

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

**EFEITO DO PENTILENOTETRAZOL E DO MIDAZOLAM NA AQUISIÇÃO
E NA EXPRESSÃO DA RESPOSTA DEFENSIVA DE RATOS SUBMETIDOS
AO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO DE MEDO**

JULIANA CAVALLI

Florianópolis, SC
2009

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

**EFEITO DO PENTILENOTETRAZOL E DO MIDAZOLAM NA AQUISIÇÃO
E NA EXPRESSÃO DA RESPOSTA DEFENSIVA DE RATOS SUBMETIDOS
AO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO DE MEDO**

JULIANA CAVALLI

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.
Co-orientador: Prof. Dr. Leandro José Bertoglio.

Florianópolis, SC
2009

“Ciência e cultura configuram uma doutrina de ordem transcendente.
Como doutrina, está destinada a nutrir o próprio espírito das gerações
presentes e futuras com uma nova força energética, essencialmente mental,
necessária e imprescindível para o desenvolvimento das aptidões humanas”

(Carlos Bernardo González Pecotche - RAUMSOL)

AGRADECIMENTOS

Agradecer para mim, incorrigivelmente, ultrapassa a lógica da razão. Transcende-a. Mistura de sensações, sentimento. Analiso como sendo um exercício. Neste caso em especial, exercício de resgatar na memória, tentando identificar sem esquecer-se de ninguém aqueles que, cada qual ao seu modo e/ou função, colaboraram na execução e conclusão deste trabalho. Trata-se, a meu ver, de um sentimento nobre, dirigido àqueles que se seleciona para dividir, tentar inutilmente retribuir, eternizar comigo este momento de êxito, mesmo que talvez não estejam citados aqui. Sinto-o por aqueles que estiveram presentes, fizeram-se. Presentes por escolha ou não. Presente próximo ou presente longe. Está voltado aos que verdadeiramente habitam o meu “lado de dentro” ou aos que compuseram os “juntos nós vamos mais longe” durante esta caminhada. Com esses dizeres, inicio a tarefa difícil de tentar elencar descrevendo, em poucas linhas, alguns dos alvos deste meu sincero sentimento de gratidão.

Professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez por sua sábia orientação, também e não apenas, em minha formação profissional. Pela oportunidade de iniciar a realização da pesquisa em seu laboratório sob sua visão crítica e madura. Pela amizade. Paciência.

Professor Dr. Leandro José Bertoglio por fazer-me perceber a importância da co-orientação num projeto de longo prazo. Visões diferentes, complementando-se, construindo. Por sua receptividade e amizade.

Professores componentes da banca examinadora: professor Dr. Hélio Zangrossi Júnior, professor Dr. André Ávila Ramos e professora Dra. Cilene Lino de Oliveira e demais professores do Departamento de Farmacologia pelas contribuições dirigidas a este trabalho. Também aos funcionários e colegas da pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Colegas do Laboratório de Neurobiologia Comportamental Eloisa, Fibrício, Grasi, Ju Kroon, Taiane, Tati e Xima pelo construtivo intercâmbio de informações científicas, porém, sobretudo pela agradável e cotidiana amizade estabelecida durante estes anos.

Meus pais, Sergio Antônio Cavalli e Tereza Pizzolatto Cavalli, por serem os meus eternos exemplos de boa conduta. Por comporem juntos a minha base forte, ensinando-me ao seu modo os valores constituintes de uma pessoa de bem. Presentes longe. Minha pequena, minha mana linda, Daiana Cavalli, pela imensa paciência e amor a mim dedicados, principalmente nos momentos finais deste projeto. Presente próximo. Convivência.

Meus amigos escolhidos e preservados, por sempre proporcionarem-me a recíproca de verdadeiros sorrisos, por acreditarem no meu potencial e pelas doces palavras de incentivo. Presença também nos momentos de desopilação.

Enfim, todos aqueles que colaboraram, que contribuíram a sua maneira: Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACOES.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
A. INTRODUÇÃO.....	1
A.1. Comportamento defensivo.....	2
A.2. Condicionamento Pavloviano de medo de primeira e segunda ordem.....	4
A.2.1. A natureza do EI no condicionamento Pavloviano de medo.....	7
A.2.2. Efeito do pentilenotetrazol no condicionamento Pavloviano de medo.....	9
A.3. Sistema GABAérgico x medo condicionado.....	10
A.4. Condicionamento olfatório de medo.....	13
B. HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	16
C. PROCEDIMENTOS GERAIS.....	18
C.1. Animais.....	19
C.2. Drogas e substâncias.....	19
C.3. Procedimentos e protocolos experimentais.....	20
C.4. Análise estatística.....	20
D. ETAPA I - PADRONIZAÇÃO DO ESTÍMULO INCONDICIONADO AVERSIVO NECESSÁRIO PARA AQUISIÇÃO DO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO DE MEDO.....	21
D.1. Objetivo experimental.....	22
D.2. Equipamentos e procedimentos.....	22
D.2.1 Caixa de condicionamento.....	22
D.2.2. Aquisição do condicionamento olfatório de medo de primeira ordem..	23
D.2.3. Protocolo experimental.....	23
D.3. Resultados.....	26
D.4. Discussão.....	28
E. ETAPA II - AVALIAÇÃO DO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO DE MEDO UTILIZANDO PENTILENOTETRAZOL E CHOQUE NAS PATAS COMO ESTÍMULOS INCONDICIONADOS.....	32
E.1 Objetivo experimental.....	33
E.2. Equipamentos e procedimentos.....	33
E.2.1. Caixa de odor - Avaliação do condicionamento olfatório de medo de primeira e segunda ordem.....	33
E.2.2. Parâmetros relacionados ao comportamento defensivo.....	35
E.2.3. Protocolo experimental.....	36
E.3. Resultados.....	38
E.4. Discussão.....	43

F. ETAPA III - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO MIDAZOLAM NA EXPRESSÃO DO MEDO CONDICIONADO AO ODORE E NA AQUISIÇÃO DO MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO.....	49
F.1. Objetivo experimental.....	50
F.2. Equipamentos e procedimentos.....	50
F.2.1. Protocolo experimental.....	50
F.3. Resultados.....	52
F.4. Discussão.....	58
G. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
G.1. Sumário dos principais resultados.....	64
G.2. Conclusão.....	66
G.3. Aplicações e perspectivas.....	67
REFEFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
APÊNDICE I – Validação da dose ansiogênica de 15 mg/kg de pentilenotetrazol.....	84
APÊNDICE II - Validação do odor de café como estímulo olfatório neutro.....	90

LISTA DE ABREVIACOES

ANOVA – Análise de Variância
AV – Avaliao de risco
BO – Bulbo olfatório
COM – Condicionamento olfatório de medo
e.p.m. – erro padrão da média
EBA – Entrada braços abertos
EBF – Entrada braços fechados
EC – Estímulo condicionado
EI – Estímulo incondicionado
GABA – cido gama-aminobutírico
LCE – Labirinto em cruz elevado
MDZ – Midazolam
NMDA – N-metil-D-aspartato
PAG – Substância cinzenta periaquedutal
PTZ – Pentilenotetrazol
RC – Respostas condicionadas
REC – Respostas emocionais condicionadas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da caixa de condicionamento.....	23
Figura 2. Esquema do protocolo experimental utilizado na padronização do estímulo aversivo incondicionado necessário para aquisição do condicionamento olfatório de medo através do tempo de congelamento (%)......	25
Figura 3. Padronização do estímulo aversivo incondicionado necessário para aquisição do condicionamento olfatório de medo através do tempo de congelamento (%) emitido pelos animais na caixa de condicionamento na presença de odor de café (dia 3).....	27
Figura 4. Esquema representativo da caixa de odor.....	34
Figura 5. Esquema do procedimento experimental utilizado para a avaliação do medo condicionado de primeira e segunda ordem. Administrou-se PTZ como estímulo incondicionado em associação com nenhum ou 3 choques elétricos nas patas e odor de café como estímulo olfatório.....	37
Figura 6. Avaliação do medo condicionado nas sessões de familiarização, teste EC1 e teste EC2 através dos parâmetros de tempo de aproximação (%) e tempo escondido (%) dos animais previamente tratados intraperitonealmente com salina ou PTZ, 30 minutos antes da sessão de condicionamento. Tais grupos, combinadamente, receberam nesta sessão nenhum ou 3 choques elétricos nas patas na presença do odor de café (EC1).....	40
Figura 7. Avaliação do medo condicionado nas sessões de familiarização, teste EC1 e teste EC2 através dos parâmetros de tempo de avaliação de risco absoluto (s) e tempo de avaliação de risco relativo (%) dos animais previamente tratados intraperitonealmente com salina ou PTZ, 30 minutos antes da sessão de condicionamento.....	41
Figura 8. Esquema do procedimento utilizado para a avaliação do efeito do MDZ sobre a expressão do condicionamento olfatório.....	51

Figura 9. Avaliação do efeito da administração sistêmica de MDZ (trat. 2) na expressão do medo condicionado nas sessões de familiarização, teste EC1 e teste EC2 através dos parâmetros de tempo de aproximação (%) e tempo escondido (%).....	55
Figura 10. Avaliação do efeito da administração sistêmica de MDZ (trat. 2) na expressão do medo condicionado nas sessões de familiarização, teste EC1 e teste EC2 através dos parâmetros tempo absoluto de avaliação de risco (s) e tempo relativo de avaliação de risco (%).....	56
Figura 11. Fotografia do aparato Labirinto em Cruz Elevado.....	84
Figura 12. Caracterização da atividade do PTZ, através dos parâmetros: % de entrada nos braços abertos (%EBA), % de tempo nos braços abertos (%TBA), avaliação de risco (AR) e entrada nos braços fechados (EBF) do LCE nas sessões de teste e reteste.....	87
Figura 13. Esquema do protocolo experimental dos 2 grupos controles realizados para a validação do odor de café como estímulo olfatório neutro: exposição ao odor de café pela primeira vez na sessão do dia 2 (grupo 1) e exposição ao odor de café pela primeira vez na sessão do dia 4 (grupo 2).....	91
Figura 14. Avaliação da resposta defensiva de ratos expostos ao odor de café nas sessões de familiarização, teste 1 e teste 2 através dos parâmetros de tempo de aproximação (%) e tempo escondido (%).....	94
Figura 15. Avaliação da resposta defensiva de ratos expostos ao odor de café nas sessões de familiarização, teste 1 e teste 2 através dos parâmetros de avaliação de risco em tempo absoluto (s) e avaliação de risco em tempo relativo.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação do medo condicionado, através da frequência de cruzamentos nas sessões de familiarização, teste EC1 e teste EC2 dos animais previamente tratados intraperitonealmente com salina ou PTZ, 30 minutos antes da sessão de condicionamento.....	42
Tabela 2. Avaliação do efeito da administração sistêmica de MDZ (trat. 2) na expressão do medo condicionado através da frequência de cruzamentos, nas sessões familiarização, teste EC1 e teste EC2.....	57
Tabela 3. Valores de referência dos parâmetros que avaliam a resposta defensiva de ratos condicionados ao estímulo neutro, odor de café, com o estímulo incondicionado, choques elétricos nas patas, utilizando 5 pareamento.....	93
Tabela 4. Frequência de cruzamentos de ratos expostos ao odor de café nas sessões de familiarização, teste 1 e teste 2.....	96

RESUMO

O condicionamento Pavloviano de medo ou condicionamento de medo de primeira ordem 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 uma ou mais associações ao EI, o estímulo inicialmente neutro adquire caráter aversivo, tornando-se o primeiro estímulo condicionado (EC1) capaz de evocar respostas de medo que anteriormente ao condicionamento ocorriam apenas na presença do EI. Neste contexto, a magnitude do EI é um dos parâmetros mais importantes no estudo do condicionamento de medo por ser determinante na taxa de aprendizado e afetar indiretamente o estabelecimento do condicionamento de medo de segunda ordem. O EI pode ser aplicado a partir de fontes exteroceptivas (ex. estímulo elétrico, odor de predador etc.) ou interoceptivas (ex. efeito de drogas ansiogênicas). Neste estudo confirmou-se, em ratos Wistar machos, o efeito ansiogênico do pentilenotetrazol (PTZ), um antagonista GABA_A, na dose de 15 mg/kg, permitindo a utilização do PTZ como EI interoceptivo. Dados prévios obtidos neste laboratório, demonstraram que o condicionamento olfatório de medo (COM) ocorre após a associação de 5 choques elétricos nas patas (EI exteroceptivo) com um odor neutro (odor de café – EC1). No presente estudo, observamos que o efeito ansiogênico do PTZ (EI interoceptivo) associado a apenas 3 choques nas patas foi capaz de produzir um aumento no tempo de congelamento contextual na presença do EC1 semelhante ao observado nos animais pareados com 5 choques não injetados com PTZ. Esses dados permitiram sugerir que a associação de estímulos (PTZ + 3 choques) seria suficiente para a promoção do COM. No teste desta hipótese observou-se que esta associação resultou na resposta defensiva mais expressiva, aumentando a eficiência do estabelecimento do COM. No entanto, o comportamento defensivo exibido pelos animais pareados ao odor apenas com o efeito ansiogênico advindo da administração de PTZ (PTZ sem choque) também evidenciou o estabelecimento do COM. Além disso, observou-se através dos resultados obtidos que o caráter aversivo adquirido do EC1, após o condicionamento, foi capaz de promover um condicionamento contextual de medo de segunda ordem, que ocorreu através da re-exposição ao odor de café na sessão de teste EC1. A ocorrência deste segundo condicionamento foi visualizada através das respostas defensivas exibidas na re-exposição ao contexto (EC2) na sessão de teste EC2. Com o objetivo de avaliar o efeito de um agonista GABA_A na expressão do COM e na aquisição do condicionamento contextual de segunda ordem, 0,5 mg/kg de midazolam (MDZ) foi administrado previamente à sessão de teste EC1. Os resultados demonstraram uma reversão na expressão das respostas de medo condicionadas frente ao EC1 em ambos os grupos previamente pareados ao odor (PTZ + 3 choques e PTZ sem choque). Com relação à aquisição do segundo condicionamento de medo observou-se a reversão das respostas defensivas somente no grupo previamente pareados ao odor com a associação de EIs (PTZ + 3 choques). Esses resultados sugerem que além do efeito ansiolítico, o midazolam exerce um efeito mnemônico na aquisição do condicionamento de segunda ordem de acordo com a força com que o primeiro condicionamento de medo se estabeleceu.

ABSTRACT

Pavlovian fear conditioning or first-order fear conditioning has been widely used to study the neuroanatomical, cellular and molecular basis of fear. This paradigm occurs when an emotionally neutral stimulus is presented in conjunction with an aversive unconditioned stimulus (US). After one or several pairings the stimulus, previously neutral, acquires the aversive character becoming the first conditioned stimulus (CS1), capable to produce fear responses that typically occur only in the US presence. The aversive character of CS1 is able to act as US in the second-order fear conditioning due the CS1 acquired an aversive motivational value as relevant as the intrinsic (US). In this context, the magnitude of the US is one of the most important parameters in the study of fear conditioning because this magnitude determinates the learning rates and, indirectly, the second-order conditioning establishment. The US could be applied using exteroceptive (*e.g.* electric stimulus, predator odor etc.) or interoceptive sources (*e.g.* anxiogenic drugs effects). Here, we confirm the anxiogenic effect of the pentylentetrazole (PTZ), GABA_A antagonist, on 15 mg/kg allows using it as an interoceptive US in this study. Previous dados acquired in this laboratory, demonstrated that the olfactory fear conditioning (OFC) occurs after the association of 5 mild footshocks (exteroceptive US) with a neutral odor (coffee odor – CS1). In the present study, we observed that anxiogenic effect (interoceptive US) resulted from PTZ administration associated to only 3 mild footshocks was able to produce an increase in the contextual freezing time (in the presence of the CS1), similar to that observed in the animals paired with 5 footshocks not injected with PTZ. These data suggested that this association of stimulus (PTZ + 3 footshocks) were sufficient to promote the OFC. In the test of the hypothesis, we observed that this association increased the efficiency of the OFC, generating the greater defensive response. However, the defensive behavior exhibited by the subjects previously paired to the odor just with the anxiogenic effect of the PTZ (PTZ without footshocks) was also able to establish the OFC. Moreover, the results demonstrated that the aversive character acquired by the CS1 was sufficient to promote the second-order contextual fear conditioning, occurred in the re-exposure to the coffee odor (CS1) in the CS1 test session. The occurrence of the second conditioning was visualized by the defensive responses emitted in the re-exposure to the context (CS2) in the CS2 test session. In the aim of evaluate the GABA_A agonist effect in the expression of the OFC and in the acquisition of the second-order fear conditioning, 0,5 mg/kg of MDZ was administrated previously the CS1 test session. The results demonstrate that MDZ counteract the expression of the conditioned fear responses in the re-exposure to CS1 in both paired groups (PTZ without footshocks and PTZ + 3 footshocks). In relation to the acquisition of the second-order fear conditioning, we observed the reversion in the fear responses only in the group previously paired to the odor with association of stimuli (PTZ + 3 footshocks). Together the results suggest that, beyond the anxiolytic-like effect, the MDZ generates a mnemonic effect in the acquisition of the second-order fear conditioning according to the strength of the first conditioning establishment.

A. INTRODUÇÃO

A.1. Comportamento defensivo

O entendimento de como a seleção natural utiliza os mais variados sistemas do organismo para regular respostas defensivas inter e intra-específicas possui grande importância na evolução (NESSE, 2005). Ainda em 1872, Charles Darwin já destacava que o estudo do comportamento de outras espécies permitia o entendimento das emoções humanas. De maneira geral, os organismos desenvolvem mecanismos para avaliar e modular experiências desagradáveis como náuseas, dor e medo. Muitas dessas respostas adaptativas permanecem latentes até que sejam despertadas por uma pista que indique a presença de uma ameaça. Assim, desde a expressão gênica e vias bioquímicas às variáveis psicológicas, do comportamento e relações sociais há sistemas dinâmicos responsáveis por manter a estabilidade através de mecanismos de controle específicos (NESSE, 2005).

As respostas emocionais a situações aversivas, constrangedoras ou ameaçadoras são bastante comuns em seres humanos e possuem grande importância para os indivíduos. Porém, em certos momentos elas podem se tornar exageradas ou começar a ocorrer em situações inapropriadas, caracterizando os distúrbios de ansiedade (LEDOUX, 1998). Em contrapartida, quando a ansiedade encontra-se dentro do limiar da normalidade, ela serve como um estímulo vital que motiva a realização de novas vivências, funções e desafios (HETEM & GRAEFF, 1997).

Tanto a ansiedade como o medo são emoções comuns já experimentadas por todos nós em algum momento da vida. Conceitualmente, o medo é uma emoção causada pela *presença* de um perigo real ou imaginário, problema ou infortúnio enquanto que a ansiedade é uma emoção causada pela *antecipação* destas mesmas naturezas de perigo descritas (LEDOUX, 2009).

Durante as últimas décadas houve um interesse crescente pelo desenvolvimento e utilização de modelos animais em psiquiatria. A demanda por novos modelos tem sido motivada por diversos entraves éticos, metodológicos e econômicos decorrente do estudo em humanos de determinados processos psicofisiológicos e psicopatológicos. Hoje, é inegável que a experimentação animal, mesmo que sujeita a calorosas discussões sobre seus limites e atribuições, tem contribuído sobremaneira para os recentes avanços obtidos em psicofarmacologia e no entendimento do funcionamento cerebral em diversos transtornos mentais/ emocionais (ZANGROSSI Jr In: HETEM & GRAEFF, 1997). Além disso, diversas similaridades relacionam os sintomas de ansiedade observados em seres humanos à expressão de comportamentos defensivos em animais (BORSINI; PODHORNA; MARAZZITI, 2002) e, por esses motivos, diversos grupos de pesquisadores em todo o mundo utilizam animais de laboratório como material de trabalho para tentar elucidar os mecanismos envolvidos na neurobiologia do medo e da ansiedade (GRAEFF & GUIMARÃES, 1999).

Do ponto de vista evolutivo, o medo e a ansiedade têm 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). Blanchard & Blanchard (1971; 1972; 1989) descrevem, em detalhes, padrões defensivos de ratos selvagens e de laboratório em resposta à exposição ao predador ou a estímulos relacionados a este, como o odor de gato. Assim, quando esses animais são expostos a situações aversivas ou encontram-se sob ameaça, as estratégias comportamentais observadas vão desde fuga e imobilidade até ataque defensivo e submissão (BLANCHARD et. al., 1993). Tais ameaças permitem, então, uma análise detalhada dos comportamentos de defesa inata e das situações em que elas ocorrem. Todavia, assim como no medo inato, as mesmas respostas defensivas podem ser observadas frente a estímulos ameaçadores aprendidos. Este fenômeno acontece quando um estímulo previamente neutro adquire propriedades aversivas após ser devidamente

associado a um evento aversivo (KIM & JUNG, 2006). Neste sentido, as experiências de medo são facilmente aprendidas e possuem a característica inerente de perdurarem por um longo período. Por esse motivo é que o condicionamento de medo tem se tornado um modelo importante e muito utilizado na elucidação dos mecanismos cognitivos e neuronais envolvidos frente a situações ou estímulos aversivos (FENDT & FANSELOW, 1999).

A.2. Condicionamento Pavloviano de medo de primeira e de segunda ordem

O estudo dos reflexos condicionados e do condicionamento Pavloviano de primeira ordem (também denominado condicionamento clássico) teve início em 1927 com o filósofo russo Ivan Petrovich Pavlov. Dentre suas contribuições para o universo científico, o experimento (PAVLOV, 1927) observando o reflexo da salivação em cães condicionados ao som de uma campainha (estímulo condicionado 1; EC1) associado a apresentação de alimento (estímulo incondicionado; EI) foi responsável por impulsionar estudos subsequentes que se utilizam deste fundamento de associação como modelo experimental para o estudo das emoções, em especial, o medo.

Conceitualmente, o condicionamento de medo de primeira ordem ocorre quando um estímulo emocionalmente neutro é pareado com um EI aversivo. Após um ou mais pareamentos, o estímulo neutro adquire a capacidade de gerar respostas defensivas que tipicamente ocorrem na presença de perigo, tornando-se um estímulo condicionado de primeira ordem (EC1; GEWIRTZ & DAVIS, 2000).

De maneira semelhante, para que o condicionamento Pavloviano de medo de segunda ordem se estabeleça, também se faz necessária a existência de um momento associativo entre os estímulos. Neste condicionamento, o segundo estímulo emocionalmente neutro é pareado com o EC1 tornando-se então, um estímulo condicionado de segunda ordem (EC2). Portanto, para que essa associação (EC1-EC2) possa ocorrer satisfatoriamente, o EC1

deve possuir valor motivacional adquirido tão relevante quanto o do EI (GEWIRTZ & DAVIS, 2000).

