *et al*, 2003a).

Em contrapartida, estudos recentes verificaram um aumento da avaliação de risco (HEBB *et al*, 2004), da liberação de hormônios do estresse (DAY *et al*, 2004) e do comportamento de congelamento (WALLACE & ROSEN, 2000) em roedores confrontados com TMT. Por esta razão, alguns pesquisadores têm proposto que as mudanças comportamentais e autonômicas visualizadas em roedores expostos ao TMT são comuns aquelas verificadas no medo, indicando desta forma que, de maneira similar ao odor de gato, o TMT funcionaria como um estímulo natural capaz de induzir o aparecimento de medo inato nestas espécies (FENDT *et al*, 2005; LASKA *et al*, 2005).

#### **1.4.2 Habituação da resposta defensiva**

Classicamente a habituação é definida como o desaparecimento de reação a determinado estímulo devido à exposição repetitiva ao mesmo (KANDELL *et al*, 2000).

No contexto da predação, uma presa pode inicialmente responder de maneira defensiva a uma série de estímulos desconhecidos ou potencialmente perigosos a primeira instância, adaptando-se com o passar do tempo a sua seleção de respostas comportamentais (SLATER, 1984).

Alguns estudos foram realizados nos últimos anos a fim de determinar se a resposta defensiva de ratos ao odor de gato permanecia presente após sucessivas exposições. Os achados mostraram que, apesar da redução nos níveis de corticosterona sanguínea no decorrer dos dias (FILE *et al*, 1993), o comportamento defensivo dos animais permanecia inalterado após repetidas apresentações ao odor (ZANGROSSI & FILE, 1992a). De forma contraditória, DIELENBERG & MCGREGOR (1999) observaram uma clara atenuação da resposta defensiva ao longo dos dias em que os animais foram reexpostos ao odor de gato (DIELENBERG & MCGREGOR, 1999).

Em um elegante estudo, TAKAHASHI *et al* (2005) enfatizaram a existência de uma importante relação entre a quantidade de odor presente em cada experimento e as respostas defensivas emitidas pelos animais. Neste estudo, diferentes tamanhos de tecidos, previamente impregnados com o odor de gato, foram apresentados ao longo de sete dias. Respostas defensivas mais robustas foram visualizadas nos ratos expostos a porções maiores de tecido (TAKAHASHI *et al*, 2005). De fato, o ritmo do fenômeno de habituação parece estar diretamente relacionado a intensidade do estímulo apresentado (THOMPSON & SPENCER, 1966). Assim sendo, estes achados têm implicações para conciliar as divergências observadas na literatura nos últimos anos, tanto no que se



refere aos estudos de habituação ao odor do predador e as diferenças comportamentais entre diferentes linhagens, quanto em relação à eficácia dos benzodiazepínicos em reduzir as respostas defensivas de ratos frente ao odor de gato (ZANGROSSI & FILE, 1992; HOOG & FILE, 1994; DIELENBERG *et al*, 1999; DIELENBERG & MCGREGOR, 2001).

#### **1.4.3 Influências do Odor de Gato sobre outros modelos comportamentais**

Pesquisas com animais de laboratório têm evidenciado mudanças comportamentais duradouras após a exposição a um agente estressor (ADAMEC & SHALLOW, 1993; ADAMEC *et al*, 2005). A exposição de ratos ao predador, por exemplo, ocasiona uma exarcebação do comportamento defensivo por muitas horas após a retirada da ameaça (BLANCHARD & BLANCHARD, 1989). Esta alteração comportamental estende-se além do ambiente e contexto inicial, refletindo de maneira significativa em outros modelos animais. Efeitos ansiogênicos são verificados em ratos no labirinto em cruz elevado (LCE), um modelo animal de ansiedade, por até três semanas após uma simples exposição de 5 minutos ao gato (ADAMEC & SHALLOW, 1993). Ainda, os níveis de corticosteróide e a resposta de

sobressalto permanecem alterados durante algumas semanas após o confronto com o predador (ADAMEC,1997).

Alterações comportamentais consistentes também são visualizadas em ratos após a exposição ao odor de gato. Consequências desta exposição foram detectadas em dois modelos animais de ansiedade: o LCE e a interação social (ZANGROSSI & FILE, 1992,1992a; HOOG & FILE, 1994; DIELENBERG & MCGREGOR, 2001).

Estas influências comportamentais em outros modelos animais são indicativos seguros de uma modificação da resposta defensiva após a exposição ao agente estressor. Além de confirmar a eficácia do estímulo aversivo, a exposição subsequente a outros modelos animais tem possibilitado ainda uma abordagem mnemônica dos mecanismos farmacológicos e biológicos envolvidos no comportamento de defesa.

### **1.5 Sistema Noradrenérgico e Resposta Defensiva**

O sistema noradrenérgico tem sido implicado em uma série de mudanças comportamentais relacionadas ao estresse. Dentre estas, a ativação do sistema noradrenérgico central e periférico seria a responsável pelas alterações neurovegetativas características durante a resposta defensiva

(midríase, taquicardia, tremores e sudorese) (GRAEFF & GUIMARÃES, 2001).

Frente a situações de estresse ou perigo potencial, o organismo reage liberando o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior. O ACTH estimula a síntese e liberação de cortisol pelo córtex da adrenal, enquanto a medula da adrenal libera adrenalina e noradrenalina armazenadas nas células cromafins (GUYTON & HALL, 1996; HERMAN & CULLINAN, 1997; NINAN, 1999). A liberação de catecolaminas ativa beta-adrenoceptores nas projeções ascendentes do nervo vago para o núcleo do trato solitário (NTS), uma estrutura cerebral com alta população de neurônios noradrenérgicos (KALIA & SULLIVAN, 1982), o qual envia projeções diretas para a amígdala e indiretas para o *locus coeruleus* (LC).

O LC, localizado no assoalho do quarto ventrículo, na transição entre o bulbo e a ponte, é o mais importante centro noradrenérgico do sistema nervoso central (SNC). Este pequeno aglomerado de neurônios noradrenérgicos emite vastas projeções axonais, cujas terminações nervosas, atingem desde o bulbo olfatório até a medula espinhal, incluindo a substância cinzenta periaquedutal, os colículos superior e inferior, o tálamo, o hipotálamo, a região septal, a amígdala e a formação hipocampal (ver para uma revisão, MAEDA, 2000).

Estudos pré-clínicos demonstram que aumentos na liberação de noradrenalina no LC, hipotálamo e amígdala estão associados com respostas de ansiedade/medo e estresse (TANAKA *et al*, 2000). Estas estruturas parecem ser importantes na mediação do medo e de suas respostas (GORMAN & DUNN, 1993; SULLIVAN, 1999; McGAUGH, 2004).

REDMOND e colaboradores (1976) foram os primeiros a sugerir um papel do sistema noradrenérgico no comportamento defensivo, baseados no fato de que a estimulação elétrica do LC em primatas ocasionava respostas comportamentais semelhantes às aquelas visualizadas quando estes animais eram expostos a um estímulo ameaçador (REDMOND *et al*, 1976). Evidências farmacológicas posteriores fortaleceram a relação entre LC e resposta defensiva (REDMOND & HUANG, 1979).

#### **1.5.1 Agentes bloqueadores beta adrenérgicos**

Técnicas de biologia molecular indicam a existência de pelo menos cinco importantes tipos de receptores adrenérgicos ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ ) classificados em diversos subtipos farmacologicamente ativos (RANG *et al*, 2004).

Os receptores beta-adrenérgicos, em especial, estão amplamente distribuídos no coração, no músculo liso dos vasos

e órgãos, em células sanguíneas, no tecido adiposo, no músculo esquelético e no sistema nervoso central.

A estimulação destes receptores leva à ativação de uma enzima ligada à membrana, adenilciclase, que catalisa a conversão de ATP (adenosina tri-fosfato) em AMPc (adenosina monofosfato cíclico). A ativação da enzima adenilciclase é mediada por uma proteína G estimulatória. Uma vez formado, o AMPc ativa proteínas-quinases dependentes de AMPc, as quais ocasionam fosforilações sucessivas possibilitando a amplificação dos sinais e a geração da resposta farmacológica (SPINOSA *et al*, 1999). WALLUKAT (2002) traz uma revisão com maiores detalhes.

Em modelos animais de ansiedade, o bloqueador beta propranolol foi capaz de promover efeitos ansiolíticos em camundongos (GORMAN & DUNN, 1993) e ratos expostos ao labirinto em cruz elevado (AUDI *et al*, 1991) e ao teste do campo aberto (ANGRINI *et al*, 1998).

Em adição, evidências substanciais de experimentos realizados em humanos e animais indicam que os receptores beta-adrenérgicos estão amplamente envolvidos em memórias associadas a eventos emocionais (CAHILL *et al*, 1994; CAHILL & McGAUGH, 1996; VAN STEGEREN *et al*, 1998). Este papel do sistema noradrenérgico emergiu décadas atrás, sugerindo que a liberação de noradrenalina poderia reforçar seletivamente os

circuitos neurais ativados durante estados afetivos (FERRY *et al*, 1999).

### **1.5.2 Bloqueadores beta: Centrais X Periféricos**

Os bloqueadores beta podem ser diferenciados em dois grupos: os centrais, que ultrapassam prontamente a barreira hematoencefálica (BH) atingindo o SNC; e os periféricos, que não cruzam a BH e limitam-se, portanto, à periferia. Embora muitos bloqueadores beta penetrem o SNC, acredita-se que grande parte da eficácia destes compostos em transtornos de ansiedade seja decorrente da atenuação das manifestações simpáticas resultantes do bloqueio de receptores beta-adrenérgicos periféricos (GRAY, 1982; AOUIZERATE *et al*, 2004). No entanto, um papel fundamental é atribuído aos beta-adrenoceptores localizados no SNC, em especial na terapia de transtornos que envolvam a recorrência de memórias aversivas (e.g. Transtorno de Estresse Pós-Traumático; KENT *et al*, 2002; VAIVA *et al*, 2003).

Sabe-se que a administração sistêmica de adrenalina aumenta a retenção em diferentes testes de memória aversiva em humanos e animais (GOLD & VAN BUSKIRK, 1975; STERNBERG *et al*, 1986; INTROINI COLLISON & McGAUGH, 1986; CAHILL & ALKIREB, 2003). Enquanto este aumento induzido pela

adrenalina é bloqueado tanto pela injeção de bloqueadores beta centrais, quanto pela administração de bloqueadores beta periféricos (STERNBERG *et al*, 1986); o aumento da consolidação produzido por alguns agonistas beta-adrenérgicos que, diferente da adrenalina, ultrapassam a BH, é bloqueado apenas por bloqueadores beta centrais (INTROINI-COLLISON *et al*, 1992). Estas evidências experimentais reforçam a importância dos beta-adrenoceptores centrais nos mecanismos mnemônicos envolvidos em determinados transtornos de ansiedade.

#### **1.6 Substrato Neuroanatômico do Comportamento Defensivo**

Através de observações em modelos experimentais, BLANCHARD & BLANCHARD (1969) têm proposto que as respostas de defesa emitidas por animais frente a um perigo em potencial, bem como as estruturas neuroanatômicas envolvidas, estão diretamente relacionadas à distância ou à intensidade do estímulo aversivo. Assim sendo, a distância que uma presa encontra-se do predador, por exemplo, pode determinar o padrão de respostas defensivas do animal, bem como os substratos neuroanatômicos envolvidos nesta situação (BLANCHARD & BLANCHARD, 1969).

Com isto, observa-se que estímulos ameaçadores potenciais ou distantes induzem um aumento das respostas de alerta, vigilância e congelamento. À medida em que o predador aproxima-se, ou aumenta a intensidade dos sinais que indicam sua presença, o comportamento de defesa altera-se para um padrão de respostas caracterizado por um congelamento intenso, seguido por um comportamento de fuga ou luta (BLANCHARD *et al*, 2003b; RIBEIRO-BARBOSA *et al*, 2005).

Evidências experimentais em roedores têm mostrado que dois sistemas neurais são teoricamente responsáveis por estes comportamentos de defesa: o sistema de inibição comportamental (SIC) e o sistema cerebral de defesa (SCD), acionados em situações de conflito ou de perigo iminente, respectivamente (HETEM & GRAEFF, 1997; BRANDÃO *et al*, 2003).

O SIC, inicialmente descrito por GRAY (1982), tem como substrato neural a formação septo-hipocampal acrescida do circuito de Papez (corpo mamilar do hipotálamo, tálamo anteroventral e córtex do giro do cíngulo), do córtex pré-frontal e das vias noradrenérgicas, dopaminérgicas e serotoninérgicas ascendentes que inervam estas estruturas. Este sistema parece estar envolvido em situações de perigo potencial em que o animal exhibe um comportamento exploratório cauteloso denominado avaliação de risco (GRAY, 1982).



Quando os sinais de perigo tornam-se mais explícitos, mas ainda estão além de uma distância crítica, a reação típica adotada pelos animais é a de congelamento. Embora o substrato neural deste comportamento não esteja bem esclarecido, alguns estudos, obtidos com lesão e estimulação elétrica ou química, sugerem que o sistema septo-hipocampal, a amígdala, o núcleo mediano da rafe e a Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP) estejam envolvidos (GRAEFF, 1994).

Um nível de defesa mais primitivo ocorre quando o estímulo ameaçador está muito próximo ou mesmo quando há contato direto com o predador. Neste caso, o sistema neural responsável pelos comportamentos de fuga ou agressão defensiva exibidos pelos animais, é o SCD. Este sistema, que envolve a amígdala, o hipotálamo medial e a SCP, foi descrito inicialmente à partir de observações de animais de laboratório que exibiam comportamentos defensivos (ameaça, luta ou fuga), associados a mudanças neurovegetativas semelhantes aquelas que ocorrem em situações ameaçadoras, após a estimulação elétrica destas estruturas (HETEM & GRAEFF, 1997).

Estudos recentes realizados por McNAUGHTON & CORR (2004), tendo como princípio a teoria proposta por GRAY (1982), têm sugerido uma simples arquitetura para o sistema neural que controla o comportamento defensivo. Esta

arquitetura baseia-se em duas dimensões comportamentais. A primeira delas, definida como Distância Defensiva, está de acordo com a teoria comportamental descrita por BLANCHARD & BLANCHARD (1969) em que a resposta defensiva apresenta-se intimamente relacionada com a distância ou a intensidade do evento aversivo. A segunda, denominada Direção Defensiva, permite, diante de uma situação de conflito, uma distinção funcional, comportamental e farmacológica entre medo e ansiedade. Nesta dimensão, enquanto o medo teria como função afastar ou movimentar o animal para um local distante do perigo, envolvendo comportamentos de fuga, luta ou congelamento, e apresentando-se insensitivo ao efeito de drogas ansiolíticas; a ansiedade, por sua vez, estaria locomovendo o animal em direção ao evento, através de comportamentos de avaliação de risco, e com respostas sensitivas a ação dos ansiolíticos (McNAUGHTON & CORR, 2004).

Diante destas explanações, as respostas de defesa emitidas durante o medo e a ansiedade são definidas, respectivamente, como Esquiva Defensiva e Aproximação Defensiva, envolvendo substratos neuroanatômicos distintos, no sentido rostro-caudal (córtex pré-frontal para a SCP), de acordo com a redução da Distância Defensiva (McNAUGHTON & CORR, 2004).

### **1.6.1 Papel do Núcleo Pré-Mamilar dorsal do Hipotálamo (PMd) no comportamento de defesa**

O hipotálamo, uma estrutura anatômica localizada no diencéfalo, apresenta três importantes funções: controle do Sistema Nervoso Autônomo, regulação do Sistema Endócrino e integração e expressão do comportamento emocional (GUYTON & HALL, 1996). Associado a esta última função, o hipotálamo têm sido proposto como uma estrutura especialmente importante na expressão de respostas defensivas, desde os trabalhos pioneiros de HESS & BRUGGER (1943) com estimulação elétrica até os achados mais recentes envolvendo estudos imunohistoquímicos e de lesão (HESS & BRUGGER, 1943; CANTERAS *et al*, 1997; CANTERAS, 2002; BLANCHARD *et al*, 2005).

Aumentos significativos na expressão de proteína c-Fos, uma proteína marcadora de atividade neural, são visualizados em uma região específica do hipotálamo denominada zona hipotalâmica medial (ZHM), tanto após o confronto direto de ratos com o gato, quanto após a simples exposição ao odor deste predador (CANTERAS *et al*, 1997; DIELENBERG *et al*, 2001a; CANTERAS, 2002). De fato, os substratos neuroanatômicos envolvidos durante a exposição ao predador ou ao odor parecem ser basicamente os mesmos (BLANCHARD *et al*, 2005).

A ZHM faz parte de um circuito anatômico e funcional que integra o núcleo hipotalâmico anterior, a porção dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo e o núcleo pré-mamilar dorsal (PMd), dando origem a um sistema de defesa intimamente relacionado com a resposta defensiva inata denominado Sistema Defensivo Hipotalâmico Medial. Este sistema, além de estar interconectado, apresenta conexões com diversas estruturas cerebrais envolvidas com comportamento de defesa, dentre elas a amígdala, o núcleo do leito da estria terminal, o córtex pré-frontal, o hipocampo, o septo e a SCP (para maiores detalhes ver CANTERAS, 2002).

Dentre as estruturas que compõem o Sistema Defensivo Hipotalâmico Medial, o PMd emerge como o mais importante núcleo, demonstrando ter um papel fundamental no comportamento de defesa. Estudos utilizando lesão química ou elétrica do PMd como ferramenta, revelam uma marcante atenuação na expressão da resposta defensiva frente ao odor de gato, sem interferências no entanto sobre outros modelos aversivos (e.g. LCE e Choque) (BLANCHARD et al, 2003c; MARKHAM et al 2004; BLANCHARD et al 2005).

Concordando com estes achados, outros estudos têm demonstrado que tanto a estimulação elétrica (YARDLEY & HILTON, 1986) como a microinjeção de bicuculina, um antagonista GABAérgico (DI SCALA et al, 1989), no PMd induzem

um padrão de resposta autonômica e motora semelhante aquela visualizada quando os animais são confrontados com uma ameaça natural.

Ainda no que se refere ao comportamento defensivo frente a situações aversivas, o PMd recebe projeções do órgão vomeronasal através de uma via que envolve o núcleo medial da amígdala, o núcleo interfascicular do leito da estria terminal e a porção dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo. Estas estruturas parecem estar associadas com odores relacionados a pistas de perigo, como o odor de predadores por exemplo (LI, 1990; MARKHAM *et al*, 2004).

Sabe-se do envolvimento do PMd na resposta defensiva frente a estímulos olfatórios aversivos. Também é conhecida a influente participação do sistema noradrenérgico no comportamento de defesa, em especial no que diz respeito a utilização de agentes beta-bloqueadores na terapia de transtornos de ansiedade. No entanto, apesar de amplamente difundidos e utilizados, pouco é sabido acerca dos mecanismos farmacológicos dos beta-bloqueadores na remissão dos sintomas presentes nestes transtornos. Enquanto alguns autores acreditam que estes efeitos devem-se ao bloqueio de receptores beta-adrenérgicos periféricos, impedindo desta forma a manifestação dos sintomas autonômicos presentes durante a resposta defensiva, outros estudiosos sugerem que a

eficácia terapêutica está diretamente relacionada a receptores beta-adrenérgicos centrais, envolvendo, portanto, a participação de estruturas do sistema nervoso central.

Por esta razão, afim de avaliar o mecanismo farmacológico do sistema beta-adrenérgico em situações que evoquem o aparecimento de respostas defensivas, utilizamos em nossos estudos dois beta-bloqueadores, um com ações centrais e periféricas e o outro com ações restritas a periferia, em ratos expostos ao modelo do odor de gato. Um terceiro beta-bloqueador, com ação beta1-bloqueadora seletiva, foi utilizado em ratos microimplantados com cânulas no PMd, com o intuito de avaliar a participação do sistema beta1-adrenérgico do PMd na resposta defensiva frente ao odor de gato. Para estes propósitos, o modelo do odor de gato foi inicialmente adaptado e validado biológica e farmacologicamente às condições experimentais de nosso laboratório, possibilitando desta forma uma interpretação segura dos resultados.

## 2. OBJETIVOS

---

Tendo em vista os fatos relatados na Introdução, o objetivo do presente estudo foi avaliar o envolvimento dos receptores beta-adrenérgicos centrais e periféricos, bem como a possível participação da neurotransmissão beta1-adrenérgica do PMd, na resposta defensiva de ratos frente ao odor de gato. Para tal, as seguintes etapas foram delineadas:

- 1) Validar e padronizar o modelo do odor de gato dentro das condições experimentais de nosso laboratório, permitindo desta forma a utilização de um modelo com valores preditivos confiáveis;
- 2) Avaliar as possíveis interferências da exposição ao odor de gato nos modelos do LCE e da Esquiva Passiva, obtendo maiores informações comportamentais durante o período que sucede a apresentação do estímulo aversivo;
- 3) Verificar as possíveis variações na resposta defensiva de ratos, ocasionadas pelo bloqueio de receptores beta-adrenérgico centrais ou periféricos, no modelo do odor de gato;
- 4) Verificar o envolvimento dos receptores beta1-adrenérgicos do PMd sobre a resposta defensiva de ratos expostos ao odor de gato.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 3.1 Animais

Ratos Wistar (experimentos I, II e III) ou Long Evans Hooded (experimento IA e IV), machos, com 12-16 semanas de idade, pesando entre 280-350g foram utilizados nos experimentos. Os animais, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, foram alojados em caixas plásticas (50 x 30 x 15 cm) em grupos de 3-4 animais por caixa.

Os animais foram mantidos em temperatura constante ( $24 \pm 1^\circ \text{C}$ ) num ciclo claro-escuro de 12 horas (luz à partir das 7:00 a.m.) com água e comida *ad libitum*.

#### 3.2 Drogas

As doses utilizadas foram baseadas na literatura ou em observações experimentais em nosso laboratório:

- Midazolam (Dormonid<sup>®</sup>, Roche, Brasil), diluído em solução salina (NaCl 0,9%), 0,25 mg/ml num volume de injeção de 1ml/Kg.
- Propranolol (hidroclorato de propranolol, Sigma-Aldrich, USA); e Nadolol (Nadolol, Sigma-Aldrich, USA), diluídos



em solução salina, 10 mg/ml num volume de injeção de 1ml/Kg.

