

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

**EFEITOS DO MIDAZOLAM, PROPRANOLOL E ESCOPOLAMINA
EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE
CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO DO MEDO**

JULIANA AMORIM VIEIRA KROON

Florianópolis, SC

2007

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

**EFEITOS DO MIDAZOLAM, PROPRANOLOL E ESCOPOLAMINA
EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE
CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO DO MEDO**

JULIANA AMORIM VIEIRA KROON

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

2007

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

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez pela oportunidade de realizar pesquisa sob sua valiosa orientação, pelo incentivo e amizade presentes durante todo período de convívio em seu laboratório.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia pelos ensinamentos que contribuíram sobremaneira para a minha formação científica.

Aos professores Dr. Francisco Silveira Guimarães, Dr. Carlos Rogério Tonussi e Dr. Leandro José Bertoglio pela disponibilidade e colaboração para o aprimoramento deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Neurobiologia Comportamental Cladis, Cláudia, Cris, Eloisa, Fibrico, Grasi, Ju Cavalli, Lu, Tati e Xima pelo apoio, amizade e agradável convivência durante estes anos.

Aos funcionários do departamento e demais colegas da pós-graduação.

Aos meus queridos pais, Valentim e Maria do Carmo, e meu adorado irmão, Fábio, pelo carinho, apoio e incentivo dedicados em todos os momentos.

Ao meu amado marido, Alexander, por estar sempre ao meu lado me trazendo amor e equilíbrio.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Enfim, a todas as pessoas que de uma maneira ou outra, colaboraram na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1- INTRODUÇÃO	1
1.1 Condicionamento de Medo	2
1.2 Condicionamento Olfatório de Medo	5
1.2.1 Circuitos Neuroanatômicos	6
1.2.2 Respostas Comportamentais x Estruturas Neuroanatômicas	7
1.3 Sistema GABAérgico e o Medo Condicionado	9
1.4 Sistema Noradrenérgico e o Medo Condicionado	11
1.5 Sistema Colinérgico e o Medo Condicionado	13
2- OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos Específicos	16
3- MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Animais	17
3.2 Drogas e substâncias	17
3.3 Equipamentos	18
3.3.1 Caixa de Condicionamento	18
3.3.2 Caixa de Teste (Avaliação do medo condicionado)	18
3.4 Procedimentos e Protocolos Experimentais	19
3.4.1 Condicionamento Olfatório de Medo	20
3.4.2 Avaliação do Medo Condicionado	20
3.4.2.1 Parâmetros relacionados ao Comportamento Defensivo	21
3.4.3 Etapa I - Padronização do Modelo de Condicionamento Olfatório de Medo	22
3.4.4 Etapa II – Análise Farmacológica	24
3.4.4.1 Avaliação do efeito do midazolam sobre a aquisição, a consolidação e a expressão do condicionamento olfatório de medo	24

3.4.4.2 Avaliação do efeito do propranolol-----	24
sobre a aquisição, a consolidação e a expressão do condicionamento olfatório de medo	
3.4.4.3 Avaliação do efeito da escopolamina-----	24
sobre a aquisição, a consolidação e a expressão do condicionamento olfatório de medo	
3.5 Análise Estatística-----	26
4- RESULTADOS-----	27
4.1 Etapa I - Padronização do Modelo de Condicionamento-----	27
Olfatório de Medo	
4.2 Etapa II – Análise Farmacológica-----	34
5- DISCUSSÃO-----	58
6- SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS-----	69
7- CONCLUSÃO-----	70
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	71

LISTA DE ABREVIACES

ABL – Amígdala basolateral
ADP – Adenosina trifosfato
AM – Amígdala medial
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA – Análise de variância
BO – Bulbo olfatório
EC – Estímulo condicionado
EI – Estímulo incondicionado
e.p.m. – erro padrão da média
Escop - Escopolamina
GABA – cido gama-aminobutírico
LC – Locus coeruleus
Mdz - Midazolam
NTS – Núcleo do trato solitário
Prop - Propranolol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo da caixa de condicionamento-----	18
Figura 2 – Esquema representativo da caixa de teste-----	19
Figura 3 – Esquema do procedimento utilizado----- para avaliação do grupo café sem choque	22
Figura 4 – Esquema do procedimento utilizado----- para avaliação do grupo não pareado	23
Figura 5 – Esquema do procedimento utilizado----- para avaliação do grupo pareado	23
Figura 6 – Esquema do procedimento utilizado----- para avaliação do efeito do midazolam, do propranolol e da escopolamina sobre a aquisição do condicionamento olfatório de medo.	25
Figura 7 – Esquema do procedimento utilizado----- para avaliação do efeito do midazolam, do propranolol e da escopolamina sobre a consolidação do condicionamento olfatório de medo.	25
Figura 8 – Esquema do procedimento utilizado----- para avaliação do efeito do midazolam, do propranolol e da escopolamina sobre a expressão do condicionamento olfatório de medo.	25
Figura 9 – Avaliação do medo condicionado olfatório,----- através dos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco, dos grupos café sem choque, pareado e não pareado durante a re-exposição ao odor de café na sessão de teste. O condicionamento foi realizado com 1, 2 e 3 pareamentos.	29
Figura 10 – Avaliação do medo condicionado olfatório,----- através dos parâmetros freqüência de aproximações e freqüência de cruzamentos, dos grupos café sem choque, pareado e não pareado durante a re-exposição ao odor de café na sessão de teste. O	30

condicionamento foi realizado com 1, 2 e 3 pareamentos.

Figura 11 – Avaliação do medo condicionado,-----32
através dos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e
tempo de avaliação de risco, dos grupos café sem choque, pareado e não
pareado na sessão de teste e sessão de contexto.
O condicionamento foi realizado com 5 pareamentos.

Figura 12 – Avaliação do medo condicionado,-----33
através dos parâmetros freqüência de aproximações e freqüência de
cruzamentos, dos grupos café sem choque, pareado e não
pareado na sessão de teste e sessão de contexto.
O condicionamento foi realizado com 5 pareamentos.

Figura 13 – Avaliação do medo condicionado-----35
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros
% de tempo de aproximação, % de tempo escondido e
tempo de avaliação de risco, dos grupos midazolam 0,375; 0,5 mg/kg/ml e
salina administrados antes do condicionamento.

Figura 14 – Avaliação do medo condicionado-----36
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros
freqüência de aproximações e freqüência de cruzamentos dos grupos
midazolam 0,375; 0,5 mg/kg/ml e
salina administrados antes do condicionamento.

Figura 15 – Avaliação do medo condicionado-----38
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros
% de tempo de aproximação, % de tempo escondido e
tempo de avaliação de risco, dos grupos midazolam 0,375; 0,5 mg/kg/ml e
salina administrados após o condicionamento.

Figura 16 – Avaliação do medo condicionado-----39
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros
freqüência de aproximações e freqüência de cruzamentos dos grupos
midazolam 0,375; 0,5 mg/kg/ml e
salina administrados após o condicionamento.

Figura 17 – Avaliação do medo condicionado-----	40
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco, dos grupos midazolam 0,375; 0,5 mg/kg/ml e salina administrados antes do teste.	
Figura 18 – Avaliação do medo condicionado-----	41
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros freqüência de aproximações e freqüência de cruzamentos dos grupos midazolam 0,375; 0,5 mg/kg/ml e salina administrados antes do teste.	
Figura 19 – Avaliação do medo condicionado-----	44
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco, dos grupos propranolol 5,0; 10,0 mg/kg/ml e salina administrados antes do condicionamento.	
Figura 20 – Avaliação do medo condicionado-----	45
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros freqüência de aproximações e freqüência de cruzamentos dos grupos propranolol 5,0; 10,0 mg/kg/ml e salina administrados antes do condicionamento.	
Figura 21 – Avaliação do medo condicionado-----	46
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco, dos grupos propranolol 5,0; 10,0 mg/kg/ml e salina administrados após o condicionamento.	
Figura 22 – Avaliação do medo condicionado-----	47
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros freqüência de aproximações e freqüência de cruzamentos dos grupos propranolol 5,0; 10,0 mg/kg/ml e salina administrados após o condicionamento.	
Figura 23 – Avaliação do medo condicionado-----	48
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco, dos grupos propranolol 5,0; 10,0 mg/kg/ml e	

salina administrados antes do teste.

Figura 24 – Avaliação do medo condicionado-----49
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros
freqüência de aproximações e freqüência de cruzamentos dos grupos
propranolol 5,0; 10,0 mg/kg/ml e salina
administrados antes do teste.

Figura 25 – Avaliação do medo condicionado-----51
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros
% de tempo de aproximação, % de tempo escondido e
tempo de avaliação de risco, dos grupos escopolamina 0,6 e 1,2 mg/kg/ml e
salina administrados antes do condicionamento.

Figura 26 – Avaliação do medo condicionado-----52
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros
freqüência de aproximações e freqüência de cruzamentos dos grupos
escopolamina 0,6 e 1,2 mg/kg/ml e salina
administrados antes do condicionamento.

Figura 27 – Avaliação do medo condicionado-----54
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros
% de tempo de aproximação, % de tempo escondido e
tempo de avaliação de risco, dos grupos escopolamina 0,6 e 1,2 mg/kg/ml e
salina administrados após o condicionamento.

Figura 28 – Avaliação do medo condicionado-----55
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros
freqüência de aproximações e freqüência de cruzamentos dos grupos
escopolamina 0,6 e 1,2 mg/kg/ml e salina
administrados após o condicionamento.

Figura 29 – Avaliação do medo condicionado-----56
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros
% de tempo de aproximação, % de tempo escondido e
tempo de avaliação de risco, dos grupos escopolamina 0,6 e 1,2 mg/kg/ml e
salina administrados antes do teste.

Figura 30 – Avaliação do medo condicionado-----57
na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros
frequência de aproximações e frequência de cruzamentos dos grupos
escopolamina 0,6 e 1,2 mg/kg/ml e salina
administrados antes do teste.

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Valores de referência dos parâmetros que avaliam a resposta defensiva de ratos confrontados com o odor de predador durante a padronização do modelo de odor de gato	27
--	----

RESUMO

Experiências de medo podem estabelecer memórias emocionais que resultam em mudanças comportamentais. Muitos neurotransmissores parecem estar envolvidos com a aquisição, consolidação e expressão do medo e de suas respostas defensivas. O condicionamento de medo Pavloviano tem sido amplamente utilizado para o estudo das bases neuroanatômicas, celulares e moleculares do medo. Este paradigma é fundamentado na associação entre um estímulo emocionalmente neutro e um estímulo incondicionado aversivo (EI). Após um ou alguns pareamentos, o estímulo condicionado (EC), que inicialmente era neutro, adquire a capacidade de gerar respostas defensivas que tipicamente ocorrem na presença de perigo. Em roedores, as respostas condicionadas parecem ocorrer de forma mais pronunciada frente a estímulos olfatórios, uma vez que a olfação é o principal sentido destes animais. O objetivo principal do presente estudo foi avaliar o efeito do midazolam, do propranolol e da escopolamina sobre as etapas de aquisição, consolidação e expressão da memória de medo utilizando o odor de café como estímulo olfatório no modelo de condicionamento de medo. Para este propósito, foi realizada inicialmente a padronização do modelo dentro das condições experimentais do laboratório. Em seguida, foi avaliado o papel da neurotransmissão GABAérgica, beta-adrenérgica e colinérgica no modelo de condicionamento olfatório de medo. Nestas etapas, foram utilizados um benzodiazepínico, midazolam, um antagonista beta-adrenérgico, propranolol e um antagonista muscarínico, escopolamina, todos com ações farmacológicas centrais. Os resultados demonstraram que a utilização de cinco associações entre o odor de café (EC) e o choque elétrico nas patas (EI) promoveu a expressão de uma robusta resposta condicionada de medo quando os animais foram reapresentados ao estímulo condicionado e ao ambiente onde ocorreu esta re-exposição. A aquisição do medo condicionado olfatório foi prejudicada pela administração de midazolam e escopolamina, ao passo que, a consolidação da memória de medo foi atenuada apenas pelo midazolam. As respostas defensivas frente ao odor de café condicionado e ao contexto foram expressivamente reduzidas quando a escopolamina foi administrada antes da re-exposição ao estímulo olfatório. A administração de propranolol atenuou o padrão comportamental defensivo frente ao odor de café condicionado e ao contexto, prejudicando as etapas de formação e expressão do medo condicionado com pista olfatória e a formação do medo condicionado contextual.

ABSTRACT

A fearful experience can establish an emotional memory that results in behavioral changes. Several neurotransmitters seem to be involved in acquisition, consolidation and expression of fear and related defensive responses. Pavlovian fear conditioning has been widely used to study the anatomical, cellular and molecular bases of fear. Fear conditioning occurs when an emotionally neutral stimulus is presented in conjunction with an aversive unconditioned stimulus (US). After one or several pairings, the conditioned stimulus (CS), previously neutral, acquires the capacity to elicit responses that typically occur in the presence of danger. In rodents, conditioned responses are more pronounced toward olfactory stimulus, since olfaction is a dominant sense in these animals. The aim of the present study is to evaluate the effects of midazolam, propranolol and scopolamine in acquisition, consolidation and expression of fear memory using coffee odor as an olfactory stimulus in the conditioning fear model. For this purpose, the standardization of the olfactory fear conditioning was realized in accordance to the experimental conditions of the laboratory. Next, the role of GABAergic, beta-adrenergic and cholinergic system in olfactory fear conditioning was evaluated. In order to examine the effects of these neurotransmission systems, rats were given midazolam, a benzodiazepine, propranolol, a beta-blocker and scopolamine, a cholinergic antagonist, all drugs with action in central nervous system. It was found that five pairings of coffee odor and footshock resulted in robust conditioned responses to subsequent presentation of CS alone and to the context where this exposition took place. The acquisition of olfactory fear conditioning was impaired by midazolam and scopolamine administration, while the consolidation of fear memory was disrupted only by midazolam. Defensive responses toward conditioned coffee odor and context were strongly reduced when scopolamine was injected before the re-exposition to the olfactory stimulus. Propranolol reduced defensive behaviors toward conditioned coffee odor and context, producing impairment in the acquisition, consolidation and expression of fear conditioning paradigm with olfactory cue.

1- INTRODUÇÃO

As respostas defensivas, desenvolvidas e adquiridas evolutivamente, apesar de exibirem algumas características espécies-específicas, possuem padrões comportamentais semelhantes entre os mais distintos animais. Já na metade do século XIX, Charles Darwin destacou em seu trabalho sobre a expressão das emoções nos homens e nos animais que o estudo do comportamento de outras espécies permite o entendimento das emoções humanas (DARWIN, 1872). Logo, o estudo das respostas defensivas frente a estímulos de perigo é uma ferramenta importante para a elucidação das bases neurobiológicas do medo. Grande parte do conhecimento dos mecanismos envolvidos nestes processos deve-se a utilização de animais de laboratório por diversos grupos de pesquisadores em todo o mundo (GRAEFF & GUIMARÃES, 1999).

Além de auxiliar no entendimento de como as emoções influenciam o comportamento, a investigação das bases neuroquímicas e neuroanatômicas do medo é um pré-requisito no desenvolvimento de estratégias para o tratamento e cura dos transtornos de ansiedade (FENDT & FANSELOW, 1999). O medo tem 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). Determinadas ameaças, tais como a exposição ao predador natural ou a estímulos associados a estes (BLANCHARD & BLANCHARD, 1989), são responsáveis pela expressão de um conjunto de respostas comportamentais denominadas de medo inato. Entretanto, estas mesmas respostas defensivas podem ser exibidas frente a estímulos ameaçadores aprendidos. É o que ocorre quando um estímulo previamente neutro adquire propriedades aversivas após ser devidamente associado com um evento aversivo (KIM & JUNG, 2006).

Em geral, as experiências de medo são rapidamente aprendidas e lembradas por um longo período. Desta forma, o condicionamento de medo tem se tornado um excelente modelo para desvendar os processos cognitivos e os mecanismos neuronais envolvidos frente a situações ou estímulos ameaçadores (FENDT & FANSELOW, 1999). Nestas circunstâncias, os

animais utilizam como estratégia comportamental um conjunto de respostas defensivas flexíveis e adaptativas que variam desde o ataque defensivo e a fuga até a imobilização e a submissão (BLANCHARD et al., 1993).

1.1 Condicionamento de Medo

Há aproximadamente oitenta anos, Ivan Petrovich Pavlov deu início aos estudos sobre reflexos condicionados. Em seus famosos experimentos com cães, um estímulo sonoro (som de uma campainha) era emitido imediatamente antes da apresentação de um alimento. No início, o cão salivava apenas quando o alimento estava em sua boca. Após diversas sessões de pareamento do som com o alimento, a resposta de salivação passava a ocorrer de forma antecipada após o simples soar da campainha (resposta condicionada). Pavlov estabeleceu então que esta resposta era um reflexo condicionado; e passou a denominar o alimento de estímulo incondicionado e o som de estímulo condicionado (PAVLOV, 1927). Desde então, o condicionamento Pavloviano ou Clássico tem sido um modelo utilizado principalmente em estudos sobre o medo.

O condicionamento de medo ocorre quando um estímulo emocionalmente neutro é pareado com um estímulo incondicionado aversivo (EI). Após um ou alguns pareamentos o estímulo neutro adquire a capacidade de gerar respostas defensivas que tipicamente ocorrem na presença de perigo, tornando-se um estímulo condicionado (EC). Em geral, a análise do medo condicionado é realizada através da quantificação destas respostas que incluem modificações no comportamento defensivo (imobilização), alterações autonômicas (frequência cardíaca e pressão arterial) e endócrinas (liberação de hormônios) e expressão de reflexos (sobressalto potencializado pelo medo) (LEDOUX, 2000).

As respostas não são aprendidas nem voluntárias, são inatas e expressadas automaticamente na presença do estímulo apropriado. O condicionamento de medo permite que ameaças aprendidas ativem respostas de perigo adquiridas evolutivamente. O fácil estabelecimento, a rapidez do aprendizado, a longa duração da memória e a natureza estereotipada das

respostas possibilitam o estudo dos mecanismos do medo através do condicionamento Pavloviano (LEDOUX, 2003).

Os estímulos condicionados geralmente utilizados nos experimentos de condicionamento de medo são sons (FANSELOW et al., 1994; DEBIEC & LEDOUX, 2004; ROOZENDAAL et al., 2006; GRAVIUS et al., 2006), luzes (CAMPEAU & DAVIS, 1995; SHI & DAVIS, 2001; TAZUMI & OKAICHI, 2002; NEWTON et al., 2004), estímulos táteis (LEAL-CAMPANARIO et al., 2006) e odores (OTTO et al., 1997; RICHARDSON et al., 1999; PASCHALL & DAVIS, 2002; KILPATRICK & CAHILL, 2003; SEVELINGES et al., 2004). O período de exposição destes estímulos durante o pareamento varia de poucos segundos a poucos minutos e por serem bastante breves são denominados de estímulos condicionados discretos (FENDT & FANSELOW, 1999). Entretanto, respostas de medo podem estar condicionadas também ao local onde ocorreu o pareamento (RESSTEL et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007). Este ambiente, denominado contexto, é temporariamente menos fugaz, uma vez que permanece presente durante toda a sessão de condicionamento e apresenta características distintas daquelas dos estímulos em geral, como duração das respostas condicionadas (CARRIVE, 2000) e circuitaria neural envolvida no processamento da associação EC/EI (PHILLIPS & LEDOUX, 1992).

O estímulo incondicionado aversivo caracteriza-se por sua relevância biológica e sua propriedade de evocar respostas inatas de medo. Em geral, grande parte dos estudos de condicionamento de medo utiliza o choque elétrico nas patas como estímulo incondicionado (BAKER & KIM, 2004; SCHAFE et al., 2005). No entanto, outros estímulos incondicionados como a apresentação de um som intenso e a estimulação química ou elétrica de estruturas cerebrais pode ser empregada.

De maneira geral, são utilizadas várias sessões de pareamento do EC com o EI na aquisição do medo condicionado tanto contextual quanto com estímulos discretos. Contudo, respostas condicionadas podem ser adquiridas de maneira muito rápida, com apenas uma associação entre o EC e o EI, em uma única sessão de pareamento (LEE et al., 2001; DEBIEC & LEDOUX, 2004).

A memória de medo desenvolve-se e manifesta-se em diferentes estágios que depende de diferentes substratos neurais. A formação de uma memória

duradoura de medo condicionado compreende a aquisição inicial, uma consolidação rápida, que leva de segundos a minutos para acontecer, e uma consolidação a longo prazo da associação EC-EI (PEZZE & FELDON, 2004). A aquisição é o primeiro estágio do aprendizado, onde o estímulo neutro (EC) é associado com o estímulo biologicamente relevante (EI) e adquire a capacidade de provocar respostas defensivas (GARAKANI et al., 2006). A consolidação compreende a conversão da memória lábil em memória duradoura, num processo dependente de síntese protéica (MCGAUGH, 2000). A recuperação da memória de medo é o acionamento representativo da associação EC-EI – estabelecida pelo condicionamento de medo – em resposta ao EC. A expressão da memória de medo necessariamente envolve a recuperação, assim como a tradução da associação numa resposta condicionada de medo apropriada (GARAKANI et al., 2006).

A quantificação clássica do medo compreende a medida da magnitude da resposta de sobressalto e do comportamento de imobilidade condicionada. Emoções aversivas como o medo e a ansiedade aumentam a resposta de sobressalto, tornando o sobressalto potencializado pelo medo um modelo confiável de investigação do medo condicionado (DAVIS, 1990). O comportamento de imobilidade condicionada é outra maneira de avaliar o condicionamento de medo. Estímulos condicionados, como luzes ou contexto, previamente pareados com choque nas patas, normalmente induzem um aumento no comportamento de imobilidade (FANSELOW, 1980; FANSELOW & HELMSTETTER, 1988; RICHMOND et al., 1998). Outros parâmetros menos convencionais são empregados na avaliação do condicionamento de medo. Kilpatrick e Cahill (2003) utilizaram o tempo de aproximação e o número de contatos com um estímulo olfatório para avaliar o medo condicionado.

Além das alterações comportamentais, algumas modificações autonômicas associadas às respostas de defesa são visualizadas no condicionamento de medo Pavloviano. A defecação covaria com outras medidas de medo (FENDT & FANSELOW, 1999), enquanto a pressão arterial demonstra-se em geral aumentada (CARRIVE, 2006). A frequência cardíaca é bastante variável, tanto taquicardia (LEDOUX, 1984) quanto bradicardia (RICHARDSON et al., 1995) têm sido relatadas. Há ainda outros índices que caracterizam a resposta de medo. Por exemplo, ratos exibem vocalização

ultrassônica (KALTWASSER, 1991) e perda da sensibilidade à dor (CHANCE et al., 1978) quando submetidos ao medo condicionado.