No condicionamento Pavloviano de medo de segunda ordem, contrariamente ao de primeira, o aprendizado associativo EC1-EC2 apresenta a característica de transitoriedade. Por isso, poucas sessões de pareamento são necessárias e o aprendizado decresce com o número crescente de pareamentos. A explicação mais plausível para essa característica seria o desenvolvimento da inibição condicionada (HERENDEEN & ANDERSON, 1968; RESCORLA, 1973; HOLLAND & RESCORLA, 1975; YIN et. al., 1994), a qual é marcada pela não ocorrência de reforço punitivo aversivo (neste caso, o EI), inibindo a emissão das respostas condicionadas (GEWIRTZ & DAVIS, 2000).

Em ambas as ordens de condicionamento, a análise do medo é realizada através de respostas condicionadas quantificáveis. Podem ser citados como exemplos dessas respostas alterações de comportamentos defensivos (imobilidade, esquiva inibitória e avaliação de risco), alterações autonômicas (pressão arterial e frequência cardíaca), endócrinas (liberação de hormônios) e expressão de reflexos (sobressalto potencializado pelo medo) (LEDOUX, 2000). No caso do condicionamento Pavloviano de segunda ordem, para que estas respostas condicionadas sejam evocadas é necessário, obrigatoriamente, que ambos os condicionamentos tenham se estabelecido. Assim, faz-se necessário garantir a ocorrência da primeira associação (EI-EC1) para, ao menos, pressupor a ocorrência da segunda associação (EC1-EC2) (ver para revisão GEWIRTZ & DAVIS, 2000).

As respostas condicionadas apresentam características advindas de fatores genéticos, mas também são reflexo das experiências particulares de cada indivíduo, uma vez que tanto o genótipo como o ambiente são igualmente importantes por serem ambos indispensáveis (MCFARLAND, 1998). De maneira geral, memórias aversivas são de fácil estabelecimento através da rapidez do aprendizado e normalmente permanecem por um longo tempo,

possibilitando o estudo dos mecanismos do medo através do condicionamento Pavloviano. Dessa forma, o condicionamento de medo permite que ameaças aprendidas ativem respostas de defesa desenvolvidas evolutivamente (LEDOUX, 2003).

Assim como a resposta incondicionada de sobressalto pode ser potencializado pelo medo aprendido, tornando-se um modelo na investigação do medo condicionado, o comportamento de imobilidade ou congelamento, definida por Blanchard & Blanchard (1969), Bolles & Collier (1980) e Fanselow (1980) como sendo a imobilidade completa do animal permitindo-lhe apenas os movimentos requeridos para a respiração, também apresenta essa possibilidade (DAVIS, 1990). Além destas duas respostas incondicionadas, o estudo do comportamento defensivo pode ser realizado através da quantificação de respostas emocionais condicionadas (REC) como, por exemplo, o tempo em que o animal permanece próximo da fonte aversiva (KILPATRICK & CAHILL, 2003) e a supressão de comportamentos em progresso (AMORAPANTH, NADER & LEDOUX, 1999). Essas REC parecem ser mediadas por mecanismos neurais diferentes daqueles observados no comportamento de congelamento (AMORAPANTH, NADER & LEDOUX, 1999).

A formação duradoura da memória de medo condicionado compreende diferentes estágios e substratos neurais. Inicialmente ocorre a aquisição, seguida dinamicamente de consolidações curtas (que demoram de segundos a minutos para acontecer). Estes dois processos se sucedem em espaços temporais muito próximos e, por este motivo, é quase impossível dissociar tais etapas. Posteriormente, ocorre uma consolidação duradoura da memória associativa (aquela estabelecida no condicionamento de medo) e, é neste momento, que ocorre o envolvimento de síntese protéica. A recuperação da memória de medo condicionado é ativada pela representação associativa ao EC. Portanto, a expressão da memória de medo condicionado compreende a tradução e, por consequência, a recuperação desta associação numa resposta de medo apropriada (PEZZE & FELDON, 2004).

A.2.1. A natureza do EI no condicionamento Pavloviano de medo

O EI aversivo caracteriza-se por sua relevância emocional e/ou biológica com a propriedade de evocar respostas inatas de medo (BAKER & KIM, 2004; SCHAFE et. al., 2005). Um dos parâmetros mais importantes no estudo de condicionamento se encontra na magnitude do EI. A maioria das teorias sobre condicionamento assume que essa magnitude determina a taxa de aprendizado, tanto no condicionamento apetitivo quanto no condicionamento aversivo (MORRIS & BOUTON, 2006). Essa magnitude do EI deve ser suficiente, portanto, para estabelecer efetivamente a associação entre o estímulo neutro e o incondicionado sem que, para isso, ocasione o fenômeno da generalização, o qual é caracterizado pela habilidade de responder de maneira similar a estímulos que são qualitativamente distintos, mas funcionalmente equivalentes (RUDY & PUGH, 1996; BALDI et. al., 2004; GARAKANI et al., 2006). Assim, assume-se que o EI é dotado de importância relevante no estabelecimento do condicionamento (MORRIS & BOUTON, 2006), tanto de primeira quanto de segunda ordem (GEWIRTZ & DAVIS, 2000).

O choque elétrico nas patas é um dos EIs mais comumente empregado no estudo do condicionamento Pavloviano de medo (BAKER & KIM, 2004; SCHAFE et. al., 2005). Alternativamente, a administração de drogas tem sido proposta como EI, desde que seja capaz de gerar respostas fisiológicas mediadas pelo Sistema Nervoso Central (EIKELBOOM & STEWART, 1982). Neste cenário, tanto a natureza como a intensidade e a frequência do EI em questão, são determinantes na tomada da decisão de cada animal frente a cada situação experimental (BOUTON, 2004; BOSSERT & SHAHAM, 2004).

Alguns estímulos podem ainda, atuar como EC e EI dependendo da dose e da frequência das intervenções. Por exemplo, a administração de morfina, em baixas e repetidas doses, pode provocar sinais da síndrome de retirada (EI) (SCHWARZ-STEVENSON &

CUNNINGHAM, 1993; BARDO, 2004; MCDONALD & SIEGEL, 2004) em ratos previamente tratados com altas doses do opióide (EC) (BARDO, 2004). Evidências neurofarmacológicas e comportamentais indicam que diferenças quantitativas na concentração deste opióide produzem efeitos farmacológicos diferentes (BARDO, 2004). Pode-se elencar como tais efeitos a ligação a distintos tipos de receptores opióides (DYKSTRA & PRESTON, 1997), efeitos locomotores (BABBINI & DAVIS, 1972), alteração na taxa cardíaca e temperatura corporal (SCHWARZ-STEVENSON & CUNNINGHAM, 1993), além de prejuízos mnemônicos (BRAIDA, GORI & SALA, 1994). Assim como a morfina, a cocaína também tem demonstrado poder atuar dualmente como EC e/ou EI (CAREY & GUI, 1998), de modo que seu uso como EI é mais recente (ZEIGLER et. al., 1991; KALIVAS et. al., 1992; CAREY & GUI, 1998).

A estimulação elétrica de específicas regiões cerebrais (CASTILHO & BRANDÃO, 2001; CASTILHO, MACEDO & BRANDÃO, 2002) assim como a exposição a um som muito intenso (BAKER & KIM, 2004; SCHAFE et al., 2005) pode provocar sensação aversiva no animal atuando, também, como EI. Kincheski & Carobrez (dados não publicados) verificaram que a estimulação química com um agonista glutamatérgico (NMDA) na substância cinzenta periaquedutal (PAG) foi capaz de estabelecer efetivamente a associação EI-EC1.

O condicionamento de medo pode ainda ser facilitado pela administração de compostos que atuem auxiliando a formação da memória aversiva adquirida ao receber o EI, através da facilitação da aquisição do aprendizado, como é o caso do emprego do extrato de *Gingo Biloba* EGB 761 antes da sessão de condicionamento de medo medido através do potencial de sobressalto (YANG et. al., 2005).

Náuseas e vômitos são sintomas aversivos do sistema gastrointestinal e manifestam-se incondicionalmente após uma experiência nauseogênica (PARKER, 2006). Entretanto, há

uma correlação de evidências entre náuseas e vômitos em que ambos os sintomas podem também atuar como EI no condicionamento Pavloviano (STOCKHORST, ENCK & KLOSERHALFEN, 2007).

A.2.2. Efeito do pentilenotetrazol no condicionamento Pavloviano de medo

Em humanos, a ansiedade é mensurada por meio de efeitos não prazerosos relatados verbalmente pelos pacientes. Devido à natureza subjetiva das síndromes de ansiedade, modelos animais apresentam limitações para tal mensuração de maneira a impulsionar o desenvolvimento de novos modelos na tentativa de entender e elucidar a sua base neurobiológica (LAL & EMMETT-OGLESBY, 1983).

O pentilenotetrazol (PTZ), antagonista do receptor GABA_A, foi inicialmente descrito como droga convulsivante em humanos. Porém, posteriormente, se verificou efeitos como ansiedade intensa e ataques de pânico em doses subconvulsivantes e convulsivantes, respectivamente (RODIN, 1958; RODIN & CALHOUN, 1970; SCHENBERG et. al., 2001).

Em animais, o PTZ é amplamente utilizado em modelos de ansiedade, sendo considerado um protótipo de droga ansiogênica (LAL & EMMETT-OGLESBY, 1983; JUNG, LAL & GATCH, 2002). Esta droga é responsável por produzir estímulos discriminados confiáveis, os quais podem ser modulados por ligantes 5-HT_{1A}, 5-HT₃, NMDA, glicina e ligantes do canal de cálcio tipo L. Devido a diversos compostos possuírem seu sítio de ação no receptor GABA_A, tais como benzodiazepínicos, etanol e fenciclidina e, na sua retirada, alguns destes compostos causarem síndrome de abstinência, há autores que sugerem que tal efeito ansiogênico causado pelo PTZ possa ser a manifestação generalizada desta síndrome de abstinência (JUNG, LAL & GATCH, 2002).

De maneira geral, os animais são expostos a estímulos *exteroceptivos* ou *exógenos* e *interoceptivos* ou *endógenos*, os quais podem tornar-se EIs dependendo de sua relevância.

Neste aspecto, estímulos exteroceptivos dizem respeito a uma variedade de tratamentos nocivos, como a exposição a situações de conflito ou choques elétricos inescapáveis, enquanto que os interoceptivos consistem de tratamentos com drogas ansiogênicas e/ou estimulação de selecionadas áreas cerebrais, conforme mencionado no item anterior. Tais estímulos interoceptivos, produzidos por drogas ansiogênicas, são utilizados como análogos de ansiedade em animais (LAL & EMMETT-OGLESBY, 1983), como é o caso do uso do PTZ neste trabalho.

A.3. Sistema GABAérgico x medo condicionado

O GABA (ácido gama-aminobutírico) é o principal aminoácido inibitório do sistema nervoso central, atuando em três diferentes tipos de receptores: GABA_A, GABA_B e GABA_C (BOWERY et.al., 1980; HILL & BOWERY, 1981; DREW et. al., 1984; CHEBIB & JOHNSTON, 1999), classificados em duas classes: 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 cinco subunidades. Estas derivam de sete famílias (α , β , γ , δ , ϵ , θ e ρ) codificadas por 16-19 genes diferentes (RUDOLPH et. al., 2001; KORPI et.al., 2002) sendo que nos roedores a combinação prevalente é a $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (MCKERNAN & WHITING, 1996). Tais famílias encontram-se dispostas num arranjo pentamérico ao redor de um canal central seletivamente permeável a íons cloreto. Para que a inibição neural ocorra é necessário um influxo aumentado dos íons cloreto tornando a membrana hiperpolarizada (NEMEROFF, 2003). Esta ação é modulada por sítios alostéricos localizados diferentemente nas

subunidades, dentre eles se destaca o sítio de reconhecimento dos benzodiazepínicos, localizado na interface entre as subunidades α e $\gamma 2$ dos receptores GABA. Este sítio, nos receptores GABA_A, é distinto do sítio de ligação do GABA no complexo canal iônico/receptor.

As vias GABAérgicas encontram-se distribuídas por todo sistema nervoso central, de modo que todos os sistemas de neurotransmissão, inclusive os mediadores de ação ansiogênica, podem ser influenciados pela neurotransmissão GABA. Por exemplo, grupos de interneurônios GABAérgicos são encontrados no *locus coeruleos*, na tentativa de controlar a atividade noradrenérgica excessiva no medo condicionado (ISHIDA et. al., 2002). Estruturas cerebrais como a substância cinzenta periaquedutal (PAG), amígdala e hipocampo, envolvidas na modulação da ansiedade e do medo, possuem importantes redes de interneurônios e projeções neurais GABAérgicas (SANGER, 1985; SHEPARD, 1986, 1987; MODY, 2001; MILLAN, 2003).

Os benzodiazepínicos não ativam diretamente os receptores GABA_A, mas requerem o neurotransmissor (GABA) para expressar seus efeitos (CHARNEY et al., 2001). Doble (1999) demonstrou que a subunidade de ligação do neurotransmissor e dos benzodiazepínicos são diferentes. Enquanto o GABA liga-se a uma subunidade β , os benzodiazepínicos e drogas relacionadas ligam-se a uma das subunidades α . Contudo, benzodiazepínicos potencializam seletivamente os efeitos GABAérgicos sobre os receptores GABA_A e, em certas sinapses, elevam a amplitude das ações do GABA (STUDY & BARKER, 1981; MACDONALD & OLSEN, 1994; WALTERS et al., 2000, MILLAN, 2003).

De maneira semelhante ao que ocorre na clínica médica, os benzodiazepínicos apresentam propriedades ansiolíticas em outras espécies animais (MILLAN, 2003). No modelo de ansiedade do labirinto em cruz elevado (LCE), 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 experimentais que avaliam o medo inato, a administração de midazolam (MDZ) em doses baixas, diminuiu a atividade defensiva de ratos (DIELENBERG et al., 1999; DO-MONTE, 2006). Santos e colaboradores (2005) relataram uma redução do comportamento de imobilidade e de sobressalto potencializado pelo medo após a administração de MDZ em ratos submetidos ao condicionamento de medo contextual. Tais prejuízos nas respostas condicionadas de medo são observados quando a administração de benzodiazepínicos é sistêmica ou diretamente em específicas estruturas cerebrais que compõem a circuitaria do condicionamento de medo. Há evidências de que os benzodiazepínicos interferem tanto na aquisição (KROON, 2007; KROON & CAROBREZ, 2009) quanto na expressão do medo condicionado através da potencialização inibitória GABAérgica na amígdala basolateral (BLA) (DICKINSON-ANSON et. al., 1993). Com relação à expressão das respostas condicionadas, a diminuição observada 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 Pavloviano de medo situa-se na interface entre a memória e a emoção (MAREN, 2001).

Evidências consideráveis têm demonstrado o envolvimento dos receptores GABA_A nos processos de memória, de modo que o aumento da atividade GABAérgica, provocada por benzodiazepínicos, prejudica esses processos. De maneira oposta, compostos que reduzem a atividade GABAérgica, como PTZ ou picrotoxina, aumentam os processos mnemônicos. Portanto, há evidências que o receptor GABA_A esteja envolvido em estados patológicos (epilepsia) e normais (ansiedade e aprendizado), o que corrobora a idéia de que no processo normal de memória há o envolvimento de níveis moderados de ansiedade (CHAPOUTHIER & VENAULT, 2002).

Contudo, há ainda estudos que fazem uso do paradigma antagonista/ agonista GABAérgicos. Rijnders, Järbe e Slangen (1991) revelaram a atividade antagônica e bidirecional de MDZ e PTZ quando comparados com a atividade de bretazenil (agonista parcial GABA_A), concluindo que mecanismo de ação destes benzodiazepínicos são semelhantes, porém não idênticos. Embora o PTZ modifique a neurotransmissão GABAérgica, o efeito não ocorre no mesmo sítio ativo dos benzodiazepínicos (HAEFELY, 1988) de modo que o estado ansiogênico promovido pelo PTZ pode ser revertido pela administração de MDZ (VIVIAN, WEERTS & MICZEK, 1994).

A.4. Condicionamento olfatório de medo (COM)

A relevância do sistema olfatório para roedores pode ser observada pelo número de genes para receptores olfatórios funcionais. Enquanto nos homens este número encontra-se em torno de 300, em camundongos o número é da ordem de 1200, o que chega a representar aproximadamente 2% do seu genoma (ZHANG & FIRESTEIN, 2002). Tamaña importância pode ser notada através do grande número de atividades realizadas que fazem uso desse sistema. Roedores se utilizam do olfato para a identificação individual entre as espécies, interagir socialmente, reproduzirem-se e detecção da presença de predadores entre outras atividades (RESTREPO et. al., 2004; CANTERAS et. al., 2008).

O sistema olfatório de roedores é extremamente sofisticado em comparação ao humano. Esse é dotado de 2 epitélios quimiossensoriais diferentes. O epitélio olfatório sensorial principal é responsável por detectar diferenças odoríferas sutis dentre a diversidade destes estímulos enquanto que o epitélio olfatório sensorial acessório é mais comumente relacionado à comunicação inter e intra específica (BRENNAN & KEVERNE, 1997; RESTREPO et. al., 2004), de modo que, odores relacionados ao predador parecem ser, majoritariamente, processados em nível do bulbo olfatório acessório (MCGREGOR et. al.,

2004). Entretanto, ambos os epitélios parecem interagir de maneira integrada na detecção de odores comuns e feromônios (BRENNAN & KEVERNE, 1997; XU et. al., 2005; SWANEY & KEVERNE, 2008).

Os primeiros sentidos a amadurecerem, durante a fase de desenvolvimento dos roedores, são o olfatório e o tátil. Em seguida, ocorre a maturação do sentido da audição e, por último, do sistema visual. De maneira semelhante, essa mesma ordem observada na maturação é observada nas respostas condicionadas, ao se empregar pistas sensoriais no condicionamento (RICHARDSON, PAXINOS & LEE, 2000). Quando as pistas olfatórias são ativadas como no condicionamento prévio entre odor e choque elétrico nas patas, a resposta detectada primeiramente é a de esquiva. Posteriormente, notam-se alterações cardíacas e, por fim, respostas de congelamento (YAP & RICHARDSON, 2007).

A utilização de estímulos olfatórios na produção do condicionamento de medo encontra-se já bem estabelecida. Respostas robustas e duradouras de congelamento a pistas olfatória previamente pareadas com choques nas patas têm sido descritas por Otto e colaboradores (1997; 2000). Além de respostas de congelamento, observou-se também que estímulos odoríferos são estímulos condicionados efetivos para a potencialização da resposta de sobressalto (RICHARDSON et. al., 1999; PASCHALL & DAVIS, 2002).

O sistema olfatório dos roedores, além de ser essencial a todas essas características já elencadas, também é decisivo no controle do comportamento. Há evidências que o aprendizado olfatório é dotado de características peculiares em relação à aquisição, retenção e extinção (SLOTNICK, 2001) e parece ser o único sistema sensorial capaz de ativar o circuito defensivo hipotalâmico medial, sistema neural este encarregado das respostas inatas de medo (CANTERAS, 2002; CANTERAS & BLANCHARD, 2008; CANTERAS, KROON, DOMONTE, PAVESI, & CAROBREZ, 2008). Além disso, as respostas de medo aprendido estão mais relacionadas à idade do animal no momento da aquisição do condicionamento olfatório

do que no momento do teste da expressão do medo condicionado ao odor (RICHARDSON & FAN, 2002), demonstrando sua importância logo nos estágios iniciais da vida dos roedores.

Neste trabalho empregou-se odor de café como estímulo a ser condicionado, porém muitos outros odores são utilizados. São exemplos o odor de amêndoa (ROSENKRANZ & GRACE, 2002) e amilacetato (KILPATRICK & CAHILL, 2003; SEVELINGES et. al., 2004; WALKER et. al., 2005). Por ser um odor sintético, mais volátil e puro, o odor de amilacetato vem substituindo o odor de café em nosso laboratório.

B. HIPÓTESES E OBJETIVOS

Estes dados descritos na introdução fundamentam os possíveis efeitos farmacológicos do PTZ. Dentre eles, seu efeito tipo ansiogênico em doses subconvulsivantes permite sugerir sua atuação como EI no COM, uma vez que este efeito respeita a prerrogativa descrita por Eikelboom & Stewart (1982) para a qualificação de drogas como EI. Entretanto, a relevância emocional e/ou biológica necessária para estabelecer a associação EI-EC1 do efeito ansiogênico causado pelo PTZ ainda é desconhecida. Supõe-se, portanto, que este estímulo interoceptivo seja suficiente, ainda que talvez não *per se*, para reduzir o número de choques elétricos necessários para estabelecer o COM. Assim, para testar a validade desta hipótese, os seguintes objetivos foram delineados:

- Padronizar os EIs necessários para aquisição do condicionamento de medo através da resposta de congelamento;
- Investigar se os comportamentos de esquiva e de avaliação de risco podem ser utilizados na confirmação do condicionamento olfatório (primeira ordem) e contextual (segunda ordem);
- Avaliar o efeito do MDZ na expressão do condicionamento olfatório (primeira ordem) e na aquisição do condicionamento contextual (segunda ordem).

C. PROCEDIMENTOS GERAIS

C.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, tendo livre acesso à água e comida.

C.2. Drogas e substâncias

As doses e quantidades empregadas foram fundamentadas em dados da literatura (DIELENBERG et. al., 1999; DO-MONTE, 2006, KROON, 2007) ou em estudos prévios deste laboratório, respectivamente:

- Midazolam (MDZ) - (Dormium®, União Química, Brasil), diluído em solução fisiológica (NaCl 0,9%), 0,5 mg/ml num volume de injeção de 1,0 ml/kg.
- Pentilenotetrazol (PTZ) - (Pentylentetrazole®, Sigma, EUA) diluído em solução fisiológica (NaCl 0,9%), 15 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.

C.3. 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).

C.4. Análise Estatística

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

Todos os resultados foram representados como média \pm e.p.m. Os dados obtidos do LCE (anexo) foram analisados pela análise de variância (ANOVA) repetida (teste e re-teste), assim como os dados da etapa II. Os dados da etapa I e III foram analisados pela análise fatorial da ANOVA. Para todas as análises *post-hoc*, o teste de Duncan foi o teste selecionado.

Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo (notação: $p < 0,05$). Para tendências (t) foram aceitos valores de p entre 0,05 e 0,10 (notação: $0,05 < p < 0,10$).

D. ETAPA I

**PADRONIZAÇÃO DO ESTÍMULO INCONDICIONADO AVERSIVO NECESSÁRIO
PARA AQUISIÇÃO DO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO DE MEDO**

D.1. Objetivo experimental

Após a confirmação do efeito ansiogênico do PTZ, nas condições experimentais deste laboratório (ver apêndice I, pg. 84), realizou-se uma padronização do estímulo aversivo necessário para produzir nos sujeitos uma resposta defensiva representativa da aquisição do COM. Nesta etapa procurou-se determinar qual(is) do(s) estímulo(s), exteroceptivo ou interoceptivo independentes ou associados seriam suficientes para promover este condicionamento. Para mensurar tal medo condicionado selecionou-se, nesta etapa do trabalho, o comportamento de congelamento ou imobilidade.