- Xilazina 2% (Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Brasil) e Quetamina 10% (Dopalen<sup>®</sup>, Agribands, Brasil); 1:1, 0,15 ml/Kg.
- Dopamina (Revivan<sup>®</sup>, Zambon Labs.Farms. Ltda, Brasil)diluída em salina tamponada (PBS - 2,7598g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O + 13,35g de NaHPO<sub>4</sub> + 5,844g de NaCl em 1000ml de água destilada, pH=7,3-7,4) numa dose de 18,36 ou 72µg/Kg.
- Atenolol [(RS)-Atenolol, Tocris, USA], diluído em PBS numa concentração de 10 ou 40nMol.

### **3.3 Modelos Experimentais**

#### **3.3.1 Modelo do Odor de Gato**

O modelo do odor de gato foi utilizado como ferramenta experimental chave para a avaliação das respostas comportamentais em nossos estudos. Este modelo, proposto inicialmente por BLANCHARD & BLANCHARD (1989), foi adaptado por DIELENBERG *et al* (1999).

O aparato consiste em uma caixa retangular de madeira, dividida em dois compartimentos, um aberto (40 x 26 x 36 cm) e um fechado (20 x 26 x 36 cm)(ver figura 1). Na parede

frontal da porção fechada da caixa, há uma pequena abertura (6 x 6 cm) com espaço suficiente para um rato transitar entre os dois lados do modelo. Na parede oposta do compartimento fechado, um pano, previamente impregnado com odor de gato, é utilizado como fonte de odor. Um pano idêntico, porém sem o odor, serve como controle.

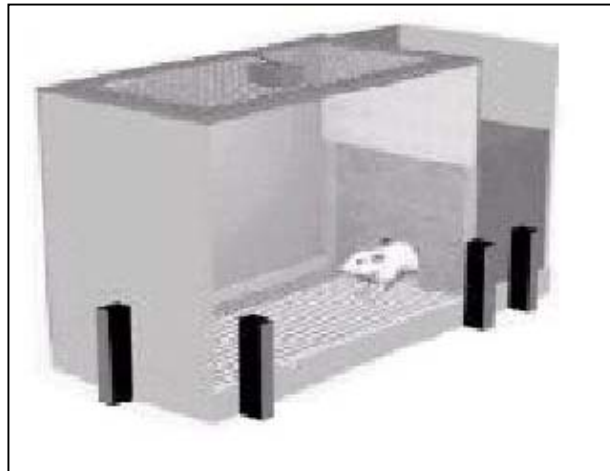


Figura 1. Esquema representativo mostrando o modelo do odor de gato com um animal em posição de head-out (Fonte: DIELENBERG & MCGREGOR, 2001).

O comportamento dos animais é registrado através de um sistema de câmera, posicionado de maneira funcional, permitindo desta forma a visualização de todo o modelo.

### 3.3.2 Labirinto em Cruz Elevado

O LCE é composto por dois braços abertos e dois braços fechados, com 50 cm de comprimento por 10 cm de largura cada, dispostos perpendicularmente a uma altura de 50 cm do solo. Os braços fechados apresentam paredes laterais de madeira com 40 cm de altura, enquanto os braços abertos possuem apenas uma pequena borda de acrílico (0,5 cm) para evitar uma possível queda dos animais (figura 2).



Figura 2. Fotografia do Labirinto em Cruz Elevado.

Este modelo, validado por PELLOW *et al* (1985) à partir de prévias observações (MONTGOMERY, 1955), tornou-se atualmente um dos modelos animais mais utilizados para a

investigação dos substratos neurais e mecanismos farmacológicos envolvidos nos transtornos de ansiedade (MONTGOMERY, 1955; PELLOW *et al*, 1985) (para maiores detalhes ver CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005).

### 3.3.3 Esquiva Inibitória

O teste da esquiva inibitória é realizado em uma caixa acrílica (35 x 20 cm), composta por uma plataforma, com largura suficiente para um rato, localizada 3 cm acima e em paralelo a um piso de metal gradeado (IZQUIERDO *et al*, 1979).



Figura 3. Fotografia do modelo da Esquiva Inibitória (Fonte:www.insigh.com.br)

Um sistema gerador de choques permite a emissão de impulsos elétricos regulados à partir de controladores de intensidade e tempo. Durante a fase de treino, um choque elétrico é ativado quando o animal desce da plataforma para o piso. No dia seguinte, durante a reexposição ao modelo, o tempo de permanência do animal sobre a plataforma serve como índice direto de retenção de memória (CAMMAROTA *et al*, 2005). Variações nos protocolos experimentais têm permitido aos pesquisadores ainda, além de uma avaliação cognitiva, uma abordagem emocional dos comportamentos avaliados (BORTA *et al*, 2005).

### **3.4 Monitoramento Cardíaco**

Os animais foram inicialmente anestesiados com uma solução 1:1 de Xilazina (2%) e Ketamina (10%), 0,15 ml/Kg. Em seguida, a veia femoral esquerda foi localizada e uma agulha foi inserida para a administração de heparina (30 UI), diluída em PBS, a fim de prevenir a formação de coágulos. A respiração foi facilitada através de uma traqueostomia com a inserção de uma pequena cânula. A artéria carótida direita foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. Com o auxílio de uma linha de sutura, o fluxo sanguíneo deste vaso foi interrompido na altura da

extremidade distal, enquanto o fluxo proximal foi temporariamente suprimido pela compressão com uma pinça curva. Uma pequena incisão na região medial da artéria carótida clampeada, serviu como via para inserção de um catéter de polietileno, o qual serviu para a mensuração contínua da FC. Os valores da frequência cardíaca (b.p.m.) e pressão arterial (mmHg) foram registrados a cada 0,5 segundos através de um computador acoplado ao sistema (software integração Dig-Med - modelo 200).

Após a manipulação cirúrgica, e um período de estabilização de 30 minutos, os efeitos da dopamina sobre a frequência cardíaca e pressão arterial (nas doses de 18, 36 e 72 µg/kg, i.v.), antes ou após a administração das drogas testadas, foram registrados.

### **3.5 Cirurgia Estereotáxica**

Os animais foram anestesiados com uma solução 1:1 de Xilazina (2%) e Quetamina (10%) num volume de 0,15 ml/Kg via i.p. Após a perda dos reflexos, os animais foram tricotomizados e fixados a um aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, EUA).

Uma incisão sagital foi realizada para exposição da calota craniana e remoção do periósteeo. Com o auxílio de uma

broca odontológica, a calota craniana foi perfurada para a introdução de duas cânulas guias (15 mm) direcionadas ao PMd conforme coordenadas (Anteroposterior (AP): 4,8 mm rostral à linha interaural previamente registrada; Latero-lateral(LL):  $\pm$  0,6 mm à partir da linha sagital mediana e Dorsoventral (DV): 7,2 mm ventral à superfície craniana) (PAXINOS & WATSON, 1998).

Em cada uma das cânulas implantadas foi adaptado um mandril (n° 30) com intuito de evitar um posterior entupimento. A superfície craniana foi recoberta por uma camada de acrílico auto-polimerizante. Dois parafusos previamente fixados sobre o crânio serviram de sustentação, permitindo a formação de uma prótese sólida após o endurecimento do acrílico.

Ao término da cirurgia, os animais foram alocados em uma sala com aquecedor até a recuperação completa da anestesia. Um período pós-operatório de sete dias foi estabelecido para o início dos experimentos.

### **3.6 Microinjeção Intracerebral**

As microinjeções foram realizadas com o auxílio de agulhas injetoras (17 mm - produzidas à partir de agulhas odontológicas) acopladas a um tubo de polietileno P10

previamente fixado a uma microseringa (Hamilton 5 $\mu$ l). Uma bomba de infusão (Insight, modelo B1200) permitiu a administração correta de 0,2  $\mu$ l a uma velocidade constante de 0,6 $\mu$ l/min. Os animais foram imobilizados com o auxílio de um pano, permitindo, assim, a remoção dos mandris protetores e a introdução das agulhas injetoras no interior das cânulas guias.

### **3.7 Perfusão e Histologia**

Após a realização dos testes comportamentais, os animais com cânulas implantadas direcionadas ao PMd foram anestesiados com Hidrato de Cloral 15%, 0,3 ml/Kg, via i.p.. e microinjetados com o corante Azul de Evans (0,5%) de maneira semelhante àquela realizada no momento de injeção da droga. Em seguida os animais foram perfundidos, via intracardíaca, por uma solução salina (NaCl 0,9%) seguida de formaldeído (10%), 5 minutos cada.

Os encéfalos foram removidos e acondicionados em formaldeído (10%) por 24 horas, sendo, posteriormente, tranferidos para uma solução de sacarose (30%) e mantidos em geladeira (3-4 dias). Os cortes histológicos foram realizados



em um criostato (LEICA CM 1850), em secções de 50  $\mu\text{m}$ , nas proximidades cerebrais demarcadas pelo corante.

As fatias foram dispostas em lâminas de vidro e o sítio de injeção foi analisado com o auxílio de um estereoscópio, segundo os diagramas do Atlas de PAXINOS & WATSON (1998).

### **3.8 Análise Estatística**

Os resultados foram analisados pelo programa Statistica 6.0 e representados em gráficos do programa Prisma 4.

Os dados paramétricos com distribuição normal observados no modelo do odor de gato (tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de *head-out*) e no LCE (% de tempo e entradas nos braços abertos, número de entradas nos braços fechados e número de tentativas) foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida de teste *post-hoc* Newman-Keuls. Os valores foram representados através de média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.).

O teste de Kruskal Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney, foi utilizado para analisar as variáveis não-paramétricas obtidas no modelo do odor de gato (número de aproximações e de cruzamentos) e no modelo da esQUIVA passiva (latência para a descida). Os dados foram representados por mediana  $\pm$  intervalo interquartil (i.i.).

O teste t de Student pareado foi utilizado para a avaliação da variação na frequência cardíaca ocasionada pela administração de dopamina, antes ou após a injeção dos beta-bloqueadores. Os valores foram expressos em média  $\pm$  e.p.m..

O nível de significância adotado em todos os experimentos foi  $p < 0,05$ .

### **3.9 Procedimentos e Protocolos Experimentais**

Todos os procedimentos realizados durante nossos estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética (23080.006118/2004-36/UFSC) e estão de acordo com o Guia de Cuidados para o uso de animais de laboratório do National Institutes of Health (1985).

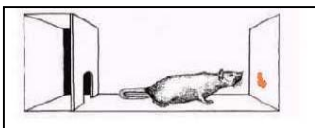
Os experimentos foram realizados em uma sala com som atenuado e baixa iluminação (4 lux) e conduzidos durante a fase clara do ciclo claro-escuro. Todos os animais foram submetidos ao modelo 24 horas antes da exposição ao odor em uma sessão denominada de familiarização. Durante a familiarização, um pano - tecido de flanela de coloração alaranjada com 36 x 22 cm - com odor neutro foi exposto a todos os animais. No dia do teste, um pano semelhante ao utilizado na familiarização, porém impregnado com odor de gato, foi usado como fonte de odor. O odor foi obtido de um

gato adulto, macho, através da fricção do pano contra a pele do animal nas regiões cervical, torácica e lombar por um tempo aproximado de 5 minutos. Uma terceira exposição foi realizada 24 horas após a exposição ao odor, na presença de um pano neutro, a fim de avaliar o medo condicionado contextual.

Os animais foram colocados no aparato com a cabeça direcionada para o pano durante os três dias de exposição ao modelo. Uma solução de álcool (10%) foi utilizada para a limpeza do modelo entre a passagem de cada um dos animais.

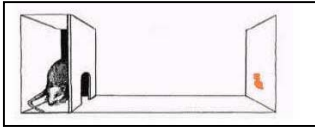
Alguns parâmetros foram padronizados e utilizados em todos os experimentos para avaliar o comportamento dos animais durante os 10 minutos de exposição ao modelo. O número de aproximações, bem como o tempo de aproximação e o tempo escondido foram utilizados como parâmetros indicativos do comportamento defensivo dos animais. Por sua vez, o tempo de *head-out* serviu para registrar o comportamento de avaliação de risco, enquanto o número de cruzamentos serviu como medida para avaliar a atividade exploratória dos animais.

- *Parâmetros relacionados com o Comportamento Defensivo*



**Tempo de aproximação:** tempo em que o animal aproxima-se do pano. Uma marcação

localizada à 7cm do pano facilita esta medida.



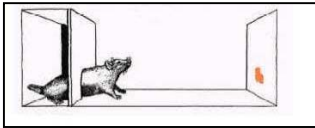
**Tempo escondido:** tempo em que o animal permanece com pelo menos duas patas no interior do compartimento fechado.

- *Parâmetros indicativos de Atividade Exploratória Geral*

**Cruzamentos** - número de vezes que o animal aproxima-se do pano somado ao número de entradas no compartimento fechado.

**Número de Aproximações** - número de vezes que o animal aproxima-se do pano

- *Parâmetro relacionado com a Avaliação de Risco*



(Fonte: DIELENBERG & MCGREGOR, 2001)

**Tempo de Head-out:** tempo em que o animal permanece no interior do compartimento fechado colocando a cabeça, com ou sem

as patas dianteiras, para fora deste compartimento. Este comportamento, que inclui diferentes padrões de avaliação de risco, foi avaliado em nossos estudos como um comportamento único.

## Experimento I

A) Comparação da resposta defensiva frente ao odor de gato entre as linhagens Wistar e Hooded;

B) Padronização farmacológica do modelo do odor de gato com Midazolam e Medo Condicionado Contextual.

No experimento IA, ratos Wistar ou Hooded foram submetidos ao modelo do odor de gato na presença de um pano com odor de gato ou um pano neutro, 24 horas após a familiarização.

No experimento IB, ratos Wistar foram divididos em três grupos, um grupo controle exposto ao odor neutro e 2 grupos experimentais submetidos ao odor de gato, tratados 30 minutos antes da exposição ao modelo com salina ou midazolam (0,25 mg/Kg,i.p.). A dose de midazolam utilizada em nossos estudos foi escolhida tendo como base a literatura (DIELENBERG *et al*, 1999; MCGREGOR & DIELENBERG, 1999), bem como prévias observações em outros modelos experimentais em nosso laboratório (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2002). Os animais foram avaliados durante três dias consecutivos. Durante o terceiro dia, os animais foram reexpostos ao modelo na presença de um pano neutro, afim de avaliar o aparecimento de medo condicionado ao contexto.

## **Experimento II**

- A) Interferências da exposição ao odor de gato sobre o comportamento defensivo no LCE;**
- B) Interferências da exposição ao odor de gato sobre a aprendizagem no modelo da esquiva inibitória.**

A) Durante esta etapa de nossos estudos os animais foram submetidos ao LCE 48 h ou 7 dias após a exposição ao odor de gato. Os animais foram colocados cuidadosamente no labirinto, com a cabeça voltada para um dos braços fechados. Durante cinco minutos de exposição os seguintes parâmetros foram registrados: % de tempo e de entradas nos braços abertos, número de entradas nos braços fechados e número de tentativas (comportamento emitido pelo animal quando o mesmo ameaça entrar em um dos braços abertos). Enquanto a porcentagem de tempo e entradas nos braços abertos serviu como parâmetro para avaliar o comportamento defensivo dos animais durante a exposição ao labirinto, o número de tentativas e de entradas nos braços fechados do modelo serviram respectivamente para o estudo do comportamento de avaliação de risco e da atividade exploratória geral.

B) A fim de avaliar as interferências da exposição ao odor de gato (48 h e 7 dias após) sobre a aprendizagem, os animais foram submetidos ao modelo da esquiiva inibitória (Experimento IIB). Durante a fase de treino, os animais receberam um choque elétrico (0,5 mA; 2 seg) imediatamente após descerem da plataforma para o piso gradeado. Após 24 h, durante a fase de teste, os animais retornaram ao modelo e o tempo de latência para descida foi utilizado como parâmetro direto de aprendizagem e retenção de memória.

### Experimento III

**Avaliação do comportamento defensivo em ratos administrados com bloqueadores beta centrais ou periféricos expostos ao odor de gato.**

Para o registro da atividade farmacológica de ambos bloqueadores beta, propranolol e nadolol, sobre a frequência cardíaca e pressão arterial nas doses utilizadas em nossos estudos, ratos Wistar foram conectados a um modelo de monitoramento cardíaco conforme descrito anteriormente.

Durante o estudo comportamental, propranolol e nadolol (10 mg/Kg, via i.p.), ou salina, foram administrados 30 min antes da exposição ao modelo do odor de gato, formando diferentes grupos experimentais conforme a Tabela 1 em apêndice.

As doses dos bloqueadores beta utilizados em nossos experimentos foram baseadas em estudos na literatura, bem como em observações prévias em nosso laboratório utilizando outros modelos animais (AUDI *et al*, 1991; ANGRINI *et al*, 1998).

#### **EXPERIMENTO IV**

##### **Efeitos comportamentais da administração do bloqueador beta1 Atenolol no PMd de ratos expostos ao odor de gato.**

Os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias direcionadas ao PMd. Após um período pós-operatório de uma semana, os mesmos foram submetidos ao modelo do odor de gato a fim de avaliar os efeitos da administração do bloqueador beta1 seletivo atenolol diretamente no PMd.

As concentrações de atenolol (10 e 40nMol) utilizadas foram baseadas na literatura (GRASS *et al*, 1998; WATANABE *et al*, 2003; HOCHT *et al*, 2005). As microinjeções foram realizadas 10 min antes da exposição ao odor de gato. O grupo controle recebeu PBS.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 EXPERIMENTO I

A etapa inicial de nossos estudos foi realizada de maneira sistemática com o intuito de validar e padronizar o modelo experimental do odor de gato dentro das condições ambientais de nosso laboratório.

Conforme mostrado na tabela 2, não foram observadas diferenças estatísticas entre as linhagens Wistar e Hooded em nenhum dos parâmetros avaliados no modelo do odor de gato.

#### A) Comparação da resposta defensiva frente ao odor de gato entre as linhagens Wistar e Hooded.

TABELA 2 - Comparação da resposta defensiva frente ao odor de gato entre as linhagens Wistar e Hooded. ANOVA com valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. para os parâmetros tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de head-out. Kruskal-Wallis com valores expressos em mediana  $\pm$  i.q. para os parâmetros número de aproximações e cruzamentos. *Legendas:* FAM= Familiarização; ODOR= Odor de gato CONT= Controle-Odor Neutro, N°= número; T'= tempo; Ap.= aproximação; Esc= escondido.

PARÂMETROS	WISTAR			HOODED		
	FAM n=24	ODOR n=13	CONT n=11	FAM n=21	ODOR n=9	CONT n=12
<b>COMPORTAMENTO DEFENSIVO</b>						
T' de Ap. (s)	171,2 $\pm$ 10,2	57,6 $\pm$ 7,7	218,3 $\pm$ 13,2	155,1 $\pm$ 15,6	39,1 $\pm$ 13,8	190,4 $\pm$ 18,5
T' Esc (s)	192,4 $\pm$ 15	481,7 $\pm$ 14,5	216,5 $\pm$ 23,3	210,8 $\pm$ 27,9	502,1 $\pm$ 19,3	236,1 $\pm$ 14,3
<b>ATIVIDADE EXPLORATÓRIA</b>						
N° Ap.	14 (10-16)	5 (3-8)	12 (11-12,5)	12 (10-14)	3 (2-6)	10 (9-13)
Cruzamentos	23 (20-26)	11 (8-16)	19 (18-20)	20 (16-21)	9 (7-10)	15 (14-18)
<b>AVALIAÇÃO DE RISCO</b>						
Head-out	16,7 (2,4)	63,0 $\pm$ 9,5	10,3 $\pm$ 3,1	18,06 $\pm$ 3,0	86,12 $\pm$ 16,3	14,05 $\pm$ 7,1

**B) Padronização farmacológica do modelo do odor de gato com Midazolam e Medo Condicionado Contextual.**

A ANOVA revelou diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais nos parâmetros relacionados ao comportamento defensivo (tempo de aproximação e tempo escondido - Figura 4, Figura 19 - Apêndice) e ao comportamento de avaliação de risco (tempo de *head-out* - Figura 5) respectivamente. [ $F_{(2,22)}=19,09$ ,  $p<0,001$ ;  $F_{(2,22)}=29,44$ ,  $p<0,001$ ;  $F_{(2,22)}=5,51$ ,  $p<0,05$ ]. O teste Newman Keuls, *a posteriori*, demonstrou uma diminuição no tempo de aproximação, bem como um aumento no tempo escondido e no tempo de *head-out*, no grupo salina quando comparado ao grupo controle. Diferenças entre estes dois grupos foram visualizadas ainda em relação aos parâmetros indicativos de atividade exploratória geral, representados por uma diminuição no número de aproximações e cruzamentos no grupo salina [teste U de Mann Whitney,  $p<0,001$ ].

Em relação ao grupo midazolam, os animais mostraram uma redução da resposta defensiva e do comportamento de avaliação de risco, quando comparados ao grupo salina. Ainda, um aumento na atividade exploratória geral, representada pelos parâmetros número de aproximação e cruzamentos [teste U de Mann Whitney,  $p<0,01$  e  $p<0,05$ ], foi observado neste grupo, o qual apresentou um perfil semelhante ao do grupo controle (Figura 5).

Em relação ao contexto, diferenças estatísticas também foram observadas entre os distintos grupos no que se refere aos parâmetros relacionados ao comportamento defensivo [ $F_{(2,22)}=12,74$ ,  $p<0,001$ ;  $F_{(2,22)}=21,02$ ,  $p<0,001$ ]. A análise estatística revelou uma redução no tempo de aproximação, seguida por um aumento no tempo escondido, nos animais tratados com salina quando comparados ao grupo controle (Figura 4, Figura 19 - Apêndice).