1.2 Condicionamento Olfatório de Medo

O sistema olfatório dos roedores é extremamente sofisticado comparado ao dos homens. Áreas cerebrais envolvidas com o processamento olfatório são muito maiores nos roedores que nos humanos, o que presumivelmente reflete a relevância etológica do sistema olfatório nestas espécies. Os roedores em geral dependem essencialmente do olfato para encontrar alimentos ou presas, identificar indivíduos da mesma espécie, interagir socialmente, reproduzir e detectar a presença de predadores no ambiente (RESTREPO et al., 2004).

Nos roedores, a cavidade nasal possui dois epitélios quimiossensoriais distintos: o epitélio olfatório principal e o acessório. Ambos são responsáveis pela detecção de odores biologicamente relevantes (RESTREPO et al., 2004). O sistema olfatório acessório tem sido implicado na comunicação intra e interespecífica, ao passo que, o sistema olfatório principal é conhecido por detectar uma variedade de odores e revelar diferenças sutis nas suas estruturas moleculares (BRENNAN & KEVERNE, 1997). Entretanto, os dois sistemas parecem agir de forma integrada na detecção de odores comuns e feromônios (RESTREPO et al., 2004; XU et al., 2005).

Durante o desenvolvimento dos roedores, ocorre inicialmente a maturação dos sentidos tátil e olfatório, em seguida do sistema auditivo e por fim do sistema visual. De maneira similar, as respostas condicionadas ocorrem de forma mais pronunciada frente a pistas olfatórias, em seguida a pistas auditivas e finalmente a pistas visuais (RICHARDSON et al., 2000).

Além de ser o principal sentido dos roedores, a olfação exerce um papel dominante no controle do comportamento. Estudos prévios sugerem que o aprendizado olfatório tem características únicas em relação à aquisição, retenção e extinção (SLOTNICK, 2001).

Estudos demonstram que o condicionamento olfatório de medo induz robustas respostas emocionais. Otto e colaboradores (1997, 2000), medindo o comportamento de imobilização como índice de medo aprendido, relataram que o condicionamento olfatório de medo resultou numa associação robusta e de

longo prazo entre o estímulo condicionado olfatório e o estímulo incondicionado choque nas patas. Richardson (1999), e mais tarde Paschall e Davis (2002), utilizando o sobressalto potencializado pelo medo como outra medida de medo aprendido, mostraram que um odor previamente pareado com choque era particularmente um estímulo eficaz para potencializar a resposta de sobressalto em ratos. Ainda, num estudo subsequente, Richardson e colaboradores (2002) relataram que a extinção do sobressalto potencializado pelo medo aprendido ocorre mais lentamente com o uso de um estímulo condicionado olfatório.

Muitos odores são utilizados como estímulos olfatórios condicionados no condicionamento de medo, tais como anis, amêndoa (ROSENKRANZ & GRACE, 2002), piridina (OTTO et al., 2000), amilacetato (KILPATRICK & CAHILL, 2003; SEVELINGES et al., 2004; WALKER et al., 2005), óleo de cedro (FUNK & AMIR, 2000), entre outros.

1.2.1 Circuitos Neuroanatômicos

A circuitaria neural do condicionamento olfatório de medo envolve algumas estruturas semelhantes às aquelas envolvidas no condicionamento com pistas auditivas ou visuais, como áreas corticais e a amígdala, e outras particulares como o bulbo olfatório (BO). O BO principal possui densas projeções monossinápticas com núcleos do grupo corticomediais amigdalóide, incluindo os núcleos do trato lateral olfatório, o núcleo cortical da amígdala e o córtex periamigdalóide (PRICE, 1973). Estas observações levaram Swanson e Petrovich (1998) a sugerir que a amígdala corticomediais é um componente do sistema olfatório. O BO principal também se projeta para o núcleo corticomediais multissinápticamente via córtex piriforme e córtex entorrinal lateral (LUSKIN & PRICE, 1983).

Os núcleos mais profundos da amígdala, incluindo o grupo basolateral, não recebem projeções diretas do BO. Entretanto, projeções consideráveis da amígdala corticomediais e discretas do córtex piriforme olfatório são enviadas para estas regiões.

Apesar de não estar diretamente conectada ao BO, muitos estudos demonstram o importante papel da amígdala basolateral (ABL) no condicionamento olfatório de medo. Lesões excitotóxicas na ABL, tanto pré

quanto pós-pareamento, aboliram a expressão do condicionamento olfatório de medo em ratos (COUSENS & OTTO, 1998). Estes dados foram confirmados por Kilpatrick e Cahill (2003) utilizando a inativação reversível da ABL com tetrodotoxina após o pareamento. Rosenkranz e Grace (2002) observaram que repetidos pareamentos de odor-choque foram capazes de induzir uma resposta aumentada no potencial pós-sináptico de neurônios do núcleo lateral da ABL. Em adição, a microinjeção de antagonistas glutamatérgicos na ABL, antes do pareamento ou do teste, foi capaz de bloquear o condicionamento olfatório de medo (WALKER et al., 2005).

Alguns trabalhos demonstram o envolvimento de áreas corticais e de outros núcleos da amígdala no condicionamento olfatório de medo. Herzog e Otto (1997) relataram que lesões no córtex perirrinal anterior prejudicavam o condicionamento de medo com estímulo olfatório. Walker e colaboradores (2005) demonstraram que a infusão pré-teste do antagonista glutamatérgico NBQX na amígdala medial (AM) reduziu o sobressalto potencializado pelo medo, refletindo um prejuízo no condicionamento olfatório de medo. Confirmando o envolvimento destas estruturas no condicionamento olfatório de medo, estudos imunohistoquímicos revelaram um aumento na expressão da proteína Fos, um marcador de atividade neuronal, no córtex perirrinal ventral e no núcleo medial da amígdala, tanto na aquisição quanto na expressão do medo condicionado olfatório (SCHETTINO & OTTO, 2001). Este aumento nos níveis de expressão de proteína Fos foi ainda visualizado no BO principal, no BO acessório e no núcleo olfatório anterior após a apresentação do estímulo condicionado olfatório (FUNK & AMIR, 2000).

Estudos eletrofisiológicos demonstram um aumento transitório do sinal de potencial de ação no córtex piriforme posterior e ABL, enquanto um acréscimo duradouro foi visualizado no núcleo cortical amigdalóide (SEVELINGES et al., 2004).

1.2.2 Respostas Comportamentais X Estruturas Neuroanatômicas

Assim como no medo condicionado auditivo e visual, respostas condicionadas de medo, como o comportamento de imobilidade (OTTO et al., 1997; HERZOG & OTTO, 1997; COUSENS & OTTO, 1998; SEVELINGES et

al., 2004), o sobressalto potencializado pelo medo (RICHARDSON et al., 1999; PASCHALL & DAVIS, 2002; WALKER et al., 2005) e taquicardia (SANANES & CAMPBELL, 1989) são expressas no condicionamento olfatório de medo. Anatomicamente, a ABL está interconectada ao núcleo central da amígdala que envia projeções para estruturas hipotalâmicas e do tronco cerebral envolvidas na mediação de respostas específicas de medo (KIM & JUNG, 2006). Projeções para a substância cinzenta periaquedutal estão envolvidas na mediação da resposta condicionada de sobressalto potencializado pelo medo (FENDT et al., 1996), comportamento de imobilidade (DE OCA et al., 1998) e analgesia induzida pelo medo (HELMSTETTER & TERSHNER, 1994). Além disso, o núcleo cortical amigdalóide possui densas projeções para o hipotálamo, favorecendo o desenvolvimento de respostas defensivas rápidas na presença do estímulo condicionado olfatório (SEVELINGES et al., 2004).

Recentemente, um trabalho realizado neste laboratório, em parceria com o Dr. Newton Canteras, avaliou a expressão de Fos após a evocação das respostas de medo relacionadas ao estímulo olfatório condicionado. Foi observado que o grupo de animais submetido ao pareamento, ao ser comparado ao grupo apenas exposto ao estímulo olfatório, quando re-exposto ao EC olfatório, exibiu uma expressão significativa de Fos na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral e no núcleo pré-mamilar dorsal, estrutura integrante do Sistema Defensivo Hipotalâmico Medial (CANTERAS, 2002) – circuito ativado durante a exposição ao predador ou ao odor do predador. Com base nos dados acima evidenciados, CANTERAS* sugere que o estímulo olfatório, através de projeções enviadas pelo bulbo olfatório principal, alcançaria a amígdala e, a partir desta estrutura, via hipocampo ventral, a informação olfatória atingiria o núcleo septal. O núcleo septal, por sua vez, exibe projeções para regiões hipotalâmicas, dentre elas o núcleo pré-mamilar dorsal. A ativação do núcleo pré-mamilar dorsal seria importante na expressão de respostas defensivas frente ao estímulo olfatório condicionado.

*CANTERAS, N.S. (Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo) Comunicação pessoal, 2007.

1.3 Sistema GABAérgico e o Medo Condicionado

O GABA (ácido gama-aminobutírico) é o principal aminoácido inibitório do sistema nervoso central. Estruturas envolvidas na modulação da ansiedade e do medo, como o hipocampo, a substância cinzenta periaquedutal e a amígdala contêm importantes redes de interneurônios GABAérgicos, assim como projeções neuronais GABAérgicas (SANGER, 1985; SHEPARD, 1986, 1987; CHERUBINI & CONTI, 2001; MODY, 2001; MILLAN, 2003).

As vias GABAérgicas são ubiqüitárias no sistema nervoso central, portanto, todos os sistemas de neurotransmissão, inclusive mediadores de ações ansiogênicas podem ser influenciados pela neurotransmissão GABAérgica. Interneurônios GABAérgicos localizados em grupos celulares do *locus coeruleus* são ativados na tentativa de controlar a atividade noradrenérgica exacerbada no medo condicionado (ISHIDA et al., 2002). Observa-se que a administração de antagonistas GABAérgicos potencializa a liberação de noradrenalina na amígdala induzida pela emissão de choque elétrico nas patas (QUIRARTE et al., 1998).

O GABA ativa dois tipos de receptores: os ionotrópicos GABA_A e GABA_C e o metabotrópico GABA_B. Embora ainda não existam evidências do envolvimento dos receptores GABA_B e GABA_C, o receptor GABA_A está intimamente relacionado aos transtornos de ansiedade (NEMEROFF, 2003).

O receptor GABA_A é uma glicoproteína transmembrana hetero-oligomérica composta de 5 subunidades, classificadas em diversas famílias (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , θ , ρ 1-3), num arranjo pentamérico ao redor de um canal central seletivamente permeável a íons cloreto. Após a ativação, o influxo de íons cloreto é aumentado e a membrana torna-se hiperpolarizada, resultando na inibição neuronal (NEMEROFF, 2003). Esta ação é modulada por sítios alostéricos localizados diferentemente nas subunidades, dentre eles destaca-se o sítio de reconhecimento dos benzodiazepínicos, localizado na interface entre as subunidades α e γ 2 dos receptores GABA. O sítio de reconhecimento dos benzodiazepínicos nos receptores GABA_A é distinto do sítio de ligação do GABA no complexo canal iônico/receptor. Os benzodiazepínicos não ativam diretamente os receptores GABA_A, mas requerem o GABA para expressar seus efeitos (CHARNEY et al., 2001). Eles potencializam seletivamente os efeitos do

GABA sobre os receptores GABA_A e, em certas sinapses, elevam a amplitude das ações do GABA (MACDONALD & OLSEN, 1994; WALTERS et al., 2000, MILLAN, 2003).

Os benzodiazepínicos exibem importantes propriedades ansiolíticas que podem ser avaliadas de diversas maneiras e em diferentes espécies (MILLAN, 2003). Em modelos clássicos de ansiedade, como o labirinto em cruz elevado, os benzodiazepínicos promovem um aumento da atividade nos braços abertos (HANDLEY & MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985; FILE & ARANKO, 1988; RODGERS et al., 1997). Em paradigmas que avaliam o medo inato, como a exposição ao odor de predador, observou-se uma atenuação das respostas defensivas do rato frente ao odor de gato após a administração do benzodiazepínico midazolam (DIELENBERG et al., 1999; DO-MONTE, 2006).

Muitos estudos relatam ainda uma atenuação das respostas condicionadas de medo após a administração de benzodiazepínicos. Fanselow e Helmstetter (1988) observaram que a administração de midazolam ou diazepam foi capaz de reduzir significativamente o comportamento de imobilização no condicionamento clássico de medo contextual. Santos e colaboradores (2005) relataram uma redução do comportamento de imobilização e do sobressalto potencializado pelo medo após a administração de midazolam em ratos submetidos ao condicionamento de medo contextual. Além disso, há evidências de que a administração de diazepam atenuou tanto o comportamento de imobilização quanto as respostas autonômicas de pressão arterial e ritmo cardíaco (RESSTEL et al., 2006). Estes prejuízos nas respostas condicionadas de medo, promovidos pelos benzodiazepínicos, são observados quando a administração é sistêmica ou diretamente em estruturas neurais que compõem a circuitaria do condicionamento e suas respostas de medo.

Há evidências de que os benzodiazepínicos interferem tanto na aquisição quanto na expressão do medo condicionado através da potencialização dos efeitos inibitórios do GABA na amígdala basolateral. O prejuízo causado pela injeção sistêmica de um benzodiazepínico na aquisição do medo é revertido pela microinjeção na amígdala de uma droga (bicuculina) que bloqueia a ligação do GABA ao receptor GABA_A (DICKINSON-ANSON et al., 1993). Outro estudo demonstrou que o midazolam diretamente microinjetado na porção

dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal promoveu uma inibição significativa do comportamento de imobilidade (CASTILHO et al., 2002).

A diminuição da expressão das respostas condicionadas pela administração de benzodiazepínicos é geralmente atribuída à sua ação ansiolítica, entretanto, sua propriedade amnésica é relevante para o modelo, uma vez que o condicionamento de medo Pavloviano situa-se na interface entre a memória e a emoção (MAREN, 2001). Alguns trabalhos sugerem que a ação dos benzodiazepínicos sobre o condicionamento clássico de medo é exclusivamente mnemônica (PAIN et al., 2002). Corroborando estes estudos, Gafford e colaboradores (2005) observaram que a administração hipocampal de midazolam imediatamente após a sessão de pareamento prejudicou o condicionamento de medo contextual.

Além disso, estudos *in vitro* demonstram que a administração de midazolam pode seletivamente inibir a potencialização de longa duração (EVANS & VIOLA-MCCABE, 1996).

1.4 Sistema Noradrenérgico e o Medo Condicionado

Há evidências consideráveis de que o sistema noradrenérgico está intimamente relacionado a comportamentos de medo, ansiedade e estresse. As alterações neurovegetativas que compõem o conjunto de respostas defensivas resultam da ativação do sistema noradrenérgico central e periférico (BREMNER et al., 1996).

A maioria dos neurônios noradrenérgicos está localizada no *locus coeruleus* (LC), com vastas projeções para todo o córtex cerebral e áreas subcorticais incluindo o hipocampo, a amígdala, o tálamo, o hipotálamo e a substância cinzenta periaquedutal (MAEDA, 2000). Esta formação neuroanatômica do sistema noradrenérgico favorece a modulação rápida e global de funções cerebrais em resposta a situações de estresse ou de perigo potencial. Nestas circunstâncias, ocorre a liberação periférica de catecolaminas que ativam os receptores beta-adrenérgicos nas projeções ascendentes do nervo vago para o núcleo do trato solitário (NTS), uma estrutura cerebral rica em neurônios noradrenérgicos (KALIA & SULLIVAN, 1982). O NTS emite projeções diretas para a amígdala e indiretas para o LC. Assim sendo, muitas

repostas de medo estão vinculadas ao aumento na liberação de noradrenalina no LC, amígdala e hipotálamo (TANAKA et al., 2000).

A transmissão noradrenérgica ativa dois tipos de receptores, α e β , classificados em diversos subtipos farmacologicamente ativos (RANG et al., 2004).

Os receptores beta-adrenérgicos foram classificados a partir de técnicas bioquímicas, farmacológicas e de biologia molecular em três subtipos: β 1, β 2 e β 3. Em adição, relata-se a existência de um receptor β 4 no coração de mamíferos (NAGAMOTO et al., 2001). A distribuição destes receptores é bastante ampla, abrangendo o coração, o músculo liso de vasos e órgãos, a musculatura esquelética, as células sangüíneas e o sistema nervoso central.

Os receptores beta-adrenérgicos pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G. Através da estimulação da enzima adenilato ciclase, a adenosina trifosfato (ATP) é convertida em adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O AMPc, então, inicia uma cadeia de eventos intracelulares que promovem a amplificação do sinal e a geração da resposta celular (DE BLASI, 1990).

Evidências apontam para a importante participação dos receptores beta-adrenérgicos na resposta e controle da ansiedade (MILLAN, 2003). A administração de propranolol, um antagonista beta-adrenérgico de ação central e periférica, promoveu efeitos ansiolíticos em ratos expostos ao labirinto em cruz elevado (AUDI et al., 1991). Além disso, a injeção sistêmica de propranolol, bem como a microinjeção do antagonista beta-adrenérgico atenolol no núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo, reduziu a resposta defensiva de ratos expostos ao odor de gato (DO-MONTE, 2006).

Um grande número de estudos indica que o sistema noradrenérgico, particularmente os receptores beta-adrenérgicos, tem papel importante na formação e consolidação de memórias emocionais. Cahill (1994) demonstrou, num estudo em humanos, que a administração de propranolol prejudicou a memória associada a eventos emocionais sem interferir na memória associada a eventos neutros. Em um trabalho posterior, Van Stegeren e colaboradores (1998) mostraram que este prejuízo era mediado por receptores beta-adrenérgicos centrais e não periféricos. A noradrenalina central exerce

importante função no condicionamento contextual de medo. Ji e colaboradores (2003) demonstraram que a infusão pós-condicionamento de propranolol na região CA1 do hipocampo diminuiu o comportamento de imobilidade, refletindo um prejuízo no condicionamento de medo contextual. Além disso, a infusão de noradrenalina na amígdala basolateral após o condicionamento foi capaz de aumentar o condicionamento contextual de medo (LA LUMIERE et al., 2003). Em experimentos com humanos, evidenciou-se que a administração de propranolol reduziu os parâmetros (atividade eletrodérmica e medidas subjetivas de emocionalidade) utilizados para a avaliação do condicionamento de medo contextual (GRILLON et al., 2004).

Em adição, alguns pesquisadores sugerem que a reconsolidação - processo pelo qual uma memória previamente consolidada torna-se lábil ao ser recuperada, necessitando de uma nova consolidação (DUDAI, 2006) - é prejudicada tanto pela administração sistêmica quanto pela infusão intra-amígdala basolateral de propranolol no condicionamento auditivo de medo (DEBIEC & LEDOUX, 2004).

1.5 Sistema Colinérgico e o Medo Condicionado

As vias colinérgicas que exercem papel fundamental no controle da atenção, motivação e função atencional-cognitiva, ramificam-se extensivamente no hipocampo, amígdala, septo, córtex frontal e várias outras regiões límbicas. Portanto, elas interagem reciprocamente com vias monoaminérgicas, GABAérgicas e glutamatérgicas (PICCIOTO, 1999; LI et al., 2001; SETH et al., 2002; MILLAN, 2003).

A atividade das vias colinérgicas frontocortical, hipocampal e septal lateral está aumentada em resposta a estímulos ansiogênicos ou estressantes, e sugere-se que a hiperatividade das aferências colinérgicas para o córtex frontal pode contribuir para os estados de ansiedade (ACQUAS et al., 1996; GIOVANNINI et al., 2001; MILLAN, 2003).

O sistema colinérgico é composto de duas classes de receptores, nicotínicos e muscarínicos, e ambos são divididos em subtipos com distintas funções farmacológicas (RANG et al., 2004).

Os receptores muscarínicos colinérgicos são classificados em 5 tipos e todos pertencem a superfamília dos receptores acoplados à proteína G. Três deles (M1, M3 e M5) agem principalmente através da ativação da fosfolipase C, promovendo uma influência excitatória sobre a atividade neuronal. No entanto, os outros dois (M2 e M4) são inibitórios e, ao inibirem a adenilato ciclase, reduzem a formação de AMPc resultando em um aumento da condutância do potássio e uma inibição dos canais de cálcio (MCKINNEY, 1993; WESS, 1996). Os receptores muscarínicos M2 estão localizados pré-sinápticamente como auto-receptores inibitórios nos terminais de neurônios colinérgicos do córtex e hipocampo (KITAICHI et al., 1999; ICHIKAWA et al., 2000; ZHANG et al., 2002).

Pouco é conhecido sobre o potencial envolvimento das classes dos receptores muscarínicos na resposta e no controle da ansiedade, apesar da ocorrência ampla e diferenciada destes receptores (M1 e M4) em estruturas como o córtex frontal, o hipocampo e a amígdala. É sugerido que sítios muscarínicos pós-sinápticos (M1) em regiões infra-límbicas do córtex participem na indução da ansiedade através de vias colinérgicas (WALL et al., 2001; WALL & MESSIER, 2002) e que mecanismos muscarínicos possam facilitar o medo (POWER & MCGAUGH, 2002). Ainda, a influência excitatória dos receptores muscarínicos sobre as vias noradrenérgicas no LC pode favorecer estados ansiosos, como o estado de pânico (PUDOVKINA et al., 2002).

A neurotransmissão colinérgica é amplamente conhecida por ser essencial para muitas formas de aprendizado. O prejuízo do aprendizado ocasionado pela administração de antagonistas muscarínicos (atropina ou escopolamina) é demonstrado em humanos (CROW & GROOVE-WHITE, 1973), macacos (AIGNER et al., 1991) e coelhos (HARVEY et al., 1983). Em roedores, o bloqueio muscarínico produziu déficits de desempenho no labirinto radial (BURESOVA & BURES, 1982), no labirinto aquático (WHISHAW, 1989; LAMBERTY & GOWER, 1991), no labirinto em T elevado (DE-MELLO & CAROBREZ, 2002) e no labirinto em cruz elevado (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2004).

Os receptores muscarínicos colinérgicos estão também envolvidos no condicionamento de medo Pavloviano. Estudos prévios de Anagnostaras e

colaboradores (1995) revelaram que a administração pré-condicionamento de escopolamina prejudicou moderadamente, mas não significativamente, o condicionamento auditivo de medo, ao passo que o condicionamento de medo contextual foi expressivamente reduzido. Em trabalhos utilizando ratos jovens, Rudy (1996) demonstrou que a administração de escopolamina pré e pós-condicionamento atenuou tanto o condicionamento auditivo de medo quanto o condicionamento de medo contextual. Estes resultados, entretanto, não foram observados com a utilização de metilescopolamina, um antagonista muscarínico que não atravessa a barreira hemato-encefálica, sugerindo que os efeitos da escopolamina sobre o condicionamento de medo ocorrem devido sua ação central e não periférica. Um estudo posterior revelou que a administração pré-condicionamento de escopolamina (0,01; 0,1; 1,0; 10,0 e 100,0 mg/kg) prejudicou intensamente o condicionamento de medo. Embora este prejuízo tenha sido mais visível no condicionamento de medo contextual, doses mais elevadas de escopolamina também atenuaram o condicionamento auditivo (ANAGNOSTARAS et al., 1999).