D.2. Equipamentos e procedimentos

D.2.1 Caixa de Condicionamento

O COM 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 composto de grades eletrificadas distanciadas 1 cm entre si, permitia a aplicação de impulsos elétricos regulados a partir de controladores de intensidade e tempo através de um sistema gerador de choques (Fig. 1). Uma quantidade de pó de café (15g) foi distribuída uniformemente em quatro porções semelhantes no compartimento abaixo do piso gradeado, servindo como o estímulo olfatório (EC1) a ser utilizado como estímulo a ser condicionado.

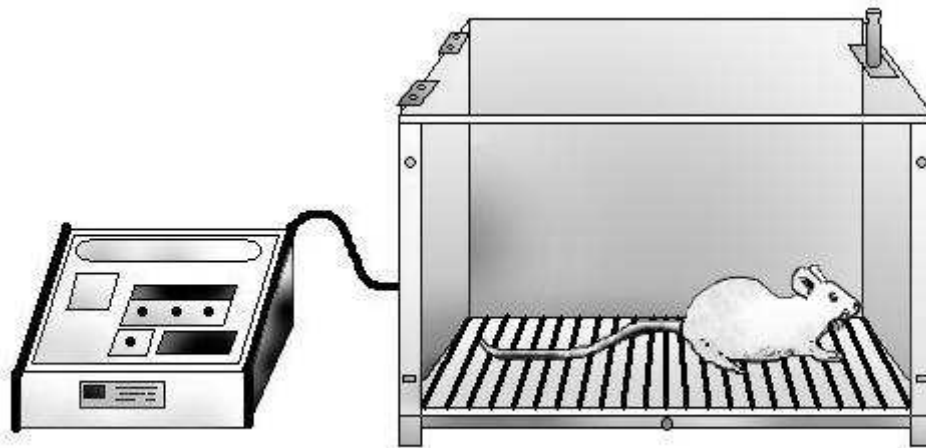


Figura 1. Esquema representativo da caixa de condicionamento (KROON, 2007).

D.2.2. Aquisição do COM de primeira ordem

Para a realização do COM, no primeiro dia (Dia 1) os animais foram colocados na caixa de condicionamento para exploração do ambiente, numa sessão denominada familiarização, com duração de 5 minutos. No dia seguinte (Dia 2), designada sessão de condicionamento, os animais foram re-expostos à caixa, sendo que neste dia foram emitidos choques elétricos nas patas (EI) associados ao estímulo olfatório neutro, odor de café (EC1), a fim de estabelecer o pareamento, conforme descrito abaixo. Trinta minutos antes da sessão de condicionamento os sujeitos foram injetados com salina ou PTZ. O condicionamento foi realizado num ambiente com som atenuado, temperatura controlada (22 ± 1 °C) e intensidade de luz de 80 lux.

D.2.3. Protocolo Experimental

A fim de determinar o comportamento de medo contextual e condicionado foi utilizada neste experimento a medida da porcentagem do tempo de congelamento. O

protocolo experimental compôs-se de grupos de animais que foram injetados intraperitonealmente 30 minutos antes da sessão de condicionamento (dia 2) com salina ou PTZ. Tais grupos experimentais foram ainda subdivididos e, de maneira combinada, receberam números diferentes de choques elétricos nas patas (0, 1, 3 ou 5). Tal sessão tinha duração de 2,5 minutos, com choques intercalados por 30 segundos, sendo que o primeiro choque foi aplicado 30s após o início da sessão. A intensidade empregada foi 0,4 mA e a duração dos choques de 2s. No dia 3, os animais foram, então, re-expostos à caixa de condicionamento por 5 minutos na presença do odor de café (EC1), onde foi mensurado o tempo em que o animal permaneceu emitindo o comportamento de congelamento, definido por Blanchard & Blanchard (1969), Bolles & Collier (1976) e Fanselow (1980) como a completa imobilidade do animal salvo os movimentos requeridos para a respiração. Esta medida de tempo de congelamento foi transformada em porcentagem em relação ao tempo total de teste e foi realizada propositalmente na presença do estímulo olfatório, odor de café, com o objetivo de observar o maior tempo de congelamento possível. Sendo assim, nesta etapa não é possível diferenciar o medo condicionado ao contexto do condicionado ao odor.

Para se ter segurança nos resultados, excluindo sujeitos que possivelmente apresentassem imobilidade acentuada na sessão de familiarização e para acompanhar o perfil de cada animal em particular, foi medido o tempo de congelamento também na sessão de familiarização. O protocolo experimental encontra-se ilustrado na figura 2.

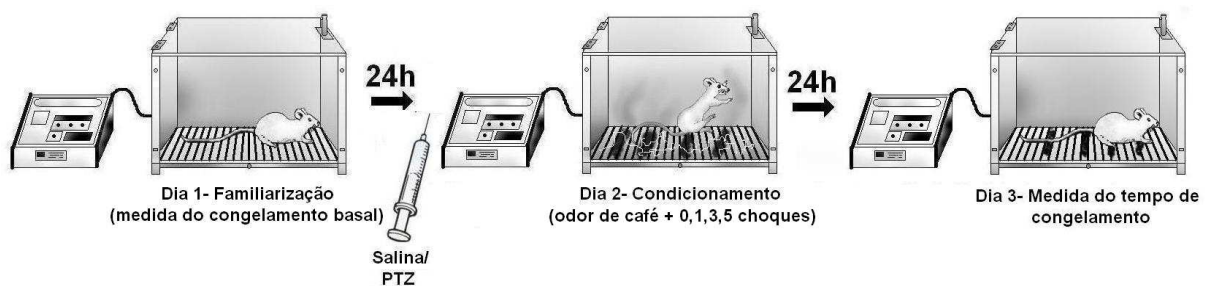


Figura 2. Esquema do protocolo experimental utilizado na padronização do EI aversivo necessário para aquisição do condicionamento olfatório de medo através do tempo de congelamento. Trinta minutos antes da sessão de condicionamento, os animais foram injetados intraperitonealmente com salina ou PTZ (15mg/kg). Durante o condicionamento, os sujeitos receberam 0, 1, 3 ou 5 choques elétricos nas patas na presença da pista olfatória (odor de café). No dia 3, dia do teste, o tempo de congelamento foi mensurado na presença do odor no mesmo ambiente das demais sessões. Legenda: PTZ = pentilenotetrazol.

D.3. Resultados

O conjunto de dados obtidos nesta etapa experimental pode ser observado na figura 3. A ANOVA revelou para a porcentagem do tempo de congelamento efeito significativo para o fator tratamento [$F(1,94)=8,370$, $p<0,01$] e choque [$F(3,92)=9,644$, $p<0,01$], mas não para o fator interação [$F(3,92)=0,206$, $p=0,89$]. O efeito significativo detectado para o fator tratamento revela o efeito geral do PTZ aumentando o tempo de congelamento (%) dos animais na sessão de teste (dia 3). Com relação ao efeito do fator choque, o teste *post hoc* de Duncan detectou o aumento significativo naqueles animais previamente pareados com 5 choques (tendência ($p=0,58$) para aqueles previamente pareados com 3 choques) ambos em comparação ao grupo controle salina sem choque (figura 3). Não foram observadas diferenças significativas no tempo de congelamento durante a sessão de familiarização entre os grupos experimentais.

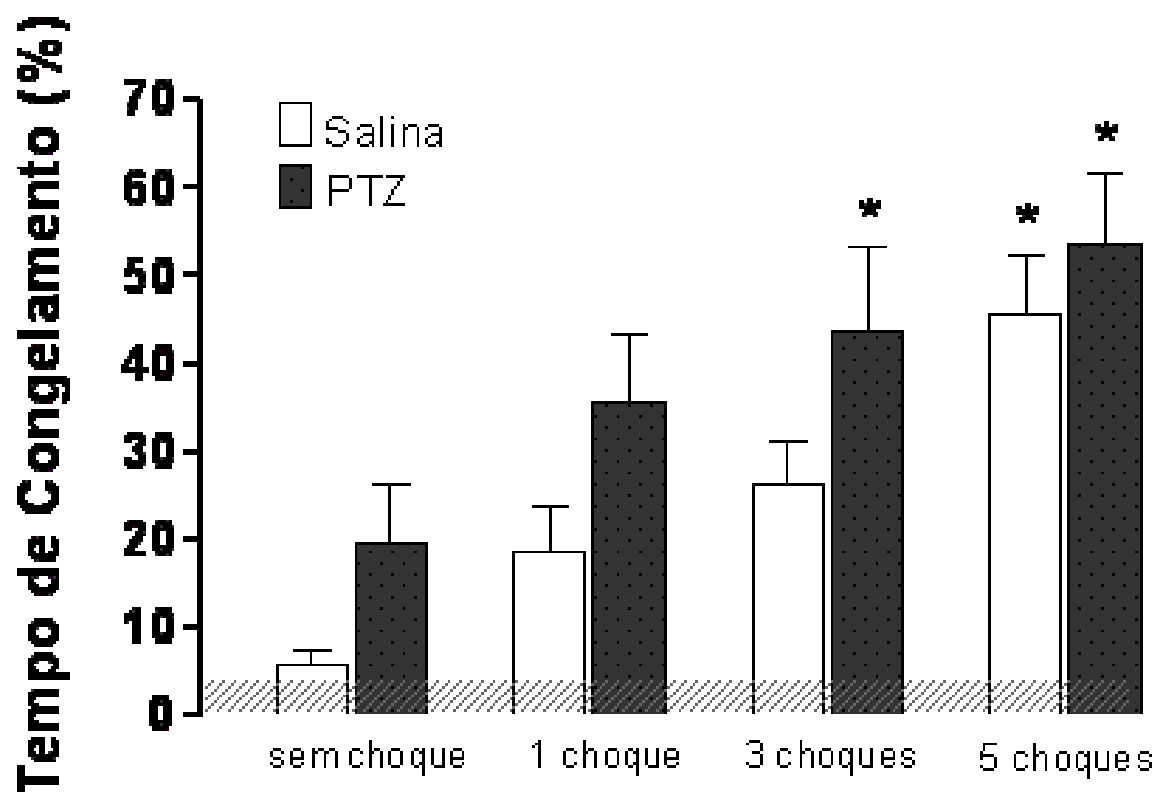


Figura 3. Padronização do EI aversivo necessário para aquisição do COM através do tempo de congelamento (%) emitido pelos animais na caixa de condicionamento na presença de odor de café (dia 3). A porcentagem do tempo de congelamento da sessão de familiarização, de todos os animais, está agrupada e representada como intervalo de confiança (95%) superior e inferior na barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo respectivo grupo sem choque. Legenda: PTZ = pentilenotetrazol. n= 11-16.

D.4. Discussão

Conforme descrito por Blanchard, Blanchard & Griebel (2005) as respostas defensivas incluem um arranjo de comportamentos específicos, que incluem ataque, congelamento e avaliação de risco. Assim, quando os animais são expostos a situações aversivas ou encontram-se sob ameaça, as estratégias comportamentais observadas variam desde fuga e imobilização até ataque defensivo e submissão (BLANCHARD et. al., 1993). Portanto, o comportamento de imobilidade é apenas uma dentre as várias estratégias defensivas que podem ser escolhidas pelo animal frente a um estímulo ameaçador. Assim, observou-se que nesta situação experimental a estratégia comportamental adotada pelos sujeitos na re-exposição ao contexto incrementado com odor foi o comportamento de imobilidade. Blanchard e colaboradores (1990) apud in McNaughton & Corr (2004) apontam para as diferenças de estratégias de defesa dependendo da distância em que se encontra o estímulo aversivo (ex. presença do predador). Dessa forma, a imobilidade ou congelamento, assim como na esquiva defensiva, ocorre quando o estímulo ameaçador encontra-se a uma distância intermediária da presa e, geralmente, não existe a opção de fuga. Neste trabalho, a emissão do comportamento de congelamento frente a um estímulo aversivo aprendido corrobora com as observações da literatura com relação a situação em que este comportamento é selecionado pelo animal.

Particularmente no comportamento de congelamento, a estratégia defensiva baseia-se em não chamar a atenção do predador (ou estímulo ameaçador) através da imobilidade emitida (DESY et al., 1990; WHISHAW & DRINGENBERG, 1991; HENDRIE & WEISS, 1994; HENDRIE et al., 1998; EILAN, 2005). Portanto, o congelamento pode ser estudado como uma resposta incondicionada, protetora e elaborada na relação presa-predador (PEZZE & FELDON, 2004) e como uma resposta condicionada, observada após pareamento com um

estímulo aversivo. Neste último caso é, também, considerada por Davis (1990) uma resposta de medo clássica e segura.

Alguns estudos têm se preocupado em mensurar a resposta de congelamento condicionada ao contexto onde se realizou o condicionamento de medo (RAU & FANSELOW, 2008; PONNUSAMY et. al., 2008). Porém, essa resposta defensiva condicionada se apresenta ainda mais robusta e duradoura quando o contexto encontra-se incrementado com pistas sensoriais, como as de natureza olfatória (OTTO et. al, 1997, 2000). Por esse e pelo motivo de se estudar exclusivamente o COM (etapa subsequente), na sessão de teste (dia 3) desta etapa, o tempo de congelamento foi mensurado no mesmo contexto em que ocorreu o condicionamento (caixa de condicionamento) e na presença do estímulo olfatório condicionado (odor de café – EC1), com o propósito de observar o maior tempo de congelamento possível.

Segundo Morris & Bouton (2006) a magnitude do EI é determinante na taxa de aprendizado e este estímulo pode ter e/ou ser de diferentes naturezas, desde que mantenha relevância emocional ou biológica para, ao menos, pressupor a ocorrência da associação EI-EC1. Assim, a fim de verificar o efeito da magnitude de cada estímulo em particular justificase, no presente trabalho, o emprego dos choques elétricos nas patas (estímulo de natureza exteroceptiva) e o tratamento sistêmico com salina ou PTZ (estímulo de natureza interoceptiva) associados ou não. De acordo com os resultados obtidos referentes ao estímulo interoceptivo como EI (fator tratamento - salina ou PTZ), observou-se que os animais pareados ao odor de café (EC1) apenas com o efeito ansiogênico advindo da administração de PTZ foi suficiente para estabelecer o condicionamento contextual (contexto + odor) aumentando, com efeito geral, o tempo de congelamento (%) em relação aos animais tratados com salina (figura 3). Com relação ao efeito observado para o fator choque, o teste *post hoc* de Duncan objetivou detectar qual a quantidade de choques responsável pelo aumento

significativo no tempo de congelamento dos animais no dia do teste. Assim, observou-se ser necessário 5 pareamentos entre o odor de café (EC1) e o choque nas patas (EI) (grupo salina 5 choques) para promover um aumento significativo neste parâmetro. Este resultado corrobora com dados prévios adquiridos neste laboratório por Kroon (2007) que demonstrou que o COM é geralmente obtido após a associação de 5 choques elétricos nas patas (EI) com um odor neutro (EC1) (KROON & CAROBREZ, 2009). Neste condicionamento em especial, não se utilizou nenhum estímulo interoceptivo como incondicionado, uma vez que os 5 choques elétricos nas patas, nesta intensidade e intervalo, demonstraram-se suficientes na promoção do COM, sem ocorrer o fenômeno da generalização. Os resultados do presente trabalho evidenciaram relevante semelhança no tempo de congelamento entre os grupos PTZ + 3 choques ($43,9\% \pm 9,5$) e salina + 5 choques ($45,6\% \pm 6,7$), fato que nos permitiu supor que 3 choques associados à injeção sistêmica de PTZ na dose ansiogênica utilizada (15mg/kg) poderiam ser suficientes para promover o efetivo COM. Ainda, embora a ANOVA não tenha detectado interação entre os fatores tratamento e choque, o teste *post hoc* de Duncan demonstrou que o pareamento ao odor de café (EC1) realizado com PTZ + 3 choques aumentou o tempo de congelamento quando comparado àqueles animais previamente pareados apenas com PTZ (grupo PTZ sem choque). Portanto, em conjunto, essas evidências basearam a escolha de manter para as etapas subsequentes o estímulo interoceptivo (injeção de salina ou PTZ) e selecionar apenas os estímulos exteroceptivos de 0 ou 3 choques nas patas, com conseqüente exclusão de 1 e 5 choques, como EI.

Devido ao interesse já mencionado voltado para a investigação exclusiva do COM, neste experimento o odor de café foi apresentado aos animais também no dia do teste, incrementado o contexto. Este fato, contudo, não permitiu diferenciar nesta etapa experimental o medo condicionado contextual do medo condicionado olfatório, uma vez que o condicionamento de medo e a re-exposição ao estímulo olfatório ocorreram no mesmo

ambiente (caixa de condicionamento). Por este motivo é que nas etapas subseqüentes do presente trabalho (etapa II e III) se utilizou além de específicos números de choques nas patas (0 ou 3), um novo aparato, denominado caixa de odor, capaz além de isolar o estímulo olfatório do contextual condicionado (evidenciando exclusivamente o COM), aprimorar o estudo do comportamento defensivo por permitir a visualização de outras estratégias defensivas, como esquiva e avaliação de risco.

E. ETAPA II

**AVALIAÇÃO DO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO DE MEDO UTILIZANDO
PENTILENOTETRAZOL E CHOQUE ELÉTRICO NAS PATAS COMO
ESTÍMULOS INCONDICIONADOS**

E.1. Objetivo experimental

O experimento abaixo foi delineado com o objetivo de verificar a aquisição do COM (condicionamento de primeira ordem) utilizando PTZ e/ou choques elétricos nas patas como EIs e o odor de café como estímulo olfatório. Além disso, verificar a ocorrência de um novo condicionamento de medo, condicionamento contextual de medo de segunda ordem, durante a sessão de teste EC1.

E.2. Equipamentos e procedimentos

Esta etapa experimental foi composta por 2 momentos: 1) aquisição do COM de primeira ordem, a qual já foi previamente descrita no item D.2.2 realizada na caixa de condicionamento; e 2) avaliação do COM frente ao estímulo condicionado de primeira (EC1) e de segunda (EC2) ordem, realizados em um novo ambiente: caixa de odor, conforme descrito abaixo.

E.2.1. Caixa de Odor - Avaliação do COM de primeira e segunda ordem

Com o intuito de diminuir as influências contextuais adquiridas na caixa de condicionamento na avaliação do medo condicionado, esta etapa foi realizada em uma caixa distinta da caixa de condicionamento, denominada caixa de odor, instalada em uma sala, com luminosidade atenuada (4 lux). Este aparato, inteiramente construído em acrílico, foi dividido em dois compartimentos, um aberto (40 x 26 x 40 cm) sem cobertura e um fechado (20 x 26 x 40 cm) com cobertura. Para permitir a visualização dos animais no modelo, as paredes frontais, de ambos os compartimentos, foram construídas em acrílico transparente. Uma

pequena abertura (6 x 6 cm), situada na parede divisória, permitiu o livre acesso do animal aos dois ambientes. Na parede lateral do compartimento aberto, uma flanela enrolada, contendo a mesma 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 próxima à flanela (Fig. 4).

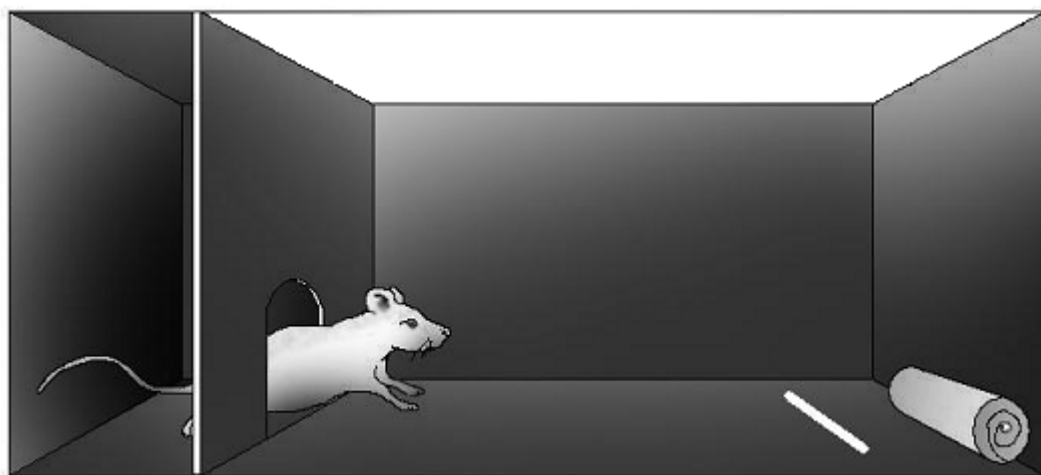
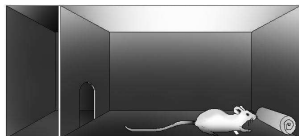


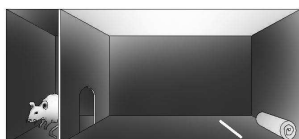
Figura 4. Esquema representativo da caixa de odor (KROON, 2007).

Para permitir a correta avaliação das respostas defensivas emitidas pelos animais nas diferentes sessões no aparato de teste, todas as sessões foram registradas através de um sistema de vídeo-câmera e gravadas em DVD.

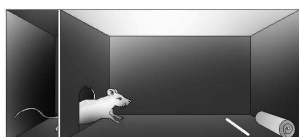
E.2.2. Parâmetros relacionados ao Comportamento Defensivo



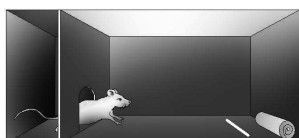
Tempo de aproximação (%): tempo em que o animal permanece com pelo menos 50% do corpo dentro de uma área retangular (7 x 26 cm) que contém a flanela em relação ao tempo total de teste. Uma marcação localizada a 7 cm da parede lateral facilita esta medida.



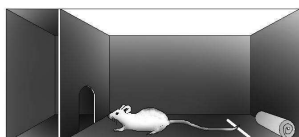
Tempo escondido (%): determina o período que o animal permanece com as 4 patas dentro do compartimento fechado da caixa em relação ao tempo total de teste.



Tempo de Avaliação de Risco Absoluta (s): é caracterizado pelo período em que o animal encontra-se dentro do compartimento fechado com a cabeça e/ou parte das patas anteriores no compartimento aberto, direcionado para a flanela.



Tempo de Avaliação de Risco Relativa (%): é caracterizado pelo período em que o animal encontra-se dentro do compartimento fechado com a cabeça e/ou parte das patas anteriores no compartimento aberto, direcionado para a flanela, dividido pelo tempo total em 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.

Durante os três dias de exposição à caixa de odor, todos os sujeitos foram colocados no modelo pelo compartimento aberto junto à parede divisória, com a cabeça direcionada para a flanela. Alguns parâmetros já estabelecidos neste laboratório (DO-MONTE, 2006; SOUZA,

2007; KROON, 2007) foram empregados durante os 10 minutos de avaliação do comportamento dos animais nas sessões de familiarização, teste EC1 e teste EC2. Dessa maneira, assume-se que tais parâmetros são capazes de representar segura e satisfatoriamente a resposta defensiva dos ratos durante as 3 sessões que ocorrem na caixa de odor.