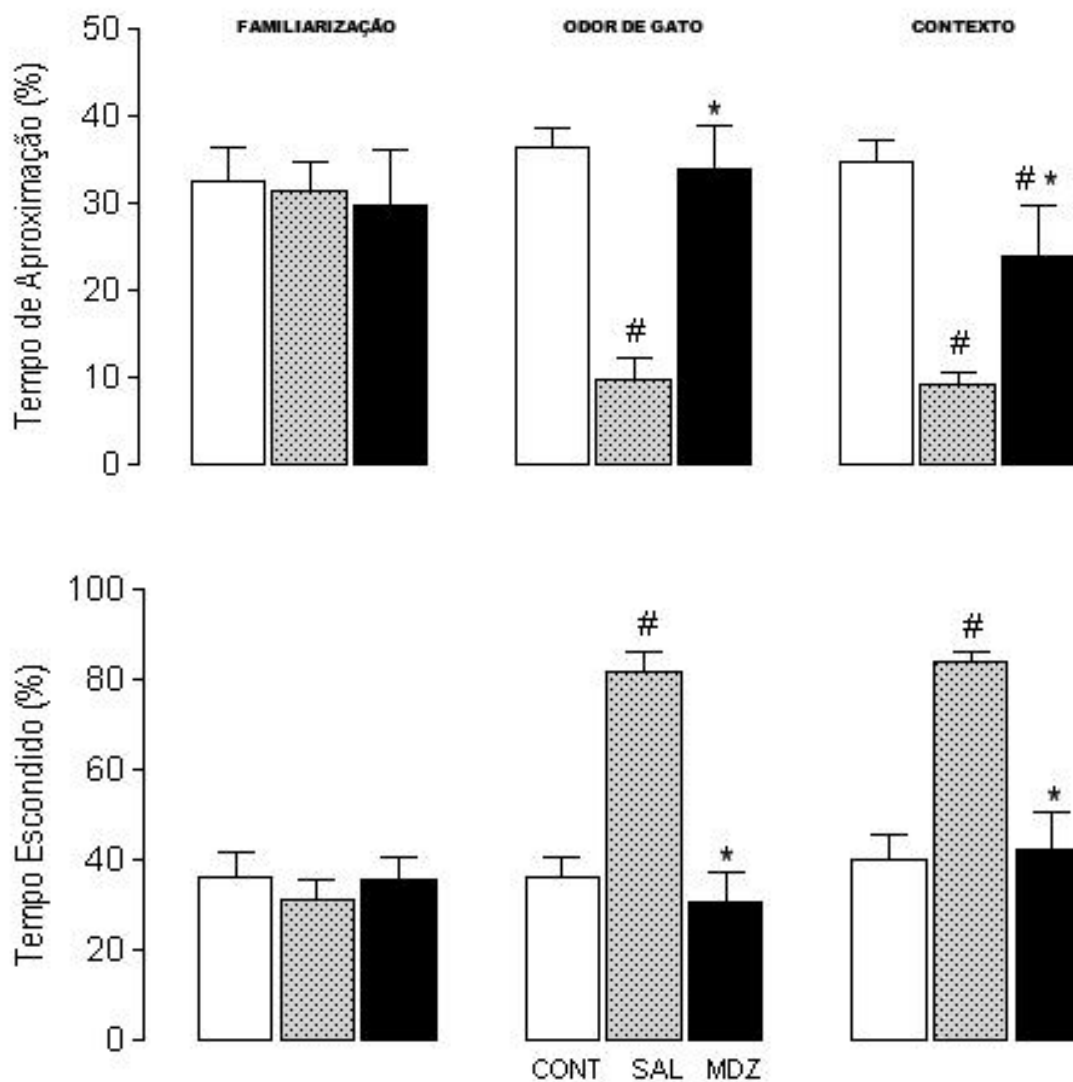


Figura 4. Avaliação da resposta defensiva dos grupos controle (odor neutro), salina e midazolam (0,25 mg/Kg, i.p., 30 minutos antes) durante a exposição ao odor e ao contexto nos parâmetros tempo de aproximação (%) e tempo escondido (%). ANOVA seguida de Newmann Keuls - valores expressos em média  $\pm$  e.p.m.. #p<0,05 comparado ao grupo controle; \*p<0,05 comparado ao grupo salina; n=8-9. Legenda: CONT= Controle; SAL=Salina; MDZ=Midazolam.

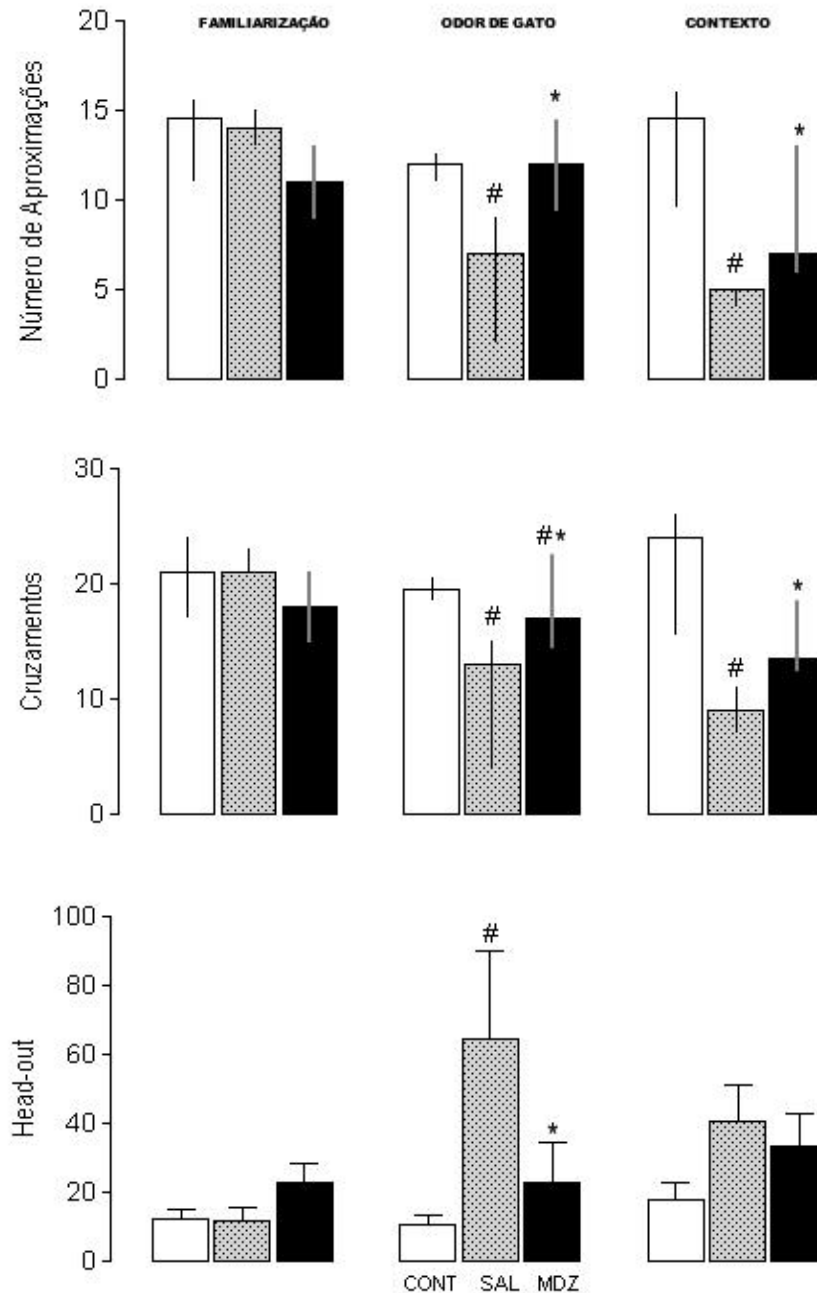


Figura 5. Atividade exploratória geral e comportamento de avaliação de risco nos grupos controle (odor neutro), salina e midazolam (0,25 mg/Kg, i.p., 30 minutos antes) durante a exposição ao odor e ao contexto, respectivamente para os parâmetros número de aproximações e cruzamentos (Kruskall Wallis seguido de Mann Whitney - valores expressos em mediana  $\pm$  i.q.) e tempo de *head-out* (Anova seguida de Newmann Keuls - valores expressos em média  $\pm$  e.p.m.). #  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo salina;  $n = 8-9$ . Legenda: CONT= Controle; SAL=Salina; MDZ=Midazolam.

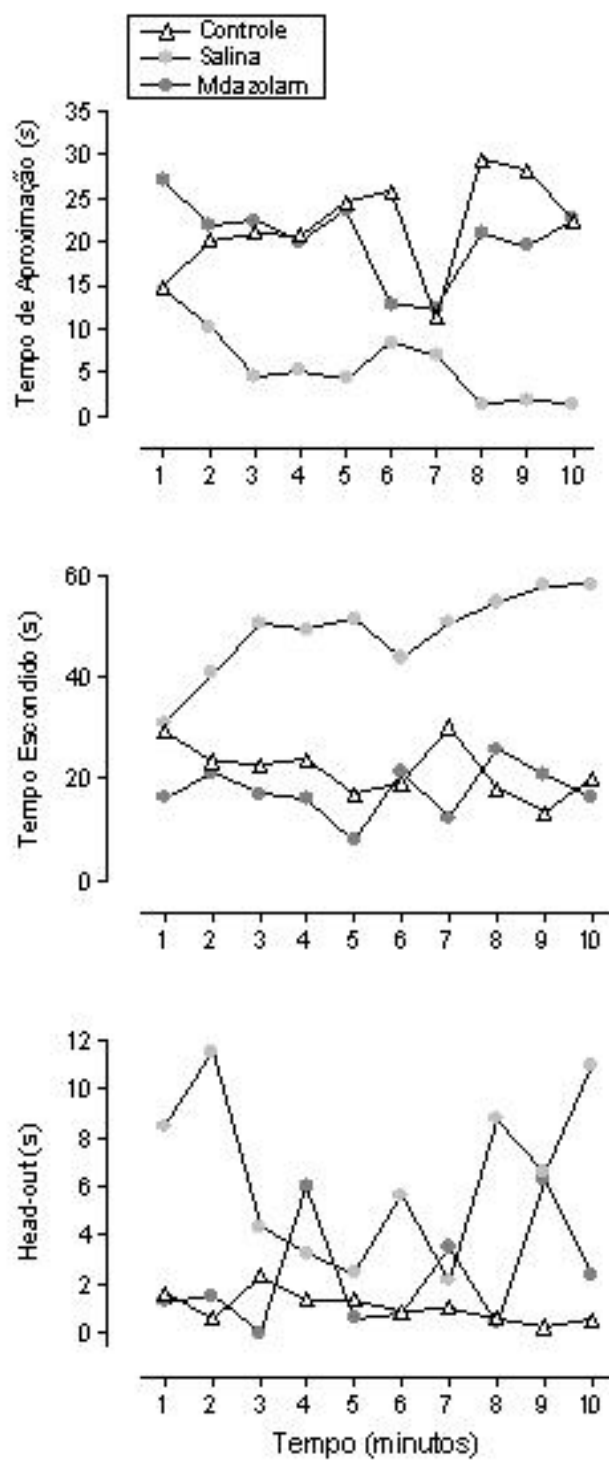


Figura 6. Traçado minuto a minuto dos parâmetros tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de *head-out*, durante a exposição ao odor de gato, dos grupos Controle (odor neutro), Salina e Midazolam.

Além disto, uma diminuição da atividade exploratória, caracterizada por uma redução do número de aproximações e cruzamentos, foi ainda constatada (teste U de Mann Whitney,  $p < 0,01$ ) (Figura 5).

Quando comparados ao grupo salina, os animais tratados com midazolam, antes da exposição ao odor de gato, mostraram uma redução das respostas defensivas e um aumento da atividade exploratória geral quando reexpostos ao contexto 24 horas após. Estas alterações ocorreram de maneira semelhante às aquelas observadas no dia anterior (Figuras 4 e 5).

Os parâmetros tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de *head-out* foram expressos minuto a minuto representando o traçado comportamental dos animais durante a exposição ao odor (Figura 6).

## **4.2 Experimento II**

### **A) Interferências da exposição ao odor de gato sobre o comportamento defensivo no LCE.**

O grupo de animais testado no LCE 48 h após a exposição ao odor de gato demonstrou uma redução no tempo de permanência nos braços abertos do modelo, associada a um aumento no número de tentativas efetuadas, quando comparado ao grupo controle exposto ao odor neutro [ $F_{(2,27)}=4,03$   $p < 0,05$ ;  $F_{(2,27)}=4,45$   $p < 0,05$ ] (Figura 7).

Não foram observadas diferenças estatísticas nos demais parâmetros observados. O grupo submetido ao LCE 7 dias após o confronto com o odor apresentou comportamento semelhante ao controle. O comportamento dos animais foi registrado minuto a minuto e está representado na figura 20 - Apêndice.

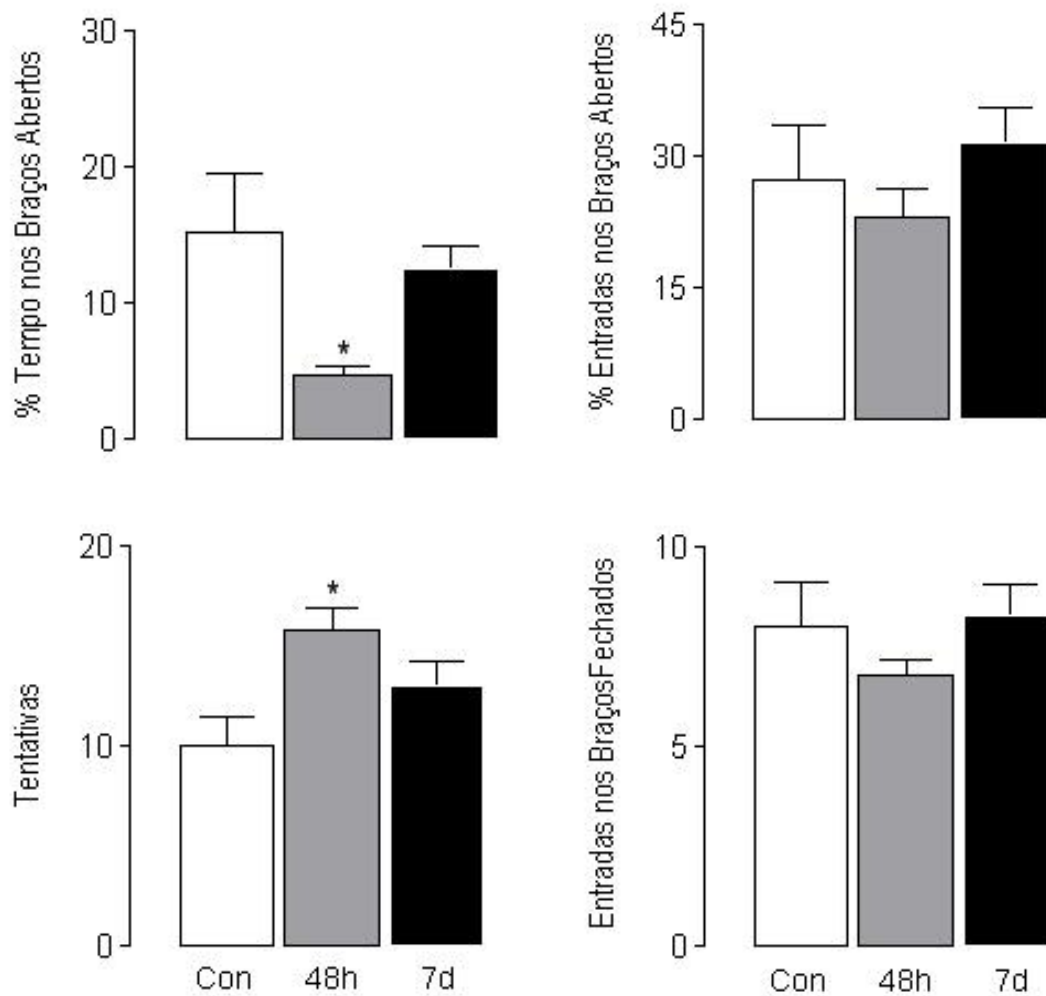


Figura 7. Porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos, número de tentativas e número de entradas nos braços fechados do LCE no grupo Con (Controle - exposto ao LCE 48 horas após o odor neutro) e nos grupos 48h e 7d (expostos ao LCE 48 horas e 7 dias após o odor de gato, respectivamente). Anova seguida de Newmann Keuls - valores expressos em média  $\pm$  e.p.m.; \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.  $n = 9-12$ .

**B) Interferências da exposição ao odor de gato sobre a aprendizagem no modelo da esquiiva inibitória.**

Uma clara redução no tempo de latência para descida foi observada no grupo de animais submetidos ao modelo da esquiiva inibitória, durante a fase de teste, 48 h após a exposição ao odor, quando comparado ao grupo controle exposto a um odor neutro [teste U de Mann Whitney,  $p < 0,0001$ ] (Figura 8).

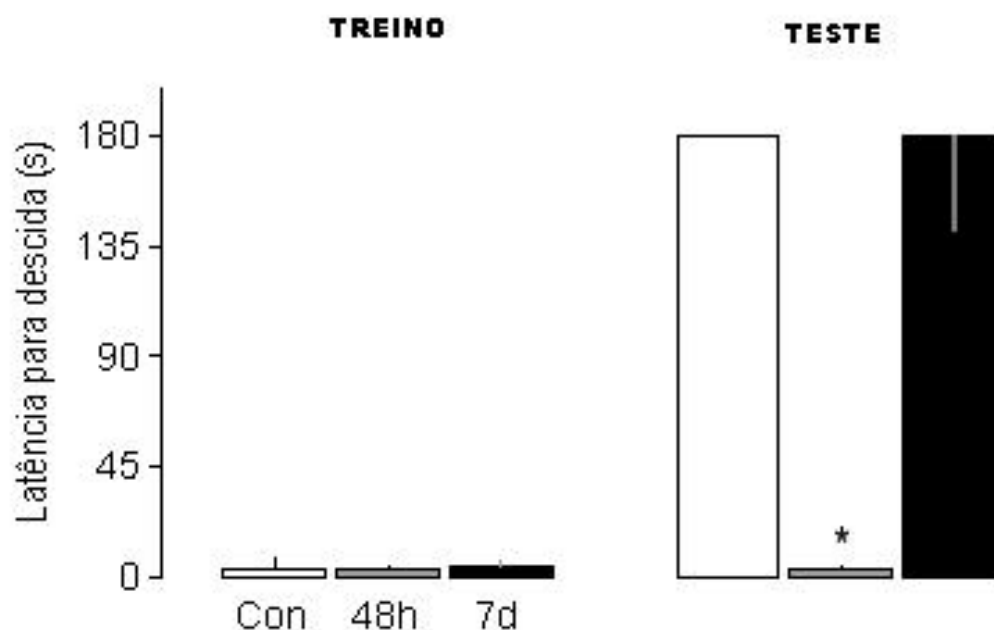


Figura 8. Latência para descida (s) durante a fase de treino e teste no grupo Con (Controle - submetidos ao treino 48 horas após o odor neutro) e nos grupos 48h e 7d (submetidos ao treino 48 horas e 7 dias após a exposição ao odor de gato, respectivamente). Kruskal Wallis seguido de Mann Whitney - valores expresos em mediana  $\pm$  i.q.; \* $p < 0,0001$  comparado ao grupo controle,  $n = 9-12$ .



### 4.3 EXPERIMENTO III

#### **Avaliação do comportamento defensivo em ratos administrados com bloqueadores beta centrais ou periféricos expostos ao odor de gato.**

Ambos bloqueadores beta, Propranolol e Nadolol, na dose de 10 mg/Kg, i.p., 30 min antes, foram capazes de impedir a taquicardia induzida pela administração de doses crescentes de dopamina (18, 36 e 72 µg/Kg i.v.) (figura 9). Este bloqueio ocorreu apesar de nenhuma das drogas produzirem alterações no ritmo cardíaco e na pressão arterial *per se* (Figura 10 e 11).

Durante a exposição ao modelo do odor de gato, diferenças estatísticas foram observadas entre os grupos experimentais nos parâmetros tempo de aproximação e tempo escondido [ $F_{(2,61)}=44,98$ ,  $p<0,01$ ;  $F_{(2,61)}=41,96$ ;  $p<0,01$ ] (Figura 12, Figura 21 - Apêndice). O teste de Newman Keuls revelou que a administração de propranolol, comparada à injeção de salina, induziu além de uma redução na resposta defensiva, um aumento visível na atividade exploratória, expressa por um maior número de aproximações e cruzamentos [teste U de Mann Whitney,  $P<0,01$ ]; e uma redução no comportamento de avaliação de risco, representada por uma clara diminuição no tempo de *head-out* durante a exposição ao modelo [ $F_{(2,61)}=11,41$ ;  $p<0,01$ ] (Figura 13). As alterações comportamentais relacionadas à resposta defensiva e à avaliação de risco foram representadas minuto a minuto (Figura 14).

Os animais tratados com nadolol apresentaram um perfil semelhante ao grupo salina durante a exposição ao odor de gato.