Tendo em vista a ampla utilização do condicionamento Pavloviano na elucidação dos mecanismos neurobiológicos do medo, o modelo de condicionamento olfatório de medo foi inicialmente adaptado e padronizado às condições experimentais do laboratório. A padronização teve como finalidade a observação de respostas defensivas, semelhantes àquelas exibidas frente ao odor de predador, diante de um estímulo olfatório de simples obtenção e mensuração. Após esta fase inicial, os animais foram farmacologicamente avaliados nas etapas de aquisição, de consolidação e de expressão do medo condicionado. Para este propósito, foi realizada a administração de midazolam, um benzodiazepínico, de propranolol, um antagonista não seletivo dos receptores beta-adrenérgicos, e de escopolamina, um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos colinérgicos, drogas envolvidas na modulação de respostas defensivas e processos de aprendizagem e memória, em ratos submetidos ao condicionamento de medo evocado a partir de um estímulo olfatório.

2- OBJETIVOS

Avaliar os efeitos agudos sistêmicos da administração de um benzodiazepínico, um antagonista beta-adrenérgico e um antagonista muscarínico sobre as etapas de aquisição, consolidação e expressão do condicionamento olfatório de medo.

2.1 Objetivos Específicos

- Validar e padronizar o modelo de condicionamento olfatório de medo de acordo com as condições experimentais do laboratório;
- Verificar os efeitos do benzodiazepínico midazolam nas etapas de aquisição, consolidação e expressão do condicionamento olfatório de medo;
- Avaliar os efeitos do antagonista beta-adrenérgico propranolol nas etapas de aquisição, consolidação e expressão do condicionamento olfatório de medo;
- Determinar os efeitos do antagonista muscarínico escopolamina nas etapas de aquisição, consolidação e expressão do condicionamento olfatório de medo.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos pesando entre 300-450g e com idade de 12-16 semanas no momento da experimentação. Os animais, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, foram dispostos em caixas plásticas, forradas com maravalha, em grupos de 3-4 animais por caixa. Estes animais foram aclimatizados no biotério do Laboratório de Neurobiologia Comportamental por pelo menos uma semana antes do início dos experimentos.

Os animais foram mantidos em temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12 horas (início da fase clara às 7:00 horas), tendo livre acesso à água e comida.

3.2 Drogas e substâncias

As doses e quantidades empregadas foram fundamentadas em dados da literatura (DIELENBERG et al., 1999; DO-MONTE, 2006; DE-MELLO & CAROBREZ, 2002) ou em estudos prévios deste laboratório:

- Midazolam (Dormonid®, Roche, Brasil), diluído em solução fisiológica (NaCl 0,9%), 0,375 mg/ml e 0,5mg/ml num volume de injeção de 1,0 ml/kg.
- Propranolol (hidroclorato de propranolol, Sigma-Aldrich, EUA), diluído em solução fisiológica (NaCl 0,9%), 5,0 mg/ml e 10,0 mg/ml num volume de injeção de 1,0 ml/kg.
- Escopolamina (hidrobrometo, Sigma-RBI, EUA), diluído em solução fisiológica (NaCl 0,9%), 0,6 mg/ml e 1,2 mg/ml num volume de injeção de 1,0 ml/kg.
- Solução fisiológica (NaCl 0,9%), utilizada num volume de injeção de 1,0 ml/kg.
- Café (tradicional, torrado e moído, Melitta®, Brasil), 15 g.

3.3 Equipamentos

3.3.1 Caixa de Condicionamento

O condicionamento foi realizado em uma caixa (Insight Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) medindo 50 x 26 x 35 cm, com paredes de alumínio, com exceção da face frontal e tampa confeccionadas em acrílico transparente. O assoalho da caixa é composto de grades eletrificadas distanciadas 1 cm entre si. Um sistema gerador de choques possibilita a emissão de impulsos elétricos regulados a partir de controladores de intensidade e tempo (figura 1). Uma pequena quantidade de café (15g), dividida em porções semelhantes, foi uniformemente distribuída em quatro fileiras no compartimento abaixo do piso gradeado servindo como estímulo olfatório a ser condicionado. O condicionamento foi realizado num ambiente com som atenuado, temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e intensidade de luz de 80 lux.

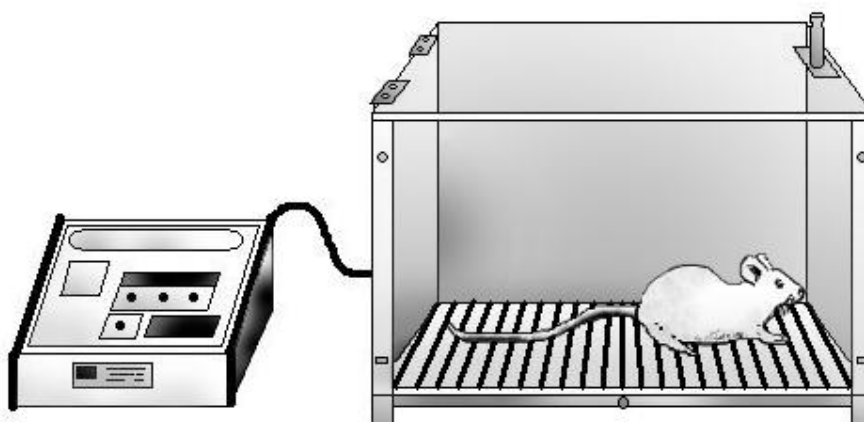


Figura 1. Esquema representativo da caixa de condicionamento.

3.3.2 Caixa de Teste (Avaliação do medo condicionado)

A fim de reduzir influências contextuais, a avaliação do medo condicionado foi realizada em uma caixa distinta da caixa de condicionamento, instalada em uma sala, com luminosidade atenuada (4 lux), diferente daquela

utilizada para o condicionamento. Este aparato, inteiramente construído em acrílico, foi dividido em dois compartimentos, um aberto (40 x 26 x 40 cm) e um fechado (20 x 26 x 40 cm) com cobertura. Para permitir a visualização dos animais no modelo, as paredes frontais, tanto do compartimento aberto quanto do fechado, foram construídas em acrílico transparente. Uma pequena abertura (6 x 6 cm), situada na parede divisória, permitiu o livre acesso do animal a ambos compartimentos. Na parede lateral do compartimento aberto, uma flanela enrolada, contendo uma pequena quantidade de café (15g), foi utilizada como fonte do estímulo olfatório condicionado. No piso da caixa, uma marcação localizada a 7 cm da parede, serviu como referência para delimitar a área proximal à flanela (figura 2).



Figura 2. Esquema representativo da caixa de teste.

O comportamento dos animais foi registrado através de um sistema de vídeo-câmera, permitindo desta forma a correta avaliação das respostas defensivas exibidas durante as diferentes sessões no aparato de teste, *a posteriori*.

3.4 Procedimentos e Protocolos Experimentais

Todos os procedimentos conduzidos no presente estudo foram aprovados e realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (23080.006118/2004-36/UFSC).

3.4.1 Condicionamento Olfatório de Medo

No condicionamento olfatório de medo, os animais, no primeiro dia, foram colocados na caixa de condicionamento para exploração do ambiente, numa sessão denominada familiarização. No dia seguinte (Dia 2), na sessão de condicionamento, os animais foram re-expostos à caixa onde foram emitidos choques elétricos nas patas (EI) e pareados com um estímulo olfatório neutro, odor de café (EC).

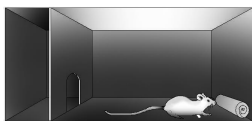
3.4.2 Avaliação do Medo Condicionado

Para a avaliação do medo condicionado, todos os sujeitos foram submetidos à caixa de teste em uma sessão denominada familiarização (Dia 3), 24 horas antes da exposição ao odor de café, nesta fase agindo como estímulo olfatório condicionado. Durante a familiarização, uma flanela enrolada e sem odor foi fixada na parede da caixa, oposta ao ambiente fechado e exposta a todos os animais. No dia do teste (Dia 4), uma flanela semelhante àquela utilizada na familiarização, porém contendo 15 g de café, foi usada como fonte do estímulo olfatório condicionado. No dia 5, com o propósito de avaliar o medo condicionado ao contexto, todos os sujeitos foram re-expostos à caixa de teste na presença de uma flanela sem odor.

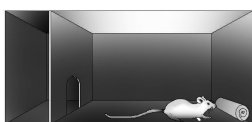
Durante os três dias de exposição à caixa de teste, todos os sujeitos foram colocados no compartimento aberto junto à parede divisória com a cabeça direcionada para a flanela.

Alguns parâmetros já estabelecidos neste laboratório foram empregados durante os 10 minutos de avaliação do comportamento dos animais nas sessões de familiarização, teste e contexto (DO-MONTE, 2006; SOUZA, 2007). Então, a resposta defensiva exibida frente ao estímulo olfatório condicionado ou ao contexto onde este estímulo foi reapresentado foi medida através de parâmetros relacionados ao comportamento defensivo.

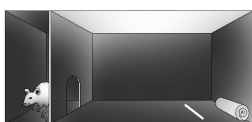
3.4.2.1 Parâmetros relacionados ao Comportamento Defensivo



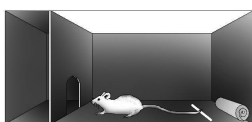
Tempo de aproximação: tempo em que o animal permanece com pelo menos a cabeça dentro de uma área retangular (7 x 26 cm) que contém a flanela. Uma marcação localizada a 7 cm da parede lateral facilita esta medida.



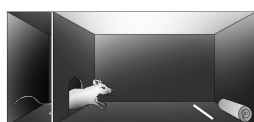
Frequência de aproximações: número de vezes que o animal aproxima-se da flanela.



Tempo escondido: determina o período que o animal permanece dentro do compartimento fechado da caixa.



Frequência de cruzamentos: é o somatório do número de vezes que o animal se aproxima da flanela com o número de entradas no compartimento fechado.



Tempo de avaliação de risco (tempo de Head-out): é caracterizado pelo período de permanência do animal no compartimento fechado, com a cabeça direcionada para a flanela, com ou sem as patas dianteiras para fora deste compartimento.

Uma solução de álcool (10%) foi utilizada para a limpeza da caixa de condicionamento e caixa de teste entre a passagem de cada animal nas sessões.

3.4.3 Etapa I – Padronização do Modelo de Condicionamento Olfatório de Medo

Para verificação do perfil comportamental dos animais expostos ao odor de café sem condicionamento prévio, no primeiro dia, os sujeitos foram familiarizados com a caixa de condicionamento durante 3 minutos. No dia seguinte, os animais foram recolocados no mesmo ambiente, durante o mesmo período, entretanto, na presença de odor de café. No terceiro dia, os animais foram expostos à sessão de familiarização com a caixa de teste, e, no dia seguinte, o estímulo neutro, odor de café, foi reapresentado neste contexto. Com o objetivo de observar qualquer tipo de condicionamento contextual que possa eventualmente ter ocorrido, no quinto dia, foi realizada uma sessão denominada contexto, onde os sujeitos foram reapresentados a caixa onde ocorreu o teste, entretanto na presença de uma flanela sem odor. O procedimento experimental completo encontra-se ilustrado abaixo, na figura 3.



Figura 3. Esquema do procedimento utilizado para avaliação do grupo café sem choque.

O condicionamento olfatório de medo foi inicialmente conduzido com a utilização de um, dois ou três pareamentos entre o odor de café (EC) e o choque elétrico nas patas (EI). Os animais foram divididos em dois grupos: o grupo não pareado e o grupo pareado. Durante o primeiro dia de experimento, os animais do grupo não pareado foram colocados na caixa de condicionamento e após 1 minuto de familiarização receberam 1, 2 ou 3 choques (0,4 mA/2s/ intervalo de 60s entre choques) nas patas, sendo retirados após o evento. No dia seguinte (Dia 2), os animais deste grupo foram re-expostos à caixa de condicionamento na presença de odor de café durante 2 (grupos 1 e 2 choques) ou 3 minutos (grupo 3 choques).

O grupo pareado foi familiarizado, no primeiro dia, na caixa de condicionamento durante 2 ou 3 minutos. No segundo dia, os animais foram re-expostos a caixa de condicionamento na presença do odor de café e, 1 minuto

após o início da sessão, receberam 1, 2 ou 3 choques (0,4 mA/2s/ intervalo de 60 s entre choques) nas patas, sendo retirados após o pareamento.

No terceiro dia, todos os grupos (pareados e não pareados) foram expostos à sessão de familiarização com a caixa de teste, e, no dia seguinte (Dia 4), o medo condicionado foi avaliado.

Com intuito de padronizar o condicionamento olfatório de medo, foram realizados ainda sessões com cinco pareamentos (EC/EI). Os animais foram divididos em dois grupos: o grupo não pareado e o grupo pareado. Durante o primeiro dia de experimento, os animais do grupo não pareado foram colocados na caixa de condicionamento e após 40 segundos de familiarização receberam 5 choques (0,4 mA/2s) nas patas, com intervalo de 40 segundos entre cada, sendo retirados após o último evento. No dia seguinte (Dia 2), os animais deste grupo foram re-expostos à caixa de condicionamento na presença de odor de café durante 3 minutos e 20 segundos. O grupo pareado foi familiarizado ao modelo durante 3 minutos e 20 segundos no primeiro dia. No segundo dia, os animais foram re-expostos à caixa de condicionamento na presença do odor de café e, 40 segundos após o início da sessão, receberam 5 choques (0,4 mA/2s) nas patas, com intervalo de 40 segundos entre cada, sendo retirados após a última associação. No terceiro dia, todos os grupos foram expostos à sessão de familiarização com a caixa de teste, e, no dia seguinte (Dia 4), o medo olfatório condicionado foi avaliado. Com o objetivo de observar o medo condicionado contextual, no quinto dia, foi realizada uma sessão denominada contexto, onde os sujeitos foram reapresentados a caixa onde ocorreu o teste, entretanto na presença de uma flanela sem odor.



Figura 4. Esquema do procedimento utilizado para avaliação do grupo não pareado.



Figura 5. Esquema do procedimento utilizado para avaliação do grupo pareado.

3.4.4 Etapa II – Análise Farmacológica

3.4.4.1 Avaliação do efeito do midazolam sobre a aquisição, a consolidação e a expressão do condicionamento olfatório de medo

A análise farmacológica realizada nesta e nas etapas subseqüentes de experimentação foram conduzidas utilizando o pareamento de 5 choques (0,4 mA/2s) com odor de café num intervalo de 40 segundos entre cada associação.

Neste experimento, os ratos foram subdivididos em três grupos experimentais com base no momento da administração dos compostos. Os sujeitos foram injetados via intraperitoneal com solução salina ou midazolam nas doses de 0,375 ou 0,5 mg/kg. O primeiro grupo foi delineado para avaliar o efeito do midazolam sobre a aquisição do condicionamento de medo na caixa de condicionamento. Desta maneira, o midazolam foi administrado e, após 30 minutos, os animais foram submetidos ao pareamento odor de café + choque. No segundo grupo, delineado para se observar a consolidação do pareamento, o midazolam foi injetado imediatamente após a sessão de pareamento. Finalmente, o efeito do midazolam sobre a expressão do medo condicionado foi avaliado no terceiro grupo que recebeu os compostos 30 minutos antes da sessão na caixa de teste.

3.4.4.2 Avaliação do efeito do propranolol sobre a aquisição, a consolidação e a expressão do condicionamento olfatório de medo

Neste experimento, os sujeitos foram injetados via intraperitoneal com solução salina ou propranolol nas doses de 5,0 ou 10,0 mg/kg e seguiu o mesmo protocolo utilizado para a administração de midazolam nos diferentes grupos experimentais.

3.4.4.3 Avaliação do efeito da escopolamina sobre a aquisição, a consolidação e a expressão do condicionamento olfatório de medo

Neste experimento, os sujeitos foram injetados via intraperitoneal com solução salina ou escopolamina nas doses de 0,6 ou 1,2 mg/kg e seguiu o

mesmo protocolo utilizado para a administração de midazolam nos diferentes grupos experimentais.

O grupo controle, ratos injetados com salina, utilizado no experimento que avaliou o efeito do midazolam, foi o mesmo usado no experimento que avaliou o efeito do propranolol e da escopolamina sobre a aquisição do condicionamento olfatório de medo, uma vez que os grupos tratados foram submetidos aos experimentos de forma combinada. Esta consideração é válida também para os experimentos que avaliaram o efeito das drogas sobre a consolidação e a expressão do medo condicionado olfatório.



Figura 6. Esquema do procedimento utilizado para a avaliação do efeito do midazolam, do propranolol e da escopolamina sobre a aquisição do condicionamento olfatório de medo. As drogas e a solução salina foram administradas 30 minutos antes do condicionamento (odor de café + choque).



Figura 7. Esquema do procedimento utilizado para a avaliação do efeito do midazolam, do propranolol e da escopolamina sobre a consolidação do condicionamento olfatório de medo. As drogas e a solução salina foram administradas imediatamente após o condicionamento (odor de café + choque).



Figura 8. Esquema do procedimento utilizado para a avaliação do efeito do midazolam, do propranolol e da escopolamina sobre a expressão do condicionamento olfatório de medo. As drogas e a solução salina foram administradas 30 minutos antes do teste.

3.5 Análise Estatística

A análise dos dados obtidos no presente estudo foi realizada com o auxílio do programa estatístico Statistica 6.0 (Statsoft, Tulsa, EUA) e a representação dos gráficos através do programa Prisma 4.0 (GraphPad Prism, San Diego, EUA).

Todos os resultados foram representados como média + e.p.m.. Os dados obtidos durante a padronização do condicionamento olfatório de medo (1 a 3 choques) foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste *post-hoc* Duncan. Os demais dados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do teste *post-hoc* Duncan, durante a padronização do condicionamento olfatório de medo (5 choques), e do teste *post-hoc* Dunnet, durante a avaliação farmacológica.

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

4- RESULTADOS

4.1 Etapa I – Padronização do modelo de Condicionamento Olfatório de Medo

A) Verificação do perfil comportamental dos animais expostos ao estímulo neutro, odor de café, sem condicionamento prévio

Conforme dados da padronização do modelo de odor de gato neste laboratório (Tabela 1; DO-MONTE, 2006), a re-exposição ao odor de café, sem o pareamento com choque, não produziu respostas defensivas evidentes (figuras 9, 10, 11 e 12).

Tabela 1. Valores de referência dos parâmetros que avaliam a resposta defensiva de ratos confrontados com o odor de predador, obtidos durante a padronização do modelo de odor de gato neste laboratório. Valores expressos em média \pm e.p.m..

Parâmetro	Familiarização	Odor de Gato	Contexto
Tempo de aproximação (%)	31,3 \pm 3,4	9,7 \pm 2,4	9,0 \pm 1,4
Tempo escondido (%)	31,0 \pm 4,4	81,5 \pm 4,5	83,8 \pm 2,0
Tempo de avaliação de risco (s)	11,6 \pm 3,9	64,3 \pm 25,6	40,7 \pm 10,2
Frequência de aproximações	12,7 \pm 0,3	5,3 \pm 0,5	5,0 \pm 0,6
Frequência de cruzamentos	22,3 \pm 0,7	9,9 \pm 0,8	9,4 \pm 1,3

B) Condicionamento do estímulo neutro, odor de café, ao estímulo incondicionado, choque nas patas, utilizando um, dois ou três pareamentos

Conforme mostrado na figura 9, não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo café sem choque, o grupo não pareado e o grupo pareado nos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco quando apenas um pareamento do odor de café com o choque nas patas foi utilizado. A ANOVA detectou diferenças significativas entre os grupos experimentais nos parâmetros frequência de aproximações e frequência de cruzamentos [$F(2,17)= 4,16$, $p,<0,04$; $F(2,17)= 4,65$, $p<0,03$] quando apenas um pareamento (EC/EI) foi utilizado. O teste Duncan, *a posteriori*, revelou uma diminuição na frequência de aproximações e frequência de cruzamentos no grupo pareado quando comparado ao grupo café sem choque (figura 10). De acordo com as figuras 9 e 10, a análise estatística não detectou diferenças significativas entre o grupo café sem choque, o grupo não pareado e o grupo pareado em nenhum dos parâmetros avaliados no modelo de condicionamento olfatório de medo quando foram utilizados dois ou três pareamentos (EC/EI).

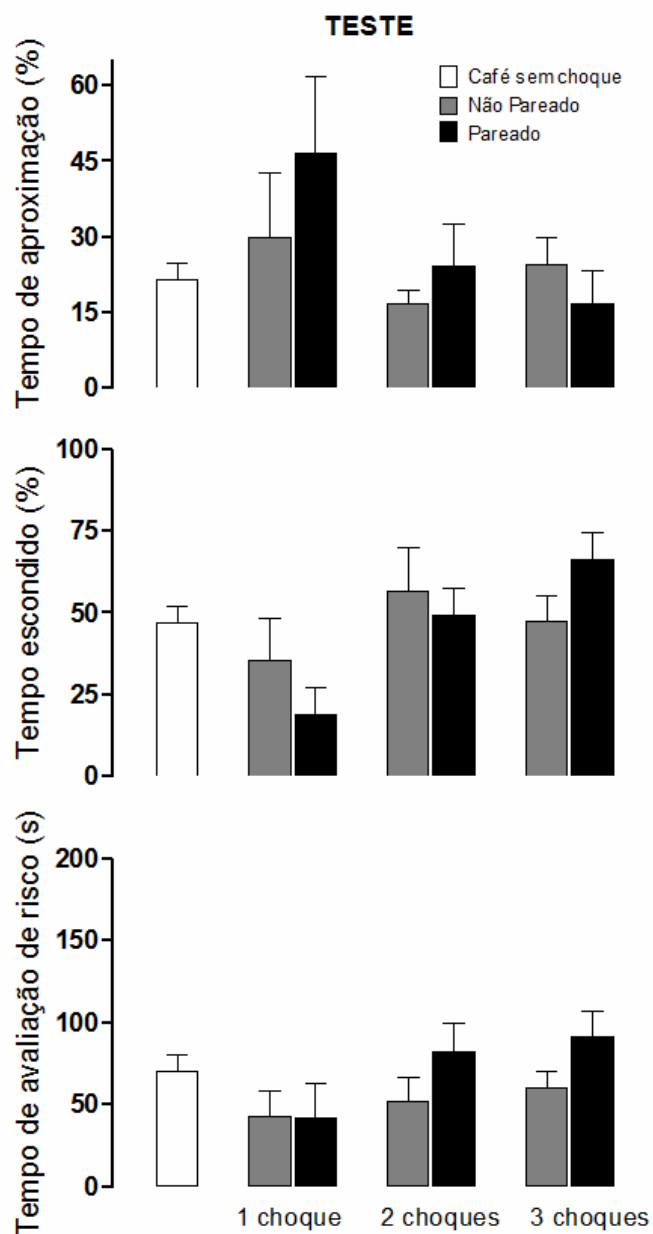


Figura 9. Avaliação do medo condicionado olfatório, através dos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco, dos grupos café sem choque, não pareado e pareado durante a re-exposição ao odor de café na sessão de teste. O condicionamento foi realizado com 1, 2 e 3 pareamentos (odor de café+choque). Valores expressos em média + e.p.m.. n=4-13.