Para diminuir as possíveis interferências odoríferas (odor de urina, fezes ou mesmo odor de cada sujeito em particular) na mensuração dos parâmetros elencados acima, foi utilizado álcool 10% na limpeza da caixa de odor após cada sessão individual

E.2.3. Protocolo experimental

Após a comprovação da neutralidade do estímulo olfatório selecionado (odor de café) (ver apêndice II, pg. 90), sucedeu-se a avaliação do medo condicionado ao odor (EC1) e ao segundo contexto (EC2). Para esta avaliação, após as sessões realizadas na caixa de condicionamento (dia 1 e 2), os animais foram expostos à caixa de odor em três momentos diferentes.

Com base nos resultados da etapa I, selecionou-se para este experimento números específicos de choques nas patas (0 ou 3 choques – 0,4mA/2s/ 30 segundos entre os disparos) mantendo-se as injeções sistêmicas (salina ou PTZ) 30 minutos antes da sessão de condicionamento (dia 2). Dessa forma, no dia 3, os animais foram familiarizados na caixa de odor na presença de uma flanela sem odor, da mesma forma como descrito nos grupos controles (apêndice II, pg. 90). Vinte e quatro horas após, os animais foram então re-expostos ao odor de café (nesta fase agindo como EC1) através de uma flanela semelhante àquela utilizada na familiarização, contendo 15 g de café. Assim, como a sessão do dia 4 tem por objetivo testar a aversividade relacionada especificamente ao estímulo olfatório (odor de café) previamente condicionado em outro ambiente, esta sessão foi denominada Teste do Estímulo

Condicionado 1 (Teste EC1). De maneira análoga, com o propósito de avaliar o medo condicionado ao contexto (EC2) em que ocorreu a re-exposição ao odor de café (EC1) devido à ocorrência de um segundo condicionamento de medo através da exposição na sessão de teste EC1 ao odor condicionado aversivo, todos os sujeitos foram re-expostos à caixa de teste na presença da flanela neutra (sem odor de café), denominando esta última sessão de Teste do Estímulo Condicionado 2 (Teste EC2). O esquema do procedimento experimental encontra-se ilustrado na figura 5



Figura 5. Esquema do procedimento experimental utilizado para a avaliação do medo condicionado de primeira e segunda ordem. Administrou-se PTZ (15mg/kg) como EI em associação com nenhum ou 3 choques elétricos nas patas e odor de café como estímulo olfatório. Legenda: PTZ = pentilenotetrazol; EC1= estímulo condicionado 1; EC2= estímulo condicionado 2.

E.3. Resultados

A ANOVA detectou efeitos significativos ($p < 0.01$) do fator tratamento {% de tempo de aproximação [$F(3,32)=23,10$], % de tempo escondido [$F(3,32)=32,99$] e tempo absoluto de avaliação de risco [$F(3,32)=7,410$]} e do fator choques {% de tempo de aproximação [$F(3,32)=9,21$], % de tempo escondido [$F(3,32)=7,41$] e tempo absoluto de avaliação de risco [$F(3,32)=7,979$]}, mas não para do fator interação {% de tempo de aproximação [$F(3,32)=0,04$; $p=0,85$], % de tempo escondido [$F(3,32)=0,15$; $p=0,70$] e tempo absoluto de avaliação de risco [$F(3,32)=1,23$; $p=0,28$]}. O teste *post-hoc* de Duncan revelou que o grupo tratado com PTZ sem choques reduziu significativamente a % de tempo de aproximação e aumentou significativamente a % de tempo escondido quando comparado com o grupo controle (salina sem choque), tanto no teste EC1 quanto no teste EC2, conforme demonstra a figura 6. O grupo previamente tratado com PTZ e que recebeu 3 choques na sessão de condicionamento além de diminuir significativamente a % de tempo de aproximação e aumentar a % de tempo escondido em relação ao grupo salina sem choque, também difere-se do grupo salina + 3 choques, tanto na sessão teste EC1 quanto no teste EC2, demonstrando o efeito aditivo dos choques no tratamento com PTZ, embora a ANOVA não tenha detectado interação. Embora o teste Duncan não tenha detectado diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo PTZ + 3 choques e salina + 3 choques no parâmetro % de tempo de aproximação durante o teste EC2, uma tendência ($p=0,053$) foi detectada.

Para o parâmetro tempo absoluto de avaliação de risco (s), o teste *post hoc* revelou que o grupo PTZ + 3 choques aumentou significativamente este parâmetro comparado ao grupo salina sem choque, tanto no teste EC1 como no EC2. Ainda, duas tendências ao aumento (ambas $p=0,06$) do grupo PTZ + 3 choques foram detectadas na sessão de teste EC1 em comparação aos grupos salina + 3 choques e PTZ sem choque, conforme demonstra figura

7B. Com relação ao parâmetro tempo relativo de avaliação de risco, a ANOVA não demonstrou haver efeito significativo.

A ANOVA, para a frequência de cruzamentos (tabela 1), detectou efeito significativo para o fator tratamento [$F(3,32)=5,256$, $p<0,05$] e repetição [$F(3,32)=8,307$, $p<0,01$] entre as sessões de teste EC1 e EC2. O teste *post-hoc* revelou uma tendência, tanto no teste EC1 quanto no teste EC2, entre os grupos PTZ + 3 choques e salina sem choque, conforme se pode observar na tabela 1.

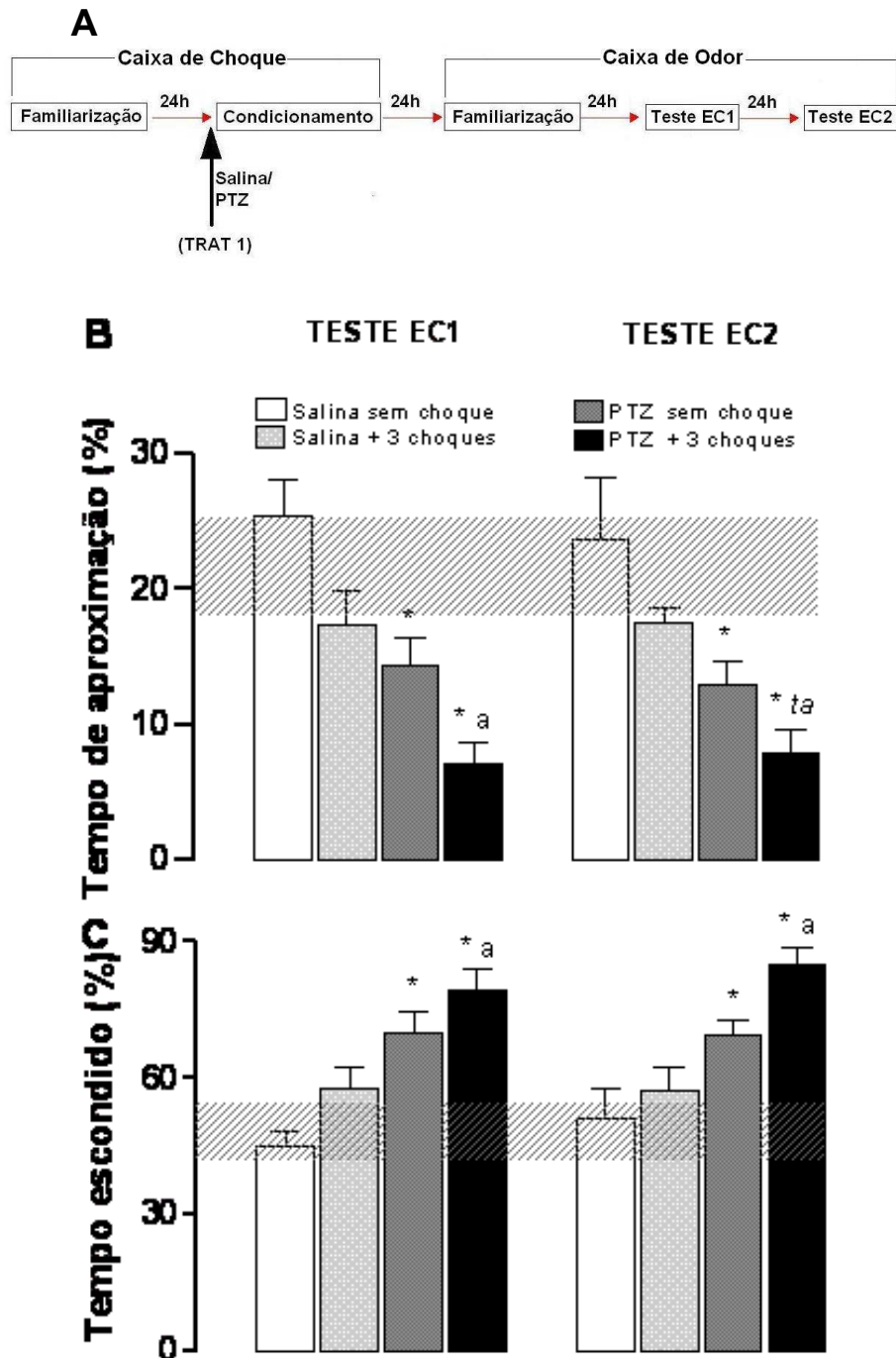


Figura 6. Avaliação do medo condicionado nas sessões de teste EC1 e teste EC2 através dos parâmetros de (B) % de tempo de aproximação e (C) % de tempo escondido dos animais previamente tratados intraperitonealmente com salina ou PTZ (15mg/kg) 30 minutos antes da sessão de condicionamento. Tais grupos, combinadamente, receberam nesta sessão nenhum ou 3 choques elétricos nas patas na presença do odor de café (EC1). O protocolo experimental utilizado encontra-se ilustrado em (A). A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina sem choque; a $p < 0,05$ comparado ao grupo salina + 3 choques; ta $0,05 < p < 0,10$ comparado ao grupo salina + 3 choques. Legenda: PTZ= pentilenotetrazol; EC1= estímulo condicionado 1; EC2= estímulo condicionado 2. n= 8-10.

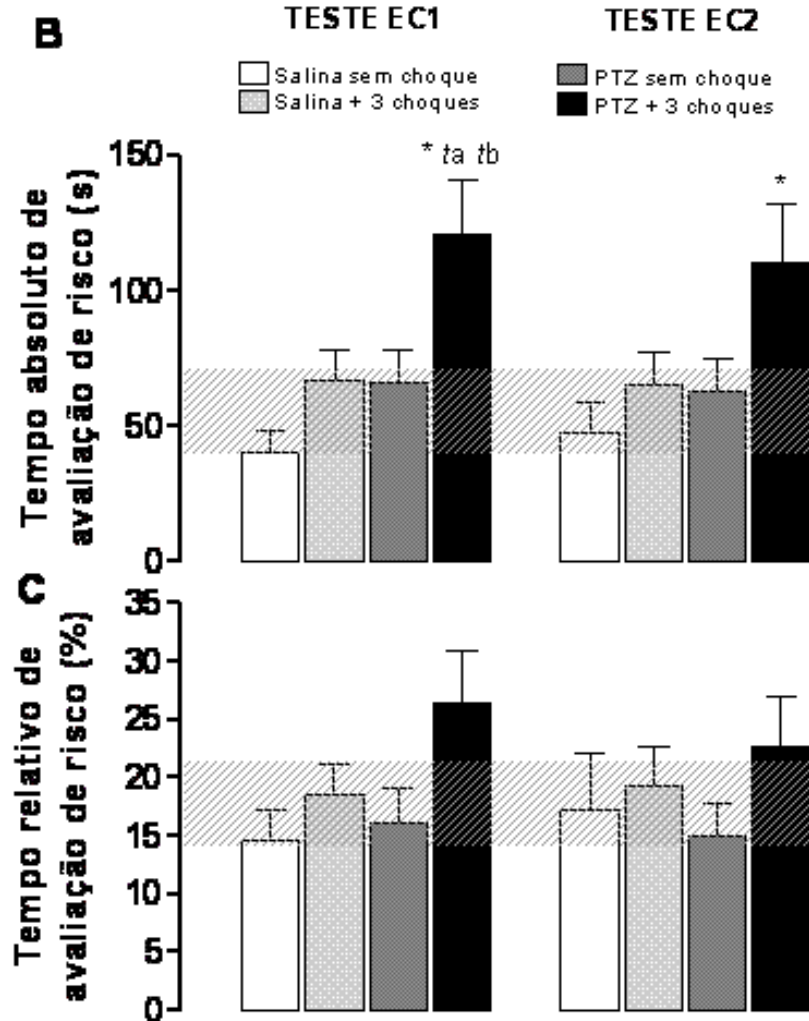
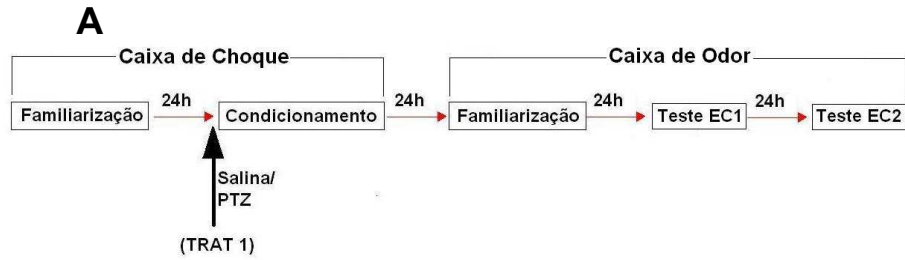


Figura 7. Avaliação do medo condicionado nas sessões de teste EC1 e teste EC2 através dos parâmetros de (B) tempo de avaliação de risco absoluto (s) e (C) tempo de avaliação de risco relativo (%) dos animais previamente tratados intraperitonealmente com salina ou PTZ (15mg/kg) 30 minutos antes da sessão de condicionamento. Tais grupos, combinadamente, receberam nesta sessão nenhum ou 3 choques elétricos nas patas na presença do odor de café (EC1). O protocolo experimental utilizado encontra-se ilustrado em (A). A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina sem choque; a $p < 0,05$ comparado ao grupo salina + 3 choques; *ta* $0,05 < p < 0,10$ comparado ao grupo salina + 3 choques; *tb* $0,05 < p < 0,10$ comparado ao grupo PTZ sem choques. Legenda: PTZ= pentilenotetrazol; EC1= estímulo condicionado 1; EC2= estímulo condicionado 2. n= 8-10.

Tabela 1. Avaliação do medo condicionado, através da frequência de cruzamentos, nas sessões de familiarização, teste EC1 e teste EC2 dos animais previamente tratados intraperitonealmente com salina ou PTZ (15 mg/kg) 30 minutos antes da sessão de condicionamento. Tais grupos, combinadamente, receberam nesta sessão nenhum ou 3 choques elétricos nas patas na presença do odor de café (EC1). Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. $t^* 0,05 < p < 0,10$ comparado ao grupo salina sem choque. $n = 8-10$.

Grupos experimentais	Familiarização	Teste EC1	Teste EC2
Salina sem choque	22,2 \pm 2,0	22,2 \pm 2,2	18,8 \pm 2,3
Salina + 3 choques	21,9 \pm 1,1	19,5 \pm 2,3	18,4 \pm 1,1
PTZ sem choque	20,4 \pm 1,0	19,2 \pm 2,0	16,3 \pm 1,6
PTZ + 3 choques	17,8 \pm 1,1	14,1 \pm 2,8 (t^*)	11,1 \pm 2,2 (t^*)

Legenda: PTZ= pentilenotetrazol; EC1= estímulo condicionado 1; EC2= estímulo condicionado 2.

E.4. Discussão

Embora o choque elétrico nas patas seja um dos EIs mais comumente empregado no estudo do condicionamento Pavloviano de medo (BAKER & KIM, 2004; SCHAFE et al., 2005) e geralmente utilizem-os repetidas vezes para o estabelecimento efetivo da associação EI-EC, como cinco (WALKER et al., 2005) ou seis pareamentos (OTTO et al., 1997; FUNK & AMIR, 2000; SEVELINGES et al., 2004), neste trabalho buscou-se avaliar o medo condicionado ao odor de café (EC1) e ao contexto (EC2) associando estímulos aversivos brandos de naturezas diferentes: estímulo exteroceptivo (choques elétricos nas patas – 0 ou 3 choques), interoceptivo (injeção sistêmica de um ansiogênico clássico – salina ou PTZ) ou de maneira combinada (estímulo interoceptivo + estímulo exteroceptivo), conforme investigação realizada na etapa I (figura 3).

Com a proposta de desenvolver um método que pudesse ser utilizado para determinar o efeito de várias doenças quando estimulados centralmente pelo PTZ (relação concentração - atividade farmacológica), Ramzan & Levy (1985) verificaram a farmacocinética desta droga, visando minimizar e/ou excluir essa variável. Tal estudo demonstrou que a meia-vida do PTZ é 116 ± 25 minutos e que a concentração no fluido cérebro-espinhal no início da primeira crise mioclônica é de 46 ± 5 mg/l e de 109 ± 13 mg/l no início da máxima convulsão. Outros estudos, como o de Starzl e colaboradores (1953) demonstraram em córtex de gatos que a dose de 15 mg/kg produzia descargas elétricas idênticas as produzidas nos animais controles. As convulsões induzidas por PTZ poderiam ser alcançadas, porém a partir do tálamo isolado de córtex. Neste caso, dose requerida de PTZ encontrava-se entre 90 – 120 mg/kg, dose esta bem distante da cortical. Esse perfil ansiogênico/convulsivante também foi observado em roedores (RIJNDERS, JÄRBE & SLANGEN, 1991; VIVIAN, WEERTS & MICZEK, 1994). Estes dados embasaram a escolha do PTZ na dose de 15 mg/kg, assegurando que esta dose

encontrava-se distante da convulsivante, promovendo apenas o efeito ansiogênico requerido. Além disso, dados previamente adquiridos neste laboratório (ANZINI, 2005) indicavam que a dose de 20 mg/kg apresentava apenas efeitos ansiogênicos. A partir disso, selecionou-se dose ainda menor (15mg/kg) e confirmou-se o perfil ansiogênico do PTZ nos animais (apêndice I, pg. 84) permitindo, portanto, seu uso na investigação deste efeito como EI pelo presente trabalho.

O condicionamento de medo deve ocorrer de maneira efetiva e, neste caso, esta efetividade está relacionada a não ocorrência do fenômeno da generalização nos animais e manutenção da capacidade discriminativa entre estímulos. A generalização, por sua vez, caracteriza-se pela habilidade de responder de maneira similar a estímulos que são qualitativamente distintos, mas funcionalmente equivalentes (GARAKANI et al., 2006). Em outras palavras, responder através da emissão de comportamentos defensivos apenas frente ao estímulo apropriado; consequência da discriminação entre os estímulos que potencialmente poderiam ser utilizados como condicionados. Dessa forma, a aversão adquirida e exibida nas sessões de teste EC1 e EC2 é o reflexo da discriminação adequada entre os estímulos, apresentando respostas defensivas apenas ao estímulo olfatório ou contextual, respectivamente, descartando a ocorrência do fenômeno da generalização. No presente trabalho, a não ocorrência da generalização é comprovada através do comportamento exibido pelos animais na sessão de familiarização na caixa de odor, os quais não apresentaram quaisquer respostas de defesa frente ao novo contexto e/ou à flanela neutra afixada no aparato. Por esse motivo, esta sessão foi representada nos resultados do presente trabalho como uma barra horizontal, que representa o intervalo de confiança (95%) superior e inferior. Portanto, com base nas respostas defensivas observadas na sessão de familiarização à caixa de odor, na re-exposição ao odor (teste EC1) e na re-exposição ao contexto (teste EC2) a não ocorrência do fenômeno da generalização em nenhum grupo experimental do presente trabalho,

garantindo a ocorrência do condicionamento olfatório de medo de primeira ordem e contextual de medo de segunda ordem.

Eikelboom & Stewart (1982) qualificam drogas como EI apenas se esta atuar de maneira aferente no sistema nervoso central de modo a gerar reações fisiológicas mediadas apenas por este sistema. Sabendo que o PTZ satisfaz esta especificação e, com os resultados obtidos através do grupo PTZ sem choque, pôde-se qualificar o PTZ na dose de 15 mg/kg como EI (EI interoceptivo) neste paradigma e condições experimentais. Assim, de acordo com os resultados analisados pela ANOVA nesta etapa experimental, sugere-se que a aversão causada tanto pelo efeito ansiogênico (advinda da administração do PTZ - estímulo interoceptivo – grupo PTZ sem choque) como pelos 3 choques nas patas (estímulo exteroceptivo – grupo salina 3 choques) foram capazes de alterar os parâmetros relacionados ao comportamento defensivo (efeito detectado pela ANOVA do fator tratamento e do fator choque), porém quando estes estímulos aversivos foram associados para estabelecer o COM (grupo PTZ + 3 choques) evidenciou-se um efeito aditivo no estabelecimento do condicionamento de medo. Este efeito, decorrente da associação do efeito ansiogênico do PTZ com os 3 choques nas patas, foi observado nos parâmetros relacionados ao comportamento defensivo, como tempo de aproximação, tempo escondido e tempo absoluto de avaliação de risco. Este grupo (grupo PTZ + 3 choques) também revelou um aumento significativo nos parâmetros relacionados ao comportamento defensivo sem qualquer indício de generalização, uma vez que esse perfil comportamental exibido em ambos os dias de teste (teste EC1 e teste EC2) demonstrou-se bem diferente daquele observado na sessão de familiarização (barra horizontal das figuras 6 e 7), conforme já mencionado. Esse efeito ainda é reforçado ao observar-se o parâmetro de tempo absoluto de avaliação de risco (figura 7B) e frequência de cruzamentos (tabela 1), os quais apresentam diferenças e tendências apenas em relação a este grupo (PTZ + 3 choques). No caso da frequência de cruzamentos, as tendências

podem ser interpretadas como sendo um efeito motivacional, reflexo de uma decisão comportamental já tomada pelo animal, em virtude da intensidade aversiva percebida por ele no confronto com EC1 (e, conseqüentemente, EC2). Dessa maneira, supõe-se que os sujeitos tenham optado por permanecer, durante a maior parte do tempo da sessão de ambos os testes, no compartimento fechado do aparato. Nesta vertente, a hipótese dessa tendência ser, puramente, um efeito locomotor é descartada, já que as injeções foram administradas antes da sessão de condicionamento, ou seja, 48 horas antes do teste EC1 e o tempo de meia-vida do PTZ é de 116 ± 25 min (RAMZAN & LEVY, 1985).