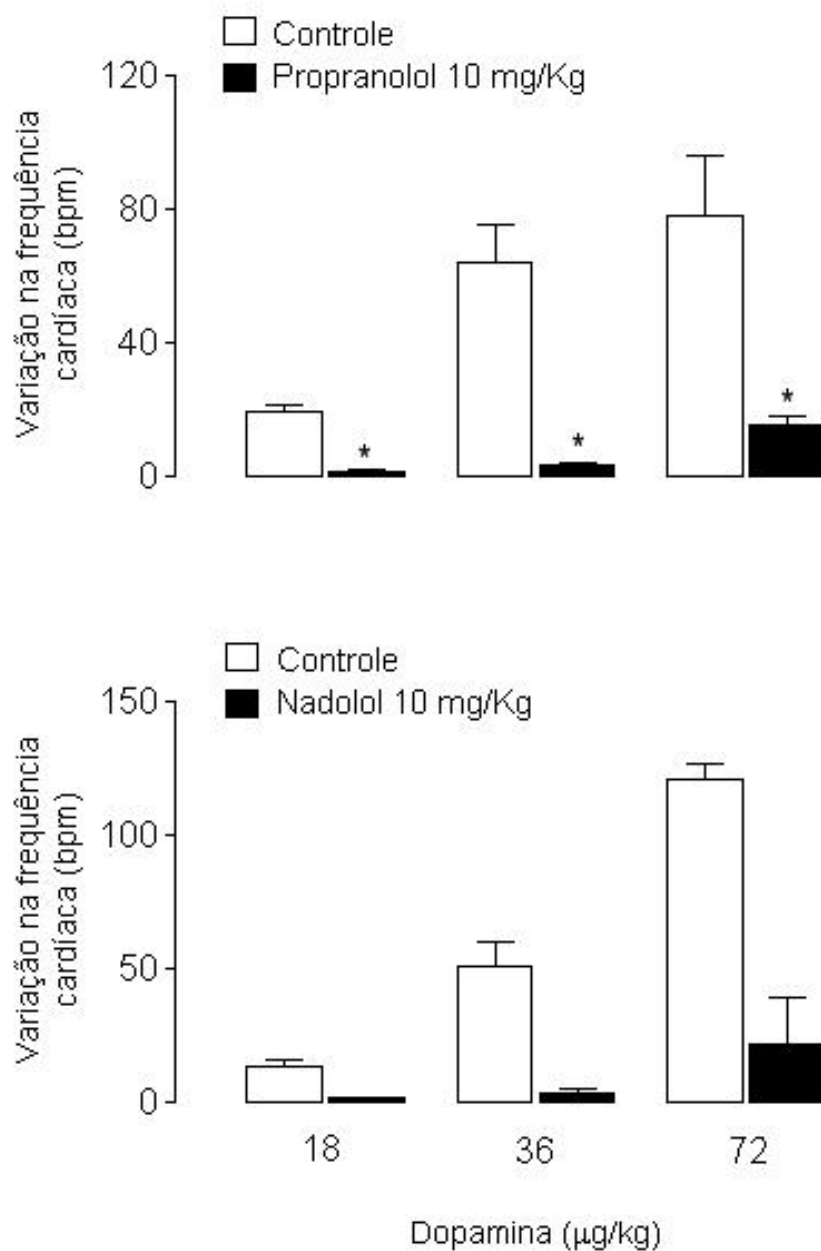


Figura 9. Variação na frequência cardíaca em número de batimentos por minuto (b.p.m.) ocasionada pela administração de doses crescentes de dopamina (18, 36 e 72 µg/Kg) antes (controle) ou após a injeção de propranolol ou nadolol (10 mg/Kg, i.p., 30 min antes). Test t student pareado - valores expressos em média ± e.p.m.; \*p<0,05 comparado ao grupo controle; n=3.

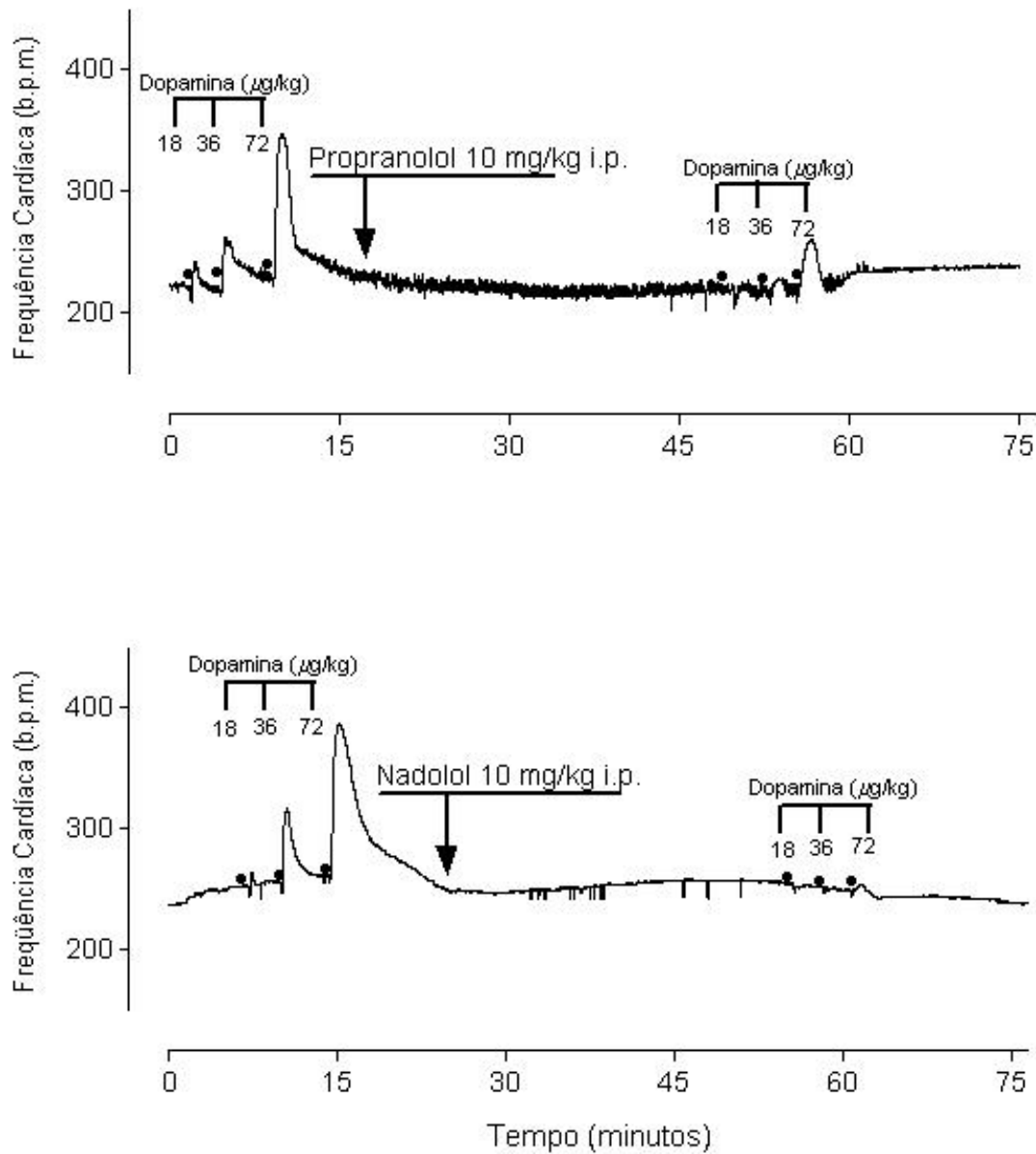


Figura 10. Registro fisiológico da frequência cardíaca em batimentos por minuto (b.p.m.) em ratos administrados com dopamina (18, 36 e 72  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) antes ou após a administração de propranolol ou nadolol (10 mg/Kg, i.p., 30 minutos antes).

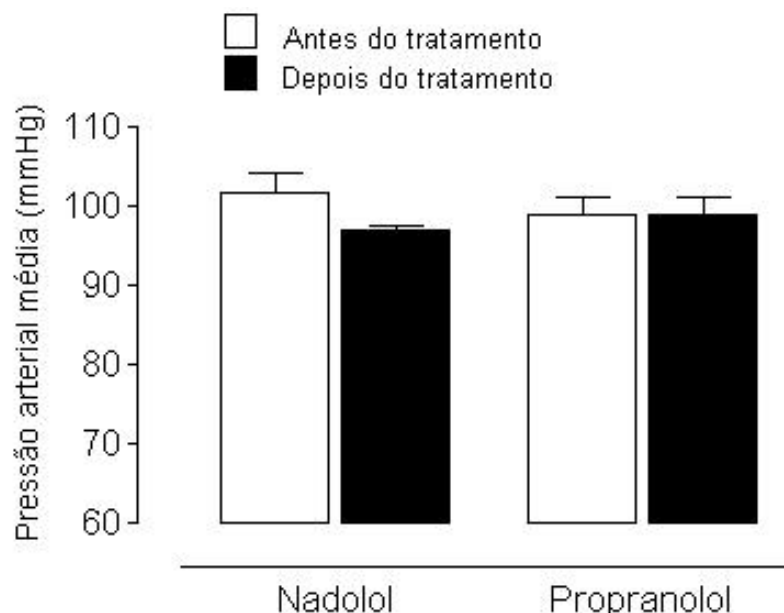


Figura 11. Variação na pressão arterial em milímetros de mercúrio (mmHg) ocasionada pela administração de Propranolol ou Nadolol (10 mg/Kg, i.p., 30 min antes). Teste t de Student pareado - valores expressos em média  $\pm$  e.p.m.; n=3.

Em relação ao contexto, diferenças estatísticas foram detectadas pela Anova, no que diz respeito aos parâmetros indicativos de comportamento defensivo [tempo de aproximação -  $F_{(5,58)}=21,67$ ;  $p<0,01$ ; e tempo escondido -  $F_{(5,58)}=18,09$ ;  $p<0,01$ ]. O teste Newman Keuls demonstrou que os animais que receberam propranolol antes da exposição ao odor, apresentaram uma redução do medo condicionado contextual, a qual foi caracterizada por um aumento no tempo de aproximação e uma diminuição no tempo escondido quando comparados ao grupo salina (Figura 12, Figura 21 - Apêndice).

Em adição, um significativo aumento na atividade exploratória, visualizado por um incremento no número de aproximações e cruzamentos, foi observado no grupo que recebeu

propranolol antes da exposição ao odor de gato e ao contexto (grupo PP) (teste U de Mann Whitney,  $p < 0,01$ ) (Figura 13).

Finalmente, não foram observadas diferenças estatísticas nos grupos tratados com propranolol ou nadolol quando estas drogas foram administradas apenas antes da exposição contextual.

#### **4.4 EXPERIMENTO IV**

##### **Efeitos comportamentais da administração do bloqueador beta1 Atenolol no PMd de ratos expostos ao odor de gato.**

Todos os testes estatísticos foram realizados após a verificação histológica dos sítios de injeção (Figura 15).

As injeções localizadas em estruturas vizinhas ao PMd foram agrupadas para análise estatística formando um grupo denominado PMd Fora, o qual serviu como um controle anatômico.

Uma expressiva redução do comportamento defensivo e da avaliação de risco foi observada pelo teste Anova - seguido de Newman Keuls - em ambos os grupos tratados com Atenolol (A10 e A40 nmol), quando comparados ao grupo controle (PBS), durante a exposição ao odor de gato. Esta redução foi caracterizada por um significativo aumento no tempo de aproximação [ $F_{(3,34)}=9,29$ ,  $p < 0,001$ ] e uma diminuição no tempo escondido [ $F_{(3,34)}=14,23$ ,  $p < 0,001$ ] (Figura 16, Figura 22 - Apêndice) e de *head-out* [ $F_{(3,34)}=7,45$ ,  $p < 0,01$ ] (Figura 17).

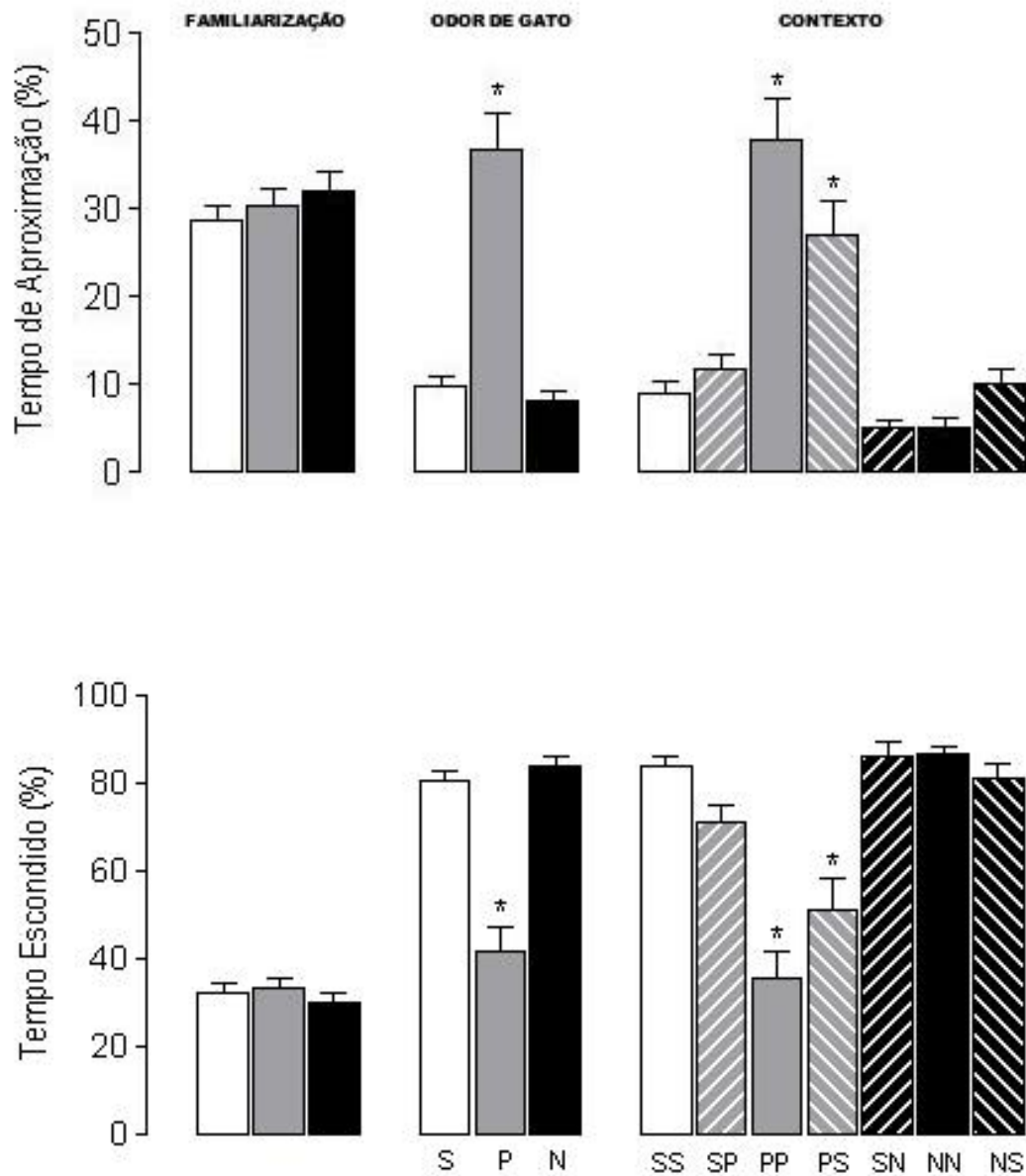


Figura 12. Avaliação do comportamento defensivo dos grupos salina, propranolol e nadolol durante a exposição ao odor de gato e ao contexto nos parâmetros tempo de aproximação (%) e tempo escondido (%). Anova seguida de Newmann Keuls - valores expressos em média  $\pm$  e.p.m.; \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina;  $n = 18-27$  (odor de gato),  $n = 7-11$  (contexto). Legenda: S=Salina; P=Propranolol; N=Nadolol.

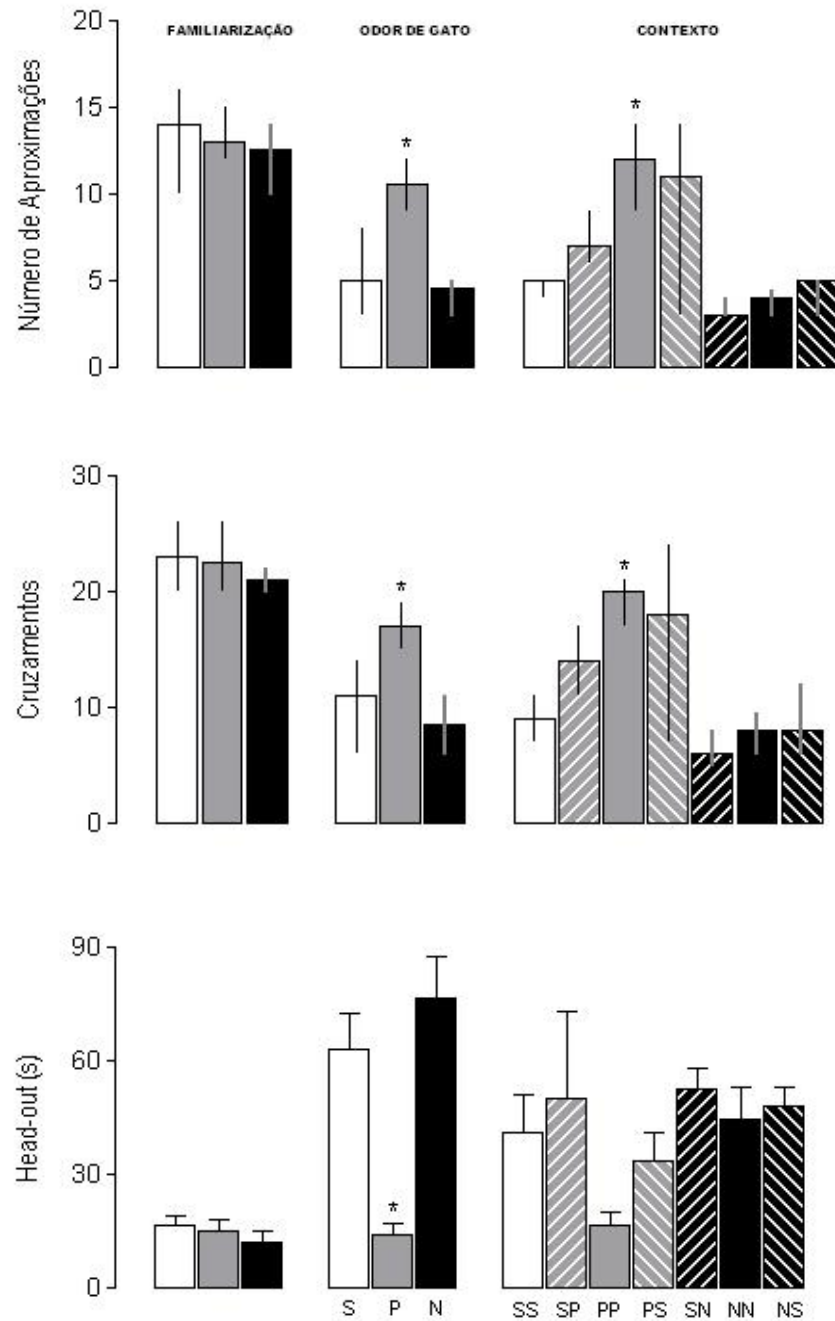


Figura 13. Avaliação da atividade exploratória geral e do comportamento de avaliação de risco dos grupos salina, propranolol e nadolol durante a exposição ao odor de gato e ao contexto, respectivamente para os parâmetros número de aproximações e de cruzamentos (Kruskall Wallis seguido de Mann Whitney - valores expressos em mediana  $\pm$  i.q.) e tempo de *head-out* (Anova seguida de Newmann Keuls - valores expressos em média  $\pm$  e.p.m.) \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina;  $n = 18-27$  (exposição ao odor),  $n = 7-11$  (contexto).  
 Legenda: S=Salina; P=Propranolol; N=Nadolol.

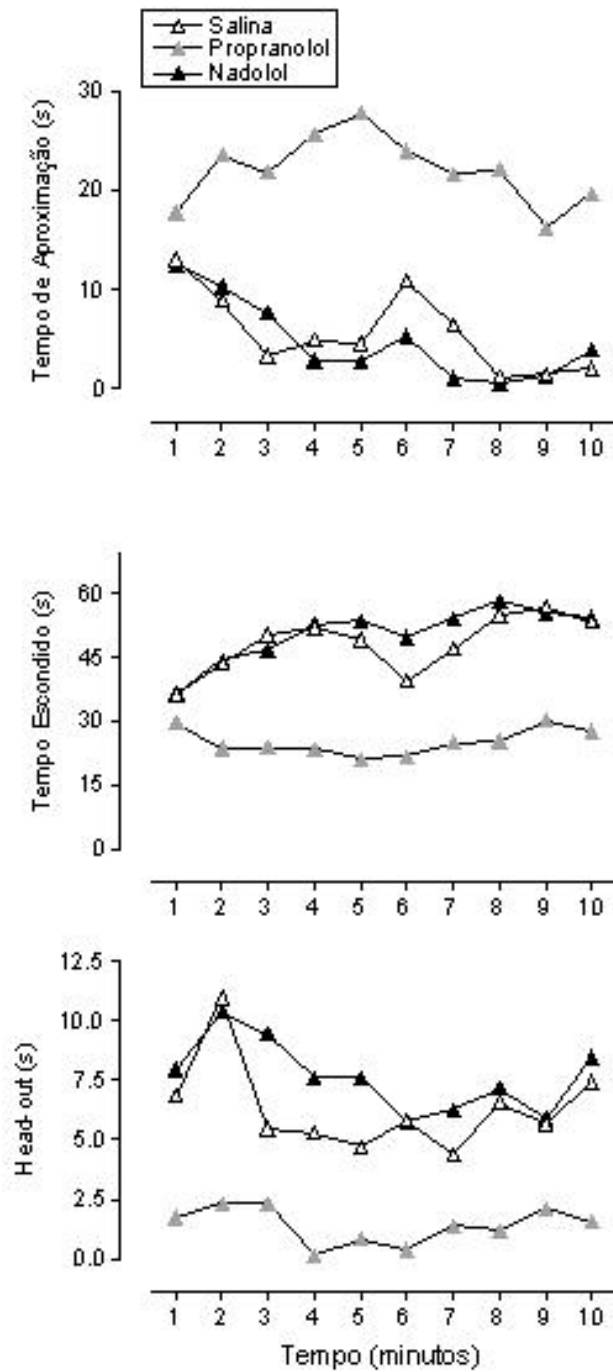


Figura 14. Traçado minuto a minuto dos parâmetros tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de *head-out*, durante a exposição ao odor de gato, nos grupos salina, propranolol e nadolol.