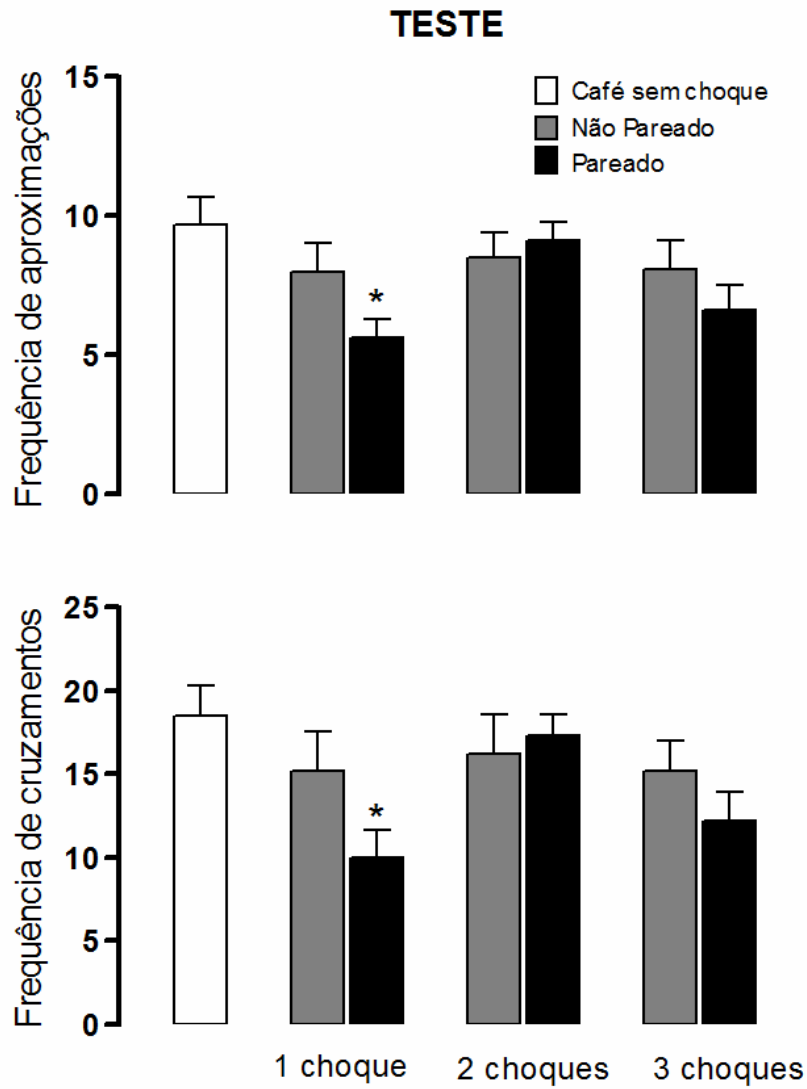


Figura 10. Avaliação do medo condicionado olfatório, através dos parâmetros frequência de aproximações e frequência de cruzamentos, dos grupos café sem choque, não pareado e pareado durante a re-exposição ao odor de café na sessão de teste. O condicionamento foi realizado com 1, 2 e 3 pareamentos (odor de café+choque). Valores expressos em média + e.p.m.. * $p < 0,05$ comparado ao grupo café sem choque. $n = 4-13$.

C) Condicionamento do estímulo neutro, odor de café, ao estímulo incondicionado, choque nas patas, utilizando cinco pareamentos

A análise de variância para os parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco detectou efeito significativo para o fator condição (café sem choque, não pareado, pareado) [$F(2,31)= 7,20, p<0,01$; $F(2,31)= 12,67, p<0,01$; $F(2,31)= 7,32, p<0,01$], mas não para o fator repetição [$F(1,31)= 0,04, p>0,1$; $F(1,31)= 0,72, p>0,1$; $F(1,31)= 3,59, p>0,05$] e para a interação entre os fatores condição e repetição [$F(2,31)= 0,50, p>0,1$; $F(2,31)= 2,42, p>0,1$; $F(2,31)= 0,40, p>0,1$]. O teste Duncan revelou uma diminuição significativa na % de tempo de aproximação, bem como um aumento na % de tempo escondido e no tempo de avaliação de risco no grupo pareado em relação ao grupo não pareado e ao grupo café sem choque na sessão de teste e de contexto, conforme figura 11. Ainda, a ANOVA para os parâmetros frequência de aproximações e frequência de cruzamentos revelou efeito significativo para o fator condição [$F(2,31)= 7,94, p<0,01$; $F(2,31)= 6,60, p<0,01$] e para a interação entre os fatores condição e repetição [$F(2,31)= 5,52, p<0,01$; $F(2,31)= 5,90, p<0,01$], mas não para o fator repetição [$F(1,31)= 0,39, p>0,1$; $F(1,31)= 0,90, p>0,1$]. O teste *post-hoc* mostrou uma diminuição significativa da frequência de aproximações e da frequência de cruzamentos no grupo pareado quando comparado ao grupo não pareado e ao grupo café sem choque apenas na sessão de teste (figura 12). O conjunto de dados evidencia a padronização do condicionamento olfatório de medo quando foram utilizados 5 pareamentos do odor de café com o choque elétrico nas patas.

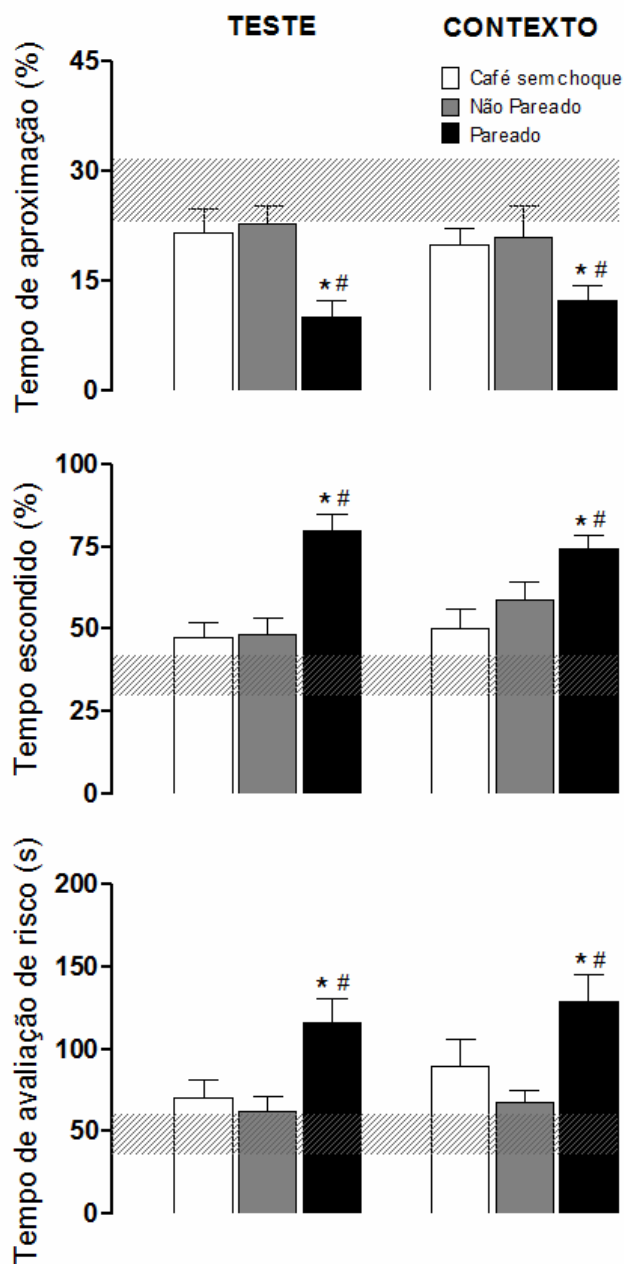


Figura 11. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco, dos grupos café sem choque, não pareado e pareado. O condicionamento foi realizado com 5 pareamentos. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo café sem choque; # $p < 0,05$ comparado ao grupo não pareado. $n = 10-12$.

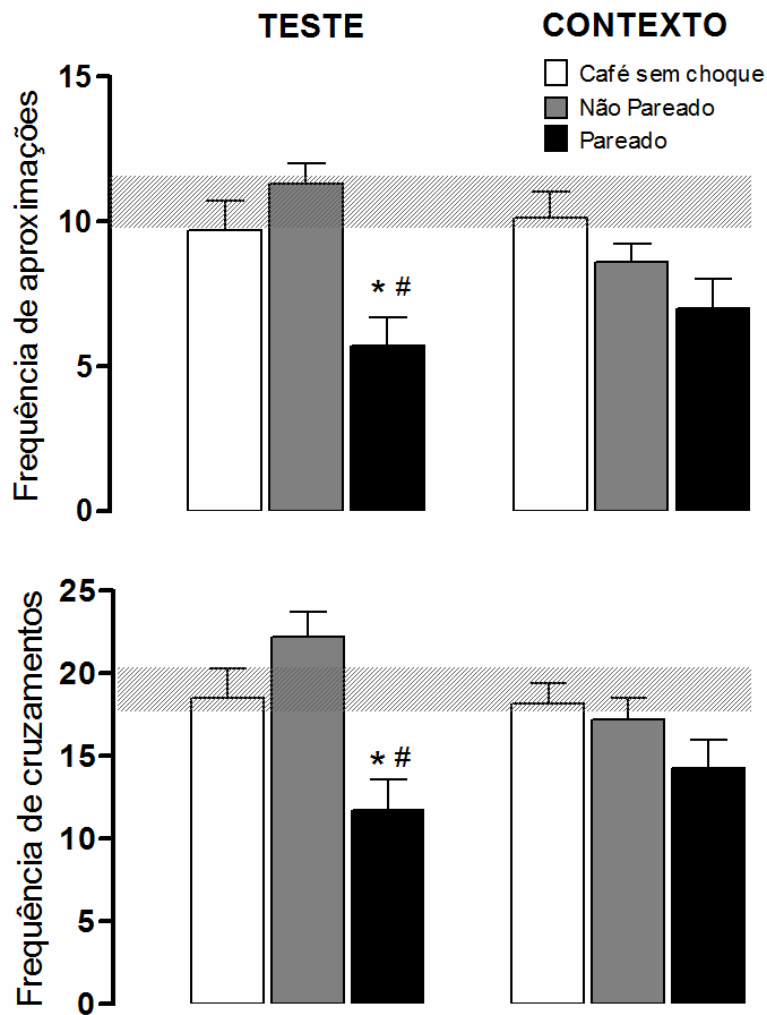


Figura 12. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros freqüência de aproximações e freqüência de cruzamentos, dos grupos café sem choque, não pareado e pareado. O condicionamento foi realizado com 5 pareamentos. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo café sem choque; # $p < 0,05$ comparado ao grupo não pareado. $n = 10-12$.

4.2 Etapa II – Análise Farmacológica

4.2.1 Avaliação do efeito do midazolam sobre a aquisição, a consolidação e a expressão do condicionamento olfatório de medo.

A) Avaliação da resposta de medo condicionado em ratos administrados com midazolam antes do condicionamento.

A ANOVA para os parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido, frequência de aproximações e frequência de cruzamentos detectou efeito significativo para o fator tratamento [$F(2,38)= 6,25, p<0,01$; $F(2,38)= 6,77, p<0,01$; $F(2,38)= 4,48, p<0,02$; $F(2,38)= 3,46, p<0,05$], mas não para o fator repetição [$F(1,38)= 0,91, p>0,1$; $F(1,38)= 3,31, p>0,05$; $F(1,38)= 0, p>0,1$; $F(1,38)= 0,40, p>0,1$] e para a interação entre o fator tratamento e o fator repetição [$F(2,38)= 0,71, p>0,1$; $F(2,38)= 1,41, p>0,1$; $F(2,38)= 1,28, p>0,1$; $F(2,38)= 0,31, p>0,1$]. A análise *post-hoc* revelou um aumento significativo na % de tempo de aproximação, bem como uma diminuição na % de tempo escondido nos grupos tratados com midazolam 0,375 e 0,5 mg/kg/ml em relação ao grupo controle (salina), conforme figura 13. Ainda, um aumento na frequência de aproximações e na frequência de cruzamentos foi observado no grupo midazolam 0,5 mg/kg/ml quando comparado ao grupo tratado com salina (figura 14). Esta expressiva redução do comportamento defensivo foi observada tanto no teste quanto no contexto.

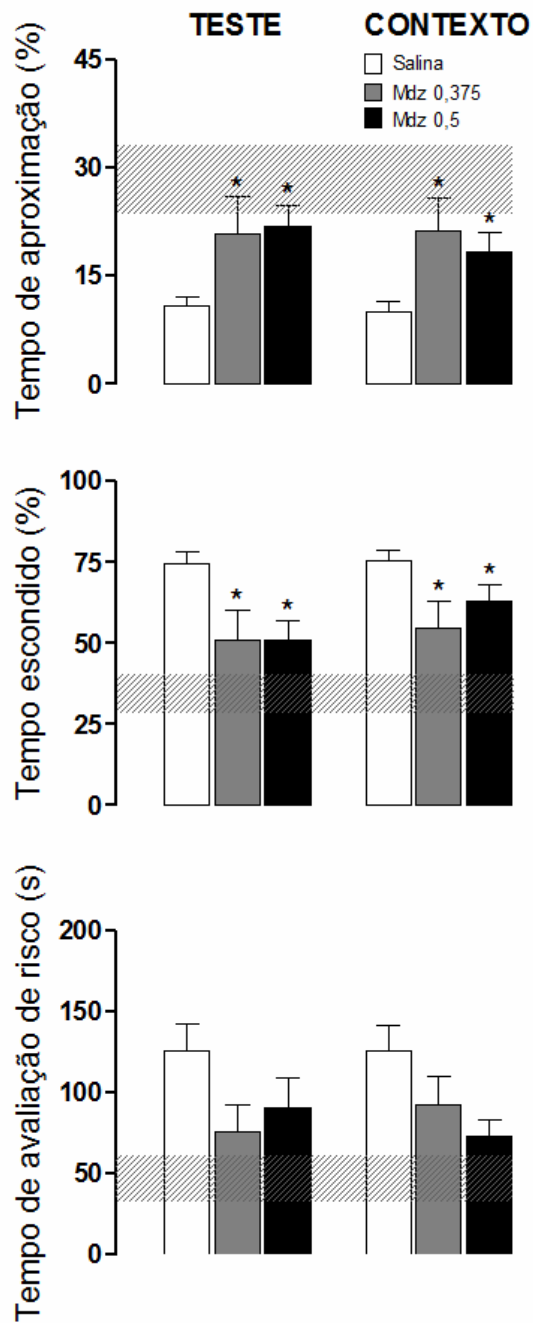


Figura 13. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco, dos grupos Mdz 0,375 (midazolam 0,375 mg/kg/ml), Mdz 0,5 (midazolam 0,5 mg/kg/ml) e salina administrados antes do condicionamento. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. $n = 10-19$.

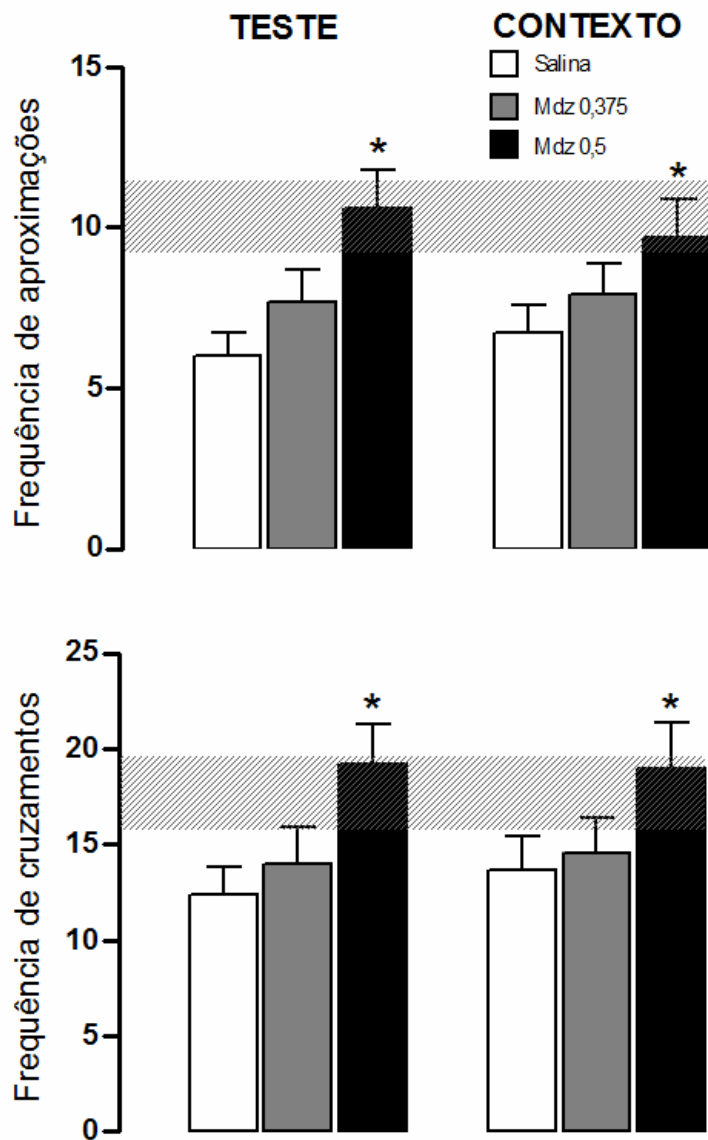


Figura 14. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros freqüência de aproximações e freqüência de cruzamentos, dos grupos Mdz 0,375 (midazolam 0,375 mg/kg/ml), Mdz 0,5 (midazolam 0,5 mg/kg/ml) e salina administrados antes do condicionamento. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. $n = 10-19$.

B) Avaliação da resposta de medo condicionado em ratos administrados com midazolam após o condicionamento.

A ANOVA para os parâmetros % de tempo de aproximação e tempo de avaliação de risco detectou efeito significativo para o fator tratamento [$F(2,37)= 4,43, p<0,02$; $F(2,37)= 5,62, p<0,01$], mas não para o fator repetição [$F(1,37)= 1,80, p>0,1$; $F(1,37)= 0,76, p>0,1$] e para a interação entre o fator tratamento e o fator repetição [$F(2,37)= 0,36, p>0,1$; $F(2,37)= 0,83, p>0,1$]. O teste *post-hoc* revelou um significativo aumento na % de tempo de aproximação e uma redução no tempo de avaliação de risco no grupo tratado com midazolam 0,5 mg/kg/ml em relação ao grupo controle (salina), conforme figura 15. O tratamento com midazolam 0,375 mg/kg/ml promoveu, da mesma forma, uma redução no tempo de avaliação de risco quando comparado ao tratamento com salina (figura 15). Esta redução do comportamento defensivo foi observada tanto no teste quanto no contexto. Em adição, a ANOVA para o parâmetro % de tempo escondido detectou efeito significativo para o fator tratamento [$F(2,37)= 5,24, p<0,01$] e para o fator repetição [$F(1,37)= 9,87, p<0,01$], mas não para a interação entre o fator tratamento e o fator repetição [$F(2,37)= 1,50, p>0,1$]. O teste Dunnet, posteriormente, mostrou uma significativa diminuição na % de tempo escondido no grupo tratado com midazolam 0,5 mg/kg/ml em relação ao grupo controle (salina), conforme figura 15, apenas no teste.

B) Avaliação da resposta de medo condicionado em ratos administrados com midazolam antes do teste.

A ANOVA para os parâmetros % de tempo de aproximação e tempo de avaliação de risco detectou efeito significativo para o fator repetição [$F(1,33)= 5,78, p<0,03$; $F(1,33)= 4,76, p<0,04$], mas não para o fator tratamento [$F(2,33)= 0,93, p>0,1$; $F(2,33)= 0,77, p>0,1$] e para a interação entre o fator tratamento e o fator repetição [$F(2,33)= 1,27, p>0,1$; $F(2,33)= 1,80, p>0,1$].

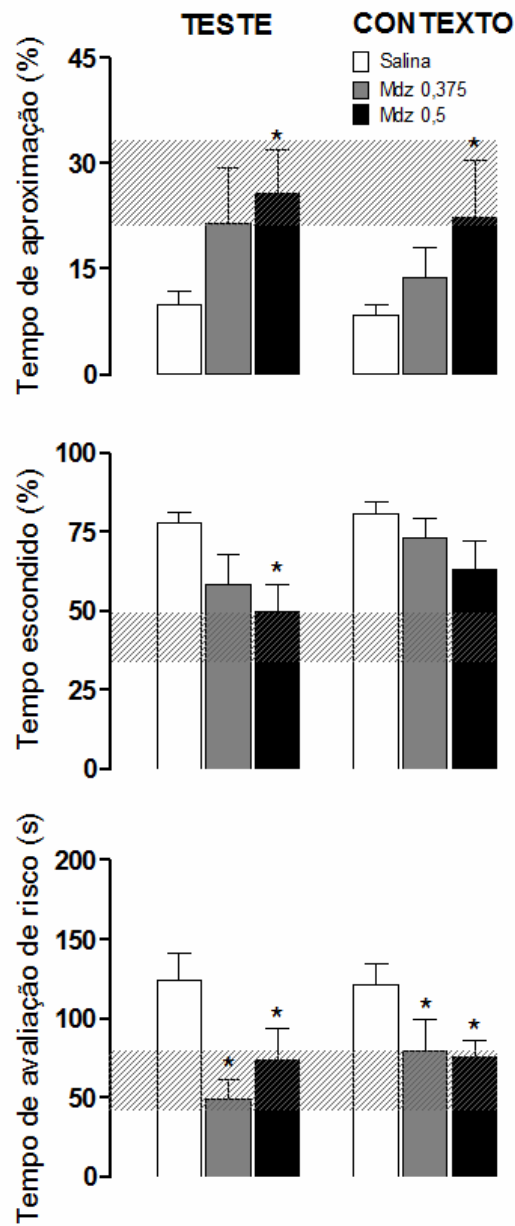


Figura 15. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco, dos grupos Mdz 0,375 (midazolam 0,375 mg/kg/ml), Mdz 0,5 (midazolam 0,5 mg/kg/ml) e salina administrados após o condicionamento. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. $n = 10-20$.