Com relação ao parâmetro de avaliação de risco, pôde-se perceber que os animais que receberam a associação de estímulos EI (grupo PTZ + 3 choques) permaneceram maior tempo realizando esse comportamento. Isto pode ser verificado através das diferenças estatísticas detectadas (teste EC1 e teste EC2) em comparação ao grupo controle (salina sem choque) e, também, pelas tendências apresentadas com relação aos grupos que receberam apenas o estímulo exteroceptivo (salina + 3 choques) ou apenas o estímulo interoceptivo (PTZ) na sessão de teste EC1. Ao analisar-se o tempo relativo de avaliação de risco (%), realizado através da divisão do tempo total de avaliação de risco (s) pelo tempo escondido, percebe-se que tais diferenças estatísticas desaparecem (figura 7C). Percebe-se com estes dados que, embora os animais pareados ao odor de café (EC1) com a associação de estímulos EI (PTZ + 3 choques) permaneçam mais tempo exibindo o comportamento de avaliação de risco, este dado já se encontra representado na % de tempo escondido. Contudo, uma análise em conjunto dos dados obtidos nesta e etapa anterior permite sugerir que a associação dos dois estímulos (PTZ e 3 choques) como EI gera tamanha aversão no confronto com o odor de café (EC1) que os animais acabam por emitir tanto comportamentos defensivos motores com definição cognitiva (ex. comportamento de imobilidade) como os com indefinição cognitiva (ex. aproximação e distanciamento da fonte aversiva, refletindo comportamentos de esquiva),

além de comportamentos de avaliação de risco. Entretanto, aqueles animais previamente pareados ao odor apenas com o efeito ansiogênico advindo da administração com o PTZ emitem, majoritariamente, comportamentos com indefinição cognitiva, uma vez que não foram capazes de aumentar o tempo de imobilidade (etapa I, fig. 3). Nesta vertente, pode-se assumir que a força com que o condicionamento se estabelece pode refletir os tipos de comportamentos defensivos no confronto com o estímulo aversivo.

O presente estudo interessou-se, também, em avaliar o medo condicionado de segunda ordem. Neste caso, verificamos que a relevância do EC1 (odor de café) após a sessão de condicionamento foi capaz de promover um novo condicionamento, sendo que a aversão adquirida ao odor de café quando em sua re-exposição (durante o teste EC1) foi capaz de promover uma segunda associação aversiva. Neste caso, o odor de café agiu como EI e o ambiente da re-exposição a este estímulo (caixa de odor, ou mesmo, contexto) como EC2, de maneira que as respostas defensivas observadas no teste EC2 (dia 5) foram interpretadas como reflexo do condicionamento de medo de segunda ordem. Este condicionamento de segunda ordem exibiu, neste caso, o mesmo perfil de respostas condicionadas de medo observado no teste EC1, mesmo sendo esse um condicionamento intrinsecamente de menor intensidade que o de primeira ordem (GEWIRTZ & DAVIS, 2000). Em conjunto, esses dados reforçam a propriedade aversiva que o odor de café (EC1) adquiriu após o pareamento com o estímulo interoceptivo (grupo PTZ sem choque) e, majoritariamente, com a associação dos estímulos, interoceptivo e exteroceptivo (grupo PTZ + 3 choques). Essas respostas condicionadas mais robustas, observadas e mantidas no teste EC2, pelo grupo experimental que recebeu tal associação aversiva de estímulos, devem-se provavelmente ao fato do condicionamento de primeira ordem (dia 2) ter ocorrido com “intensidade aversiva intrínseca” maior (GEWIRTZ & DAVIS, 2000) neste grupo do que naquele que recebeu apenas a injeção sistêmica de PTZ, conforme já sugerido.

Os resultados conjuntos desta etapa experimental evidenciaram, através do efeito aditivo entre PTZ e choque nas patas, que a associação de EIs (PTZ + 3 choques) constituem a melhor opção quando se deseja estabelecer seguramente, neste modelo, o COM. Devido à magnitude dos resultados observados deste grupo pôde-se evidenciar também ser esta a melhor opção para a promoção do condicionamento de segunda ordem. No entanto, a alteração do estado interno (efeito ansiogênico) causada pela administração de PTZ mostrou-se mais efetiva no estabelecimento do condicionamento de medo que o estímulo exteroceptivo aplicado (3 choques) por apresentar diferença significativa nos parâmetros relacionados ao comportamento defensivo ao ser comparado ao grupo salina sem choque. Este dado não descarta o efeito dos 3 choques independente do tratamento farmacológico, apenas sugere o efeito mais pronunciado do PTZ como EI (grupo PTZ sem choque).

F. ETAPA III

**EFEITO DO MIDAZOLAM NA EXPRESSÃO DO MEDO CONDICIONADO AO
ODOR E NA AQUISIÇÃO DO MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO**

F.1. Objetivo experimental

A realização deste grupo experimental teve por finalidade avaliar o efeito da injeção sistêmica de midazolam (MDZ) na dose de 0,5 mg/kg na expressão do medo condicionado de primeira ordem (odor de café) e observar um possível efeito sobre a aquisição do medo condicionado ao contexto (caixa de odor), através do teste EC1 e EC2.

F.2. Equipamentos e procedimentos

Da mesma forma que na etapa II, utilizou-se na aquisição do medo condicionado de primeira ordem a caixa de condicionamento e, na avaliação do medo condicionado de primeira e segunda ordem, a caixa de odor. O experimento compôs-se de 8 grupos experimentais subdivididos de acordo as variáveis: 1) tratamento 1 (salina ou PTZ; 30 min antes da sessão de condicionamento); 2) o número de choques (0 ou 3 choques elétricos nas patas; durante a sessão de condicionamento); e 3) tratamento 2 (salina ou MDZ; antes da sessão de teste EC1).

F.2.1. Protocolo experimental

No primeiro dia, os animais foram familiarizados à caixa de condicionamento por 5 minutos. Trinta minutos antes da sessão de condicionamento (dia 2) os animais receberam injeção intraperitoneal de salina ou PTZ (tratamento 1). O condicionamento foi conduzido utilizando nenhum ou 3 choques elétricos nas patas (0,4 mA/2s/ intervalo de 30s entre os disparos) na presença do odor de café (EC1), igualmente à etapa anterior. No terceiro dia, os animais foram familiarizados ao novo aparato, caixa de odor e, no dia 4, 30 minutos antes da

sessão de teste EC1, os animais foram injetados sistemicamente com salina ou MDZ (tratamento 2), sendo esta intervenção a única diferença com relação ao protocolo experimental da etapa anterior (E.2.3, figura 5). O protocolo experimental desta etapa III encontra-se ilustrado na figura 8.



Figura 8. Esquema do procedimento utilizado para a avaliação do efeito do MDZ (0,5 mg/kg) sobre a expressão do COM. Legenda: PTZ= pentilenotetrazol (15 mg/kg); MDZ= midazolam (0,5 mg/kg); EC1= estímulo condicionado 1; EC2= estímulo condicionado 2.

F.3. Resultados

Para os animais pareados sem choque, no teste EC1 a ANOVA detectou efeitos significativos do fator tratamento 1 {% de tempo de aproximação [F(3,60)=4,86; p<0,05] e % de tempo escondido [F(3,60)=9,18; p<0,01]} e do fator interação entre o tratamento 1 e tratamento 2 {% de tempo de aproximação [F(3,60)=6,79; p<0,05] e % de tempo escondido [F(3,60)=8,84; p<0,01]}. O teste *post hoc* de Duncan revelou diminuição significativa para a % de tempo de aproximação e aumento significativo para a % de tempo escondido nos grupos PTZ sem choque/salina e PTZ + 3 choques/salina comparados ao grupo salina/salina, reproduzindo os dados da etapa anterior. O teste de Duncan demonstrou também que o tratamento com MDZ foi capaz de aumentar significativamente a % de tempo de aproximação, elevando-a a níveis da sessão de familiarização (figura 9B e 9C), tanto nos grupos previamente pareados com PTZ sem choque como naqueles previamente pareados com PTZ + 3 choques, quando comparados aos animais que receberam salina como tratamento 2. O mesmo perfil de resposta defensiva foi visualizado com relação a % de tempo escondido, na qual os animais de ambos os grupos (PTZ sem choque e PTZ + 3 choques) reduziram significativamente esta porcentagem, assemelhando-se novamente ao perfil de respostas defensivas observadas na sessão de familiarização (figura 9B e 9C).

Para os animais pareados com 3 choques, no teste EC1 a ANOVA detectou efeitos significativos do fator tratamento 1 na % de tempo de aproximação [F(3,60)=4,66; p<0,05] e do fator interação entre o tratamento 1 e tratamento 2 [F(3,60)=9,45; p<0,01]. Com relação a % de tempo escondido, a ANOVA detectou apenas interação significativa dos fatores tratamento 1 e tratamento 2 [F(3,60)=13,93; p<0,01]. No entanto, o teste *post hoc* de Duncan revelou diminuição significativa para a % de tempo de aproximação e aumento significativo para a % de tempo escondido do grupo previamente tratado com PTZ (PTZ + 3 choques) em

comparação ao grupo previamente pareado com salina sem choque, reforçando os achados da etapa anterior (figura 6B e 6C). Com relação ao efeito do MDZ, o teste de Duncan demonstrou o mesmo efeito observado nos animais pareados apenas com PTZ, ou seja, aumento significativo na % de tempo de aproximação e redução significativa na % de tempo escondido.

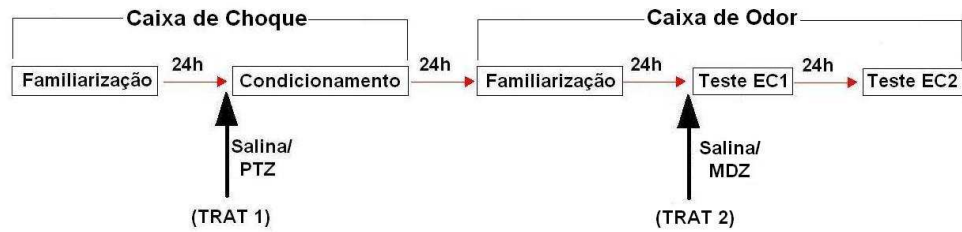
Para o teste EC2, naqueles animais pareados sem choque, a ANOVA detectou efeitos significativos apenas do fator tratamento 1 {% de tempo de aproximação [F(3,60)=4,41; $p<0,05$] e % de tempo escondido [F(3,60)=9,27; $p<0,01$]}. No entanto, naqueles animais previamente pareados com 3 choques, a ANOVA detectou apenas efeito significativo do fator interação entre tratamento 1 e tratamento 2 {% de tempo de aproximação [F(3,60)=7,08; $p<0,05$] e % de tempo escondido [F(3,60)=10,18; $p<0,01$]}. O teste *post hoc* de Duncan revelou neste grupo uma redução significativa na % de tempo de aproximação e aumento significativo na % de tempo escondido no grupo PTZ/salina. Com relação ao efeito do MDZ, o teste de Duncan detectou aumento significativo na % de tempo de aproximação e redução significativa na % de tempo escondido (figura 9B e 9C).

Com relação aos parâmetros de avaliação de risco (figura 10B e 10C), a ANOVA detectou efeito significativo no teste EC1 apenas do fator tratamento 2 {tempo relativo de avaliação de risco [F(3,60)=4,30, $p<0,05$]} naqueles animais previamente pareados com PTZ sem choque.

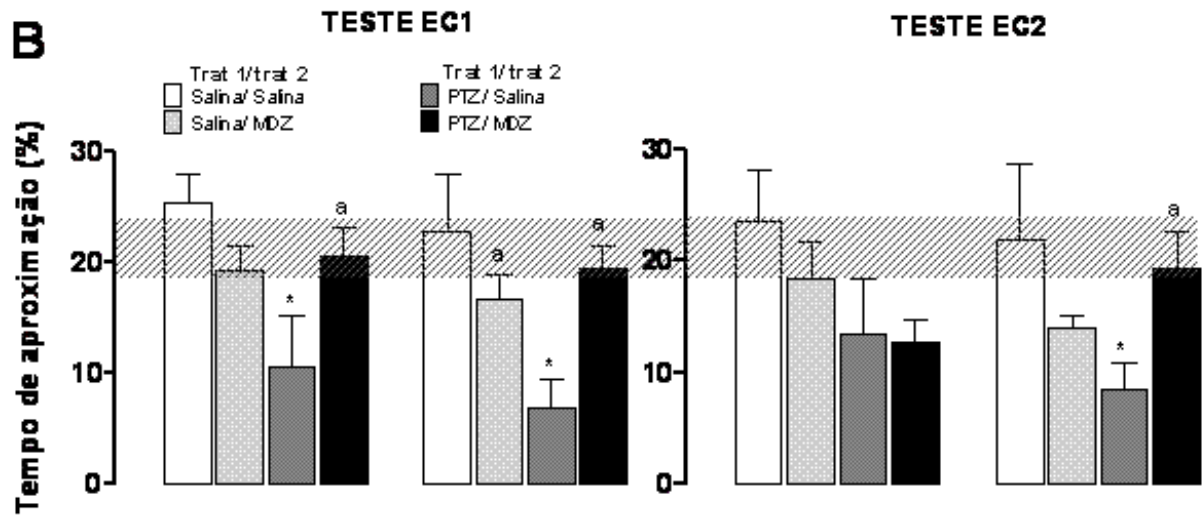
No teste EC1, a ANOVA demonstrou efeito significativo para o parâmetro de frequência de cruzamentos (tabela 2) no grupo pareado sem choque para os fatores tratamento 1 [F(3,60)=8,93; $p<0,05$], interação entre tratamento 1 e tratamento 2 [F(3,60)=5,042 $p<0,05$]. O teste de Duncan *a posteriori* demonstrou diminuição significativa neste parâmetro do grupo PTZ/salina quando comparado ao grupo/salina. Com relação ao efeito do MDZ, observou-se uma tendência ($p=0,053$) ao aumento do grupo que recebeu MDZ como tratamento 2, em

comparação ao salina. No teste EC2, para este mesmo grupo sem choque, a ANOVA detectou diferença estatística apenas do fator tratamento 1 [$F(3,60)=6,42$; $p<0,05$]. Com relação aos animais que receberam 3 choques, a ANOVA detectou, para o teste EC1, efeito significativo do fator interação entre o tratamento 1 e tratamento 2 [$F(3,60)=6,31$; $p<0,05$]. O teste *post hoc* de Duncan revelou diminuição na frequência de cruzamentos do grupo PTZ/salina em comparação ao grupo salina/salina. Com relação ao efeito do MDZ, houve um aumento significativo na frequência de cruzamentos entre os animais que receberam MDZ como tratamento 2, comparados aos que receberam salina. No teste EC2, para o mesmo grupo que recebeu 3 choques, a ANOVA também detectou interação entre os tratamentos [$F(3,60)=9,78$; $p<0,01$]. O teste *post hoc* de Duncan demonstrou as mesmas diferenças estatísticas visualizadas no teste EC1.

A



B



C

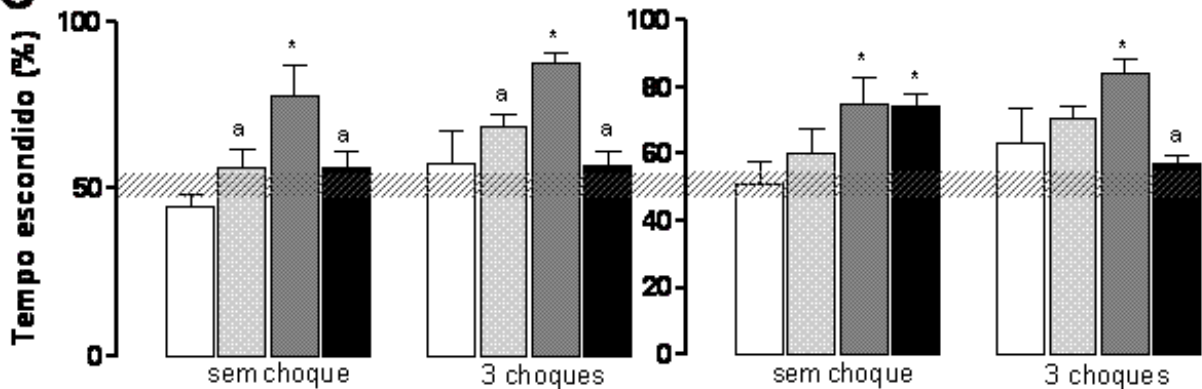


Figura 9. Efeito do MDZ (0,5 mg/kg) na expressão do medo condicionado nas sessões de teste EC1 e teste EC2 através dos parâmetros de (B) % de tempo de aproximação e (C) % de tempo escondido. Previamente ao trat. 2, no Dia 2, os animais foram tratados intraperitonealmente com salina ou PTZ (15 mg/kg) antes da sessão de condicionamento, na qual receberam, de maneira combinada, 0 ou 3 choques elétricos nas patas na presença do odor de café (EC1). O protocolo experimental utilizado encontra-se ilustrado em (A). A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média ± e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo salina/salina; ^a $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo PTZ/salina. Legenda: PTZ= pentilenotetrazol; MDZ= midazolam; EC1= estímulo condicionado 1; EC2= estímulo condicionado 2. n= 5-13.

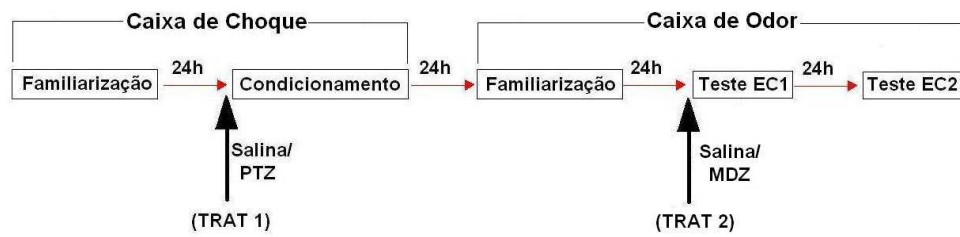
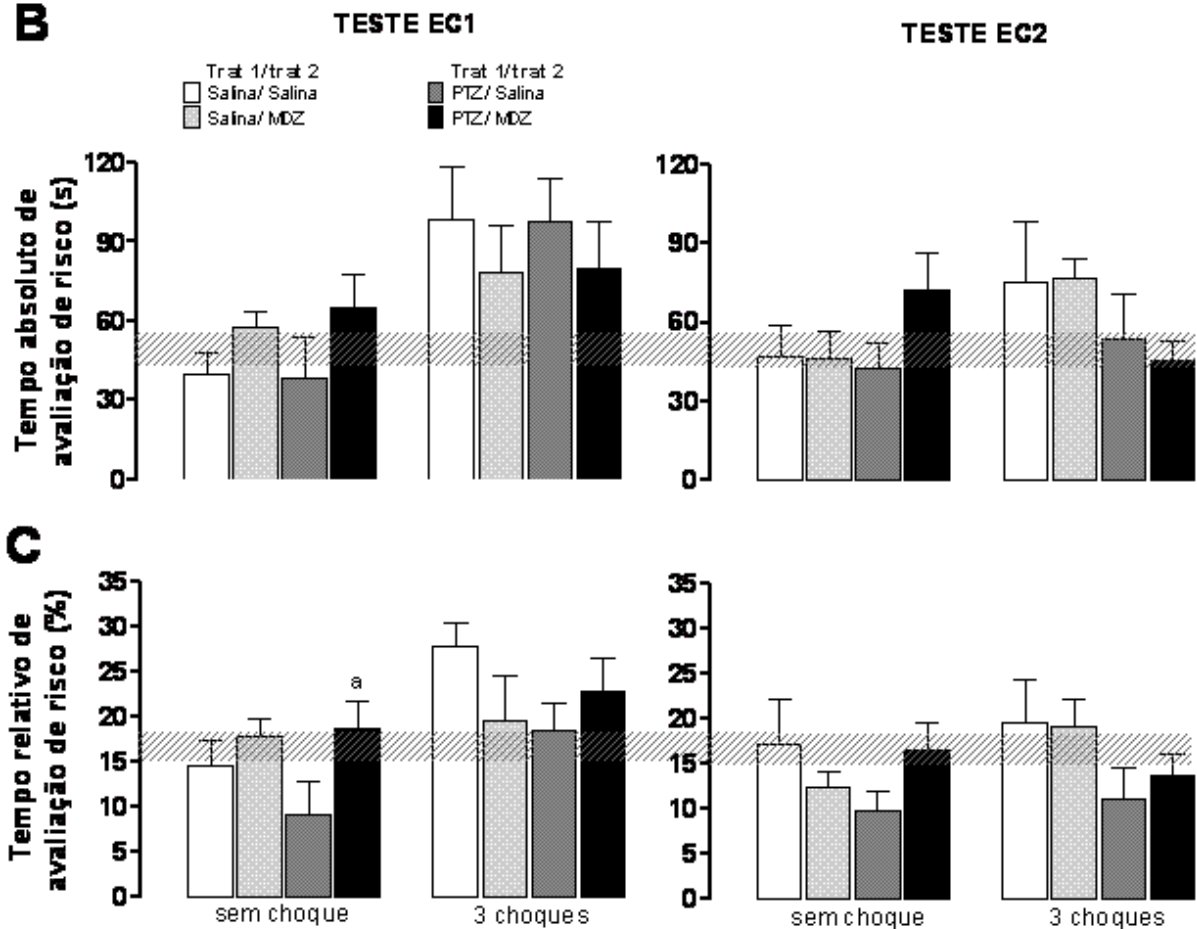
A**B**

Figura 10. Efeito do MDZ (0,5 mg/kg) na expressão do medo condicionado nas sessões de teste EC1 e teste EC2 através dos parâmetros de (B) tempo absoluto de avaliação de risco e (C) tempo relativo de avaliação de risco. Previamente ao trat. 2, no Dia 2, os animais foram tratados intraperitonealmente com salina ou PTZ (15 mg/kg) antes da sessão de condicionamento, na qual receberam, de maneira combinada, 0 ou 3 choques elétricos nas patas na presença do odor de café (EC1). O protocolo experimental utilizado encontra-se ilustrado em (A). A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. a $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo PTZ/salina. Legenda: PTZ= pentilenotetrazol; MDZ= midazolam; EC1= estímulo condicionado 1; EC2= estímulo condicionado 2. n= 5-13.

Tabela 2. Efeito do MDZ (0,5 mg/kg) na expressão do medo condicionado, através da frequência de cruzamentos, nas sessões familiarização, teste EC1 e teste EC2. Previamente ao trat. 2, no Dia 2, os animais foram tratados intraperitonealmente com salina ou PTZ (15 mg/kg) antes da sessão de condicionamento, na qual receberam, de maneira combinada, 0 ou 3 choques elétricos nas patas na presença do odor de café (EC1). Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo salina/salina; a $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo PTZ/salina; *ta* $0,05 < p < 0,10$ comparado ao respectivo grupo PTZ/salina. n= 5-13.