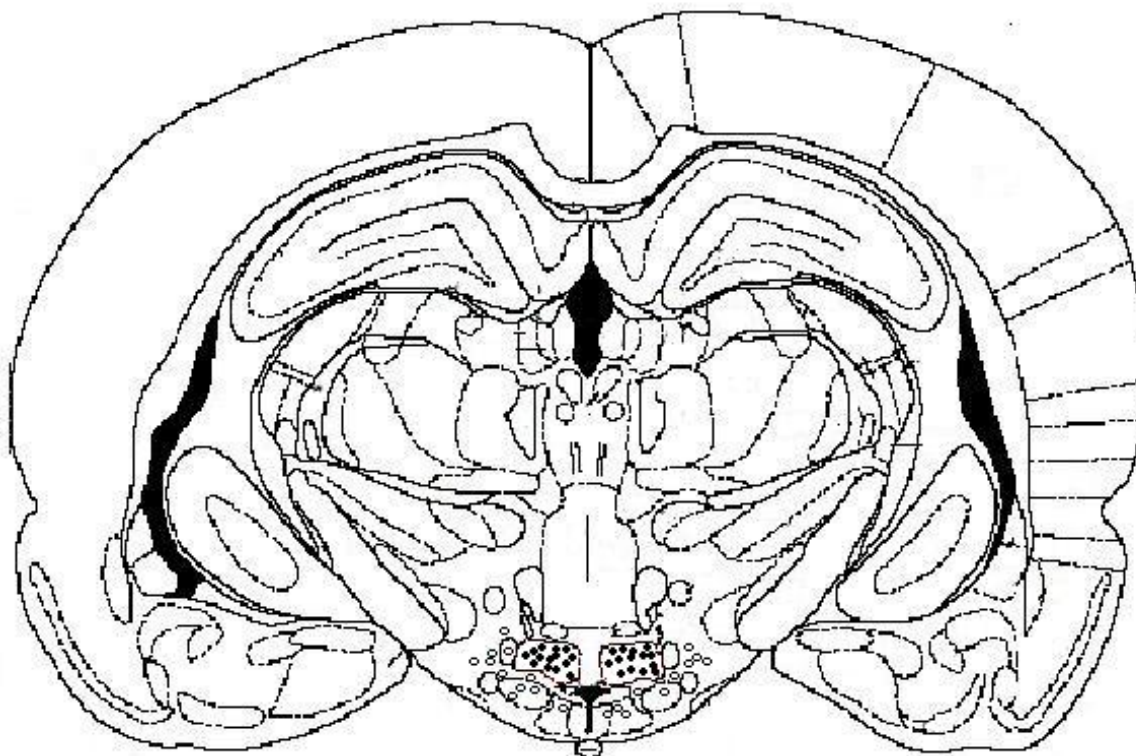


Figura 15. Representação gráfica do corte transversal do cérebro de um rato, demonstrando os núcleos Pré-Mamilares Dorsais (PMds) esquerdo e direito, com a localização dos sítios de injeção por meio de círculos pretos (PMd) ou brancos (Fora). Coordenada ântero-posterior: +4,84 em relação a linha interaural ou -4,16 em relação ao bregma. (Desenho modificado do atlas Paxinos e Watson, 1998).

Modificações na atividade exploratória foram ainda visualizadas nos grupos Atenolol 10 e 40 nmol no que diz respeito aos parâmetros número de aproximações (Teste U de Mann Whitney,  $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ ) e número de cruzamentos (Mann Whitney U test,  $p < 0,01$ ;  $p < 0,01$ ), respectivamente (Figura 17). O traçado comportamental dos animais durante a exposição ao odor está representado através de um gráfico minuto a minuto (Figura 18).

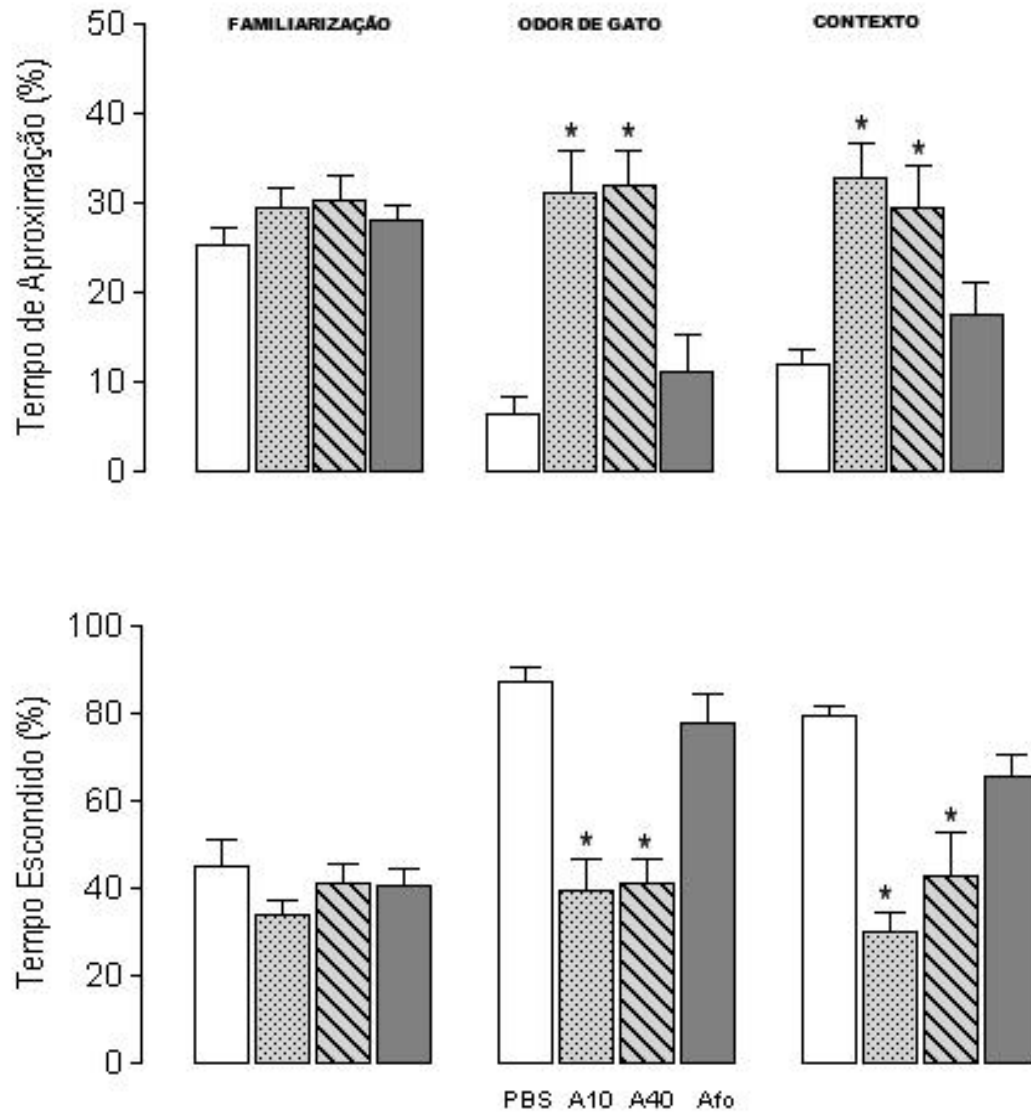


Figura 16. Avaliação do comportamento defensivo dos grupos PBS (Controle), A10 (Atenolol 10 nmol no PMd), A40 (Atenolol 40 nmol no PMd) e Afo (Atenolol fora do PMd) durante a exposição ao odor de gato e ao contexto nos parâmetros tempo de aproximação (%) e tempo escondido (%). Anova seguida de Newman Keuls - valores expressos em média  $\pm$  e.p.m.; \* $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS;  $n = 7-15$ .

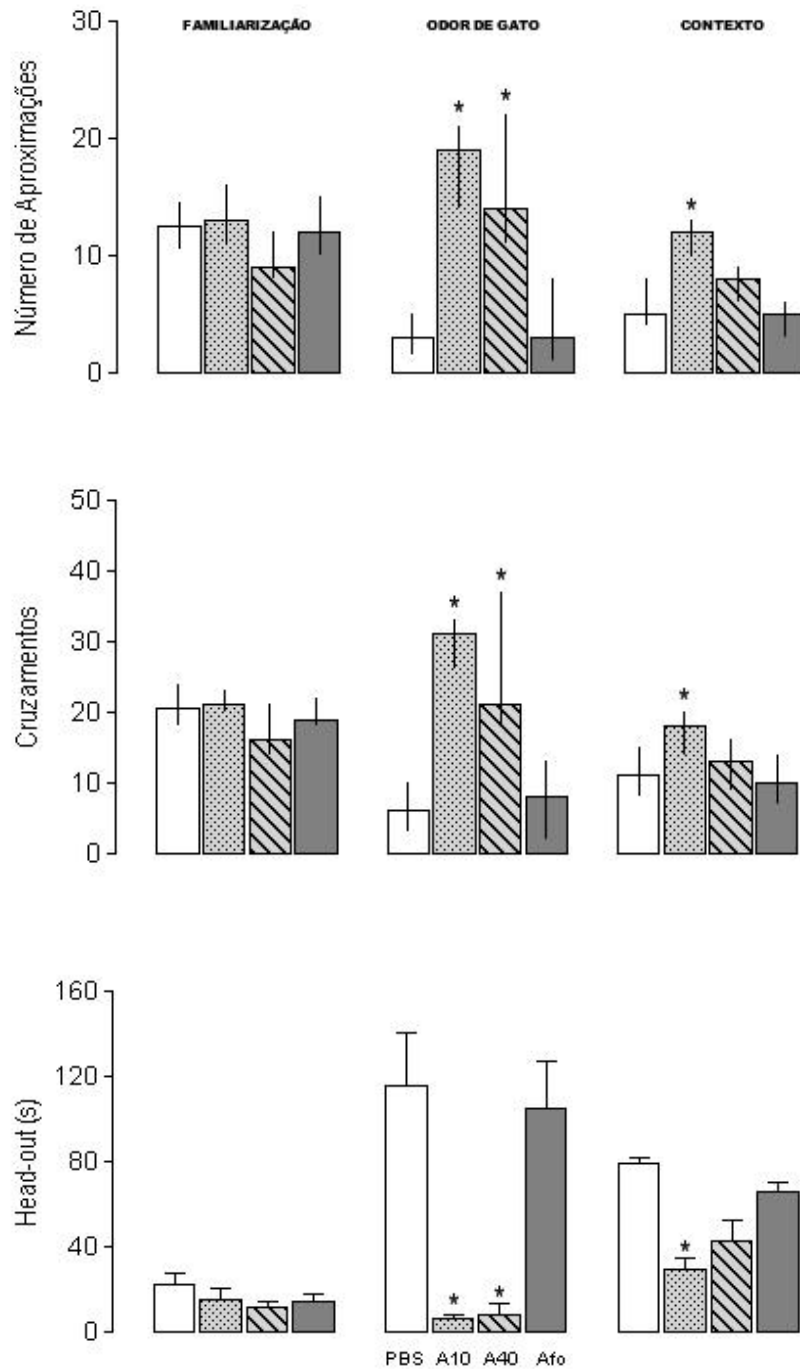


Figura 17. Atividade exploratória geral e comportamento de avaliação de risco dos grupos PBS (PBS PMd), Atenolol 10 nmol (ATE10PMd), Atenolol 40 nmol (ATE40PMd) e Atenolol fora (Ate-Fora) durante a exposição ao odor de gato e ao contexto, respectivamente para os parâmetros número de aproximações e cruzamentos (Kruskall Wallis seguido de Mann Whitney - valores expressos em mediana  $\pm$  i.q.) e tempo de *head-out* (Anova seguida de Newmann Keuls - valores expressos em média  $\pm$  e.p.m.) \* $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS;  $n = 7-15$ .

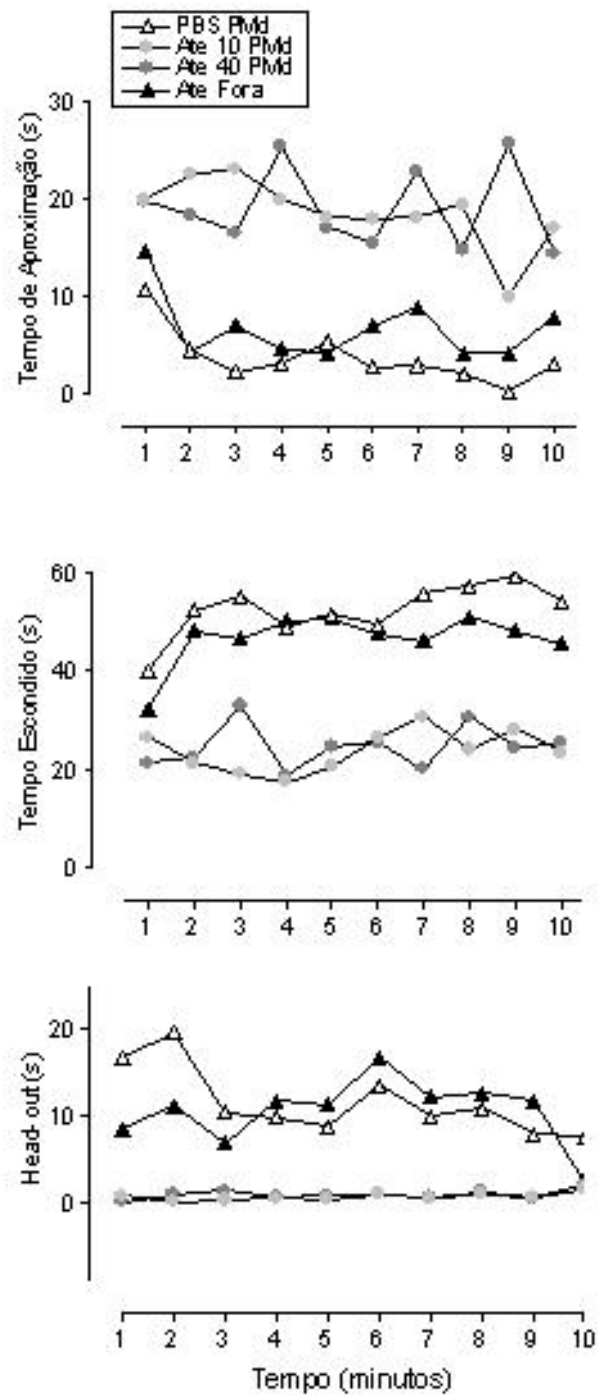


Figura 18. Traçado minuto a minuto dos parâmetros tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de *head-out*, durante a exposição ao odor de gato, nos grupos PBS, Atenolol 10 nmol, Atenolol 40 nmol e Atenolol fora.

No dia de exposição ao contexto, os animais submetidos ao tratamento com Atenolol nas doses de 10 ou 40 nmol antes da exposição ao odor, apresentaram uma redução da resposta defensiva nos parâmetros tempo de aproximação e tempo escondido [Anova- seguida de Newman Keuls -  $F_{(3,34)}=9,29$ ,  $p<0,001$  e  $F_{(3,34)}=14,23$ ,  $p<0,001$ ) (Figura 16, Figura 22 - Apêndice).

Uma diminuição no comportamento de avaliação de risco, caracterizada por uma redução no tempo de *head-out* [Anova- seguida de Newman Keuls -  $F_{(3,34)}=7,45$ ,  $p<0,05$ ], associada a um aumento na atividade exploratória (teste U de Mann Whitney,  $p<0,01$  e  $p<0,05$ , respectivamente para os parâmetros número de aproximações e de cruzamentos) foram visualizados nos animais do grupo Atenolol 10 nmol, quando comparados ao grupo PBS (Figura 17).

## 5. DISCUSSÃO

---

Estudos comportamentais envolvendo a resposta defensiva de ratos frente ao odor de gato têm ocasionado contradições na literatura. Enquanto alguns pesquisadores demonstram, dentro de uma mesma linhagem, a existência de duas populações distintas em relação à resposta defensiva frente ao odor de gato (FILE *et al*, 1993; HOOG & FILE, 1994); outros estudos têm relatado que este estímulo é suficientemente potente para causar a mesma resposta defensiva em todos animais, havendo apenas diferenças comportamentais sutis em estudos comparativos envolvendo diferentes linhagens (DIELENBERG & MCGREGOR, 2001).

Na etapa inicial de nossos estudos os resultados mostraram não haver diferenças significativas entre as linhagens Wistar e Hooded avaliadas no modelo do odor de gato. Diferenças nos procedimentos experimentais entre os laboratórios, bem como a deficiência de uma técnica eficaz para a quantificação do estímulo olfatório, podem estar ocasionando o aparecimento de resultados distintos, conduzindo os pesquisadores a diferentes conclusões (TAKAHASHI *et al*, 2005).

De fato, resultados contraditórios são descritos ainda no que se refere a eficácia dos benzodiazepínicos em reduzir as respostas defensivas de ratos expostos ao odor de gato. Os

benzodiazepínicos são os ansiolíticos protótipos utilizados em modelos envolvendo odor de predador (DIELENBERG & MCGREGOR, 2001). Enquanto ZANGROSSI & FILE (1992) demonstraram, em ratos tratados com o benzodiazepínico clordiazepóxido, apenas um modesto aumento no tempo de contato com a fonte de odor de gato, outros estudos revelaram uma eficácia dos benzodiazepínicos diazepam (BLANCHARD et al, 1990) e midazolam (DIELENBERG et al, 1999; MCGREGOR & DIELENBERG, 1999) em reduzir as respostas defensivas exibidas frente ao odor.

Neste estudo, ratos tratados com midazolam antes da exposição ao odor de gato, mostraram uma expressiva redução do comportamento de defesa e da avaliação de risco, com um aumento significativo da atividade exploratória geral. Estas alterações comportamentais foram verificadas ainda durante a reexposição dos animais somente ao contexto, 24 h após, sem a administração de drogas. A ausência de medo condicionado contextual, em contraste com o grupo salina, sugere a falta de uma interpretação aversiva durante a exposição ao odor de gato, confirmando mais uma vez a eficácia dos benzodiazepínicos na atenuação das respostas defensivas frente a este estímulo.

Através de estudos imunohistoquímicos, MCGREGOR e colaboradores (2004) demonstraram alterações na expressão do comportamento defensivo em ratos tratados com midazolam. Estas modificações comportamentais ocorreram associadas a uma redução

na expressão de proteína Fos em diversas estruturas encefálicas envolvidas com a resposta defensiva durante a exposição ao odor de gato (McGREGOR et al, 2004).

Uma diminuição na expressão de proteína Fos foi visualizada também no bulbo olfatório acessório, colocando em debate se a atenuação da resposta defensiva causada pelo midazolam poderia ser a consequência de uma deficiência no processamento sensorial olfatório. No entanto, os pesquisadores acreditam que as deficiências sensoriais seriam incapazes de justificar os resultados, uma vez que as principais áreas de projeções neuronais do bulbo olfatório acessório, mostraram apenas pequenas reduções na expressão de proteína Fos após a administração de midazolam (McGREGOR et al, 2004).

Após a validação biológica e a padronização farmacológica do modelo dentro das condições experimentais de nosso laboratório, nos propusemos a avaliar as interferências comportamentais da exposição ao odor de gato sobre outros modelos animais, incluindo o LCE e a Esquiva Passiva.

O modelo do LCE parte do pressuposto que ratos têm aversão a ambientes abertos, onde podem ser vítimas fáceis de predação. Os animais sentem-se mais seguros quando suas vibrissas estão em contato com alguma superfície vertical (tigmotaxia), razão



pela qual permanecem por um tempo maior nos braços fechados do LCE (HETEM & GRAEFF, 1997).

O tratamento com agentes que reduzem o comportamento defensivo em ratos, abole a preferência pelos braços fechados, aumentando desta forma o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos do LCE. De forma oposta, drogas ou eventos estressantes que aumentam a resposta defensiva dos animais tendem a reduzir o tempo e as entradas nos braços abertos do modelo (PELLOW *et al*, 1985).

Assim sendo, interferências sobre a resposta defensiva exibida durante os cinco minutos de exposição ao LCE foram visualizadas 48 h, mas não sete dias, após o procedimento experimental do odor de gato. Uma diminuição no tempo de permanência nos braços abertos do labirinto, associada a um aumento no comportamento de avaliação de risco, caracterizado por um maior número de tentativas, demonstram uma exacerbação da resposta de defesa expressa pelos animais. Estes achados, além de confirmarem a eficácia do estímulo olfatório aversivo utilizado em nossos experimentos, sugerem a ocorrência de consideráveis modificações comportamentais após uma simples exposição de 10 minutos ao odor do predador.

De maneira semelhante àquela ocorrida no LCE, os animais expostos ao modelo da esquiva inibitória, 48 h após a apresentação do odor, mostraram interferências comportamentais

visíveis. Do ponto de vista mnemônico, a redução significativa no tempo de latência para descida da plataforma, visualizada neste grupo durante o dia do teste, estaria indicando um prejuízo na aprendizagem e conseqüentemente na retenção da memória associada a esta tarefa, sugerindo o aparecimento de modificações nos processos cognitivos por, pelo menos, 48 h após a exposição ao odor de gato.

Considerando o envolvimento do sistema noradrenérgico, em especial dos receptores beta, nos transtornos de ansiedade e em situações que envolvam a recorrência de memórias aversivas, utilizamos, em uma etapa subsequente, o modelo do odor de gato para avaliar o papel dos bloqueadores beta centrais e periféricos sobre a resposta defensiva de ratos.

Sabe-se que quando um evento ameaçador ou temível é percebido, homens e animais reagem de maneira inata para a sobrevivência, através de mudanças fisiológicas conduzidas em parte pela ativação do LC, a mais importante via noradrenérgica do SNC (THASE *et al*, 1995). De fato, TANAKA e colaboradores (2000) têm sugerido que uma variedade de estímulos estressantes aumentam a liberação de noradrenalina no hipotálamo, na amígdala e no LC (TANAKA *et al*, 2000). Outros achados relevantes demonstraram também que o sistema locus coeruleus-

noradrenalina desempenha um papel mais complexo e específico do que se pensava inicialmente (ASTON-JONES & COHEN, 2005). Este papel parece começar com vigilância, atenção e processos sensoriais (BARNES & PAMPEIANO, 1991; FOOTE *et al*, 1991; ASTON-JONES *et al*, 1994), culminando em outros comportamentos envolvendo a tomada de decisão (BOURET & SARA, 2005), a memória aversiva (McGAUGH & ROOZENDAAL, 2002; FRANCES DAVIES *et al*, 2003) e a ansiedade e/ou medo (SULLIVANN *et al*, 1999; BERRIDGE & WATERHOUS, 2003; FENDT *et al*, 2005a).