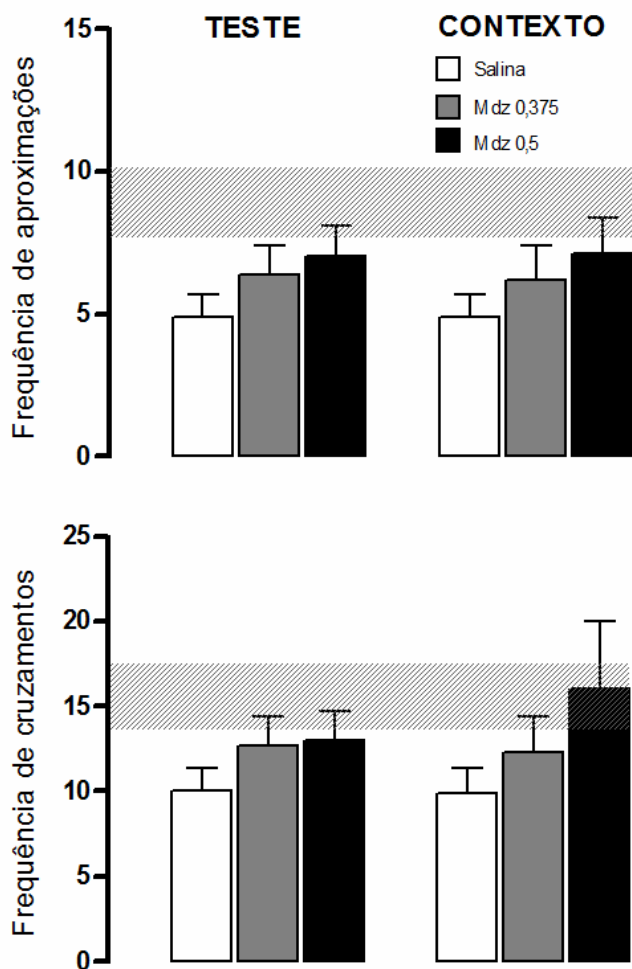


Figura 16. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros freqüência de aproximações e freqüência de cruzamentos, dos grupos Mdz 0,375 (midazolam 0,375 mg/kg/ml), Mdz 0,5 (midazolam 0,5 mg/kg/ml) e salina administrados após o condicionamento. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m. n=10-20.

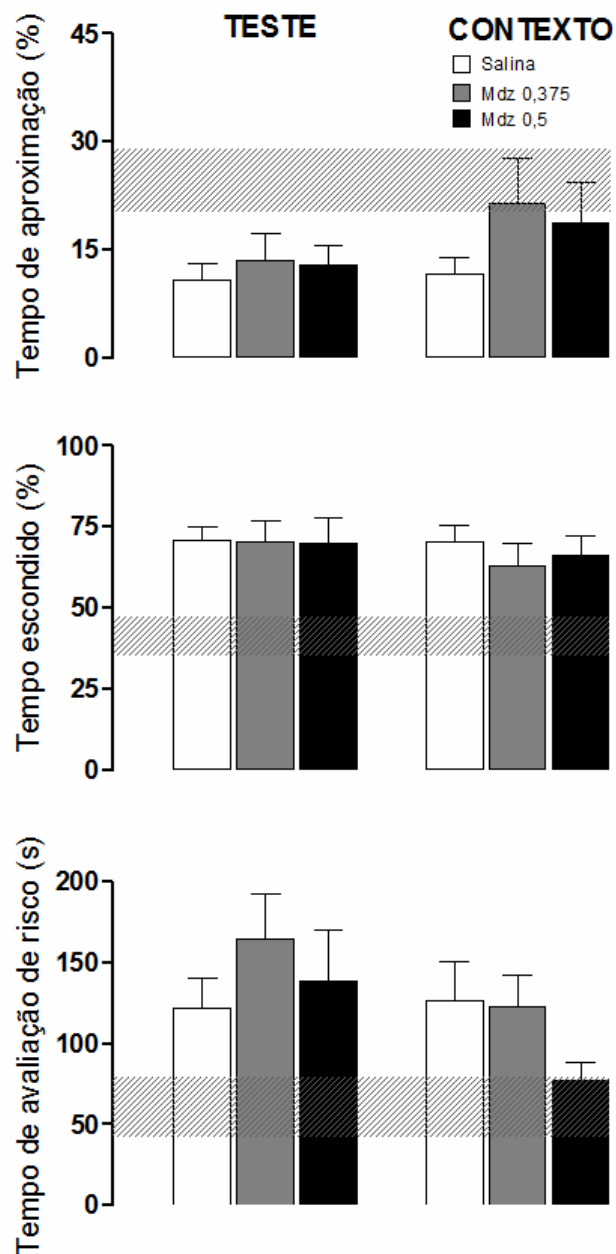


Figura 17. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco, dos grupos Mdz 0,375 (midazolam 0,375 mg/kg/ml), Mdz 0,5 (midazolam 0,5 mg/kg/ml) e salina administrados antes do teste. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m. n=10-14.

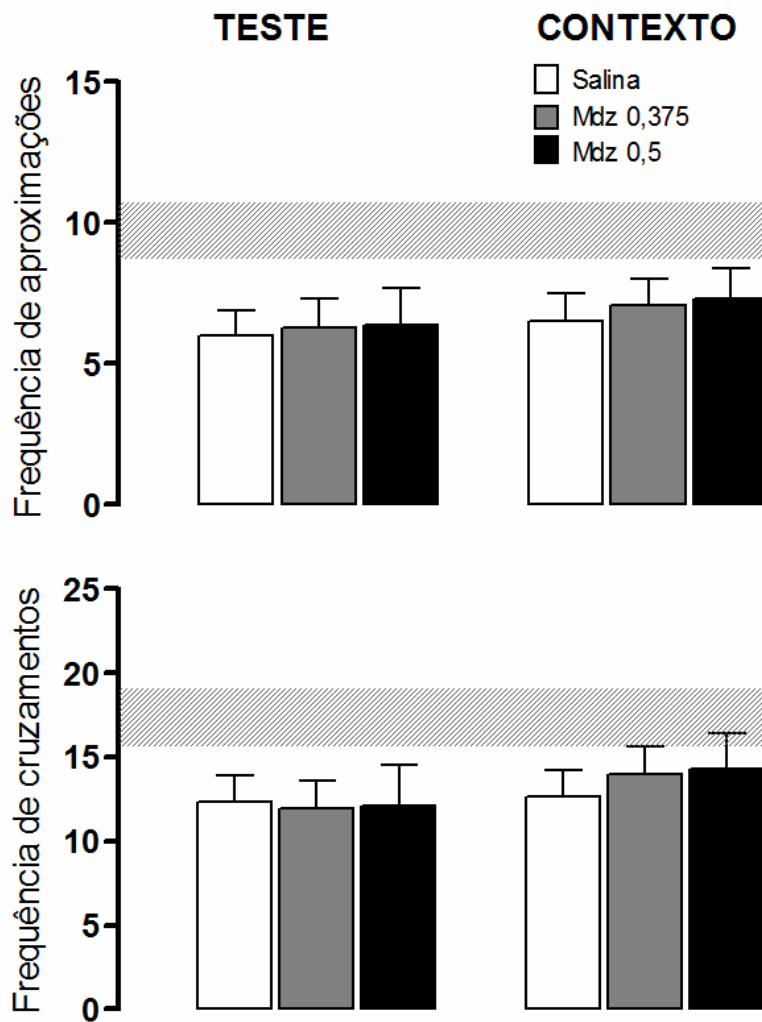


Figura 18. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros freqüência de aproximações e freqüência de cruzamentos, dos grupos Mdz 0,375 (midazolam 0,375 mg/kg/ml), Mdz 0,5 (midazolam 0,5 mg/kg/ml) e salina administrados antes do teste. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m. n=10-14.

4.2.2 Avaliação do efeito do propranolol sobre a aquisição, a consolidação e a expressão do condicionamento olfatório de medo.

A) Avaliação da resposta de medo condicionado em ratos administrados com propranolol antes do condicionamento.

A ANOVA para o parâmetro % de tempo de aproximação detectou efeito significativo para o fator tratamento [$F(2,40) = 4,13$, $p < 0,03$], mas não para o fator repetição [$F(1,40) = 0,35$, $p > 0,1$] e para a interação entre o fator tratamento e o fator repetição [$F(2,40) = 0,53$, $p > 0,1$]. O teste Dunnett mostrou um significativo aumento na % de tempo de aproximação no grupo tratado com propranolol 10 mg/kg/ml quando comparado ao grupo salina tanto na sessão de teste quanto de contexto (figura 19). Em adição, a ANOVA para os parâmetros frequência de aproximações e frequência de cruzamentos detectou efeito significativo para o fator repetição [$F(1,40) = 4,55$, $p < 0,04$; $F(1,40) = 5,42$, $p < 0,03$], mas não para o fator tratamento [$F(2,40) = 1,42$, $p > 0,1$; $F(2,40) = 0,78$, $p > 0,1$] e para a interação entre o fator tratamento e o fator repetição [$F(2,40) = 2,3$, $p > 0,1$; $F(2,40) = 2,19$, $p > 0,1$].

B) Avaliação da resposta de medo condicionado em ratos administrados com propranolol após o condicionamento.

A ANOVA para o parâmetro % de tempo de aproximação detectou efeito significativo para o fator tratamento [$F(2,40)= 5,97, p<0,01$], para o fator repetição [$F(1,40)= 4,27, p<0,05$] e para interação [$F(2,40)= 3,54, p<0,04$] entre os dois fatores. A análise *post-hoc* revelou um significativo aumento na % de tempo de aproximação no grupo tratado com propranolol 10 mg/kg/ml em relação ao grupo controle (salina), conforme figura 21, apenas no contexto. A ANOVA para o parâmetro % de tempo escondido detectou efeito significativo para o fator tratamento [$F(2,40)= 5,00, p<0,02$], mas não para o fator repetição [$F(1,40)= 2,29, p>0,1$] e para a interação entre o fator tratamento e o fator repetição [$F(2,40)= 2,78, p>0,05$]. O teste *post-hoc* mostrou uma significativa redução na % de tempo escondido no grupo tratado com propranolol 10 mg/kg/ml quando comparado ao grupo controle (salina), conforme figura 21, em ambos teste e contexto. Ainda, a ANOVA para o parâmetro frequência de aproximações detectou efeito significativo para o fator repetição [$F(1,40)= 5,97, p<0,02$], mas não para o fator tratamento [$F(2,40)= 1,25, p>0,1$] e para a interação entre o fator tratamento e o fator repetição [$F(2,40)= 1,93, p>0,1$].

C) Avaliação da resposta de medo condicionado em ratos administrados com propranolol antes do teste.

A ANOVA para o parâmetro % de tempo de aproximação detectou um efeito significativo para o fator tratamento [$F(2,32)= 3,30, p<0,05$], mas não para o fator repetição [$F(1,32)= 0,02, p>0,1$] e para a interação entre o fator tratamento e o fator repetição [$F(2,32)= 0,08, p>0,1$]. A análise *post-hoc* mostrou um significativo aumento na % de tempo de aproximação no grupo tratado com propranolol 5,0 mg/kg/ml quando comparado ao grupo salina, conforme figura 23, nas duas sessões.

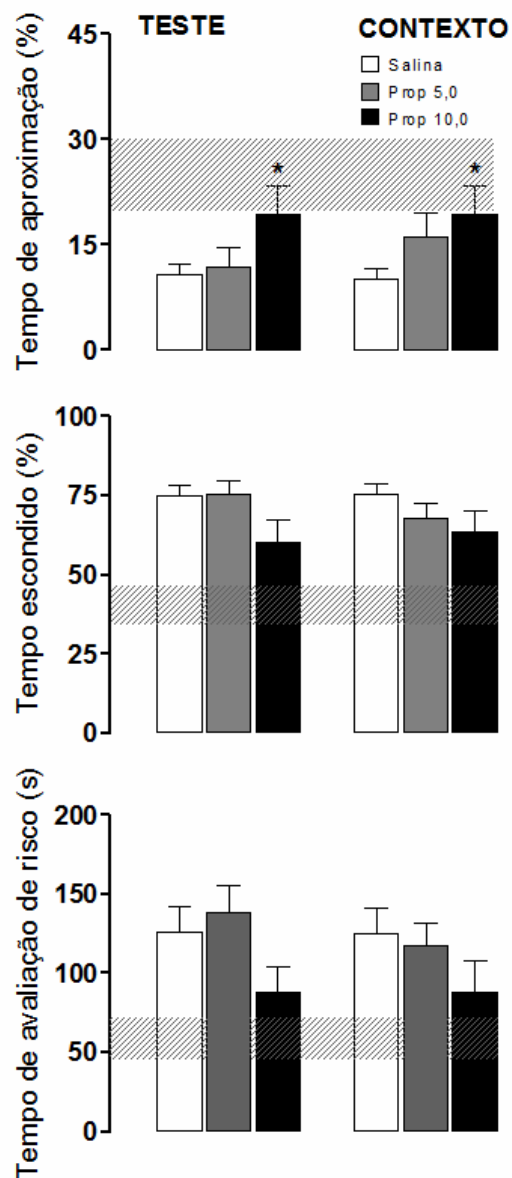


Figura 19. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco, dos grupos Prop 5,0 (propranolol 5,0 mg/kg/ml), Prop 10,0 (propranolol 10,0 mg/kg/ml) e salina administrados antes do condicionamento. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. $n = 10-19$.

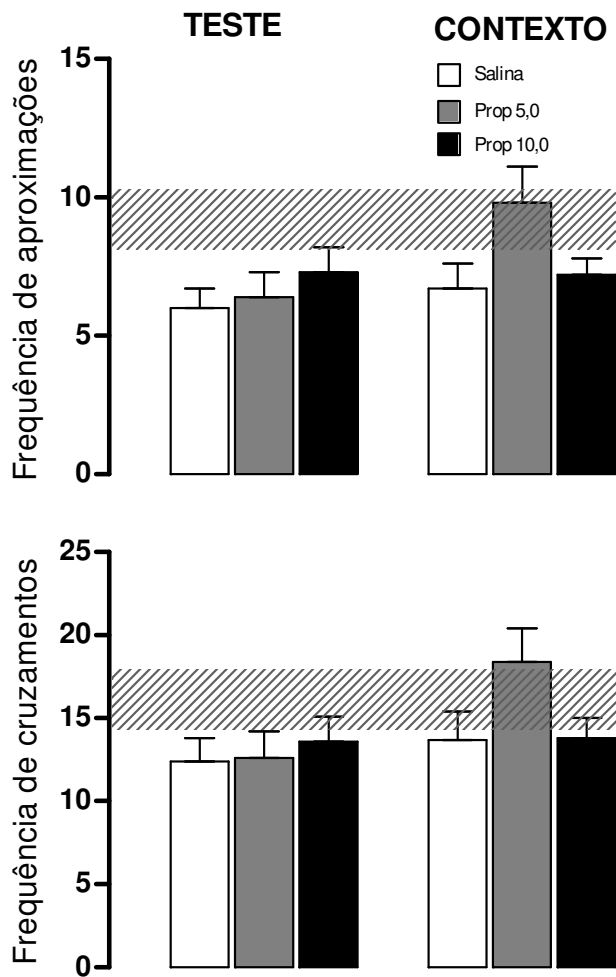


Figura 20. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros frequência de aproximações e frequência de cruzamentos, dos grupos Prop 5,0 (propranolol 5,0 mg/kg/ml), Prop 10,0 (propranolol 10,0 mg/kg/ml) e salina administrados antes do condicionamento. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m. n=10-19.

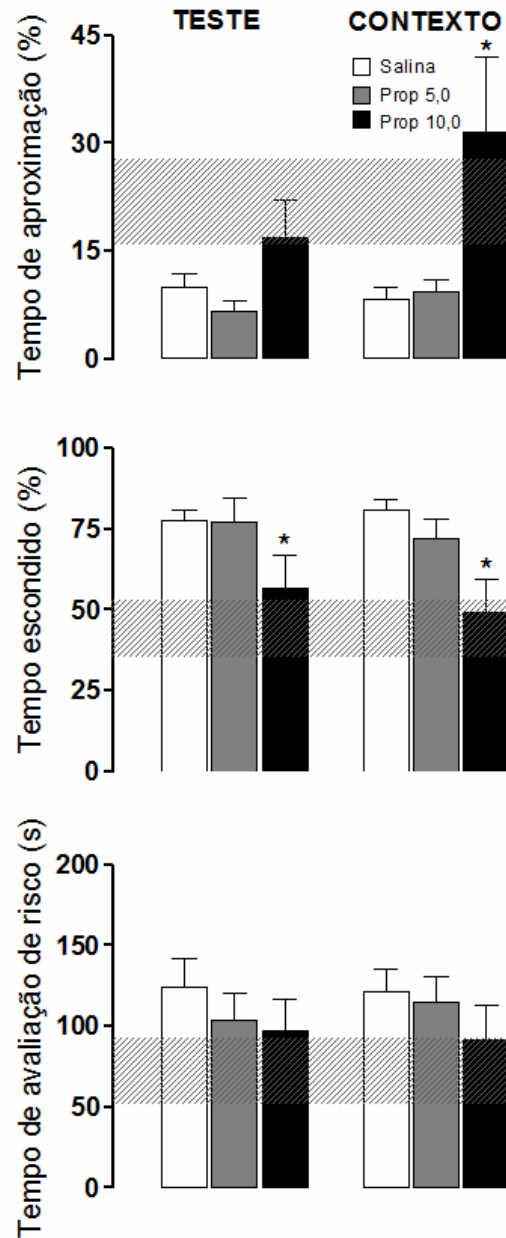


Figura 21. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco, dos grupos Prop 5,0 (propranolol 5,0 mg/kg/ml), Prop 10,0 (propranolol 10,0 mg/kg/ml) e salina administrados após o condicionamento. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m. *p<0,05 comparado ao grupo salina. n=11-20.

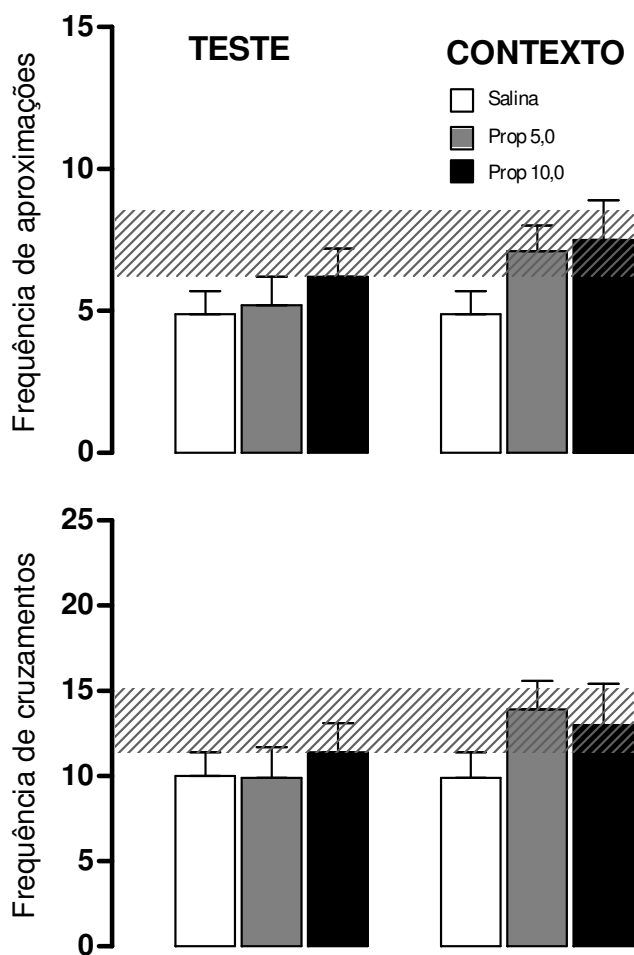


Figura 22. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros frequência de aproximações e frequência de cruzamentos, dos grupos Prop 5,0 (propranolol 5,0 mg/kg/ml), Prop 10,0 (propranolol 10,0 mg/kg/ml) e salina administrados após o condicionamento. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m. n=11-20.

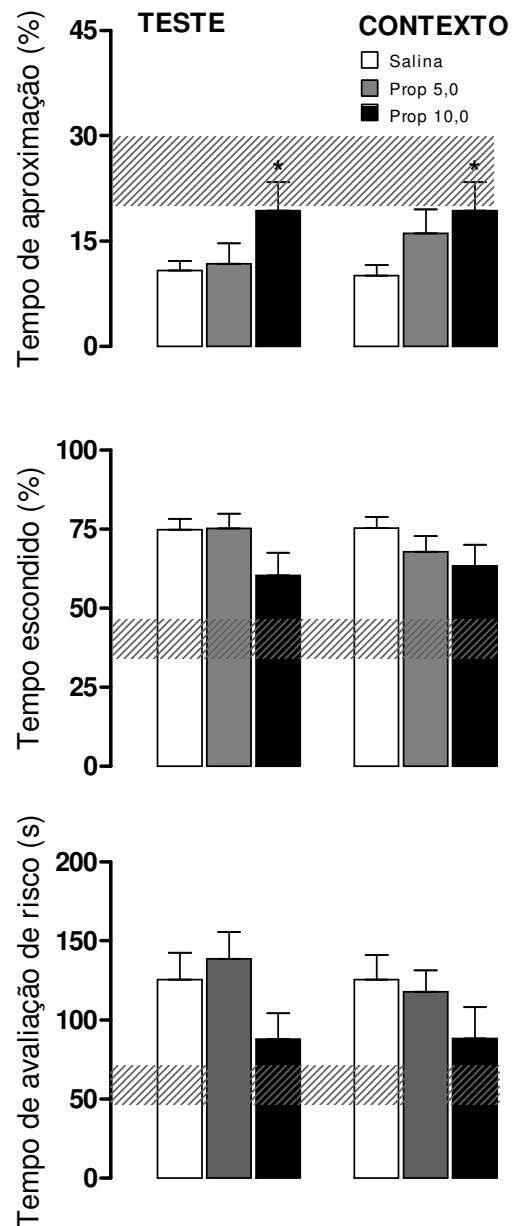


Figura 23. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco, dos grupos Prop 5,0 (propranolol 5,0 mg/kg/ml), Prop 10,0 (propranolol 10,0 mg/kg/ml) e salina administrados antes do teste. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. $n = 10-14$.

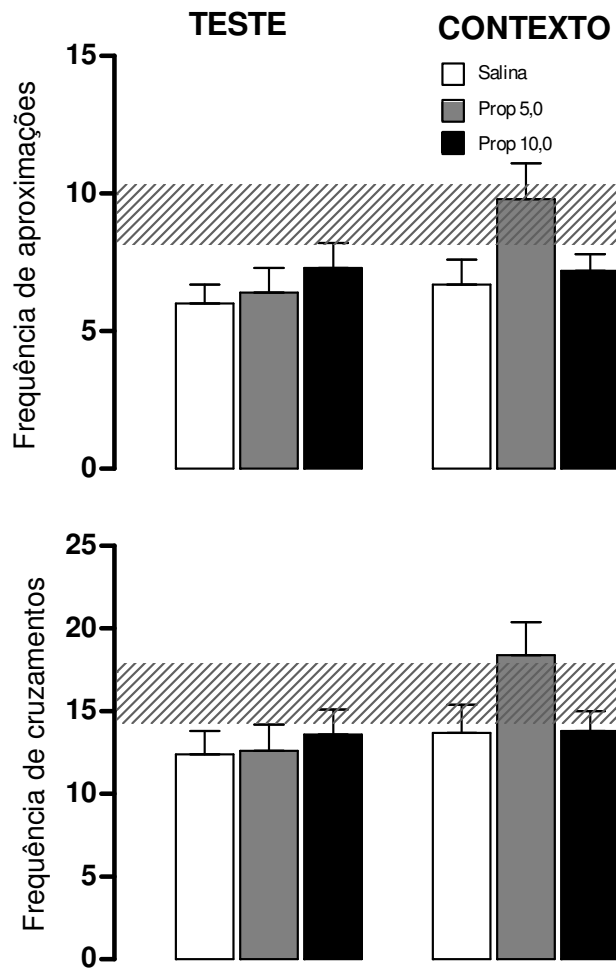


Figura 24. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros freqüência de aproximações e freqüência de cruzamentos, dos grupos Prop 5,0 (propranolol 5,0 mg/kg/ml), Prop 10,0 (propranolol 10,0 mg/kg/ml) e salina, administrados antes do teste. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m. n=10-14.