Grupos experimentais	Familiarização	Teste EC1	Teste EC2
Salina sem choque / salina	22,2 \pm 2,0	22,2 \pm 2,2	18,8 \pm 2,3
Salina sem choque / MDZ	21,2 \pm 1,4	18,7 \pm 1,7	16,9 \pm 2,0
PTZ sem choque / Salina	15,0 \pm 1,5 (*)	11,0 \pm 3,7(*)	11,6 \pm 2,7 (*)
PTZ sem choque / MDZ	16,8 \pm 1,4	17,1 \pm 1,4 (<i>ta</i>)	12,8 \pm 1,7
Salina + 3 choques / salina	18,4 \pm 2,5	17,2 \pm 3,5	16,0 \pm 2,9
Salina + 3 choques / MDZ	14,4 \pm 0,9	14,9 \pm 1,5	13,9 \pm 1,2
PTZ + 3 choques / Salina	18,0 \pm 1,9	10,4 \pm 2,3(*)	9,0 \pm 2,2 (*)
PTZ + 3 choques / MDZ	18,3 \pm 2,7	19,0 \pm 1,6 (a)	19,1 \pm 1,9 (a)

Legenda: PTZ= pentilenotetrazol; MDZ= midazolam; EC1= estímulo condicionado 1; EC2= estímulo condicionado 2.

F.4. Discussão

Considerando o envolvimento do sistema GABAérgico, em especial dos receptores GABA_A, nos transtornos de ansiedade e nos processos de memória e aprendizado, a etapa subsequente do presente estudo avaliou o papel do benzodiazepínico MDZ sobre a expressão do COM (condicionamento de primeira ordem) e aquisição do condicionamento contextual de medo (condicionamento de segunda ordem). Assim, observou-se principalmente através dos parâmetros de tempo de aproximação e tempo escondido que o COM utilizando como EIs PTZ sem choque ou PTZ associado aos 3 choques nas patas (etapa II) possui reprodutibilidade, uma vez que foi capaz de alterar significativamente os parâmetros avaliados também neste experimento (figura 9B e 9C). Diante disso, investigou-se o efeito do MDZ na expressão da resposta defensiva condicionada de primeira ordem (exposição ao odor de café – teste EC1) e na aquisição do medo condicionado de segunda ordem (re-exposição à caixa de odor (contexto), sem odor – teste EC2). Os resultados da etapa III demonstram, portanto, que os animais tratados com MDZ que receberam apenas PTZ como EI apresentaram uma redução da porcentagem de tempo escondido apenas na sessão de teste EC1, enquanto que os animais condicionados com PTZ associados aos 3 choques elétricos nas patas a redução/reversão nas respostas defensivas foi observada tanto no teste EC1 como no teste EC2 (figura 9). Com estes resultados sugere-se que a redução da resposta comportamental defensiva observada no teste EC1 trata-se de um efeito tipo ansiolítico clássico, causada justamente por ter sido administrado MDZ minutos antes desta sessão de teste. Esses resultados corroboram dados da literatura que demonstram que outras respostas condicionadas, como o comportamento de imobilidade e o sobressalto potencializado pelo medo, também são afetadas pela administração de MDZ antes do teste (SANTOS et. al., 2005).

Os resultados do teste EC2 permitem inferir que há diferenças na aquisição do condicionamento Pavloviano de medo quando se utiliza diferentes EIs. Conforme já elencado pode-se observar, através dos resultados obtidos na sessão de teste EC2, o efeito do MDZ na aquisição do condicionamento de segunda ordem (EC2), a qual ocorre durante o teste EC1 (justamente pela re-exposição ao odor de café (EC1), que neste momento já adquiriu caráter aversivo). Dessa maneira, observou-se que o efeito do MDZ sobre a aquisição da memória aversiva nos animais pareados ao odor com PTZ + 3 choques foi diferente daquela exibida por aqueles animais pareados apenas com PTZ como EI. Assim, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a ação do MDZ no condicionamento contextual de segunda ordem está mais relacionada a um prejuízo na formação da memória, ao invés de um efeito puramente ansiolítico do benzodiazepínico. Corroborando com esta hipótese, alguns estudos têm demonstrado a ação dos benzodiazepínicos nos processos de aprendizado e memória. Jensen e colaboradores (1979) demonstraram que a administração intraperitoneal de flurazepam, imediatamente após o treino de esquiva inibitória, foi capaz de gerar prejuízos nos processos de memória. Fanselow & Helmstetter (1988) demonstraram que a administração sistêmica de MDZ ou clordiazepóxido pré-treino e/ou pré-teste atenuaram a resposta de congelamento contextual associado ao choque elétrico nas patas. Quando injetado na amígdala, previamente ao treino de esquiva passiva, o MDZ prejudicou o aprendizado (DICKINSON-ANSON & MCGAUGH, 1993). Da mesma forma, num modelo celular de aprendizado e memória, a administração de MDZ conseguiu inibir seletivamente a LTP (long-term potentiation) (EVANS & VIOLA-MCCABE, 1996). Estas evidências indicam que os déficits causados pelos benzodiazepínicos nos processos mnemônicos são devido às influências propriamente nos processos de memória (DECKER et. al., 1990; MCNAMARA & SKELTON, 1991) e não à sedação, estados de dependência ou efeitos motores (CAHILL et. al., 1986; MCNAMARA & SKELTON, 1991; 1993). Entretanto, o condicionamento de

medo parece envolver além dos processos relacionados à memória, processos emocionais (MAREN, 2001), principalmente por encontra-se na interface entre memória e emoção. Dessa forma, Scaife e colaboradores (2005) sugerem ainda que, dentre os possíveis mecanismos responsáveis pelo prejuízo causado pelo MDZ na formação da memória associativa EI-EC estariam a atenção reduzida ao EC durante as sessões de pareamento e a diminuição do caráter aversivo do EI. Porém, no presente trabalho, a associação aversiva em questão diz respeito ao segundo condicionamento (EC1-EC2), que se estabelece sem a ocorrência de choques elétricos nas patas, apenas pela re-exposição ao EC1 aversivo na caixa de odor. Ainda, com relação à possibilidade da diminuição do caráter aversivo do EI, o odor de café, que neste condicionamento de segunda ordem está atuando como EI, poderia não estar sendo um estímulo proeminente devido a uma possível atuação sedativa do MDZ. Entretanto, durante a execução experimental não foi percebido qualquer indício de sedação nos animais. Além disso, a tabela 2 corrobora com esta hipótese, demonstrando a mesma atividade, ou ainda uma tendência ao aumento, na frequência de cruzamentos entre os grupos controles e tratados com MDZ na sessão de teste EC1, descartando então qualquer hipótese de um efeito sedativo do MDZ. Por sua vez, o MDZ poderia estar produzindo atenção reduzida ao EC1 impedindo o estabelecimento do condicionamento de segunda ordem. Contudo, esta possibilidade torna-se improvável ao se observar que a associação EC1-EC2 estabeleceu-se efetivamente no grupo PTZ + 3 choques/MDZ (figura 9, teste EC2). Assim, este conjunto de dados permite a sugestão de que o efeito do MDZ visualizado no teste EC1 (em ambos os grupos: PTZ *sem choque*/ MDZ e PTZ + 3 *choques*/ MDZ) seja um efeito tipo ansiolítico clássico pela potencialização da atividade GABAérgica. Já o efeito dual do MDZ, observado na sessão de teste EC2 entre os grupos sem choque (PTZ *sem choque*/ MDZ) e 3 choques (PTZ + 3 choques/MDZ) estaria, de fato, mais relacionado aos efeitos nos processos de memória deste benzodiazepínico.

O sistema olfatório é decisivo no controle do comportamento (SLOTNICK, 2001), sendo que a administração de MDZ tem pressuposto diferentes ações com relação aos processos de aquisição e expressão da memória aversiva de diferentes naturezas sensoriais. Kroon & Carobrez (2009) demonstraram que o MDZ (0,5 mg/kg) foi capaz de interferir na aquisição da associação olfatória aversiva (EC-EI) e na consolidação desta memória aversiva. Em contrapartida, Harris & Westbrook (1999) demonstraram, através do comportamento condicionado de imobilidade, que o MDZ não prejudica diretamente o processo de aquisição do condicionamento auditório de medo, mas regula quando e onde o medo é expresso. No presente trabalho, o efeito do MDZ nos processos mnemônicos parece estar prejudicando o processo de aquisição da segunda associação aversiva (EC1-EC2) apenas no grupo que recebeu, na sessão de condicionamento (dia 2), PTZ + 3 choques elétricos nas patas (figura 9). Assim, sugere-se como explicação deste efeito, o conflito entre a atuação ansiolítica clássica do MDZ durante a sessão de teste EC1 e a elevada aversividade motivacional adquirida pelo EC1 aversivo na mesma sessão de teste. Neste caso, esta elevada aversividade motivacional deve-se a ação sinérgica dos dois EIs: PTZ (antagonismo seletivo GABA_A – efeito ansiogênico) e 3 choques elétricos nas patas (ação sistêmica de ainda outros sistemas de neurotransmissão – estímulo nociceptivo aversivo). Portanto, pode-se sugerir que esta elevada situação de conflito acabe resultando numa atenção reduzida dos animais ao contexto (EC2), de modo a prejudicar a aquisição da segunda associação (EC1-EC2). Sobre essa mesma óptica, os animais previamente condicionados ao odor de café apenas com o efeito ansiogênico advindo da administração de PTZ não sofreriam este conflito de maneira tão intensa, culminando na efetiva aquisição do segundo condicionamento de medo por não reduzir a atenção ao contexto (EC2). Dessa forma, sugere-se que o efeito do MDZ sob o condicionamento de segunda ordem depende da força com que o primeiro condicionamento de medo se estabeleceu. Contudo, pode-se concluir com os resultados desta etapa

experimental que o MDZ exerceu efeitos ansiolíticos significativos, o qual pôde ser observado na sessão de teste EC1 em ambos os grupos teste (PTZ sem choque/ MDZ e PTZ + 3 choques/MDZ). Porém, o efeito deste benzodiazepínico na aquisição do condicionamento contextual de medo de segunda ordem parece possuir um caráter mais voltado aos processos de memória, uma vez que apresentou diferentes efeitos de acordo com a força que o condicionamento de medo de primeira ordem se estabeleceu.

G. CONSIDERAÇÕES FINAIS

G.1. Sumário dos principais resultados

Os resultados obtidos do presente trabalho permitem destacar as seguintes evidências:

- A injeção sistêmica de PTZ na dose de 15 mg/kg, associada à 3 choques elétricos nas patas foi eficaz em transformar um estímulo olfatório neutro (odor de café) em estímulo condicionado (EC1). Este estímulo condicionado provocou a expressão de uma resposta emocional condicionada;
- A injeção sistêmica de PTZ na dose de 15 mg/kg, antes da sessão de condicionamento, agiu como EI sendo capaz de promover aquisição e expressão de respostas condicionadas de medo frente ao EC1 (odor de café) e ao EC2 (contexto);
- A injeção sistêmica de PTZ associada à 3 choques elétricos nas patas, antes da sessão de condicionamento, foi capaz de promover uma expressão de REC de medo mais robusta frente ao odor de café (EC1) e ao contexto (EC2) quando comparada ao grupo PTZ sem choque;
- O caráter aversivo adquirido pelo odor de café durante o pareamento com o(s) estímulo(s) incondicionado(s) foi/foram suficiente(s) para promover a associação entre o estímulo olfatório condicionado (EC1) e o ambiente (EC2) onde este foi re-exposto, propiciando um condicionamento olfatório de segunda ordem;
- A injeção sistêmica de MDZ, antes da sessão teste EC1, foi capaz de atenuar a expressão das respostas de medo frente ao odor de café (EC1) em ratos previamente condicionados ao odor de café através da associação do PTZ com 3 choques elétricos nas patas;
- A injeção sistêmica de MDZ, antes da sessão teste EC1, foi capaz de prejudicar a aquisição da memória da segunda associação aversiva em ratos previamente pareados

ao odor de café (EC1) com a associação dos estímulos (PTZ e 3 choques elétricos nas patas), mas não daqueles animais previamente pareados apenas com o estímulo ansiogênico (PTZ).

G.2. Conclusão

Com os resultados obtidos do presente trabalho evidenciou-se o efeito do PTZ, sozinho ou em associação a choques elétricos nas patas, como EI, através das REC exibidas em virtude do efetivo COM nas sessões de teste EC1 e teste EC2. Observou-se também, o efeito do MDZ na reversão destas respostas defensivas condicionadas ao odor (EC1) (expressão do condicionamento olfatório de medo de primeira ordem) e ao contexto (EC2) (aquisição do condicionamento de medo de segunda ordem), através dos prováveis efeitos, ansiolítico e mnemônico, deste benzodiazepínico observado nas sessões de teste EC1 e teste EC2, respectivamente. Com esses achados pôde-se perceber que a aquisição do COM é sensível a EIs de natureza interoceptiva, como o PTZ, e majoritariamente à associação de EIs interoceptiva e exteroceptiva (PTZ + 3 choques), culminando na ocorrência de um novo condicionamento durante a sessão de teste EC1. Além disso, pôde-se observar a reversão do COM através do efeito ansiolítico do MDZ na sessão de teste EC1 e mnemônico na sessão de teste EC2.

G.3. Aplicações e perspectivas

O presente trabalho permitiu avaliar a funcionalidade do COM. Uma das vantagens do modelo apresentado reside na possibilidade de se estudar o efeito de fármacos, compostos ou manipulações elétricas e/ou comportamentais dentro de uma amplitude variando desde efeitos ansiogênicos até efeitos ansiolíticos em um mesmo animal. Os tratamentos e/ou manipulações realizadas antes da sessão de condicionamento e da sessão de teste EC1 permitiriam essa aplicação.

Sob o ponto de vista dos processos de memória, a disposição das sessões ao longo do tempo, permite a realização de intervenções farmacológicas em momentos pontuais, dependendo do interesse particular em cada fase nos processos de memória (aquisição, consolidação e expressão), tanto no condicionamento de primeira quanto de segunda ordem. Neste trabalho, o efeito ansiogênico - gerado pela administração de PTZ promovendo o COM (condicionamento este potencializado ou não por choques elétricos nas patas) - conferiu ao modelo a característica intrínseca de estudar o fenômeno da *aquisição* do COM. Sob o mesmo enfoque, a injeção de um ansiolítico clássico (MDZ) antes da sessão de teste EC1, permitiu o estudo da *expressão* do condicionamento de primeira e segunda ordem, através das respostas condicionadas exibidas nas sessões de teste EC1 e EC2, respectivamente.

Conforme descrito por Kim & Jung (2006), o condicionamento Pavloviano de medo tem sido amplamente utilizado para o estudo das bases neuroanatômicas, celulares e moleculares do medo. No entanto, Morris & Bouton (2006) apontam que um dos parâmetros mais importantes no estudo do condicionamento estaria na magnitude do EI, de maneira a assumir que tal magnitude é determinante na taxa de aprendizado tanto de primeira (MORRIS & BOUTON, 2006) como de segunda ordem (GEWIRTZ & DAVIS, 2000). Assim, o presente trabalho evidenciou que, desde que se mantivesse a relevância biológica e/ou

emocional do EI, suas naturezas poderiam ser diferentes. Assim, percebeu-se que este modelo de COM se apresentou sensível a EI de natureza interoceptiva - administração de PTZ - e combinada - 3 choques elétricos nas patas (exteroceptiva) + PTZ (interoceptiva) - reforçando, neste último caso, a importância dos fatores intensidade e/ou quantidade de cada estímulo isolado na promoção do condicionamento.

Outra possível utilidade do paradigma utilizado é a do estudo do condicionamento de segunda ordem. Este condicionamento, em especial, ocorre quando há a associação de um estímulo neutro (neste caso, contexto) com outro estímulo que foi previamente pareado (neste caso, odor de café) com o EI (neste caso, efeito ansiogênico causado pelo PTZ em associação ou não aos 3 choques nas patas). Uma das vantagens deste paradigma experimental encontra-se na não necessidade de choques nas patas (EI) na aquisição do condicionamento. Além disso, o condicionamento de segunda ordem proporciona um estudo mais voltado aos acontecimentos cotidianos, pois memórias associativas de medo nem sempre envolvem a participação de EIs. De Houwer (2009) e Dicknson (2009) apontam que somente os modelos de formação associativa são capazes de explicar respostas não-rationais para experiências de associação, as quais se encontram diretamente relacionadas com os processos automáticos de aprendizado. Dessa forma, além da viabilidade de se estudar o condicionamento clássico, o paradigma experimental aqui empregado possibilita ainda o estudo do condicionamento de segunda ordem.

Desta forma, como perspectiva na tentativa de modular a ansiedade (causada pela administração de PTZ ou ainda gerada por outro sistema de neurotransmissão), poderiam ser explorados alguns caminhos:

- Estudar a inibição ou estimulação de *áreas específicas* envolvidas com o comportamento defensivo, verificando o papel dos *diferentes sistemas de*

neurotransmissão em cada momento do processo mnemônico (*aquisição, consolidação e expressão*) em ambas as ordens de condicionamento (*primeira e segunda*);

- Submeter os sujeitos a *estresse agudo* ou *crônico*, detectando possíveis diferenças no comportamento defensivo apresentado nas sessões de teste EC1 e EC2.
- E, com enfoque nas ordens de condicionamento que o paradigma proporciona o estudo, estudar diferenças entre eles (tipos de estratégias defensivas, selecionando parâmetros mais adequados para cada uma; diferentes naturezas sensoriais de cada ordem particularmente), através de intervenções anteriores e posteriores ao teste EC1 e anteriores ao teste EC2.

REFEFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORAPANTH, P.; NADER, K.; LEDOUX, J.E. Lesions of periaqueductal gray dissociate-conditioned freezing from conditioned suppression behavior in rats. **Learn Mem.** Sep-Oct;6(5): 491-9, 1999.

ANZINI, C. **Participação da substância cinzenta periaqueductal dorso-lateral na modulação do efeito ansiogênico do pentilenotetrazol de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado.** (Dissertação de mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.

BABBINI, M.; DAVIS, W.M. Time-dose relationships for locomotor activity effects of morphine after acute or repeated treatment. **Br J Pharmacol.** Oct;46(2): 213-24, 1972.

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.

BALDI, E.; LORENZINI, C.A.; BUCHERELLI C. Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. **Neurobiol Learn Mem.** May;81(3): 162-6, 2004.

BARDO, M. T. On the Nature of the Intra-Administration Unconditioned Stimulus: Comment on McDonald and Siegel (2004) **Experimental and Clinical Psychopharmacology** 12(1): 12–14, 2004.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD R.J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **J Comp Physiol Psychol.** 81: 281-90, 1972.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; GRIEBEL, G. Defensive responses to predator threat in the rat and mouse. **Curr Protoc Neurosci.** Feb 8: 8.19, 2005.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Crouching as an index of fear. **J Comp Physiol Psychol.** 67:370 –375, 1969.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Defensive reactions in the albino rat. **Learn Motivation** 21: 351-62, 1971.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli **J Comp Physiol Psychol.** May; 68(1): 129-35, 1969.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Editors, **An ethoexperimental analysis of defense, fear and anxiety**. Anxiety, Otago University Press, Dunedin, pp. 124–133, 1990 In: Mcnaughton N., Andrews G., A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci Biobehav Rev.** May;28(3):285-305, 2004.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D.C. In: BRAIN, P.F.; PARMIGIANI, S; BLANCHARD R.J.; MAINARDI, D. (Editors). **Anti-predator defense as models of animal fear and anxiety Defence**, Harwood Academic Publishers, Chur, p. 89-108, 1990.

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.

BOLLES R.C., COLLIER A.C. The effect of predictive cues on freezing in rats. **Anim Learn Behav.** 4: 6–8, 1976.

BORSINI, F.; PODHORNA, J.; MARAZZITI, D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? **Psychopharmacology (Berl)**. Sep; 163(2): 121-41, 2002.

BOSSERT, J. M.; SHAHAM, Y. Drug Onset Cues, Conditioned Withdrawal, and Drug Relapse: Comment on McDonald and Siegel (2004) **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, 12(1): 15–17, 2004.

BOUTON, M. E. A General Role for Early Onset Cues and Intra-Event Learning: Comment on McDonald and Siegel (2004) **Experimental and Clinical Psychopharmacology** 12(1): 18–19, 2004.

BOWERY, N.G.; HILL, D.R.; HUDSON, A.L.; DOBLE. A.; MIDDLEMISS, D.N.; SHAW, J.; TURNBULL, M.J. (-) Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by action at a novel receptor. **Nature** 283:92, 1980.

BRAIDA D.; GORI, E.; SALA, M. Relationship between morphine and etonitazene-induced working memory impairment and analgesia. **Eur J Pharmacol.** Dec;27 271(2-3): 497-504, 1994.

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

CAHILL, L.; BRIONI, J.; IZQUIERDO I., Retrograde memory enhancement by diazepam: Its relation to anterograde amnesia, and some clinical implications, **Psychopharmacology** 90: 554–556, 1986.

CANTERAS, N.S.; KROON, J.A.; DO-MONTE, F.H.; PAVESI, E.; CAROBREZ, A.P. Sensing danger through the olfactory system: The role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. **Neurosci Biobehav Rev.** 32(7): 1228-35, 2008.

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

CANTERAS, N. S.; BLANCHARD, D. C. A behavioral and neural systems comparison of unconditioned and conditioned defensive behavior. In R. J. Blanchard, D. C. Blanchard, G. Griebel, & D. Nutt (Eds.), **Handbook of anxiety and fear** (pp. 141–153). Elsevier., 2008.

CAREY, R. J.; GUI, J. Cocaine conditioning and cocaine sensitization: what is the relationship? **Behavioural Brain Research** 92: 67–76, 1998.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev.** 29(8): 1193-205, 2005.

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** 165: 77–85, 2002.

CASTILHO, V.M.; BRANDÃO, M.L. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT_{2A} receptors in rats. **Psychopharmacology** 155: 154–162, 2001.

CHAPOUTHIER, G.; VENAULT P. GABA-A receptor complex and memory processes. **Curr Top Med Chem.** Aug;2(8): 841-51, 2002.

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.

CHEBIB, M.; JOHNSTON, G.A.R. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 26:937-940, 1999.

COLLIER, A.C.; BOLLES, R.C. The ontogenesis of defensive reactions to shock in preweanling rats. **Dev Psychobiol**. Mar; 13(2): 141-50, 1980.

CORDA, M.G.; ORLANDI, M.; LECCA, D.; GIORGI, O. Decrease in GABAergic function induced by pentylenetetrazol kindling in rats: antagonism by MK-801. **J Pharmacol Exp Ther** 262(2): 792-800, 1992.

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

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 HOUWER, J. What are association formation models good for? **Learn Behav**. Feb;37(1):25-6, 2009.

DECKER, M.W.; TRAN, T.; MCGAUGH, J.L. A comparison of the effects of scopolamine and diazepam on acquisition and retention of inhibitory avoidance in mice, **Psychopharmacology** 100: 515-521, 1990.

DE-SOUZA, M.M.; SCHENBERG, L.C.; CAROBREZ, A.P. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxioselective drug effects on plus-maze performance. **Behav Brain Res** 90: 157-165, 1997.