Em concordância com estes achados, o ritmo de disparo neuronal e o padrão de imunoreatividade da proteína Fos no LC de roedores estão aumentados após diferentes situações de estresse (NIKULINA *et al*, 1998; CRANE *et al*, 2005), incluindo a exposição de ratos ao odor de gato (McGREGOR *et al*, 2004).

Alterações neurovegetativas ocasionadas pela ativação do sistema noradrenérgico são responsáveis por grande parte dos sinais clínicos presentes no medo/ansiedade (GRAEFF & GUIMARÃES, 2001). No entanto, há controvérsias na literatura acerca da eficácia terapêutica dos bloqueadores beta ser decorrente de um bloqueio central ou periférico (INTROINI-COLLISON *et al*, 1992; VAN STEGEREN *et al*, 1998; MURCHISON *et al*, 2004).

Tendo em vista todas estas considerações acerca do sistema noradrenérgico, dois bloqueadores beta foram utilizados em

nossos estudos, o propranolol, que ultrapassa facilmente a barreira hematoencefálica e o nadolol, que apresenta suas ações restritas aos receptores beta-adrenérgicos periféricos.

Ambos bloqueadores beta, propranolol e nadolol, na dose de 10 mg/Kg, 30 min antes, foram capazes de bloquear o aumento da FC induzido pela administração de dopamina, sem modificar no entanto a PA basal, conforme visualizado nos estudos com monitoramento cardíaco, em ratos anestesiados.

Relatos na literatura confirmam que a dopamina promove taquicardia ao atuar diretamente sobre receptores betal-adrenérgicos localizados no coração, ou indiretamente ao promover a liberação de noradrenalina (GOLDBERG, 1974). Considerando-se que a dopamina não ultrapassa a BH, o aumento na FC observado após a injeção de dopamina é ocasionado por um mecanismo restrito ao sistema periférico (CRUICKSHANK *et al*, 1980). Assim sendo, apesar de não apresentarem efeitos *per se*, nós podemos supor que ambos bloqueadores beta foram capazes de bloquear os receptores betal-adrenérgicos impedindo a taquicardia.

Nossos resultados experimentais utilizando o modelo do odor de gato forneceram evidências de que a administração de propranolol, antes da exposição ao odor de gato, reduziu a resposta defensiva. Este efeito foi acompanhado por uma diminuição no comportamento de avaliação de risco e um aumento

na atividade exploratória geral, ocasionando desta forma um comportamento semelhante aquele observado no dia da familiarização.

Diminuições no comportamento de defesa têm sido documentadas em diversos transtornos de ansiedade em humanos e animais nos quais os bloqueadores beta adrenérgicos são amplamente utilizados (AUDI *et al*, 1991; GORMAN & DUNN, 1993; KENT *et al*, 2002; GILES, 2005). Tanto no homem (LE MELLÈDO *et al*, 1998), como em macacos (ERVIN *et al*, 1991), o bloqueio efetivo de receptores beta-adrenérgicos com propranolol, foi capaz de atenuar os efeitos comportamentais e cardiovasculares do CCK-4, um agonista de receptores CCK-B de colecistocinina que produz a maioria dos sintomas clássicos do ataque de pânico.

Os animais submetidos ao tratamento com propranolol antes da exposição ao odor (grupos PS ou PP) mostraram ainda uma redução do medo condicionado durante a exposição ao contexto. Esta redução pode ser decorrente de uma falha na aquisição do condicionamento aversivo, devido à eficácia ansiolítica do propranolol ao interagir com o componente emocional aversivo do evento durante o estágio de aprendizado.

Corroborando esta hipótese, estudos prévios têm apontado uma redução do medo condicionado contextual em ratos tratados

com ansiolíticos antes do condicionamento (PAIN *et al* 2002; BLANCHARD *et al*, 2003).

Entretanto, levando-se em consideração a meia vida plasmática do propranolol em torno de 90 min no rato (LETENDRE *et al*, 2004), deve-se atentar que os efeitos da injeção de propranolol antes da exposição ao odor poderiam estar afetando, além do aprendizado, o período de consolidação da memória, ocasionando desta forma um prejuízo na consolidação, revelado apenas durante a evocação (contexto). De fato, uma série de estudos com animais e humanos têm demonstrado um envolvimento dos receptores beta-adrenérgico na facilitação da memória associada com experiências emocionais (CAHILL *et al*, 1994; McGAUGH & CAHILL, 1997; McGAUGH, 2000; FERRY & McGAUGH, 2000).

Apesar da eficácia ansiolítica do propranolol antes da exposição ao odor de gato, modificações comportamentais não foram visualizadas quando os animais receberam a droga antes da exposição ao contexto, 24 horas após. Assim, duas seriam as hipóteses, não excludentes, para explicar este fenômeno: a) a dose de propranolol utilizada em nossos estudos não foi eficaz para evitar a evocação da memória aversiva em ratos submetidos a uma simples exposição de 10 min ao odor de gato, 24 h antes do contexto; ou b) o sistema beta-adrenérgico não interfere com o processo de expressão de uma resposta aprendida.

Estes achados são consistentes com um elegante estudo, utilizando camundongos mutantes e ratos tratados com drogas noradrenérgicas, o qual ressalta que a sinalização noradrenérgica é necessária para a evocação de memórias espaciais, mas não é fundamental para a evocação de memórias emocionais (MURCHISON et al, 2004).

Ainda, em concordância com esta ausência de efeitos do propranolol, quando administrado antes do contexto, BLANCHARD e colaboradores (2003) têm sugerido que o comportamento defensivo exibido durante o contexto é dificilmente reduzido em resposta a drogas, exceto quando estas são administradas antes da exposição ao odor (BLANCHARD et al, 2003).

Por outro lado, não foram encontrados efeitos sobre o comportamento defensivo após a administração do bloqueador beta adrenérgico de ações preferencialmente periféricas, o nadolol. Este resultado sugere que o bloqueio isolado da resposta autonômica periférica não é suficiente para extinguir a resposta comportamental defensiva frente ao odor de gato. Assim sendo, os receptores beta-adrenérgicos do SNC parecem ser os principais componentes envolvidos nos efeitos ansiolíticos dos bloqueadores beta.

Além da propriedade de bloqueador beta adrenérgico, uma ação antagonista sobre receptores serotoninérgicos tem sido atribuída ao propranolol, a qual poderia estar interferindo

nesses efeitos comportamentais (PIERSON *et al*, 1990). Por esta razão, na etapa final de nossos estudos, nós utilizamos o atenolol, um bloqueador beta, seletivo para receptores do subtipo 1, desprovido de qualquer ação sobre o sistema serotoninérgico (NISHIO *et al*, 1989), o qual foi administrado diretamente no PMd.

Achados na literatura demonstram uma grande atenuação na expressão da resposta defensiva frente ao odor de gato em ratos com lesões químicas no PMd (BLANCHARD *et al*, 2003c; MARKHAM *et al* 2004; BLANCHARD *et al* 2005). Além disto, um envolvimento desta estrutura no comportamento defensivo inato foi ressaltado em estudos imunohistoquímicos, os quais constataram aumentos significativos na expressão de proteína Fos após a exposição ao odor de gato (DIELENBERG *et al*, 2001a).

Em nossos experimentos, uma expressiva diminuição da resposta de defesa e do comportamento de avaliação de risco foram observados após a administração de ambas as doses de Atenolol no PMd. Em adição, um aumento significativo da atividade exploratória geral foi ainda visualizado nestes animais. Por outro lado, as mesmas doses de atenolol administradas em estruturas vizinhas ao PMd, não ocasionaram alterações comportamentais significativas quando comparadas ao grupo controle.



Durante a exposição ao contexto, uma robusta diminuição da resposta defensiva foi verificada nos grupos pré-tratados com atenolol no PMd. Porém, curiosamente, apenas o grupo que recebeu a menor dose, 10 nmol, apresentou uma redução no comportamento de avaliação de risco e um aumento da atividade exploratória de maneira semelhante ao dia anterior.

Embora preliminares, nossos achados sugerem o envolvimento dos receptores beta1-adrenérgicos no PMd, confirmando desta forma a participação dos receptores beta-adrenérgicos centrais na resposta defensiva de ratos frente ao odor de gato. Além disto, nossos resultados reforçam o papel chave do PMd sobre o comportamento defensivo inato, abrindo novos horizontes para futuros estudos.

Dentro de uma perspectiva evolutiva, a ansiedade e o medo têm suas raízes nas reações de defesa dos animais frente a estímulos que representam perigo ou ameaça à sobrevivência, ao bem-estar ou à integridade física das diferentes espécies (HETEM & GRAEFF, 1997).

Por esta razão, a utilização do modelo do odor de gato, um modelo animal com valor preditivo suficiente para reproduzir as características comportamentais e patológicas, bem como possibilitar a investigação dos mecanismos neurobiológicos e farmacológicos envolvidos nos estados de ansiedade, tem contribuído de maneira significativa na identificação dos

neurotransmissores e sistemas neurais envolvidos nos diferentes transtornos de ansiedade.

## 6. CONCLUSÕES

---

- Em concordância com os achados da literatura, a administração do benzodiazepínico midazolam, antes da exposição ao odor de gato, foi capaz de reduzir a resposta defensiva dos animais, além de impedir o aparecimento de medo condicionado durante a exposição ao contexto;
- A exposição ao odor de gato causa alterações comportamentais visualizadas no LCE e na Esquiva Inibitória por pelo menos 48h, mas não 7 dias após;
- O bloqueio isolado das respostas autonômicas periféricas com nadolol, não foi suficiente para extinguir a resposta defensiva de ratos frente ao odor de gato;
- A administração de propranolol, antes da exposição ao odor de gato, foi capaz de reduzir o comportamento defensivo dos animais impedindo a consolidação de uma memória aversiva (contexto);
- A administração de bloqueadores beta apenas antes da exposição contextual, não foi capaz de alterar a resposta defensiva;
- A microinjeção de atenolol no PMd ocasionou uma diminuição da resposta defensiva, confirmando a participação dos receptores beta-adrenérgicos centrais nas respostas de defesa e reforçando o papel chave desta estrutura no comportamento defensivo inato.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ADAMEC, R.E.; SHALLOW, T.; Lasting Effects on Rodent Anxiety of a Single Exposure to a Cat. **Physiology & Behavior** 54:101-109, 1993.
- ADAMEC, R. E.: Transmitter systems involved in neural plasticity underlying increased anxiety and defense Implications for understanding anxiety following traumatic stress. **Neurosci Biobehav Rev** 21:751-766,1997.
- ADAMEC, R.; STRASSER, K.; BLUNDELL, J.; BURTON, P.; MCKAY, D.W.; Protein synthesis and the mechanisms of lasting change in anxiety induced by severe stress. **Behav Brain Res** in press, 2005.
- ANGRINI, M,; LESLIE, J.C.; SHEPHARD, R.A.; Effects of Propranolol, Buspirone, pCPA, Reserpine, and Chlordiazepoxide on Open-Field Behavior. **Pharmacology Biochem and Behav** 59:387-397, 1998.
- AOUIZERATE, B.; MARTIN-GUEHL, C.; TIGNOL, J.; Neurobiology and pharmacotherapy of social phobia. **Encephale** 30(4):301-13, 2004.
- ASTON-JONES, G; RAJKOWSKI, J.; KUBIAK, P.; ALEXINSKY, T.; Locus coeruleus neurons in monkey are selectively activated by attended cues in a vigilance task, **J Neurosci** 14:4467-4480, 1994.

- ASTON-JONES, G.; COHEN, J.D.; Adaptive gain and the role of the Locus Coeruleus-Norepinephrine System in optimal performance. **The Journal of Comparative Neurology** 493:99-110, 2005.
- AUDI, E.A., DE OLIVEIRA, R.M., GRAEFF, F.G.; Microinjection of propranolol into the dorsal periaqueductal gray causes an anxiolytic effect in the elevated plus-maze antagonized by ritanserin. **Psychopharmacology** 105 (4):553-7, 1991.
- BARNES, C.A.; POMPEIANO, M.; Neurobiology of the locus coeruleus, **Prog Brain Res** 88:307-321,1991.
- BAXI, K.N.; DORRIES, K.M.; EISTHEN, H.L.; Is the vomeronasal system really specialized for detecting pheromones? **Trends in Neuroscience**, im press, 2005.
- BECKER, B.J.; A holistic approach to anxiety and stress. **American Journal Psychoanalysis** 36:139-146, 1976.
- BERDOY, M.; WEBSTER, J.P.; MacDONALD, F.W.; Fatal attraction in rats infected with toxoplasma gondii. **Proc R Soc Lond-Ser B: Biol Sci** 267:1591-4, 2000.
- BERRIDGE, C.W.; WATERHOUS, B.D.; The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes; **Brain Research Reviews** 42: 33-84, 2003.

- BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P.; Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav** 72(1-2):449-55, 2002.
- BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; Crouching as an index of fear. **J Comp Physiol Psychol** 67:370-5, 1969.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; Defensive reactions in the albino rat. **Learn Motiv** 21:351-362, 1971.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; RODGERS, J.; WEISS, S.M.; The characterization and modeling of antipredator defense behavior. **Neurosci Biobehav Rev** 14:463-72, 1989.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; Antipredator defense behaviors in a visible burrow system. **J Comp Psychol** 103:70-82, 1989.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatry** 13:S3-S14, 1989a.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; WEISS, S.M.; MEYER, S.; The effects of ethanol and diazepam on reactions to predatory odors. **Pharmacol Biochem Behav** 35:775-80, 1990.
- 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. **Behav Brain Res** 58:155-166, 1993.

BLANCHARD, D.C.; YANG, M.; LI, C-I; GARVACIO, A.; BLANCHARD, D.C.; Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. **Neurosci Biobehav Rev** 26:587-595, 2001.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J.; Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. **Progress in Neuropsychopharm** 27:1177-85, 2003.

BLANCHARD, D.C., MARKHAM, C., YANG, M., HUBBARD, D., MADARANG, E., BLANCHARD, R.J.; Failure to produce conditioning with low-dose trimethylthiazoline or cat feces as unconditioned stimuli. **Behav Neurosci** 117, 268-360, 2003a.

BLANCHARD, D.C., GRIEBEL, G., BLANCHARD, R.J.; The mouse defense test battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Eur J Pharmacol** 463, 97-116, 2003b.

BLANCHARD, D.C.; LI, C.I.; HUBBARD, D.; MARKHAM, C.; YANG, M.; TAKAHASHI, L.K.; BLANCHARD, R.J.; Dorsal preammillary nucleus differentially modulates defensive behaviors induced by different threat stimuli. **Neurosci Lett** 345:145-148, 2003c.

BLANCHARD, D.C.; CANTERAS, N.S.; MARKHAM, C.M.; PENTKOWSK, N.S.; BLANCHARD, R.J.; Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: Effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 29:1243-53, 2005.

- BORTA, A.; WOHR, M.; SCHWARTING, R.K.; Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. **Behav Brain Res**, in press, 2005.
- BOURET, S.; SARA, S.J.; Network reset: a simplified overarching theory of locus coeruleus noradrenaline Function. **Trends in Neurosciences** 28:11, 2005.
- BRANDÃO, L.B.; VIANNA, D.M.; MASSON, S.; SANTOS, J.; Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. **Rev Bras Psiquiatr** 25(2), 2003.
- BRENNAN, P.A.; KEVERNE, E.B.; Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. **Progress in Neurobiology** 51:457-481, 1997.
- BRUNELLO, N.; DEN BOER J.A. , JUDD, L.L.; KASPER, S. ; KELSEY, K.E.; LADER, M.; LECRUBIER, Y.; LEPINE, J.P.; LYDIARD, R.B.; MENDLEWICZ, J.; MONTGOMERY, J.A.; RACAGNI, G.; STEIN, M.B.; WITTCHEN, H.U. Social phobia: diagnosis and epidemiology, neurobiology and pharmacology, comorbidity and treatment. **Journal of Affective Disorders** 60: 61-74, 2000.
- CAHILL, L.; PRINS, B.; WEBER, M.; McGAUGH, J.L.; Beta-adrenergic activation and memory for emotional events. **Nature** 371 (6499):702-4, 1994.
- CAHILL, L., McGAUGH J.L.; Modulation of memory storage. **Curr Opin Neurobiol** 6: 237-242, 1996.



- CAHILL, L.; ALKIREB, M.T. Epinephrine enhancement of human memory consolidation: Interaction with arousal at encoding. **Neurobiology of Learning and Memory** 79:194-198, 2003.
- CHATTOPADHYAY, P.; COOKE, E.; TOONE, B.; LADER, M.; Habituation of Physiological response in anxiety. **Biological Psychiatry** 15:711-721, 1980.
- CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.; BARROS, D.M.; VIANA, L.R.; IZQUIERDOR, L.A.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; Retrieval and the extinction of memory. **Cell Mol Neurobiol**, 25(3-4):465-74, 2005.
- CANTERAS, N.S.; CHIAVEGATTO, S.; RIBEIRO DO VALLE, L.E.; SWANSON, L.W.; Reduction of Rat Defensive Behavior to a Predator by Discrete Hypothalamic Chemical Lesions. **Brain Research Bulletin** 44(3):297-305, 1997
- CANTERAS, N.S.; The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 71:481- 491, 2002.
- CARLETON, A.; ROCHEFORT, C.; MORANTE-ORIA, J.; DESMAISONS, D. ; VICENT, J.D. ; GHEUSI, G. ; LLEDO, P.M. ; Making scents of olfactory neurogenesis. **J. Physiol** 96:115-122, 2002.
- CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J.; Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev** 29(8):1193-205, 2005.

- CRANE, J.W.; FRENCH, K.R.; BULLER K.M.; Patterns of neuronal activation in the rat brain and spinal cord in response to increasing durations of restraint stress. **Stress** 8(3):199-211, 2005.
- CRUICKSHANK, J.M.; NEILL-DWYER,G.; BARTLETT, J.; MCAINSH, J.; Beta-blockers and the blood-brain barrier. **Primary Cardiol Suppl** 1:34-37, 1980.
- DAY, H.E.; MASINI, C.V.; CAMPEAU, S.; The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5- trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. **Brain Res** 1025:139 -151, 2004.
- DICKMAN, C.R.; Predation and habit shift in the house mouse, *Mus domesticus*. **Ecology** 73:313-22, 1992.
- DIELENBERG, R.A.; MCGREGOR, I.S.; Habituation of the hide response in predatory odor in rats (*Rattus norvergicus*). **J Com Psychol** 113:376-87, 1999.
- DIELENBERG, R.A.; ARNOLD, J.C.; MCGREGOR, I.S.; Low-dose midazolam attenuates predatory odor avoidance in rats. **Pharmacol Biochem Behav** 62:197-201, 1999.
- DIELENBERG, R.A.; MC GREGOR, I.S.; Defensive behaviour in rats towards predatory odors: a review; **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 25: 597-609, 2001.

- DIELENBERG, R.A.; CARRIVE, P.; MCGREGOR, I.S.; The cardiovascular and behavioral response to cat odor in rats: unconditioned and conditioned effects. **Brain Research** 897 (1-2)228-37, 2001.
- DIELENBERG, R.A.; HUNT, G.E.; MCGREGOR, I.S.; "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. **Neuroscience** 104(4):1085-97, 2001a.
- DI SCALA, G.; SCHMITT, P.; KARLI, P.; Flight induced by infusion of bicuculline methiodide into periventricular structures. **Brain Res** 309:199-208, 1984.
- ENDRES, T.; APFELBACH, R.; FENDT, M.; Behavioral changes induced in rats by exposure to trimethylthiazoline, a component of fox odor. **Behav Neurosc** 119 (4) 1004-10, 2005.
- ERVIN, F.; PALMOUR, R.; BRADWEJN, J.; A new primate model for panic disorder. **New Research Program and Abstracts**, 144th Meeting of the American Psychiatric Association, New Orleans, 1991.
- FENDT, M.; ENDRES, T.; LOWRY C.A.; APFELBACH, R.; MCGREGOR, I.S.; TMT-induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing. **Neurosci Biobehav Rev** 29(8):1145-56, 2005.

FENDT, M.; SIEGL, S.; BJÖRN, S.B.; Noradrenaline transmission within the ventral bed nucleus of the stria terminalis is critical for fear behavior induced by trimethylthiazoline, a component of fox odor, **The Journal of Neuroscience** 25:5998-6004, 2005a.

FERRY, B.; ROOZENDAAL, B.; McGAUGH, J.L.; Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: A critical involvement of the amygdala. **Biol Psychiatry** 46 (9) 1140-52, 1999.

FERRY B, McGAUGH JL.; Role of amygdala norepinephrine in mediating stress hormone regulation of memory storage. **Acta Pharmacol Sin** 21:481-493, 2000.

FILE, S.E., ZANGROSSI JR., H., SANDERS, F.L., MABBUTT, P.S.; Dissociation between behavioral and corticosterone responses on repeated exposures to cat odor. **Physiol Behav** 54:1109-11, 1993.

FOOTE, S.L.; BERRIDGE, C.W.; ADAMS, L.M.; PINEDA, J.A.; Electrophysiological evidence for the involvement of the locus coeruleus in alerting, orienting, and attending, **Prog Brain Res** 88:521-532, 1991.

FRANCES DAVIES, M.F.; TSUI, J.Y.; FLANNERY, J.A.; LI, X.; DELOREY, T.M.; HOFFMAN, B.B.; Augmentation of the noradrenergic system in alpha-2 adrenergic receptor deficient mice: anatomical changes associated with enhanced fear memory. **Brain Research** 986: 157-165, 2003.