4.2.3 Avaliação do efeito da escopolamina sobre a aquisição, a consolidação e a expressão do condicionamento olfatório de medo

A) Avaliação da resposta de medo condicionado em ratos administrados com escopolamina antes do condicionamento

A ANOVA para os parâmetros % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco detectou efeito significativo para o fator tratamento [$F(2,39)=3,51$, $p<0,05$; $F(2,39)=4,71$, $p<0,02$], mas não para o fator repetição [$F(1,39)=1,18$, $p>0,1$; $F(1,39)=3,22$, $p>0,05$] e para a interação entre o fator tratamento e o fator repetição [$F(2,39)=0,23$, $p>0,1$; $F(2,39)=1,00$, $p>0,1$]. O teste Dunnett revelou uma significativa redução na % de tempo escondido e no tempo de avaliação de risco no grupo tratado com escopolamina 0,6 mg/kg/ml em relação ao grupo controle (salina), conforme figura 25. O tratamento com escopolamina 1,2 mg/kg/ml promoveu, da mesma forma, uma redução no tempo de avaliação de risco quando comparado ao tratamento com salina (figura 25). Esta redução do comportamento defensivo foi observada tanto no teste quanto no contexto.

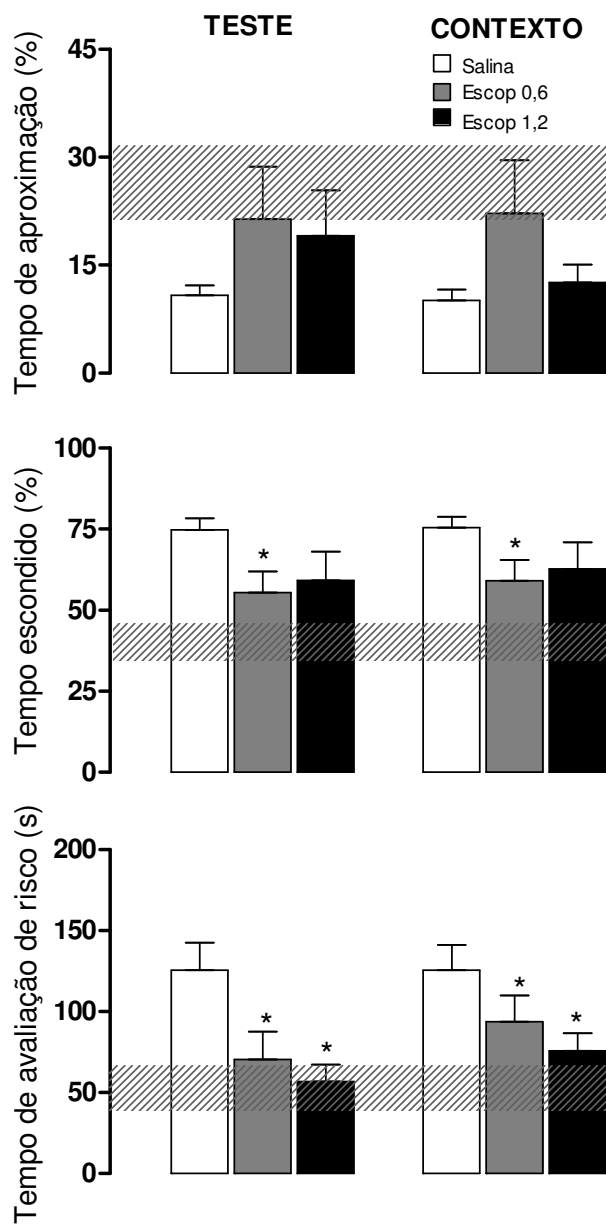


Figura 25. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco, dos grupos Escop 0,6 (escopolamina 0,6 mg/kg/ml), Escop 1,2 (escopolamina 1,2 mg/kg/ml) e salina administrados antes do condicionamento. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. $n = 11-19$.

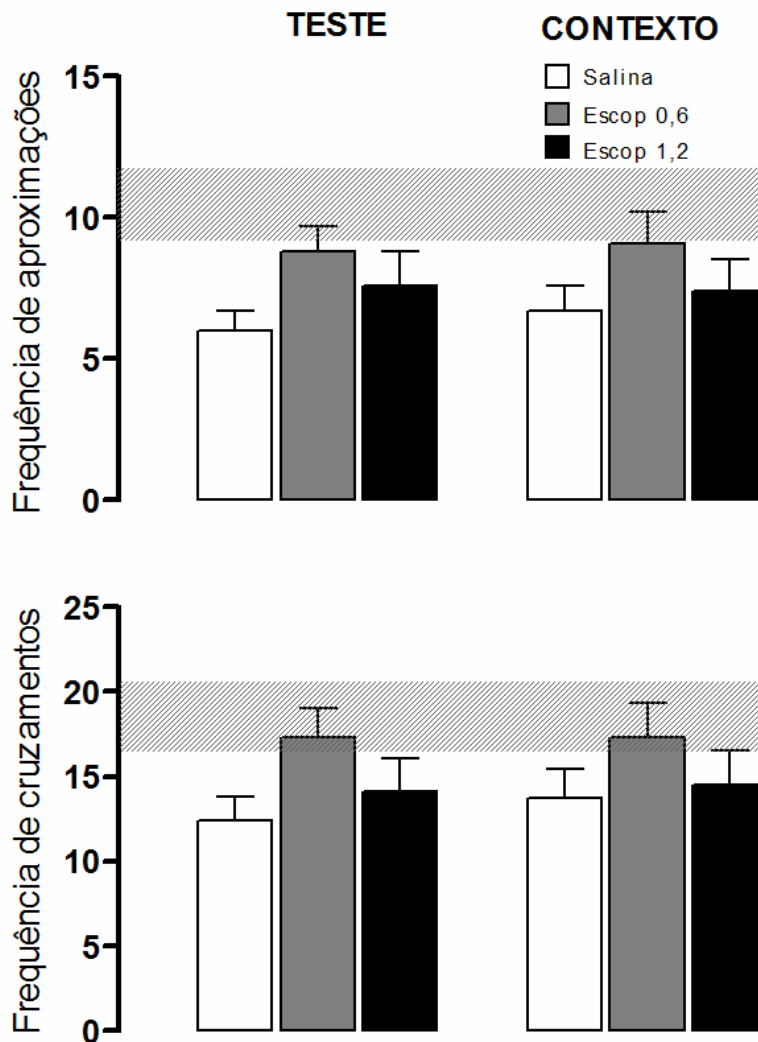


Figura 26. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros frequência de aproximações e frequência de cruzamentos, dos grupos Escop 0,6 (escopolamina 0,6 mg/kg/ml), Escop 1,2 (escopolamina 1,2 mg/kg/ml) e salina administrados antes do condicionamento. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m.. n=11-19.

B) Avaliação da resposta de medo condicionado em ratos administrados com escopolamina após o condicionamento

Conforme visualizado nas figuras 27 e 28, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos e as sessões em nenhum dos parâmetros analisados.

C) Avaliação da resposta de medo condicionado em ratos administrados com escopolamina antes do teste

A ANOVA para os parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido, tempo de avaliação de risco e frequência de aproximações detectou efeito significativo para o fator tratamento [$F(2,34) = 4,80$, $p < 0,02$; $F(2,34) = 3,32$, $p < 0,05$; $F(2,34) = 3,33$, $p < 0,05$; $F(2,34) = 3,56$, $p < 0,04$], mas não para o fator repetição [$F(1,34) = 0$, $p > 0,1$; $F(1,34) = 0,50$, $p > 0,1$; $F(1,34) = 0,06$, $p > 0,1$; $F(1,34) = 0,08$, $p > 0,1$] e para a interação entre o fator tratamento e o fator repetição [$F(2,34) = 0,02$, $p > 0,1$; $F(2,34) = 0,32$, $p > 0,1$; $F(2,34) = 0,34$, $p > 0,1$; $F(2,34) = 0,57$, $p > 0,1$]. A análise *post-hoc* revelou um significativo aumento na % de tempo de aproximação, bem como uma diminuição na % de tempo escondido e no tempo de avaliação de risco no grupo tratado com escopolamina 0,6 mg/kg/ml em relação ao grupo controle (salina), conforme figura 29. Ainda, um aumento na frequência de aproximações foi observado neste grupo quando comparado ao grupo tratado com salina (figura 30). Esta importante redução do comportamento defensivo foi observada tanto no teste quanto no contexto.

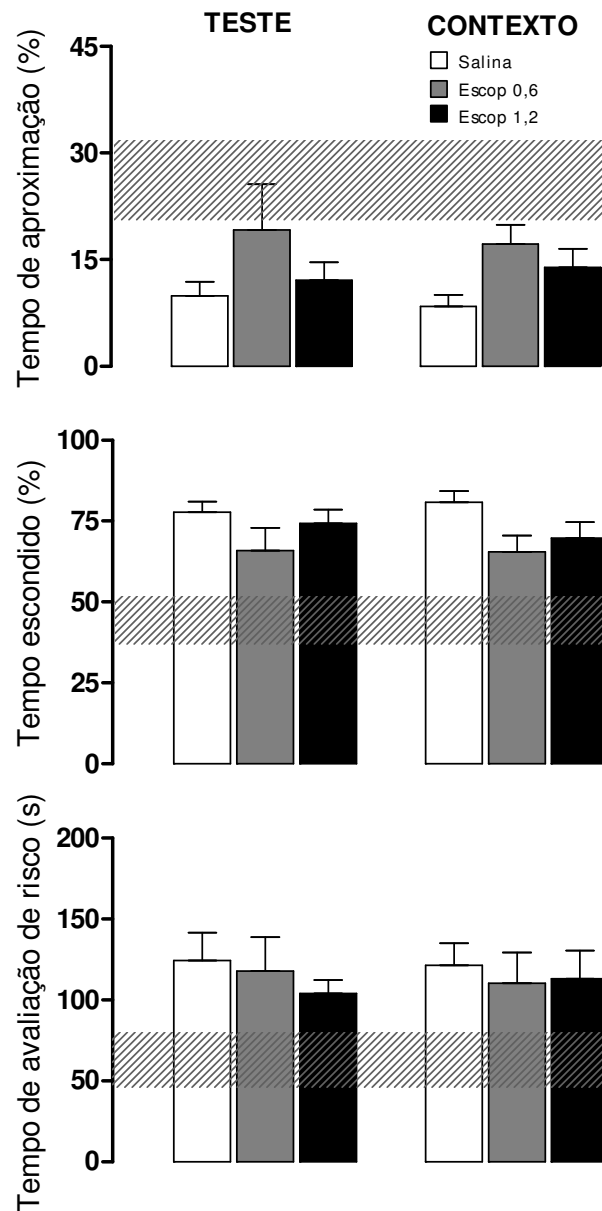


Figura 27. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco, dos grupos Escop 0,6 (escopolamina 0,6 mg/kg/ml), Escop 1,2 (escopolamina 1,2 mg/kg/ml) e salina administrados após o condicionamento. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m.. n=12-20.

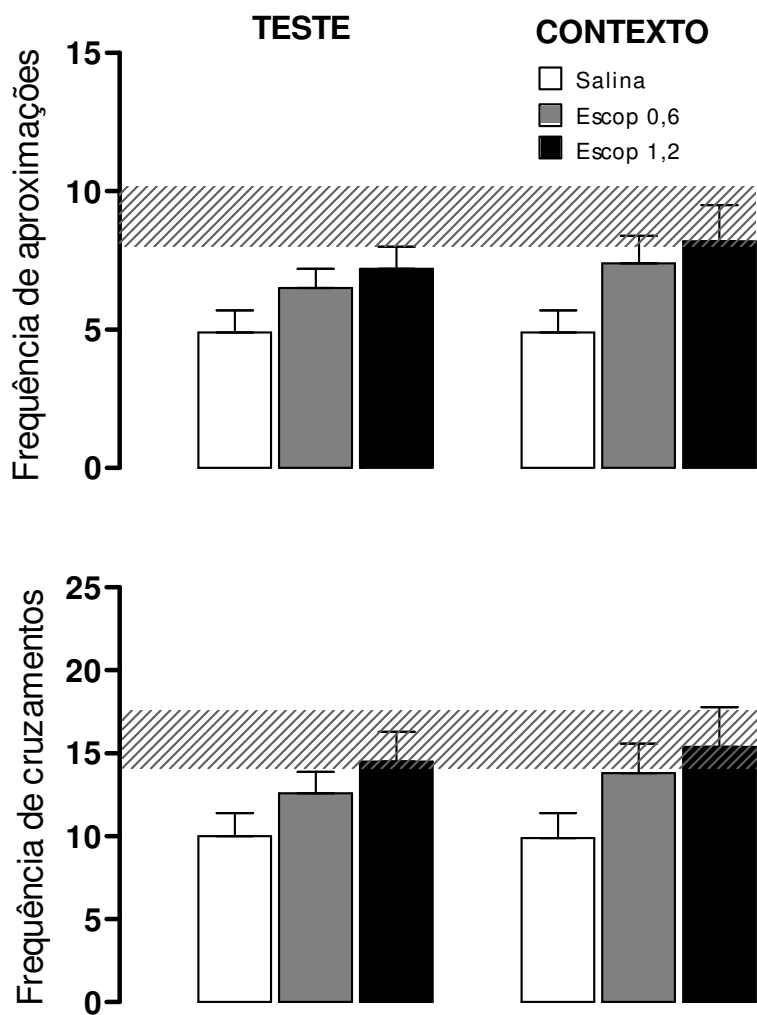


Figura 28. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros freqüência de aproximações e freqüência de cruzamentos, dos grupos Escop 0,6 (escopolamina 0,6 mg/kg/ml), Escop 1,2 (escopolamina 1,2 mg/kg/ml) e salina administrados após o condicionamento. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m.. n=12-20.

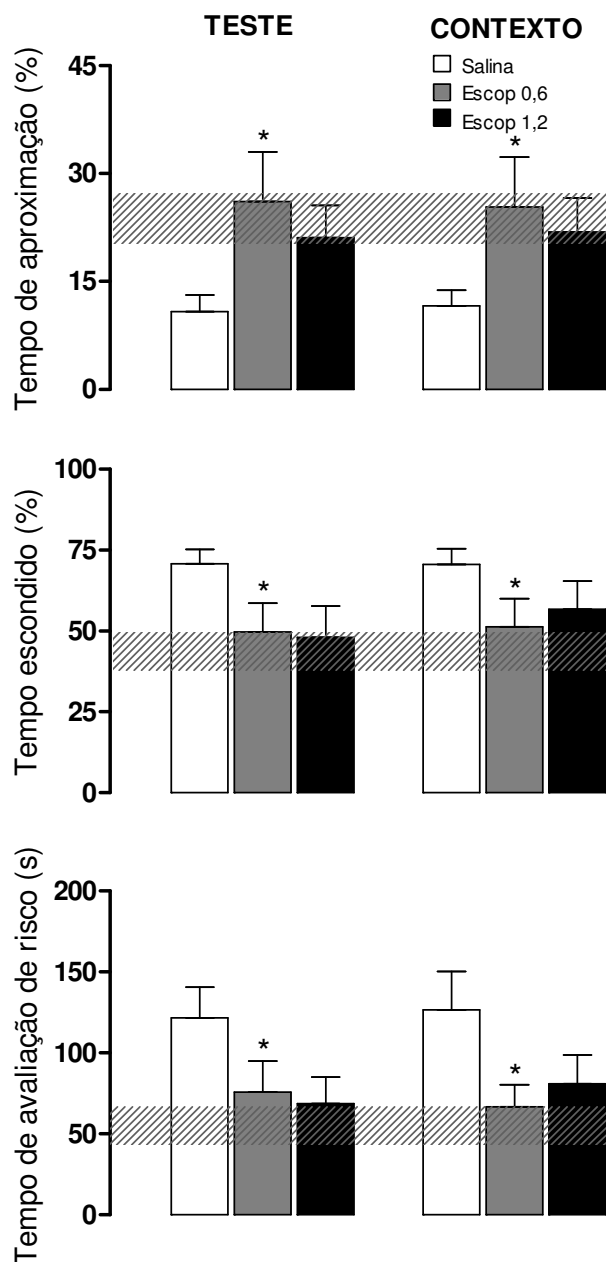


Figura 29. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de avaliação de risco, dos grupos Escop 0,6 (escopolamina 0,6 mg/kg/ml), Escop 1,2 (escopolamina 1,2 mg/kg/ml) e salina administrados antes do teste. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. $n = 11-14$.

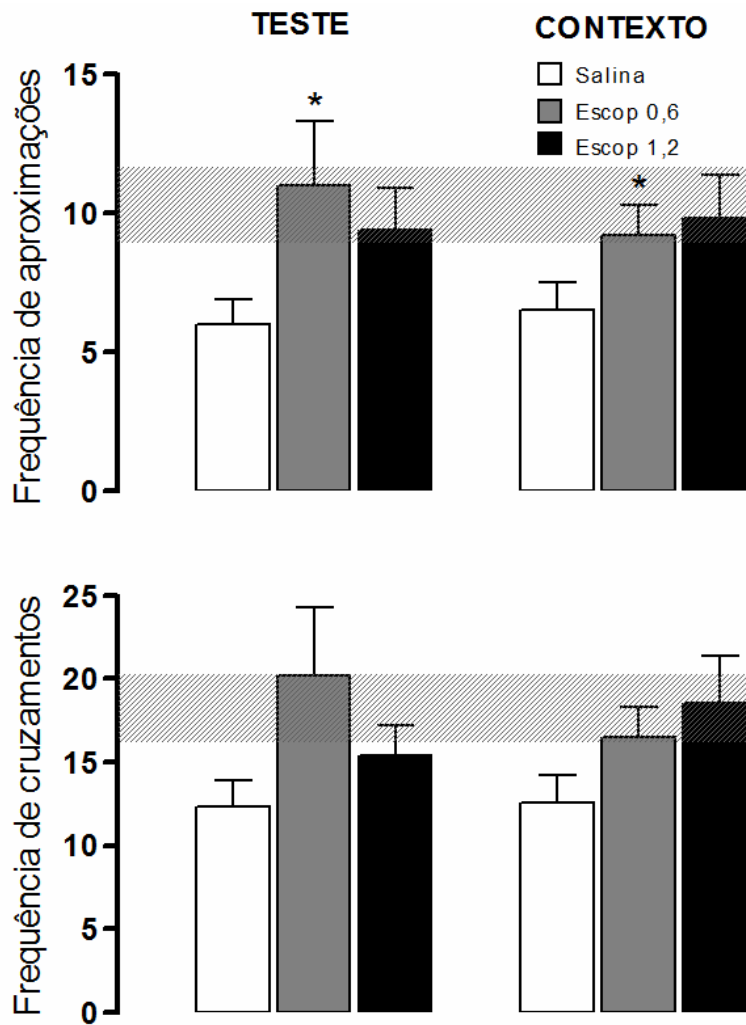


Figura 30. Avaliação do medo condicionado, na sessão de teste e sessão de contexto, através dos parâmetros freqüência de aproximações e freqüência de cruzamentos, dos grupos Escop 0,6 (escopolamina 0,6 mg/kg/ml), Escop 1,2 (escopolamina 1,2 mg/kg/ml) e salina administrados antes do teste. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo do limite de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média + e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. $n = 11-14$.

5 - DISCUSSÃO:

Experiências de medo podem estabelecer memórias emocionais que resultam em mudanças comportamentais. Enquanto o medo é um componente adaptativo em resposta a estímulos potencialmente ameaçadores, o medo em excesso ou inapropriado exibe um importante papel na psicopatologia dos transtornos de ansiedade (PEZZE & FELDON, 2004).

O condicionamento de medo Pavloviano tem sido amplamente utilizado para o estudo das bases neuroanatômicas, celulares e moleculares do medo (KIM & JUNG, 2006). Como descrito na introdução, para que o condicionamento de medo seja estabelecido e as respostas defensivas expressas, é necessário que ocorra o pareamento entre um estímulo inicialmente neutro e um estímulo incondicionado aversivo (EI). No presente estudo, foi utilizado o odor de café, como estímulo olfatório neutro pareado com o choque elétrico nas patas para a obtenção de padrões comportamentais defensivos semelhantes àqueles exibidos em situações de medo inato (ex.: exposição ao odor de predador). Assim sendo, os parâmetros utilizados para avaliar o comportamento defensivo dos animais submetidos ao condicionamento olfatório de medo foram os mesmos utilizados na padronização do modelo de odor de gato (DO-MONTE, 2006).

O café exibe um aroma bastante característico que é formado por inúmeros compostos voláteis de intensidades e concentrações diferentes. Estes compostos voláteis são gerados basicamente durante a torrefação do café verde (CZERNY & GROSCHE, 2000). Apesar da complexidade de seu aroma, o odor de café é um estímulo neutro, não causa preferência nem aversão em ratos, podendo ser utilizado como estímulo olfatório condicionado (SAKAI & IMADA, 2003). Com o intuito de confirmar estes dados da literatura sobre a neutralidade ou irrelevância biológica do odor de café, durante a etapa inicial deste trabalho, um grupo de animais foi apresentado e re-exposto a este estímulo olfatório para a avaliação das respostas comportamentais. De acordo com as figuras 9, 10, 11 e 12, pôde-se observar que a exposição ao odor de café, na ausência de condicionamento prévio, não gerou quaisquer alterações nos parâmetros utilizados para a avaliação do comportamento defensivo. Este perfil mostrou-se diferente daquele observado durante a exposição de ratos ao

odor de gato, onde os mesmos parâmetros traduziram uma resposta de medo bastante evidente (Tabela 1; DO-MONTE, 2006).