DESY, E.A.; BATZLI, G.O.; LIU, J. Effects of food and predation on behavior of prairie voles—a field experiment. **Oikos** 58: 159-168, 1990.

DICKINSON, A. What are association formation models? **Learn Behav.** Feb;37(1):21-4, 2009.

DICKINSON-ANSON, H.; MCGAUGH, J.L. Midazolam administered into the amygdala impairs retention of an inhibitory avoidance task. **Behav. Neural Biol.** 60: 84–87, 1993.

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.

DOBLE A. New insights into the mechanism of action of hypnotics. **J Psychopharmacology** 13(1): 11-20, 1999.

DREW, C.A.; JOHNSTON, G.A.R.; WEATHERBY, R.P. Bicuculline-insensitive GABA receptors: studies on the binding (-) baclofen to rat cerebellar membranes. **Neurosci Lett** 52: 317-321, 1984.

DYKSTRA, L.A.; PRESTON, K.L.; BIGELOW, G.E. Discriminative stimulus and subjective effects of opioids with mu and kappa activity: data from laboratory animals and human subjects. **Psychopharmacology (Berl)**. Mar;130(1): 14-27, 1997.

EIKELBOOM, R.; STEWART, J. Conditioning of drug-induced physiological responses. **Psychol Rev.** Sep;89(5): 507-28, 1982.

EILAN, D. Die hard: A blend of freezing and fleeing as a dynamic defense—implications for the control of defensive behavior. **Neuroscience and biobehavioral reviews.** 29(8): 1181-91, 2005.

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

FANSELOW, M.S. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing **Pavlov J Biol Sci.** Oct-Dec;15(4): 177-82, 1980.

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

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

FILE, S.E.; LISTER, R.G. Do the reductions in social interaction produced by picrotoxin and pentylentetrazole indicate anxiogenic actions? **Neuropharmacology** 23(7A): 793-796, 1984.

FILE, S.E.; PELLOW, S. Does the benzodiazepine antagonist Ro 15-1788 reverse the action of picrotoxin and pentylentetrazole on social and exploratory behaviour? **Arch Int Pharmacodyn** 277(2): 272-279, 1985.

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.

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.

GARCIA, J.; HANKINS, W. G.; RUSINIAK, K. W. Behavioral regulation of the milieu interne in man and rat. **Science** Sep 6;185(4154): 824-31, 1974.

GEWIRTZ, J.C.; DAVIS, M. Using pavlovian higher-order conditioning paradigms to investigate the neural substrates of emotional learning and memory. **Learn Mem.** Sep-Oct;7(5): 257-66, 2000.

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

HAEFELY, W. Endogenous ligands of the benzodiazepine receptor **Pharmacopsychiatry.** Jan;21(1): 43-6, 1988.

HARRIS, J.A.; WESTBROOK, R.F. The benzodiazepine midazolam does not impair Pavlovian fear conditioning but regulates when and where fear is expressed. **J Exp Psychol Anim Behav Process.** Apr;25(2): 236-46, 1999.

HENDRIE, C.A.; WEISS, S.M. The development of an animal model of panic with predictive and face validity. In: Cooper, S.J., Hendrie, C.A. (Eds.), **Ethology and Psychopharmacology** 111–132, 1994.

HENDRIE, C.A.; WEISS, S.M.; EILAM, D. Behavioural response of wild rodents to the calls of an owl: a comparative study. **J. Zool.** 245: 439–446, 1998.

HERENDEEN, D.; ANDERSON, D.C. Dual effects of a second-order conditioned stimulus: Excitation and inhibition. **Psychon. Sci.** 13: 15–16, 1968.

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

HILL D.R.; BOWERY N.G. 3H-Baclofen and 3H-GABA bind bicuculline insensitive GABA_B sites in the rat brain. **Nature** 290: 149-52, 1981.

HOLLAND, P.C.; RESCORLA, R.A. Second-order conditioning with food unconditioned stimulus. **J. Comp. Physiol. Psychol.** 88: 459–467, 1975.

HUSSAINI, S.A.; KOMISCHKE, B.; MENZEL, R.; LACHNIT, H. Forward and backward second-order Pavlovian conditioning in honeybees. **Learn Mem.** Oct 1;14(10):678-83, 2007.

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.R.; VASQUEZ B.J.; MCGAUGH, J.L. Benzodiazepines alter acquisition and retention of an inhibitory avoidance response in mice. **Psychopharmacology** 64: 125–126, 1979.

JUNG, M.E.; DEPOORTERE, R.; OGLESBY, M.W. Use of negatively reinforcing electrical brain stimulation to detect conventional and nonconventional anxiolytics as well an anxiogenic drug. **Pharmacol Biochem Behav** 68: 33-42, 2001.

JUNG, M.E.; LAL, H.; GATCH, M.B. The discriminative stimulus effects of pentylentetrazol as a model of anxiety: recent developments. **Neurosci Biobehav Rev.** 26(4): 429-39, 2002.

KALIVAS, P.W.; STRIPLIN, C.D.; STEKETEE, J.D.; KLITENICK, M.A., DUFFY, P. Cellular mechanisms of behavioral sensitization to drugs of abuse. **Ann N Y Acad Sci.** Jun 28;654: 128-35, 1992.

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.

KORPI, E.R.; GRUNDNER, G.; LÜDDENS, H. Drug interaction at GABAA receptors. **Prog Neurobiol** 67: 113-159, 2002.

KROON, J.A.; CAROBREZ, A.P. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: Effects of midazolam, propranolol or scopolamine. **Neurobiol Learn Mem.** 91: 32-40, 2009.

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

LAL, H.; EMMETT-OGLESBY, M.W. Behavioral analogues of anxiety. Animal models. **Neuropharmacology.** Dec;22(12B): 1423-41, 1983.

LEDOUX, J. Fear and the brain: where have we been and where are we going? **Biol Psychiatry**, 44(12): 1229-1238, 1998.

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

LEDOUX, J.E. **Ledoux Laboratory.** Center for Neural Science. New York University. Disponível em: <www.cns.nyu.edu/ledoux/slide_show/Slide_show_age_of_terror.htm>. Acesso em: 09 janeiro 2009.

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

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

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

MCDONALD R.V.; SIEGEL S. Intra-Administration Associations and Withdrawal Symptoms: Morphine-Elicited Morphine Withdrawal. *Experimental and Clinical Psychopharmacology* 12(1): 3–11, 2004.

MCFARLAND, D. **Animal Behaviour: Psychobiology, Ethology and Evolution.** Longman Science & Technology, 1998.

MCGREGOR, I.S.; HARGREAVES, G.A.; APFELBACH, R.; HUNT, G.E. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. *J. Neurosci.* 24, 4134–4144, 2004.

MCKERNAN, R.M.; WHITING, P.J. Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosc* 19(4): 139-143, 1996.

MCNAMARA, R.K.; SKELTON, R.W. Benzodiazepine receptor antagonists flumazenil and CGS 8216 and inverse agonist β -CCM enhance spatial learning in the rat: Dissociation from anxiogenic actions, *Psychobiology* 21: 101–108, 1993.

MCNAMARA, R.K.; SKELTON, R.W. Diazepam impairs acquisition but not performance in the Morris water maze, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 38: 651–658, 1991.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev.* May;28(3):285-305, 2004.

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

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

MORRIS, R.W.; BOUTON, M.E. Effect of unconditioned stimulus magnitude on the emergence of conditioned responding. **J Exp Psychol Anim Behav Process.** Oct;32(4): 371-85, 2006.

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

NESSE, R.M. Natural selection and the regulation of defenses. A signal detection analysis of the smoke detector principle. **Evolution and Human Behavior** 26: 88–105, 2005.

OTTO, T.; COUSENS, G.; HERZOG, C. Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. **Behav. Brain Res.** 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.

PARKER, L.A. The role of nausea in taste avoidance learning in rats and shrews (review) **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical** 125: 34 – 41, 2006.

PASCHALL, G.Y.; DAVIS, M. Olfactory-mediated fear-potentiated startle. **Behav. Neurosci.** 116: 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 Meth** 14:149-167, 1985.

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

PONNUSAMY, R.; POULOS, A.M.; FANSELOW, M.S. Amygdala-dependent and amygdala independent pathways for contextual fear conditioning. **Neuroscience**. Jul 29;147(4): 919-27, 2007.

RAMZAN, I.M.; LEVY G. Kinetics of drug action in disease states. XIV. Effect of infusion rate on pentylentetrazol concentrations in serum, brain and cerebrospinal fluid of rats at onset of convulsions. **J Pharmacol Exp Ther**. Sep;234(3): 624-8, 1985.

RAU, V.; FANSELOW, M.S. Exposure to a stressor produces a long lasting enhancement of fear learning in rats. **Stress**. Jun 18:1, 2008.

RESCORLA, R.A. Second-order conditioning: Implications for theories of learning. In **Contemporary approaches to conditioning and learning** pp. 127–150, 1973.

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.; FAN M. Behavioral expression of learned fear in rats is appropriate to their age at training, not their age at testing. **Anim Learn Behav**. Nov;30(4): 394-404, 2002.

RICHARDSON, R.; VISHNEY, A.; LEE, J. Conditioned odor potentiation of startle in rats. **Behav. Neurosci.** 113: 787–794, 1999.

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

RIJNDERS H.J.; JÄRBE T.U.; SLANGEN J.L. The pentylentetrazole-cue antagonist actions of bretazenil (Ro 16-6028) as compared to midazolam. **Pharmacol Biochem Behav**. May;39(1): 129-32, 1991.

RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J.T.; COLE, J.C.; DEWA, C.V.; KIDD, G.R.; KIMPSON, P.H. Plus-maze retest profile: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade in mice. **Pharmacol Biochem Behav** 54: 41-50, 1996.

RODIN, E. Metrazol tolerance in a normal voluntser population; an investigation of the potential significance of abnormal findings. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol**. Aug;10(3): 433-46, 1958.

RODIN, E.A.; CALHOUN, H.D. Metrazol tolerance in a "normal" volunteer population. A ten year follow-up report. **J Nerv Ment Dis.** 150(6): 438-43, 1970.

RODRIGUES, S.M.; SCHAFE, G.E.; LEDOUX, J.E. Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. **J Neurosci.** Sep 1;21(17): 6889-96, 2001.

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

RUDOLPH, U.; CRESTANI, F.; MOHLER, H. GABA_A receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. **Trends Pharmacol Sci** 22: 188- 194, 2001.

RUDY, J.W.; PUGH, C.R. A comparison of contextual and generalized auditory-cue fear conditioning: evidence for similar memory processes. **Behav Neurosci.** Dec;110(6): 1299-308, 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.

SÁNCHEZ-AMATE, M.C.; DÁVILA, E.; CAÑADAS, F.; FLORES, P.; SÁNCHEZ-SANTED, F. Chlorpyrifos Shares Stimulus Properties with Pentylenetetrazol as Evaluated by an Operant Drug Discrimination Task **NeuroToxicology** 23: 795–803, 2002.

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

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 'fearpotentiation' 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.

SCHENBERG, L.C.; BITTENCOURT, A.S.; SUDRÉ, E.C.; VARGAS, L.C. Modeling panic attacks. **Neurosci Biobehav Rev.** Dec;25(7-8):647-59, 2001.

SCHWARZ-STEVENSON, K. S.; CUNNINGHAM, C. L. Pavlovian Conditioning of Heart Rate and Body Temperature With Morphine: Effects of CS Duration. **Behavioral Neuroscience** 107(6): 1039-1048, 1993.

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

SLOTNICK, B. Animal cognition and the rat olfactory system. **Trends Cogn Sci.** May 1;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.

STARZL, T.E.; NIEMER, W.T.; DELL, M.; FORGRAVE, P.R. Cortical and subcortical electrical activity in experimental seizures induced by metrazol. **J Neuropathol Exp Neurol.** Jul;12(3): 262-76, 1953.

STOCKHORST, U.; ENCK, P.; KLOSTERHALFEN, S. Role of classical conditioning in learning gastrointestinal Symptoms **World J Gastroenterol** July 7; 13(25): 3430-3437, 2007.

STUDY, R.E.; BARKER, J.L. Diazepam and (--)pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured central neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 789: 7180–7184, 1981.

SWANEY, W.T.; KEVERNE, E.B. The evolution of pheromonal communication. **Behav Brain Res.** Oct 11, 2008.

VIVIAN, J.A.; WEERTS, E.M.; MICZEK, K.A. Defeat engenders pentylene-tetrazole-appropriate responding in rats: antagonism by midazolam. **Psychopharmacology (Berl).** Dec;116(4): 491-8, 1994.

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.

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.

WHISHAW, I.Q.; DRINGENBERG, H.C. How does the rat (*Rattus norvegicus*) adjust food-carrying responses to the influences of distance, effort, predatory odor, food size, and food availability. **Psychobiology** 19: 251–261, 1991.

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.

YANG, Y.L.; SU, Y.W.; NG, M.C.; CHANG, C.L.; LU, K.T. Extract of *Ginkgo biloba* EGb 761 facilitates fear conditioning measured by fear-potentiated startle. **Neurosci Lett.** Jul 22-29;383(1-2): 145-50, 2005.

YAP, C.S.; RICHARDSON, R. The ontogeny of fear-potentiated startle: effects of earlier acquired fear memories **Behav Neurosci.** Oct;121(5): 1053-62, 2007.

YIN, H.; BARNET, R.C.; MILLER, R.R. Second-order conditioning and Pavlovian conditioned inhibition: Operational similarities and differences. **J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.** 20: 419–428, 1994.

ZANGROSSI Jr, H. Modelos Animais de Ansiedade In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Ansiedade e Transtornos de Ansiedade.** Editora Científica Nacional, Rio de Janeiro, 1997.

ZEIGLER, S.; LIPTON, J.; TOGA, A.; ELLISON, G. Continuous cocaine administration produces persisting changes in brain neurochemistry and behavior. **Brain Res.** Jun 21;552(1): 27-35, 1991.

ZHANG, X.M.; FIRESTEIN, S. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. **Nat. Neurosci.** 5, 124–133, 2002.

APÊNDICE I

Validação da dose ansiogênica de 15 mg/kg de pentilenotetrazol

Objetivo experimental

A realização deste experimento teve por finalidade confirmar o perfil ansiogênico do PTZ na dose de 15 mg/kg nas condições experimentais deste laboratório através do modelo do labirinto em cruz elevado.

Equipamentos e procedimentos

Labirinto em cruz elevado (LCE)

O aparato, posicionado a 50 cm do chão, consiste em dois braços abertos opostos (40 x 10 cm) e dois braços fechados com paredes (40 x 40 x 10 cm) que se encontram numa plataforma central (10 x 10 cm) conferindo-o a forma de cruz (Fig. 11). Os braços abertos são circundados por um anteparo de acrílico (1 cm) para evitar possíveis quedas dos animais.



Figura 11. Fotografia do aparato Labirinto em Cruz Elevado.

No teste LCE os ratos foram submetidos a duas sessões experimentais, identificadas como teste e re-teste. Ambas as sessões possuíam duração de 5 minutos e intervalo entre elas foi de 24 horas. O experimento foi realizado sob som atenuado e temperatura controlada (24 ± 1 °C).

O modelo encontrava-se localizado numa sala com luz amarela, cuja intensidade não ultrapassava 40 lux. Trinta minutos antes da sessão de teste, os animais foram injetados intraperitonealmente com salina ou PTZ na dose de 15 mg/Kg. O experimento foi registrado por um sistema de vídeo-câmera e ambas as sessões foram gravadas em DVD. Após a passagem de cada animal pelo aparato, o mesmo foi limpo com solução de etanol 10%.

As medidas comportamentais avaliadas no LCE foram:

- Freqüência de entradas dos animais com as quatro patas nos braços abertos e fechados do aparato;
- Tempo de permanência dos animais com as quatro patas nos braços abertos e fechados do labirinto;

Estas medidas tradicionais foram utilizadas para se calcular a porcentagem do número de entradas nos braços abertos em relação ao número total de entradas nos quatro braços (%EBA) e a porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA), durante os 5 minutos de cada exposição ao LCE. Registrou-se:

- Tempo de avaliação de risco (AR), representado no LCE, pelo tempo de tentativas de entradas aos braços abertos. Foram consideradas como tentativas o comportamento de estiramento do corpo a partir da plataforma central, com a colocação da cabeça e, pelo menos uma, duas ou três patas em um dos braços abertos com o retorno subsequente à posição original;
- Freqüência de entradas nos braços fechados (EBF), medida que representa atividade exploratória geral.

Resultados

A ANOVA detectou efeito significativo para o parâmetro %EBA para os fatores tratamento [F(1,13)=9,37, $p<0,01$], sessões teste e reteste [F(1,13)=11,42, $p<0,01$] e repetição [F(1,13)=11,39, $p<0,01$]. O teste *post hoc* de Duncan revelou neste parâmetro diminuição significativa ($p<0,01$) entre os grupos salina e PTZ na sessão de teste, mas não na sessão reteste e, diminuição significativa ($p<0,001$) entre as sessões de teste e re-teste para o grupo salina, mas não para o grupo PTZ (figura 12A).

Com relação a %TBA, a ANOVA detectou efeito significativo ($p<0,01$) para os fatores tratamento [F(1,13)=9,66], sessões teste e reteste [F(1,13)=15,82] e repetição [F(1,13)=15,53]. O teste *post hoc* Duncan apontou diminuição significativa entre os grupos salina e PTZ na sessão de teste ($p<0,01$), mas não na sessão re-teste ($p=0,67$) e, diminuição significativa entre as sessões de teste e re-teste para o grupo salina ($p<0,001$), mas não para o grupo PTZ ($p=0,98$) (figura 12B).

Para o parâmetro EBF, foi detectado efeito significativo entre as sessões teste e reteste [F(1,13)=7,605, $p<0,05$], mas não para o fator tratamento [F(1,13)=0,935, $p>0,1$] e nem para o fator repetição [F(1,13)=0,810, $p>0,1$]. O teste Duncan *post-hoc* demonstrou aumento significativo entre a sessão de teste e re-teste para os animais previamente tratados com PTZ (figura 12D).

Nenhuma diferença foi observada no parâmetro AR com relação ao tratamento, sessões e repetição [F(1,13)=0,079, $p>0,1$; F(1,13)=0,095, $p>0,1$; F(1,13)=2,014, $p>0,1$] (figura 12C).

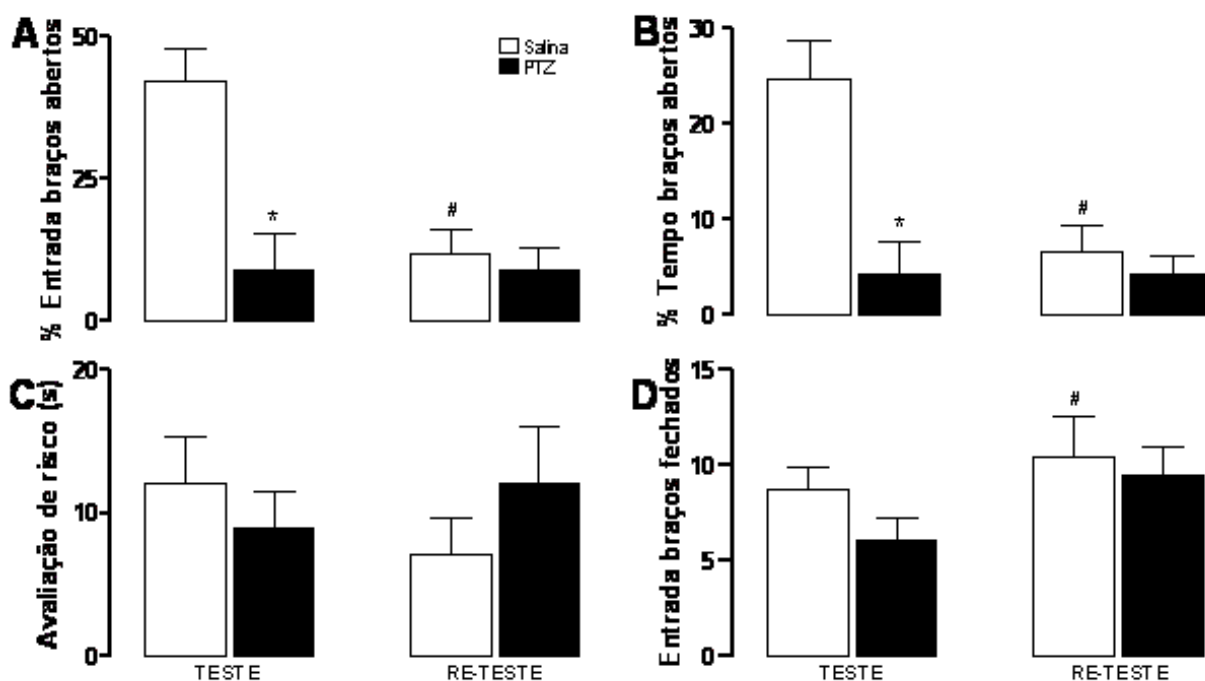


Figura 12. Caracterização da atividade do PTZ (15 mg/kg), através dos parâmetros (A) % de entrada nos braços abertos (%EBA), (B) % de tempo nos braços abertos (%TBA), (C) avaliação de risco (AR) e (D) entrada nos braços fechados (EBF) do LCE nas sessões de teste e re-teste. O tratamento salina/PTZ foi administrado intraperitonealmente 30 minutos antes da sessão de teste. Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. * $p < 0,01$ comparado ao grupo salina; # $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo grupo na sessão teste. Legenda: PTZ= pentilenotetrazol.

Discussão

O LCE tem sido um dos modelos animais mais frequentemente utilizados para a caracterização do perfil ansioseletivo de drogas (PELLOW et. al., 1985; CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005). Conforme sustentado pela literatura, a diminuição significativa no número de entradas (%EBA) e na porcentagem de tempo despendido nos braços abertos (%TBA) do aparato, em comparação ao grupo controle, é responsável por caracterizar um perfil tipo ansiogênico em roedores (PELLOW et. al., 1985).

O PTZ apesar de ter propriedades convulsivantes dose-dependente, este apresenta também, em doses subconvulsivantes, propriedades ansiogênicas em numa variedade de modelos animais (LAL & EMMETT-OLGLESBY, 1983; FILE & LISTER, 1984; FILE & PELLOW, 1985; PELLOW et. al., 1985; CORDA et. al., 1992; DE SOUZA et. al., 1997;

JUNG et. al., 2001; 2002). Com este propósito e para confirmar, nas condições experimentais deste laboratório, o perfil tipo ansiogênico do PTZ na dose subconvulsivante de 15 mg/kg, empregou-se o teste do LCE.

Embora neste trabalho a quantificação dos dados no LCE tenha optado pela análise do tempo corrido e total em ambas as sessões (teste e re-teste), tal perfil ansiogênico pode ser detectado pontualmente quando se adota a análise do comportamento monitorando-o minuto a minuto. Bertoglio e Carobrez (2005) demonstram que, enquanto o perfil tipo ansiolítico (midazolam 0,25 mg/kg i.p) é detectado nos três últimos minutos da sessão de teste, o perfil ansiogênico (PTZ 30 mg/kg i.p) é observado através do comportamento exibido nos dois minutos iniciais da sessão desta sessão.