- FUNK, D.; AMIR, S.; Circadian modulation of Fos response to odor of red fox, a rodent predator, in the rat olfactory system. **Brain Res** 866, 262-67, 2000.
- GILES, J. Beta-blockers tackle memories of horror. **Nature** 436:28, 2005.
- GOLD, P.E.; VAN BUSKIRK, R.B.; Facilitation of time-dependent memory processes with posttrial amygdala stimulation: effect on memory varies with footshock level. **Brain Research** 86:509-513, 1975.
- GOLDBERG, L.I.; Dopamine: clinical uses of an endogenous catecholamine. **New England J Med** 291:707-712, 1974.
- GORMAN A.L.; DUNN A.J.; Beta-adrenergic receptors are involved in stress-related behavioral changes, **Pharmacol Biochem Behav** 45(1):1-7, 1993.
- GRAEFF, F.G.; Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Braz J Med Biol Res** 27:811-29, 1994.
- GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. Atheneu: São Paulo, 2001.
- GRASS, K.; PRAST, H.; PHILIPPU, A.; Influence of catecholamine receptor agonists and antagonists on the ultradian rhythm of the EEG in the posterior hypothalamus. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 357(2):169-75, 1998.
- GRAY, J.A.; **The Neuropsychology of Anxiety**. Oxford. University Press, New York, 1982.

- GUYTON, A.C.; HALL, J.E.; **Textbook of Medical Physiology**, 9th edition. Philadelphia, W.B. Saunders Company. 1996.
- HEBB, A.L.; ZACHARKO, R.M.; GAUTHIER, M.; TRUDEL, F.; LAFOREST, S.; DROLET, G.; Brief exposure to predator odor and resultant anxiety enhances mesocorticolimbic activity and enkephalin expression in CD-1 mice. **Eur J Neurosci** 20:2415-29, 2004.
- HERMAN, J. & CULLINAN, W.E.; Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neuroscience** 20:53-98, 1997.
- HESS, W.R.; BRUGGER, M.; Das subkortikale Zentrum der affektiven Abwehrreaktion. **Helv Physiol Pharmacol Acta** 1:33- 52, 1943.
- HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G.; **Ansiedade e Transtornos de Ansiedade**. Editora Científica Nacional, Rio de Janeiro, 1997.
- HOCHT, C.; OPEZZO, J.A.; GIRONACCI, M.M.; PENA, C.; TAIRA, C.A.; Anterior hypothalamic beta-adrenoceptors in chronic aortic-coarctated hypertensive rats: an interaction with central angiotensin II receptors. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 32(1-2):30-4, 2005.
- HOOG, S.; FILE, S.E.; Responders and nonresponders to cat odor do not differ in other tests of anxiety. **Pharm Bioch Behav** 49:219-222, 1994.

- HUBBARD, D.; 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. **Physiol Behav** 80(4):525-30, 2004.
- INTROINI-COLLISON, I.B.; MCGAUGH, J.L.; Epinephrine modulates long-term retention of an aversively-motivated discrimination task. **Behav Neural Biol** 45:358 -365, 1986.
- INTROINI-COLLISON, I.B.; SAGHAFI, D.; NOVACK, G.; MCGAUGH, J.L.; Memory enhancing effects of posttraining dipivefrin and epinephrine: Involvement of peripheral and central adrenergic receptors. **Brain Research** 572:81- 86, 1992.
- IZQUIERDO, I.; BEAMISH, D.G.; ANISMAN, H.; Effect of an inhibitor of dopamin-beta-hydroxylase on the acquisition and retention of four different avoidance tasks in mice. **Psychopharmacology** 63(2):173-8, 1979.
- KALIA, M.; SULLIVAN, J.M.; Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. **J Comp Neurol**, 211:248 -264, 1982.
- KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M.; **Principles of Neural Science**, 4th Ed., McGraw-Hill: New York,2000.
- KENT, J.M.; MATHEW, S.J.; GORMAN, J.M.; Molecular targets in the treatment of anxiety. **Biol Psychiatry** 52:1008-1030, 2002.

- KESSLER, R.C.; SONNEGA, A.; BORMET, E.; HUGHES, M.; NELSON, C.B.; Posttraumatic Stress Disorder in the National Comorbidity Survey. **Arch Gen Psychiatry** 52:1048-60, 1995.
- KAVALIERS, M.; WIEBE, J.P.; GALEA, L.A.M.; Reduction of predator odor-induced-anxiety in mice by the neurosteroid 3- $\alpha$ -hydroxy- $\Delta$ -4-pregnen-20-one (3 $\alpha$ HP). **Brain Research** 645:325-329, 1994.
- LASKA, M.; FENDT, M.; WIESER, A.; ENDRES, T.; SALAZAR, L.T.H.; APFELBACH, L.; Detecting danger-or just another odorant? Olfactory sensitivity for the fox odor component 2,4,5-trimethylthiazoline in four species of mammals. **Physiology & Behav** 84:211-15, 2005.
- LE MELLÈDO, J.M.; BRADWEJN, J.; KOSZYCK, D.; BICHET, D.G.; BELLAVANCE, F.; The role of the  $\beta$ -noradrenergic system in cholecystinin-tetrapeptide-induced panic symptoms. **Biol Psychiatry** 44:364-66, 1998.
- LETENDRE, L.; SCOTT, M.; DOBSON, G.; HIDALGO, I.; AUNGST, B.; Evaluating barriers to bioavailability *in Vivo*: Validation of a technique for separately assessing gastrointestinal absorption and hepatic extraction. **Pharmaceutical Research** 21, 8:1457-1462, 2004.
- LI, C.S., KABA, H., SAITO, H.; SETO, K.; Neural mechanisms underlying the action of primer pheromones in mice. **Neuroscience** 36, 773-778, 1990.



- MAEDA, T.; The *Locus Coeruleus*: History; **J Chem Neuroanat** 18 (1-2):57-64, 2000.
- MARKHAM, C.M.; BLANCHARD D.C.; CANTERAS, N.S.; CUYNO, C.D.; BLANCHARD, R.J.; Modulation of predatory odor processing following lesions to the dorsal preammillary nucleus. **Neurosci Lett** 372 (1-2):22-6, 2004.
- McGAUGH, J.L.; CAHILL, L.; Interaction of neuromodulatory systems in modulating memory storage. **Behav Brain Res** 83:31-38, 1997.
- McGAUGH, J.L.; Memory - a century of consolidation. **Science** 287:248-251, 2000.
- McGAUGH, J.L.; ROOZENDAAL, B.; Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain; **Current Opinion in Neurobiology** 12: 205-210, 2002.
- McGAUGH, J.L.; The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences, **Annu Ver Neurosci** 27:1-28, 2004.
- McGREGOR, I.S.; DIELENBERG, R.A.; Differential anxiolytic efficacy of a benzodiazepine on first versus second exposure to a predatory odor in rats. **Psychopharmacology** 147:174-181, 1999.

- McGREGOR, I.S.; SCHRAMA L.; AMBERMOON, P.; DIELENBERG, R.A.;  
Not all 'predator odours' are equal: cat odour but not  
2,4,5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific  
defensive behaviours in rats. **Behav Brain Res** 129(1-2):1-  
16, 2002.
- McGREGOR, I.S.; HARGREAVES, G.A.; APFELBACH, R.; HUNT, G.E.;  
Neural Correlates of Cat Odor-Induced Anxiety in Rats:  
Region-Specific Effects of the Benzodiazepine Midazolam;  
**The Journal of Neuroscience** 24(17):4134-4144, 2004.
- McNAUGHTON, N.; CORR, P.J.; A two dimensional neuropsychology  
of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuro  
Biobehav Reviews** 28:285-305, 2004.
- MONTGOMERY, K.C.; The relation between fear induced by novelty  
stimulation and exploratory behaviour. **J Comp Physiol  
Psychol** 48:254-260, 1955.
- MURCHISON, C.F.; ZHANG, W.P.; OUYANG, M.; LEE, A.; THOMAS,  
S.A.; A distinct role for norepinephrine in memory  
retrieval. **Cell** 117(1):3-4, 2004.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Guide for Care Use of  
Laboratory Animal Washington: US Government Printing  
office, 1985.
- NESSE, R.M.; The smoke detector principle. Natural selection  
and the regulation of defensive responses. **Ann NY Acad Sci**  
935:75-85, 2001.

- NESSE, R.M.; Natural selection and the regulation of defenses  
A signal detection analysis of the smoke detector  
principle, **Evolution and Human Behavior** 26:88-105, 2005.
- NIKULINA, E.M.; MARCHAND J.E.; KREAM, R.M.; MICZEK K.A.;  
Behavioral sensitization to cocaine after a brief social  
stress is accompanied by changes in fos expression in the  
murine brainstem. **Brain Res** 810(1-2):200-10, 1998.
- NINAN, P.T.; The functional anatomy, neuchemistry and  
pharmacology of anxiety. **Journal of clinical Psychiatry**  
Suppl 22:12-17, 1999.
- NISHIO, H.; NAGAKURA, Y.; SEGAWA, T; Interactions of carteolol  
and other beta-adrenoceptor blocking agents with serotonin  
receptor subtypes. **Arch Int Pharmacodyn Ther** 302:96-106,  
1989.
- PAIN, L.; LAUNOY, A.; FOUQUET, N.; OBERLING, P.; Mechanisms  
of action of midazolam on expression of contextual fear in  
rats. **British Journal of Anaesthesia** 89(4):614-21, 2002.
- PAXINOS, G.; WATSON, C.; The rat brain in stereotaxic  
coordinates. 4 ed. New York, Academic Press, 1998.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M.; Validation of  
open:close arm entries in an elevated plus-maze as a  
measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Meth** 14:149-167,  
1985.

- PERROT-SINAL, T.S.; OSSENKOPP, K.P.; KAVALIERS, M.; Brief predator odour exposure activates de HPA axis independent of locomotor changes. **NeuroReport** 10, 775-780, 1999.
- PERROT-SINAL, T.S.; GREGUS, A.; BOUDREAU, D.; KALYNCHUK L.E.; Sex and repeated restraint stress interact to affect car odor-induced defensive behavior in adult rats. **Brain Research** 1027:161-172, 2004.
- PIERSON, M.E.; LYON, R.A.; TITELER, M.; SCHULMAN, S.B.; KOWALSKI, P.; GLENON, R.A.; Design and synthesis of propranolol analogues as serotonergic agents. **J Med Chem** 33(4):1270, 1990.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K.; **Farmacologia**, 5<sup>a</sup> ed., Guanabara & Koogan, 2004.
- REDMOND, Jr.D.E.; HUANG, Y.H.; SNYDER, D.R., MAAS, J.W.; Behavioral effects of stimulation of the locus coeruleus in the stumpailed monkey *Macaca arctoides*. **Brain Res** 116:502-510, 1976.
- REDMOND, Jr.D.E.; HUANG, Y.H.; New evidence for a locus coeruleus-norepinephrine connection with anxiety. **Life Sci** 25:2149-2162, 1979.
- RESTREPO, D.; ARELLANO, J.; OLIVA, A.M.; SCHAEFER, M.L.; LIN, W.; Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to

chemosensory signals in mice. **Horm Behav** 46(3):247-56, 2004.

RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; CANTERAS, N.S.; CEZARIO, A.F.; BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; An alternative experimental procedure for studying predator-related defensive responses. **Neurosci Biobehav Rev** 29(8):1255-63, 2005.

SLATER, M.D.; Predator-prey behavior and habituation. In: PEEKE, H.V.S.; PETRINOVICH, L; (Eds.), **Habituation, Sensitization, and Behavior**. Academic Press, New York, 349-391, 1984.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M.; **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**, 2<sup>a</sup> ed.; Guanabara e Koogan, 1999.

SULLIVAN G.M.; COPLAN, J.D.; KENT J.M.; GORMAN J.M.; The Noradrenergic System in Pathological Anxiety: A Focus on Panic with Relevance to Generalized anxiety and Phobias; **Biol Psychiatry** 46:1205-1218, 1999.

STERNBERG, D.B.; KOROL, D.; NOVACK, G.; MCGAUGH, J.L.; Epinephrine-induced memory facilitation: Attenuation by adrenergic receptor antagonists. **Eur J Pharmacol** 129:189-193, 1986.

- TAKAHASHI, L.K.; NAKASHIMA, B.R.; HONG, H.; WATANABE, K.; The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. **Neurosci Biobehav Rev** 29(8):1157-67, 2005.
- TANAKA, M.; YOSHIDA, M.; EMOTO, H.; ISHII, H.; Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies; **Eur Jour Pharmacol** 405:397-406, 2000.
- THASE, M.E.; HOWLAND, R.H.; Biological processes in depression: An updated review and integration. In E. E. Beckham & W. R. Leber (Eds.), **Handbook of depression**, 2<sup>a</sup>ed., New York: Guilford Press, 1995.
- THOMPSON, R.F., SPENCER, W.A., Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. **Psychol Rev** 73, 16-43, 1966.
- TIRINDELLI, R.; MUCIGNAT-CARRETA, C.; RYBA, N.J.P.; Molecular aspects of pheromonal communication via the vomeronasal organ of mammals. **Trends Neurosci** 21:482-486, 1998.
- VAIVA, G.; DUCROCQ, F.; JEZEQUEL, K.; AVERLAND, B.; LESTAVEL, P.; BRUNET, A.; MARMAR, C.R.; Immediate treatment with propranolol decreases posttraumatic stress disorder two months after trauma. **Biol Psychiatry** 54(9):947-9, 2003.
- VAN STEGEREN, A.H.; EVERAERD, W.; CAHILL, L.; MCGAUGH, J.L.; GOOREN, L.J.G.; Memory for emotional events: differential

effects of centrally versus peripherally acting b-blocking agents. **Psychopharmacology** 138:305-310, 1998.

WALLACE, K.J.; ROSEN, J.B.; Predator odor as an unconditioned fear stimulus in rats: elicitation of freezing by trimethylthiazoline, a component of fox feces. **Behav Neurosci** 114:912-922, 2000.

WALLUKAT, G.; The beta-adrenergic receptors. **Herz** 27(7):683-90, 2002.

WATANABE, T.; NAKAGAWA, T.; YAMAMOTO, R.; MAEDA, A.; MINAMI, M.; SATOH, M.; Involvement of noradrenergic system within the central nucleus of the amygdala in naloxone-precipitated morphine withdrawal-induced conditioned place aversion in rats. **Psychopharmacology** 170(1):80-8, 2003.

YARDLEY, C.P.; HILTON, S.M.; The hypothalamic and brainstem areas from which the cardiovascular and behavioural components of the defense reaction are elicited in the rat. **J Auton Nerv Syst** 15:227-44, 1986.

ZANGROSSI, H.JR.; FILE, S.E.; Chlordiazepoxide reduces the generalised anxiety, but not the direct responses, of rats exposed to cat odor. **Pharmacol Biochem Behav** 43:1195-1200, 1992.

ZANGROSSI, H.JR.; FILE, S.E.; Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. **Brain Res Bull** 29:381-388, 1992a.



## 8. APÊNDICE

Tabela 1. Esquema representativo das drogas e momento de injeção dos diferentes grupos experimentais formados no Experimento III.

Droga	30 min	ODOR DE GATO	24 h	Droga	30 min	CONTEXTO
Sal	→	Exposição	⇒	Sal	→	Exposição
Sal	→	Exposição	⇒	Prop	→	Exposição
Prop	→	Exposição	⇒	Prop	→	Exposição
Prop	→	Exposição	⇒	Sal	→	Exposição
Sal	→	Exposição	⇒	Nad	→	Exposição
Nad	→	Exposição	⇒	Nad	→	Exposição
Nad	→	Exposição	⇒	Sal	→	Exposição

Tabela 3 - Comparação da resposta defensiva entre os grupos controle (odor neutro), salina e midazolam. Valores em média  $\pm$  e.p.m. e mediana  $\pm$  i.i. \* $p < 0,05$  em comparação com o grupo salina # $p < 0,05$  em comparação com o grupo controle. Legendas: N°= número; T'= tempo; Ap.= aproximação; Esc= escondido;

PARÂM	FAMILIARIZAÇÃO			ODOR DE GATO			CONTEXTO		
	Cont	Sal	MDZ	Cont	Sal	MDZ	Cont	Sal	MDZ
<b>COMPORTAMENTO DEFENSIVO</b>									
T'Ap (%)	32,3 $\pm$ 4,0	31,3 $\pm$ 3,4	29,7 $\pm$ 6,2	36,3 $\pm$ 2,2	9,7 $\pm$ 2,4#	33,8 $\pm$ 5,0*	34,8 $\pm$ 2,4	9 $\pm$ 1,4#	23,8 $\pm$ 5,9*
T'Esc(%)	36,3 $\pm$ 5,1	31 $\pm$ 4,4	35,5 $\pm$ 4,9	36,08 $\pm$ 4,5	81,5 $\pm$ 4,5#	30,68 $\pm$ 6,4*	39,9 $\pm$ 5,4	83,8 $\pm$ 2,0#	42,3 $\pm$ 7,9*
T'Ap(s)	192,2 $\pm$ 24,33	188,2 $\pm$ 20,4	178,6 $\pm$ 37,4	218,3 $\pm$ 13,2	58,4 $\pm$ 14,5#	203,1 $\pm$ 30,5*	208,8 $\pm$ 14,8	54,3 $\pm$ 8,5#	142,8 $\pm$ 35,5*
T'Esc(s)	218,1 $\pm$ 31,6	186,2 $\pm$ 26,4	213,3 $\pm$ 29,9	216,5 $\pm$ 27,3	489,1 $\pm$ 27,4#	184,1 $\pm$ 38,9*	239,8 $\pm$ 32,6	503,2 $\pm$ 12,4#	254,1 $\pm$ 47,7*
<b>ATIVIDADE EXPLORATÓRIA</b>									
N° Ap	14,5 (11-15,5)	14 (13-15)	11 (9-13)	12 (11-12,5)	7 (2-9) #	12 (9,5-14,5) *	14,5 (9,5-16)	5 (4-5) #	7 (6-13) *
Cruzamentos	21 (17-24)	21 (21-23)	18 (15-21)	19,5 (18,5-21,5)	13 (4-15) #	17 (14,5-22,5) *	24 (15,5-26)	9 (7-11) #	13,5 (12,5-18,5) *
<b>AVALIAÇÃO DE RISCO</b>									
Head-out	12,2 $\pm$ 2,8	11,6 $\pm$ 3,9	22,5 $\pm$ 5,8	10,3 $\pm$ 3,1	64,3 $\pm$ 25,6#	22,6 $\pm$ 11,5*	18 $\pm$ 4,9	40,7 $\pm$ 10,2#	33,2 $\pm$ 9,8*

TABELA 4 - Comparação da resposta defensiva entre os grupos Salina, Propranolol e Nadolol durante a familiarização e a exposição ao odor de gato. Anova seguida de Newman Keuls - valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. para os parâmetros tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de head-out. Kruskal Wallis seguido de Mann Whitney - valores expressos em mediana  $\pm$  i.q. para os parâmetros número de aproximações e cruzamentos. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina. *Legendas:* N°=Número; T'=Tempo; Aprox.=Aproximação.

<b>Parâmetros</b>	<b>Salina</b>	<b>Propranolol</b>	<b>Nadolol</b>
<b>FAMILIARIZAÇÃO</b>			
<b>COMPORTAMENTO DEFENSIVO</b>			
T' de Aprox. (%)	28,5 $\pm$ 1,7	30,3 $\pm$ 1,8	31,9 $\pm$ 2,3
T' Escondido (%)	32,0 $\pm$ 2,5	33,5 $\pm$ 2,2	29,7 $\pm$ 2,3
T' de Aprox. (s)	171,2 $\pm$ 10,2	182,1 $\pm$ 10,8	191,9 $\pm$ 13,8
T' Escondido (s)	192,4 $\pm$ 15,0	201,2 $\pm$ 13,5	178,6 $\pm$ 14,1
<b>ATIVIDADE EXPLORATÓRIA</b>			
N° de Aprox.	14 (10-16)	13 (12-15)	12,5 (10-14)
Cruzamentos	23 (20-26)	22,5 (20-26)	21 (20-22)
<b>AVALIAÇÃO DE RISCO</b>			
Head-out	16,7 $\pm$ 2,4	14,8 $\pm$ 2,9	11,8 $\pm$ 3,07
<b>ODOR DE GATO</b>			
<b>COMPORTAMENTO DEFENSIVO</b>			
T' de Aprox. (%)	9,6 $\pm$ 1,2	36,6 $\pm$ 4,1*	8,1 $\pm$ 0,9
T' Escondido (%)	80,2 $\pm$ 2,4	41,7 $\pm$ 5,6*	84,1 $\pm$ 1,8
T' de Aprox. (s)	57,6 $\pm$ 7,7	220,1 $\pm$ 24,6*	48,6 $\pm$ 5,7
T' Escondido (s)	481,7 $\pm$ 14,5	250,5 $\pm$ 33,7*	504,8 $\pm$ 11,2
<b>ATIVIDADE EXPLORATÓRIA</b>			
N° de Aprox.	5 (3-8)	10,5 (9-12) *	4,5 (3-5)
Cruzamentos	11 (6-14)	17 $\pm$ (15-19) *	8,5 (6-11)
<b>AVALIAÇÃO DE RISCO</b>			
Head-out	63,0 $\pm$ 9,5	14 $\pm$ 3,2*	76,5 $\pm$ 11,1

TABELA 5 - Comparação da resposta defensiva entre os grupos Sal/Sal, Sal/Prop, Prop/Prop, Prop/Sal, Sal/Nad, Nad/Nad e Sal/Nad durante a exposição ao contexto. Anova seguida de Newman Keuls - valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. para os parâmetros tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de *head-out*. Kruskal Wallis seguido de Mann Whitney - valores expressos em mediana  $\pm$  i.q. para os parâmetros número de aproximações e cruzamentos. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina. *Legendas:* Sal=Salina, Prop=Propranolol, Nad=Nadolol, Parâm=Parâmetro, N°=número; T'=Tempo; Ap.=Aproximação; Esc=Escondido, Cruz.=Cruzamentos; Comp.= Comportamento; Av. Avaliação; Explor.=Exploratória

Parâm	Sal/Sal	Sal/Prop	Prop/Prop	Prop/Sal	Sal/Nad	Nad/Nad	Nad/Sal
<b>COMP. DEFENSIVO</b>							
T' Ap. (%)	9,0 $\pm$ 1,41	11,6 $\pm$ 1,7	37,7 $\pm$ 4,7*	27 $\pm$ 3,9*	4,9 $\pm$ 0,8	5,1 $\pm$ 0,9	9,9 $\pm$ 1,7
T' Esc (%)	83,8 $\pm$ 2,0	70,8 $\pm$ 4	35,7 $\pm$ 5,9*	50,9 $\pm$ 7,2*	86,1 $\pm$ 3,1	86,8 $\pm$ 1,6	81,1 $\pm$ 3,1
T' Ap. (s)	54,3 $\pm$ 8,50	69,8 $\pm$ 10,7	226,4 $\pm$ 28,7*	162 $\pm$ 23,5*	29,6 $\pm$ 5	30,6 $\pm$ 5,7	59,4 $\pm$ 10,6
T' Esc. (s)	503,2 $\pm$ 12,4	425,1 $\pm$ 24,4	214,4 $\pm$ 35,6*	305,4 $\pm$ 43,3*	516,6 $\pm$ 19	521,2 $\pm$ 10	487,1 $\pm$ 19,1
<b>ATIVIDADE EXPLOR.</b>							
N° de Ap.	5 (4-5)	7 (6-9)	12 (9- 14)*	11 (3-14)	3 (3-4)	4 (3-4,5)	5 (3-5)
Cruz.	9 (7-11)	14 (11- 17)	20 (17-21)*	18 (7-24)	6 (5-8)	8 (6-9,5)	8 (6-12)
<b>AVALIAÇÃO DE RISCO</b>							
Head-out	40,7 $\pm$ 10,2	50 $\pm$ 22,8	16,5 $\pm$ 3,2	33,2 $\pm$ 7,6	52,2 $\pm$ 5,7	44,3 $\pm$ 8,6	47,8 $\pm$ 5,3

TABELA 6 - Comparação da resposta defensiva entre os grupos PBS (controle), A10 (atenolol 10 nmol no PMd), A40 (atenolol 40 nmol no Pmd) e Afo (atenolol fora do PMd) durante a familiarização e a exposição ao odor de gato. Anova seguida de Newman Keuls - valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. para os parâmetros tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de *head-out*. Kruskal Wallis seguido de Mann Whitney - valores expressos em mediana  $\pm$  i.q. para os parâmetros número de aproximações e cruzamentos. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina. Legenda: PARÂM=Parâmetros, N°= número; T'= tempo; Ap.= aproximação; Esc= escondido; Cruz. Cruzamentos, Comport.=Comportamento; Explor.= Exploratória.