Um segundo grupo de animais, grupo não-pareado, foi exposto tanto ao EI quanto ao EC em dias alternados. Estes animais receberam choque(s) nas patas no primeiro dia de experimento e no dia seguinte foram apresentados ao odor de café. Esta seqüência de eventos foi determinada com base em dados da literatura que demonstram que o condicionamento olfatório de medo ocorre apenas quando o EC precede o EI, e que a ordem inversa, não é capaz de ocasionar uma associação entre os estímulos (OTTO et al., 1997). De fato, a análise comportamental do grupo não-pareado confirmou a importância desta seqüência de eventos para a ocorrência do pareamento, uma vez que não foram observadas alterações em nenhum dos parâmetros utilizados para a avaliação da resposta defensiva neste grupo (Figuras 11 e 12).

Os animais do grupo pareado foram apresentados ao odor de café, que permaneceu exposto ao longo de toda sessão, de maneira concomitante a apresentação do estímulo aversivo choque elétrico nas patas. A utilização de vários pareamentos (EC-EI) no condicionamento com estímulo discreto é considerada indispensável em muitos trabalhos (RADLEY et al., 2006, GRAVIUS et al., 2006; OTTO et al., 1997). Apesar desta premissa, Paschall e Davis (2002) demonstraram um robusto reflexo de sobressalto potencializado pelo medo, mediado por uma pista olfatória, com um único pareamento EC/EI. Desta forma, a padronização do modelo de condicionamento olfatório de medo foi iniciada com apenas uma sessão de pareamento. Mesmo tratando-se de um estímulo que ativa um sentido bastante desenvolvido nos roedores, uma única sessão de pareamento, como ilustra as figuras 9 e 10, não foi suficiente para gerar um padrão de respostas condicionadas de medo. Apesar das diferenças estatísticas em relação ao grupo café sem choque nos parâmetros frequência de aproximações e de cruzamentos, não foram observadas alterações significativas entre o grupo pareado e não-pareado em nenhum dos parâmetros comportamentais avaliados. De maneira semelhante, o grupo de animais que recebeu dois ou três choques pareados com o estímulo olfatório também não apresentou modificações significativas nos parâmetros indicativos de resposta defensiva. Conforme ilustrado nas figuras 9 e 10, em ambos os protocolos (2 ou 3 choques), os grupos pareados são semelhantes aos respectivos grupos

não pareados e café sem choque, não exibindo qualquer indício de medo no confronto com o estímulo olfatório condicionado.

A padronização do modelo foi estabelecida com a emissão de cinco choques, com intervalo de 40 segundos entre cada evento, na presença do estímulo olfatório. Este resultado está de acordo com muitos estudos de condicionamento olfatório de medo que utilizam cinco (WALKER et al., 2005) ou seis (OTTO et al., 1997; FUNK & AMIR, 2000; SEVELINGES et al., 2004) pareamentos para o estabelecimento da associação EC/EI. As figuras 11 e 12 demonstram claramente que a re-exposição ao odor de café, num ambiente diferente daquele em que ocorreu o pareamento, foi capaz de alterar significativamente os parâmetros comportamentais avaliados, revelando um aumento das respostas defensivas frente ao estímulo condicionado.

O estímulo incondicionado, assim como o estímulo condicionado, exibe importante papel na aquisição da resposta condicionada. É essencial a administração de um estímulo suficiente para gerar o condicionamento, contudo é necessário que a aversão exibida pelo estímulo não resulte no fenômeno de generalização. A generalização é a habilidade de responder de maneira similar a estímulos que são qualitativamente distintos, mas funcionalmente equivalentes (GARAKANI et al., 2006). Por outro lado, a discriminação baseia-se na capacidade de discernir estímulos semelhantes, produzindo respostas condicionadas frente apenas ao estímulo apropriado.

Os resultados obtidos demonstram uma similaridade entre o grupo não pareado e o grupo café sem choque descartando a possibilidade de estas respostas defensivas terem sido ocasionadas simplesmente pela emissão dos choques elétricos nas patas. Em conjunto, os dados da padronização confirmam que a expressão do comportamento de medo na presença do EC, observada no grupo pareado, não é atribuída a uma generalização ao novo contexto ou a simples reapresentação ao odor de café, mas reflete na verdade um aprendizado da associação EC-EI.

O protocolo experimental utilizado no presente estudo permitiu ainda a avaliação do medo condicionado contextual ao ambiente onde ocorreu a re-exposição ao odor de café. Durante esta etapa, apesar da ausência do estímulo olfatório, o grupo pareado manteve o mesmo perfil de medo visualizado no dia anterior, quando o estímulo olfatório encontrava-se presente,

conforme figuras 11 e 12. Este fenômeno foi interpretado como um novo condicionamento contextual, confirmando de fato a relevância que o estímulo olfatório adquiriu após o pareamento. Esta exacerbação das respostas defensivas, visualizada nos animais do grupo pareado durante o contexto, não foi observada nos demais grupos, o que reforça a propriedade neutra do odor de café e confirma a necessidade do EC preceder o EI para que ocorra uma associação dos estímulos.

Os resultados obtidos durante esta etapa de padronização demonstram que a relação informacional na associação entre o EC e o EI foi eficientemente adquirida e capaz de gerar respostas condicionadas. Assim sendo, e considerando o envolvimento do sistema GABAérgico, em especial os receptores GABA_A, nos transtornos da ansiedade e nos processos de memória e aprendizado, a etapa subsequente do presente estudo avaliou o papel do benzodiazepínico midazolam em ratos submetidos ao modelo de condicionamento olfatório de medo.

A administração de midazolam, na dose de 0,5 mg/kg/ml, 30 minutos antes do condicionamento, foi capaz de prejudicar expressivamente a resposta defensiva durante a re-exposição ao odor de café (figuras 13 e 14). Além disso, esta mesma dose, quando administrada imediatamente após o condicionamento, foi capaz de alterar o comportamento defensivo (figura 15). Entretanto, quando administrada 30 minutos antes do teste, não provocou quaisquer mudanças no perfil de medo condicionado (figuras 17 e 18).

A dose mais baixa de midazolam, 0,375 mg/kg/ml, quando administrada antes do condicionamento, causou uma atenuação da resposta defensiva somente em alguns parâmetros (figura 13). Esta mesma dose, injetada logo após o condicionamento, foi capaz de reduzir apenas o comportamento de avaliação de risco (figura 15). De maneira semelhante àquela observada com a dose mais alta, a administração de midazolam 0,375 mg/kg 30 minutos antes do teste, não prejudicou a expressão das respostas comportamentais condicionadas (figuras 17 e 18).

Os animais submetidos ao tratamento com midazolam antes do condicionamento exibiram ainda uma redução da resposta comportamental defensiva durante a exposição ao contexto, a qual foi representada por uma alteração nos mesmos parâmetros comportamentais modificados no dia

anterior (figuras 13 e 14). Esta diminuição nas respostas de defesa pode ter sido decorrente do prejuízo causado na aquisição da associação EC-EI. Assim sendo, a ausência de uma interpretação aversiva durante a re-exposição ao odor de café impediu a ocorrência de condicionamento contextual no dia seguinte. De fato, alguns trabalhos demonstram que a administração de benzodiazepínicos prejudica a aquisição das respostas condicionadas de medo em diferentes espécies. Dantzer e colaboradores (1976) observaram que a administração de diazepam antes da sessão de pareamento prejudicou o desempenho das respostas condicionadas e impediu o aumento dos níveis plasmáticos de corticosteróide em porcos. Sanger e colaboradores (1986) observaram um prejuízo na aquisição do medo condicionado ao administrar triazolam antes da sessão de pareamento em camundongos. Feldon e Weiner (1989) mostraram que administração de clordiazepóxido antes do pareamento resultou no bloqueio da aquisição da resposta comportamental condicionada em ratos. Scaife e colaboradores (2005) propuseram que a administração de diazepam bloqueia a aquisição do sobressalto potencializado pelo medo em humanos.

A aquisição das respostas de medo condicionado implica num aprendizado inicial da associação EC/EI, seguido por um período de consolidação, onde a associação é estabelecida através da memória de longo prazo (MAREN, 2001; MCGAUGH, 2004). No presente estudo, os processos de formação da associação e consolidação foram sensíveis aos efeitos do midazolam. Há algumas evidências de experimentos em animais mostrando que os benzodiazepínicos prejudicam a consolidação da memória. Jensen e colaboradores (1979) mostraram que o flurazepam administrado imediatamente após a sessão de condicionamento bloqueou a subsequente expressão da resposta de medo.

A ação dos benzodiazepínicos sobre o condicionamento de medo parece envolver interações entre processos mnemônicos e emocionais. Desta forma, o midazolam exhibe efeitos amnésicos (POLSTER et al., 1993; THOMAS-ANTERION et al., 1999; HIRSHMAN et al., 1999) bem como propriedades ansiolíticas potenciais (SALONEN et al., 1992).

Entre os possíveis mecanismos responsáveis pelo prejuízo causado pelo midazolam na formação da associação EC/EI estão a atenção reduzida ao EC

durante as sessões de pareamento e a diminuição do caráter aversivo do EI (SCAIFE et al., 2005). A atenção reduzida ao EC poderia estar relacionada a uma diminuição na capacidade sensorial olfatória. No entanto, as respostas defensivas frente ao estímulo olfatório condicionado não foram atenuadas quando o midazolam foi administrado antes do teste. Este dado descarta a possibilidade de que o midazolam tenha impedido a aquisição do condicionamento olfatório de medo através de prejuízos na percepção sensorial. A diminuição da interpretação aversiva do IC, por sua vez, poderia estar relacionada a um efeito analgésico da droga, entretanto, ratos tratados com midazolam, na dose de até 3 mg/kg, exibiram o mesmo perfil de ratos tratados com salina em um estudo que avaliou o limiar de resposta ao choque (PAIN et al., 2002). Além disto, a propriedade sedativa dos benzodiazepínicos poderia também influenciar na redução da característica aversiva do choque elétrico. No entanto, as doses utilizadas na aquisição e consolidação foram as mesmas administradas antes do teste, e nesta sessão, todos os parâmetros avaliados exibiram medidas semelhantes em ratos tratados com salina e ratos tratados com midazolam, não sendo observado qualquer efeito sedativo. Há ainda estudos que sugerem que a supressão do medo condicionado pelo midazolam não seria mediada pela redução da propriedade aversiva do EI, mas por efeitos puramente mnemônicos. Pain e colaboradores (2002) demonstraram que o midazolam prejudicou a aquisição do condicionamento de medo, bem como suprimiu o efeito da pré-exposição do EC num subsequente condicionamento. Ou seja, a apresentação prévia do EC atenua um futuro condicionamento, entretanto, a administração de midazolam antes da pré-exposição ao EC, promoveu um condicionamento de medo semelhante ao grupo controle não pré-exposto. Estes pesquisadores observaram um efeito do midazolam sobre eventos aversivos e não-aversivos e propuseram que sua ação estaria mais relacionada a um prejuízo na formação da memória que a um efeito tipo-ansiolítico.

O presente trabalho não identificou qualquer alteração no comportamento defensivo nos grupos tratados com midazolam antes da sessão de teste. Há estudos que relatam uma atenuação do comportamento de imobilidade e do sobressalto potencializado pelo medo quando o midazolam é administrado antes da sessão de teste (SANTOS et al., 2005), contudo, o paradigma

utilizado neste trabalho foi o condicionamento de medo contextual. Assim sendo, a partir dos resultados obtidos, sugere-se que as alterações decorrentes da administração sistêmica de midazolam, principalmente a dose de 0,5 mg/kg/ml, no condicionamento olfatório de medo, são restritas à aquisição e consolidação da resposta de medo condicionado, não interferindo na expressão de respostas previamente aprendidas.

Devido à participação do sistema noradrenérgico, em especial dos receptores beta-adrenérgicos, na formação e consolidação de memórias aversivas e nas respostas defensivas (CAHILL et al., 1994; VAN STEGEREN et al., 1998; DO-MONTE, 2006), a etapa seguinte do trabalho procurou estudar os efeitos do antagonista não-seletivo dos receptores beta-adrenérgicos, o propranolol, sobre a aquisição, a consolidação e a expressão do medo condicionado olfatório.

A administração de propranolol 10 mg/kg/ml antes do condicionamento foi capaz de aumentar a % de tempo de aproximação no teste e no contexto, conforme visualizado na figura 19. Esta mesma dose, quando administrada após o condicionamento, reduziu a % de tempo que os animais permaneceram escondidos tanto no teste quanto no contexto e aumentou % de tempo que os animais se aproximaram da flanela apenas no contexto, sendo que uma tendência do aumento deste parâmetro foi observada já no dia do teste (figura 21). A dose menor de propranolol, quando administrada antes do teste, aumentou a % de tempo que os animais permaneceram aproximados da flanela tanto no dia do teste quanto na sessão de contexto (figura 23).

Evidências do envolvimento dos receptores beta-adrenérgicos em memórias emocionais partem de estudos utilizando a esquiva inibitória em roedores (DALMAZ et al., 1993; MCGAUGH et al., 1993). Durante a esquiva inibitória, os animais são treinados a esquivar-se de um lugar perigoso, portanto, é possível que a esquiva inibitória assemelhe-se mais ao condicionamento contextual (estímulo incondicionado aversivo pareado com um ambiente) que ao condicionamento com estímulo discreto (estímulo incondicionado aversivo pareado com um estímulo auditivo, visual, tátil ou olfatório). Desta forma, tratamentos que alteram a transmissão noradrenérgica, via receptores beta-adrenérgicos, podem ser especialmente importantes no condicionamento contextual. Alguns trabalhos comprovam esta hipótese (JI et

al., 2003; LA LUMIERE et al., 2003; GRILLON et al., 2004). Apesar destes resultados no condicionamento contextual, tratamentos que prejudicam a esquivas inibitória parecem não atenuar o condicionamento de medo Pavloviano com estímulo discreto avaliado através do reflexo de sobressalto (MISERENDINO et al., 1990) ou outras medidas de medo (LEE et al., 2001; JI et al., 2003; GRILLON et al., 2004).

Apesar das considerações acima descritas, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a participação dos receptores beta-adrenérgicos na aquisição do condicionamento contextual, bem como, na aquisição, na consolidação e na expressão do condicionamento olfatório de medo. A administração de propranolol nas diferentes etapas de formação e expressão do medo condicionado olfatório promoveu uma atenuação da resposta defensiva frente ao estímulo olfatório condicionado. Apesar da alteração em apenas um ou dois parâmetros do comportamento defensivo, estes índices estão intimamente relacionados à obtenção e interpretação do estímulo olfatório, traduzindo, desta forma, uma influência dos receptores beta-adrenérgicos sobre o condicionamento de medo com pista olfatória.

A atenuação das respostas defensivas resultante da administração de propranolol antes e após o condicionamento parece ser decorrente da eficácia do propranolol ao interagir com o componente emocional aversivo do evento durante o estágio de aprendizado, assim como de prejudicar a consolidação deste evento emocionalmente aversivo. A administração do propranolol antes do teste parece ter interferido na interpretação aversiva adquirida pelo estímulo condicionado, uma vez que o pareamento deste com o contexto mostrou-se, da mesma forma, prejudicado. Em adição, além da propriedade de antagonista beta-adrenérgico, uma ação antagonista sobre os receptores serotoninérgicos tem sido atribuída ao propranolol, a qual poderia estar interferindo nesses efeitos comportamentais (PIERSON et al., 1990).

Em concordância com estes achados, o tratamento com propranolol antes da exposição ao odor de gato promoveu uma redução da resposta defensiva e uma diminuição do medo condicionado avaliado durante a re-exposição ao contexto onde o odor de gato foi apresentado (DO-MONTE, 2006).

Baseado nos resultados obtidos nas etapas anteriores, o próximo passo foi a utilização da escopolamina, uma droga que classicamente prejudica o

aprendizado e a memória. A administração de escopolamina 0,6 mg/kg/ml, 30 minutos antes do condicionamento, reduziu o comportamento de avaliação de risco e a % de tempo escondido (figura 25). A dose mais alta de escopolamina, quando administrada antes do pareamento, diminuiu apenas o comportamento de avaliação de risco (figura 25).

O déficit na aquisição do aprendizado induzido pela administração de escopolamina tem sido descrito em diversos modelos animais de aprendizado e memória, como a esQUIVA passiva (ZANOTTI et al., 1986), o labirinto aquático (MCNAUGHTON & MORRIS, 1987), o labirinto radial (BOLHUIS et al., 1988) e o labirinto em T elevado (DE-MELLO & CAROBREZ, 2002).

Estudos demonstram que a aquisição do condicionamento de medo com estímulo discreto também é prejudicada pela administração de escopolamina antes da sessão de pareamento EC/EI (YOUNG et al., 1995; RUDY, 1996; ANAGNOSTARAS et al., 1999). Este déficit pode ser decorrente de uma redução no processamento do estímulo condicionado ou de um prejuízo na sua associação com o estímulo aversivo. É possível que o decréscimo produzido pela escopolamina no processamento do EC esteja atribuído a uma redução da atividade do sistema colinérgico nos sítios sensoriais determinantes para este evento (YOUNG et al., 1995).

A escopolamina administrada imediatamente após o condicionamento não foi capaz de modificar as respostas defensivas dos animais frente ao estímulo olfatório condicionado (figuras 27 e 28).

Rudy (1996), em seus estudos com ratos jovens, relatou que a administração de escopolamina após o condicionamento promoveu um prejuízo na consolidação do medo condicionado acústico. Por outro lado, Young e colaboradores (1995) observaram que a administração de escopolamina imediatamente após o condicionamento facilitou o condicionamento de medo acústico. Controvérsias em relação a estes resultados são discutidas por Anagnostaras e colaboradores (1999) que não obtiveram qualquer redução da resposta defensiva com a administração de escopolamina após o condicionamento. Estes autores sugerem que os resultados de Rudy (1996) são decorrentes do uso de ratos jovens, os quais são mais sensíveis à droga, ou pelo fato da neurotransmissão colinérgica ser requerida na consolidação somente durante o desenvolvimento.

A administração de escopolamina na dose mais baixa, 0,6 mg/kg/ml, 30 minutos antes do teste, promoveu uma importante redução da resposta defensiva. A redução da resposta de medo foi, de forma semelhante, mantida na sessão de contexto (figuras 29 e 30).

Em concordância com estes resultados, estudos mostram que a escopolamina bloqueia as reações defensivas exibidas em ratos confrontados com um gato (PLOTNIK et al., 1974; RODGERS et al., 1990), bem como aquelas produzidas pela administração de D-tubocurarina (SIEGEL & POTT, 1988). Em adição, um efeito tipo ansiolítico foi detectado usando o modelo do labirinto em zero elevado (SHEPHERD et al., 1994). Em contrapartida, alguns estudos na literatura relatam que a administração de escopolamina é capaz de promover um aumento da esquivas a ambientes não familiares (HUGHES et al., 1975) e uma redução na atividade nos braços abertos no labirinto em cruz elevado para ratos e camundongos (FALTER et al., 1992; RODGERS & COLE, 1995), sugerindo uma aversão/ansiedade aumentada com o uso deste antagonista muscarínico.

Levando-se em consideração estas divergências encontradas na literatura, Bertoglio e Carobrez (2004) sugerem que as alterações das respostas defensivas promovidas pela administração de escopolamina, muitas vezes traduzidas como um efeito tipo ansiolítico, possam ser decorrentes de um prejuízo na estratégia comportamental adotada pelo animal no modelo onde o mesmo foi submetido (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2004). Desta forma, sugere-se que a redução da resposta condicionada de medo, observada com a administração de escopolamina 0,6 mg/kg/ml 30 minutos antes do teste, deva-se a uma mudança na estratégia de defesa frente ao estímulo olfatório condicionado. A expressão deste perfil comportamental impediu o condicionamento entre o estímulo olfatório condicionado e o ambiente onde este foi reapresentado.

Concluindo, o presente trabalho avaliou os efeitos do midazolam, um benzodiazepínico, do propranolol, um antagonista beta-adrenérgico, da escopolamina, um antagonista muscarínico colinérgico sobre as etapas de aquisição, consolidação e expressão do condicionamento olfatório de medo em ratos. Os resultados demonstraram que a administração de midazolam antes e imediatamente após o condicionamento promoveu redução da resposta

defensiva, frente ao estímulo condicionado. O propranolol promoveu uma atenuação do comportamento defensivo quando administrado nas diferentes etapas de formação e expressão do condicionamento de medo. A escopolamina injetada antes do condicionamento e antes do teste promoveu também uma diminuição da resposta de medo.

Os resultados obtidos sugerem que o modelo de condicionamento de medo evocado por um estímulo olfatório exibe valor preditivo suficiente para revelar os efeitos farmacológicos de drogas como o midazolam, o propranolol e a escopolamina. Assim sendo, estudos futuros são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos que correlacionam as estruturas cerebrais envolvidas na circuitaria do condicionamento olfatório de medo com os diversos sistemas de neurotransmissão relacionados ao comportamento defensivo e à memória aversiva.

6 – SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

- A utilização de cinco associações entre o odor de café (EC) e o choque elétrico nas patas (EI) promoveu a expressão de uma robusta resposta condicionada de medo quando os animais pareados foram re-apresentados ao estímulo condicionado;
- O caráter aversivo do odor de café adquirido durante a associação com o estímulo incondicionado foi suficiente para promover o pareamento entre o estímulo olfatório condicionado e o ambiente onde este foi re-exposto aos animais, propiciando um condicionamento contextual;
- A administração de midazolam, um benzodiazepínico, foi capaz de reduzir as respostas de medo frente ao estímulo condicionado quando administrado antes e imediatamente após o condicionamento, não exercendo qualquer prejuízo na expressão da resposta de medo previamente aprendida;
- A atenuação da resposta defensiva, decorrente do prejuízo na aquisição e consolidação do condicionamento olfatório de medo promovido pelo midazolam, foi observada também na sessão de contexto;
- A administração de propranolol, um antagonista beta-adrenérgico não seletivo, atenuou o padrão comportamental defensivo frente ao odor de café condicionado e ao contexto de reapresentação do estímulo olfatório, prejudicando as etapas de formação e expressão do medo condicionado com pista olfatória e a formação do medo condicionado contextual;
- A administração de escopolamina antes do condicionamento foi capaz de atenuar a resposta de medo frente ao odor de café condicionado;
- A escopolamina bloqueou de forma robusta a expressão da resposta defensiva frente ao estímulo olfatório quando administrada antes da reapresentação ao odor de café condicionado;
- A redução da resposta defensiva, resultante de um prejuízo na aquisição e expressão do condicionamento olfatório de medo pela administração de escopolamina, foi visualizada, da mesma forma, na sessão de contexto.

7 - CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, evidenciou-se que o condicionamento olfatório de medo, utilizando cinco pareamentos entre o odor de café, estímulo condicionado, e o choque nas patas, estímulo incondicionado, foi capaz de gerar respostas defensivas em ratos confrontados com o estímulo olfatório condicionado e com o contexto onde este estímulo foi reapresentado. Em adição, o condicionamento olfatório de medo mostrou-se um modelo sensível a drogas que modulam a formação e expressão do medo, a evocação de respostas defensivas e os processos de aprendizagem e memória.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACQUAS, E.; WILSON, C.; FIBIGER, H.C. Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation and fear. **J. Neurosci.** 16: 3089-3096, 1996.