Em consonância com a literatura, os resultados obtidos neste experimento piloto confirmam o perfil tipo ansiogênico do PTZ, permitindo a sua utilização nas etapas I, II e III deste trabalho. Tal perfil pôde ser visualizado através da diminuição significativa nos parâmetros %EBA (figura 12A) e %TBA (figura 12B) comparados ao grupo salina na sessão de teste. Nesta mesma sessão, o parâmetro de número de entradas nos braços fechados (EBF) (figura 12D) não apresentou diferenças significativas entre o grupo tratado e o controle, garantindo que o tratamento com PTZ nesta dose não exerce efeito significativo na atividade locomotora dos animais.

Um perfil comportamental já descrito por Carobrez & Bertoglio (2005) foi observado no dia seguinte, na sessão de re-teste. Conforme por eles elencado e discutido, na sessão de re-teste observa-se que a exposição prévia ao modelo (sessão de teste) acarreta mudanças duradouras nas respostas comportamentais, as quais podem ser observadas exatamente nessa sessão de re-teste. Dessa forma, quando não há nenhuma intervenção farmacológica *a priori* ou *a posteriori* da sessão de teste, os animais controles passam a esquivar-se dos braços abertos na sessão de re-teste. Tal alteração comportamental se deve a memória previamente

adquirida, consolidada e, nesta re-exposição ao LCE, evocada, acerca desta área majoritariamente aversiva do aparato. Assim, a esquiava aos braços abertos do LCE foi capaz de diminuir significativamente os parâmetros de %EBA e %TBA (figura 12A e 12B, respectivamente) na sessão de re-teste. De maneira similar, os animais injetados antes da sessão de teste com PTZ, apenas mantiveram, na sessão de re-teste, o mesmo perfil comportamental observado na primeira sessão (esquiava aos braços abertos) (figura 12A e 12B). Este efeito não se deve, no entanto, a ação farmacológica do efeito tipo ansiogênico causado pelo PTZ na sessão de teste, mas trata-se da expressão da memória aversiva aos braços abertos, previamente adquirida e consolidada na sessão de teste. Uma das possíveis explicações para este efeito pode ser devido redução da atividade GABAérgica, proporcionada pela administração de PTZ, aumentando os processos de memória (CHAPOUTHIER & VENAULT, 2002).

A atividade locomotora manteve-se sem nenhuma alteração significativa entre os grupos controle e PTZ também na sessão de re-teste. Observou-se, no entanto, um aumento significativo no número de entrada nos braços fechados (EBF) do grupo PTZ entre as sessões teste e re-teste (figura 12D). É possível que esse aumento se deva ao fato dos animais não encontrarem-se mais sob o efeito tipo ansiogênico causado pela administração sistêmica de PTZ, o que os levou a explorarem mais o aparato na sessão de re-teste, porém mantendo a esquiava aos braços abertos.

Embora diferente do esperado, o PTZ não apresentou diferença significativa comparado ao grupo salina no parâmetro AR (figura 12C) em ambas as sessões de teste. Porém, por ser este um parâmetro complementar do modelo LCE, o qual acaba assumindo maior relevância quando sensibilizado em concomitância com o %TBA, esse resultado não afetou diretamente a caracterização do perfil ansiosetivo do PTZ.

APÊNDICE II

Validação do odor de café como estímulo olfatório neutro

Objetivo experimental

Este experimento foi delineado com o objetivo de analisar se o estímulo olfatório selecionado, odor de café, não possui natureza aversiva *per se*, em ratos Wistar *naive*, nas condições experimentais deste laboratório.

Protocolo Experimental

Para a validação do odor de café como estímulo olfatório neutro, procedeu-se com 2 grupos (figura 13): *grupo 1*: primeira exposição ao odor de café no dia 2 e re-exposição ao odor no dia 4 e, *grupo 2*: primeira (e única) exposição ao café no dia 4. Ambos receberam, 30 minutos antes da sessão do dia 2, injeção sistêmica de salina, com o intuito de descartar a emissão de comportamentos defensivos devido exclusivamente à manipulação e/ou injeção nos animais.

No primeiro dia, tanto os animais do grupo 1 como do grupo 2 foram familiarizados à caixa de condicionamento durante 5 minutos (sem odor de café). No dia 2, os sujeitos do grupo 1 foram expostos pela primeira vez ao odor de café (15 g) na caixa de condicionamento, por 2,5 minutos, após a administração intraperitoneal de salina. No terceiro dia, os sujeitos deste grupo foram familiarizados ao novo ambiente (caixa de odor). Durante a familiarização, uma flanela enrolada e sem odor foi afixada na parede da caixa, oposta ao ambiente fechado e exposta a todos os animais. No quarto dia, uma flanela semelhante àquela utilizada na familiarização, porém contendo 15 g de pó de café, foi usada como fonte do

estímulo olfatório durante o teste. No dia 5, os animais foram novamente colocados na caixa de odor na presença da flanela sem odor.

No dia 1, o segundo grupo foi também familiarizado por 5 minutos à caixa de condicionamento (como já mencionado), mas diferentemente do primeiro grupo, no dia 2 estes sujeitos foram re-expostos ao aparato na ausência do odor de café por 2,5 minutos, após a administração intraperitoneal de salina. No terceiro dia, os sujeitos foram familiarizados ao novo aparato, caixa de odor e, no dia 4, esse grupo de animais foi exposto ao estímulo olfatório, odor de café, pela primeira (e única) vez na caixa de odor. No quinto dia, os animais foram re-expostos à caixa de odor na presença da flanela sem odor. Todas as sessões na caixa de odor, para ambos os grupos, possuem duração de 10 minutos. Esses protocolos experimentais encontram-se ilustrados na figura 13.

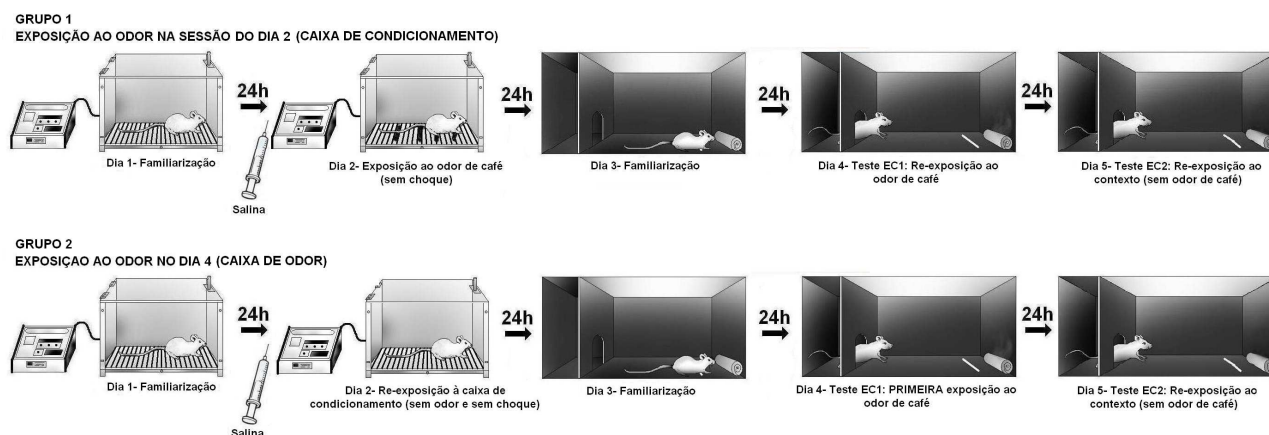


Figura 13. Esquema do protocolo experimental dos 2 grupos controles realizados para a validação do odor de café como estímulo olfatório neutro: exposição ao odor de café pela primeira vez na sessão do dia 2 (grupo 1) e exposição ao odor de café pela primeira vez na sessão do dia 4 (grupo 2).

A estratégia experimental utilizada nos grupos experimentais 1 e 2 foi assim delineada com o objetivo de observar, no primeiro grupo, a não emissão de comportamentos defensivos fruto de uma aversão mnemônica, a qual seria evocada no teste 1, uma vez que o odor de café

foi apresentado aos animais no dia 2 e re-exposto no teste 1. Já o segundo grupo estaria revelando uma aversão ao odor de café pelo efeito da novidade, já que este estímulo olfatório foi apresentado aos animais pela primeira e única vez na sessão de teste 1 (dia 4).

Resultados

Para os parâmetros de tempo de aproximação, tempo escondido, tempo absoluto de avaliação de risco e tempo relativo de avaliação de risco a ANOVA não detectou efeito significativo ($p > 0,1$) dos fatores: momento de exposição ao odor (grupo 1 e 2), repetição entre as sessões (familiarização, teste 1 e teste 2) ou interação entre estes fatores. Com relação à frequência de cruzamentos a ANOVA detectou efeito significativo apenas para o fator repetição [$F(1,14)=3,751$, $p < 0,05$] enquanto que para o momento de exposição ao odor e interação não houve diferença significativa. O teste de Duncan, realizado *a posteriori*, demonstrou que o efeito significativo ($p=0,04$) da frequência de cruzamentos encontrava-se no grupo exposto ao odor de café pela primeira vez no dia 4 (tabela 2) entre a sessão de familiarização e a sessão de teste EC1.

Com base nos dados do condicionamento olfatório de medo utilizando 5 pareamentos com choques elétricos nas patas – 0,4mA/2s/40s entre treinos – (Tabela 3; KROON, 2007), podemos sugerir que os grupos 1 (re-exposição ao odor de café) e 2 (primeira exposição ao odor de café) não produziram respostas defensivas evidentes (figura 14, 15 e tabela 4).

Tabela 3. Valores de referência dos parâmetros que avaliam a resposta defensiva na caixa de odor de ratos condicionados ao estímulo neutro, odor de café, com o estímulo incondicionado, choques elétricos nas patas, utilizando 5 pareamentos. Valores expressos em média \pm e.p.m. (Dados obtidos por KROON, 2007).

Parâmetro	Familiarização	Teste EC1	Teste EC2
Tempo aproximação (%)	19,4 \pm 2,9	9,6 \pm 2,9	9,5 \pm 1,4
Tempo escondido (%)	49,9 \pm 5,9	82,4 \pm 4,8	81,0 \pm 2,8
Tempo absoluto de avaliação de risco (s)	71,0 \pm 13,8	113,2 \pm 16,5	134,0 \pm 19,9
Tempo relativo de avaliação de risco (%)	23,9 \pm 2,7	22,7 \pm 2,7	27,3 \pm 3,6
Frequência de cruzamentos	16,0 \pm 0,7	10,7 \pm 2,2	11,7 \pm 1,3

Legenda: EC1= estímulo condicionado 1; EC2= estímulo condicionado 2

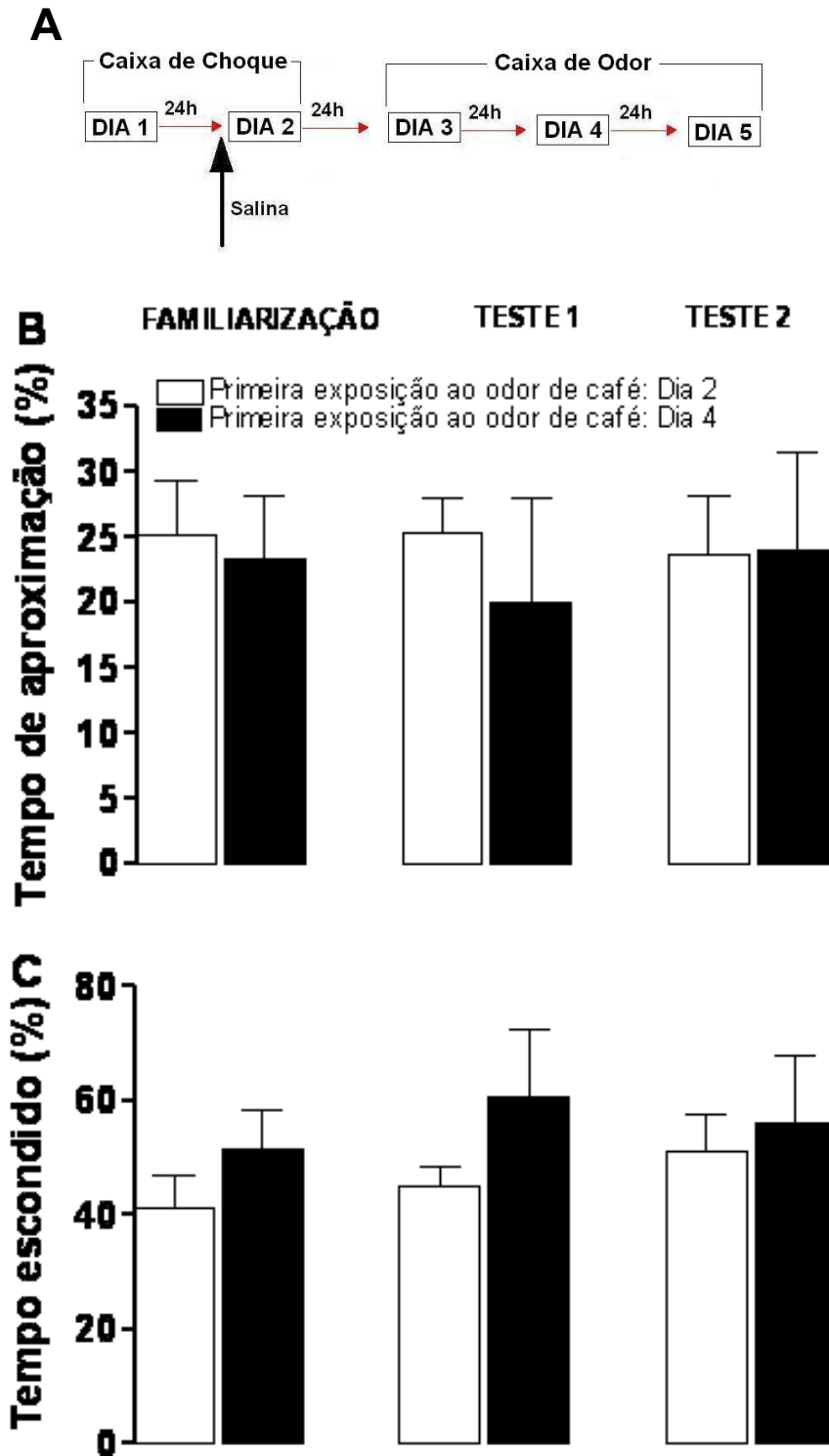


Figura 14. Avaliação da resposta defensiva de ratos expostos ao odor de café nas sessões de familiarização, teste 1 e teste 2 através do (B) tempo de aproximação (%) e do (C) tempo escondido (%). O protocolo experimental utilizado encontra-se ilustrado em (A). As barras brancas (grupo 1) representam os animais que foram expostos ao odor de café pela primeira vez no Dia 2 e re-expostos ao mesmo estímulo olfatório no Dia 4 (Teste 1). As barras pretas (grupo 2) representam os animais expostos pela primeira e única vez ao odor de café no Dia 4 (Teste 1). Ambos os grupos receberam, antes da sessão do Dia 2, injeção sistêmica de salina. Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. n= 6-10.

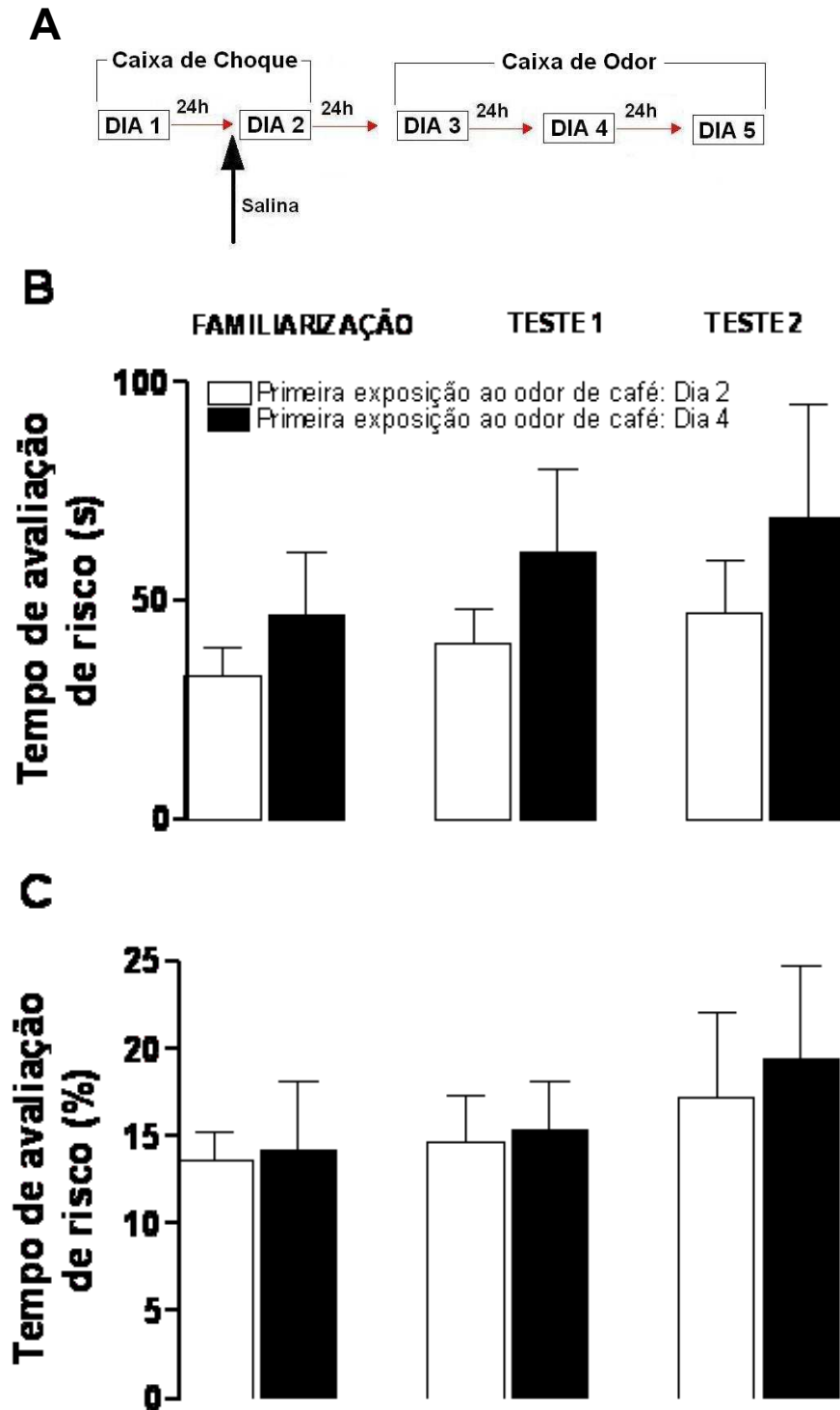


Figura 15. Avaliação da resposta defensiva de ratos expostos ao odor de café nas sessões de familiarização, teste 1 e teste 2 através dos parâmetros de (B) tempo absoluto (s) e (C) relativo (%) de avaliação de risco. O protocolo experimental utilizado encontra-se ilustrado em (A). As barras brancas (grupo 1) representam os animais que foram expostos ao odor de café pela primeira vez no Dia 2 e re-expostos ao mesmo estímulo olfatório no Dia 4 (Teste 1). As barras pretas (grupo 2) representam os animais expostos pela primeira e única vez ao odor de café no Dia 4 (Teste 1). Ambos os grupos receberam, antes da sessão do Dia 2, injeção sistêmica de salina. Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. $n = 6-10$.

Tabela 4. Frequência de cruzamentos de ratos expostos ao odor de café nas sessões de familiarização, teste 1 e teste 2. Os animais do grupo 1 foram expostos ao odor de café pela primeira vez no Dia 2 e re-expostos a este estímulo olfatório no Dia 4 (Teste 1). Os animais do grupo 2 expostos pela primeira e única vez ao odor de café no Dia 4 (Teste 1). Ambos os grupos receberam, antes da sessão do Dia 2, injeção sistêmica de salina. Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ comparado a sessão de familiarização. $n = 6-10$.

Grupos experimentais	Familiarização	Teste 1	Teste 2
<i>Grupo 1 - Primeira exposição ao odor de café: Dia 2</i>	22,2 \pm 2,0	22,2 \pm 2,2	18,8 \pm 2,3
<i>Grupo 2 - Primeira exposição ao odor de café: Dia 4</i>	19,8 \pm 2,3	15,3 \pm 3,6 (*)	16,2 \pm 3,5

Discussão

O odor de café apresenta aroma bastante característico por conter em sua composição inúmeros compostos voláteis presentes em diferentes concentrações e intensidade. Estes compostos são produzidos basicamente durante a torrefação do café verde (CZERNY & GROSCH, 2000). Apesar de tal complexidade em seu aroma, Sakai & Imada (2003) afirmam que o odor de café não causa preferência nem aversão em ratos sendo, então, considerado como estímulo neutro. Por esse motivo, estes dados da literatura já permitem a utilização desse estímulo olfatório como estímulo olfatório condicionado. Contudo, com o intuito de confirmar a neutralidade ou irrelevância biológica do odor de café também nas condições experimentais deste laboratório, realizou-se os 2 estudos experimentais já descritos (figura 13). A administração de salina, antes da sessão de condicionamento, teve por finalidade descartar a hipótese da emissão de comportamentos defensivos em virtude da injeção e/ou manipulação dos animais nos tratamentos posteriores com salina ou PTZ. Dessa forma, a diferença no delineamento experimental entre os grupos foi que o primeiro deles foi apresentado ao odor de café no dia 2 - sem receber qualquer EI aversivo - e, re-exposto a este

estímulo olfatório no dia 4, onde os parâmetros relacionados ao comportamento defensivo foram obtidos, ao passo que os animais do grupo 2 foram apresentados ao odor de café apenas durante a sessão de teste 1 (dia 4), onde os dados comportamentais foram adquiridos. De acordo com os resultados obtidos (figura 14 e 15), pôde-se observar que em ambos os grupos a exposição ao odor de café não foi capaz de gerar alterações significativas no comportamento defensivo de ratos, visto que o perfil comportamental observado manteve-se semelhante daquele observado na sessão de familiarização. Este perfil exibido nas sessões de teste 1 e teste 2 também mostrou-se diferente daquele observado durante a exposição de ratos ao odor de café quando previamente pareado com 5 choques elétricos nas patas, no qual, os mesmos parâmetros evidenciaram uma resposta robusta de medo condicionado ao odor (Tabela 3; KROON, 2007), confirmando os dados de Sakai & Imada (2003) quanto a neutralidade deste estímulo olfatório. Dessa forma, confirmou-se nas condições experimentais deste laboratório a neutralidade do odor de café, permitindo seu uso como EC1 nas etapas posteriores do presente trabalho.