PARÂM	FAMILIARIZAÇÃO				ODOR DE GATO			
	PBS	A10	A40	Afo	PBS	A10	A40	Afo
<b>COMPORT. DEFENSIVO</b>								
T' Ap. (%)	25,3 $\pm$ 1,8	29,3 $\pm$ 2,3	30,3 $\pm$ 2,7	27,9(1,86)	6,5 $\pm$ 1,73	31 $\pm$ 4,74*	31,8 $\pm$ 4,1*	11,2 $\pm$ 4,1
T' Esc. (%)	44,8 $\pm$ 6,3	34 $\pm$ 3,2	41,3 $\pm$ 4,1	40,3(4,34)	87,4 $\pm$ 3,14	39,6 $\pm$ 7,01*	41 $\pm$ 5,5*	78 $\pm$ 6,3
T' Ap. (s)	152,2 $\pm$ 11,2	176 $\pm$ 14,3	182,2 $\pm$ 16,3	167,8 $\pm$ 11,9	39,12 $\pm$ 10,4	186,5 $\pm$ 28,4*	191 $\pm$ 24,7*	67,4 $\pm$ 24,8
T' Esc. (s)	269 $\pm$ 38,3	204 $\pm$ 19,4	247,8 $\pm$ 25	241,9 $\pm$ 26	524,7 $\pm$ 18,8	238,0 $\pm$ 42,1*	246 $\pm$ 33,1*	468,2 $\pm$ 38,1
<b>ATIVIDADE EXPLOR.</b>								
N° Ap	12,5(10,5-14,5)	13(11-16)	9(8-14)	12(10-15)	3(1,5-5)	19(14-21)*	14(11-22)*	3(1-8)
Cruz.	20,5(18-24)	21(20-23)	16(14-21)	19(18-22)	6(3-10)	31(26-33)*	21(18-37)*	8(2-13)
<b>AVALIAÇÃO DE RISCO</b>								
Head-out	22 $\pm$ 5,1	15,4 $\pm$ 4,9	11,8 $\pm$ 2,39	14,3 $\pm$ 3,5	115,3 $\pm$ 24,6	6 $\pm$ 2,07*	8,2 $\pm$ 4,75*	104,6 $\pm$ 22,1

TABELA 7 - Comparação da resposta defensiva entre os grupos PBS (controle), A10 (Atenolol 10 nmol no PMd), A40 (Atenolol 40 nmol no Pmd) e Afo (Atenolol fora do PMd) durante o contexto. Anova seguida de Newman Keuls - valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. para os parâmetros tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de *head-out*. Kruskal Wallis seguido de Mann Whitney - valores expressos em mediana  $\pm$  i.q. para os parâmetros número de aproximações e cruzamentos. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina. Legenda: N°= número; T'= tempo; Aprox.= aproximação; Esc= escondido.

PARÂMETROS	CONTEXTO			
	PBS	ATE10	ATE40	ATE-FORA
<b>COMPORTAMENTO DEFENSIVO</b>				
T´Aprox. (%)	11,8 $\pm$ 1,8	32,8 $\pm$ 3,89*	29,4 $\pm$ 4,67*	17,5 $\pm$ 3,61
T´Esc. (%)	79,2 $\pm$ 2,2	29,7 $\pm$ 6,7*	42,8 $\pm$ 9,13*	65,7 $\pm$ 4,8
T´Aprox. (s)	71,3 $\pm$ 10,8	197,1 $\pm$ 23,3*	176,8 $\pm$ 28,05*	105 $\pm$ 21,7
T´Esc. (s)	475,4 $\pm$ 13,5	178,5 $\pm$ 40,7*	257,2 $\pm$ 54,7*	394,2 $\pm$ 29
<b>ATIVIDADE EXPLORATÓRIA</b>				
N° Aprox.	5 (4-8)	12 (10-13) *	8 (6-9)	5 (3-6)
Cruzamentos	11 (8-15)	18 (14-20) *	13 (9-16)	10 (7-14)
<b>AVALIAÇÃO DE RISCO</b>				
<i>Head-out</i>	32,8 $\pm$ 7,4	16,8 $\pm$ 4,7*	25 $\pm$ 11,4	57 $\pm$ 9,5

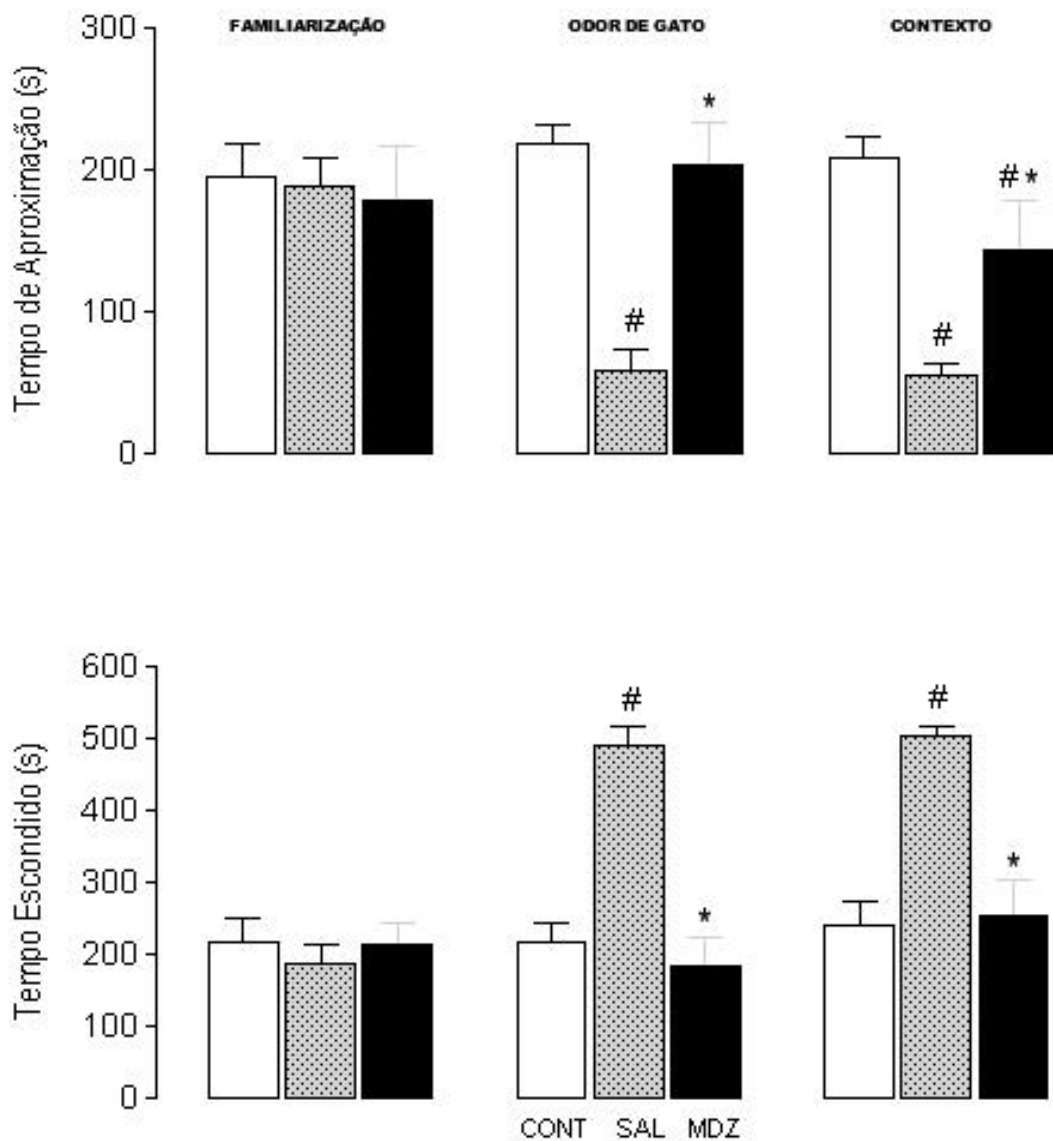


Figura 19. Avaliação comportamental dos grupos controle (odor neutro), salina e midazolam (0,25 mg/Kg, i.p., 30 min antes) durante a exposição ao odor e ao contexto nos parâmetros tempo de aproximação (s) e tempo escondido (s). # $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina;  $n = 8-9$ . Valores em média  $\pm$  e.p.m..

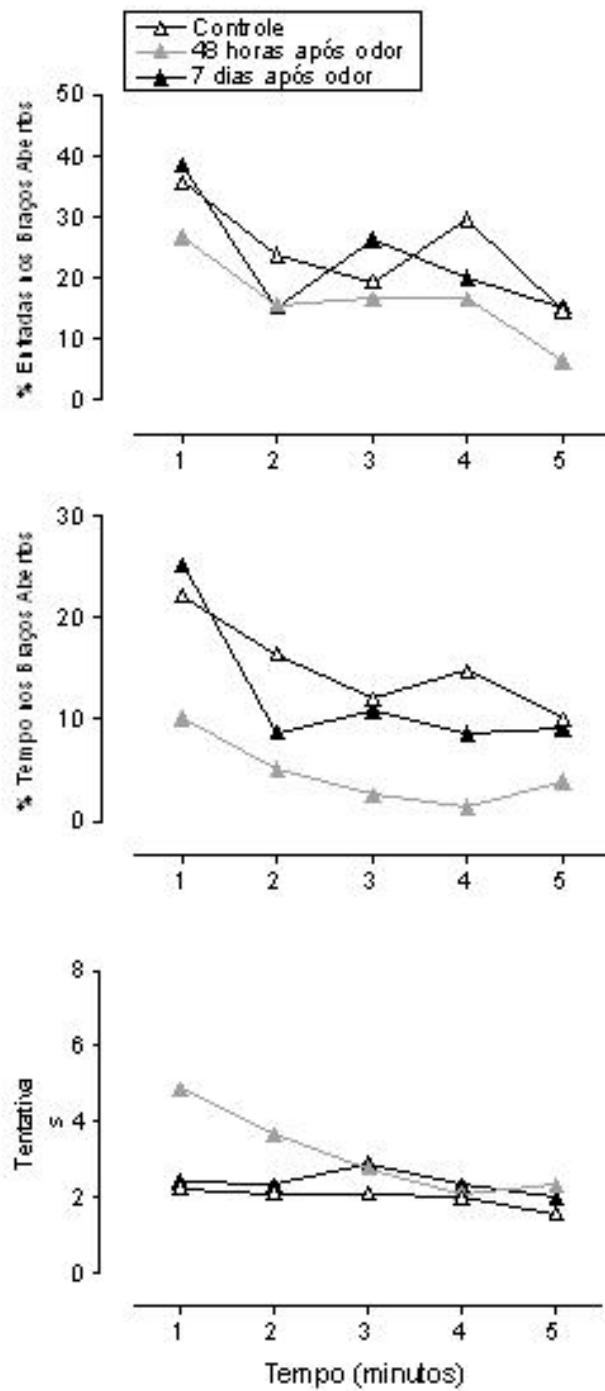


Figura 20. Traçado minuto a minuto dos parâmetros % de entradas e de tempo nos braços abertos e número de tentativas efetuadas no LCE nos grupos Controle (exposto ao LCE 48 h após o odor neutro) e nos grupos expostos ao LCE 48 h e 7 dias após o odor de gato.

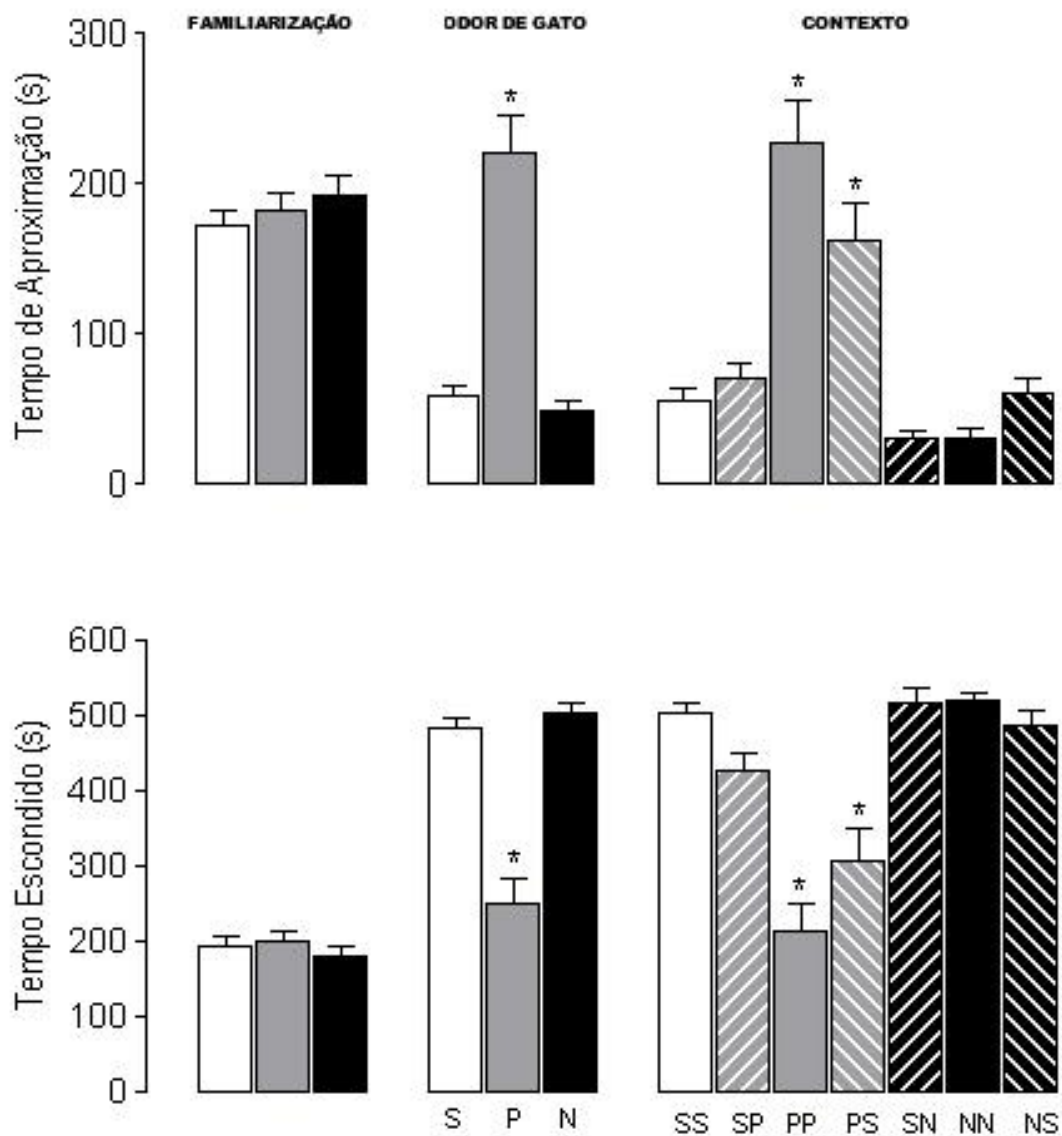


Figura 21. Avaliação do comportamento defensivo dos grupos Salina (Sal), Propranolol (Prop) e Nadolol (Nad) durante a exposição ao odor de gato e ao contexto nos parâmetros tempo de aproximação (em segundos) e tempo escondido (em segundos). Anova seguida de Newmann Keuls - valores expressos em média  $\pm$  e.p.m.; \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina;  $n = 18-27$  (odor de gato),  $n = 7-11$  (contexto). Legenda: S=Salina; P=Propranolol; N=Nadolol.



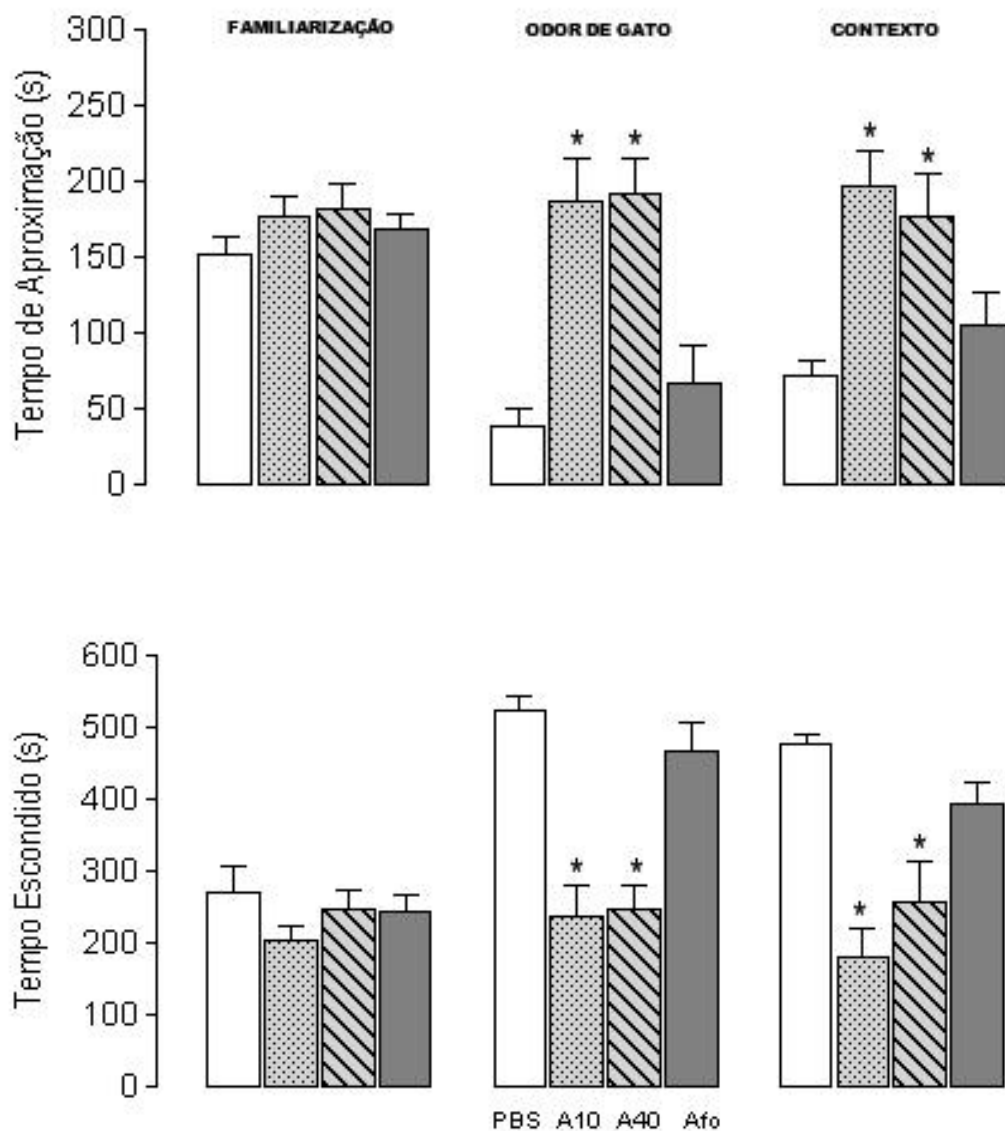


Figura 22. Avaliação do comportamento defensivo dos grupos PBS (Controle), A10 (Atenolol 10 nmol no PMd), A40 (Atenolol 40 nmol no PMd) e Afo (Atenolol fora do PMd) durante a exposição ao odor de gato e ao contexto nos parâmetros tempo de aproximação (em segundos) e tempo escondido (em segundos). Anova seguida de Newman Keuls - valores expressos em média  $\pm$  e.p.m.; \* $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS;  $n = 7-15$ .