AIGNER, T.G.; WALKER, D.L.; MISHKIN, M. Comparison of the effects of scopolamine administered before and after acquisition in a test of visual recognition in monkeys. **Behav. Neural Biol.** 55: 61-67, 1991.

ANAGNOSTARAS, S.G.; MAREN, S. SAGE, J.R.; GOODRICH, S.; FANSELOW, M.S. Scopolamine and Pavlovian fear conditioning in rats: dose-effect analysis. **Neuropsychopharmacology** 21 (6): 731-744, 1999.

ANAGNOSTARAS, S.G.; MAREN, S.; FANSELOW, M.S. Scopolamine selectively disrupts the acquisition of contextual fear conditioning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory** 64: 191-194, 1995.

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.

BAKER, K.B.; KIM, J.J. Amygdalar lateralization in fear conditioning: evidence for greater involvement of the right amygdala. **Behavioral Neuroscience** 118 (1): 15-23, 2004.

BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P. Scopolamine given pre-trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze trial 2. **Behavioural Pharmacology** 15: 45-54, 2004.

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-S4, 1989.

BLANCHARD, R.J.; YUDO, E.B.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, D.C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioural Brain Research** 58: 155-156, 1993.

BOLHUIS, J.J.; STRIJKSTRA, A.M.; KRAMERS, R.J. Effects of scopolamine on performance of rats in a delayed-response radial maze task. **Physiol. Behav.** 43: 403-409, 1988.

BREMNER, J.D.; KRYSTAL, J.H.; SOUTHWICK, S.M.; CHARNEY, D.S. Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. **Synapse** 23 (1): 28-38, 1996.

BRENNAN, P.A.; KEVERNE, E.B. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. **Progress in Neurobiology** 51: 457-481, 1997.

BURESOVA, O.; BURES, J. Radial maze as a tool for assessing the effect of drugs on the working memory of rats. **Psychopharmacology** 77: 268-271, 1982.

CAHILL, L.; PRINS, B.; WEBER, M.; MCGAUGH, J.L. Beta-adrenergic activation and memory for emotional events. **Nature** 371 (6499): 702-4, 1994.

CAMPEAU, S.; DAVIS, M. Involvement of subcortical and cortical afferents to the lateral nucleus of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. **The Journal of Neuroscience** 15 (3): 2312-2327, 1995.

CANTERAS, N.S. The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 71: 481-491, 2002.

CARRIVE, P. Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. **Brain Research** 858: 440-445, 2000.

CARRIVE, P. Dual activation of cardiac sympathetic and parasympathetic components during conditioned fear to context in the rat. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** 33: 1251-1254, 2006.

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

CHANCE, W.T.; KRYNOCK, G.M.; ROSECRANS, J.A. Antinociception following lesion-induced hyperemotionality and conditioned fear. **Pain** 4: 243-252, 1978.

CHARNEY, D.S.; MIHIC, S.J.; HARRIS, R.A. Hypnotics and sedatives. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. McGraw-Hill, 2001.

CHERUBINI, E.; CONTI, F. Generating diversity at GABAergic synapses. **Trends Neurosci.** 24: 155-162, 2001.

COUSENS, G.; OTTO, T. Both pre and posttraining excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience** 112 (5): 1092-1103, 1998.

CROW, T.; GROVE-WHITE, I. An analysis of the learning deficit following hyoscine administration in man. **Br. J. Pharmacol.** 49: 322-327, 1973.

CZERNY, M.; GROSCH, W. Potent odorants of raw Arabica coffee. Their changes during roasting. **J. Agric. Food Chem.** 48: 868-872, 2000.

DALMAZ, C.; INTROINI-COLLISON, I.B.; MCGAUGH, J.L. Noradrenergic and cholinergic interactions in the amygdala and the modulation of memory storage. **Behavioural Brain Research** 58: 167-174, 1993.

DANTZER, R.; MORMEDE, P.; FAVRE, B. Fear-dependent variations in continuous avoidance behavior of pigs, II. Effects of diazepam on acquisition and performance of Pavlovian fear conditioning and plasma corticosteroid levels. **Psychopharmacology** 49 (1): 75-8, 1976.

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

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

DE BLASI, A. Beta-adrenergic receptors: structure, function and regulation. **Drugs Exp. Clin. Res.** 16 (3): 107-12, 1990.

DEBIEC, J.; LEDOUX, J.E. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. **Neuroscience** 129: 267-272, 2004.

DE-MELLO, N.; CAROBREZ, A.P. Elevated T-maze as an animal model of memory: effects of scopolamine. **Behavioural Pharmacology** 13: 139-148, 2002.

DE OCA, B.M.; DECOLA, J.P.; MAREN, S.; FANSELOW, M.S. Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and

expression of defensive responses. **Journal of Neuroscience** 18: 3426-3432, 1998.

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

DIELENBERG, R.A.; ARNOLD, J.C.; MCGREGOR, I.S. Low-dose midazolam attenuates predatory odor avoidance in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 62 (2): 197-201, 1999.

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

DUDAI, Y. Reconsolidation: the advantage of being refocused. **Current Opinion in Neurobiology** 16: 174-178, 2006.

EVANS, M.S.; VIOLA-MCCABE, K.E. Midazolam inhibits long-term potentiation through modulation of GABA_A receptors. **Neuropharmacology** 35: 347-357, 1996.

FALTER, U.; GOWER, A.; GOBERT, J. Anxiogenic effects of scopolamine observed in rats in the elevated plus-maze. In: FILES, S.E.; BRILEY, M. **New concepts in Anxiety.** London: Macmillan, 1992.

FANSELOW, M.S. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. **Pavlov J. Biol. Sci.** 15: 177-182, 1980.

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

FANSELOW, M.S.; KIM, J.J.; YIPP, J.; DE OCA, B. Differential effects of the N-methyl-D-aspartate antagonist DL-2-amino-5-phosphonovalerate on acquisition of fear of auditory and contextual cues. **Behavioral Neuroscience** 108 (2): 235-40, 1994.

FELDON, J.; WEINER, I. Abolition of the acquisition but not the expression of latent inhibition by chlordiazepoxide in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 32 (1): 123-7, 1989.

FENDT, M.; FANSELOW, M.S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 23: 743-760, 1999.

FENDT, M.; KOCH, M.; SHNITZLER, H.U. Lesions of the central gray block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. **Behavioural Brain Research** 74: 127-134, 1996.

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

FUNK, D.; AMIR, S. Enhanced Fos expression within the primary olfactory and limbic pathways induced by an aversive conditioned odor stimulus. **Letter to Neuroscience** 8 (3): 403-406, 2000.

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

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

GIOVANNINI, M.G.; RAKOVSKA, A.; BENTON, R.S.; PAZZAGH, M.; BIANCHI, L.; PEPEU, G. Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA and glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. **Neuroscience** 106: 43-53, 2001.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. Atheneu: São Paulo, 1999.

GRAVIUS, A.; BARBERI, C.; SCHAFFER, D.; SCHMIDT, W.J.; DANYSZ, W. The role of group I metabotropic glutamate receptors in acquisition and expression of contextual and auditory fear conditioning in rats – a comparison. **Neuropharmacology** 51 (7-8): 1146-55, 2006.

GRILLON, C.; CORDOVA, J.; MORGAN, C.A.; CHARNEY, D.S.; DAVIS, M. Effect of the beta-blocker propranolol on cued and contextual fear conditioning in humans. **Psychopharmacology** 175: 342-352, 2004.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonist and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Shmiedeberg's Arch. Pharmacol.** 327: 1-5, 1984.

HARVEY, J.A.; GORMEZANO, I.; COOL-HAUSER, V.A. Effects of scopolamine and methyl scopolamine on classical conditioning of the rabbit nictitating membrane response. **J. Pharmacol. Exp. Therap.** 225: 42-49, 1983.

HELMSTETTER, F.J.; TERSHNER, S.A. Lesions of the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla disrupt antinociceptive but not cardiovascular aversive conditional responses. **Journal of Neuroscience** 14: 7099-7108, 1994.

HERZOG, C.; OTTO, T. Odor-guided fear conditioning in rats: 2. Lesions of the anterior perirhinal cortex disrupt fear conditioned to the explicit conditioned stimulus but not to the training context. **Behavioral Neuroscience** 111 (6): 1265-1272, 1997.

HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Ansiedade e Transtornos de Ansiedade**. Editora Científica Nacional, Rio de Janeiro, 1997.

HIRSHMAN, E.; PASSANANTE, A.; ARNDT, J. The effect of midazolam on the modality-match effect in implicit memory. **Brain Res. Cogn. Brain Res.** 7: 473-9, 1999.

HUGHES, R.N.; BLAMPIED, N.M.; STEWART, W.J. Scopolamine induced changes in activity and reactions to novelty. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 3: 731-734, 1975.

ICHIKAWA, J.; DAI, J.; MELTZER, H.Y. Acetylcholinesterase inhibitors are neither necessary nor desirable for microdialysis studies of brain acetylcholine. **Curr. Sep.** 19: 37-44, 2000.

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

JENSEN, R.A.; MARTINEZ, J.L.; VASQUEZ, B.J.; MCGAUGH, J.L. Benzodiazepine alter acquisition and retention of an inhibitory avoidance response in mice. **Psychopharmacology** 64: 125-126, 1979.

Jl, J.; WANG, X.; LI, B. deficit in long-term contextual fear memory induced by blocked of β -adrenoceptors in hippocampal CA1 region. **European Journal of Neuroscience** 17: 1947-1952, 2003.

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.

KALTWASSER, M.T. Acoustic startle induced ultrasonic vocalization in the rat: a novel animal model of anxiety. **Behavioural Brain Research** 43: 133-137, 1991.

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

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

KITAICHI, K.; HORI, T.; SRIVASTAVA, L.K.; QUIRION, R. Antisense oligodeoxynucleotides against the muscarinic m2, but not m4, receptor supports its role as autoreceptors in the rat hippocampus. **Mol. Brain Res.** 67: 98-106, 1999.

LA LUMIERE, R.T.; BUEN, T.; MCGAUGH, J.L. Post-training intra-basolateral amygdala infusions of norepinephrine enhance consolidation of memory for contextual fear conditioning. **The Journal of Neuroscience** 23 (17): 6754-6758, 2003.

LAMBERTY, Y.; GOWER, A.J. Cholinergic modulation of spatial learning in mice in a Morris-type water maze. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.** 309: 5-19, 1991.

LEAL-CAMPANARIO, R.; DELGADO-GARCIA, J.M.; GRUART, A. Microstimulation of the somatosensory cortex can substitute for vibrissa stimulation during Pavlovian conditioning. **P.N.A.S.** 103 (26): 10052-10057, 2006.

LEDOUX, J.E. Emotion circuits in the brain. **Annu. Rev. Neurosci.** 23: 155-184, 2000.

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

LEDOUX, J.E.; SAKAGUCHI, A.; REIS, D.J. Subcortical efferent projections of the geniculate nucleus mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. **Journal of Neuroscience** 4: 683-698, 1984.

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

LI, R.; NISHIJO, H.; WANG, Q.; UWANO, T.; TAMURA, R.; OTHANI, O.; ONO, T. Light and electron microscopic study of cholinergic and noradrenergic elements in the basolateral nucleus of the rat amygdala: evidence for interactions between the two systems. **J. Comp. Neurol.** 439: 411-425, 2001.

LUSKIN, M.B.; PRICE, J.L. The laminar distribution of intracortical fibers originating in the olfactory cortex of the rat. **J. Comp. Neurol.** 21: 292-302, 1983.

MACDONALD, R.L.; OLSEN, R.W. GABA_A receptor channels. **Annu. Rev. Neurosci.** 17: 569-602, 1994.

MAEDA, T. The *Locus Coeruleus*: History. **J. Chem. Neuroanat.** 18 (1-2): 57-64, 2000.

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

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

MCGAUGH, J.L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Ann. Rev. Neurosci.** 27: 1-28, 2004.

MCGAUGH, J.L.; INTROINI-COLLISON, I.B.; CAHILL, L.F.; CASTELLANO, C.; DALMAZ, C.; PARENT, M.B.; WILLIAMS, C.L. Neuromodulatory systems and memory storage; role of the amygdala. **Behavioural Brain Research** 58: 81-90, 1993.

MCKINNEY, M. Muscarinic receptor subtype-specific coupling to second messengers in neuronal systems. **Prog. Brain Res.** 98: 333-340, 1993.

MCNAUGHTON, N.; MORRIS, R.G. Chlordiazepoxide, an anxiolytic benzodiazepine, impairs place navigation in rats. **Behavioural Brain Research** 24: 39-46, 1987.

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

MISERENDINO, M.J.D.; SANANES, C.B.; MELIA, K.R.; DAVIS, M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. **Nature** 345: 716-718, 1990.

MODY, I. Distinguishing between GABA A receptors responsible for tonic and phasic conductances. **Neurochem. Res.** 26: 907-913, 2001.

NAGAMOTO, T.; OHNUKI, T.; ISHIGURO, M.; AHMED, M.; NAKAMURA, T. β -adrenoceptors: Three dimensional structures and binding sites for ligands. **Jpn. J. Pharmacol.** 87: 7-13, 2001.

NEMEROFF, C.B. The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. **Psychopharmacology Bulletin** 37 (4): 133-146, 2003.

NEWTON, J.R.; ELLSWORTH, C.; MIYAKAWA, T.; TONEGAWA, S.; SUR, M. Acceleration of visually cued conditioned fear through the auditory pathway. **Nature Neuroscience** 7 (9): 967-973, 2004.

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

OTTO, T.; COUSENS, G.; HERZOG, C. Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. **Behavioural Brain Research** 110: 119-128, 2000.

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

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.

PASCHALL, G.Y.; DAVIS, M. Olfactory-mediated fear-potentiated startle. **Behavioral Neuroscience** 116 (1): 4-12, 2002.

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

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods** 14: 149-167, 1985.

PEZZE, M.A.; FELDON, J. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. **Progress in Neurobiology** 74: 301-320, 2004.

PHILLIPS, R.G.; LEDOUX, J.E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience** 106 (2): 274-285, 1992.

PICCIOTTO, M.R. Knock-out mouse models used to study neurobiological systems. **Crit. Rev. Neurobiol.** 13: 103-149, 1999.

PIERSON, M.E.; LYON, R.A.; TITELER, M.; SHULMAN, S.B.; KOWALSKY, P.; GLENON, R.A. Design and synthesis of propranolol analogues as serotonergic agents. **J. Med. Chem.** 33(4): 1270, 1990.

PLOTNICK, R.; MOLLENAUER, S.; SNYDER, E. Fear reduction in the rat following central cholinergic blockade. **J. Comp. Psychol.** 86: 1074-1082, 1974.

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

POWER, A.E.; MCGAUGH, J.L. Cholinergic activation of the basolateral amygdala regulates unlearned freezing behavior in rats. **Behav. Brain Res.** 134: 307-315, 2002.

PRICE, J.L. An autoradiographic study of complementary laminar patterns of termination of afferent fibers to the olfactory cortex. **J. Comp. Neurol.** 150: 87-108, 1973.

PUDOVKINA, O.L.; CREMERS, T.I.F.H.; WESTERINK, B.H.C. The interaction between the locus coeruleus and dorsal raphe nucleus studied with dual-probe microdialysis. **Eur. J. Pharmacol.** 445: 37-42, 2002.

QUIRARTE, G.L.; GALVEZ, R.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J.L. Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioidpeptidergic drugs. **Brain Research** 808: 134-140, 1998.

RADLEY, J.J.; JOHNSON, L.R.; JANSSEN, W.G.M.; MARTINO, J.; LAMPRECHT, R.; HOF, P.R.; LEDOUX, J.E.; MORRISON, J.H. Associative Pavlovian conditioning leads to an increase in spinophilin-immunoreactive dendritic spines in the lateral amygdala. **European Journal of Neuroscience** 24: 876-884, 2006.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia.** 5^a ed., Elsevier, 2004.

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

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.

RICHARDSON, R.; PAXINOS, G.; LEE, J. The ontogeny of conditioned odor potentiation of startle. **Behavioral Neuroscience** 114 (6): 1167-1173, 2000.

RICHARDSON, R.; TRONSON, N.; BAILEY, G.K.; PARNAS, A.S. Extinction of conditioned odor potentiation of startle. **Neurobiology of Learning and Memory** 78: 426-440, 2002.

RICHARDSON, R.; WANG, P.; CAMPBELL, B.A. Delayed development of conditioned heart rate responses to auditory stimuli in the rat. **Dev. Psychobiol.** 28: 221-238, 1995.

RICHARDSON, R.; VISHNEY, A.; LEE, J. Conditioned odor potentiation of startle in rats. **Behavioral Neuroscience** 113 (4): 787-794, 1999.

RICHMOND, M.A.; MURPHY, C.A.; POUZET, B.; SCHMID, P.; RAWLINS, J.N.; FELDON, J. A computer controlled analysis of freezing behavior. **J. Neurosci. Methods** 86: 91-99, 1998.

RODGERS, R.J.; BLANCHARD, D.C.; WONG, L.K.; BLANCHARD, R.J. Effects of scopolamine on antipredator defense reactions in wild and laboratory rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 36: 575-583, 1990.

RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 30: 289-304, 1997.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. Effects of scopolamine and its quaternary analogue in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Behav. Pharmacol.** 6: 283-289, 1995.

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

ROSENKRANZ, J.A.; GRACE, A.A. Dopamine-mediated modulation of odour-evoked amygdala potentials during pavlovian conditioning. **Nature** 417: 282-287, 2002.

RUDY, J.W. Scopolamine administered before and after training impairs both contextual and auditory-cue fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory** 65: 73-81, 1996.

SAKAI, N.; IMADA, S. Bilateral lesions of the insular cortex or of the prefrontal cortex block the association between taste and odor in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory** 80: 24-31, 2003.

SALONEN, M.; ONAIVI, E.S.; MAZE, M. Dexmedetomidine synergism with midazolam in the elevated plus-maze test in rats. **Psychopharmacology** 108: 229-34, 1992.

SANANES, C.B.; CAMPBELL, B.A. Role of the central nucleus of the amygdala in olfactory heart rate conditioning. **Behavioral Neuroscience** 103 (3): 519-525, 1989.

SANGER, D.J. GABA and the behavioural effects of anxiolytic drugs. **Life Sci.** 36: 1503-1513, 1985.

SANGER, D.J.; JOLY, D.; ZIVKOVIC, B. Effects of zolpidem, a new imidazopyridine hypnotic, on the acquisition of conditioned fear in mice. Comparison with triazolam and CL 218,872. **Psychopharmacology** 90 (2): 207-10, 1986.

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

SCAIFE, J.C.; LANGLEY, R.W.; BRADSHAW, C.M.; SZABADI, E. Diazepam suppresses the acquisition but not the expression of 'fear-potentiation' of the acoustic startle response in man. **J. Psychopharmacol.** 19 (4): 347-56, 2005.

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

SCHETTINO, L.F.; OTTO, T. Patterns of Fos expression in the amygdala and ventral perirhinal cortex induced by training in an olfactory fear conditioning paradigm. **Behavioral Neuroscience** 115 (6): 1257-1272, 2001.

SETH, P.; CHEETA, S.; TUCCI, S.; FILE, S.E. Nicotinic-serotonergic interactions in the brain and behaviour. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 71: 795-805, 2002.

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

SHEPARD, R.A. Behavioral effects of GABA agonists in relation to anxiety and benzodiazepine action. **Life Sci.** 40: 2429-2436, 1987.

SHEPARD, R.A. Neurotransmitters, anxiety and benzodiazepines: a behavioural review. **Neurosci. Behav. Rev.** 10: 449-461, 1986.

SHEPHERD, J.K.; GREWAL, S.S.; FLETCHER, A.; BILL, D.J.; DOURISH, C.T. Behavioural and pharmacological characterization of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. **Psychopharmacology** 116: 56-64, 1994.

SHI, C.; DAVIS, M. Visual pathways involved in fear conditioning measured with fear-potentiated startle: behavioral and anatomic studies. **The Journal of Neuroscience** 21 (24): 9844-9855, 2001.

SIEGEL, A.; POTT, C.B. Neural substrate of aggression and flight in the cat. **Prog. Neurobiol.** 31: 261-283, 1988.

SLOTNICK, B. Animal cognition and the rat olfactory system. **Trends in Cognitive Sciences** 5 (5): 216-222, 2001.

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

SWANSON, L.W.; PETROVICH, G.D. What is the amygdala? **Trends in Neuroscience** 21: 323-331, 1998.

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. J. Pharmacol.** 405: 397-406, 2000.

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

THOMAS-ANTERION, C.; KOENING, O.; NAVEZ, M.; LAURENT, B. Midazolam effects on implicit and explicit memory process in healthy subjects. **Psychopharmacology** 145: 139-43, 1999.

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 β -blocking agents. **Psychopharmacology** 138: 305-310, 1998.

WALKER, D.L.; PASCHALL, G.Y.; DAVIS, M. Glutamate receptor antagonist infusions into the basolateral and medial amygdala reveal differential contributions to olfactory vs. context fear conditioning and expression. **Learning and Memory** 12: 120-129, 2005.

WALL, P.M.; FLINN, J.; MESSIER, C. Infralimbic muscarinic M1 receptors modulate anxiety-like behaviour and spontaneous working memory in mice. **Psychopharmacology** 155: 58-68, 2001.

WALL, R.J.; MESSIER, C. Infralimbic kappa opioid and muscarinic M1 receptor interactions in the concurrent modulation of anxiety and memory. **Psychopharmacology** 160: 233-244, 2002.

WALTERS, R.J.; HADLEY, S.H.; MORRIS, K.D.W.; AMIN, J. Benzodiazepines act on GABA_A receptors via two distinct and separable mechanisms. **Nat. Neurosci.** 3: 1274-1281, 2000.

WESS, J. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. **Crit. Rev. Neurobiol.** 10: 69-99, 1996.

WHISHAW, I.Q. Dissociating performance and learning deficits on special navigation tasks in rats subjected to cholinergic muscarinic blockade. **Brain Res. Bull.** 23: 347-358, 1989.

XU, F.; SCHAEFER, M.; KIDA, I.; SCHAFER, J.; LIU, N.; ROTHMAN, D.L.; HYDER, F.; RESTREPO, D.; SHEPHERD, G.M. Simultaneous activation of mouse and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. **J. Comp. Neurol.** 489 (4): 491-500, 2005.

YOUNG, S.L.; BOHENEK, D.L.; FANSELOW, M.S. Scopolamine impairs acquisition and facilitates consolidation of fear conditioning: differential effects for tone vs context conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory** 63 174-180, 1995.

ZANOTTI, A.; VALZELLI, L.; TOFFANO, G. Reversal of scopolamine-induced amnesia by phosphatidylserine in rats. **Psychopharmacology** 90: 274-275, 1986.

ZHANG, W.; BASILE, A.S.; GOMEZA, J.; VOLPICELLI, J.; VOLPICELLI, L.A.; LEVEY, A.I.; WESS, J. Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. **J. Neurosci.** 22: 1709-1717, 2002.